

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08099

研究課題名(和文)ハウスダストマイトによる腸上皮バリア障害を起点とした犬の慢性腸症発症機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of house dust mite-induced intestinal epithelial barrier dysfunction in the development of chronic enteropathy in dogs

研究代表者

大森 啓太郎 (Ohmori, Keitaro)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：20466915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、犬の消化管内におけるハウスダストマイト(HDM)の存在、および消化管内HDMが犬の慢性腸症の病態に及ぼす影響を解析した。HDMアレルゲンは、健康犬および慢性腸症の犬の胃液、十二指腸液および糞便において検出され、慢性腸症の犬の腸粘膜内には、健康犬に比べより多くのHDMアレルゲンが検出された。さらに、HDMアレルゲンは、犬のマクロファージにおいて炎症性サイトカインであるIL-1betaおよびその産生に必要なNLRP3の発現を誘導した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境アレルゲンであるHDMは、健康犬および慢性腸症の犬を含め、家庭で飼育されている犬に幅広く経口摂取されるが、腸上皮バリア機能が減弱した慢性腸症の犬の腸粘膜では、HDMアレルゲンが腸粘膜内に侵入し、腸粘膜に存在するマクロファージのNLRP3インフラマソームを活性化することでIL-1betaの産生を誘導する可能性が明らかになった。本研究により、HDMが慢性腸症の犬の消化管において、自然免疫系を活性化することで慢性的な腸炎を発症させる新たな病態が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：House dust mite (HDM) is an environmental allergen ubiquitously present indoors, causing allergic inflammation in dogs. However, whether HDM allergens are detected in the gastrointestinal (GI) tract of dogs and their contribution to the development of chronic enteropathy (CE) remain unclear. The purposes of this study were to determine the presence of HDM allergens in the GI tract of dogs with CE, and to elucidate the effect of HDM on IL-1beta and NLRP3 expression in canine macrophages. HDM allergens were detected in the gastric and duodenal fluids of laboratory healthy dogs and dogs with CE and feces of all dogs examined. HDM allergens in the duodenal and colonic mucosae were significantly higher in dogs with CE than in laboratory healthy dogs. HDM induced expressions of nlrp3 and il-1beta mRNA and IL-1beta protein in canine macrophages. HDM allergens present in the GI tract may be involved in the pathogenesis of CE, promoting IL-1beta expression in the intestinal mucosa.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：ハウスダストマイト 犬 慢性腸症 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

犬の慢性腸症は慢性的な嘔吐や下痢を引き起こし、腸粘膜における過剰な炎症を特徴とする疾患群である。これまでの研究から、慢性腸症の犬の腸内では、腸上皮バリア機能の破綻に伴う腸透過性の亢進が引き金となり、腸内細菌や食物抗原が腸管粘膜へと侵入し、腸管粘膜において過剰な炎症が起こっているものと推測されている。しかしながら、慢性腸症の犬において腸上皮バリア機能が破綻するメカニズムについては明らかになっていなかった。

本研究では、腸上皮バリア機能を破綻させる因子およびその後発生する腸炎増悪因子としてハウスダストマイト (HDM) に着目した。HDM は環境中に存在するアレルゲンで、ヒトや犬において HDM 特異的な IgE を産生させ、アトピー性皮膚炎やアレルギー性気管支炎などのアレルギー疾患を引き起こすことが良く知られている。さらに、HDM は自身が持つプロテアーゼ (蛋白分解) 活性を介して、皮膚ケラチノサイトや気管上皮細胞のタイトジャンクションを変性させる作用や、気管上皮細胞から産生されるムチンを分解する作用を有している。これらの作用により、HDM は皮膚や気道のバリア機能を直接減弱させることができる。HDM のプロテアーゼはまた、特異的な受容体を介して、皮膚ケラチノサイトや気管上皮細胞、免疫細胞から様々な炎症性サイトカインを産生させることもできる。HDM は、環境アレルゲンとしてだけではなく、そのプロテアーゼ活性により、皮膚や気道においてアレルギーだけではなく多様な炎症反応を誘発する因子としても重要な役割を果たしている。

近年行われた研究から、マウスやヒトにおいて、経口摂取された HDM が胃酸や消化液に曝露された後もプロテアーゼ活性を保ったまま消化管内 (胃、十二指腸、結腸、直腸) に存在し続けることが明らかになっている。犬において同様の解析は行われていないが、ヒトと同じ生活環境に居住する犬においても、経口摂取した HDM が消化管内に存在する可能性が高いことが推察される。消化管内に存在する可能性がある HDM は、そのプロテアーゼ活性により腸上皮バリアを破綻させ、さらに腸粘膜に存在する免疫細胞から炎症性サイトカインを産生させることで、慢性腸症の発症および増悪因子として機能している可能性が十分に考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、犬に経口摂取されたハウスダストマイト (HDM) が、プロテアーゼ活性を保ちながら腸管内に到達し、腸上皮バリア機能を破綻させるとともに、腸粘膜の免疫細胞から炎症性サイトカインを産生させることで慢性腸症を惹起するという仮説を立てた。ヒトと同じ生活環境に居住する犬は、その動物学的特性から床やカーペットに存在する HDM を経口摂取している可能性が高い。本研究の目的は、以下の3つを明らかにすることである。

- (1) 犬の消化管内における HDM の存在
- (2) 消化管内 HDM が腸上皮バリア機能に及ぼす影響
- (3) 消化管内 HDM が慢性腸症の病態、特に炎症性サイトカイン IL-1 β の発現に及ぼす影響

3. 研究の方法

(1) 犬の消化管内における HDM の存在

大学において飼育している健常犬、家庭で飼育されている健常犬、および慢性腸症と診断した犬の直腸から用手法により直接糞便を採取した (環境から糞便中へのハウスダストマイトのコンタミネーションを極力さけるため)。また、大学飼育の健常犬および慢性腸症の犬から、内視鏡下で胃液および十二指腸液を採取した。これらのサンプルにおいて、HDM の主要アレルゲンの1つでありプロテアーゼ活性を有する Der p1 濃度を市販の ELISA キットおよび高感度 ELISA 測定系を用いて測定した。さらに、Der p1 が、腸上皮バリア機能が低下した慢性腸症の犬の腸粘膜内に存在するか否かを解析するため、大学飼育の健常犬および慢性腸症の犬から内視鏡生検により十二指腸粘膜および結腸粘膜を採取し、腸粘膜における Der p1 濃度を測定した。

(2) 消化管内 HDM が腸上皮バリア機能に及ぼす影響

慢性腸症の犬において腸上皮バリア機能が低下しているか否かを解析するため、大学飼育の健常犬および慢性腸症の犬から十二指腸粘膜および結腸粘膜を内視鏡生検により採取し、タイトジャンクション構成分子であるオクルディンの遺伝子発現量をリアルタイム PCR により測定した。次に、大学飼育の健常犬の十二指腸粘膜および結腸粘膜を HDM 抗原と培養し、オクルディンおよびその他のタイトジャンクション構成分子の遺伝子発現量をリアルタイム PCR により測定した。

(3) 消化管内 HDM が慢性腸症の病態、特に炎症性サイトカイン IL-1 β の発現に及ぼす影響

炎症性サイトカイン IL-1 β は、消化管において主にマクロファージから産生される。これまでの報告では、慢性腸症の犬の十二指腸において IL-1 β が高発現していることが報告されている。慢性腸症では、腸炎は結腸にも波及することから、慢性腸症の病態における IL-1 β の重要性をさらに明らかにするため、慢性腸症の犬の結腸粘膜における IL-1 β およびその受容体アンタゴニスト (IL-1Ra) の発現量を ELISA で測定し、その比率を算出した。

次に、消化管内 HDM が IL-1 β の産生に及ぼす影響を明らかにするため、大学飼育の健常犬の末梢血由来マクロファージを HDM 抗原とともに培養し、IL-1 β の遺伝子発現量をリアルタイム PCR により定量し、蛋白質発現量を ELISA により測定した。また、HDM に含まれるプロテア

ーゼ活性の作用および HDM に混入している LPS の影響を解析するため、HDM を各阻害剤とともに培養し、IL-1 β の mRNA 発現量を同様に測定した。さらに、HDM アレルゲンによるマクロファージからの IL-1 β 産生誘導能のメカニズムを解析するため、IL-1 β の発現に必要な NLRP3 インフラマソームの構成因子である NLRP3 遺伝子の発現量を、HDM 抗原で刺激したマクロファージにおいてリアルタイム PCR により定量した。

4. 研究成果

(1) 犬の消化管内における HDM の存在

市販の ELISA キットの感度では、各サンプル中の Der p1 濃度を測定することができなかった。そこで、Der p1 に対する異なる抗体を用いて高感度 ELISA 測定系を新たに構築し、各サンプルにおける Der p1 濃度を測定したところ、大学飼育の健常犬および慢性腸症の犬の胃液、十二指腸液、糞便において Der p1 が検出された。また、家庭飼育の健常犬の糞便からも Der p1 が検出された。このことから、犬の消化管内には経口摂取した HDM アレルゲンが存在することが明らかになった。一方、大学飼育の健常犬および慢性腸症の犬の胃液、十二指腸において、Der p1 濃度に有意差は検出されなかった。糞便中 Der p1 濃度については、家庭飼育の健常犬における Der p1 濃度が大学飼育の健常犬および慢性腸症の犬における Der p1 濃度よりも有意に高かった。これらの結果から、犬の消化管内 HDM アレルゲン量は、飼育環境における HDM の量や、嘔吐や下痢に伴う消化管外への HDM の排出により変動していることが推察された。

十二指腸粘膜および結腸粘膜内において検出された Der p1 濃度は、健常犬に比べ慢性腸症の犬において有意に高かった。このことから、腸上皮バリア機能が減弱した慢性腸症の犬の腸粘膜では、HDM アレルゲンが腸粘膜内に侵入している可能性が考えられた。

(2) 消化管内 HDM が腸上皮バリア機能に及ぼす影響

大学飼育の健常犬と慢性腸症の犬の十二指腸粘膜において、オクルディン遺伝子の発現量に有意差は認められなかった。一方、結腸粘膜におけるオクルディン遺伝子発現量は、大学飼育の健常犬に比べ慢性腸症の犬において有意に低下していた。この結果から、オクルディンは慢性腸症の結腸炎の発症に関与しているものと考えられた。

大学飼育の健常犬から採取した十二指腸粘膜および結腸粘膜を HDM 抗原と培養した群と対照（生理食塩水培養）群においては、オクルディンを含むタイトジャンクション構成分子の遺伝子発現量に有意差は検出されなかった。この結果から、犬の消化管内に存在する HDM アレルゲンは、腸上皮バリア機能に影響を及ぼす影響は低いものと推察された。

(3) 消化管内 HDM が慢性腸症の病態、特に炎症性サイトカイン IL-1 β の発現に及ぼす影響

慢性腸症の犬の結腸粘膜においては、大学飼育の健常犬と比較して IL-1 β 、IL-1Ra それぞれの発現に有意差は認められなかったが、IL-1 β と IL-1Ra の発現量の比を解析したところ、慢性腸症の犬では大学飼育の健常犬と比較して IL-1 β の発現が有意に増加していた。このことから、慢性腸症の犬の結腸では、十二指腸と同様に、IL-1 β と IL-1Ra の発現バランスが破綻することで過剰な炎症反応が誘導されていると考えられた。

HDM 抗原で刺激したマクロファージからの IL-1 β 遺伝子および蛋白質発現量は、対照群に比べ、HDM 刺激群において有意に増加していた。この効果は、システインプロテアーゼ阻害剤や LPS 阻害剤により影響されず、セリンプロテアーゼ阻害剤により減少することから、HDM に含有されるセリンプロテアーゼの作用によりマクロファージからの IL-1 β 産生が誘導されることが明らかになった。

HDM 抗原で刺激したマクロファージにおける NLRP3 遺伝子発現量は、対照群に比べ、HDM 刺激群で有意に増加していた。この効果は、システインプロテアーゼ阻害剤や LPS 阻害剤により影響されず、セリンプロテアーゼ阻害剤により減少することから、HDM に含有されるセリンプロテアーゼの作用により、マクロファージにおける NLRP3 インフラマソームの活性化が誘導される可能性が考えられた。

本研究で得られた成果により、環境アレルゲンである HDM は、健常犬および慢性腸症の犬を含め、家庭で飼育されている犬に幅広く経口摂取されるが、腸上皮バリア機能が減弱した慢性腸症の犬の腸粘膜では、HDM アレルゲンが腸粘膜内に侵入し、腸粘膜に存在するマクロファージの NLRP3 インフラマソームを活性化することで IL-1 β の産生を誘導する可能性が明らかになった。本研究により、HDM が慢性腸症の犬の消化管において、自然免疫系を活性化することで慢性的な腸炎を発症させる新たな病態が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ohno H, Takahashi K, Yanuma N, Ogawa M, Hasegawa A, Sugita K, Kawano K, Sasaki K, Shirai J, Nagaoka K, Ohmori K.	4. 巻 81
2. 論文標題 Effects of a selective casein kinase 1 and inhibitor on Fc RI expression and IgE-mediated immediate-type cutaneous reactions in dogs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 1680-1684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.18-0756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sugita K, Yanuma N, Ohno H, Takahashi K, Kawano K, Morita H, Ohmori K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Oral faecal microbiota transplantation for the treatment of Clostridium difficile-associated diarrhoea in a dog: a case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Vet Res	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12917-018-1754-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Osada H, Ogawa M, Hasegawa A, Nagai M, Shirai J, Sasaki K, Shimoda M, Itoh H, Kondo H, Ohmori K.	4. 巻 79(2)
2. 論文標題 Expression of epithelial cell-derived cytokine genes in the duodenal and colonic mucosae of dogs with chronic enteropathy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 393-397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.16-0451	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa A, Watanabe M, Osada H, Ogawa M, Ohno H, Yanuma N, Sasaki K, Shimoda M, Shirai J, Ohmori K.	4. 巻 495(3)
2. 論文標題 Influence of glucocorticoids on time-of-day-dependent variations in IgE-, histamine-, and platelet-activating factor-mediated systemic anaphylaxis in different mouse strains	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 2184-2188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.12.099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa M, Osada H, Hasegawa A, Ohno H, Yanuma N, Sasaki K, Shimoda M, Shirai J, Kondo H, Ohmori K.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Effect of interleukin-1 on occludin mRNA expression in the duodenal and colonic mucosa of dogs with inflammatory bowel disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Vet Intern Med	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jvim.15117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 高橋佳穂、矢沼菜々子、大野光、廣川真凜、宮島柁生、杉田浩児、佐々木一昭、白井淳資、大森啓太郎
2. 発表標題 慢性腸症の犬の消化管内に存在するハウスダストマイトの作用解析：マクロファージからのIL-1beta産生作用
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugita K, Takahashi K, Ogawa M, Hasegawa A, Yanuma N, Ohno H, Kawano K, Ohmori K.
2. 発表標題 Fecal microbiota transplantation for the treatment of protein-losing enteropathy secondary to inflammatory bowel disease in two dogs
3. 学会等名 Asian Meeting of Animal Medical Specialties 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahashi K, Yanuma N, Ohno H, Hirokawa M, Miyajima M, Sugita K, Sasaki K, Shirai J, Ohmori K.
2. 発表標題 Presence of house dust mite in the gastrointestinal tract of dogs with chronic enteropathy: a potential inducer of IL-1beta from macrophages
3. 学会等名 Asian Meeting of Animal Medical Specialties 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古川林太郎, 高橋佳穂, 廣川真凜, 宮島征生, 伊藤博, 大森啓太郎
2. 発表標題 国内の犬における食事反応性腸症および炎症性腸疾患の臨床的特徴に関する回顧的研究
3. 学会等名 第16回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢沼菜々子, 大野光, 高橋佳穂, 小川美聡, 長谷川絢奈, 杉田浩児, 佐々木一昭, 白井淳資, 大森啓太郎
2. 発表標題 慢性腸症の犬の消化管内におけるハウスダストマイトの存在
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉田浩児, 矢沼菜々子, 大野光, 高橋佳穂, 川野浩志, 森田英利, 大森啓太郎
2. 発表標題 Clostridium difficileが検出された慢性大腸性下痢に対し経口糞便移植療法を行った犬の1例
3. 学会等名 第15回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川美聡, 長田大翔, 長谷川絢奈, 大野光, 矢沼菜々子, 佐々木一昭, 下田 実, 白井淳資, 近藤広孝, 大森啓太郎
2. 発表標題 犬の炎症性腸疾患の結腸粘膜におけるIL-1betaの発現が腸管上皮細胞の密着結合に及ぼす影響
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷川 絢奈、渡邊美和、長田大翔、小川美聡、大野光、矢沼菜々子、佐々木一昭、下田実、白井淳資、大森啓太郎
2. 発表標題 マウス系統による全身性アナフィラキシー日内変動の違い
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ogawa M, Osada H, Hasegawa A, Ohno H, Yanuma N, Sasaki K, Shimoda M, Shirai J, Kondo H, Ohmori K.
2. 発表標題 Imbalance of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist attenuates gene expression of occludin, a tight junction component, in the colonic mucosa of dogs with inflammatory bowel disease
3. 学会等名 Asian Meeting of Animal Medicine Specialties 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----