

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 7 日現在

機関番号：12965

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年～2011 年

課題番号：22780279

研究課題名（和文） 腸管粘膜防御機構の検出による犬の炎症性腸疾患の新規検査法の開発

研究課題名（英文） Detection of a defense system of intestinal mucosa as a novel examination tool for canine inflammatory bowel disease.

研究代表者

井手 香織（IDE KAORI）

東京農工大学大学院農学研究院・助教

研究者番号：40550281

研究成果の概要（和文）：犬において腸管型アルカリフォスファターゼ（iALP）は、結腸よりも十二指腸の粘膜上皮細胞で多く存在し、かつ活性を有していることが明らかとなった。さらに、細菌由来内毒素であるリポ多糖類（LPS）を脱リン酸化するという腸粘膜防御機構として重要な作用も有していることが証明された。便中 iALP 濃度は犬の炎症性腸疾患症例のうち、臨床スコアの高い重度な症例において、健常犬よりも高い傾向が認められた。

研究成果の概要（英文）：Intestinal alkaline phosphatase (iALP) was found to be expressed with enzymatic activity, more intensively in mucosal epithelia of duodenum than of colon, in dogs. Dephosphorylation reaction of lipopolysaccharide (LPS), which is the core function of the defense mechanism by iALP against excessive intestinal microflora, was also proven to be active. Fecal iALP concentration was shown to be high in cases of severe inflammatory bowel disease with high clinical activity score.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：犬 炎症性腸疾患 腸管型アルカリフォスファターゼ 腸管粘膜上皮

1. 研究開始当初の背景

アルカリフォスファターゼは、アルカリ性条件下でリン酸エステル化合物を加水分解する酵素であり、様々な臓器にそれぞれ特徴的なアイソザイムやアイソフォームが分布している。

近年、ヒトの炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease; IBD) において、腸管型 ALP (intestinal ALP; iALP) が病態に深く関与していることが明らかとなった (Tuin et

al., Gut, 2009)。IBD では腸粘膜における免疫応答の異常が示唆されており、腸内細菌のリポ多糖類 (LPS) による刺激が疾患の増悪因子と言われている (Inohara et al., J Biol Chem, 2003)。一方 LPS は、ALP によって脱リン酸化されて無毒化することが知られている (Poelstra et al., Lab Invest, 1997; Goldberg et al., PNAS, 2008)。iALP は小腸の粘膜上皮細胞の細胞膜に存在し、消化管内にも一部分泌されることがヒトやマウスで

知られており、LPS に対してバリア的な機能を持つと考えられる。

犬でも IBD は多く見られる疾患でありながら原因や病態に不明な点が多く、診断・治療に苦慮する症候群である。近年、IBD 症例犬における腸内細菌叢の変化や宿主による腸内細菌に対する異常な免疫応答を示唆する研究結果が報告されている。したがって犬の IBD においても腸内細菌と宿主との関係に着目した病態解析が重要であると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 健常犬の腸管粘膜における iALP の詳細な局在および活性・機能、便中濃度の検討

(2) 消化器疾患群の十二指腸粘膜における iALP 発現レベルおよび活性・機能、便中濃度の検討

(3) IBD 症例犬群における、上記 iALP 調査結果と重症度や予後との関係の調査

3. 研究の方法

(1) 消化管粘膜組織における iALP 分布および活性の把握：小腸（十二指腸）と大腸（結腸）の粘膜組織を健常犬または症例犬から採取した。採取方法は、消化管内視鏡下粘膜生検によって行った。組織の凍結切片を作成し、ALP の基質を用いた酵素組織化学染色を行った。なお、iALP に特異的に阻害する L-フェニルアラニンを用いた実験も行うことによって、組織非特異型 ALP の反応と区別し、得られたものが iALP による反応であることを確かめた。

(2) 消化管粘膜組織における iALP 遺伝子 mRNA 発現解析：(1)と同様に採取した組織中の iALP 遺伝子 mRNA 量を、リアルタイム PCR 法を用いて定量した。

(3) 消化管粘膜組織における iALP の LPS 分解機能の解析：(1)と同様に採取した組織の凍結切片を作成し、LPS を基質とした反応を切片上で起こさせ、LPS の分解反応の有無を解析した。なお、iALP に特異的に阻害する L-フェニルアラニンを用いた実験も行うことによって、組織非特異型 ALP の反応と区別し、得られたものが iALP による反応であることを確かめた。

(4) 糞便中 iALP 濃度の定量：健常犬または症例犬から採取した糞便中の iALP を、酵素基質反応を応用することによって測定した。なお、iALP に特異的に阻害する L-フェニルアラニンを用いた実験も行うことによって、組織非特異型 ALP の反応と区別し、得られたものが iALP による反応であることを確かめた。

(5) 十二指腸組織における iALP 遺伝子 mRNA 量および便中 iALP 濃度と、犬 IBD の病態との関連解析：結果について、犬 IBD 症例群と健常犬での比較、また犬 IBD 群の中でも臨床スコア(重症度)との関係、治療反応性との関係について統計解析を行った。

4. 研究成果

(1) 犬における iALP の局在および活性：健常犬において iALP は大腸(結腸)よりも小腸(十二指腸)の粘膜上皮細胞に多く存在しており、ALP 活性も有していることが明らかとなった。組織中 iALP 遺伝子 mRNA 量は十二指腸の方が結腸に比べて有意に多く(図 2)、また酵素組織化学においても明らかに十二指腸粘膜上皮細胞で強い反応が認められた。組織中に確認された iALP 活性の局在は、腸粘膜上皮細胞に最も強く認められたほか、粘膜固有層の腺細胞にも認められた(図 1)。犬では iALP の存在はすでに知られていたものの、組織における詳細な局在や活性はこれまで報告されておらず、本研究によって初めて明らかとなった。

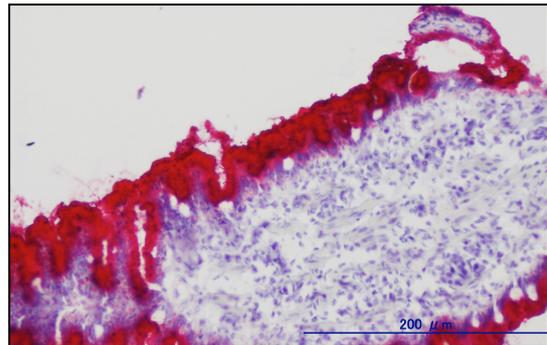


図 1：健常犬十二指腸の絨毛の拡大写真。赤い部分が iALP 酵素活性を示す部分である。

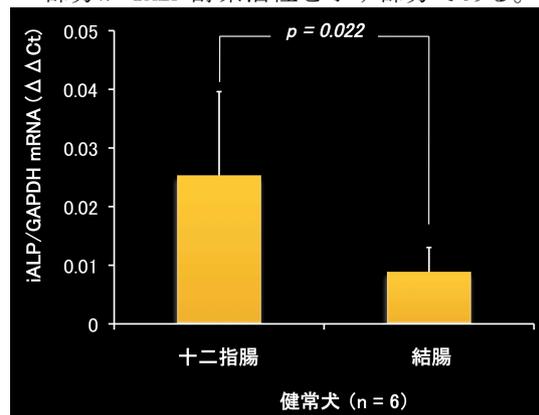


図 2：犬の腸管粘膜組織中 iALP 遺伝子 mRNA 量（小腸と大腸の比較）

(2) 犬の消化管粘膜組織における iALP の LPS 分解機能：LPS を基質とした酵素基質反応を組織上で確認したところ、先行する上記の実験結果で明らかとなった iALP 活性存在部位

と一致した部位にLPSが分解されたことを示す反応が認められた。犬の消化管においてiALPが実際にLPS分解機能を有することを証明した報告はこれまでになく、今回が初めてである。本結果より、犬の消化管粘膜上皮に存在するiALPが、腸内細菌が産生する内毒素LPSを分解することによって、腸粘膜防御機構として働いている可能性が示唆された。

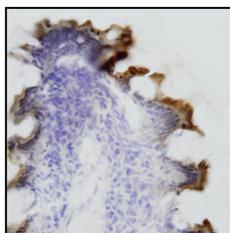


図3：LPSの分解が起こった部位に黒い沈着が生じている。図1でALP活性が認められたものと同様に粘膜上皮細胞において強い反応が確認された。

(3)犬IBD症例群の消化管粘膜組織中iALP遺伝子mRNA量の検討と臨床スコアとの関係：消化管粘膜組織中iALP遺伝子mRNA量は、健常群の平均と症例群全体の平均との間に違いは認められなかった。しかし、初診時の犬IBD臨床スコア(CCECAI)が高かった(つまりより重度であった)症例ほど、iALP遺伝子mRNA量が少ない傾向が認められた。さらに、CCECAIスコアを軽度(5以下)と中等度から重度(6以上)の2群に分けて平均値を比較したところ、前者よりも後者におけるiALP遺伝子mRNA量が少なかった(図4)。この結果から考察されることとして、犬IBD群全体には軽度なものから重度なものまでであるために全体の平均としては健常群と差が認められなかったものと考えられた。一方、臨床的に重度な症例の消化管粘膜組織中iALP遺伝子mRNA量が少ない傾向であったことは、iALP発現量が少ないことが疾患発症の一要因である可能性と、疾患(炎症)によって消化管粘膜上皮が剥離などの障害を受けた結果として発現量が低くなった可能性の2つが考えられた。犬で消化器疾患とiALPについて検討した報告はこれまでになく、本結果は、iALPが犬IBDの未知の病態の一つである可能性を示唆するものである。また、消化管粘膜組織中iALP遺伝子mRNA量の定量が、重症度の指標を示す検査の一つとして応用を前向きに検討できると考えられた。

(4)便中iALP濃度の測定：犬ではこれまでにiALPが便中に存在することを証明した報告はない。本研究の結果、犬の便中にiALPが存在していることが明らかとなり、健常犬群の平均値が求められた。したがって、ヒトや齧歯類で知られているものと同様に、腸管粘膜上皮細胞で産生されたiALPが腸管内へ分泌されているのか、あるいはiALPを発現した粘膜上皮細胞がターンオーバーで脱落したものが便中に存在しているかのいずれか

である可能性が考えられた。症例群においては、今回の結果では臨床スコア(CCECAI)との関連は乏しかったものの、治療反応性が良好であった症例の濃度は正常群と同等で、難治性であった症例の濃度は低い傾向が認められた。本試験に組み入れることが出来た症例の数が限られていたことから、今後も引き続きデータの集積を行い、予後因子としての有用性を検討する価値があると思われる。

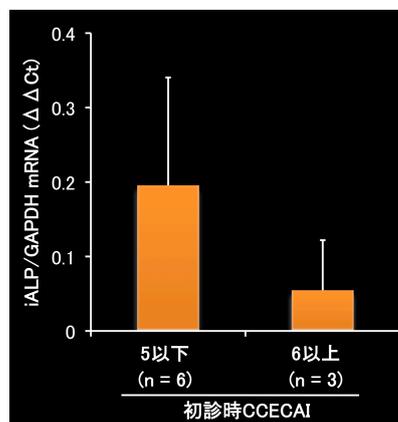


図4：犬IBDの臨床スコアにより軽度の群と中等度以上の群に分けた際のiALP遺伝子mRNA量

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

① 井手香織、岩崎望、松本英、平塚彰悟、石下進平、西藤公司、岩崎利郎、犬の腸管型アルカリフォスファターゼに関する検討、日本獣医内科学アカデミー学術大会、2012年2月18日、横浜

〔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◇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
<http://www.tuat-amc.org/laboratory/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井手 香織 (IDE KAORI)
東京農工大学大学院農学研究院・助教
研究者番号：40550281

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：