

令和元年6月19日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2018

課題番号：24780305

研究課題名（和文）新たな犬好中球機能不全症の病態解明と新しい治療法へのアプローチ

研究課題名（英文）The clarification of pathological mechanisms of neutrophil functions in a new type of canine neutrophil dysfunction and approach to a new therapy

研究代表者

小林 沙織 (Kobayashi, Saori)

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：60566214

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、好中球機能不全症を呈する雑種犬の病態解明およびウシラクトフェリン（LF）療法の治療機序を明らかにするために実施されたものである。

症例犬の幼少時からの再発性感染は、好中球のCD18依存性殺菌能の障害が主な原因であり、CD18非依存性殺菌能によってある程度代償されているために、中年齢までの生存が可能だったことが考えられた。LFの長期経口投与は、好中球のCD18遺伝子レベルを増加させることに加え、慢性的な炎症状態の沈静化と血中鉄分補充効果を示すことによってCD18依存性殺菌能を回復させていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犬の好中球機能不全症でもこれまで報告のないタイプを日本雑種犬に見出した。CD18欠損の犬白血球粘着不全症（CLAD）のバリエーションの存在は証明されていないが、本症が世界初のCLADバリエーションに分類される可能性を示した。

また、新たな好中球不全症に対してウシラクトフェリン投与が効果があることを突き止め、その治療機序についていくつかの作用が明らかとした。本研究結果は、これまで治療法がなかった好中球機能不全症に対して根治療法ならびに将来的な新規治療薬の開発に寄与するものと期待している。

研究成果の概要（英文）：In this study, neutrophil functions were analyzed in order to clarify the pathological mechanisms of neutrophil dysfunction and the mechanism of action of bovine lactoferrin administration in a mixed breed dog.

Recurrent infections from puppyhood were caused by a main defect of CD18-dependent neutrophil sterilizing function. It was thought that the dog could survive until middle age because CD18-independent neutrophil sterilizing function was compensated to some extent. Long-term oral administration of bovine lactoferrin increased the mRNA level of neutrophil CD 18 and also downregulated the chronic inflammatory status and increased blood iron concentration, leading to improving the CD18-dependent neutrophil sterilizing function in the dog.

研究分野：臨床獣医学免疫学

キーワード：犬好中球機能不全症 先天性免疫不全 細胞免疫 ITGB2 CD18 ウシラクトフェリン

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

1. 研究開始当初の背景

先天性の好中球機能不全症は、「若齢時から易感染性および細菌・真菌感染を繰り返し、抗生物質等の治療で回復しない」という所見を特徴とする。人医学領域では、生命に関わる疾患のひとつであることから、好中球機能不全症に対する病態解明および治療法開発が精力的に展開されている。しかし、小動物獣医学領域では、純血種での少数の報告がされているのみで、国内外ではほとんど好中球機能不全症に対する研究が展開されていない。このため、小動物臨床現場では、好中球機能不全症の存在は見過ごされていることが多く、たとえ診断に至ったとしても根治的な治療法がないのが現状である。

このような状況の中、申請者は雑種犬 2 頭において先天性好中球機能不全症を見出した(Vet. Immunol. Immunopathol. 130 : 187-196, 2009)。本好中球機能不全症は新たな好中球機能不全症に分類され、Current Opinion in Immunology で紹介されるに至った(“ Genetic etiologies of leukocyte adhesion defects” 21, P481-486, 2009)。

本症例における好中球機能不全症は、好中球のある膜レセプターの発現が減少していることに起因し、特に活性酸素産生能の著しい減弱を特徴とする。これまでの報告では、レセプター蛋白をコードする $\beta 2$ インテグリン遺伝子 (ITGB2 遺伝子) の変異が原因であったが、本症例では遺伝子変異は伴っていないものだった。この点が、犬・牛・人での白血球粘着不全症と大きく異なる点であった。

本症例に対し、ウシラクトフェリンの長期経口投与試験を実施すると、膜レセプター遺伝子発現が正常レベルまで増加し、続いて、レセプター発現および活性酸素産生能が正常レベルまで回復することが明らかとなった (Vet. Immunol. Immunopathol. 143 : 155-161, 2011)。申請者の研究では、本好中球機能不全症は膜レセプター遺伝子発現の低下に起因し、ウシラクトフェリン投与が正常レベルまでその発現を増加させ臨床症状を改善することまでは突き止めたが、いまだその治療機序については不明な点が多く残されている。これまで、人医学領域においても投薬による好中球機能不全症の根治療法は報告されていない。したがって、さらなる病態解明によって獣医療・人医療への有用な知見・情報が提供可能となり、病気の解明および治療法開発の進展につながることを期待された。

2. 研究の目的

申請者は、犬において新しいタイプの先天性好中球機能不全症を見出し、ウシラクトフェリン投与が好中球機能および臨床症状を改善することを突き止めた。本研究では、ウシラクトフェリン経口投与が好中球機能不全症の犬における好中球機能を正常化させた点に焦点を当て、本好中球機能不全症のさらなる病態解明およびラクトフェリンの治療機序の解明・新規治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

申請当初の計画を進めていく中、様々な困難や産休・育休等の研究中断に伴って、いくつかの計画を変更して研究を実施した。

○症例犬における殺菌能の検討

本症例は、好中球における膜レセプターCD18 発現の低下によって殺菌能が減弱していたが、膜レセプターを介さない経路の検索はされていなかったため、細胞質内プロテインキナーゼ (PKC) 以降の経路を介した殺菌能を検討する。 PKC 刺激剤である PMA を使用した好中球の活性酸素量の測定、健常犬との比較

○本症例の遺伝的背景の精査

同腹犬 2 頭が発症していたことから、家族性の遺伝病であることが強く疑われた。申請者の研究では、本症例の好中球 RNA における ITGB2 遺伝子翻訳領域では遺伝子変異が認められなかった。そのため、遺伝的な背景を再度確かめるために、正常犬の遺伝子配列を得ると共に、症例犬の DNA および RNA を用いて、これまで検索していなかった ITGB2 遺伝子領域をターゲットに遺伝子解析を進める。ダイレクトシーケンシング法、クローニング

○本症例の好中球機能不全症へのウシラクトフェリンの治療機序の検討

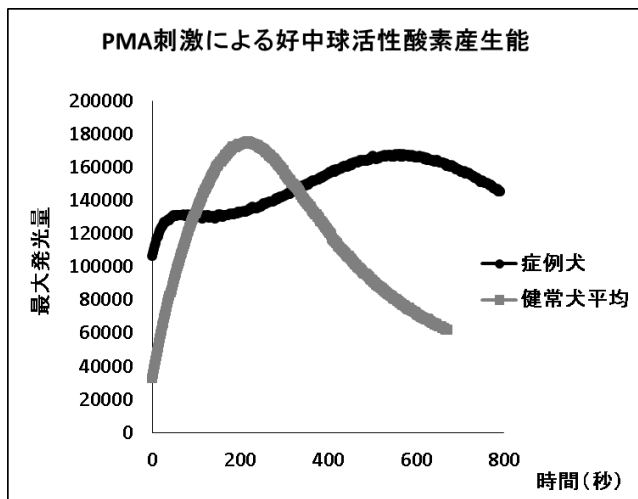
(1) 本症例の好中球機能不全症の原因は膜レセプター遺伝子発現の低下に起因していたが、ウシラクトフェリンによって可逆的に増加することが明らかとなった。一方、オプソニン化ザイモサンが CD18 を介して活性酸素を産生する経路において、生体内ラクトフェリンが持つ鉄や血管内皮細胞に存在する貯蔵鉄が由来する 2 価鉄がヒドロキシラジカルの生成に必要なことが報告されている。ウシラクトフェリンは 2 価鉄を有していることから、経口投与による鉄分の補充効果も期待される。初診時、貧血が認められていた症例犬における血中の鉄濃度の評価が必要であるため、血清鉄濃度を測定すると共に、ウシラクトフェリンの長期投与によって血清鉄濃度に影響があったのか調べる。 保存血清による血中鉄濃度、総鉄結合能の測定

- (2) ウシラクトフェリン添加が好中球性前骨髄球 HL60 細胞の活性酸素産生に及ぼす影響を調べる。CD18 依存性経路と CD18 非依存性経路の活性酸素産生を調べ、ウシラクトフェリンが作用する部位を検討する。 培養細胞系での再現

4. 研究成果

○症例犬における殺菌能の検討

ホルボールミリステートアセテート Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)刺激による好中球活性酸素産生能を調べた結果、症例犬では最大発光量 167760/s、反応時間 572 秒、健常犬平均では最大発光量 $175800 \pm 821/s$ 、反応時間 220 ± 5.7 秒であった。症例犬では健常犬レベルの活性酸素産生が認められたが、最大発光量に達するまでの反応時間は 2.6 倍ほど長く要した。また、これまで本研究で得られていた症例犬における NADPH オキシダーゼコンポーネントは過剰発現していたことが示されていたことを併せると、症例犬では PKC 以降のシグナル伝達経路には障害がないが、健常犬と比較すると反応までの時間を要するため、NADPH オキシダーゼコンポーネントの過剰発現という代償反応が起こっていることが明らかとなった。

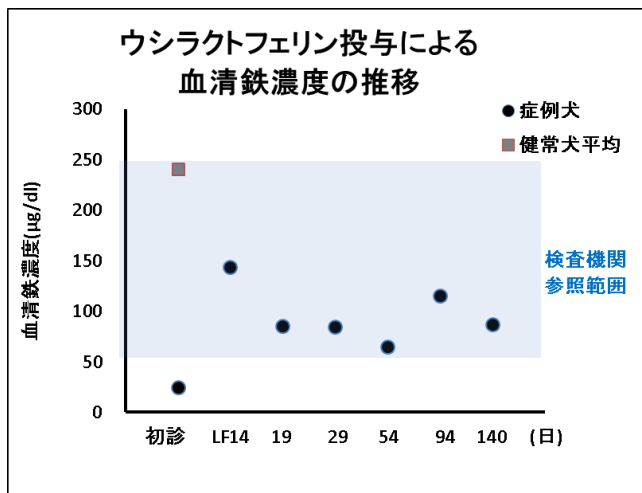
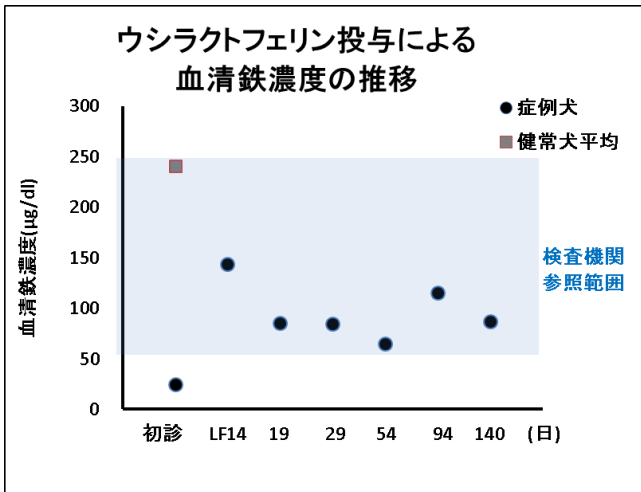


○本症例の遺伝的背景の精査

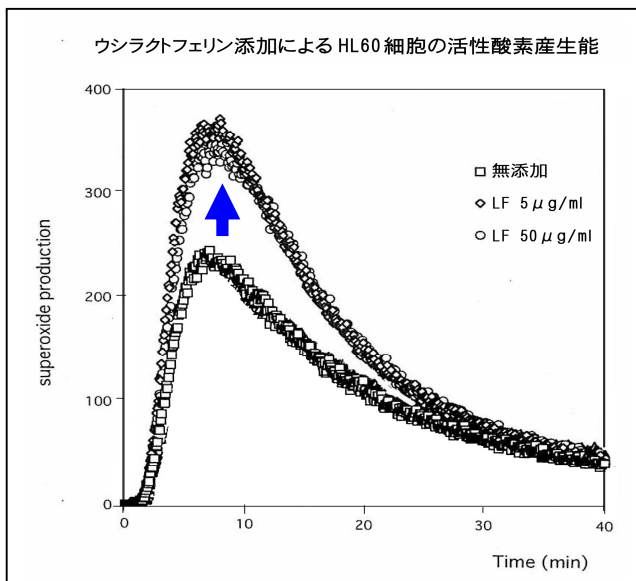
症例犬の遺伝子解析を進める予定だったが、正常犬の配列を取得したものの、症例犬の保存核酸では解析が困難だったため断念した（症例犬はすでに不慮の事故で死亡しているため、DNA/RNA の再採取が不可能であった）。

○本症例の好中球機能不全症へのウシラクトフェリンの治療機序の検討

(1) 好中球機能不全症を示した症例犬は当初、著しい非再生性貧血を呈していた。そこで、ウシラクトフェリン投与前後による貧血状態の推移の解析を試みた。その際、対象となる健常犬群、症例との血縁関係にある子犬群も併せて調べた。症例犬の初診時は、赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、血清鉄濃度 ($24.3 \mu\text{g/dl}$, 参照範囲 $61 - 240 \mu\text{g/dl}$)、総鉄結合能 ($56.8 \mu\text{g/dl}$, 参照範囲 $303 - 526 \mu\text{g/dl}$) が全て著しく減少していた。この結果と再発性の細菌感染の既往歴および現症を考慮すると、慢性炎症に伴う二次性の鉄欠乏性貧血であると考えられた。その後、症例犬に対するウシラクトフェリンの経口投与により、血清鉄濃度は 2 週間程度で $143 \mu\text{g/dl}$ まで増加し、投与 140 日後まで血清鉄濃度は $64 - 115 \mu\text{g/dl}$ となった。総鉄結合能は 1 か月程度で参照範囲内に回復し、赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度も緩徐ではあるが確実に増加していることが明らかとなった。症例犬の活性酸素産生能も並行して改善していた。一方、健常犬における 1 か月間のウシラクトフェリン投与では、各項目に有意な変化は認められなかった。血縁子犬群にはいずれも健常子犬群と同様、貧血の項目に関して異常値は認められなかった。以上から、症例犬に対するウシラクトフェリン療法によって、慢性炎症に伴う二次性鉄欠乏性貧血を正常犬レベルまで回復させていた。活性酸素産生には生体内の鉄が不可欠であることから、ウシラクトフェリンの慢性炎症の調節と血中鉄分補充効果が、ITGB2 遺伝子発現の増加に加えて、好中球の機能回復につながっているものと考えられた。



(2) 好中球性前骨髄球が主体のHL-60細胞へのウシラクトフェリン添加試験にて効果を検討した。dibutyryl cAMPにて分化刺激したHL60に各濃度のウシラクトフェリン(終濃度5µg/ml、50µg/ml)を添加し、48時間培養した後に1mg/ml オプソニン化ザイモサンにて刺激し活性酸素能を測定した。その結果、LF無添加群に比較してウシラクトフェリン添加群(5µg/mlおよび50µg/ml)がオプソニン化ザイモサン刺激に対して約1.5倍の活性酸素の産生を認めた。一方、PMA(1µg/ml)刺激に対しては、ウシラクトフェリンの添加(終濃度5µg/ml、50µg/ml)の有無に関わらず変化がなかった。以上より、HL60細胞株においても、ウシラクトフェリンはPKC以前のCD18依存性活性酸素産生経路に作用・調節することで活性酸素産生を促すことが明らかとなった。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Sato, R., Kobayashi, S. (2017) The Immunomodulatory Effects of Lactoferrin on the Neutrophil Functions. Intern Med review 3 (11): 16-33. 査読有. DOI: 10.18103/imr.v3i11.600

Sato, R., Kobayashi, S., Abe, Y., Kamishina, H., Oda, S., Yasuda, J., and Sasaki, J. (2012) Clinical effects of bovine lactoferrin on two canine cases with familial neutrophil dysfunction. J. Vet. Med. Sci. 74:1177-1183. 査読有. DOI: 10.1292/jvms.11-0173

〔学会発表〕(計2件)

小林沙織 (2016) 動物の遺伝病 犬の好中球機能不全病 . 平成 28 年度岩手大学公開講座

小林沙織 (2013) 小動物臨床における好中球機能低下症 . 平成 24 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会 (大阪市) 講演要旨 : 267-268.

〔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

http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~naika/works/naika2_study.html#koutyuukyuu

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。