

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660237

研究課題名(和文)リンパ球の選択的誘導を用いた犬炎症性腸疾患に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel therapeutic strategy for canine inflammatory bowel disease using selective lymphocyte induction

研究代表者

越野 裕子(後藤裕子)(Goto-Koshino, Yuko)

東京大学・農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：80436518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はイヌの炎症性腸疾患に対し、ラパマイシン(シロリムス)を投与することにより、1. 犬炎症性腸疾患におけるラパマイシンの新規治療薬としての有用性、2. 犬炎症性腸疾患の病態におけるTregおよびTh17の関与、についての検討をおこなうことを目的とした。ConA刺激条件下で培養した犬末梢血リンパ球にラパマイシン、IL-2、TGFbをさまざまな組み合わせで添加したが、いずれの組み合わせもConA単独添加と比較してTregの割合および絶対数の大幅な増加を誘導することができなかった。ConA刺激以外の条件下における検討が必要なものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was; 1. To evaluate the effect of Rapamycin in canine Inflammatory bowel disease as a novel therapeutic drug; 2. To investigate the involvement of Treg and Th17 cells in clinical pathology of canine inflammatory bowel disease. We added Rapamycin, IL-2 and TGFb to ConA-stimulated canine peripheral lymphocytes in various combination. However, compared to lymphocytes cultured with ConA alone, neither of the combination achieved significant increase in Treg cell percentage nor numbers. It might be necessary to evaluate culture condition other than ConA stimulation-based method.

研究分野：獣医内科学

キーワード：ラパマイシン 犬 Treg リンパ球 炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

ラパマイシン(シロリムス)は細菌から分離された免疫抑制剤であり、抗癌剤としての作用も認められている。近年、ヒトやマウスにおいては制御性 T 細胞 (Treg) を増加させるとともに、IL-17 産生リンパ球サブセットである Th17 を減少させる効果があることが分かってきた (Strauss et al, *J Immunol*, 2007; Yin et al, *Immunology*, 2013)。

犬の炎症性腸疾患は多様な病態を内包する混成疾患群と考えられており、下痢や嘔吐、食欲不振などの慢性の消化器症状を特徴とする (Allenspach et al, *J Vet Intern Med*, 2007)。その病態は未だ不明な点が多いが、環境要因、遺伝的要因に加え、炎症部位における CD3 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞や形質細胞の増加など (German et al, *J Vet Intern Med*, 2001; Jergens et al, *Am J Vet Res*, 1996) 過剰な免疫系の活性化が示唆されている。

近年、犬の炎症性腸疾患において、腸粘膜に存在する Treg の数が減少しているとの報告がなされた (Junginger et al, *Vet Res*, 2012)。Treg の減少は、Th17 リンパ球サブセットの増加とともにヒト炎症性腸疾患の病態において重要とされる所見であり、犬炎症性腸疾患の病態にも深く関与している可能性がある。そこで、ラパマイシンが犬リンパ球に対して同様の作用を示す場合、犬炎症性腸疾患における免疫異常を効果的に改善する新規治療薬となり得るのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

免疫抑制剤であるラパマイシンには Treg を増加させ、Th17 を減少させる作用があることが報告されている。犬の炎症性腸疾患の病態については未だ不明な点が多いが、近年、症例犬の腸組織においては抑制性の活性を有する Treg が減少しているとの知見が発表された。犬 Th17 に関する研究はなされていないが、ヒトやマウスの炎症性腸疾患と同様、Treg と Th17 の不均衡が発病メカニズムにおいて重要である可能性が考えられる。本研究は、炎症性腸疾患罹患犬に対してラパマイシンを投与することにより、(1)犬炎症性腸疾患におけるラパマイシンの新規治療薬としての有用性、(2)犬炎症性腸疾患の病態における Treg および Th17 の関与、についての検討を行うものである。

3. 研究の方法

(1) Treg および Th17 の検出

リンパ球 *in vitro* 試験においては CD4, CD25, FoxP3 は多重染色により Treg をフローサイトメトリーで検出することが可能である。また、組織切片における FoxP3 発現は免疫組織化学により検出できる。これらについては、既存の方法を用いる。Th17 のマーカータンパク質は犬においては明らかではないので、Th17 由来サイトカインである IL-17 の mRNA 発現を検討するものとする。

(2) ラパマイシンを用いた犬リンパ球の *in vitro* における選択的誘導

犬リンパ球に対するラパマイシンの Treg 選択的誘導効果を検証するため、*in vitro* 試験を行う。健常犬から分離した PBMC に対し、ラパマイシンを様々な濃度で添加した後、フローサイトメトリーにより CD4+CD25+FoxP3+Treg 数の増減を検討するとともに、上述の RT-PCR により Treg および Th17 関連 mRNA 発現の増減を検討する。

4. 研究成果

(1) Treg および Th17 の検出

健常犬末梢血単核球を 3 日間 ConA 刺激条件下で培養したあと、CD4, CD25, FoxP3 による多重染色をおこなった。Treg 分画は問題なく検出可能であったものの、死細胞が多く含まれていたために Treg の正確な割合を測定するのが困難であった。当初使用したフローサイトメーターで検出できる蛍光は 3 色までであり、死細胞の検出をおこなうことができなかった。そこで使用するフローサイトメーターを 2 レーザーのものに変更し、CD4, CD25, FoxP3, 死細胞を同時に検出可能な系に変更した。

死細胞を検出する VFD780 色素を併用することにより、正確な Treg 数および割合の測定が可能となった (図 1)。

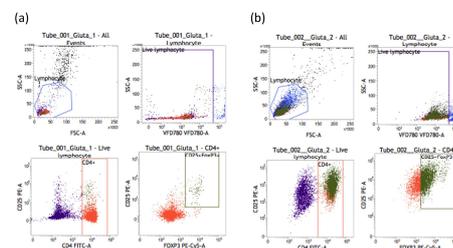


図 1 犬末梢血単核球のフローサイトメトリー解析(VFD780, CD4, CD25, FOXP3染色)。5日間培養後のTreg分画(CD4+CD25+FOX3+)の割合は(a)無刺激条件下と比較し、(b)ConA刺激条件下において増加した。

(2) ラパマイシンを用いた犬リンパ球の *in vitro* における選択的誘導

健常犬末梢血単核球を以下の薬剤の添加条件下で培養し、ConA (5 µg/ml) 単独刺激条件

(a)

	% of Treg	Counts of Treg
no stimulation	1.40	9200
ConA	41.9	900000
ConA + IL-2	52.6	2000000
ConA + TGFβ	44.8	890000
ConA + Rapamycin	35.6	150000

(b)

	% of Treg	Counts of Treg
no stimulation	9.12	43000
ConA	23.9	240000
ConA + IL-2	34.0	480000
ConA + TGFβ	27.8	280000
ConA + Rapamycin	17.8	110000

図2 健康犬2頭 (a) Dog 1, (b) Dog 2 から採取した末梢血単核球を表中の条件下で5日間培養し、Tregの割合および細胞数を測定した。

下の場合と Treg 数および割合を比較した。

ConA + IL-2 (100 IU/ml)

ConA + TGFβ (2 ng/ml)

ConA + ラパマイシン (100nM)

いずれの場合も ConA 単独添加の場合と比較して Treg の数および割合の増加を引き起こすことはなく、この条件下では Treg の選択的誘導をおこなうことができなかつた (図 2)。

ConA + IL-2 + ラパマイシン、ConA + TGFβ + ラパマイシンの組み合わせで作用させた場合もこの傾向は変わらず、Treg の選択的誘導を得るためには ConA 刺激以外の条件を模索するものがあると考えられた。

この後、以下のような実験計画を進める予定であったが、in vitro における選択的誘導を得ることができなかつたため、保留とした。

(3) 健康犬におけるラパマイシン投与量の検討

(4) 炎症性腸疾患症例に対するラパマイシンの試験的投与

(5) Treg および Th17 細胞の増減に関する検討

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 11 件)

Koshino A, Goto-Koshino Y, Setoguchi A, Ohno K, Tsujimoto H. Mutation of p53 gene and its correlation with the clinical outcome in dogs with lymphoma. J Vet Intern Med. 査読有, 30: 223-229, 2016.

10.1111/jvim.13807

Hiyoshi-Kanemoto S, Goto-Koshino Y, Fukushima K, Takahashi M, Kanemoto H, Uchida K, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Detection of circulating tumor cells using GeneScan analysis for antigen receptor gene rearrangements in canine lymphoma patients. J

Vet Med Sci. 査読有, Epub ahead of print, 2016.

<http://doi.org/10.1292/jvms.15-0433>

Goto-Koshino Y, Mochizuki H, Sato M, Nakashima K, Hiyoshi S, Fujiwara-Igarashi A, Maeda S, Nakamura K, Uchida K, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Construction of a multicolor GeneScan analytical system to detect clonal rearrangements of immunoglobulin and T cell receptor genes in canine lymphoid tumors. Vet Immunol Immunopathol. 査読有, 165: 81-87, 2015.

10.1016/j.vetimm.2015.03.005

Nakashima K, Hiyoshi S, Ohno K, Uchida K, Goto-Koshino Y, Maeda S, Mizutani N, Takeuchi A, Tsujimoto H. Prognostic factors in dogs with protein-losing enteropathy. Vet J, 査読有, 205: 28-32, 2015.

10.1016/j.tvjl.2015.05.001

Fujiwara-Igarashi A, Igarashi H, Mizutani N, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Ohno K, Tsujimoto H. Expression profile of circulating serum microRNAs in dogs with lymphoma. Vet J. 査読有, 205: 317-321, 2015.

10.1016/j.vjl.2015.04.029

Hiyoshi S, Ohno K, Uchida K, Goto-Koshino Y, Nakashima K, Fukushima K, Kanemoto H, Maeda S, Tsujimoto H. Association between lymphocyte receptor gene rearrangements and histopathological evaluation in canine chronic enteropathy. Vet Immunol Immunopathol. 査読有, 165: 138-144, 2015.

10.1016/j.vetimm.2015.03.009

Asada H, Tomiyasu H, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Evaluation of the drug sensitivity and expression of 16 drug resistance-related genes in canine histiocytic sarcoma cell lines. J Vet Med Sci, 査読有, 77: 677-685, 2015.

10.1292/jvms.14-0415.

Igarashi H, Ohno K, Fujiwara-Igarashi A, Kanemoto H, Fukushima K, Goto-Koshino Y, Uchida K, Tsujimoto H. Functional analysis of pattern recognition receptors in miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps. J Vet Med Sci. 査読有, 77: 439-447, 2015.

10.1292/jvms.14-0505

Goto-Koshino Y, Tomiyasu H, Suzuki H, Tamamoto T, Mizutani N, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Differential expression of CD45 isoforms in canine leukocytes. Vet Immunol Immunopathol. 査読有, 160: 118-122. 2014.
10.1916/j.vetimm2014.03.011

Maeda S, Ohno K, Uchida K, Ugarashi H, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Tsujimoto H. Intestinal protease-activated receptor-2 and fecal serine protease activity are increased in canine inflammatory bowel disease and may contribute to intestinal cytokine expression. J Vet Med Sci. 査読有 76: 1119-1127. 2014.
<http://dx.doi.org/10.1292/jvms.14-0060>

Nakajima M, Ohno K, Goto-Koshino Y, Fjino Y, Tsujimoto H. Plasma transferrin concentration as a nutritional marker in malnourished dogs with nutritional treatment. J Vet Med Sci. 査読有, 76: 539-543. 2014.
<http://dx.doi.org/10.1292/jvms.13-0583>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

越野 裕子 (後藤裕子)(Goto-Koshino, Yuko)
東京大学・農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号 : 80436518