

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292159

研究課題名(和文)国内の犬種特異的腸炎を用いた腸内環境-粘膜応答クロストーク異常の解析と治療法探索

研究課題名(英文) Investigation on dysregulation of enteric environment-mucosal response crosstalk and searching novel therapies in domestic breed-specific canine enteritis

研究代表者

大野 耕一 (OHNO, KOICHI)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90294660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：国内のミニチュア・ダックスフンド(MD)に好発する炎症性結直腸ポリプ(ICRP)を用いて粘膜免疫と腸内環境の異常について解析した。ICRPでは自然免疫に関与するパターン認識受容体(PRR)の発現や機能に異常があることがわかり、その中でもNOD2の一塩基多型が有意にICRPの発生と関連することが明らかとなった。またICRP症例犬は健常犬とは異なる細菌叢を有することも明らかとなった。このほか犬の慢性腸症ではリンパ球抗原レセプター遺伝子再構成は小細胞性リンパ腫で陽性率が高くなること、およびFoxp3陽性の制御性T細胞数はIBDで減少、小細胞性リンパ腫で増加することなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Dysregulation of mucosal immunity and intestinal environment in Inflammatory colorectal polyp (ICRP) in Miniature Dachshund (MD) were investigated. Expression profiles and functions of pattern recognition receptors (PRRs) were altered in ICRPs. Among these PRR, SNPs observed in nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors NOD2 gene may play a role in the pathogenesis of ICRPs in MDs. Furthermore, we elucidated the fecal dysbiosis in ICRP. Additionally, we revealed that PCR for antigen receptor gene rearrangements (PARR) could be an indicator of was small cell intestinal lymphoma and mucosal Foxp3-Treg number is decreased in canine IBD but not in small cell intestinal lymphoma, suggesting Tregs contributes to the pathogenesis of canine IBD and intestinal lymphoma.

研究分野：獣医内科学

キーワード：犬種 慢性腸炎 パターン認識受容体 腸内細菌叢 リンパ球抗原レセプター遺伝子再構成 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

犬種特異的な慢性腸炎の病態に関する報告は極めて乏しく、ジャーマン・シェパード (GSD) における慢性腸炎や肛門周囲瘻孔などの疾患で報告があるのみである。これまでに、我々は犬の炎症性腸疾患について数多くの基礎研究を行ってきたが、その研究過程で国内では世界的にみても特異な2つの犬種特異的腸炎があることを明らかにしてきた。一つはミニチュア・ダックスフントの炎症性結直腸ポリープ (Inflammatory colorectal polyps; ICRP) であり、国内のミニチュア・ダックスフントでは結直腸部に限局した炎症性多発性ポリープが多発する。これは他犬種では例をみない新しいIBDの病型であると考えられ、その病理組織所見はヒトの潰瘍性大腸炎(UC)と非常に類似している。もう一つは柴犬の難治性慢性腸症 (Chronic enteropathy; CE) であり、これも我々の国内のIBDの疫学調査において初めて認識された疾患であり、柴犬はIBDの発症が有意に多く、十二指腸でとくに強い炎症が惹起され、難治性症例が多い。

このような背景をもとに、今回の申請研究の目的は、ミニチュア・ダックスフントのICRPおよび柴犬の難治性慢性CEという2つの品種特異的な特発性腸炎症例を用いて、その腸内環境の変化と粘膜応答の変化を解析して、新規治療法開発の基礎とすることにある。

2. 研究の目的

1) 病原体関連分子パターン(PAMPs)に対する免疫応答の変化とパターン認識受容体(PRR)の遺伝子変異の有無の検出

ミニチュア・ダックスフントのICRPにおいても、Toll様受容体(Toll like receptors; TLR)の遺伝的変異やパターン認識受容体(PRR)の異常が発症に関わっている可能性はかなり高いと考えられるため、これらの変化について、免疫学および分子生物学的解析を行う。

2) ミニチュア・ダックスフントのICRPの腸内細菌叢の解析

ミニチュア・ダックスフントのICRP罹患犬の腸内細菌叢について、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行い、細菌叢の変化、特定の細菌の関与を明らかにする。

3) 犬の慢性腸症におけるリンパ球抗原レセプター遺伝子再構成(PARR)の有無や制御性T細胞(Treg)数の臨床的意義

リンパ系腫瘍の診断の一助としてPARR検査が知られているが、犬の消化管型リンパ腫では感度特異度に問題があると言われている。また消化管粘膜に存在するTregがIBDの発症に関わっているとする仮説もあるため、犬のIBDおよび低悪性度(小リンパ球性)リンパ腫におけるこれらのパラメーターについて、その臨床的意義を検討する。

3. 研究の方法

1) 病原体関連分子パターン(PAMPs)に対する免疫応答の変化とパターン認識受容体(PRR)の遺伝子変異の有無の検出

ICRPの病変部、非病変部における各種PRRの発現をリアルタイムPCRにて解析する。また健常なミニチュア・ダックスフントおよびICRP症例より末梢血単核球(PBMC)を分離・培養し、それに各種PRRに対する病原体関連分子パターン(PAMPs)を添加する。産生されるサイトカイン(IL-1、TNF)量をリアルタイムPCR・ELISAにより定量し、ICRP罹患犬と健常犬とで比較評価する。異常を認められたPRRについて遺伝子をクローニングし、その塩基配列のシーケンス解析を行ない、遺伝子多型を検索する。

2) ミニチュア・ダックスフントのICRPの腸内細菌叢の解析

ICRP各個体の糞便サンプルからDNAを抽出し、16SrRNA遺伝子について次世代シ

ーケンサーによる解析を行なう。得られたデータについて、腸内細菌叢解析ソフトウェア (QIIME) により ICRP 罹患犬および健常犬の腸内細菌叢について比較解析し、疾患と腸内細菌叢の構成との関連性を検討する。

3) 犬の慢性腸症におけるリンパ球抗原レセプター遺伝子再構成(PARR)の有無や制御性T細胞(Treg)数の臨床的意義

IBD および小リンパ球性リンパ腫を含む慢性腸症の犬の内視鏡生検サンプルを用いる。PARR 解析とともに、病理組織学的検査、臨床病理学的パラメーターならびに予後と比較検討する。Treg は Foxp3 の免疫染色にて検出し、粘膜内の細胞数をカウントする。また同時に IgA 陽性細胞数も測定する。

4. 研究成果

1) 病原体関連分子パターン(PAMPs)に対する免疫応答の変化とパターン認識受容体(PRR)の遺伝子変異の有無の検出

実験にさきがけて、ミチュア・ダックスフント[®]の ICRP 症例を用いて、病変の好発部位について再検討を実施した。その結果、ICRP は結直腸の背側面よりも腹側面により好発することが明らかとなった(下図、文献 11 より抜粋)。そのため、糞便に対する過剰反応が ICRP の病態に関与することが推測された。

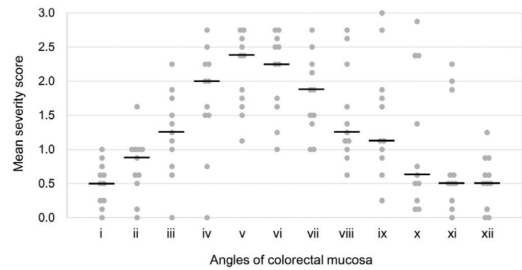
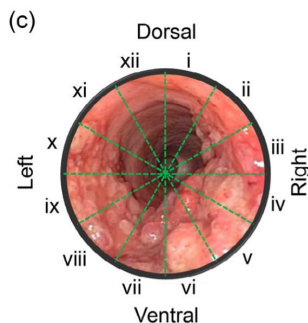


Fig. 3. Mean severity scores of ICRPs in 11 dogs at different angles of colorectal mucosa. The plots indicate the averaged data of each dog derived from two images and four observers. Each angle specified in the x-axis corresponds to that allocated in Fig. 1c. The horizontal lines represent the median value of the angle.

ICRP 症例犬のポリープ病変部における TLR1、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10 および NOD2 の遺伝子発現量の有意な上昇が観察された。これらの遺伝子の発現上昇はいずれも炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、IL-8/CXCL8 および TNF- α) の発現上昇と有意に相関していた。しかしながら、この発現上昇は病変部に限局して認められ、症例犬の非病変部結腸での発現レベルは健常犬の結腸と同等であった。そのため、この PRR の発現上昇は炎症の結果として発生したと考えられた。(文献 15)

次に、ICRP 症例犬における PRR の機能を評価するために、ICRP 症例犬 26 頭および対照の MD16 頭より末梢血由来単球を分離・培養し、IL-1 の遺伝子発現および蛋白産生量を指標として NOD1、NOD2、TLR1/2、TLR2、TLR2/6、TLR4、TLR5 および TLR9 のリガンド刺激に対する反応性を評価した。その結果、IL-1 の遺伝子発現レベルは NOD2 のリガンド刺激時に ICRP 症例犬でより高値となり、IL-1 の蛋白産生量は NOD2、TLR1/2、TLR2 および TLR2/6 のリガンド刺激時に ICRP 症例犬で亢進していることが明らかとなった。このことより、ICRP 症例犬では NOD2、TLR1/2、TLR2 および TLR2/6 の反応性が亢進していることが示唆された。(下図、文献 10 より抜粋)。

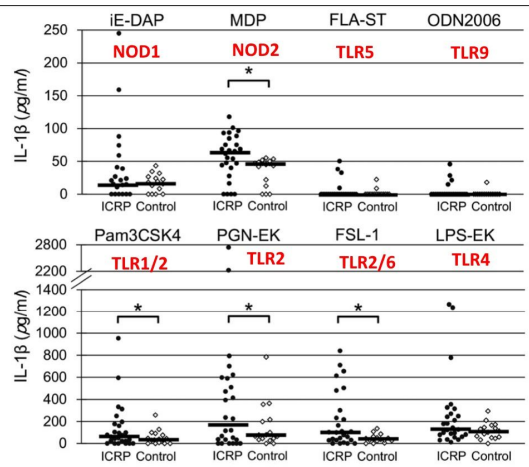


Fig. 4. Secretion of IL-1 β protein from monocytes stimulated with PAMPs for 24 hr in ICRP-affected (n=26) and control (n=16) MDs. Samples below the limit of detection (5.9 pg/ml) have been assigned a value of zero. The horizontal lines represent the median value of that group. Asterisks indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

そこで、この NOD2 に遺伝的変異が存在するのではないかと考え、データベース上の塩基配列を参照し、犬の NOD2 遺伝子の全翻訳領域(3,042 bp)をクローニングした。次に、ICRP 症例犬、対照および健常犬のゲノム DNA を用いて NOD2 遺伝子の全長をダイレクトシーケンスにより解析したところ、合計で 13ヶ所の一塩基多型 (SNP) が同定され、NOD2 のエクソン 3 に存在する 4 つの SNP (A1532G、T1573C、C1688G および G1880A) は実験ビーグル犬よりも ICRP 症例犬および対照 MD で多く認められる傾向にあった。さらに ICRP 症例犬 63 頭、対照 MD82 頭および対照の様々な犬種 237 頭について、ゲノム DNA をダイレクトシーケンスすることによりこの 4 つの SNP の遺伝子型を決定した。その結果、ICRP 症例犬群の変異アレル頻度は対照 MD 群よりも有意に高く、不完全優性遺伝モデルにおいて有意に ICRP の発生と関連することが明らかとなった。(下表、文献 9 より抜粋)。

Table 2
Association of six SNPs in NOD2 exon 3 with ICRPs in MDs.

SNP	Associated allele	Minor allele frequency		P-value
		Control MD	ICRP-affected MD	
A1532G	G	0.140	0.016	0.0002
T1573C	C	0.140	0.016	0.0002
C1688G	G	0.140	0.016	0.0002
G1690A	A	0.110	0.135	0.5144
G1880A	A	0.140	0.016	0.0002
G1990A	G	0.037	0.008	0.1151

2) ミチュア・ダックスフント[®] の ICRP の腸内細菌叢の解析

ICRP 症例犬 6 頭および健常な MD12 頭より糞便を採取し、その腸内細菌叢構成について次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) による 16S rRNA 解析を実施したところ、ICRP 症例犬は健常犬とは異なる細菌叢を有し、ICRP の寛解にしたがって細菌叢構成も健常化していくことが明らかとなった。また、ICRP 症例犬では Fusobacteriaceae の増加や Lachnospiraceae の減少が顕著に認められた (下図、文献 3 より抜粋)。

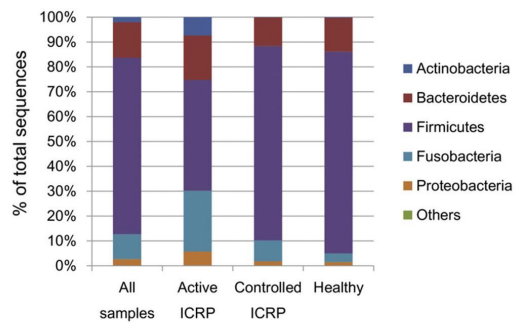


Fig. 1. Distributions of major bacterial groups at the phylum level. ICRP; inflammatory colorectal polyp. The bars "Others" includes the minor phyla Deferrribacteres, Spirochaetes, Tenericutes, TM7, and Verrucomicrobia.

* これら一連の研究により、ICRP 症例犬における自然免疫と腸内細菌叢の異常が明らかとなった。今回報告した PRR の発現および機能異常と遺伝的素因、ならびに腸内細菌叢の変動が ICRP の粘膜炎症の発生に寄与していることが示唆された。

3) 犬の慢性腸症におけるリンパ球抗原レセプター遺伝子再構成 (PARR) の有無や制御性 T 細胞 (Treg) 数の臨床的意義

柴犬の慢性腸症は他の犬種に比較して予後が悪いことをこれまでに報告してきたが、その病態解明のための基礎研究として、犬の慢性腸症におけるリンパ球抗原レセプター遺伝子再構成 (PARR) と腸粘膜における制御性 T 細胞数の意義を検討した。その結果 PARR は慢性腸炎と病理組織学的に判断される症例でもある程度の陽性例が認められたが、重症例で上皮内へのリンパ球浸潤が顕著である

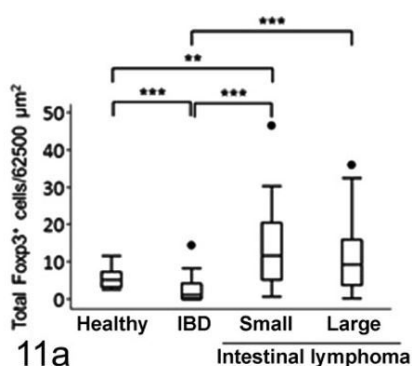
ほど、そして小細胞性リンパ腫であるほど陽性率が高くなることを明らかとした(下図、文献8より抜粋)

Table 1
Detection rate of clonal rearrangements of antigen receptor genes by histopathological category.

Histopathological diagnosis (n)	Total number positive for clonal rearrangements (%)
Chronic enteritis (96)	49 (51%)
Mild (14)	4 (29%)
Moderate (20)	8 (40%)
Marked (62)	37 (60%)
Epitheliotropism [-] (21)	10 (48%)
Epitheliotropism [+] (41)	27 (66%)
GI ⁺ lymphoma (21)	16 (76%)

また PARR についてはさらに慢性腸症の中で蛋白喪失性腸症では明らかな予後不良因子となることも同時に明らかとし、柴犬では PARR の陽性率が高いことを報告した。

また Foxp3 陽性の制御性 T 細胞数は I B D で減少、小細胞性リンパ腫で増加し、柴犬では両者の鑑別に利用可能であることなどを明らかにした(下図、文献6より抜粋)



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15件)

1: Kubota-Aizawa S, Ohno K, Kanemoto H, et al. Epidemiological study on feline gastric Helicobacter spp. in Japan. J Vet Med Sci. 2017;79(5):876-880.

2: Maeda S, Tsuboi M, Sakai K, et al. Endoscopic Cytology for the Diagnosis of Chronic Enteritis and Intestinal Lymphoma in Dogs. Vet Pathol. 2017 doi: 10.1177/0300985817705175. [Epub ahead of print]

3: Igarashi H, Ohno K, Horigome A, et al. Fecal dysbiosis in miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps. Res Vet Sci. 2016 doi:10.1016/j.rvsc.2016.01.005. Epub

2016 Jan 27.

4: Uchida E, Chambers JK, Nakashima K, et al. Pathologic Features of Colorectal Inflammatory Polyps in Miniature Dachshunds. Vet Pathol. 2016;53(4):833-9.

5: Fukushima K, Eguchi N, Ohno K, et al. Efficacy of leflunomide for treatment of refractory inflammatory colorectal polyps in 15 Miniature Dachshunds. J Vet Med Sci. 2016;78(2):265-9.

6: Maeda S, Ohno K, Fujiwara-Igarashi A, et al. Changes in Foxp3-Positive Regulatory T Cell Number in the Intestine of Dogs With Idiopathic Inflammatory Bowel Disease and Intestinal Lymphoma. Vet Pathol. 2016;53(1):102-12.

7: Nakashima K, Hiyoshi S, Ohno K, et al. Prognostic factors in dogs with protein-losing enteropathy. Vet J. 2015;205(1):28-32.

8: Hiyoshi S, Ohno K, Uchida K, et al. Association between lymphocyte antigen receptor gene rearrangements and histopathological evaluation in canine chronic enteropathy. Vet Immunol Immunopathol. 2015;165(3-4):138-44.

9: Igarashi H, Ohno K, Uchida E, et al. Polymorphisms of nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) gene in miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps. Vet Immunol Immunopathol. 2015;164(3-4):160-9.

10: Igarashi H, Ohno K, Fujiwara-Igarashi A, et al. Functional analysis of pattern recognition receptors in miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps. J Vet Med Sci. 2015 ;77(4):439-47.

11: Igarashi H, Ohno K, Fujiwara-Igarashi A, et al. Inflammatory colorectal polyps in miniature Dachshunds frequently develop ventrally in the colorectal mucosa. Vet J. 2015;203(2):256-8.

12: Igarashi H, Maeda S, Ohno K, et al. Effect of oral administration of metronidazole or prednisolone on fecal microbiota in dogs. PLoS One. 2014 Sep 17;9(9):e107909. doi: 10.1371/journal.pone.0107909.

13: Maeda S, Ohno K, Uchida K, et al. Intestinal protease-activated

receptor-2 and fecal serine protease activity are increased in canine inflammatory bowel disease and may contribute to intestinal cytokine expression. J Vet Med Sci. 2014;76(8):1119-27.

14: Maeda S, Ohno K, Fujiwara-Igarashi A, et al. Methylation of TNFRSF13B and TNFRSF13C in duodenal mucosa in canine inflammatory bowel disease and its association with decreased mucosal IgA expression. Vet Immunol Immunopathol. 2014; 160 (1-2):97-106.

15: Igarashi H, Ohno K, Maeda S, et al. Expression profiling of pattern recognition receptors and selected cytokines in miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps. Vet Immunol Immunopathol. 2014; 159 (1-2): 1-10.

〔学会発表〕(計 7件)

1. 「炎症性結直腸ポリープのミニチュア・ダックスフンドにおける糞便中短鎖脂肪酸濃度と腸内細菌叢との関連性」五十嵐寛高, 大野耕一ら 平成 28 年度日本小動物獣医学会 2016 年 9 月 2 日 札幌

2. 「犬の肉芽腫性胃炎の臨床的特徴に関する回顧的研究」五十嵐寛高, 大野耕一ら 第 12 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 2016 年 2 月 20 日 横浜

3. 「生菌製剤投与が健常犬の消化管におよぼす影響に関する基礎的検討」福島建次郎, 大野耕一ら 第 17 回日本ペット栄養学会 2015 年 7 月 18 日 東京

4. 「炎症性結直腸ポリープのミニチュア・ダックスフンドにおける糞便中短鎖脂肪酸濃度の解析」五十嵐寛高, 大野耕一ら 第 11 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 2015 年 2 月 21 日 横浜

5. Analyses on fecal microbiota and short chain fatty acids in Miniature Dachshunds with inflammatory colorectal polyps. Igarashi H, Ohno K, et al. Joint Symposium of the 6th Veterinary Research and the 3rd Veterinary Education among Universities of Veterinary Medicine in East Asia 2015 年 2 月 2 日 台北

6. 「ミニチュア・ダックスフンドの炎症性結直腸ポリープの発生角度に関する前向き研究」五十嵐寛高, 大野耕一ら 第 157 回日本獣医学会学術集会 2014 年 9 月 11 日 岐阜

7. PREVALENCE OF NOVEL HELICOBACTER STRAINS IN JAPAN. Sanae Kubota, Koichi Ohno, et al. ACVIM 2015 June, Indianapolis, IN

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 耕一 (KOICHI OHNO)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
准教授
研究者番号: 90294660

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者

辻本 元 (Hajime Tsujimoto)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
教授
研究者番号: 60163804

金本 英之 (Hideyuki Kanemoto)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
特任助教
研究者番号: 70646728

福島 建次郎 (Kenjiro Fukushima)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
特任助教
研究者番号: 00724915

坪井 誠也 (Masaya Tsuboi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
特任助教
研究者番号: 20721963

(4) 研究協力者: なし

()