

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580444

研究課題名(和文) イヌ炎症性腸疾患の免疫学的アプローチによる病態解明と新規治療ターゲットの探索

研究課題名(英文) Study on Intestinal Immune Responses in Canine Inflammatory Bowel Disease

研究代表者

藤本 由香 (FUJIMOTO, YUKA)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：40405361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：イヌの炎症性腸疾患(IBD)の病態を解明する目的で、ヒトのIBDの病態に関与があり、治療への応用の報告のある因子のうち、特にtumor necrosis factor (TNF)- α に着目し、イヌの腸管組織における発現量、発現分布について検討をおこなった。イヌのIBDでは、健康なイヌとくらべ、TNF- α の発現量は低下していたが、TNF受容体(TNFR1)の発現は高値を示した。イヌの消化管免疫におけるTNF- α は、炎症を促進するよりも、炎症を制御する機構に重要な役割がある可能性が示唆され、ヒトとイヌとの免疫応答に違いがある可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify pathophysiology of canine inflammatory bowel disease (IBD), we investigate the gene expression levels and localizations of the expression in the intestinal mucosa, focus on tumor necrosis factor (TNF)- α in particular, in the intestinal biopsies from dogs with IBD and healthy dogs. The gene expression level of TNF- α was lower in dogs with IBD, compared to healthy dogs, using in situ hybridization method. Furthermore, the protein expression level of TNF receptor 1 (TNF-R1) was higher in dogs with IBD, compared to healthy dogs, using immunohistochemical staining. The role of TNF- α in the canine intestinal immunity was thought to be participated in the control of inflammation than the aggravation of inflammation. And also, it was suggested the possibility that the immune responses in canine intestine was different from human.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：消化管免疫 イヌ

1. 研究開始当初の背景

イヌの炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) は、胃、小腸、および大腸における炎症細胞の浸潤を特徴とし、慢性の消化器症状を引き起こす原因不明の症候群である。イヌ IBD は、確定診断法はなく、3 週間以上の慢性的な消化器症状、食事療法や対症療法のみでは症状が消失しないこと、他の疾患が除外されていること、免疫抑制療法に対する反応性を総合的に評価し、臨床的に診断される疾患である。また、治療に対するエビデンスも少なく、動物やその家族、そして獣医師を悩ます疾患である。一方、ヒトの IBD は、疾患概念および病態が幾分明らかになってきており、病因は、遺伝的要因、環境要因、食物要因が発症に大きく影響し、腸内細菌に対する異常な免疫応答が IBD の発症・増悪に大きく関わると考えられている。消化管免疫は恒常性の維持だけではなく、IBD 発症の役割も担う諸刃の剣であり、わずかな調節の乱れが、重篤な病態を招くため、イヌにおいても消化管免疫の解明が望まれる。

近年、ヒト IBD で発現変動が観察される免疫因子について、イヌにおいても幾つかの報告がある。微生物などの生体への侵入物を認識し、免疫応答を誘導する Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) に関して、IBD の腸管では、健常犬と比較し、TLR2、TLR4、TLR9 の発現上昇がみられたという報告がある一方で、TLR4 には変動が無く、TLR2 発現の顕著な上昇が見られたという、異なる報告もある。ヒトの IBD は、クローン病と潰瘍性大腸炎があり、いずれも不適切で過剰な免疫応答が惹起されていることは共通しているが、クローン病は獲得免疫系が Th1 優位、潰瘍性大腸炎では Th2 優位という病態特性があるが、イヌにおいては Th1、Th2 の混合型と報告がある。イヌ IBD の免疫反応について、病態の解明や新規の治療法に結びつく報告が十分にはないのが現状である。

そこで、まずはヒト IBD の新規の治療ターゲットとなっている免疫因子に着目することとし、イヌの IBD への関与の有無を検討し、イヌ IBD の病態の理解を深めることが重要であると考えた。また、解析手法は、着目因子の発現の有無や発現量を解析するだけではなく、免疫組織化学的手法を用いることで、発現部位や発現細胞、また炎症反応との関わりなど、その因子の役割がより明らかになると期待される。

研究開始当初に着目した免疫因子は、ヒト IBD の胃腸で発現上昇が観察され、腸炎の発症進展に対して抑制的に作用することがモデルマウスで報告されている Heme oxygenase-1 (HO-1)、同じく抗炎症作用に関与があると示唆されているアデノシン受容体 (A2aR)、ヒト IBD の血中マーカーとして期待されている血小板由来成長因子 (PDGF-BB)、病原体を認識する TLR であ

る。また、病態が異なると理解されているヒト IBD のクローン病と潰瘍性大腸炎のいずれにおいても、病態形成への関与が認められている tumor necrosis factor (TNF)- α について、イヌ IBD への関与の有無を検討することとした。さらに TNF- α 同様、中和抗体によるヒト IBD の治療効果が報告されているインターロイキン (IL)-6 のイヌ腸管免疫における関わりについて検討を加えた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト IBD の病態に関わっていると報告のある免疫因子に着目し、イヌ IBD の病態への関与を検討することを目的とし、イヌ IBD の診断や治療法の発展を目指す。

これまで、イヌ IBD の腸管における免疫因子の mRNA 発現量の報告はいくつかあるが、そのほとんどが組織あたりの発現量を解析したものであった。したがって、本研究では、組織切片を用い、免疫組織化学染色法、*in situ* hybridization 法を用いることで、着目因子の発現部位または発現細胞、炎症による細胞浸潤などの形態学的な変化も合わせてとらえることとし、発現量の増減だけではなく、着目因子の発現の特徴や役割についても考察を加え、イヌの消化管免疫機構の解明ならびにイヌ IBD の病態解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 供試材料

IBD 群

2008 年に World Small Animal Veterinary Association の総会で提唱されたイヌ IBD の診断基準に基づき、3 週間以上の消化器症状を示し、食事の変更や対症療法には完全に反応せず、その他の慢性消化器症状を示す疾患を除外し、病理組織学的に炎症性変化が明らかであることから IBD と診断されたイヌから採材した小腸組織法本 IBD 群とした

慢性群

3 週間以上、慢性消化器症状を示し、食事療法や抗菌治療で改善がみられるなど、IBD 以外の慢性腸炎と診断されたイヌより採材した小腸組織標本を慢性群とした。

急性群

消化器症状を呈してから 2 週間未満のイヌより採材した小腸組織標本を急性群とした。

健常群

消化器症状がなく、身体検査、一般的な血液検査、血液生化学検査で健康であることを確認した、実験用ビーグルから採材した小腸組織標本を健常群とした。

(2) 組織の処理法

健常群

全身麻酔下で、腹部正中切開を行い、十二指腸、空腸、回腸、結腸より生検トレパン(直径 8 mm)を用いて組織採取(全層生検)し、一部はRNAlaterで保存し、その他は中性ホルマリンで固定し、常法によりパラフィンブロックを作製した。

IBD 群, 慢性群, 急性群

全身麻酔下で内視鏡による生検,あるいは開腹術を行い,全層切除生検を実施し,採取した組織をホルマリン固定し,パラフィン包埋ブロックを作製した。

(3) 臨床症状の重症度

IBD 群と慢性群について,臨床症状のスコアリングシステム(Canine IBD Activity Index: CIBDAI)を用いて,臨床症状の重症度を評価した。

(4) 消化管組織の形態学的観察

組織サンプルにヘマトキシリン・エオジン染色を施し,炎症細胞の浸潤の程度,上皮細胞の損傷の程度などを観察した。

(5) 免疫組織化学染色法による解析

HO-1, A2aR, PDGF-BB の小腸における発現,これらタンパクの発現細胞の同定するために,マクロファージ(macrophage scavenger receptor-A: MSR-A 陽性マクロファージ)の免疫組織染色による検出を行った。

TNF-receptor (R)1 の小腸における発現を免疫組織化学染色法で解析した。

(6) *in situ* hybridization 法による解析

TNF- α ならびに IL-6 の mRNA 発現を *in situ* hybridization 法 (QuantiGene ViewRNA Evaluation Kit[®])を用いて検出した。

(7) リアルタイム PCR による TNF- α 発現量

TNF- α に対する特異的なプライマーを用い,消化管組織(健常犬)あたりの発現量を内在性コントロールに GAPDH をもちいて定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) IBD 群 (n=50) では健常群 (n=10) と比較して HO-1 は約 7 割の検体で, A2aR は約 8 割の検体で発現増加が認められた。一方, PDGF-BB は約 2 割の検体で発現増加を観察した。また,発現細胞は,HO-1 はヒトと同様にマクロファージであったのに対して, A2aR と PDGF-BB はヒトと異なりプラズマ細胞が主体であった。

IBD 群において HO-1 と A2aR の発現増加が認められたことから,これらの因子が,イヌ IBD の免疫応答と関わることを示唆され

た。また,IBD 群において,HO-1 と A2aR がともに発現していた検体は 50 検体中 28 検体,いずれの発現も観察されなかったのは 50 検体中 5 検体で,ヒトと同様に,イヌにおいても HO-1 の発現誘導が A2aR の活性化に関与している可能性も考えられた。しかしながら,ヒトとイヌの A2aR 発現細胞種が異なったため,イヌの腸管ではヒトと異なる免疫応答が存在する可能性が示唆された。

(2) *in situ* hybridization 法によるイヌ小腸 TNF- α mRNA 発現解析では,IBD 群 (n=10) は慢性群 (n=5) および健常群 (n=6) と比較し,有意に低い発現量を示し,慢性群と健常群には有意な差はみられなかった。一方,免疫組織化学染色法による TNF-R1 発現解析では,IBD 群では他の 2 群と比べて高い発現量を示す傾向が観察された ($P=0.10$) が,有意な差はなく,健常群と慢性群の間にも有意な差は観察されなかった。

IBD 群と慢性群において,臨床症状の重症度と TNF- α mRNA, TNF-R1 発現量の相関性を検討した結果, TNF- α mRNA の発現量と臨床症状の重症度との間に有意な相関はみられなかったが, TNF-R1 発現量と臨床症状の重症度においては,有意な正の相関 ($p=0.0054$, $R^2=0.40$) が観察された。

TNF- α mRNA 発現量と TNF-R1 発現量のバランスについて,1 視野あたりの発現量の比を算出することにより比較したところ,IBD 群では,他の 2 群よりも TNF- α mRNA 発現量と TNF-R1 発現量の比が有意に低値を示し,慢性群と健常群とのあいだに有意な差はみられなかった。

以上の結果より,IBD 群では, TNF- α mRNA 発現量が有意に低く, TNF-R1 発現量が高値を示す傾向がみられ,他の群とは異なる発現動態が観察されたので,これら因子が他の腸炎との鑑別診断に活用できる可能性が考えられた。しかしながら,炎症のある IBD 群で TNF- α mRNA 発現量が健常群よりも低値を示したことから,ヒト IBD の治療として着目される抗 TNF- α 療法はイヌ IBD の治療への適応とはならず, TNF- α はイヌの腸管免疫において炎症を促進するよりも炎症を制御する作用に関わる可能性が示唆された。

(3) 前述の TNF- α mRNA 発現の結果においても,イヌの消化管の免疫応答はヒトと異なる可能性が示唆されたので,ヒトの IBD の病態に関与し,治療にも応用されている TNF- α と IL-6 に着目し,健常犬の消化管(十二指腸,空腸,回腸,結腸)における発現量,発現パターンを比較し,イヌの腸管免疫の理解を深めることとした。消化管の部位による発現量の違いを *in situ* hybridization 法による解析で評価したところ, TNF- α と IL-6 mRNA はともに,小腸での発現が大腸(結腸)にくらべて高いが,小腸(十二指腸,空腸,

回腸)間による違いはみられなかった。また、TNF- α は、絨毛の粘膜固有層に発現が高く、IL-6 は絨毛と陰窩で発現の差はなく上皮での発現が高く認められ、発現のパターンに違いがみられた。健常群(n=8)と疾患群(IBD 群: n=9, 慢性群: n=5, 急性群: n=4) で発現量を比較すると、TNF- α は健常組織において発現細胞は少なく腸炎組織においてはさらに減少が観察された。そこで、健全な消化管での TNF- α mRNA 発現をリアルタイム PCR 法による定量解析で確認したが *in situ* hybridization 法での解析同様に、小腸間での差はなく、大腸よりも小腸の発現が高かった。

一方、IL-6 は健常組織よりも疾患組織で増加することが観察され、IL-6 の上皮細胞における発現が粘膜固有層よりも高かったので、ヒトの報告と同様に、イヌにおいても腸管上皮細胞の方が、粘膜固有層の浸潤細胞よりも IL-6 産生能が高いのであれば、腸管免疫における上皮細胞の役割がより重要である可能性が考えられる。

また、イヌの腸管における TNF- α の発現細胞数は少なかったが、1つの細胞あたりの発現数(陽性シグナル数)は、TNF- α は IL-6 よりも顕著に高く、発現パターンが異なることがわかった。

今回、*in situ* hybridization 法で発現解析することにより、組織あたりの発現定量法(リアルタイム PCR 法)とは異なり、発現量だけではなく、発現分布、発現細胞、細胞あたりの発現量など、着目因子の発現パターンの特徴をより詳細に観察することができた。しかしながら、今回の着目因子は、IBD の病態への関与の可能性は少なく、今後、さらなる解析を進めることで、イヌの腸管免疫機構、ならびにイヌ IBD の病態解明につながると期待できると考えた。

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤本 由香 (FUJIMOTO YUKA)

大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：40405361

(2)研究分担者

東 泰孝 (AZUMA YASUTAKA)

大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：50298816