

氏 名 (本籍)	えん 遠	どう 藤	かつ 克	や 哉
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	医 博 第 2 5 3 6 号			
学位授与年月日	平 成 2 0 年 3 月 2 5 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻			
学位論文題目	TL1A 遺伝子発現における NF-kappa B 経路の 関与			

(主 査)

論文審査委員	教授 下瀬川	徹	教授 佐々木	巖
	教授 海野	倫	明	

## 論文内容要旨

原因不明の慢性炎症性腸疾患であるクローン病 (Crohn's disease) では、Th-1 型優位の異常免疫反応が病態形成に大きく関与することが知られている。一方、2002 年、Th-1 型の免疫反応を惹起する TNFSF (Tumor necrosis factor superfamily; 腫瘍壊死因子) の一つとして、TL1A (TNFSF 15) が同定された。最近、この TL1A とクローン病との免疫学的関連性および遺伝学的関連性がそれぞれ独立して報告された。前者の主要な報告としては、TL1A 蛋白および mRNA はクローン病の炎症腸管局所で発現が亢進しており、その局在は粘膜固有層内のマクロファージであったとする報告である。この報告から、クローン病において発現が亢進している TL1A が Th-1 型免疫反応を誘導し、病態形成に関与していると考えられる。一方、後者の主要な報告としては、TL1A 遺伝子多型と日本人クローン病に相関が認められたとする報告である。この報告から、遺伝子多型が TL1A の発現に質的または量的な異常をもたらし、クローン病の病態形成に関与する可能性が考えられる。

今後、TL1A とクローン病の関連を更に解明していくにあたり、TL1A の発現制御について基礎的知見を得ておくことが重要であると考えられるが、特に転写制御に関しては現在殆ど明らかになっていない。そこで本研究では、特に LPS (Lipopolysaccharide; リポ多糖) によってもたらされる TL1A 発現亢進に関与する遺伝子転写制御機構について、ヒト単球系培養細胞である U937 を用いて解析を行った。

RT-PCR を用いて LPS 刺激により U937 細胞で TL1A mRNA 発現が亢進することを確認し、更に、TL1A 遺伝子 5'領域断片を挿入したレポータープラスミドを構築し、U937 細胞に導入し、レポーターアッセイを行うことにより、mRNA 発現亢進は転写活性亢進を介していることを明らかにした。また、TL1A 遺伝子 5'領域断片を順次 deletion して挿入したレポータープラスミドを用いてレポーターアッセイを行い、LPS による転写活性亢進に関与する領域を絞り込んだ。結合転写因子予測プログラムを用いた解析から、この領域に NF-kappa B の結合予測配列が存在することが明らかとなり、従来までの文献的知見とあわせ、LPS による TL1A 転写活性亢進には NF-kappa B 経路が関与するものと予測した。そこで、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を行い、TL1A 遺伝子 5'領域の予測された配列への NF-kappa B の結合を確認した。更に、mutation assay にて同配列の重要性を示し、I-kappa B $\alpha$  の過剰発現実験を行い、NF-kappa B 経路の関与を明らかにした。

以上から、本研究により明らかとなった知見は以下の通りである。(1) LPS による TL1A 発現の亢進は転写活性の亢進を介して行われ、かつ転写活性亢進には NF-kappa B 経路が関与し

ている、(2) TL1A 遺伝子の 5' 領域に NF-kappa B 結合部位を同定した。本結果は TL1A のクローン病への関与を免疫学的あるいは遺伝子学的に明らかにしていく上での基本的知見として重要であると考ええる。

## 審査結果の要旨

原因不明の慢性炎症性腸疾患であるクローン病では、Th-1型優位の異常免疫反応が病態形成に関与する。2002年、Th-1型の免疫反応を惹起するTNFSF (Tumor necrosis factor superfamily) の一つとしてTL1A (TNFSF 15) が同定されたが、最近、TL1Aとクローン病との免疫学的関連性および遺伝学的関連性がそれぞれ独立して報告された。前者の主要な報告としては、TL1A蛋白およびmRNAはクローン病の炎症腸管局所で発現が亢進し、その局在は粘膜固有層内のマクロファージであったとする報告である。一方、後者の主要な報告としては、TL1A遺伝子多型と日本人クローン病に相関が認められたとする報告である。今後、TL1Aとクローン病の関連を更に解明していくにあたり、TL1Aの発現制御について基礎的知見を得ておくことが重要であるが、特に転写制御に関しては現在殆ど明らかにされていない。本研究は、特にLPS (Lipopolysaccharide; リポ多糖) によってもたらされるTL1A発現亢進に関与する遺伝子転写制御機構につき、ヒト単球系培養細胞であるU937を用いて解析を行っている。

本研究では、RT-PCRを用いてLPS刺激によりU937細胞でTL1A mRNA発現が亢進することを確認し、更に、TL1A遺伝子5'領域断片を挿入したレポータープラスミドを構築し、U937細胞に導入し、レポーターアッセイを行い、mRNA発現亢進は転写活性亢進を介していることを明らかにした。また、TL1A遺伝子5'領域断片を順次deletionして挿入したレポータープラスミドを用いてレポーターアッセイを行い、LPSによる転写活性亢進に関与する領域を絞り込んだ。結合転写因子予測プログラムによる解析から、この領域にNF-kappa Bの結合予測配列が存在することが明らかとなり、LPSによるTL1A転写活性亢進にはNF-kappa B経路が関与すると予測した。そこで、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を行い、TL1A遺伝子5'領域の予測された配列へのNF-kappa Bの結合を確認した。更に、mutation assayにて同配列の重要性を示し、I-kappa B $\alpha$ の過剰発現実験にてNF-kappa B経路の関与を明らかにした。

本研究により明らかとなった知見は以下の通りである。(1) LPSによるTL1A発現の亢進は転写活性の亢進を介して行われ、かつ転写活性亢進にはNF-kappa B経路が関与している、(2) TL1A遺伝子の5'領域にNF-kappa B結合部位を同定した。本結果はTL1Aのクローン病への関与を明らかにしていく上での基本的知見として重要であると考えられる。

よって、本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。