

氏名(本籍)	たき 滝	もと 本	てつ 哲	や 也
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	農博第855号			
学位授与年月日	平成18年3月24日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研究科専攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	鶏 Tumor necrosis factor (TNF) like ligand 1A (TL1A) 分子の クローニングおよび機能特性 — 鶏 TL1A は炎症応答において TNF- α 機能を代替する —			
論文審査委員	(主査)	教授	秋葉	征夫
	(副査)	教授	山口	高弘
		助教授	北澤	春樹

論文内容要旨

第1章 緒論

免疫系は病原微生物から宿主を防御するための生体防御機構として重要な役割を果たしている。感染時には、殺菌や感染細胞除去など、非自己と認識される物質から自己を防御するための初期応答として排他的応答、すなわち炎症応答が起こる。炎症応答には炎症を促進する比較的分子量の小さなタンパク質である Interleukin(IL)-1 β 、IL-6、Tumor necrosis factor (TNF)- α などの前炎症性サイトカインが大きく関わっている。炎症応答は基本的には生体機能を通常状態に回復させるための反応であるが、これら前炎症性サイトカイン産生が高まりすぎると、過度の炎症応答により生体自体が傷害を受ける。したがって、これらサイトカインは炎症応答調節にあたり、重要な標的とされている分子である。

哺乳動物では IL-1 family、IL-6、TNF- α を含む TNF ligand superfamily がクローニングされ、また IL-1 β 、IL-6、TNF- α がそれぞれ炎症応答において重要な役割を果たしていることが明らかとされてきた。また、近年では哺乳動物以外のヒラメやニジマスなど魚類においても TNF の存在が確認され、その重要性は種を越えているものと考えられる。一方、鶏を含む鳥類においては、前炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-6 のクローニングがなされ、鶏 IL-1 β 、IL-6 が後炎症性物質であるコルチコステロンを上昇させることが確認されている。しかし、鳥類の TNF- α に関してはマクロファージ培養上清画分中に TNF 様活性が確認されているにすぎず、いまだ TNF- α の存在は確認されていない。

TNF ligand superfamily は TNF- α を含む 19 種類のメンバーから構成されている。哺乳動物において、TNF- α は好中球の貪食能や細胞傷害性の増強、接着因子 intercellular adhesion molecule (ICAM) や vascular cell adhesion molecule (VCAM) 発現上昇によるリンパ節の肥大、IL-2 受容体発現上昇による T 細胞活性化、一酸化窒素 (NO) 合成の促進、さらには IL-1、IL-6 などを含むさまざまなサイトカイン発現調節を介して炎症応答を惹起することが報告されており、免疫応答調節において重要な役割を果たしている。また、TNF α はリポプロテインリパーゼ活性の低下および

VLDL 分泌の上昇による血中トリグリセリドの上昇、糖質コルチコイド産生の上昇、インスリンシグナル伝達抑制による糖取込みの低下など、多くの代謝応答にも関与している。

本研究では、鳥類における TNF- α を同定し、その機能を解明することを目的にした。まず他種 TNF- α と相同性の高い分子を検索することを行った (第 2 章)。これまでの鶏サイトカイン研究結果から哺乳動物 TNF- α に相同性が高い分子が存在しない可能性も考えられたので、TNF- α が確認されなかった場合には TNF- α 機能を代替する可能性のある TNF ligand superfamily に属する Tumor necrosis factor like ligand (TL)1A 分子を検索した (第 3 章)。それによって得られた分子の機能を検索するため、リポポリサッカライド (LPS) 投与による炎症応答時の発現変化や (第 4 章)、組換えタンパク質を用いて細胞や鶏に対する投与試験を行い (第 5 章)、免疫・炎症応答における本分子の機能を調査することにより、鶏の免疫および炎症応答における TL1A の重要性を示す。

第 2 章 哺乳動物 TNF- α の塩基相同性からの鶏 TNF- α のクローニング

鶏ゲノムデータベースや Expressed sequence tagged (EST) データベースを、キーワードとして TNF- α を用いた検索、または Based local alignment search tool (BLST) を用いて他種 TNF- α 塩基配列との相同性による検索を行った。また、他種動物の TNF- α 同士で相同性の高い配列の混合オリゴマー TGGTAYRAISCIRTITAYY を作製し、大腸菌リポポリサッカライド (LPS) 投与 3 時間後鶏脾臓 cDNA ライブラリーを検索した。さらにサブトラクション法により哺乳動物 TNF- α の類似分子の検索を試みた。

その結果、いずれの検索法によっても哺乳動物 TNF- α と相同性の高い遺伝子、蛋白質は確認できず、鶏では TNF- α 遺伝子が欠損している可能性が示唆された。

第 3 章 鶏 Tumor necrosis factor like ligand (TL) 1A のクローニング

BLAST によって、ゲノムおよび EST データベース内にヒト TNF- α アミノ酸配列

と相同性の高い分子があるかどうか検索したところ、一つの遺伝子が確認された。そこで、この分子をクローニングし、その塩基およびアミノ酸配列を同定し、系統樹解析を行なった。その結果、推定される239アミノ酸残基中にはTNF ligand superfamily特有の配列([LV]-x-[LIVM]-x₃-G-[LIVMF]-Y-[LIVMFY]₂-x₂-[QEKHL])や疎水性アミノ酸残基を多く含む膜貫通領域(VLLCLLAVLLLALPIAYLLA)が確認された(Fig. 3-1)。この分子はヒト TL1A と最も相同性が高かったので、鶏 TL1A とした。

TL1A は近年、哺乳動物においてクローニングされた血管内皮細胞成長阻害因子(VEGD)の long form であり、主に内皮細胞で発現している TNF ligand superfamily に属する分子である。TL1A はその発現および分泌細胞や受容体は TNF- α と異なるものの、TNF- α 様の免疫調節機能を示すことが明らかにされている。鶏 TL1A はヒト TL1A と 51%の相同性があった。ヒト、ヒラメおよびマス TNF- α とはそれぞれ 25、26、25%の相同性を有していた(Fig. 3-1)。また他種および鶏 TNF ligand superfamily と系統樹解析を行ったところ、鶏 TL1A は TL1A 分子のグループに属し、鶏の他の TNF ligand superfamily と比較すると、TNF- α に最も近縁の分子であることが明らかとなり(Fig. 3-2)、本分子が TNF ligand superfamily に属することが推定された。これらのことより、鶏では TL1A が TNF- α 機能を代替する分子である可能性が予想された。

第4章 炎症応答時および栄養調節による鶏 TL1A の発現変動

鶏 TL1A が TNF- α 機能を代替するかを、前炎症性サイトカイン産生を高め、炎症を引き起こす LPS を用いて検討した。LPS 1.5mg/kg body weight (BW) 投与2時間後の鶏の各種臓器における TL1A mRNA 発現量を RT-PCR で測定し、TL1A mRNA 発現が各臓器で増加することを確認した(Fig. 4-1)。特に肝臓、脾臓といった免疫担当細胞が多く定着している組織や内分泌に関わる副腎では、LPS 投与による発現量の顕著な増加が見られた(Fig.4-1)。鶏 TL1A 発現変化を real-time PCR によって定量分析したところ、LPS 投与によって脾臓で約25倍、肝臓で約15倍、腹腔内脂肪組織で約9倍と鶏 TL1A mRNA 発現の有意な上昇が確認された(Fig. 4-2)。鶏へ

LPS1.5mg/kg BW 投与後における脾臓の TL1A mRNA 発現量の経時変化を調査したところ、投与 2 時間後に TL1A mRNA 発現量が最大となり、その後徐々に減少していった (Fig. 4-3)。LPS 投与による鶏 TL1A の血中への分泌を検証するため、抗鶏 TL1A 抗体を用い血漿のウェスタンブロットを行った。15~20kDa に TL1A と思われるバンドが確認され、LPS 投与 4 時間後には血中に鶏 TL1A タンパク質が分泌されていることが確認された (Fig. 4-4)。

さらに各種栄養素給与によって鶏脾臓の TL1A mRNA 発現が変化するかについて検討した。その結果、鶏で抗炎症作用が確認されている栄養素であるグリシン、アラニンなどのアミノ酸およびキシリトールの給与によって TL1A mRNA の発現低下が確認された (Fig. 4-5)。これらのことから、本研究でクローニングした TL1A は炎症および代謝応答を調節する機能分子である可能性を示した。

第 5 章 細胞および鶏を用いた鶏 TL1A 機能の検証

鶏 TL1A の機能を検証するために TL1A 融合蛋白質を作成し、各種細胞や鶏における炎症応答と代謝応答を検討した。まず、各種細胞に対する TL1A の影響を検討するために、TNF- α 活性測定のために哺乳動物で用いられるマウス線維芽細胞 L929 cell line および鶏初代線維芽細胞を供試し、鶏 TL1A 組換えタンパク質の細胞死誘導試験を行った。鶏 TL1A 組換えタンパク質は両細胞に対して濃度依存的に細胞活性を低下させることを確認した (Fig. 5-1)。さらに、鶏 TL1A の受容体になる可能性を持つ TNF receptor (TNFR)1、2 および decoy receptor (DcR)3 を形質導入した CHO-K1 細胞培養系へ鶏 TL1A を添加したところ、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 (Fig. 5-2)。また、リンパ細胞が大部分を占める鶏脾臓単核球の細胞活性は、低濃度 TL1A を添加した場合には変動は見られなかったが、高濃度の TL1A を添加した場合には細胞生存活性が上昇することが明らかになった (Fig. 5-3)。これらのことから、鶏 TL1A は、哺乳動物 TNF- α の細胞に対する各種作用とほぼ同様な作用を有することを明らかにした。

さらに、鶏の代謝応答と炎症応答における TL1A の機能を明らかにするために、鶏への TL1A *in vivo* 投与試験を行った。鶏への TL1A 200 μ g/kg BW 静脈投与は投与後 4-8 時間における飼料摂取量の減少 (Fig. 5-4(A))、投与後 12 時間までの直腸温上昇 (Fig. 5-4(B))、投与後 4-12 時間の血中亜硝酸塩濃度の上昇 (Fig. 5-5(A))、投与後 4-24 時間の血中セルロプラスミン濃度の上昇 (Fig. 5-5(B)) および投与後 8-12 時間の血中 α 1 急性期糖タンパク質濃度の上昇を観察した (Fig. 5-5(C))。これらのことから、鶏 TL1A は鶏における炎症応答惹起因子であることが示された。

また、TL1A 200 μ g/kg BW 投与後 2 時間で、TL1A 投与時には GST 投与と比較して脾臓、腹腔内脂肪組織、副腎において IL-1 β mRNA 発現が上昇した。しかしながら肝臓における IL-1 β 発現は鶏 TL1A 投与と GST 投与で有意な差は見られなかった (Fig. 5-6(A))。IL-6 mRNA は、今回測定した全ての組織で GST 投与と比較して鶏 TL1A 投与時で発現量が高かった (Fig. 5-6(B))。これら主要な前炎症性サイトカインは、鶏 TL1A 投与 2 時間後の脾臓において最大の発現量となった。また鶏 TL1A 投与によって、肝臓および脾臓において鶏 TL1A mRNA 発現が上昇した。しかしながら、副腎や脂肪組織での鶏 TL1A 発現は GST 投与時と鶏 TL1A 投与時でほぼ同程度であった (Fig. 5-6(C))。鶏 TL1A 投与によって脾臓での IFN- γ mRNA 発現量上昇が見られたが、肝臓での IFN- γ 発現は GST 投与時と鶏 TL1A 投与時でほぼ同程度であった (Fig. 5-6(D))。鶏 TL1A 投与により、GST 投与時と比較して脾臓、肝臓 iNOS mRNA 発現の有意な上昇が見られた。副腎では鶏 TL1A 投与によって上昇する傾向 ($t=0.08$) が確認されたが、GST 投与時との差は有意なものではなかった。また腹腔内脂肪組織における発現も GST 投与時と鶏 TL1A 投与時で有意な差はなかった (Fig. 5-6(E))。COX-2 は、脾臓において、鶏 TL1A 投与によって GST 投与時と比較して有意な発現上昇が見られた。しかしながら、他の組織での発現量の変化は見られなかった (Fig. 5-6(F))。

以上、鶏 TL1A の投与は炎症応答関連因子 mRNA 発現を上昇させること、特に脾臓においてその作用が大きいことを明らかにした。したがって鶏 TL1A は、炎症応答

において哺乳動物 TNF- α 機能を代替する因子であることが示された。

本研究結果は、1. 鶏 TL1A は鶏において免疫・炎症応答を調節する重要な因子であること、2. 鶏 TL1A は鶏において哺乳動物 TNF- α 機能を代替している可能性が大きいこと、を示したものである。

本研究で明らかにした、TNF- α 代替機能を有する前炎症性サイトカインとしての鶏 TL1A の発見は、鶏 TL1A が鶏の免疫・炎症応答研究の新たな標的となることを提示するだけでなく、鳥類の免疫学を基盤とする比較免疫学の進展を促すと共に、サイトカインの鶏生産機能開発への応用に関する研究進展にも大きく資するものと期待される。

```

ChTL1A      1:-----MDHGAEITL-EEASATGQAS-RMHIKEDLR-R-MRCAVLLCCL----- 38
hTL1A      1:----MAE-DLGLSFGETASV-EMLPEHGSC--RPKARSSSARWALT----CCLV----- 42
hTNFalpha   1:-----MSTESMIRDVELAEALPKKTGG-----PQGSRR-----CLF---LS 34
flTNF      1:-----MCKVLGGLFIVALC 14
trTNFalpha 1:MEGYAMTPED--MERGPVYNT-TVTAVAEGKASRGWLW-----RLCGV--LL-IAGLC 47
          . . . . . *

ChTL1A      39:-LAVLLLA-LPIA-YL----LAGNLRAPTS-CPQVVDERSSSHFLKQR-----AVAAV-T 83
hTL1A      43:LLPF--LAGLT-T-YL----LVSQ LRAQGEACVQFQALKGQE--FAP-----SHQQV-Y 85
hTNFalpha   35:LFSFL-----IV--AGATT---LF-CL-----LHFGV-IGPQREEFPRLDLSLIS 71
flTNF      15:LGGVLAFSWYTNKSEMMTQSGQTAALSQKD-CA-EKTEP-----HN-T 54
trTNFalpha  48:AAAALLFA-----WCQHGRPST-----MQDEIEPQLEILIGA-----KDTHH-T 85
          . . . . .

ChTL1A      84:-DTL-PSAE-----KPRAHLTVKKQEPSSTTGSHLPILQ-WEDKRG-LAFTKNNLSYSS 133
hTL1A      86:-APL-RADGD-----KPRAHLTVVRQTPTQHFKNQFPALH-WEHELG-LAFTKNRMNYTN 136
hTNFalpha   72:PLAQAVRSSSRTPSDKPVAVH---V--ANP--QAEGQ-LQWLNRRANAL-LAN-GVELRD 121
flTNF      55:-LRQ-ISSRA-----KAAIH---LEGRDEEDEETSENKLWKNDEG-LAFTQGGFELVD 102
trTNFalpha  86:-LKQ-IAGNA-----KAAIH---LEG--EYNPNLSADTVQWRKDDG-QAFSQQGFELQG 131
          . . . . . * . . . . .

ChTL1A      134:NALVIPVSGDYVYVYACVTFR-----GPSDTSSKTSSVTAVI-TKVTDSEYPEPT 180
hTL1A      137:KFL LIPESGDYFIYSCVTFRGMTSECS--EIRQA-GRPNKPSITVVI-TKVTDSEYPEPT 192
hTNFalpha   122:NCLVVPSEGLYLIYSCVLF-----K-GQGCPSTHVLLTHTISR-IAVSYQTKV 167
flTNF      103:NHIIIIPRSGLYFVYSCASFRV---SCSSDDADDGKEAAEKHLTSISHRVWLFTESLGTQV 159
trTNFalpha  132:NCILIPHTGLFFVYSCASFRV---KCN-----SPGE-HTTPLSHIIWRYSDSIGVNA 179
          . . . * . * . . . * . * . . . * .

ChTL1A      181:QLLTSTKTLSEERNN-----WFQPIYLGAVVSLEIGDKLMVNVSDIKLVDYTKHEK 231
hTL1A      193:QLLMGTKSVCEVGSN-----WFQPIYLGAMFSLQEGDKLMVNVSDISLVDYTKEDK 243
hTNFalpha   168:NLLSAIKSP--CQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQ 225
flTNF      160:SLMSAVRSACQKSQEDAYRD-GQGWYNAIYLGAVFQLNEGDKLWTETNMLSELETESGK- 217
trTNFalpha  180:NLLSGVRSVCQNYGDAESEIGEGWYNAVYLGAVFQLNEGDKLWTETNRLTDVEPEQ GK- 238
          * . . . . . * . . . . . * . . . . .

ChTL1A      232:TFFGAFLL 239
hTL1A      244:TFFGAFLL 251
hTNFalpha   226:VYFGIIAL 233
flTNF      218:TFFGVFAL 225
trTNFalpha  239:NFFGVFAL 246
          . . . * . * . . .

```

Fig. 3-1 鶏TL1A と他種動物TL1AおよびTNF- α とのアミノ酸配列比較

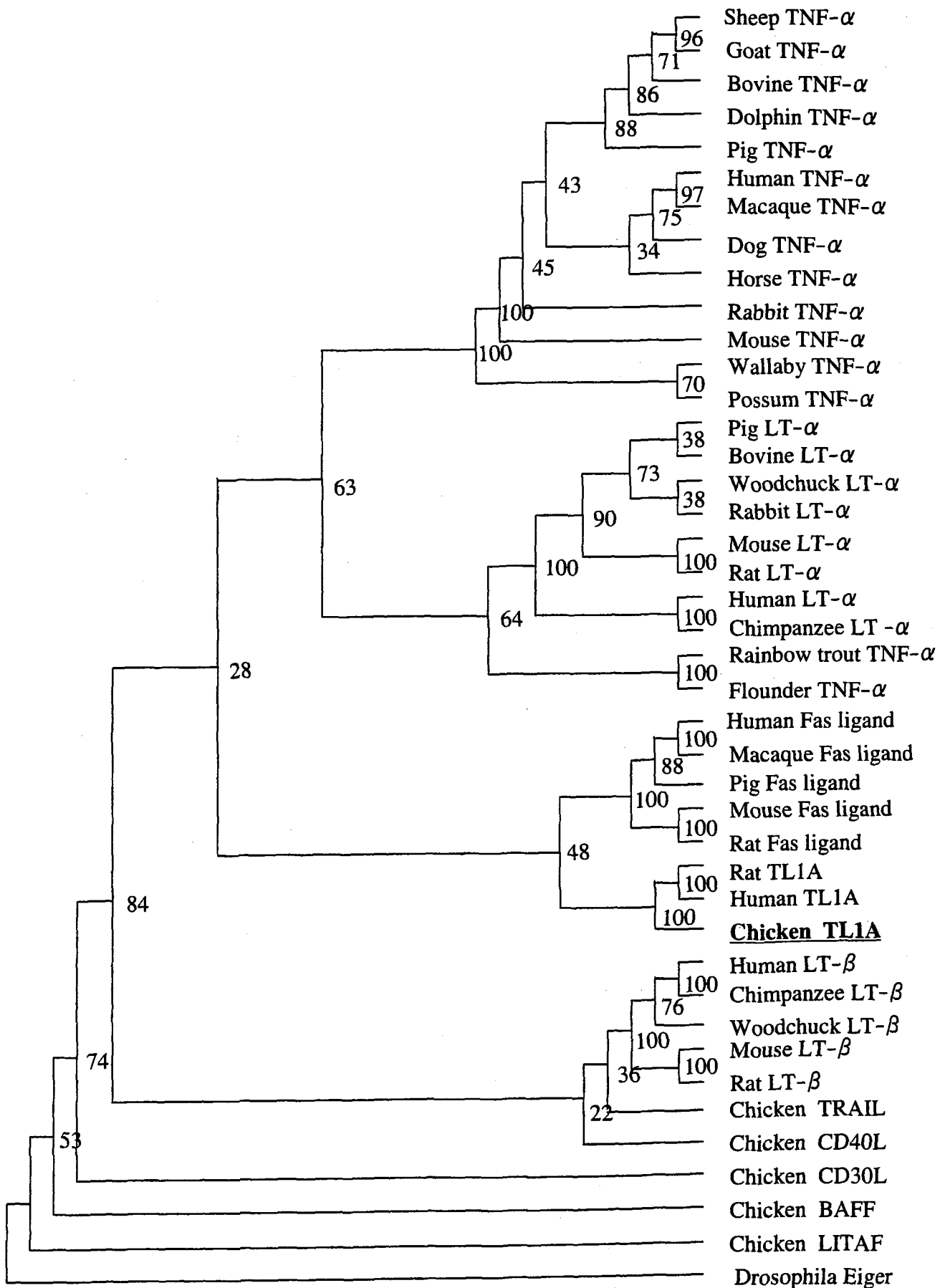


Fig. 3-2 アミノ酸配列レベルでの鶏TL1Aと他種動物および鶏TNF ligand superfamilyとの系統樹解析

LPS投与前



LPS投与後



Liver Spleen Lung Adipose tissue Thymus Bursa of Fabricius Brain Heart Testis Adrenal gland Kidney Small intestine

Fig. 4-1 各組織における鶏TL1A mRNA発現とLPS投与2時間後の発現変化 RT-PCRによって分析した結果を示した。0.8%ゲルで100V、20分泳動した。GAPDHは内部標準として示した。

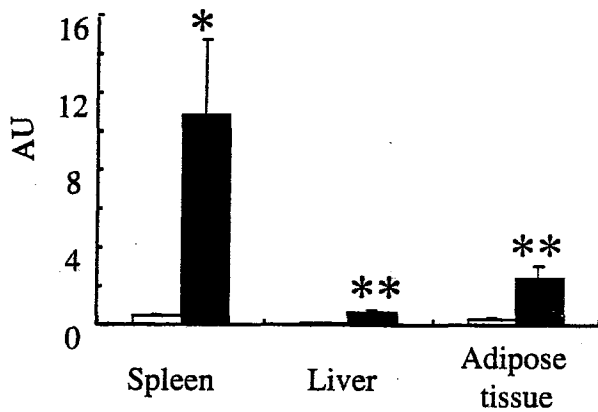


Fig. 4-2 LPS投与2時間後における脾臓、肝臓および腹腔内脂肪組織TL1A mRNA発現の変化

□はLPS無投与、■はLPS(1.5mg/kg体重)投与後2時間における鶏TL1A mRNA発現を示した。real-time PCRによって測定し、値はGAPDHを内部標準としてarbitrary units (AU)で示した。

LPS投与前と比較して ** P<0.01, * P<0.05

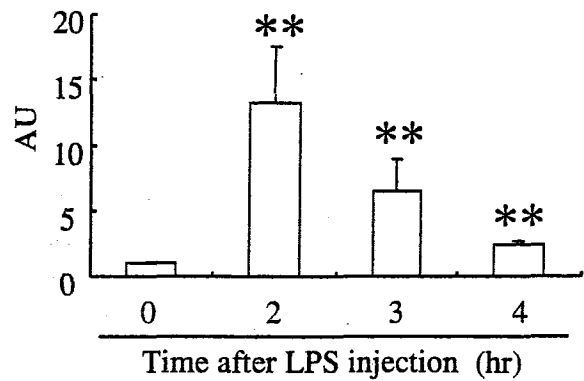


Fig. 4-3 LPS投与後の脾臓における鶏TL1A mRNA発現の経時変化

real-time PCRによって測定し、値はGAPDHを内部標準としてarbitrary units (AU)で示した。

LPS投与前と比較して ** P<0.01

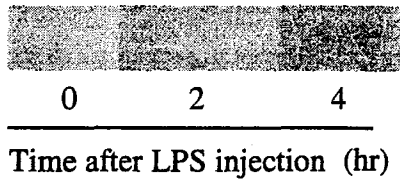


Fig. 4-4 LPS投与による血中鶏TL1Aタンパク質の変化 Western blotによって分析した結果を示した。

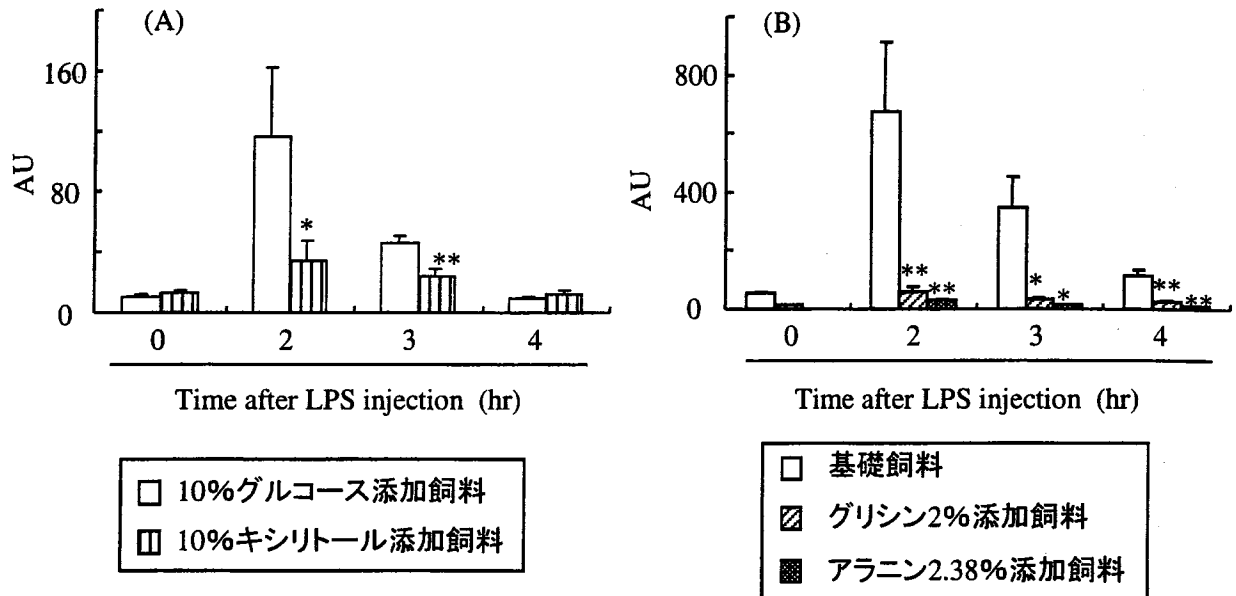


Fig. 4-5 抗炎症作用を有する栄養素による脾臓における鶏TL1A mRNA発現修飾
 (A) 15日齢鶏に10%グルコース飼料、10%キシリトール飼料を7日間給与し、22日齢時にLPS無投与またはLPSを3mg/kg 体重となるように腹腔内に投与し、2、3、4時間後に各区、各処理5羽ずつの脾臓を採取した。(B) 8日齢鶏基礎飼料または基礎飼料にGly 2%添加、Ala 2.38%添加した飼料を14日間自由摂取させた。22日齢時に基礎飼料区およびGly 2%添加飼料区から4羽ずつLPS無投与またはLPSを1.5mg/kg 体重となるように腹腔内に投与し、2、3、4時間後に各区、各処理4羽ずつの脾臓を採取した。脾臓における鶏TL1A mRNA発現に対する作用を示した。real-time PCRによって測定し、値はGAPDHを内部標準としてarbitrary units (AU)で示した。
 各投与時間における10%グルコースまたは基礎飼料の値と比較して ** P<0.01, * P<0.05

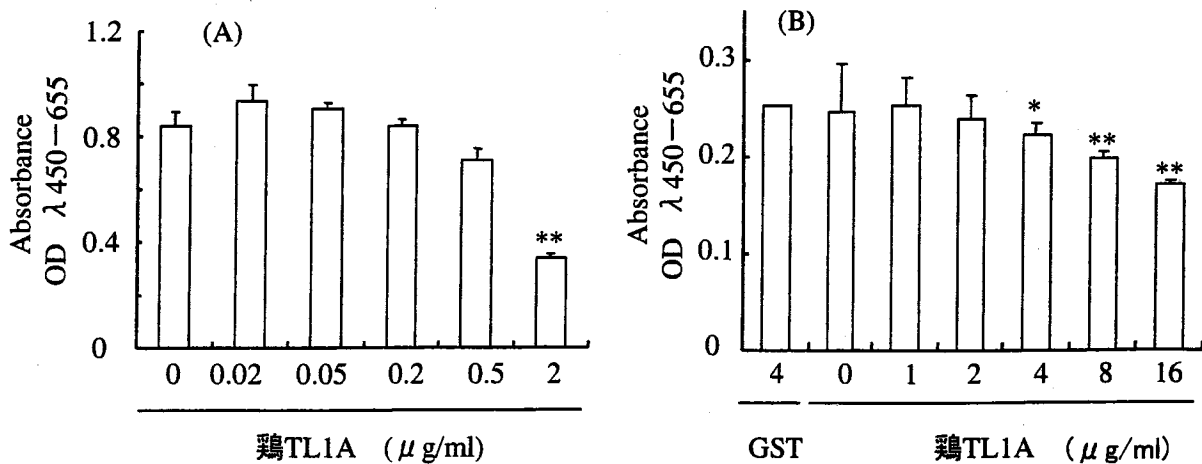


Fig. 5-1 各種細胞生存活性に対する鶏TL1Aの影響

(A)L929細胞、(B)鶏初代線維芽細胞の培養系への鶏TL1A添加による細胞生存活性示した。GSTはネガティブコントロールとして用いた。値は細胞活性を反映する吸光度で示した。

TL1A無添加と比較して ** P<0.01, * P<0.05

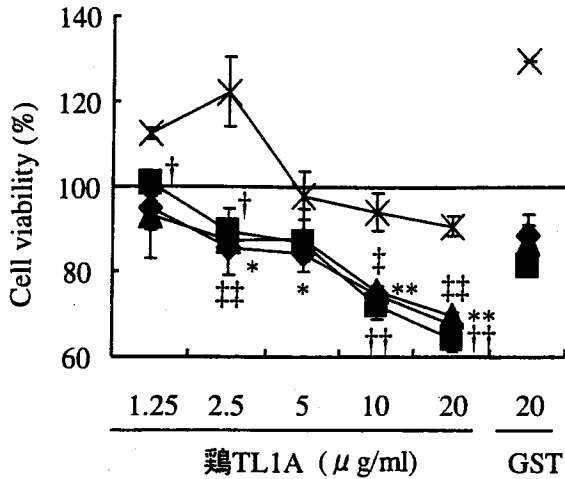


Fig. 5-2 TNF receptor導入CHO細胞の生存率に対する鶏TL1Aの影響

◆ TNF receptor (TNFR)1導入細胞、■ TNFR2導入細胞、▲ DcR3導入細胞、× pINDベクター導入細胞への鶏TL1A添加による生存率を示した。pINDは受容体遺伝子を組込んでいない対照として用いた。値は各添加濃度に対する細胞活性/鶏TL1A無投与時の細胞活性×100(%)で示した。GSTはネガティブコントロールとして用いた。

各鶏TL1A添加濃度時のpIND導入細胞生存率と比較して **、††、‡‡ P<0.01 *、†、‡ P<0.05

*: TNFR1に対する有意性、†: TNFR2に対する有意性、‡: DcR3に対する有意性を示す。

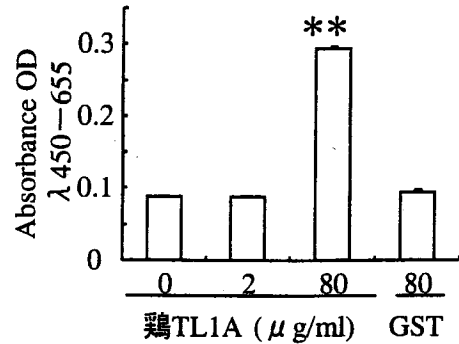


Fig. 5-3 鶏脾臓単核球活性に対する鶏TL1Aの影響

GSTはネガティブコントロールとして用いた。値は細胞活性を反映する吸光度で示した。

鶏TL1A無添加と比較して ** P<0.01

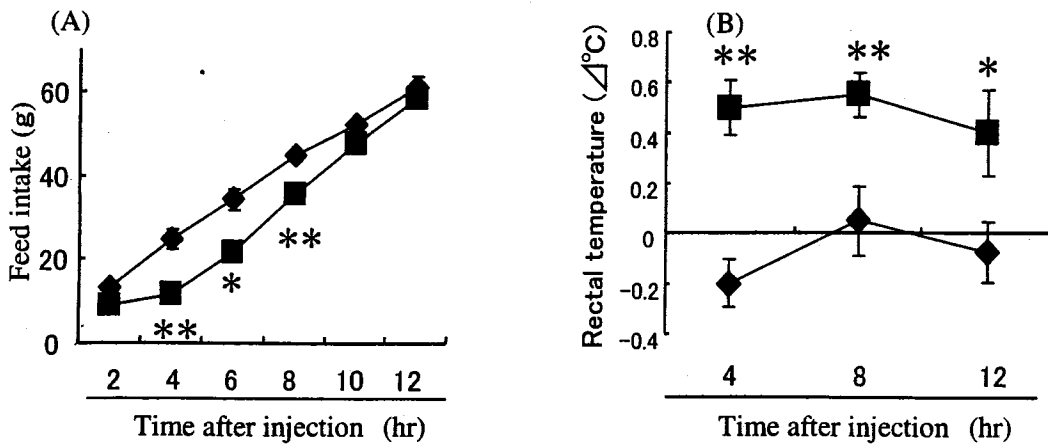


Fig. 5-4 TL1A投与鶏における代謝応答の変化

鶏TL1A投与時の(A)累積飼料摂取量、(B)直腸温変化を示した。■は鶏TL1A投与、◆はネガティブコントロールとしてのGST投与による変化を示した。GSTはネガティブコントロールとして用いた。直腸温は各投与後経過時間の直腸温と投与前における直腸温の変化値で示した。

GST投与と比較して ** P<0.01, * P<0.05

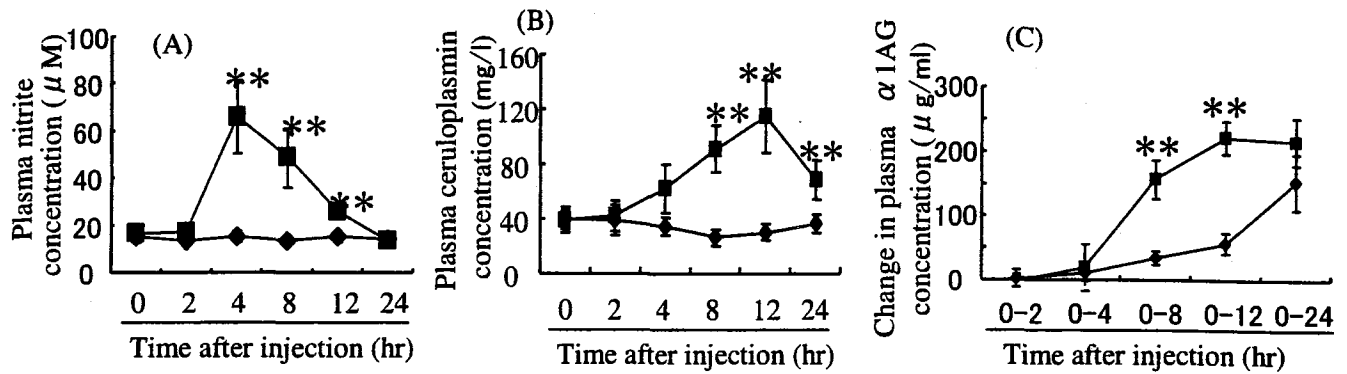


Fig. 5-5 TL1A投与鶏における急性期応答物質の血中濃度変化

鶏TL1A投与時の血中(A)亜硝酸塩、(B)セルロプラズミンおよび(C)α1酸性糖タンパク質濃度を示した。■は鶏TL1A投与、◆はGST投与による変化を示している。GSTはネガティブコントロールとして用いた。α1酸性糖タンパク質は各投与後経過時間の血中濃度と投与前における血中濃度の変化値で示した。

GST投与と比較して ** P<0.01, * P<0.05

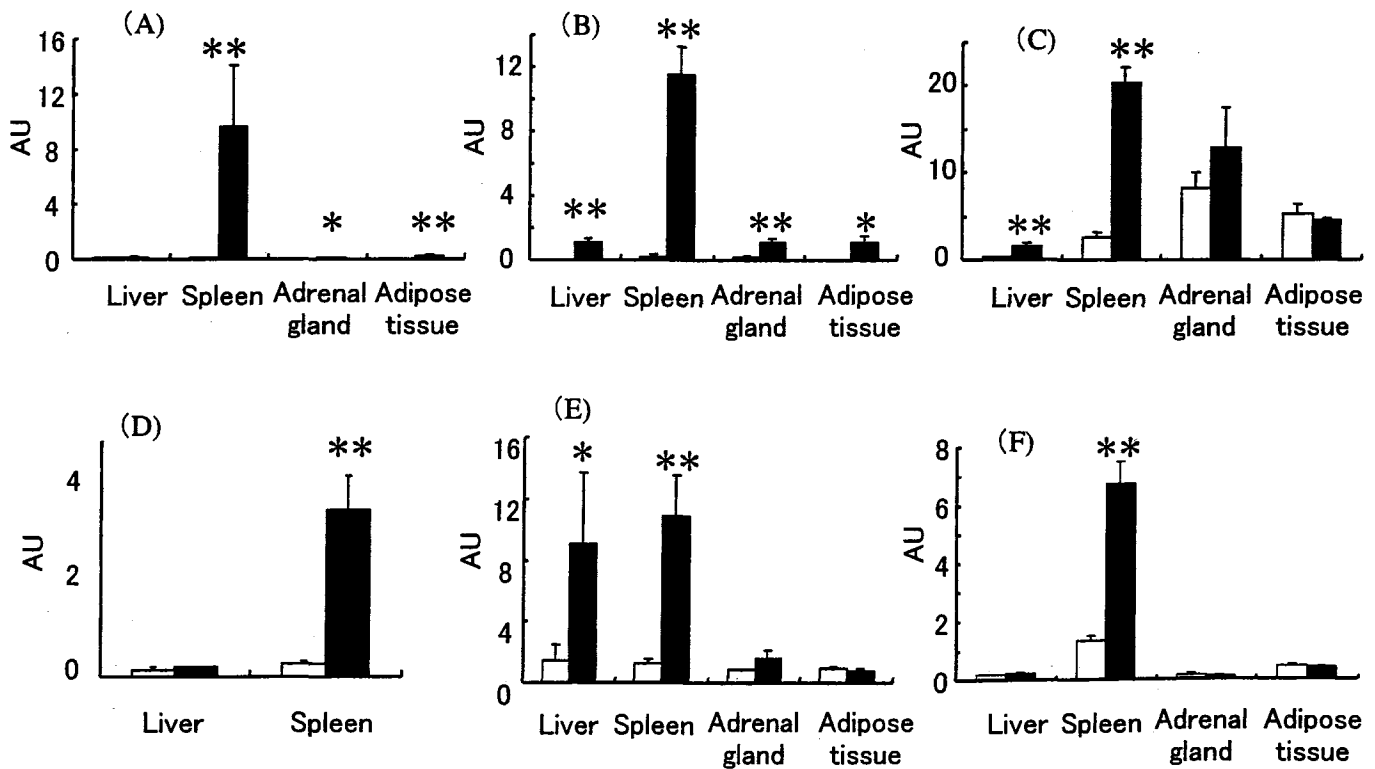


Fig. 5-6 TL1A鶏の各組織における炎症関連因子mRNA発現変化

鶏TL1A投与時の各組織における(A)IL-1β、(B)IL-6、(C)鶏TL1A、(D)IFN-γ、(E)iNOS、(F)COX-2 mRNA発現を示した。■は鶏TL1A投与、□はGST投与による変化を示している。GSTはネガティブコントロールとして用いた。real-time PCRによって測定し、値はGAPDHを内部標準としてarbitrary units (AU)で示した。

GST投与と比較して ** P<0.01, * P<0.05

論文審査結果要旨

動物は多様な環境下での各種のストレスから自己の内部環境を維持するために、免疫系を中心にした生体防御機構を構築している。哺乳動物では IL-1, IL-6, TNF- α を含む TNF ligand superfamily が自己防御機能としての炎症応答において重要な役割を果たしている。一方、鶏を含む鳥類では、IL-1 β や IL-6 がクローニングされているが、TNF- α の存在は確認されていない。本研究は、鶏における免疫能の制御機構を解明し、免疫能の調節による鶏生産体系の改善に資する目的で、鳥類における TNF- α 、あるいは TNF- α 機能代替因子を同定し、その機能を解明したものである。

まず、鶏組織から他種 TNF- α と相同性の高い分子を検索するために、EST データベース検索、BLST を用いた検索、サブトラクション法検索などを行ったが、哺乳動物 TNF- α と相同性の高い遺伝子・蛋白質は確認できず、鶏では TNF- α 遺伝子が欠損している可能性を示唆した。次いで、TNF- α 機能を代替する因子として TNF ligand superfamily に属する Tumor necrosis factor like ligand (TL) 1A 分子をクローニングし、TNF ligand superfamily と系統樹解析を行い、鶏 TL1A は TNF- α に最も近縁の分子であることを明らかにした。さらに、炎症応答時 (LPS 投与時) の免疫担当組織における鶏 TL1A mRNA 発現上昇と栄養素による TL1A mRNA の発現低下、抗鶏 TL1A 抗体を用いた血漿鶏 TL1A タンパク質濃度上昇などを確認し、本研究でクローニングした鶏 TL1A は炎症および代謝応答を調節する機能分子であることを示した。

次いで、鶏 TL1A 融合蛋白質はマウス線維芽細胞および鶏初代線維芽細胞の活性を濃度依存的に低下させること、鶏 TL1A の受容体になる可能性を持つ TNF receptor 1, 2 および decoy receptor 3 を形質導入した CHO-K1 細胞の活性を濃度依存的に低下させることを確認した。さらに、鶏の代謝・炎症応答における TL1A の機能を明らかにするために、鶏への TL1A in vivo 投与試験を行った。飼料摂取量の減少、直腸温上昇、血中セルロプラズミンおよび α 1 急性期糖タンパク質濃度の上昇、各種組織での IL-1 β mRNA, IFN- γ mRNA, iNOS mRNA, 鶏 TL1A mRNA などの発現上昇を認めた。以上の結果から鶏 TL1A は、鶏の代謝応答および炎症応答において哺乳動物 TNF- α 機能を代替する因子である可能性が示された。

本研究成果は、鶏 TL1A は鶏において免疫・炎症応答を調節する重要な因子であり、哺乳動物 TNF- α 機能を代替している可能性が大きいことを明らかにした。本研究での鶏 TL1A の発見は、鳥類の免疫学を基盤とする比較免疫学の進展とサイトカインの鶏生産機能開発への応用に関する研究進展に大きく資するものと期待される。

審査委員一同は、本論文提出者に対し、博士 (農学) の学位を授与するに値するものと認定した。