

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月7日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21390114

研究課題名（和文） T細胞共刺激分子を標的とした炎症性腸疾患発症制御

研究課題名（英文） T-cell costimulation-mediated regulation of mucosal inflammation

研究代表者

石井 直人（ISHII NAOTO）

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60291267

研究成果の概要（和文）：

我々は、自身が開発した炎症性腸疾患（IBD）自然発症マウスが C57BL/6 系統依存的に IBD を発症することを利用して、マウス IBD 感受性遺伝子の同定を試みた。感受性遺伝子を同定するために、疾患感受性系統（C57B/6）と疾患抵抗性系統（BALB/c）を OX40L-Tg 背景下に交配し、IBD 重症度を指標として遺伝子連鎖解析等の種々の解析を行った。その結果、有力な候補遺伝子 HVEM を同定した。

研究成果の概要（英文）：

We examined a quantitative trait locus (QTL) that may make C57BL/6 (B6) mice susceptible and BALB/c mice resistant to IBD developing in OX40 ligand-transgenic (OX40L-Tg) mice. The locus exhibits highly significant logarithm of odd (LOD) score for the IBD severity. Further positional mapping performed using single nucleotide polymorphisms (SNPs) at this locus revealed the lowest p-value ($< 10^{-7}$) for the SNP in *TNFRSF14* gene. *TNFRSF14* encodes the herpes virus entry mediator (HVEM), which belongs to the TNF receptor superfamily.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：炎症性腸疾患、疾患感受性遺伝子、遺伝子導入マウス

1. 研究開始当初の背景
潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎

症性腸疾患（IBD）は原因不明の重篤な疾患であり、有効な治療法は確立されていない。

T 細胞共刺激分子である OX40L の遺伝子導入 (OX40L-Tg) マウスは C57BL/6 系統でのみ潰瘍性大腸炎様の IBD を自然発症するが BALB/c などの他のマウス系統では IBD を発症しない。すなわち、同マウスモデルでは C57BL/6 系統特異的な遺伝背景下に OX40 過剰シグナルが加わることにより発症すると考えられる。すなわち、同 IBD モデルマウスではヒト疾患と同様にその疾患発症が多因子遺伝を示す。従って、同マウスの IBD 感受性遺伝子が同定されれば、IBD 発症機序が明らかになるだけでなく、ヒト IBD の治療法開発にも直結する重要な知見が得られると考えられた。

2. 研究の目的

発症感受性系統 C57BL/6 系統と疾患抵抗性系統の BALB/c 系統の OX40L-Tg マウスを交配し、その子孫の疾患発症の重症度と各系統由来のマイクロサテライトマーカーを検索することにより、IBD 発症感受性遺伝子の同定できる可能性が考えられた。そこで、種々の方法で IBD 感受性遺伝子の同定を試みた。

3. 研究の方法

C57BL/6 系統の OX40L-Tg マウスでは 20 週齢までにはほぼ全例が IBD を発症するのに対し、BALB/c 系統の OX40L-Tg マウスでは IBD の発症がほとんどみられない。そこで、図 1 に示す通り、C57BL/6 系統 (IBD 感受性) の OX40L-Tg 雄マウスと BALB/c 系統 (IBD 抵抗性) 野生型雌マウスを交配した CBF1 背景 OX40L-Tg 雄マウスを作製し、その雄マウスをさらに C57BL/6 系統野生型雌マウスと交配した。交配により作製された 900 匹以上の (BALBxB6)xB6-N2 マウスの中で OX40L-Tg 遺伝子を有する 339 匹を用いて、IBD の重症度と腸管重量を指標にした QTL 解析および相関解析を行うことにより IBD 感受性遺伝子座の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) マウス IBD 感受性遺伝子座の同定

第 4 番染色体、第 8 番染色体および第 19 番染色体に IBD の重症度と有意に相関する遺伝子座が同定された。その中で、第 4 番染色体のテロメア付近が最も重症度との相関が高かったことから、本研究では同部位に焦点を当てて研究を遂行した。その結果、IBD 発症に密接に関連する第 4 番染色体のテロメア付近の遺伝子座の存在が明らかになった。同遺伝子座はヒト第 1 染色体の 1p36 の相同部位であり、1p36 はヒト IBD の感受性遺伝子座 IBD7 として知られている(5)。従って、マウス第 4 番染色体上のマウス IBD 感受性遺伝子が同定できれば、その遺伝子がヒト IBD7 遺伝子座に存在する感受性遺伝子と同一で

ある可能性が考えられることから、次に、同遺伝子座に存在するマウス IBD 感受性遺伝子の同定を行った。

(2) マウス第 4 番染色体テロメア近傍遺伝子の解析

同定した第 4 番染色体のテロメア付近には約 70 個の遺伝子が存在することが、ゲノム情報から明らかであった。そこで、個々の遺伝子の中で、C57BL/6 系統と BALB/c 系統間で遺伝子多型がみられるものについて、IBD の重症度との相関の単点解析を行った。その結果、調べた範囲内では、HVEM (Herpes virus entry mediator; TNFRSF14) 遺伝子多型と IBD 重症度との相関が χ^2 検定で $p = 1.2 \times 10^{-8}$ と最も有意であった。また、同遺伝子座上の 65 個の遺伝子の脾臓と腸管における mRNA 発現量を OX40L-Tg 背景の C57BL/6 マウスと BALB/c マウスで比較したところ、いくつかの遺伝子の発現量に差がみられ、その中で HVEM の発現量は C57BL/6 の脾臓において BALB/c の脾臓に比し約 5 分の 1 程度であること分かった。さらに、脾臓における他のマウス系統 (野生型) でも HVEM を含むいくつかの遺伝子の発現量を検討したところ、調べた範囲では HVEM の発現だけが C57BL/6 系統特異的に低下していた。これまで、C57BL/6、NOD、BDF1、129 および BALB/c 系統の OX40L-Tg マウスを作製したが、これらの中で IBD の発症がみられたのは C57BL/6 系統のみであった。従って、IBD の発症がみられた C57BL/6 系統のみで HVEM の発現量が低下していることは、疾患の発症と HVEM の発現低下が密接に関連していることを示唆する。

(3) ヒト HVEM (TNFRSF14) 遺伝子多型と潰瘍性大腸炎発症との相関解析

HVEM はヒト IBD7 遺伝子座に存在することから、ヒト IBD においても HVEM がその発症に関与する可能性が考えられる。そこで、潰瘍性大腸炎患者 279 人とコントロール健常人 478 人において 8 カ所の HVEM (TNFRSF14) 遺伝子の SNPs と SNP ハプロタイプの頻度の差異について統計学的解析を行った。しかし、調べた SNPs およびハプロタイプの頻度について患者と健常人で有意な差は認められなかった。少なくとも日本人の潰瘍性大腸炎発症においては HVEM 遺伝子の関与を確認することはできなかった。

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 16 件)

1. Moriya K, Suzuki M, Watanabe Y, Takahashi T, Aoki Y, Uchiyama T, Kumaki S, Sasahara Y, Minegishi M, Kure S, Tsuchiya S, Sugamura K, and Ishii N.: Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice. *PLoS ONE*, in press, 2012
2. Wong WF, Kohu K, Nakamura A, Ebina M, Kikuchi T, Tazawa R, Tanaka K, Kon S, Funaki T, Sugahara-Tobinai A, Looi CY, Endo S, Funayama R, Kurokawa M, Habu S, Ishii N., Fukumoto M, Nakata K, Takai T, and Satake M.: Runx1-deficiency in CD4⁺ T cells causes fatal autoimmune inflammatory lung disease due to spontaneous hyperactivation of cells. *J. Immunol.* in press, 2012
3. Suzuki M, Takahashi T, Katano I, Ito R, Ito M, Harigae H, Ishii N., and Sugamura K.: Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/ γ ^{null} mouse. *Int. Immunol.*, 24: 243-252, 2012.
4. Rabieyousefi M, Soroosh P, Satoh K, Date F, Ishii N., Yamashita M, Oka M, McMurtry IF, Shimokawa H, Nose M, Sugamura K, and Ono M.: Indispensable roles of OX40L-derived signal and epistatic genetic effect in immune-mediated pathogenesis of spontaneous pulmonary hypertension. *BMC Immunol.*, 12: 67, 2011
5. Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N., and Ogasawara K.: Interaction between NK cells and dendritic cells generate MHC class II-dressed NK cells to regulate CD4⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 18360-5, 2011
6. Chagan-Yasutan H, Tsukasaki K, Takahashi Y, Oguma S, Harigae H, Ishii N., Zhang J, Fukumoto M, and Hattori T.: Involvement of osteopontin and its signaling molecule CD44 in clinicopathological features of adult T cell leukemia. *Leuk Res.* 35: 1484-90, 2011
7. Kamada, F., Aoki, Y., Narisawa, A., Abe, Y., Komatsuzaki, S., Kikuchi, A., Kanno, J., Niihori, T., Ono, M., Ishii, N., Owada, Y., Fujimura, M., Mashimo, Y., Suzuki, Y., Hata, A., Tsuchiya, S., Tominaga, T., Matsubara, Y, and Kure, S.: A genome-wide association study identifies *RNF213* as the first Moyamoya disease gene. *J. Hum. Genet.*, 56: 34-40, 2011
8. Nakano, M., Fukumoto, Y., Satoh, K., Ito, Y., Kagaya, Y., Ishii N., Sugamura, K., and Shimokawa, H.: OX40 ligand plays an important role in the development of atherosclerosis through vasa vasorum neovascularization. *Cardiovasc. Res.* 88: 539-546, 2010
9. Kimura, O., Takahashi, T., Ishii N., Inoue, Y., Ueno, Y., Kogure, T., Fukushima, K., Shiina, M., Yamagiwa, Y., Kondo, Y., Inoue, J., Kakazu, E., Iwasaki, T., Kawagishi, N., Shimosegawa, T., and Sugamura, K: Characterization of the EpCAM⁺ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Sci.*, 101: 2145-2155, 2010
10. Shiokawa, M., Takahashi, T., Murakami, A., Kita, S, Ito, M., Sugamura, K., and Ishii, N.: In vivo assay of human NK-dependent ADCC using NOD/SCID/ γ ^{null} (NOG) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 399: 733-737, 2010
11. Shima, T., Sasaki, Y., Itoh, M., Nakashima, A., Ishii N., Sugamura, K., and Saito, S.: Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice. *J. Reprod. Immunol.*, 85: 121-129, 2010
12. Ishii, N., Takahashi, T., Soroosh, P., and Sugamura, K.: OX40-OX40L ligand interaction in T cell-mediated immunity and immunopathology, *Adv. Immunol.*, 105: 63-98, 2010
13. Damayanti T, Kikuchi T, Zaini J, Daito H, Kanehira M, Kohu K, Ishii N., Satake M, Sugamura K, and Nukiwa T.: Serial OX40 engagement on CD4⁺ T cells and NKT cells causes allergic airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 181: 688-698, 2010
14. Hatta, M., Yamamoto, N., Miyazato, A., Ishii, N., Nakamura, K., Inden, K., Aoyagi, T., Kunishima, H., Hirakata, Y., Suzuki, K., Kaku, M., and Kawakami, K.: Early production of tumor necrosis factor-alpha by Gr-1(+) cells and its role in the host defense to pneumococcal infection in lungs. *FEMS Immunol & Medical Microbiol.* 58: 182-192, 2010
15. Watanabe, Y., Takahashi, T., Okajima, A., Shiokawa, M., Ishii, N., Katano, I., Ito, R.,

Ito, M., Minegishi, M., Minegishi, N., Tsuchiya, S., and Sugamura, K.: The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/ γ c^{null} (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *Int. Immunol.* 21: 843-858, 2009

16. Satoh, K., Fukumoto, Y., Nakano, M., Sugimura, K., Nawata, J., Demachi, J., Karibe, A., Kagaya, Y., Ishii, N., Sugamura, K., and Shimokawa, H.: Statin ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension associated with down-regulated stromal cell-derived factor-1. *Cardiovasc. Res.*, 81, 226-34, 2009

[学会発表] (計7件)

国際学会口頭発表のみ記載

1. The first CSI/JSI/KAI joint symposium on Immunology (Shanghai, China, November 6-8, 2009) Naoto Ishii: Roles of OX40 in the generation and maintenance of memory T cells.
2. 3rd NM-GCOE international symposium (Sendai, Dec 7-8, 2009) Naoto Ishii: Roles of OX40 signals in the generation and maintenance of memory T cells.
3. 3rd NM-GCOE international symposium (Sendai, Dec 7-8, 2009) Asao A, Sugamura K, and Ishii N.: OX40-mediated susceptibility to Leishmania infection is dependent on IL-13
4. 14th International Congress of Immunology (Kobe, Japan, Aug 22-27, 2010) Kawabe T, Irie M, Ono M., Asao A, Zhang M, Yoshida A, Takahashi T, Uede T, Watanabe N, Sugamura K, and Ishii N.: Positional identification of TNFRSF14, encoding the herpes virus entry mediator, as a susceptibility gene for inflammatory bowel disease in mice
5. 14th International Congress of Immunology (ICI2010) (Kobe, Japan, Aug 22-27, 2010) Asao A, Ndhlovu LC, Hoshino T, Sugamura K, and Ishii N.: OX40-Mediated Susceptibility to *Leishmania major* Infection is Dependent on IL-13.
6. 14th International Congress of Immunology (ICI2010) (Kobe, Japan, Aug 22-27, 2010) Takahashi T, Suzuki M, Katano I, Ito R, Ishii N., Ito M, and Sugamura K.: The analysis of the functions of human T cells in humanized NOD/shi-scid/ γ c^{null}

(NOG)-HLA transgenic mice.

7. 40th JSI international symposium, (Chiba, Nov 27-29, 2011) Ishii N.: OX40 contributes to the generation and maintenance of memory CD4⁺ T cells

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.immunol.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 直人 (ISHII NAOTO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60291267

(2) 研究分担者

小野 栄夫 (ONO MASAO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20302218

(H21-H22)

木内 喜孝 (KINOUCHI YOSHITAKA)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20250780

(H21-H22)