

平成30年6月18日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18788

研究課題名(和文) 犬猫の可溶性CTLA-4検索と自己免疫疾患診断マーカーへの応用

研究課題名(英文) Detection of a soluble form of CTLA-4 in dog and cat, and application to the diagnostic marker for autoimmune disease.

研究代表者

田川 道人 (Tagawa, Michihito)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：00749468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：犬の可溶性CTLA-4の検索を行うため、犬PBMCから作成したcDNAを用いてRT-PCRを行った。その結果、膜貫通ドメインであるエクソン3が欠損したスプライシングバリエントが検出された。健康犬の血清を用いて免疫沈降およびウエスタンブロッティングを行ったところ、23kDa付近にバンドが検出され、これは塩基配列から予想されたバンド長と同一であった。次に、自己免疫疾患罹患犬における可溶性CTLA-4の発現を評価するためELISAキットを用いて血清中の可溶性CTLA-4の測定を行ったが、健康犬と比較し自己免疫疾患罹患犬における可溶性CTLA-4の有意な上昇は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：For the detection of a soluble form of CTLA-4 (sCTLA-4) in dog, RT-PCR using cDNA obtained from canine PBMC was performed. As a result, alternatively spliced mRNA lacking the transmembrane domain coded by exon 3 of the CTLA-4 gene was detected. Immunoprecipitation and western blotting of dog serum revealed a band of approximately 23-kDa, which is consistent with the predicted size, based on the amino acid sequence of the canine sCTLA-4 obtained in this study. Next, ELISA kit was used to assess the expression of serum sCTLA-4 in dog with autoimmune disease. However, there was no significant difference in the expression level of serum sCTLA-4 between autoimmune disease patients and healthy control.

研究分野：獣医内科学

キーワード：可溶性CTLA-4 自己免疫疾患 犬 診断マーカー

1. 研究開始当初の背景

犬猫には免疫介在性溶血性貧血や全身性エリテマトーデス、関節リウマチなど人と類似した疾患や、直腸の炎症性ポリープ、壊死性髄膜脳炎など限られた品種に好発する疾患といった様々な自己免疫疾患が多発する。これら自己免疫疾患の診断は主に各種自己抗体の検出によって行われるが、それらは非特異的かつ感度も十分ではなく、疾患に矛盾しない臨床検査所見や急性相蛋白の上昇、治療反応をもって診断される場合も多い。つまり獣医学領域には自己免疫疾患に特異性の高い診断マーカーは存在しておらず、そのことが診断自体を曖昧にしている。また、多くの自己免疫疾患の治療はステロイドを主体とした免疫抑制療法であり、その薬剤の特性からしばしば副作用が問題となることから、ステロイドに代わる新たな治療法が望まれている。可溶性 CTLA-4 (以下 sCTLA-4) は CTLA-4 の膜貫通ドメインが splicing により欠損し、血清中に放出される分子であり、宿主の免疫調整作用を有しているとされる。sCTLA-4 はヒト自己免疫疾患では診断・治療マーカーとして検討されており、新規治療薬への応用が期待される分子であるが、犬猫において sCTLA-4 の存在はこれまで知られていない。

2. 研究の目的

本研究では、犬猫において sCTLA-4 の存在を証明し、その役割を解明することで自己免疫疾患における診断マーカーとしての有用性を検討し、新規治療法開発の足掛かりとすることを目的とした。

3. 研究の方法

帯広畜産大学 (以下本学) に飼養される健康ビーグル犬より末梢血液を採血し、比重遠心法により末梢血単核球 (以下 PBMC) を分離、mRNA を抽出し CTLA-4 に対する RT-PCR を行った。PCR 産物はクローニングした後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を解析、決定した。次に、健康犬の血清を用い、CTLA-4 抗体 (H-126、Santa Cruz Biotechnology) を用いた免疫沈降を行った後ウエスタンブロッティングにて sCTLA-4 の検出を行った。

本学動物医療センターに来院し、各種検査にて何らかの自己免疫疾患と診断された症例犬より飼主の許可を得たうえで採血を行った。血液は一定時間放置後、血清を分離し解析まで -30℃ で保存した。血清中の sCTLA-4 は canine CTLA-4 ELISA kit (LifeSpan BioSciences) を用いて定量し、疾患別の比較を行うとともに、少数例ではあるが一部の症例で治療経過との比較を行った。

健康ビーグル犬から末梢血液を採取し、比重遠心法にて PBMC を分離し 2×10^6 cell とした。同様に健康な他犬種 (ラブラドルレト

リーバー) より PBMC を採取し、 2×10^6 cell に対しマイトマイシン C (10 μ g/ml) を 2h、37℃ で処理し PBS で洗浄、それぞれ 10% FBS 加 RPMI にて 1×10^5 cell/well に調整、100 μ l ずつ 96well プレート上で混合し、犬リコンビナント CTLA-4 (Sino Biological) を各種濃度で添加し 5% CO₂、37℃ で 96h 培養しリンパ球混合反応試験を行った。培養終了後は cell counting kit にて細胞増殖率を測定した。

4. 研究成果

RT-PCR の結果、450 および 550bp の 2 本のバンドが認められた (図 1)。

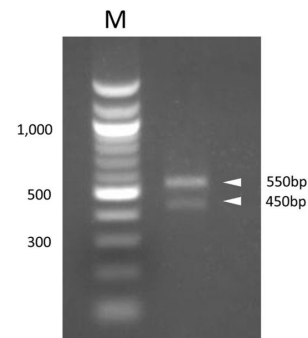


図 1. RT-PCR の電気泳動結果。

M: 分子量マーカー

PCR 産物のシーケンスの結果、550bp の増幅産物は犬 CTLA-4 (GenBank accession No. NM001003106) と 100% 一致していた。また 450bp のものは犬 CTLA-4 の exon3 が欠損した splicing variant であり、sCTLA-4 と考えられた (DDBJ: LC191194、LC191195)。得られた配列から予想されるアミノ酸配列はヒト sCTLA-4 と 82.9% の相同性であった。さらに、CD80/86 との結合に必要なとされる MYPPPY motif を有していた。免疫沈降およびウエスタンブロッティングの結果、23kDa 付近にバンドが認められ、犬 sCTLA-4 の予想されるアミノ酸配列と同程度の分子量であった (図 2)。

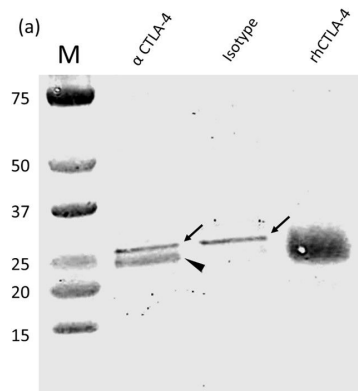


図 2. 犬 sCTLA-4 のウエスタンブロッティング。 CTLA-4: 抗 CTLA-4 抗体、isotype: アイソタイプ抗体、rhCTLA-4: ヒトリコンピナント CTLA-4 を泳動。25bp 付近(矢印)は免疫沈降に使用した抗体のキャリアオーバー。23bp 付近(矢頭)にバンドが認められる。

上記の結果から犬においても sCTLA-4 が存在することが示唆された。予想されるアミノ酸配列はヒト sCTLA-4 と高い相同性を有しており、また MYPPPY motif の存在からヒト同様 sCTLA-4 としての機能を有している可能性が高いものと思われた。また、予想される犬 sCTLA-4 のアミノ酸配列はヒト sCTLA-4 と比較し C 末端側の 3 アミノ酸が終止コドンにより欠落するものであった。この変化は sCTLA-4 の存在が認められている他の動物種(マウス、ラット)においても認められておらず、蛋白としての機能に影響を与えているかどうかは不明である。

自己免疫疾患罹患犬における sCTLA-4 の発現を評価するため、ELISA キットを用いて血清中の sCTLA-4 測定を行った。自己免疫疾患(39 頭: SLE・天疱瘡様疾患:3 頭、免疫介在性血小板減少症:11 頭、免疫介在性溶血疾患:13 頭、自己免疫性脳炎:6 頭、自己免疫性関節炎:6 頭)、健常犬 13 頭を用いた。その結果、sCTLA-4 濃度は自己免疫疾患で $4.8 \pm 19.8\text{ng/ml}$ 、健常犬で $7.6 \pm 18.2\text{ng/ml}$ となり有意な差は認められなかった。sCTLA-4 が検出されたのは SLE・天疱瘡様疾患: 0/3 頭、免疫介在性血小板減少症: 4/11 頭、免疫介在性溶血疾患: 1/13 頭、自己免疫性脳炎: 1/6 頭、自己免疫性関節炎: 1/6 頭、健常犬: 5/13 頭であった。一部の症例で治療経過との比較も行ったが、有意な変動は認められなかった(図 3)。

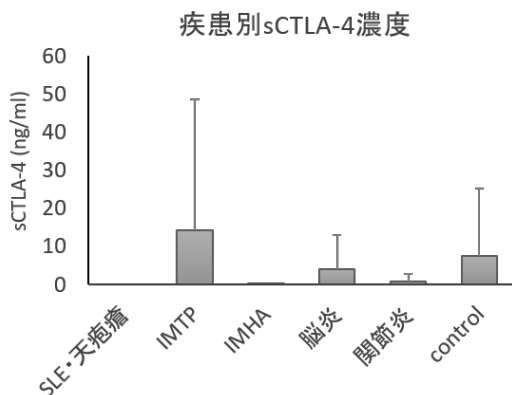


図 3. 自己免疫疾患罹患犬の血清を用いた Canine CTLA-4 ELISA kit の結果。

SLE: 全身性エリテマトーデス
IMTP: 免疫介在性血小板減少症
IMHA: 免疫介在性溶血性貧血
control: 健常犬

健常犬の PBMC を用いたリンパ球混合反応試験では、犬リコンピナント CTLA-4 の濃度に依存し増殖の抑制がみられた(図 4)。

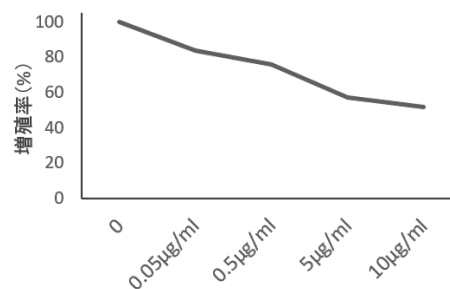


図 4. 犬リコンピナント CTLA-4 存在下でのリンパ球混合反応試験。

0 はコントロールとして PBS を同量添加。0 を 100%として計算。

上記の結果より犬においても CTLA-4 は過剰な免疫反応を抑制する作用を有している可能性が示唆された。sCTLA-4 は自己免疫疾患犬において特異的な上昇は認められなかったが、ヒト同様免疫調整作用を有している可能性が示唆された。

以上の結果より、犬においても sCTLA-4 の存在が示唆され、健常犬を含め様々な自己免疫疾患の一部の症例で上昇が認められた。診断マーカーとしての有用性については更なる検討が必要と思われるが、sCTLA-4 自体は他の動物種同様、免疫調整作用を有している可能性がある。今後は自己免疫疾患における新規治療薬としての有用性を検討する必要がある。

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)

1. Tagawa M, Yamamoto Y, Shimbo G, Iguchi A, Xuan X, Tomihari M, Miyahara K (2017)

Gene and protein expression of a soluble form of CTLA-4 in a healthy dog.

J. Vet. Med. Sci. 79 (5), 871-875. 査読あり
(doi: 10.1292/jvms.16-0583.)

〔学会発表〕(計1件)

1. 山本悠平, 田川道人, 新坊弦也, 井口愛子, 玄学南, 富張瑞樹, 宮原和郎. 犬可溶性 CTLA-4 の検索と臨床例での発現解析. 第159回日本獣医学会 日本大学(神奈川県・藤沢市)
2016年9月7日(口頭発表)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田川 道人 (TAGAWA, Michihito)

帯広畜産大学・動物医療センター・助教

研究者番号: 00749468