

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660235

研究課題名(和文) イヌの炎症性腸疾患と低グレードT細胞性リンパ腫の診断法と病理発生解明

研究課題名(英文) Diagnostic hallmarks and pathogenesis of canine inflammatory bowel disease and T cell lymphomas.

研究代表者

内田 和幸 (Uchida, kazuyuki)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10223554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：動物医療における内視鏡普及に伴い、腸疾患の病理診断機会が増加している。リンパ腫診断に遺伝子検査が導入されたことも相まって、その診断精度が高まると期待されたが、炎症疾患(IBD)と消化管T細胞性リンパ腫(ETCL)の鑑別は現在でも困難である。申請者らはこれらの病態の病理学的特徴を明確にするとともに、イヌのIBDあるいはETCL罹患症例の血清中のグルテン由来分子に対する抗体の有無を調査したところ、正常対照<IBD<ETCLの順に抗グリアジンIgA抗体、抗組織トランスグルタミナーゼIgA抗体が有意に高値であることを明らかにした。この結果はヒトのセリアック病との類似する病態を示唆するものであった。

研究成果の概要(英文)：Molecular clonality analysis of T-cell receptor (TCR) genes for diagnosing T-cell lymphoma is widely used in veterinary medicine. However, differentiating chronic enteritis (CE) from intestinal lymphoma is challenging. We conducted serological examinations in combination IgA and IgG antibodies against gliadin and tissue transglutaminase (tTG) were quantitatively measured using ELISA. The conditions were classified according to the histopathological diagnosis, clonality analysis, and combined histopathological/clonality analysis. Histopathological analysis showed that dogs with intestinal lymphoma were likely to have high levels of serum IgA antibodies against gliadin and tTG, and serum IgG antibodies against tTG. Interestingly, dogs with intestinal lymphoma had a higher serum IgA titer against gliadin and tTG than did dogs with CE. These results suggest that canine CE and intestinal lymphoma may have a pathogenesis similar to human Celiac disease.

研究分野：獣医病理学

キーワード：犬 炎症性腸疾患 T細胞性リンパ腫 セリアック病 グリアジン 組織トランスグルタミナーゼ

1. 研究開始当初の背景

近年、イヌではタンパク漏出性腸症(PLE)と総称される胃腸疾患が増加している。伴侶動物医療における内視鏡検査の普及に伴い、これらの疾患の病理診断機会が増加するとともに、リンパ腫診断にIgHやTCRのクローナリティ検査が導入されたことも相まって、その診断精度が高まると期待されたが、実際には両検査の不一致が多く炎症疾患と低グレードリンパ腫の鑑別に混乱が生じている。このため平成24年度より科学研究費・挑戦的萌芽研究(研究代表 中山裕之)の助成を受け、申請者も分担者として参画し、イヌやネコの内視鏡組織診断の標準化のための研究を実施している。その結果、粘膜、特に絨毛先端部の上皮内におけるリンパ球の浸潤・増殖程度に応じてIBDとリンパ腫を区別することで、クローナリティ検査との一致率を向上させることができた。

しかし現在でも炎症性疾患と診断した症例に遺伝子検査ではTCRのクローナリティが検出される頻度は決して少なくない。このため申請者らの研究グループでは、「イヌのIBDは、単一分子に対する免疫応答により誘発され、重症化の過程で低グレードリンパ腫に進行する」と推察するに至った。平成24年度に自然科学機構生理学研究所(岡崎市)において、リンパ腫をテーマに医学領域と獣医領域の意見交換会を実施した際にも、医学領域の病理専門医よりイヌ・ネコの消化管T細胞性低グレードリンパ腫の病理組織像とヒトのセリアック病のそれとの類似性を指摘された。セリアック病はグルテン分子の一部に対する自己免疫疾患であり重症化によりリンパ腫を併発することが知られ、欧米に多く遺伝的背景が指摘されている。

2. 研究の目的

本研究では1の背景をもとに、イヌのIBDと低グレードリンパ腫の病理発生について3つの視点から研究を推進することとした。まず、(1)IBDおよび低グレードリンパ腫の罹患症例のMHCクラスIIの遺伝子型を調査し、罹患症例側の遺伝的背景の有無を検討する。ヒトのセリアック病には遺伝的背景が存在し、患者の多くがHLA-DQ2またはHLA-DQ8の白血球抗原を持つことが知られている。このため、まず犬においては、IBDや低グレードリンパ腫に罹患した症例の臨床データを回顧的に調査して、本疾患と犬種特異性の有無を検証し、特定犬種に発生がみられる場合は、特定犬種を対象にしてその白血球型を調査する。また(2)罹患症例の保存血清を利用してグルテン由来分子(グリアジン)および関連する自己抗体(組織トランスグルタミナーゼ)に対する抗体の有無を調査する。グルテン分子に対する抗体検査は、セリアック病診断には必須の項目であり、既に

ELISAキット等も市販されているため、これをイヌ用に調整して抗体価調査を実施する。(3)IBDと消化管低グレードリンパ腫の絨毛上皮内Tリンパ球の細胞型を特定し、両疾患の共通性と免疫学的な機序を検討する。以上の3項目が申請研究期間2カ年の現実的なゴールと考えた。本研究の遂行により得られる知見は、伴侶動物領域で非常に大きな問題となっている胃腸疾患の新規診断法や治療法の開発に直接寄与できるのみならず、ヒトのセリアック病の病理発生解明に有用な知見を提供するものになる。

3. 研究の方法

基本的な研究実施は、研究代表者(内田)が実施したが、申請者の所属研究室のジェームズ チェンバース助教、博士課程大学院生(2名)と学部学生(2名)の研究協力を得た。研究期間の2カ年は本体制で以下の項目を実施した。

(1)罹患症例の白血球遺伝型

内視鏡検査時に採取された腸粘膜の冷凍保存組織よりDNAを抽出し、白血球抗原のMHCクラスIIの遺伝子型を調査し、罹患症例側の遺伝的背景の有無を検討した。本検討については、クローナリティ検査用に分離抽出されたDNAを利用できたため、過去の症例の回顧的検索を実施した。特に国内の柴犬では、重度の炎症性腸疾患、低グレードリンパ腫を経て、高グレードリンパ腫へ進行する症例が多数確認されたため、柴犬の罹患症例を優先的に収集した。

(2)グルテン分子および組織トランスグルタミナーゼに対する抗体の検討

罹患症例の保存血清を利用してグルテン由来分子および組織トランスグルタミナーゼに対する抗体の有無を調査する。グルテン分子に対する抗体検査は、セリアック病診断には必須の項目であり、既にELISAキット等も市販されている。これをイヌ用に調整して本研究に汎用できる検査系を確立して、抗体価調査を実施した。

(3)慢性炎症性腸疾患と低グレードリンパ腫における上皮内リンパ球の同定

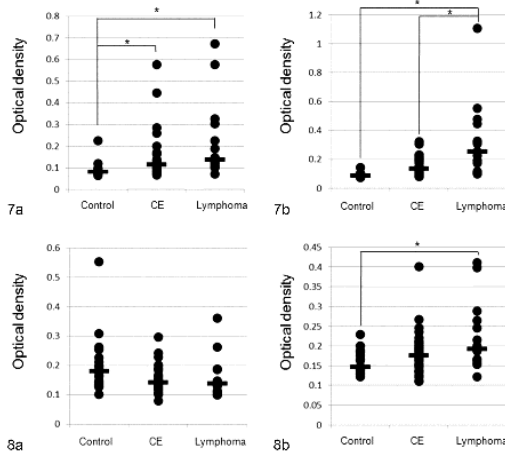
慢性炎症性腸疾患と消化管低グレードリンパ腫における絨毛上皮内のリンパ球の細胞型を特定し、両疾患の共通性と免疫学的発症機序を検討する。これまでの検討により、パラフィン標本でT細胞(CD3)、B細胞(CD20)、細胞傷害性T細胞/NK細胞(Granzyme B)および制御性T細胞あるいは一部のHelper T細胞(Foxp3等)をそれぞれ染色することができるが、その特異性には問題があり、T細胞をパラフィン標本で描出することはできていない。このためクローナリティ検査用に採取した凍結標本を使用して、上記の検討にイヌCD4、CD8等の抗体による検討も加え、凍結標本と蛍光抗体法の組み合わせによりそれぞれの細胞を染色し共焦点レーザー顕

微鏡で観察する。この結果より上皮内で生じている免疫応答を推測する。

4. 研究成果

当初計画した研究分野のうち、イヌの白血球型については、柴犬で本病態が最も多く、かつ疾患としての均一性が極めて高いことを確認できたので、現在多症例の DNA を収集している段階であり、来年度以降に一定の成果が得られると期待している。

申請者は、イヌの IBD あるいは低グレードリンパ腫罹患症例の血清（約 50 例）を利用してグリアジンおよび組織トランスグルタミナーゼに対する抗体の有無を調査したところ、正常対照 < IBD < ETCL の順に抗グリアジン IgA 抗体、抗組織トランスグルタミナーゼ IgA 抗体が有意に高値であることを明らかにした。この内容は 2016 年日本獣医内科学アカデミーおよび第 4 回日本獣医病理学専門家協会 JCVF 学術集会で公表し、JCVF 学術集会では本内容で優秀ポスター賞を受賞した。現在この研究課題については一定の再現性ある成果が得られたため科学論文として取りまとめを終了し、Vet Pathol 誌に投稿している。

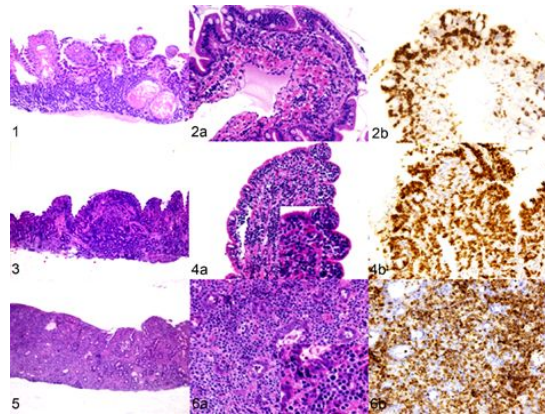


(抗グリアジン・組織トランスグルタミナーゼ IgA 抗体の疾患別力価)

上皮内リンパ球の定性については、現在までのところやや意外な結果を得ている。犬の腸管内リンパ球は T 細胞が主体であり、基本的に CD3 に陽性を示すが、これらの細胞は増殖の過程で CD20 も共発現することが分かった。皮膚リンパ腫では上皮向性リンパ腫で同様の所見が報告されているが、腸管リンパ腫における知見はこれまで確認されていない。

また他のリンパ球マーカーの検討の結果、犬の消化管 T 細胞性リンパ腫は、必ずしも、ヒトの腸症関連 T 細胞性リンパ腫 (EATL) の Type I および Type II の分類とは一致しないことが明らかになった。これらの知見については、一部を獣医学会の年次大会で公表する

予定である。



(IBD、小細胞性 T 細胞性リンパ腫、大細胞性 T 細胞性リンパ腫の組織像と CD3 免疫染色像)

研究期間全体を通じての最も大きな成果としては、イヌの IBD および T 細胞性リンパ腫の一部でヒトのセリアック病同様、抗グリアジン抗体、あるいは抗組織トランスグルタミナーゼ抗体が存在することが明らかになった点であり、今後本知見をもとに非侵襲的な診断方法の開発や病態予測が可能になると期待される。

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 4 件)

1. Maeda S, Ohno K, Fujiwara-Igarashi A, Uchida K, Tsujimoto H. 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
2. Nakashima K, Hiyoshi S, Ohno K, Uchida K, Goto-Koshino Y, Maeda S, Mizutani N, Takeuchi A, Tsujimoto H.. Prognostic factors in dogs with protein-losing enteropathy. Vet J. 2015, 205(1):28-32.
3. Hiyoshi S, Ohno K, Uchida K, Goto-Koshino Y, Nakashima K, Fukushima K, Kanemoto H, Maeda S, Tsujimoto H. Association between lymphocyte antigen receptor gene rearrangements and histopathological evaluation in canine chronic enteropathy. Vet Immunol Immunopathol. 2015, 15;165(3-4):138-44.
4. Goto-Koshino Y, Mochizuki H, Sato M, Nakashima K, Hiyoshi S, Fujiwara-Igarashi A, Maeda S, Nakamura K, Uchida K, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Construction of a multicolor GeneScan analytical system to detect clonal rearrangements of immunoglobulin and T cell receptor genes in canine lymphoid

tumors. Vet Immunol Immunopathol.
165(1-2): 81-87, 2015

〔学会発表〕(計2件)

1. 内田和幸、松本 功、中島 亘. 犬の慢性腸症「病理組織所見と血清学的検査」. 2016年日本獣医内科学アカデミー. 横浜. 2016. 2月19日-21日
2. 松本 功、内田和幸、中島 亘、チェンバース ジェームズ、中山裕之. 犬の慢性腸炎および腸管リンパ腫の病理発生に関する検討. 第4回日本獣医病理学専門家協会(JCVP)学術集会. 三鷹市、2016, 3月29日-30日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田和幸 (UCHIDA, Kazuyuki)
東京大学大学院・農学生命科学研究科・
准教授
研究者番号：10223554

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：