

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780315

研究課題名(和文) 犬の炎症性腸疾患の病態解明：粘膜バリアとサイトカインバランスの観点から

研究課題名(英文) Study on the pathogenesis of canine inflammatory bowel disease: investigation of the intestinal mucosal barrier function and intestinal mucosal cytokine expression.

研究代表者

大田 寛(Ohta, Hiroshi)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・助教

研究者番号：50431333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円、(間接経費) 570,000円

研究成果の概要(和文)：IBD症例犬の腸粘膜のバリア機能について、細胞接着因子であるタイトジャンクションとアドヘレンスジャンクション(AJ)の腸粘膜病変局所での発現パターンを評価し、AJタンパク質であるE-カドヘリンがIBD症例犬の十二指腸粘膜で発現低下していることを明らかにした。一方、腸粘膜バリア機能の低下の背景として、IL-17をはじめとするヘルパーT細胞サイトカイン(IL-17, IL-4, IFN-gamma, IL-10)の遺伝子発現を解析した結果、IBD症例犬の十二指腸での発現量は、健康犬での発現量と有意な差が認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We examined the expression of tight junction and adherens junction protein in duodenal mucosa sample of dogs with inflammatory bowel disease (IBD). The expression of TJ proteins (claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 and -8), and AJ proteins (E-cadherin and beta-catenin) were determined by means of immunoblotting. As a result, expression of E-cadherin protein was significantly lower in duodenal mucosa samples of dogs with IBD than it was in samples obtained from healthy control dogs. We speculated that T helper cells have important roles in change in expression of E-cadherin in duodenal mucosa of IBD dogs. Thus, we evaluated the gene expression of cytokines of T cell subsets (IL-17, IFN-gamma, IL-4, and IL-10) in duodenal mucosa from dogs with IBD. As a result, there was no significant difference in each cytokine mRNA transcription level between groups. Thus, there is no clear evidence for the involvement of distinct T helper cytokine in the pathogenesis of canine IBD.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：獣医学・臨床獣医学

キーワード：犬 腸炎 サイトカイン インターロイキン - 17 粘膜バリア

## 1. 研究開始当初の背景

犬の炎症性腸疾患 (IBD) は、原因不明で難治性の腸疾患で、免疫抑制療法に反応を示すもののその効果は限定的であり、その病態の解明による効果的な治療法の開発が獣医師および伴侶動物飼育者に強く望まれている。IBD の発症には腸内細菌抗原に対する過剰な免疫反応が関与すると考えられているが、宿主には害のないはずである腸内細菌に対して過剰な免疫反応が成立してしまう背景として、ヒトの IBD 患者の研究から腸粘膜上皮バリアの異常、特に接着因子であるタイトジャンクション (TJ) の構成分子クローデインの異常が存在することが解明されてきている。一方で、IBD 発症における過剰な免疫反応の側面については、これまでのヒトの IBD 患者での研究の結果、近年発見された炎症性サイトカインの一種であるインターロイキン-17 (IL-17) が IBD の病態形成に関わることが明らかとなってきた。IL-17 の機能としては他の炎症性サイトカインの産生誘導により局所での炎症を惹起するとともに、クローデインの発現を調整することにより腸管上皮のバリア機能の制御に関与することも明らかになっている。

## 2. 研究の目的

犬の IBD の発症には腸粘膜上皮バリアの異常が関与することが疑われている。クローデインは粘膜上皮バリアの形成に必要な細胞接着分子であり、サイトカインである IL-17 等による発現制御を受けながら腸粘膜上皮のバリア機能を維持している。本研究ではこのクローデイン分子に着目し、クローデインの犬の腸粘膜での発現と IBD の発症との関連性を明らかにし、IBD の分子病態を解明することを目的とする。

本研究課題の具体的な研究目的は以下の2点である。

犬の腸粘膜におけるクローデインの発現動態と IBD 発症との関連性の有無。  
犬の腸粘膜における IL-17 の発現量とク

ローデインの発現量との相関の有無。

## 3. 研究の方法

### (1) IBD 症例の十二指腸粘膜における TJ 蛋白質・クローデインおよびアドヘレンスジャンクションの蛋白質の発現解析 イムノプロット法を用いた解析

健常犬と IBD 症例犬の十二指腸粘膜 (内視鏡生検材料) におけるクローデイン (クローデイン 1~5、7、8) およびアドヘレンスジャンクション (AJ) のタンパク質である E-カドヘリンと  $\beta$ -カテニンの蛋白質発現量を比較する。内視鏡生検組織から蛋白質を抽出し、各種の特異抗体を用いてイムノプロット法によりクローデイン (1~5、7、8) および AJ タンパク質の検出を行った。同時に内部標準として  $\beta$ -アクチンの蛋白質も検出し、クローデイン/ $\beta$ -アクチン比、AJ 蛋白質/ $\beta$ -アクチン比を健常犬と IBD 犬で比較する。

### 蛍光抗体法を用いた局在解析

IBD 症例犬の腸粘膜ではクローデインの発現量だけでなく局在も変化している可能性がある。そこで、IBD 症例犬の十二指腸粘膜の凍結切片を作成し、各種抗クローデイン抗体ならびに抗 E-カドヘリン、抗  $\beta$ -カテニン抗体を用い蛍光抗体法によりクローデイン、E-カドヘリン、 $\beta$ -カテニンの腸粘膜上皮での局在を明らかにする。

### (2) IBD 症例犬の十二指腸粘膜における IL-17 の発現解析

#### IBD 症例犬の十二指腸粘膜での IL-17 の遺伝子発現解析

健常犬ならびに IBD 症例犬の十二指腸粘膜組織での IL-17 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により定量的に解析する。また同時に、Th1 型、Th2 型、制御性 T 細胞それぞれのサイトカインの代表としてインターフェロン (IFN)  $\gamma$ 、インターロイキン (IL)-4、IL-10 をそれぞれ選別し、定量的遺伝子解析を行う。これにより、IBD 症例犬の腸粘膜での IL-17 を主とするサイトカインバランスを明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) IBD 症例の十二指腸粘膜におけるクローデインおよびアドヘレンスジャンクションの蛋白質発現解析

##### イムノプロット法を用いた解析

イムノプロットによる解析の結果、IBD 症例犬の十二指腸粘膜では、クローデイン 3、5、7、E-カドヘリン、 $\beta$ -カテニンの発現が確認され、この発現パターンは健常犬と同様の発現パターンであった(図1)。

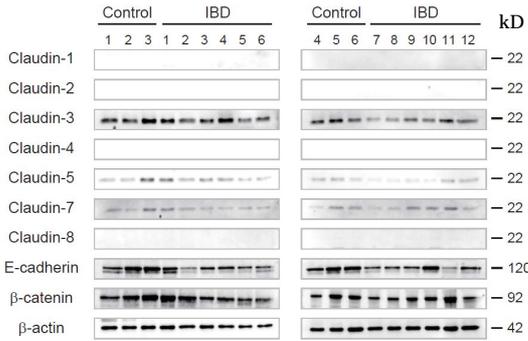


図1. 健常犬 (Control) と IBD 症例犬の十二指腸粘膜におけるクローデイン (1、2、3、5、7、8) および E-カドヘリン、 $\beta$ -カテニンの発現。健常犬ならびに IBD 症例犬の十二指腸で、クローデイン (3、5、7) および E-カドヘリン、 $\beta$ -カテニンの発現が認められる。

これらのうち、IBD 症例犬で発現量の変化が認められたのは E-カドヘリンのみであり、IBD 症例犬において E-カドヘリンの有意な発現低下が認められた(図2)。この E-カドヘリンの発現量の程度と、IBD の臨床的な活動指数や組織学的重症度との相関は認められなかった。

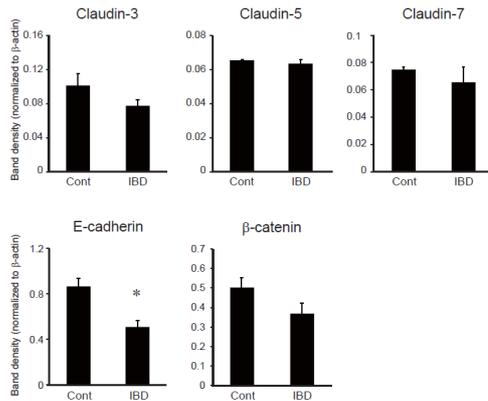


図2. 健常犬 (Cont) および IBD 症例犬の十二指腸におけるクローデイン (3、5、7) および E-カドヘリン、 $\beta$ -カテニンの発現量。IBD 症例犬において E-カドヘリンの有意な発現量の低下が認められた。

##### 蛍光抗体法を用いた局在解析

上記のイムノプロットによる解析の結果、IBD 症例で発現量の低下が認められた E-カドヘリンについて局在解析を行った。局在解析の結果、一部の IBD 症例において、E-カドヘリンの絨毛先端部における信号強度の低下が認められた。

(2) IBD 症例犬の十二指腸粘膜における

#### IL-17 の発現解析

IBD 症例犬の十二指腸粘膜での IL-17、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 の遺伝子発現解析リアルタイム PCR 法を用いて、IBD 症例犬の十二指腸粘膜における IL-17、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 遺伝子の定量的な発現解析を行った結果、いずれのサイトカインも IBD 症例群と健常犬群 (Control) で有意な差は認められなかった(図3)。

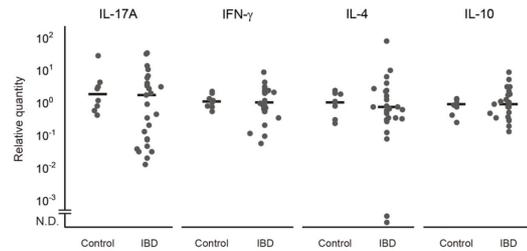


図3. 健常犬 (Control) および IBD 症例犬の十二指腸における IL-17、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 の遺伝子発現量。いずれのサイトカインも IBD 症例犬と健常犬の間に有意な差が認められなかった。

#### IBD 症例犬の十二指腸粘膜での IL-17、IFN- $\gamma$ 、IL-10 の蛋白質発現解析

追加の実験として、ELISA を用いて IBD 症例犬の十二指腸粘膜における IL-17、IFN- $\gamma$ 、IL-10 の蛋白質発現量を解析した。その結果、IL-17、IFN- $\gamma$  の蛋白質量に両群では差が認められず、IL-10 は両群において検出限界以下の量であった(図4)。

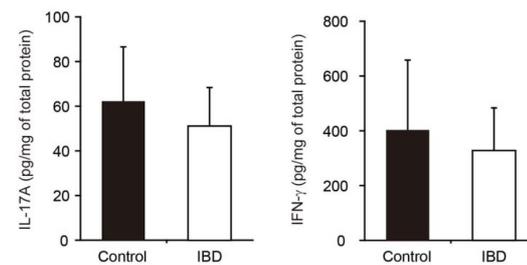


図4. 健常犬 (Control) および IBD 症例犬の十二指腸における IL-17、IFN- $\gamma$ 、IL-10 の蛋白質発現量。IL-17、IFN- $\gamma$  とも IBD 症例犬と健常犬の間に有意な差が認められなかった。IL-10 は両群で検出限界以下であった。

#### 炎症性結直腸ポリープにおける IL-17、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 の遺伝子発現解析

炎症性結直腸ポリープは、近年日本国内で発生が認められている大腸の炎症性ポリープで、ミニチュア・ダックスフンドに好発する。上記の IBD の解析に加えて、炎症性結直腸ポリープの病変部に

けるサイトカイン発現の解析も実施した。その結果、ポリープ病変部では、IL-17、IFN- $\gamma$ 、IL-10 の有意な発現上昇が認められることが明らかになった(図5)。

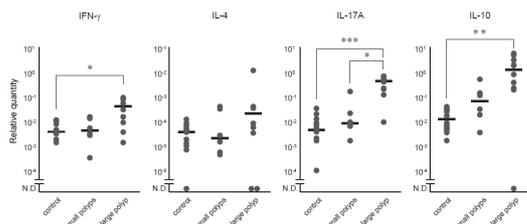


図5. 炎症性結直腸ポリープのポリープ病変部(小ポリープ、大ポリープ)におけるIL-17、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 遺伝子発現量。大ポリープ病変部では、IL-17、IFN- $\gamma$ 、IL-10 遺伝子の有意な発現上昇が認められた。

## 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)

Ohta H., Sunden Y, Yokoyama N, et al. Expression of apical junction complex proteins in the duodenal mucosa of dogs with inflammatory bowel disease. *Am J Vet Res*, 査読有, 2014, in press.

Ohta H., Takada K, Sunden Y, et al. CD4(+) T cell cytokine gene and protein expression in duodenal mucosa of dogs with inflammatory bowel disease. *J Vet Med Sci*, 査読有, 2014, 76:409-414.

Tamura Y, Ohta H., Torisu S, et al. Markedly increased expression of interleukin-8 in the colorectal mucosa of inflammatory colorectal polyps in miniature dachshunds. *Vet Immunol Immunopathol*, 査読有, 2013, 156:32-42.

DOI:10.1016/j.vetimm.2013.09.017.

Ohta H., Takada K, Torisu S, et al. Expression of CD4+ T cell cytokine genes in the colorectal mucosa of inflammatory colorectal polyps in miniature dachshunds. *Vet Immunol Immunopathol*, 査読有, 2013, 155:259-263.

DOI:10.1016/j.vetimm.2013.07.006.

[学会発表](計9件)

大田寛. Expression of claudins protein in the duodenal mucosa from dogs with inflammatory bowel disease. American College of Veterinary Internal Medicine Forum 2013. 2013年6月12日

~2013年6月15日, Washington State Convention Center, シアトル, ワシントン州, USA.

田村悠. Marked increased expression of interleukin-8 in the colorectal mucosa of dogs with inflammatory colorectal polyps but not with lymphocytic-plasmacytic colitis. American College of Veterinary Internal Medicine Forum 2013. 2013年6月12日~2013年6月15日, Washington State Convention Center, シアトル, ワシントン州, USA.

大田寛. ミニチュア・ダックスフンドの炎症性結直腸ポリープの病態。第155回日本獣医学会学術集会, 2013年3月28日~2013年3月30日, 東京大学, 東京。

田村悠. ミニチュア・ダックスフンドの炎症性結直腸ポリープにおけるインターロイキン-8の発現上昇。第9回日本獣医内科学アカデミー学術大会, 2013年2月22日~2013年2月24日, パシフィコ横浜, 横浜。

田村悠. ミニチュア・ダックスフンドの炎症性結直腸ポリープ病変における炎症性サイトカインの発現解析。第154回日本獣医学会学術集会, 2012年9月14日~2012年9月16日, 岩手大学, 盛岡。

大田寛. Interleukin-17A gene expression in the intestinal mucosa in dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis and inflammatory colorectal polyp. American College of Veterinary Internal Medicine Forum 2012. 2012年5月30日~2012年6月2日, Ernest N. Morial Convention Center, ニューオーリンズ, ルイジアナ州, USA.

大田寛. ミニチュア・ダックスフンドの炎症性結直腸ポリープの腸炎膜病変におけるインターロイキン(IL)-17Aの発現解析。第8回日本獣医内科学アカデミー学術大会, 2012年2月18日, パシフィコ横浜, 横浜。

高田佳苗. 犬の慢性腸炎症例の腸粘膜におけるIL-17A遺伝子の発現解析。第152回日本獣医学会学術集会, 2011年9月20日, 大阪府立大学, 大阪。

大田寛. 犬の慢性腸炎症例の結腸粘膜における細胞接着分子クローデインの発現動態。第152回日本獣医学会学術集会, 2011年9月20日, 大阪府立大学, 大阪。

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

大田 寛 (Ohta Hiroshi)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号: 50431333