

論文の内容の要旨

論文題目 Dok-1/-2 二重欠損マウスは IL-17A 及び IL-22 の発現低下を伴う重度
の DSS 誘導性大腸炎を発症する

氏名 早稲田 真澄

腸管の粘膜組織は、病原性微生物に加えて微生物叢由来の多種多様な抗原に絶えず曝露されている。また、食物には抗原となる異種タンパク質が含まれており、これらに対する免疫反応は食物アレルギーの原因となる。したがって、腸管の恒常性を維持するためには、病原性細菌に対する炎症応答と宿主にとって有用な微生物叢及び無害な食物由来の抗原に対する免疫寛容とを、適切に制御する必要がある。これまでの研究から、腸管の恒常性は、宿主の免疫系及び腸上皮組織と腸内微生物叢との複雑な相互作用に依存することが示唆されており、この相互作用のバランスが崩壊すると、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) 等の慢性炎症性疾患が引き起こされると考えられているが、IBD の病因は未だ完全には解明されていない。

私の所属研究室では、造血系細胞における蛋白質チロシンキナーゼの主要な基質としてアダプター分子 Dok-1 (Downstream of tyrosine kinases 1) を同定した。これまでの研究から、Dok-1 及びその類縁分子である Dok-2 は主に免疫系細胞に高発現しており、増殖因子やサイトカインの受容体及びパターン認識受容体などの下流において、様々なシグナル伝達を負に制御することが明らかになっている。しかしながら、腸管の恒常性維持における Dok-1 及び Dok-2 の役割は明らかではなかった。

本研究では、IBD モデルとして広く用いられている dextran sodium sulfate (DSS) 大腸炎をマウスに誘導し、その病態を解析することにより、腸管の恒常性維持におけるこれら Dok アダプター分子の役割を検討した。

腸管の恒常性維持における Dok-1 及び Dok-2 の役割を解明するため、8 - 12 週齢の野生型 (wild type: WT) マウス、Dok-1 欠損 (knockout: KO) マウス及び Dok-2 KO マウスに、2.5% DSS 水溶液を飲水投与し大腸炎を誘導した。DSS 水溶液を 5 日間投与した後に DSS を含まない飲料水を与えた群を DSS 群、DSS を含まない飲料水のみを与えた群を対照群とし、体

重、便の性状及び下血を含めた評価 (disease activity index: DAI) を毎日記録した。DSS 非投与である対照群において、Dok-1 KO マウス及び Dok-2 KO マウスは、WT マウスと同様にほぼ一定の体重及び DAI を示した。一方、DSS 群において Dok-2 KO マウスは、Dok-1 KO マウスとは異なり WT マウスよりも有意な体重減少を示した。さらに DSS 群において、Dok-1 KO マウス及び Dok-2 KO マウスの DAI は WT マウスに比べ僅かに上昇傾向を示したが、統計学的に明らかな差は認められなかった。以上の結果から、Dok-2 KO マウスは、WT マウスと比較して DSS 誘導性大腸炎に対する感受性が僅かに高いと考えられた。

Dok-1 KO マウス及び Dok-2 KO マウスとは異なり、Dok-1/-2 二重欠損 (double knockout: DKO) マウスが約 1 年齢で骨髄増殖性疾患を発症することなどから、両分子は血球系の細胞において協調的な役割を担うと考えられている。そこで、8 - 12 週齢の WT マウス及び Dok-1/-2 DKO マウスに対して上記の投与日程にて DSS 大腸炎を誘導したところ、対照群の Dok-1/-2 DKO マウスは、WT マウスと同様にほぼ一定の体重及び DAI を示した。一方 DSS 群の Dok-1/-2 DKO マウスは、WT マウスと比較して顕著な体重減少を示した。また、DSS を投与した Dok-1/-2 DKO マウスの DAI は、WT マウスに比べて顕著に高い値を示した。さらに実験開始 8 日目において、Dok-1 KO マウス及び Dok-2 KO マウスと比較しても、DSS を投与した Dok-1/-2 DKO マウスの DAI は有意に悪化していた。これらの結果から、Dok-1/-2 DKO マウスが、WT マウスだけでなく Dok-1 KO マウス及び Dok-2 KO マウスと比較しても、DSS 誘導性大腸炎に対してより高い感受性を示すことが明らかとなり、腸管の恒常性維持において Dok-1 と Dok-2 が協調して炎症を抑制することが示唆された。

DSS 誘導性大腸炎においては、炎症に伴う大腸の短縮がその評価基準のひとつとして知られていることを踏まえ、実験開始 8 日目に腸管を摘出し大腸の長さを測定した。対照群において、WT マウス及び Dok-1/-2 DKO マウスの大腸は同程度の長さであったが、DSS 群において、WT マウスと比較して Dok-1/-2 DKO マウスの大腸は顕著に短くなっていた。これらの結果から、WT マウスに比べ、Dok-1/-2 DKO マウスにおける DSS 誘導性大腸炎の重症化が示唆された。そこで DSS 誘導性大腸炎による組織傷害を評価するため、実験開始 8 日目に摘出した大腸を 10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、パラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン及びエオジンにて染色した大腸組織切片を観察したところ、対照群の WT マウスと Dok-1/-2 DKO マウスとの間に組織学的な差は認められず、また炎症の兆候や組織の損傷も認められなかった。一方これまでの知見と同様に、DSS を投与した WT マウスの大腸において、陰窩と呼ばれる構造の消失及び炎症性細胞の浸潤が認められた。これらの病理組織学的な変化は、DSS 群の Dok-1/-2 DKO マウスにおいても同様に観察されたが、興味深いことに Dok-1/-2 DKO マウスの大腸では、WT マウスに比べてより広範囲に潰瘍形成が認められた。これらの結果から、WT マウスと比較し、DSS 群の Dok-1/-2 DKO マウスは大腸に重度の組織傷害を受けることが病理組織学的にも明らかとなった。

これまでの研究から、DSS 投与により大腸上皮組織の透過性の亢進及び潰瘍形成が起こること、そして DSS 投与中止後に損傷を受けた大腸上皮組織が修復されることが知られている。また、大腸上皮組織の修復に重要な初期過程として、潰瘍近傍部の陰窩にて腸上皮細胞が活発に増殖することが報告されている。そこで、陰窩中の腸上皮細胞の増殖を評価するため、細胞増殖マーカーである Ki-67 に対する抗体にて免疫組織染色を行い、陰窩中の Ki-67 陽性細胞数を測定した。その結果、対照群の WT マウスと Dok-1/-2 DKO マウスとの間で、陰窩中の Ki-67 陽性細胞数に明らかな差はなかったが、DSS 群の Dok-1/-2 DKO マウスでは、WT マウスと比較して潰瘍近傍部の陰窩にて Ki-67 陽性細胞数が顕著に減少していた。これらの結果から、DSS 群の Dok-1/-2 DKO マウスでは、WT マウスと比較して大腸上皮組織の修復が障害されている可能性が示唆された。

腸上皮組織は腸内細菌の侵入を防ぐ障壁としての役割を担っており、組織が損傷すると、損傷部位から腸内細菌が大腸組織内に侵入することが知られている。組織学的な解析の結果、Dok-1/-2 DKO マウスの大腸では、WT マウスに比べてより広範囲に潰瘍形成が認められたことから、細菌の 16S rRNA に対するプライマーを用いたリアルタイム PCR 法にて腸内細菌の大腸組織内への侵入を評価した。DSS 群の WT マウスでは実験開始 6 日目以降に DAI は改善したが、Dok-1/-2 DKO マウスでは 6-7 日目にかけて DAI はさらに悪化した。そこで、回復期の初日に該当する実験開始 6 日目にマウスの大腸から RNA を抽出し、逆転写反応により合成した cDNA を用いて大腸組織中の 16S rRNA 量を解析した。遺伝子型に関わらず、対照群に比べ DSS 群において大腸組織中の 16S rRNA 量は増加したが、DSS 群の Dok-1/-2 DKO マウスは、WT マウスよりも有意に高い 16S rRNA 量を示した。対照群の WT マウス及び Dok-1/-2 DKO マウスにおいて 16S rRNA 量は同程度であったことから、DSS 投与により、Dok-1/-2 DKO マウスの大腸において、WT マウスよりも腸内細菌の侵入が促進されたと考えられた。

大腸組織に腸内細菌が侵入すると、最近の構成成分により免疫細胞などから IL-6 や TNF- α 等の炎症性サイトカインが誘導される。そこで、Dok-1/-2 DKO マウスにおける DSS 誘導性大腸炎の病態悪化に関わる分子機構を解明するため、IL-6 及び TNF- α の遺伝子発現を解析した。しかしながら、予想に反し、対照群だけでなく DSS 群においても、WT マウスと Dok-1/-2 DKO マウスとの間でこれらの炎症性サイトカインの発現量に有意な差は見られなかった。一方これまでの研究により、IBD の病態と IL-23 による Th17 サイトカインの誘導経路との関連が示唆されることから、IL-23 特異的サブユニット p19 (IL-23p19) 及び Th17 サイトカインである IL-17A と IL-22 について、同様に遺伝子発現解析を実施した。その結果、DSS 投与の有無に関わらず、WT マウスと Dok-1/-2 DKO マウスとの間で IL-23p19 の発現量に有意な差はなかったが、DSS 群の WT マウスよりも Dok-1/-2 DKO マウスにおいて、IL-17A 及び IL-22 の発現量は有意に低下することが判明した。さらに DSS を投与したマウスから大腸粘膜固有層由来の免疫細胞を単離し、IL-17A 陽性細胞及び IL-22 陽性細胞

をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、Dok-1/-2 DKO マウスにおける IL-17A 陽性細胞及び IL-22 陽性細胞の個体あたりの割合及び数は、WT マウスと比較していずれも顕著に減少することが分かった。以上の結果から、DSS 群の Dok-1/-2 DKO マウスでは、WT マウスに比べて大腸における IL-17A 及び IL-22 の発現が抑制されることが明らかとなった。

以上の本研究にて得られた知見から、Dok-1 及び Dok-2 は DSS 誘導性大腸炎を協調的に抑制するとともに、Th17 サイトカインである IL-17A と IL-22 の発現制御に関与することが示唆された。本研究により、Dok ファミリー分子による腸管の恒常性維持機構及び Th17 サイトカインの大腸炎における役割の更なる解明につながることを期待される。