

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23857

研究課題名(和文) 腸管上皮細胞におけるTL1A-DR3の機能の解明

研究課題名(英文) Role of TL1A-DR3 in intestinal epithelial cells

研究代表者

下平 陽介 (Shimodaira, Yosuke)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20777982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞株(大腸癌細胞Caco2)を用い、DR3の発現を確認し、同時にsiRNAを用い遺伝子をノックダウンすることでDR3の発現が抑制されることを確認した。Caco2をシングルセルとして培地にまきTL1Aを負荷することで、細胞増殖が亢進することが確認された。MTTアッセイにより同様にTL1A負荷による細胞増殖亢進が確認され、LDHアッセイではTL1A負荷による細胞死の増加は確認されなかった。さらにTL1Aを負荷したときの遺伝子発現の変化をRNAsequenceで解析し、ミトコンドリアクレアチンキナーゼ関連遺伝子、ペルオキシソーム形成関連遺伝子の発現変化を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TL1A-DR3サイトカイン-受容体シグナルは様々な炎症性疾患に関与していることが知られている。しかし、作用する細胞やまわりの環境によりその機能が異なる可能性があり、今回の研究では新たに腸管上皮細胞における役割が明らかとなった。今回明らかになった結果に基づきさらに研究展開が行われることで、腸炎のメカニズムが明らかとなり、治療応用などがなされることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The expression of DR3 in Caco2 was confirmed by realtime PCR, and the expression of DR3 was knocked down using siRNA. Single Caco2 cell in culture media was proliferated more with TL1A. MTT assay also confirmed proliferation under TL1A treatment, though LDH assay did not confirm an increase in cell death under TL1A treatment. Furthermore, gene expression alteration with TL1A was analyzed by RNA sequence, and alteration in expression of mitochondrial creatine kinase-related genes and peroxisome formation-related genes were confirmed.

研究分野：消化器内科学

キーワード：TL1A 腸管上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(Inflammatory bowel disease:IBD)は、消化管に原因不明の炎症を来す潰瘍性大腸炎とクローン病を総称して呼び、これらは共に厚生労働省の指定難病に指定され患者数も増え続けている。発症には複雑なメカニズムが関与し、免疫などに関わる遺伝子の変異、腸内細菌を含めた腸管内容物に対する異常免疫応答などが疾患の発症や維持に関わることが知られている。

TL1A は、TNF superfamily member であり、TL1A を encode している TNFSF15 は健常者と比べ IBD 患者におけるその遺伝子多型の頻度が日本人および欧米人で高く、人種差を超えて病態に関わることが示唆されている。TL1A は血管内皮細胞より分泌され特に TH1 細胞を中心とした T 細胞の活性、増殖、細胞生存に関わるサイトカインとして報告された。ヒトにおいては decoy receptor の存在が知られるものの、その機能性受容体としては DR3 が唯一知られている。さらに TL1A-DR3 はその後の研究で自然免疫細胞や線維芽細胞に作用し活性化や増殖に関わるなど幅広い機能を有することがわかってきた。実際に TL1A 遺伝子多型があると、ヒト腸管粘膜内の TL1A 濃度が増加していることも示されている。また、マウス生体内で Dr3 が腸管上皮細胞に発現していることが示され、さらに腸管上皮特異的に Dr3 を欠損したマウスでは腸管粘膜の透過性が亢進することなどが示された。ヒト腸管上皮細胞においても DR3 が発現していることも示されており、腸管上皮細胞における TL1A-DR3 の機能についてはさらなる検討が必要と考えられる。自己免疫性脳脊髄炎、アレルギー性肺炎、関節炎などの炎症性疾患のマウスモデルでは Tl1a や Dr3 のノックアウトなどにより炎症が軽快することが知られ、TL1A-DR3 が炎症に寄与していることが報告されているが、腸炎マウスモデルにおいては抗 TL1A 抗体が慢性 DSS 腸炎を軽快するが、コンベンショナルノックアウトマウスを用いた検討では Tl1a および Dr3 の遺伝子欠損により急性 DSS 腸炎が増悪することが報告されていた。このように腸炎マウスモデルにおいては TL1A-DR3 が炎症を増悪するか、あるいは逆に保護的に作用するのか、矛盾に思われる結果が報告されていたが、腸管上皮細胞における TL1A-DR3 の役割が明らかになったことで説明可能となった。臨床的には TL1A-DR3 が IBD にどのように関わるかには未だ不明な点が多く、腸管上皮細胞における上皮修復機構などに関わっている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は腸管上皮細胞における TL1A-DR3 の機能およびその分子メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

大腸癌培養細胞である Caco2 を用い、TL1A の作用を in vitro で確認する。また、TL1A-DR3 シグナルによる分子メカニズムを明らかにする。

細胞より RNA を抽出し、遺伝子発現を検討する。Electroporation にて siRNA をトランスフェクションする。recombinantTL1A を Caco2 に負荷することで、Caco2 の細胞増殖や細胞死の変化を検討する。コントロール、TL1A 負荷群、siDR3 群、siDR3+TL1A 負荷群での遺伝子発現の変化を RNA sequence で解析する。

4. 研究成果

培養細胞株(大腸癌細胞 Caco2)における DR3 の遺伝子発現を Realtime PCR で確認した。同時に siRNA を用い DR3 遺伝子をノックダウンすることで DR3 の発現が抑制されることを確認した。Caco2 をシングルセルとして 96 ウェルプレート内の培地にまき、TL1A を負荷することで、コントロールと比較して細胞増殖が亢進することが確認された。MTT アッセイにより同様に TL1A 負荷による細胞増殖亢進が確認され、一方 LDH アッセイでは TL1A 負荷による細胞死の増加は確認されなかった。さらに TL1A を負荷したときの遺伝子発現の変化を RNA sequence で解析し、ミトコンドリアクレアチンキナーゼ関連遺伝子、ペルオキシソーム形成関連遺伝子の発現変化を確認した。

TL1A-DR3 サイトカイン-受容体シグナルは様々な炎症性疾患に関与していることが知られている。しかし、作用する細胞やまわりの環境によりその機能が異なる可能性があり、今回の研究では新たに腸管上皮細胞における役割が明らかとなった。今回明らかになった結果、特に TL1A-DR3 シグナルとミトコンドリアクレアチンキナーゼ、ペルオキシソーム形成の関連は知られておらず、これらの結果に基づきさらに研究展開を行うことで、腸管上皮細胞に関わる腸炎のメカニズムが明らかとなる可能性がある。炎症性腸疾患における治療ターゲットとしてサイトカインや接着因子などを標的としたものは存在するが、腸管上皮を標的としたものはなく新たな mode of

action をもつ治療薬などへの応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------