

令和元年6月17日現在

機関番号：32701  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2016～2018  
課題番号：16K18801  
研究課題名(和文) 犬種特異的な炎症性腸疾患の病態における腸内細菌叢および制御性T細胞の関連性の解明  
研究課題名(英文) Association between gut microbiota and mucosal regulatory T cells in dogs with breed-specific inflammatory bowel disease  
研究代表者  
五十嵐 寛高 (Igarashi, Hirotaka)  
麻布大学・獣医学部・講師  
研究者番号：20758172  
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)：ミニチュア・ダックスフンドにおける炎症性結直腸ポリープ(ICRP)では、糞便中のBifidobacteriumおよび短鎖脂肪酸、特にプロピオン酸濃度が有意に減少し、また糞便中のBifidobacterium、Firmicutes、Lactobacillus濃度が短鎖脂肪酸濃度と正に相関することを明らかにした。さらに、ICRP病変部では制御性T細胞数が増加し、IL-10やTGF- $\beta$ 、Foxp3遺伝子の発現量が増加することを明らかにした。しかし、抗炎症性サイトカインであるIL-10の発現上昇率は炎症性サイトカインであるIL-1やIL-6、IL-8よりも有意に少ないものであった。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、犬種特異的な炎症性結直腸ポリープにおける腸内細菌叢と短鎖脂肪酸の変動およびその関連性が明らかとなり、さらにポリープ病変部における制御性T細胞をはじめとした粘膜免疫の動態について基礎的な知見を得ることができた。この内容は、今後の炎症性ポリープに対する現状の治療法である免疫抑制療法に加えて、腸内細菌叢や短鎖脂肪酸が新規治療ターゲットとなりうる可能性を示唆している。また今回得られた知見は、NOD2機能亢進症であるブラウ症候群や大腸の化膿性炎症性疾患である潰瘍性大腸炎などの病態解明の一助になることを期待している。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated the association between fecal dysbiosis and concentration of short chain fatty acids (SCFAs), and distribution of regulatory T cells (Tregs) in canine inflammatory colorectal polyp (ICRP). HPLC revealed a decreased fecal propionate concentration in ICRP-affected dogs. ICRP cases had fewer amount of fecal Bifidobacterium. Fecal composition of Bifidobacterium, Firmicutes, and Lactobacillus significantly correlated with the total SCFA concentrations. Immunohistochemistry and qPCR analysis on the mucosal tissues revealed an increased number of Tregs and upregulation of IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-22, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and TGF- $\beta$  genes in the polyp. However, the rate of increase in IL-10 gene expression was significantly lower than that of IL-1b, IL-6, and IL-8. These results suggest that the reduced SCFA-producing bacteria results in the decreased fecal SCFA concentration, which may lead to the weak recruitment of Tregs and anti-inflammatory cytokines in ICRP lesion.

研究分野：獣医内科学

キーワード：腸内細菌叢 短鎖脂肪酸 制御性T細胞 粘膜免疫 ミニチュア・ダックスフンド 炎症性ポリープ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性結直腸ポリープ (Inflammatory Colorectal Polyp ; ICRP) は、近年国内の MD に好発することが明らかになった疾患である。ICRP は一般的に中高齢 (中央値で約 9 歳) の雄に発生することが多く (雄がおよそ 70%)、慢性的な粘血便やしづりといった臨床症状を一般的に呈する。結直腸移行部を中心とした大腸炎に続発して多発性の小型ないしは大型のポリープ病変を形成し、病理組織学的には好中球やマクロファージを主体とした炎症浸潤を特徴とする。また、腹側面に好発するという特徴もある。ICRP は副腎皮質ステロイド薬やシクロスポリン、レフルノミドといった免疫抑制療法に比較的よく反応することから、新しい犬種特異的な炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease ; IBD) の一種と考えられている。

ICRP の病態については、先行研究でポリープ病変部における炎症性サイトカインや Th17 サイトカイン遺伝子の発現上昇、特に好中球の浸潤を誘導する IL-8/CXCL8 の発現がポリープ病変部内のマクロファージで亢進していることが報告されていた。これに加え、代表者らは自然免疫の起点となるパターン認識受容体の発現や機能の解析を行い、NOD2 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2) という受容体の機能亢進および一塩基多型が ICRP の発生と関連することを明らかにした。しかしながら、代表者らが同定した NOD2 遺伝子の一塩基多型は MD に特異的なものではなかったため、MD に特異的な遺伝子変異の探索が今後の課題となっている。

NOD2 は細菌のペプチドグリカン分解産物を認識し、サイトカイン産生を誘導するとともにその他の Toll 様受容体の反応性を制御する受容体である。そのため、この機能異常が ICRP の病態の起点となっていることが示唆された。腸内細菌叢は粘膜免疫と相互作用する関係にあるため、NOD2 の異常は腸内細菌叢へも影響を与えていることが考えられる。そこで、代表者らはさらに ICRP 症例犬の糞便中細菌叢について 16S 解析を実施した。すると、ICRP 症例犬における腸内細菌叢異常、特に Fusobacteria の増加と短鎖脂肪酸 (Short chain fatty acid ; SCFA) 産生菌 (主に Lachnospiraceae) の減少が明らかとなった。そこで、本研究課題では SCFA 産生菌の減少が ICRP の病態に関与するメカニズムを解明することを目的とした。

### 2. 研究の目的

- 1) ICRP 症例犬における腸内細菌叢および糞便中 SCFA 濃度とそれぞれの関連性について解析を行う
- 2) ICRP 病変部における制御性 T 細胞の分布およびサイトカイン発現パターンについて解析する

### 3. 研究の方法

- 1) ICRP 症例犬における腸内細菌叢および糞便中 SCFA 濃度の解析  
過去 2 週間で抗菌薬を投与されていない ICRP 症例 MD 11 頭および消化器疾患のない対照 MD 25 頭より糞便を採取した。適量の糞便を水に懸濁させ、その上清中の SCFA (酢酸、プロピオン酸、酪酸、乳酸、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸) 濃度を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。さらに各糞便より DNA を抽出し、リアルタイム PCR により SCFA 産生菌 (*Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Faecalibacterium*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Lactobacillus*, *Ruminococcaceae*, *Turicibacter*) を定量した。
- 2) ICRP 病変部における制御性 T 細胞の動態についての解析  
内視鏡下生検により採取された ICRP 症例犬 28 頭のポリープ病変部および肉眼的に正常な結腸粘膜、および健常ビーグル犬 21 頭の結腸粘膜を使用した。採取した組織より RNA を抽出し、リアルタイム PCR により各種サイトカイン (IL-1、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-17、IL-22、IFN-、TNF-、TGF-) および Foxp3 遺伝子の発現量を定量した。さらに、パラフィン包埋組織が保存されていた症例について連続切片を作成し、免疫組織化学にて Foxp3 および Iba-1 発現細胞数を計測した。

### 4. 研究成果

- 1) ICRP 症例犬における腸内細菌叢および糞便中 SCFA 濃度の解析  
抗菌薬を投与されていない ICRP 症例犬は対照犬に比べて糞便中の総 SCFA 濃度が減少する傾向にあり、特にプロピオン酸濃度の有意な減少が認められた (下表、雑誌論文より引用)。

**Table 2.** Summary statistics and evaluated markers for ICRP-affected and control dogs

	ICRP	Control	P-value <sup>a)</sup>
Sex			
Male (neutered)	5 (4)	17 (8)	0.274
Female (spayed)	6 (4)	8 (5)	
Age (months)	119 (48–159)	103 (24–197)	0.786
Body weight (kg)	5.15 (3.85–7.50)	6.10 (3.90–7.75)	0.392
Body condition score <sup>b)</sup>	5 (5–7)	5 (3–7)	0.237
Fecal parameters			
Dry matter (%)	20.32 (9.24–38.37)	33.22 (15.84–46.18)	<0.001
pH	6.80 (5.90–8.65)	6.40 (5.50–7.40)	0.051
Total SCFA <sup>c)</sup>	181.73 (0.00–535.75)	249.91 (122.89–501.59)	0.070
Acetic acid <sup>c)</sup>	134.09 (0.00–316.16)	136.65 (43.69–334.17)	0.241
Propionic acid <sup>c)</sup>	0.00 (0.00–125.54)	50.04 (0.00–137.44)	0.030
Butyric acid <sup>c)</sup>	5.88 (0.00–57.30)	9.62 (0.00–39.32)	0.163
Isobutyric acid <sup>c)</sup>	0.00 (0.00–0.00)	0.00 (0.00–1.20)	0.254
Lactic acid <sup>c)</sup>	0.00 (0.00–109.97)	33.21 (0.00–170.12)	0.079
Valeric acid <sup>c)</sup>	0.00 (0.00–0.00)	0.00 (0.00–0.07)	0.254
Isovaleric acid <sup>c)</sup>	0.00 (0.00–0.00)	0.00 (0.00–0.67)	0.171
Acetic acid (%)	69.41 (57.94–100.00)	59.15 (32.47–87.47)	0.004
Propionic acid (%)	4.88 (0.00–34.53)	23.98 (0.00–34.88)	0.049
Butyric acid (%)	3.45 (0.00–11.14)	4.02 (0.00–15.12)	0.661
Isobutyric acid (%)	0.00 (0.00–0.00)	0.00 (0.00–0.21)	0.527
Lactic acid (%)	3.96 (0.00–31.05)	16.85 (0.00–67.53)	0.304
Valeric acid (%)	0.00 (0.00–0.00)	0.00 (0.00–0.03)	0.527
Isovaleric acid (%)	0.00 (0.00–0.00)	0.00 (0.00–0.12)	0.364

a) Welch's *t*, Mann-Whitney *U*, or Fisher's exact test between ICRP-affected MDs and control MDs. b) Represented using a 9-point scale. c) Data are shown in  $\mu\text{mol/g}$  fecal dry matter. Measurements, other than sex, are reported as medians (ranges). ICRP, inflammatory colorectal polyp; MD; miniature dachshund; SCFA, short chain fatty acid.

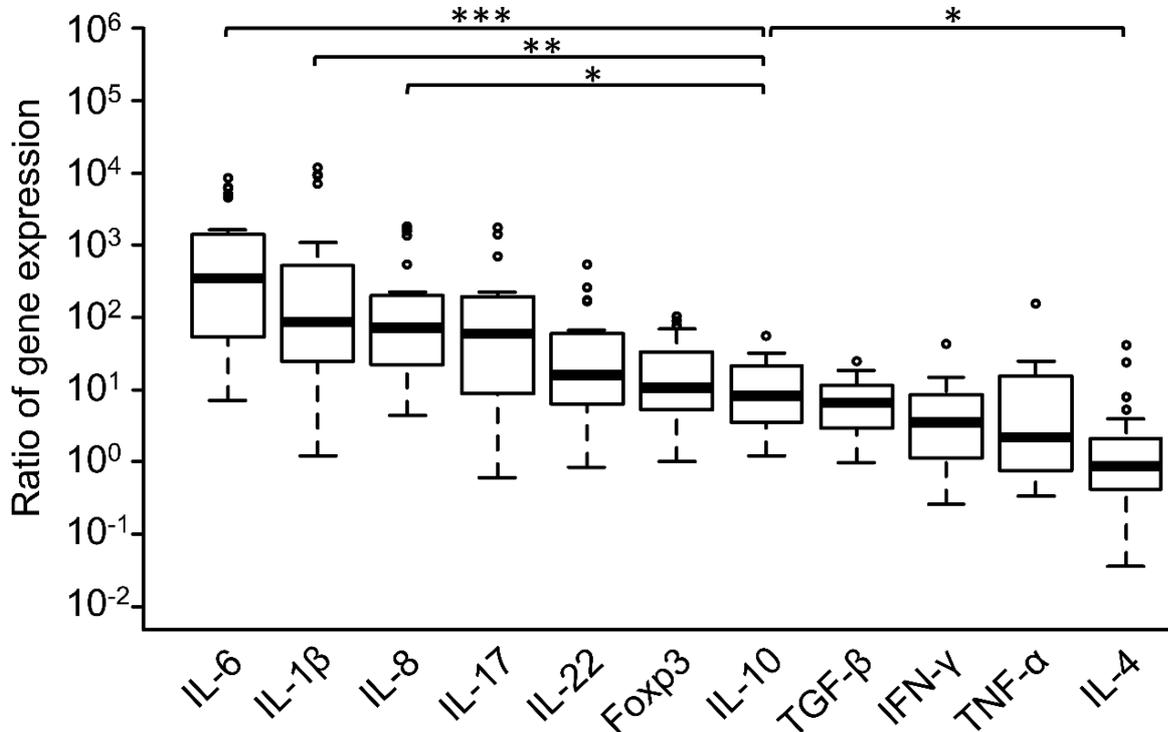
また、ICRP 症例犬では対照犬に比べて *Bifidobacterium* の有意な減少が認められたが、他の菌種については有意差が認められなかった。また、糞便中の総 SCFA 濃度と Firmicutes、*Bifidobacterium* および *Lactobacillus* 量との間に有意な正の相関が認められた（下表、雑誌論文より引用）。また、糞便中の酢酸・プロピオン酸・酪酸濃度と *E. coli* 量との間には有意な負の相関が認められた。

**Table 3.** Correlations between fecal SCFA concentrations and abundance of bacterial DNA

	Total SCFAs		Acetic acid		Propionic acid		Butyric acid		Lactic acid	
	$\rho$	P-value	$\rho$	P-value	$\rho$	P-value	$\rho$	P-value	$\rho$	P-value
Bacteroidetes	0.0183	0.916	0.0713	0.679	0.1012	0.557	0.0080	0.963	-0.2891	0.087
<i>Bifidobacterium</i>	0.3279	0.049	0.2867	0.090	0.1045	0.544	0.2607	0.125	0.1962	0.252
<i>Blautia</i>	0.0716	0.678	0.2378	0.163	-0.0106	0.951	0.0545	0.752	-0.1967	0.250
<i>C. perfringens</i>	0.1356	0.431	-0.0925	0.592	-0.0001	0.999	-0.0843	0.625	0.2007	0.240
<i>Enterococcus</i>	-0.0682	0.693	0.0342	0.843	-0.1230	0.475	-0.0925	0.592	-0.0649	0.707
<i>E. coli</i>	-0.3022	0.073	-0.4263	0.010	-0.3559	0.033	-0.3451	0.039	0.338	0.044
<i>Faecalibacterium</i>	-0.0023	0.989	0.0510	0.768	-0.0016	0.993	0.1741	0.310	-0.0682	0.693
Firmicutes	0.3761	0.026	0.1792	0.289	0.4828	0.004	0.0021	0.993	0.0219	0.892
Fusobacteria	-0.1145	0.506	-0.0435	0.801	-0.0584	0.735	0.2154	0.207	-0.1735	0.312
<i>Lactobacillus</i>	0.3897	0.019	0.2465	0.147	0.2186	0.200	0.2190	0.200	0.1058	0.539
Ruminococcaceae	-0.0695	0.687	0.1619	0.346	-0.1946	0.256	0.1297	0.451	-0.2169	0.204
<i>Turicibacter</i>	0.1475	0.391	0.1925	0.261	0.0866	0.615	0.2018	0.238	0.2079	0.224

## 2) ICRP 病変部における制御性 T 細胞の動態についての解析

ポリ-IP 病変部では、非病変部の結腸粘膜に比較して IL-4 以外のすべてのサイトカインおよび Foxp3 遺伝子発現が有意に上昇していた。さらに、非病変部結腸粘膜に対するポリ-IP 病変部での発現上昇率を IL-10 と比較したところ、IL-1、IL-6、IL-8 の上昇率は IL-10 よりも有意に高く、IL-4 は IL-10 よりも有意に低い上昇率であった（下図）。



図：ポリープ病変部における遺伝子発現の上昇率の比較（学会発表 より引用）

また、ポリープ病変部における Foxp3 陽性細胞数および Iba-1 陽性細胞数はいずれも非病変部の結腸粘膜と比較して有意に増加していた。また、正の相関が IL-10 遺伝子発現量と Foxp3 陽性細胞数 ( $r=0.549$ ,  $P<0.01$ ) および Foxp3 遺伝子発現量 ( $r=0.749$ ,  $P<0.001$ ) との間に認められた。この成果は 2019 年に *Veterinary Immunology and Immunopathology* 誌に投稿した。現在審査中であり、リバイスを実施している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Mizukami K, Uchiyama J, Igarashi H, Murakami H, Osumi T, Shima A, Ishihara G, Nasukawa T, Une Y, Sakaguchi M. Age-related analysis of the gut microbiome in a purebred dog colony. *FEMS Microbiology Letters*, 366(8) pii: fnz095, 2019.

五十嵐寛高. 犬や猫における腸内細菌叢と消化器疾患. *日本ペット栄養学会誌*, 21(3), 145 - 151, 2018.

Igarashi H, Ohno K, Matsuki N, Fujiwara-Igarashi A, Kanemoto H, Fukushima K, Uchida K, Tsujimoto H. Analysis of fecal short chain fatty acid concentration in miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 79(10), 1727 - 1734, 2017.

Omori M, Maeda S, Igarashi H, Ohno K, Sakai K, Yonezawa T, Horigome A, Odamaki T, Matsuki N. Fecal microbiome in dogs with inflammatory bowel disease and intestinal lymphoma. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 79(11), 1840 - 1847, 2017.

〔学会発表〕(計 11 件)

五十嵐寛高. 犬と猫における腸内細菌叢と消化器疾患. 第 15 回日本獣医内科学アカデミー学術大会(招待講演), 2019 年 2 月 16 日, 神奈川.

五十嵐寛高, 大野耕一, 横山望, 玉本隆司, 藤原亜紀, 辻本元. 国内の人気犬種における好発疾患についての疫学的調査. 平成 30 年度 日本小動物獣医学会(関東・東京), 2018 年 9 月 9 日, 茨城.

五十嵐寛高. シンポジウム 動物における「マイクロバイオーム」研究の現状と応用 犬や猫における腸内細菌叢と消化器疾患. 日本ペット栄養学会第 20 回大会(招待講演), 2018 年 7 月 22 日, 東京.

Igarashi H, Konishi K, Uchida E, Tamamoto T, Ohno K, Uchida K, Endoh D. Distribution of regulatory T cells in inflammatory colorectal polyps in Miniature Dachshunds. *American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM Forum 2018)*, June 14, 2018, Seattle.

Igarashi H, Ohno K, Tsuboi M, Fukushima K, Yokoyama N, Nishimura R, Uchida K, Tsujimoto H. A retrospective study of granulomatous gastritis in Miniature Dachshunds: 11 cases. American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM Forum 2018), June 14, 2018, Seattle.

五十嵐寛高. 難治性の腸疾患に挑む 慢性消化器疾患に対するステロイドの始め方切り方. 第 14 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (招待講演), 2018 年 2 月 18 日, 神奈川.

Igarashi H, Yamada K, Kamida A, Kakimoto T, Ohno K, Endoh D. Altered composition of fecal microbiota and their functional genes in geriatric dogs: a pilot study. Asian Meeting of Animal Medicine Specialties 2017 (AMAMS 2017), Nov 11, 2017, 大邱.

五十嵐寛高. プレドニゾロン抵抗性の消化器疾患に対するアプローチ シクロスポリンの有効性を見直そう. 第 19 回日本臨床獣医学フォーラム年次大会 2017(招待講演), 2017 年 9 月 17 日.

五十嵐寛高. 腸内細菌叢と食事療法. 第 19 回日本臨床獣医学フォーラム年次大会 (招待講演) 2017 2017 年 9 月 16 日, 東京.

五十嵐寛高. なぜそのフード 消化器疾患の食事. 第 13 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (招待講演), 2017 年 2 月 19 日, 神奈川.

五十嵐寛高. ミニチュア・ダックスフントの消化器疾患. 第 13 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (招待講演), 2017 年 2 月 18 日, 神奈川.

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。