

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790644

研究課題名 (和文) T細胞由来 TNFSF15 はクローン病発症に関与するか？

研究課題名 (英文) TNFSF15 derived from T cells may play an important role in the pathogenesis of Crohn's disease.

研究代表者

角田 洋一 (KAKUTA YOICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：50509205

研究成果の概要 (和文)：

クローン病感受性遺伝子 TNFSF15 は単球系培養細胞では LPS による刺激で TNFSF15 の発現が亢進し、それは NFkappaB 経路が関与していることが分かった。また、その予測結合部位には SNP が存在しないことから、遺伝子多型によって単球系細胞での TNFSF15 発現が変化しないことに矛盾せず、TNFSF15 遺伝子多型が T 細胞特異的に転写制御にかかわるメカニズムの一部が解明された。

研究成果の概要 (英文)：

We analyzed the transcriptional mechanisms of TL1A induced by LPS using the human monocytic cell line U937, LPS induces TL1A expression through the transcriptional activation via a NF-kappa B pathway. The NF-kappa B binding site in the 5' flanking region of TL1A was identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード： 炎症性腸疾患 感受性遺伝子 TNFSF15

## 1. 研究開始当初の背景

クローン病はその発症に遺伝因子が関与しており、NOD2/CARD15, IBD5 をはじめ、この数年の間に多数のクローン病感受性遺伝子候補が報告され、2005 年に日本人クローン病感受性遺伝子候補として TNFSF15 が報告された。また、TNFSF15 は、このような疾患感受性遺伝子として注目される以前から、クローン病の病態に重要なサイトカインとして報告されていた。TNFSF15 は

DR3(TNFRSF25)のリガンドで、T細胞からの INF $\gamma$  産生を誘導する強力な T細胞刺激物質として働き、主に樹状細胞やマクロファージに発現し、小腸粘膜にホーミングする T細胞が刺激を受けやすいこと、クローン病患者の腸管病変部に TNFSF15 の発現が著明に増加していることなどから、クローン病の腸管病変局所での反応に重要なサイトカインと考えられている。そこで、TNFSF15 遺伝子多型が、実際の病変局所での発現増加にどの

ように関与していくのかを検討したところ、健常人の末梢血単核球のうちT細胞を刺激したときにリスクアレル由来の mRNA が有意に多く誘導されること、T細胞系培養細胞である Jurkat を用いたプロモーターアッセイで、5' 領域の-358C/T が regulatory に働いていることがわかった。この現象は単球系培養細胞の U937 など他の細胞種では確認されなかった。

この結果から、T細胞では、TNFSF15 は -358C/T 多型のために転写活性に違いがあり、リスクアレルをもつ個体では T細胞由来の TNFSF15 が増加し、腸管炎症に関与しクローン病に感受性を示していると予測される。しかし、TNFSF15 を主に発現している細胞は従来の報告によると樹状細胞などの抗原提示細胞であり、T細胞ではない。腸炎モデルマウスでの検討では、樹状細胞由来の TNFSF15 が、ナイーブ細胞の Th17 への分化に必要であること、炎症局所で TNFSF15 を最も発現しているのが樹状細胞であることなどが示されている。前述の機能解析での結果は T細胞特異的に-358C/T が regulatory SNP として働くことが示されており、ここに乖離がある。一方で樹状細胞などでの発現に比べるとわずかではあるものの、T細胞に発現している TNFSF15 の多くが小腸にホーミングする CD4(+)CCR9(+)の T細胞であるという報告があり、クローン病との関連が示唆される。そこで、T細胞由来の TNFSF15 が腸炎発症に重要であるかどうかを確認する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、日本人クローン病感受性遺伝子候補 TNFSF15 について、

(1) T細胞由来 TNFSF15 が発現亢進することが、クローン病の発症に関係しているかを確認すること

(2) 主たる TNFSF15 の産生細胞である単球系細胞が、遺伝子多型によって影響を受けないことについても、その発現制御メカニズムについて確認すること

(3) TNFSF15 がクローン病の発病だけでなく予後に関わるかどうか検討する。

以上から TNFSF15 遺伝子多型が感受性を示すメカニズムをより明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) T細胞由来TNFSF15が腸炎発症に影響を与えるかどうかの検討

①ドナーマウスからのCD45RB<sup>high</sup>細胞の採取  
SPF環境下の正常BALB/cマウスおよび、すでにトランスジェニック社に作成受託しているTNFSF15ノックアウトマウスを用意する。それぞれより、無菌的に脾臓を採取し浮遊細胞を

作成、MACDビーズを用いてCD4陽性細胞を選択する。PE標識抗マウスCD4抗体、FITC標識抗CD45RM抗体を用い、FACSでCD4陽性細胞中25-35%CD45RB<sup>high</sup>部分を分離する。

②SCIDマウスへのCD45RB<sup>high</sup>細胞の導入  
免疫不全マウスとして、SPF環境下正常C.B.-17 SCIDマウスを日本クレアより入手し、正常マウスおよびTNFSF15ノックアウトマウスから採取したCD4+CD45RB<sup>high</sup>細胞を腹腔注射し、SPF環境下で飼育する。

### ③腸炎発症の評価およびTNFSF15を含む各種サイトカインの変化の確認

CD4+CD45RB<sup>high</sup>TNFSF15(-/-) および CD4+CD45RB<sup>high</sup>TNFSF15(+/-) 導入SCIDマウスについて以下の点について比較検討を行う。

- 体重の変化、便の性状（下痢の有無）などの臨床症状の観察。
- 肉眼的組織学的大腸ならびに小腸の潰瘍形成の有無とその程度、炎症による腸管の短縮や浮腫による重量変化、周囲臓器への炎症浸潤の程度、脾臓など他臓器への影響の有無などの観察。
- 腸管粘膜炎症の程度をヘマトキシリン-エオジン染色標本で、スコア化して評価する。また、myeloperoxidase 活性の測定により炎症を客観的に評価する。
- 大腸ならびに小腸の粘膜の組織培養を行ない、培養上清中のサイトカイン分泌量をELISAにて測定する。
- 免疫染色により腸管粘膜でのTNFSF15の発現が、T細胞のTNFSF15をノックアウトすることで変化しているかを観察する。

### (2) 単球系細胞由来TNFSF15の発現制御メカニズムの検討

単球系細胞としてU937を用いて、LPS刺激によってTNFSF15が誘導されるメカニズムを明らかにする。

①RT-PCRを用いてLPS刺激によりU937細胞でTL1A mRNA発現が亢進することを確認する。

②TL1A遺伝子 5' 領域断片を挿入したレポータープラスミドを構築し、U937細胞に導入し、レポーターアッセイを行うことにより、mRNA発現亢進は転写活性亢進を介していることを明らかにする。

③TL1A遺伝子 5' 領域断片を順次deletionして挿入したレポータープラスミドを用いてレポーターアッセイを行い、LPSによる転写活性亢進に関与する領域を絞り込む。

④結合転写因子予測プログラムを用いた解析から、この領域に結合が予測される転写因子を予測する。

⑤従来までの文献的知見より、LPSによるTL1A転写活性亢進にはNF-kappa B経路が関与する可能性があり、④で予測された転写因子も含め、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を行い、TL1A 遺伝子5' 領域の予測された配列へのNF-kappa Bなどの結合を確認する。

⑥mutation assay にて同配列の重要性を示し、I-kappa B $\alpha$  の過剰発現実験を行い、NF-kappa B経路の関与を明らかにする。

### (3) TNFSF15遺伝子多型とクローン病予後との関連に関する解析

当科を受診した日本人CD患者203例において、TNFSF15の遺伝子型データをもとに、各CDリスクアレルをホモ接合で持つリスクホモ (RH) 群とそれ以外の群(non-RH群)にわけ、初回診断時の寛解導入後、再燃するまでの期間についてKaplan-Meier法を用いて検討しLog-rank検定により単変量解析を行う。また感受性遺伝子は臨床表現型と関連があることから、病型、診断時年齢、肛門病変の有無についても検討し、これらを交絡因子としてCOX比例ハザードモデルを用いて多変量解析も行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) TNFSF15 ノックアウトマウスを用いた検討

TNFSF15 ノックアウトマウスの作成を試みたが全例致死であったため、単球系細胞での発現制御に関わる解析を進めることとした。

##### (2) 単球系細胞における TNFSF15 転写制御の解析

①RT-PCRによってLPS刺激でU937細胞における TNFSF15-mRNA の発現が亢進することが確認された。

②deletion アッセイによって、U937 の TNFSF15 転写に関わる領域が、転写開始位置より-247 から-135 塩基の部位にあることが分かった。

③データベース予測により転写開始位置より-210 塩基の部位に NFkappaB の結合予測部位を認めた。

④NFkappaB を阻害するため I-kappa B $\alpha$  を過剰発現させたところ LPS 刺激によって TNFSF15 の発現は誘導されなかった。

⑤ EMSA によって -210 塩基にある NF-KappaB 結合予測部位への NF-KappaB 結合が確認された

⑥mutation assay で、同配列が NFkappaB を介した TNFSF15 の誘導に必要であることを確認した。

以上から、単球系細胞 U937 において、LPS 刺激による TNFSF15 転写には、-210 塩基への NF-KappaB の結合が関わることが分かった。同部位には日本人において多型が存在しないことから、この結果は、TNFSF15 遺伝子多型が単球系細胞での発現に影響しないことと矛盾しない。

##### (3) T細胞由来 TNFSF15 が疾患の予後に与える影響の検討

TNFSF15 遺伝子型をもとに、クローン病の初回寛解導入から再燃までの期間までを検討したところ、単変量解析では、有意に TNFSF15 遺伝子リスクハプロタイプをホモ接合で保有する患者が、それ以外より再燃しやすいことが分かった。しかし、多変量解析ではこの現象は確認されず、肛門病変の有無が予後と関連した。TNFSF15 遺伝子多型は肛門病変の有無と有意に相関しており、TNFSF15 遺伝子リスクハプロタイプをホモ接合でもつ患者は、肛門病変を有意に合併しやすいため、結果的に再燃しやすいことが予想された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

① Katsuya Endo, Yoshitaka Kinouchi, Yoichi Kakuta, Nobuo Ueki, Seiichi Takahashi, Tooru Shimosegawa, Involvement of NF-kappa B pathway in TL1A gene expression induced by lipopolysaccharide, Cytokine, 49, 215-220, 2010, 査読あり

② 角田洋一、木内喜孝、高橋成一、下瀬川徹、  
「炎症性腸疾患への今日的アプローチ・病  
因・病態生理-遺伝子異常面からみた」、成人  
病と生活習慣病、Vol140 No12、1351-56、2010  
査読なし

③ 角田洋一、木内喜孝、遠藤克哉、根来健一、  
高橋成一、下瀬川徹「消化器領域における遺  
伝子多型検査」 分子消化器病 6(4) 370-374  
2009、査読なし

④ 角田洋一、木内喜孝、植木紳夫、遠藤克哉、  
根来健一、高橋成一、下瀬川徹「クローン病  
感受性遺伝子 TNFSF15 遺伝子多型における機  
能解析」 東北医学会雑誌 121 59-61 2009、  
査読なし

〔学会発表〕(計4件)

① Yoichi Kakuta, Yoshitaka Kinouchi,  
Seiichi Takahashi, Tooru Shimosegawa,  
Functional analysis of the candidate genes  
associated with Japanese IBD, The  
Kinshukai International Symposium, 2010  
年11月20日, 大阪

② Yoichi Kakuta, Yoshitaka Kinouchi, 他  
10名 The IL12B gene is associated with  
the clinical course of Crohn's disease in  
Japanese patients. 18th UEGW, 2010年10  
月27日, バルセロナ(スペイン)

③ 角田洋一、木内喜孝、他10名「日本人ク  
ローン病感受性候補遺伝子  
TNFSF15, HLA-DQB1, IL12B と再燃率との関連  
について」 JDDW、2010年10月14日 横浜

④ Yoichi Kakuta, Yoshitaka Kinouchi,  
Seiichi Takahashi, Tooru Shimosegawa,  
Functional analysis of the candidate genes  
associated with inflammatory bowel  
disease using allelic expression  
imbalance analysis, US-Japan GI Executive  
meeting 2010年6月18日, 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

角田 洋一 (KAKUTA YOICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講  
師

研究者番号：50509205