

機関番号 : 37104

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009 ~ 2010

課題番号 : 21790690

研究課題名 (和文) 炎症性腸疾患における TL1A の役割について

研究課題名 (英文) The role of TL1A in inflammatory bowel disease

研究代表者

竹田津 英稔 (HIDETOSHI TAKEDATSU)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号 : 80352144

研究成果の概要 (和文) : 炎症性腸疾患における TL1A の役割について多数の報告がある。今回、私たちは急性腸炎モデルにおける TL1A の役割および TL1A と Th2 の関係についても検討を行った。急性腸炎モデルにおいてマクロファージからの TL1A の発現の増加、そして腸管上皮にはそのレセプターである DR3 の発現が増加していた。Human 由来の腸管上皮細胞株を使用し、DR3 の発現について検討を行ったところ IL-1+IL-6 の炎症刺激により上皮における DR3 の発現が増加することが分かった。患者手術標本において腸管上皮の DR3 の発現を検討したところクローン病患者の腸管上皮において DR3 の発現が増加していた。その結果、マクロファージや樹状細胞から分泌された TL1A と腸管上皮の DR3 との関連が示唆された。急性腸炎モデルマウスに対し抗 TL1A 中和抗体を行ったところ腸炎の改善傾向を認めたが、有意差を得ることができなかった。抗体量を十分に確保することが困難であるため、私たちは TL1A に対する siRNA を作製した。今後 TL1A の siRNA 局所投与により腸管上皮に対する役割を検討する。

また、TL1A による T 細胞の活性化については報告されているが、Th2type の腸炎に対する役割についてはまだ解明されていない。今回、Th2 が関与する腸炎モデルである SAMP1/Yit マウスを使用し TL1A について検討を行ったところ、腸炎組織において TL1A の発現は増加。腸管膜リンパ節より細胞を分離し、TL1A で刺激を行ったところ、Th1、Th17 と同様に Th2 も活性化を認めた。

研究成果の概要 (英文) : The pathogenic role of TL1A in inflammatory bowel disease has been shown in several studies. In this study, we evaluated the role of TL1A in acute colitis and the association between TL1A and Th2.

We showed that TL1A expression from macrophages and DR3 expression from intestinal epithelial cells was increased in DSS-colitis mice. In human intestinal epithelial cell lines, DR3 expression was increased by the stimulation of IL-1 and IL-6. Indeed, DR3 expression was increased in intestinal epithelial cells from Crohn's Disease patients compared with normal and ulcerative colitis. These results suggested that the interaction of TL1A and DR3 on intestinal epithelial cells was important to develop acute colitis. Then, we performed the treatment of neutralizing anti-TL1A antibodies in DSS acute colitis. Anti-TL1A treatment attenuated acute colitis, however there was not a significant difference of body weight, colon length, and cytokine expression between control group and treatment group. We made siRNA of TL1A because we could not have an enough amount of anti-TL1A antibodies. We are going to continue to study the treatment of siRNA in DSS acute colitis.

Furthermore, we investigated whether TL1A activated Th2 cells. In our study, SAMP1/Yit mice which spontaneously develop severe ileitis, were used. TL1A was significantly increased in ileum of SAMP1/Yit mice. Mononuclear cells isolated from mesenteric lymph nodes were stimulated with TL1A, IL-12, IL-23, IL-13 and their combinations. In this experiment, we showed that TL1A activated not only Th1 and Th17, but also Th2 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医学

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、TL1A、death receptor 3

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は主にクローン病と潰瘍性大腸炎の2つの疾患があり、どちらも欧米では発症率が高く注目されている疾患である。日本でも近年は徐々に若い人を中心に増加傾向にある。最近では基礎研究により原因の解明したサイトカインに対する抗体治療が人に対して行なわれるようになった。抗 TNF- α 抗体（レミケード）はその代表でクローン病に対する優れた治療効果をもち、ステロイドや免疫抑制剤しかなかったクローン病に対する治療効果そして治療戦略を大きく変化させた。他にも抗 IL-12 抗体、抗 IFN- γ 抗体、抗 IL-6 レセプター抗体など多数の治験も行なわれている。基礎研究の結果が、臨床の現場で応用されるようになり、サイトカインを含めた分子標的治療に対する研究がさらに盛んになってきている。

TL1A は 2002 年に同定された TNF ファミリーサイトカインである(1)。この TL1A については炎症性腸疾患、特にクローン病患者の炎症組織において著明に増加を認めている(2, 3)。この TL1A は主にマクロファージや樹状細胞から分泌され、細菌や免疫複合体によって分泌が増加していることが知られている(4)。

さらには遺伝子解析において NOD2 や IL-23R の特異的な変異は欧米クローン病患者において認められているものの、日本人において有意差は認められなかった。しかし、TL1A の特異的な変異は欧米ばかりでなく日本のクローン病患者にも認められており、クローン病患者において TL1A は感受性遺伝子として発病において重要な役割を担っているのではないかと考えられている(5, 6)。

また、TL1A は ileitis モデルマウスにおいても上昇を認め、CD11chigh MHC classII 陽性樹状細胞が TL1A を発現していることが証明

された(7)。そこで、私達は他の腸炎モデル(DSS 慢性腸炎モデルおよび G protein alpha2 ノックアウトマウスモデル)を使用し、同様に腸炎モデルマウスにおいて TL1A は明らかに炎症に伴い増加しており、その発現はおもに樹状細胞によることを証明した(8)。その TL1A のレセプターは DR3 で主に活性化 T 細胞に発現を認め、TL1A により T 細胞を活性化することが明らかとなった。さらに私達は TL1A が腸管内の T 細胞を活性化するだけでなく、IL-12 による Th1 細胞の活性化を促進し、また IL-23 による Th17 細胞の活性化をも促進することを証明した。(クローン病においては Th1 ばかりでなく Th17 により炎症を隆起すると考えられる。) 腸炎モデルに抗 TL1A 中和抗体投与を行ったところ、腸炎の著明な改善を認め、TL1A は慢性腸炎における T 細胞の活性化に関与していると考えられ、また抗 TL1A 抗体はクローン病の新しい治療薬の一つとなりうる可能性を証明した(8)。

しかし、この研究では慢性期における T 細胞に対する作用を明らかにしたもの、急性期における役割、さらには他の細胞に対する検討は十分になされていない。TL1A のレセプターである DR3 は腸管上皮細胞への発現を認める報告があることから(9)、急性期において TL1A が腸管上皮になんかの影響を与え、急性の粘膜障害を起こすことが予想される。わたしは、まだ十分に解明されていない TL1A の急性期における TL1A の発現および腸管粘膜への作用について検討を行う。さらに TL1A は Th2 との関与も報告されていることより、引き続き慢性モデルにおける Th2 の関与を検討する。Th2 モデルとして SAMP1/Yit マウス(10)および T cell receptor alpha ノックアウトマウス(11)があり、これらのマウスにお

ける TL1A の役割を検討する。さらに私達は、人においても日本人のクローン病患者における血清、末梢血、腸管内での TL1A の発現を正常人や潰瘍性大腸炎患者と比較検討を行い、最終的には TL1A のクローン病あるいは炎症性腸疾患における役割を突き止め、抗 TL1A 抗体による新たな炎症性腸疾患における治療戦略を確立することを目的とする。

1. Migone TS, Zhang J, et al. *Immunity* 2002;16:479-92.
2. Prehn JL, Mehdizadeh S, et al. *Clin Immunol* 2004;112:66-77.
3. Bamias G, Martin C, et al. *J Immunol* 2003;171:4868-74.
4. Prehn JL, Thomas LS, et al. *J Immunol* 2007;178:4033-8.
5. Yamazaki K, McGovern D, et al. *Hum Mol Genet* 2005;14:3499-506.
6. Picornell Y, Mei L, et al. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1333-1338.
7. Bamias G, Mishina M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8441-6.
8. Takedatsu H, Michelsen, KS et al. *Gastroenterology* 2008;135:552-67.
9. Mizoguchi A, Mizoguchi E, et al. *Gastroenterology*. 1999 Feb;116(2):320-6.
10. Takedatsu H, Mitsuyama K, et al. *European Journal of Immunology* 2004;34(6):1561-69
11. Gout S, Morin C, et al. *Cancer Res* 2006; 66: 9117-24

2. 研究の目的

研究の目的は大きく3つあり、1つ目は急性炎症におけるTL1Aの役割の検討、2つ目はTh2優位の慢性炎症モデルにおけるTL1Aの役割の検討、3つ目は炎症性腸疾患患者におけるTL1Aの発現の検討である。

1つ目については急性炎症モデルマウスを使用し、TL1Aがマクロファージおよび樹状細胞にどのような影響を与え、さらにはTL1Aが腸管上皮に与える影響を解明する。同時にTL1Aのレセプターであるdeath receptor 3の腸管細胞における発現と、どのような状況にて発現が増加するか解明を行う。さらに抗TL1A中和抗体が急性炎症モデルにおいて治療効果を認めるか検討を行う。

2つ目についてはSAMP1/Yitマウスを使用し、TL1AがTh2サイトカインに与える影響を検討する。この検討により炎症性腸疾患におけるTh1やTh17だけでなくTh2サイトカインの役割を検討することができる。さらに急性モデルと同様に抗TL1A中和抗体の効果についても明

らかとする。

3つ目に付いてはクローン病あるいは潰瘍性大腸炎患者、正常人におけるレセプターであるDR3の発現を腸管粘膜の細胞を用いて検討を行う。

3. 研究の方法

以前の基礎データおよび、他の研究者の報告より腸管上皮およびヒト腸管上皮の cell line には TL1A のレセプターである DR3 の発現が報告されている。主な研究内容は急性腸炎モデルでの TL1A の発現およびそのレセプターである DR3 の発現を確認し、TL1A が DR3 を通じて腸管上皮に与える影響を検討する。

以前の論文にて DR3 が発現していることがわかっている腸管上皮細胞株や他の上皮細胞株 (HT29, Lovo, DLD-1) を使用し FACS および Real time-PCR にて DR3 発現の確認を行った。IL-1、IL-6 の炎症性サイトカインが DR3 の発現に影響を与えるか検討を行った。

DSS 急性腸炎モデルを作製し、腸炎による TL1A の発現の検討を行った。具体的には急性期の腸管をとりだし、腸管内のマクロファージをソーティングにより分離。これらの細胞からの TL1A の発現を PCR にて評価を行った。

DSS 急性腸炎モデルや他の炎症性腸疾患マウスモデルからの腸管上皮の分離も行い、腸管上皮における DR3 の発現の検討を行った (炎症度と DR3 の発現の関連など)。

SAMP1/Yit マウスを使用し、自然発症腸炎モデルについても検討を行った。急性腸炎モデルと同様に TL1A および DR3 の発現について検討を行った。

慢性モデルより抽出された T 細胞の機能の解析を行う。TL1A により Th2 サイトカインは活性化されるか検討した。さらにはこのモデルにおける TL1A の発現についても検討を行った。

急性モデルおよび慢性モデル、抗 TL1A 抗体による効果を検討した。抗体投与群と非投与群にて炎症の程度、サイトカインの濃度、炎症細胞の分画の違い、腸管組織のアポトーシスの程度などの比較検討を行った。

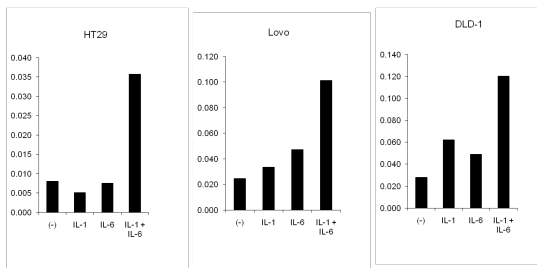
抗体による治療が十分ではなく TL1A に対する siRNA を作製した。

IBD 患者（クローン病および潰瘍性大腸炎）の手術サンプルから腸管上皮を分離し、TL1A や DR3 の発現を real time PCRにて測定した。コントロールとして非炎症部位もしくは大腸がん患者の正常部位を採取し比較を行った。

4. 研究成果

腸管におけるTL1Aの作用を検討するため、腸管上皮細胞株や他の上皮細胞株 (HT29, Lovo, DLD-1) を使用し Real time-PCRにてDR3発現の確認を行った。その結果、IL-1やIL-6の炎症性サイトカインによる刺激にてDR3の発現が増加することが分かった。（下図）

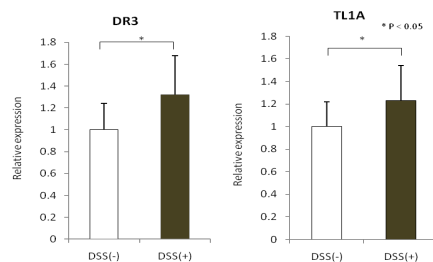
Human epithelial cell lineにおけるDR3の発現



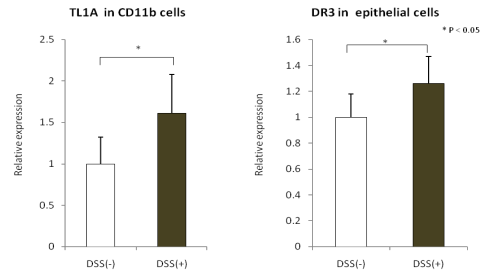
Flow cytometryにて発現の確認を行ったところIL-1+IL-6の共刺激によりDR3の発現が増加していることが分かった。

DSS急性腸炎モデルを作製し、腸炎におけるTL1Aの発現とそのレセプターであるDR3の発現の検討を行った。その結果、炎症部位にてDR3およびTL1Aの発現が有意に増加していることが分かった（下図）

Colon



さらに私たちは急性腸炎においてどの細胞がTL1AおよびDR3を発現しているか検討を行ったところ、腸管内のCD11b陽性細胞にTL1Aの発現の増加を認めた。また、腸管より腸管上皮細胞の分離を行い、腸管上皮におけるDR3の発現の検討を行ったところ、正常腸管およびDSS腸炎非炎症部位と比較し、炎症部に強いDR3の発現を認めた。（下図）

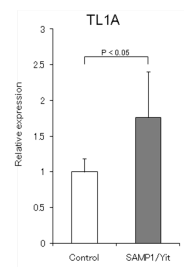


以上の実験結果よりDSS急性腸炎モデルにおいてマクロファージからTL1A発現し、腸管上皮にDR3発現が増加することが分かった。そしてTL1A-DR3による反応が腸炎における腸管上皮のダメージに関連する可能性が示唆された。

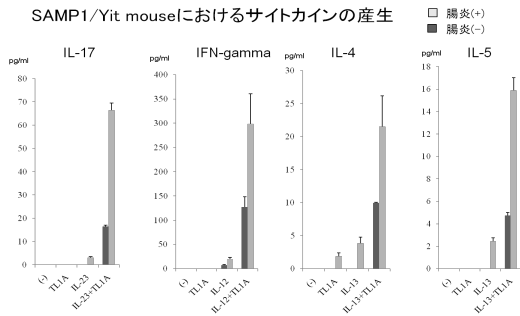
その関連を証明するためDSS腸炎モデルを使用し、抗TL1A抗体投与を行い、急性腸炎におけるTL1Aの役割についての検討を行った。抗体投与群と非投与群にて体重の変化や炎症の程度について比較検討を行った結果、抗体投与群において若干の改善傾向が認められたが、明らかな有意差は認められなかった。この結果は十分な抗体量得られず、抗体量、投与回数などが問題であると考えられた。

そこで抗体の投与方法、投与量などの検討が必要と考えられたが、今回新たな試みとしてマウスTL1Aに対するsiRNAを作製した。今後は引き続き急性腸炎に対しsiRNAの局所投与（注腸や局所注入）を試みる予定である。

SAMP1/Yitマウスはクローン病モデルマウスとして知られており、SAMP1/YitにおけるTL1Aの発現を検討したところ炎症を起こす回腸末端部位の腸管においてTL1Aの発現が著明に増加していた。（下図）

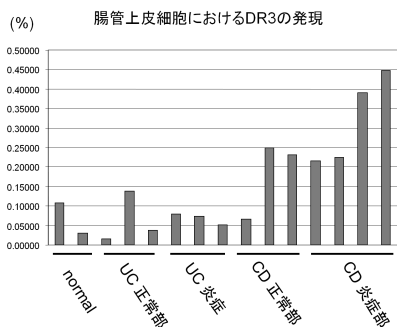


この回腸炎はTh2も病因として重要視されている。このマウスから単核球を分離し、TL1AやIL-12, IL-23, IL-13との共培養にて刺激をおこなったところ、Th1, Th17と同様にIL-4, IL-5の産生増加を認め、Th2も活性化することが明らかとなった。特に反応は炎症部位に強く認められた。（下図）



慢性モデルである SAMP1/Yit マウスに対しても抗体投与群およびコントロール抗体投与群にて炎症の程度、サイトカインの発現などについて検討を行ったが、DSS 腸炎同様に明らかな有意差を認めず、結果を得ることができなかった。十分な抗体量が確保できないこともあり、投与量、投与方法、投与期間などの検討も必要である。siRNA 投与について本モデルを使用し検討中である。

患者の手術サンプルを使用し、腸管上皮の DR3 の発現について検討を行った。クローン病患者の腸管上皮の DR3 の発現を Real-time PCR で確認を行ったところ、正常および潰瘍性大腸炎の腸管上皮と比較し、クローン病の特に炎症部位に著明に増加していることが明らかとなった。(下図)



今後はさらに患者数を増やし検討を継続中である。

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 1 件)

竹田津英稔、光山慶一、佐田通夫、炎症性腸疾患における TL1A (TNFSF15) の役割と抗 TL1A 抗体による治療効果、消化器内科、査読無、2010, Vol. 51 No. 4 353-360

[学会発表] (計 2 件)

① David Q. Shih, Robert Barrett, Xiaolan Zhang, Brian Ko, Michelle H. Wong,

Piangwarin Phaosawasdi, Nicole Yeager, Gislaine Martins, Hidetoshi Takedatsu, Kathrin S. Michelsen, Stephan R. Targan
Constitutive in vivo expression of TL1A (TNFSF15) in myeloid or lymphoid cells induce mild small bowel inflammation in mice

DDW-USA (The 111st American Gastroenterological Association Institute) 2010 年 5 月

② 竹田津英稔、炎症性腸疾患における TL1A の役割と抗 TL1A 抗体による治療効果の検討 JDDW (第 51 回日本消化器病学会大会) シンポジウム 2009 年 10 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田津 英稔 (TAKEDATSU HIDETOSHI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80352144

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：