

平成21年 5月21日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580322
 研究課題名（和文） 鶏新規サイトカイン腫瘍壊死因子様リガンド1Aの機能解析
 —効率的家禽生産への基礎—
 研究課題名（英文） Functional characteristics of tumor necrosis like ligand 1A in a
 novel avian cytokine —foundation block to efficient poultry
 production—
 研究代表者 高橋 和昭（TAKAHASHI KAZUAKI）
 東北大学・大学院農学研究科・助教
 研究者番号：80183440

研究成果の概要：

- ①ニワトリ腫瘍壊死因子様リガンド1A(TL1A)は炎症反応において、哺乳動物腫瘍壊死因子(TNF)- α と同等の作用を有することを明らかにした。
 ②鶏 TL1A は哺乳動物 TNF と類似した情報伝達機構により種々の作用を表すことを明らかにした。
 ③飼料中グリシン含量の増加により TL1A 及びその他の前炎症サイトカイン発現を調節できることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 応用動物科学

キーワード：応用動物・畜産学・免疫学・シグナル伝達・ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の学術的背景

平成17-18年度科学研究基盤研究で、鳥類において Tumor necrosis factor like ligand 1A (TL1A) をクロニンシ機能の一部を世界で初めて示した (Takimoto, Takahashi, et al., Develop. Comp. Immunol., 29:895-905, 2005)。本試験は、TL1A 機能解析をさらに進め、効率的かつ健全な鶏生産のための TL1A 産生調節法や利用法のための基礎知見を得ることを目的としている。

(2) 社会的、学術的背景

①畜産食品の低または無薬剤化は消費者ニーズであり、今後、家畜・家禽生産においても抗菌物質を使用しない生産手法が必要となる。低または無薬剤飼養条件下での、家禽・家畜の免疫機能の増進は、疾病を予防する見地から重要であり、動物福祉や効率的生産の基礎となる。一方で、抗菌物質など薬剤を使用しない動物生産方法は生産性の低下をまねくことが知られている (松下, 高橋, 家禽学会誌 41:J57-J67, 2004.)。

②免疫は特異的抗原を認識しない自然免疫と特異的抗原を認識する獲得免疫に大別され、相互に密接な関連を保ちつつ生体防御に関わっている。免疫能の活性化時には免疫担当細胞および急性期タンパク質、抗体など特異的物質の合成などのために摂取および体内蓄積栄養素の再分配が必要となる。すなわち、免疫機能活性時には、免疫系不活性時における成長、生産のための栄養素分配より生体防御のための栄養素分配が多くなる (Takahashi., J Integrated Field Sci., 3:1-6. 2006)。

③自然免疫、特に、病原菌を殺菌する際の炎症応答が過度に活性化された場合には栄養素の損耗すなわち生産のための栄養素の損耗を生じるとともに、炎症応答は非特異的であり異常細胞のみならず正常細胞にも生体自体への悪影響が知られている。炎症反応はインターロイキン (IL) 1-および 6 腫瘍壊死因子 (TNF) α などの前炎症性サイトカインを初発の情報伝達因子として反応が進み、獲得免疫の調節にも関与する。従って、自然免疫の適切な調節は飼料栄養素の生産への有効な利用と生体防御の適切な発動に不可欠である。すなわち、自然免疫調節は、無薬剤飼養条件下ばかりでなく従来の薬剤使用条件下での飼育条件下でも、動物生産の効率的生産の根幹をなすと考えられる。

④鳥類において IL-1 および 6 はクローニングされてはもの、TNF- α はクローニングされていない。申請者は平成 17-18 年度科学研究基盤研究の試験遂行過程で、鳥類には哺乳類 TNF- α ホモログが存在している可能性は低く、TNF ligand ファミリーに属する Tumor necrosis factor like ligand 1A (TL1A) が機能代替している可能性が高いことを世界で初めて示した (Takimoto, Takahashi, et al., Develop. Comp. Immunol., 29:895-905. 2005)。

⑤哺乳動物 TNF- α は免疫、代謝など恒常性維持に深く関わっていることから、TL1A が鶏において哺乳動物 TNF- α の数多くの機能を代替しているとすれば、その産生調節は、鶏生体防御および生産上の意義は大きいと考えられる。さらに近年の哺乳動物 TL1A 研究において、TL1A とその受容体が、腸管免疫系の恒常性維持に TNF- α とは異なった経路で働いていることが認識されている。したがって、鶏 TL1A は哺乳動物の TL1A と TNF- α の両方の機能を持つ可能性も十分考えられる。

2. 研究の目的

鶏腫瘍壊死因子様リガンド (TL) 1A は炎症応答時での哺乳動物の腫瘍壊死因子 (TNF) α の機能代替分子であることを以下の点から明らかにする。

(1) TL1A を鶏自体や培養鶏免疫担当細胞への投与または添加する。その後、前炎症性サイトカイン発現変化、前炎症性サイトカイン産生後の炎症反応を酵素活性や関連物質の産生変化を調査する。

(2) TL1A 抗体を作成し、炎症反応誘発処理鶏や培養鶏免疫担当細胞に抗体投与を投与、炎症反応の変化を調査する。これらから鶏 TL1A が哺乳動物 TNF α 様作用を有するかを検討する。

(3) 鶏 TNF 受容体ファミリーの組み換えタンパク質を大腸菌を用いて作成し、TL1A との結合能力を調査する。CHO 細胞に既知の鶏 TNF 受容体ファミリーを発現させ、細胞生存活性から TL1A との受容体結合を調査とともに TL1A の細胞内情報伝達機構の一端を明らかにする。

これらのことから、哺乳動物 TNF α との異同を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 生体反応からの検証

自然免疫活性化時、特に、炎症応答時には、TNF- α は炎症惹起因子として、前炎症性サイトカイン IL-1 および IL-6 産生促進により後述する一連の炎症応答惹起を増強する。そこで、鶏 TL1A 投与または添加後の免疫担当細胞、組織そして鶏自体で、前炎症性サイトカインの産生、シクロオキシゲナーゼ-2 および誘導型一酸化窒素合成酵素発現上昇、前炎症性因子プロスタグランジン E2、誘導型一酸化窒素および IL-8 などのケモカイン産生上昇、後炎症物質である急性期タンパク質 (α 1 産生糖タンパク質やセルロブラスミン) 産生変化が起きているか否かを遺伝子発現、酵素活性、血中、組織または培養液中の物質濃度の変化から検討する。さらに、申請者が作成済み炎症モデル鶏にウサギまたはマウスを用いて作成するポリまたはモノクローナル抗体 (委託または申請者作成) を投与したときの変化も併せて検討する。

(2) 応答の分子生物学的側面からの検証

TNF- α は TNF receptor superfamily (TNFR) に属する TNF receptor (TNFR1) 1 または TNFR 2 に結合することで、細胞内にシグナル伝達となされる。一方、TL1A は哺乳動物において TNFR の decoy receptor (DcR) 3 および death receptor (DR) 3 に対して結合能を有し、

DR3を介して細胞内にシグナル伝達が行なわれる。そこで、鶏TL1Aの受容体特定は、鶏TNFR1および2、DcR3のバイディングアッセイにより特定する。さらに、鶏TNFR1および2、DcR3遺伝子をCHO-K1細胞に形質導入した細胞に対して鶏TL1Aが細胞誘導死作用を示すかどうか検討し、鶏TL1Aの受容体を特定する。すなわち、鶏 TNFR1、鶏 TNFR2、鶏 DcR3 受容体の GST または Flag 結合性蛋白質を作成しとの鶏 TL1A との結合能力をバイディングアッセイにより測定する。鶏 TNFR1、鶏 TNFR2、鶏 DcR3 受容体の全長 ORF を PCR によって増幅し、制限サイトを持つ PCR 産物を作成し、ライゲーションする。その後、鶏 TNFR1、鶏 TNFR2、鶏 DcR3 受容体 cDNA 候補を含む組み替えプラスミドを大腸菌にトランスフォーメーションする。GST または Flag 結合性蛋白質と鶏 TNFR1、鶏 TNFR2、鶏 DcR3 蛋白質の融合物を得るために組み替えプラスミドから得たプラスミドにサブクローニングする。融合蛋白質はアフィニティークロマトグラフィーにより生成後、候補蛋白質を分離する。

4. 研究成果

(1) 腫瘍壊死因子様受容体(TL)1A 融合蛋白質および抗体を用いた TL1A 機能の検証

TL1A 融合蛋白質および抗体を作成し、鶏における TL1A の機能を検証した。TL1A 融合蛋白質投与により肝臓、脾臓のインターロイキン(IL)-1,IL-6,インターフェロン(IFN)- γ および TL1A の前炎症性サイトカイン mRNA の増加を観察した (図-1)。LPS 投与ニワトリへの TL1A 抗体投与は、LPS 投与による急性期蛋白質と誘導型一酸化窒素の増加の抑制すること明らかにした。これらのことから、ニワトリ TL1A は炎症反応において、哺乳動物腫瘍壊死因子(TNF)- α と同等の作用を有することを明らかにした。

(2) TL1A 受容体のクローニングと TL1A 情報伝達機構の解析

TL1A の情報伝達機構を知る目的で、TNF の主要な受容体との結合能から検討することを試みた。すなわち、ニワトリ腫瘍壊死因子受容体(TNFR)1、2 および DcR3 をクローニングしそれぞれの融合蛋白質を作成した後、TL1A との結合能を検討し、TL1A はいずれの受容体とも結合することを確認した。さらに、CHO 細胞へニワトリ TNFR1、2 および DcR3 を形質導入し、TL1A を投与したところ各受容体を形質導入した細胞において TL1A 添加濃度依存的に細胞活性の低下を確認した (図-2)。次に、肝臓、脾臓において、TL1A 投与後の TNF- α の情報伝達核内転写因子 NF- κ B 活性化によって誘起される iNOS,COX-2 mRNA の増加も観察した。これらのことから鶏 TL1A は哺乳動物 TNF と類

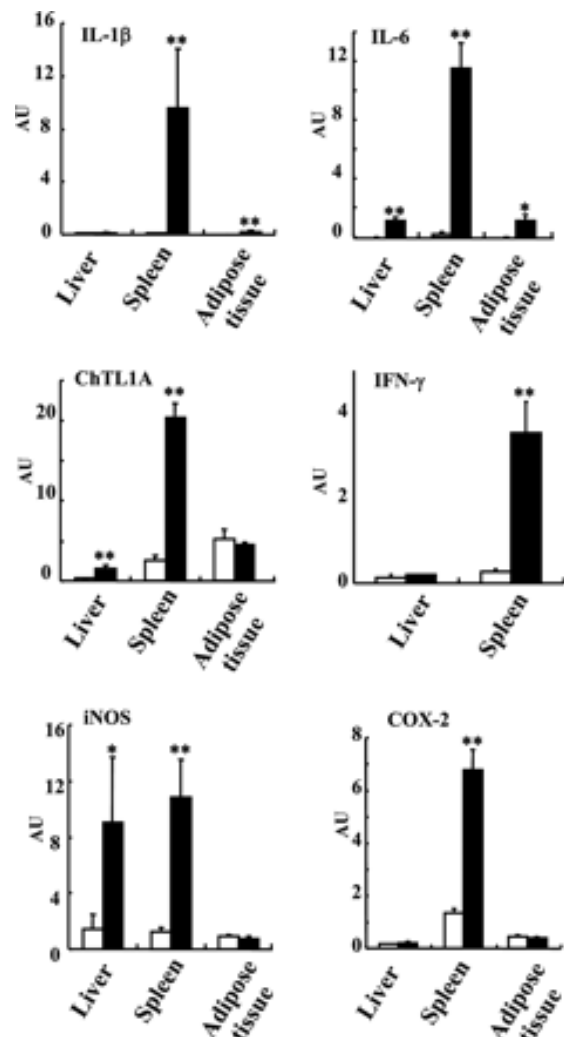


図-1. TL1A 投与時の肝臓、脾臓のインターロイキン(IL)-1,IL-6,インターフェロン(IFN)- γ および TL1A の前炎症性サイトカイン mRNA 量

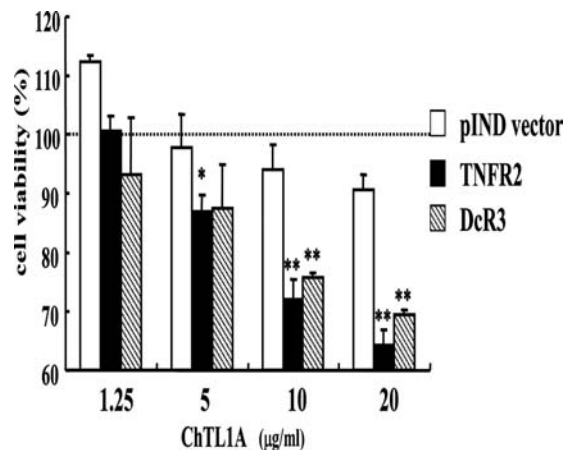


図-2. TL1A を投与の TNF 受容体導入 CHO 細胞の細胞活性

似した情報伝達機構により種々の作用を表

すことを明らかにした。

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2件)

- ① T. Takimoto, K. Sato, Y. Akiba and K. Takahashi/Role of chicken TL1A on inflammatory responses and partial characterization of its receptor/Journal of Immunology/査読有/180/2008/8327-8332
- ② K. Takahashi, A. Aoki, K. Takimoto and Y. Akiba/Dietary Supplementation of glycine modulates inflammatory response indicators in broiler chickens/British Journal of Nutrition/ 査 読 有 /100/2008/1019-1028

[学会発表] (計3件)

- ① 高橋和昭, 井上襟佳/ブロイラーの肝臓及び脾臓におけるiNOS及びその関連遺伝子発現に対するアスコルビン酸の影響/2009年度日本家禽学会春季大会/2009. 3. 28/藤沢市・日本大学
- ② 井上襟佳, 高橋和昭/アスコルビン酸給与した採卵鶏および肉用鶏ヒナのLPSに対する反応性の異同/2008年度日本家禽学会秋季大会/2008. 9. 26/十和田市・北里大学
- ③ 滝本哲也, 高橋和昭, 佐藤幹, 秋葉征夫/鶏腫瘍壊死様リガンド 1Aは前炎症性サイトカインとして機能する/2007年日本家禽学会秋季大会/2007. 9. 29/岡山大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 和昭 (TAKAHASHI KAZUAKI)
東北大学・農学研究科・助教
研究者番号: 80183440

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし