

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06428

研究課題名(和文) 犬の炎症性および腫瘍性疾患における免疫寛容機構IDO1の発現機能解析

研究課題名(英文) Expression and functional analysis of IDO1, an immunological tolerance system, in canine inflammatory and neoplastic disease.

研究代表者

井手 香織 (Ide, Kaori)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40550281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：免疫寛容機構は動物にとって、炎症の沈静化というメリットと、腫瘍が宿主の免疫から逃れるというデメリットを併せ持つ。本研究では犬の腸炎および腫瘍性疾患で、免疫寛容のスイッチであるIDO1の挙動を調べた。健康群、腸炎群、腸炎と臨床的類似性の高い消化管型リンパ腫(LM)群の犬の十二指腸組織を用いて、IDO1とその働きによって誘導されると言われるTreg細胞について解析し、比較検討した。犬に自然発生した25種類の腫瘍について、腫瘍そのものおよびマージン組織中IDO1遺伝子転写量を解析し、腫瘍の種類による違いを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年症例数の多い犬の腸炎および消化管型リンパ腫について免疫寛容機構のIDO1に着目した病態解析は新しく、特に腸炎との鑑別が難しい一方で予後の悪い消化管型リンパ腫において特徴的な結果が得られたことは、今後、新規の診断補助ツールや治療への応用が期待できる成果である。つまり、消化管粘膜生検で得られた組織を用いて、既存の病理組織学検査やリンパ球クローン性解析に加えてIDO1の発現レベルも評価することが、腸炎と消化管型リンパ腫の鑑別の一助となる可能性に期待している。また、消化管型リンパ腫を含むリンパ腫などIDO1を多く発現する腫瘍に対しては新しい治療戦略の糸口となる可能性も期待される。

研究成果の概要(英文)：Immunological tolerance system suppresses inflammation, which is a good aspect, while giving a chance for tumor cells to escape from immunological attack, which is a bad aspect. In this study, expression and function of IDO1, a key factor for immunological tolerance system, was investigated in canine enteritis and neoplastic diseases.

Using biopsy samples of duodenum, expressions of IDO1 and Treg (regulatory T cells which are known to be induced by IDO1) was analyzed and comparatively investigated between healthy controls, enteritis cases and intestinal lymphoma cases.

In 25 tumors from canine cases, IDO1 mRNA level was analyzed. The results were compared between different types of tumors, and between tissues of tumor itself and its margin.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：IDO1 犬 腸炎 腫瘍 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

ノーベル生理学医学賞に選ばれた腫瘍の免疫チェックポイント機構に関する発見に象徴されるように、免疫反応のブレーキである免疫寛容に関して近年様々な因子や機構が明らかにされてきている。免疫寛容機構は動物にとって、炎症が沈静化されるというメリットと、腫瘍が宿主の免疫から逃れるというデメリットの両側面を併せ持つ。免疫寛容をもたらす重要なスイッチの一つに Indoleamine 2,3 dioxygenase-1 (IDO1) が知られており、これはアミノ酸であるトリプトファンをキヌレニンに代謝する酵素で、炎症組織および腫瘍組織の両者において発現が増加することがヒトや齧歯類で知られており、それぞれ炎症の鎮静化と腫瘍の免疫逃避機構に関わっている証拠が次々と報告されている (Ciorba *et al.*, 2010, *Jour Immunol*; Sharma *et al.*, 2009, *Blood*)。すなわち、IDO1 が高発現すると局所のトリプトファンが代謝されて枯渇することとその代謝産物の作用によって周囲の T 細胞がアポトーシスを起こし沈静化される (Munn *et al.*, 2007, *Jour Clin Invest*; Nowak *et al.*, 2012, *J Exp Med*) とともに制御性 T 細胞 (Treg) の活性が刺激されること、IDO1 を発現する樹状細胞が Treg の分化を促進する正のフィードバック効果をもたらすと同時に抑制性サイトカイン IL-27 を産生することで Th17 が抑制されること (Ciorba *et al.*, 2013, *Curr Opin Gastroenterol*) などである。このように、IDO1 は特に腸炎および腫瘍性疾患の病態や予後に関与しうることが齧歯類やヒトで近年報告されている。

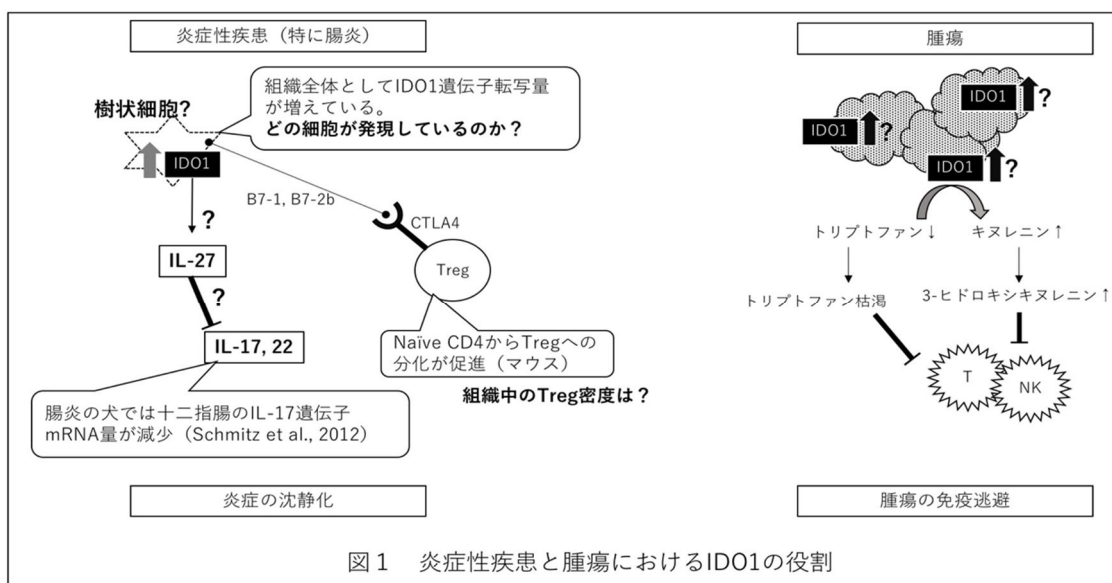


図1 炎症性疾患と腫瘍におけるIDO1の役割

伴侶動物の医療では腸炎や皮膚炎、腫瘍の症例数が非常に多く、疾患のコントロールが難しい症例では生活の質が著しく下がるほか、腫瘍は伴侶動物でも死因の第1位である。これまでとは異なる切り口からの病態解析が必要であり、申請者は犬ではまだ疾患における検討が報告されていないIDO1に着目した。犬の炎症性疾患および腫瘍性疾患を標的とした研究のうち免疫寛容ないし免疫逃避機構に関係するものとしては Treg の存在を検討した報告が得られつつあるが、現時点で IDO1 について解析した報告は無い。炎症ないし免疫反応のブレーキ機構の重要な鍵である IDO1 が、犬の炎症性疾患および腫瘍においてどのような挙動をとっているかを明らかにしたい。人工的な疾患モデル動物とは異なり疾患を自然発症した大型哺乳類である犬で得られた情報はトランスレーショナルリサーチとして医学領域への貢献も期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、炎症性疾患（特に腸炎）および腫瘍性疾患の自然発症症例犬の病変部における IDO1 の発現およびその作用を解析し、病態ごとの特徴を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

【研究1：犬の十二指腸粘膜組織における IDO1 発現解析】

(1) 動物と検体

本研究の動物実験は国立大学法人東京農工大学研究倫理委員会動物実験小委員会の承認を得

ている（承認番号：R03-139, R04-60）。本研究に用いた犬の十二指腸粘膜組織は、健常犬（ビーグル成犬 6 頭，未去勢雄 3 頭，去勢雄 1 頭，避妊雌 2 頭，年齢 6-12 歳）を用いて，すべて全身麻酔下の内視鏡下粘膜生検によって採材した。全身麻酔には，アトロピン（0.04 mg/kg）およびブトルファノール（0.2 mg/kg）を前投与薬，プロポフォール（6.0 mg/kg）を導入薬，イソフルランを維持に用いた。麻酔前から覚醒後にかけて静脈内点滴を行い，麻酔中のモニタリングは常法通り行った。採取した組織は後述する試験に用いるために，一部を RNAlater（Merck Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany）内に浸漬し，一部を 10%中性緩衝ホルマリン（KANTO CHEMICAL, Tokyo, Japan）内に保存した。

(2) 免疫組織化学染色

ID01 および制御性 T 細胞マーカーである FOXP3 に対する免疫組織化学染色を実施した。詳細な手技については，一定期間公表を差し控える。

(3) 十二指腸粘膜組織中の ID01 陽性細胞の分布の検討

ID01 に対する免疫組織化学染色を実施した切片を用いて，十二指腸組織中の ID01 陽性細胞の分布を検討した。顕微鏡用イメージングソフトウェア cellSens (Olympus) を使用して評価した。まず，20 倍の対物レンズを使用し，一次抗体反応切片とアイソタイプコントロール反応切片の画像を同一条件下で撮影した。続いて，アイソタイプコントロール反応切片の画像の平均輝度を，細胞質の染色が見えなくなるまで低下させた。この輝度まで，一次抗体反応切片の画像の輝度も低下させ，細胞質の染色が確認できる細胞を陽性細胞とした。80 μm \times 80 μm を単位エリアとして，十二指腸の絨毛部分の粘膜固有層から無作為に選んだ 4 エリア中の陽性細胞数の平均値を算出した。加えて，境界不明瞭に染色された領域の有無と絨毛上皮細胞における染色性の有無を評価した。

(4) 組織中 ID01 遺伝子および FoxP3 遺伝子 mRNA 量の定量

RNAlater 内に浸漬保存された十二指腸粘膜組織から，total RNA を抽出した。まず，ビーズクラッシャー（Beads Crusher μT -12, TAITEC, Saitama, Japan）を用いて組織を粉砕し，次に NucleoSpin RNA（MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany）を用いて製品プロトコルに従い total RNA を抽出した。逆転写反応は Prime Script RT Master Mix (Perfect Real Time)（Takara Bio, Shiga, Japan）を用いて製品プロトコルに従い行った。リアルタイム PCR は，酵素試薬として TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)（Takara Bio）を使用し，機器は Thermal Cycler Dice TM Real Time System（Takara Bio）を用いた。ID01 遺伝子および FoxP3 遺伝子の mRNA 量を，内因性コントロールである GAPDH 遺伝子の mRNA 量に対する相対量として求めた。ID01 遺伝子の mRNA の検出用プライマーは，ソフトウェア Primer3Plus (<https://primer3plus.com>) を用いて，独自に設計した（表 1 一定期間非公表）。FoxP3 遺伝子および GAPDH 遺伝子 mRNA 量の検出用プライマーは，それぞれ既報(Konishi et al., 2019, Vet Immunol Immunopathol)のものを用いた。GAPDH 遺伝子の mRNA の検出用プライマーは，既報(Peters et al, 2005, Vet Immunol Immunopathol)のものを用いた。リアルタイム PCR の反応条件は 95 で 30 秒間変性反応した後，95 で 5 秒間，60 で 30 秒間の伸長反応を 40 サイクル行った。各遺伝子の mRNA 量は，検量線法を用いて算出した。すべての検体を二重試験で測定し，平均値を算出した。

【研究 2: 腸炎および消化管型リンパ腫の犬の十二指腸における ID01 および FOXP3 の発現解析】

(1) 動物と検体

本研究に組み入れた症例犬群は，2015 年 1 月から 2023 年 7 月までに東京農工大学農学部付属動物医療センター内科を受診し，慢性腸症（腸炎）または消化管型リンパ腫と診断された犬 38 頭であった。性別は雄 3 頭，雌 4 頭，去勢雄 17 頭，避妊雌 14 頭，年齢中央値は 9 歳（範囲：3-15 歳）であった。犬種は柴（n=6），トイ・プードル（n=6），雑種（n=5），ミニチュア・ダックスフンド（n=3），ジャック・ラッセル・テリア（n=2），パグ（n=2），フレンチ・ブルドッグ（n=2），ヨークシャー・テリア（n=2），イタリアン・グレーハウンド（n=1），ウエスト・ハイランド・ホワイト・テリア（n=1），エアデール・テリア（n=1），ジャーマン・シェパード・ドッグ（n=1），パピヨン（n=1），ビーグル（n=1），ピション・フリーゼ（n=1），ペキニーズ（n=1），ボーダー・コリー（n=1），ボストン・テリア（n=1）であった。症例犬群については，診断した時点の臨床スコアである Canine Chronic Enteropathy Clinical Activity Index (CCECAI) スコア (Allenspach et al., 2007, J Vet Intern Med), Canine Inflammatory Bowel Disease Activity Index (CIBDAI) スコア (Jergens et al., 2003, J Vet Intern Med), 血中アルブミン (ALB) 値，総蛋白 (TP) 値，C 反応性蛋白 (CRP) 値，葉酸値，コバラミン値を記録した。また，病理組織学的にリンパ形質細胞性腸炎と診断された犬については，病理組織学的重症度スコアである World Small Animal Veterinary Association (WASAVA) スコアの総スコア，部分スコアである上皮内リンパ球スコアおよび粘膜固有層リンパ球スコア (Washabau et al., 2010, J Vet Intern Med) を記録した。

全身麻酔下の内視鏡下粘膜生検の実施方法は前述と同じであり，症例の場合は診断のために必要な検査として消化管粘膜生検を実施しており，その過程で生じた余剰検体を研究に用いた。

(2) 免疫組織化学染色

研究 1 に同じ。

- (3) 十二指腸粘膜組織中の ID01 陽性細胞および FOXP3 陽性細胞の分布の検討
研究 1 に同じ。
- (5) 組織中 ID01 遺伝子および FoxP3 遺伝子 mRNA 量の定量
研究 1 に同じ。
- (4) 統計解析

統計解析ソフト Graph Pad Prism 9J (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) を使用した。血液検査の結果について、測定上限値以上または下限値以下の値となった場合には、それぞれ測定上限値または下限値を用いて統計解析を行った。各データの正規性の判定には Shapiro-Wilks 検定を用いた。病理組織学検査の結果で分類した症例犬群と健常犬群の年齢の比較には Welch's t test を、性別分布の比較には Fisher's exact test を用いた。症例犬群と健常犬群の組織中 ID01 遺伝子 mRNA 量、FoxP3 遺伝子 mRNA 量、ID01 陽性細胞数、FOXP3 陽性細胞数の多群間比較は Kruskal-Wallis 検定の後に Dunn's multiple comparison test を用いて統計解析した。症例犬における組織中 ID01 遺伝子 mRNA 量と ID01 陽性細胞数の相関関係、組織中 FoxP3 遺伝子 mRNA 量と FOXP3 陽性細胞数の相関関係、組織中の ID01 遺伝子 mRNA 量と FoxP3 遺伝子 mRNA 量の相関関係、ID01 陽性細胞数と FOXP3 陽性細胞数の相関関係、症例犬全体および群別の組織中 ID01 遺伝子および FoxP3 遺伝子の mRNA 量と各臨床項目の相関関係、症例犬全体および群別の ID01 および FOXP3 の陽性細胞数と各臨床項目の相関関係を Spearman's rank correction coefficient を用いて解析した。症例犬全体と健常犬群の組織中 ID01 遺伝子および FoxP3 遺伝子 mRNA 量、ID01 および FOXP3 陽性細胞数の比較には Mann-Whitney U 検定を用いて解析した。すべての解析で $P < 0.05$ を有意差ありとした。

【研究 3：様々な腫瘍組織における ID01 発現解析】

(1) 動物と検体

2021 年 4 月から 2022 年 9 月までに東京農工大学農学部付属動物医療センターに来院し、腫瘍性疾患が診断された犬 41 頭であり、性別は未去勢雄 8 頭、未避妊雌 5 頭、去勢雄 12 頭、避妊雌 16 頭、診断時の年齢中央値は 12 歳齢 (範囲：5-18 歳齢) であった。犬種は、雑種 ($n = 9$)、チワワ ($n = 6$)、トイ・プードル ($n = 5$)、ミニチュア・ダックスフンド ($n = 5$)、ウェルシュ・コーギー・ペンブローク ($n = 2$)、フレンチ・ブルドッグ ($n = 2$)、アイリッシュ・セッター ($n = 1$)、キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル ($n = 1$)、ゴールデン・レトリバー ($n = 1$)、サモエド ($n = 1$)、ジャック・ラッセル・テリア ($n = 1$)、ドーベルマン ($n = 1$)、バーニーズ・マウンテン・ドッグ ($n = 1$)、パグ ($n = 1$)、バセット・ハウンド ($n = 1$)、パピヨン ($n = 1$)、ボーダー・コリー ($n = 1$)、マルチーズ ($n = 1$) であった。

本研究で使用した腫瘍組織はすべて、対象となった症例犬から外科手術や切除生検によって摘出された腫瘍組織の一部を用いた。摘出された組織に、マージン組織が含まれていた場合は、そのマージン組織の一部も本研究に用いた。採取した組織は後述する試験に用いるために、一部を RNAlater (Merck Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) 内に浸漬し、一部を 10% 中性緩衝ホルマリン (KANTO CHEMICAL, Tokyo, Japan) 内に保存した。

腫瘍組織の病理組織学検査は日本獣医生命科学大学獣医病理学教室または合同会社ノーバウングラズ動物病理 (今治市 愛媛県において行われた。臨床データが得られた症例については、TNM 分類に基づいた臨床ステージ分類 (Lee B et al., 2020, Vet Comp Oncol; Bergman PJ et al., 2007, Clinical Techniques in Small Animal Practice) および腫瘍摘出時から死亡までの生存期間を記録した。

(2) 組織中 ID01 遺伝子 mRNA 量の定量

原則として研究 1 に同じだが、この方法で RNA の抽出が困難だった組織は、ビーズクラッシャーで組織を粉碎した後に、ISOGEN-LS (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) とクロロホルム (Merck Sigma-Aldrich) を添加し、4 12000g 15 分の遠心分離を行った。そして、遠心分離後の上清に対して、NucleoSpin RNA (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) を用いて total RNA を抽出した。リアルタイム PCR の手法は研究 1 と同じである。

(3) 免疫組織化学染色

ID01 に対する免疫組織化学染色を実施した。詳細な手技については、一定期間公表を差し控える。

(4) 統計解析

統計解析ソフトは、Graph Pad Prism9J software (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) を用いた。肺腺癌マージン組織とその他のマージン組織の ID01 遺伝子 mRNA 量の比較、また、肺腺癌、悪性黒色腫、リンパ腫症例における、それぞれの腫瘍組織とマージン組織の ID01 遺伝子 mRNA 量の比較には、Mann-Whitney の U 検定を用いた。 $P < 0.05$ を有意差ありと判断した。

4. 研究成果

【研究1：犬の十二指腸粘膜組織における ID01 発現解析】

(1) 十二指腸粘膜組織中の ID01 陽性細胞の分布の検討

健常犬6頭のうち1頭ホルマリン組織の保存状態が悪く、免疫組織化学染色を用いた ID01 陽性細胞の分布は合計5頭で評価した。単位エリアあたりの陽性細胞数の平均値を算出し、絨毛の上皮細胞における染色性の有無と固有層で境界不明瞭に染色された領域の有無を評価した。十二指腸粘膜組織中の ID01 陽性細胞は、粘膜固有層に散在していたほか、絨毛の上皮細胞、特に基底膜側と上皮細胞に隣接する領域で認められた。詳細な図は一定期間公表を差し控える。

(2) 組織中 ID01 遺伝子および FoxP3 遺伝子 mRNA 量の定量

具体的な数値は一定期間公表を差し控える。

【研究2：腸炎および消化管型リンパ腫の犬の十二指腸における ID01 発現解析】

(1) 十二指腸粘膜組織中の ID01 陽性細胞および FOXP3 陽性細胞の分布について健常群との比較 一定期間公表を差し控える。

(2) 組織中 ID01 遺伝子および FoxP3 遺伝子 mRNA 量について健常群との比較

一定期間公表を差し控える。

(3) 組織中 ID01 および FoxP3 の発現レベルと様々な臨床スコア等との相関解析

一定期間公表を差し控える。

【研究3：様々な腫瘍組織における ID01 発現解析】

(1) 腫瘍の種類

症例犬41頭における腫瘍性疾患は、肺腺癌 (n = 5), 悪性黒色腫 (n = 5), 肝細胞癌 (n = 4), リンパ腫 (n = 3), 形質細胞腫 (n = 2), 肛門周囲腺腫 (n = 2), 肥満細胞腫 (n = 2), 乳腺良性混合腫瘍 (n = 2), 肝細胞腺腫 (n = 1), 胆管細胞癌 (n = 1), 平滑筋肉腫 (n = 1), 平滑筋腫 (n = 1), 骨髄脂肪腫 (n = 1), ライディツヒ細胞腫 (n = 1), 精上皮腫 (n = 1), セルトリ細胞腫 (n = 1), 管状乳頭状乳腺癌 (n = 1), 乳管内乳頭状腺腫 (n = 1), 骨外性骨肉腫 (n = 1), 血管肉腫 (n = 1), 未分化肉腫 (n = 1), 毛包上皮腫 (n = 1), 皮脂腺上皮腫 (n = 1), 末梢神経腫 (n = 1), 線維付属器過誤腫 (n = 1) の25種であった(表1)。1症例において、肝細胞癌と形質細胞腫の2種の腫瘍を採材したため、本研究に組み入れた腫瘍検体総数は42検体となった。また、マージン組織は、全腫瘍42検体中、32検体で採材された。精巣腫瘍では、腫瘍化していない片側の精巣を比較対象として採材した。

(2) 腫瘍組織およびマージン組織中の ID01 遺伝子 mRNA 量の解析

一定期間公表を差し控える。

(3) 免疫組織化学染色を用いた腫瘍組織における ID01 発現パターン

一定期間公表を差し控える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 多田 勇太, 宇田 惇太郎, モタラ 俊ヤヒヤ, 石原 優太, 皆上 大吾, 井手 香織
2. 発表標題 犬の腫瘍組織におけるIndoleamine 2,3-dioxygenase 1 発現に関する検討
3. 学会等名 第19回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宇田 惇太郎, 多田 勇太, 井手 香織
2. 発表標題 慢性腸炎および消化管型リンパ腫の犬の十二指腸組織におけるIndoleamine - 2,3 dioxygenase 1発現に関する検討
3. 学会等名 第19回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2023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
研究分担者	皆上 大吾 (Azakami Daigo) (80453934)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授 (12605)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------