

## 博士論文（要約）

炎症性腸疾患と唾液中  $\alpha$ 1,2-フコースの免疫病理学的関連性

籠 谷 領 二

クローン病 (Crohn's disease, 以下 CD)と潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, 以下 UC)を含む疾患群である炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, 以下 IBD)は、原因不明の消化管慢性炎症により血便、下痢、腹痛といった症状を呈する生活の質を著しく損なう疾患群である。IBD の病態生理は未解明であるが、遺伝的素因、免疫機構そして腸内細菌叢の三者間相互作用異常により発症する多因子疾患と考えられている。IBD は消化管のみならず、口腔、関節、皮膚、眼、肝胆道系などの領域に腸管外合併症を伴うことが知られている。

口腔病変は IBD に伴う腸管外合併症の中でも頻度が高く、IBD 患者の 5%~50%は多発性アフタ性口内炎を中心とした口腔病変を呈する。また IBD 患者の唾液中細菌叢は健常者と比べて変化しているという報告もなされており、腸炎の存在が影響を与えている可能性が示唆されている。唾液は場所を問わず非侵襲的に短時間で十分な量を採取できる検体であり、腸管炎症の活動性を反映する指標を唾液から見出すことができれば、有用なバイオマーカーとなる。

フコシルトランスフェラーゼは、オリゴ糖や糖蛋白などにフコースを付加する酵素群であり、その中のフコシルトランスフェラーゼ 1 (fucosyltransferase 1, 以下 FUT1)とフコシルトランスフェラーゼ 2 (fucosyltransferase 2, 以下 FUT2)は、ガラクトース残基にフコースを  $\alpha 1,2$ -結合で転位 (以下  $\alpha 1,2$ -フコシル化)することにより ABO 血液型抗原の合成に関与する酵素である。以下、このガラクトース残基に  $\alpha 1,2$ -結合でフコースが結合した分子構造を  $\alpha 1,2$ -フコースと呼ぶ。外分泌液から検出される ABO 血液型抗原は主に FUT2 により合成されており、外分泌液から ABO 血液型抗原が検出されない FUT2 非分泌型と呼ばれる遺伝子多型の存在が知られている。FUT2 非分泌型は日本人と白人のいずれにおいても約 20%の頻度で存在し、CD の他、原発性硬化性胆管炎、慢性膵炎、I 型糖尿病、乾癬、ベーチェット病、カンジダ感染症、口腔癌といった疾患のリスク因子であることが報告されている。腸管において  $\alpha 1,2$ -フコースは腸内細菌の *Bacteroides* 属に栄養源として利用されていることや、*Citrobacter rodentium* などの病原性細菌の感染に対して防御的にはたらくことが知られており、腸内細菌との共生、病原体に対する防御において重要な役割を果たしていると考えられている。また、小腸上皮細胞における FUT2 による  $\alpha 1,2$ -フコシル化は 3 型自然リンパ球 (Type 3 innate lymphoid cell, 以下 ILC3)の産生する IL-22 により制御されていることが報告されている。IL-22 は上皮細胞における抗菌物質の産生や細胞の分化・増殖に関わる因子の誘導を担う、臓器の恒常性維持において重要なサイトカインであり、IBD 患者の腸管粘膜組織や血中において増加していることが報告されている。FUT2 非分泌型が様々な疾患のリスク因子であることから、腸管以外の上皮組織においても  $\alpha 1,2$ -フコースが類似の役割を担っていると予想されるが、腸管以外の臓器における  $\alpha 1,2$ -フコースの役割や誘導機構に関してはこれまでほとんど報告されていない。

本研究では、腸炎の存在により全身で増加した IL-22 により唾液中の  $\alpha 1,2$ -フコースが増加しているという仮説を立てた。唾液中の  $\alpha 1,2$ -フコースを定量する Enzyme-linked lectin assay (以下 ELLA)という手法を確立し、炎症性腸疾患のモデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (Dextran sulfate sodium, 以下 DSS)誘導性腸炎モデルマウスを使用して病態形成に伴う唾液中  $\alpha 1,2$ -フコースの変化及びその誘導機構における IL-22 の寄与について検討した。

まず ELLA の特異性を確認するため、FUT2 欠損マウスの唾液中  $\alpha 1,2$ -フコースを定量解析した。 $\alpha 1,2$ -フコースは野生型マウスの唾液から検出されたが、FUT2 欠損マウスの唾液からは検出され

なかった。また全唾液の約 70%を産生する大唾液腺である顎下腺組織における  $\alpha 1,2$ -フコースの発現を免疫組織化学染色により検討したところ、野生型マウスの顎下腺の腺房細胞表面には  $\alpha 1,2$ -フコースが発現していたのに対して、FUT2 欠損マウスの顎下腺組織ではほとんど発現していなかった。以上の結果から、今回確立した ELLA は唾液中  $\alpha 1,2$ -フコースの定量において十分な特異性を有すること、マウスの唾液中  $\alpha 1,2$ -フコースは FUT2 依存性に産生されていることが明らかとなった。

次に DSS 誘導性腸炎モデルを用いて唾液中  $\alpha 1,2$ -フコースの定量解析を行った。本研究は、腸炎の存在が唾液に与える影響を評価することを主目的としており、DSS が口腔粘膜に直接傷害を与える可能性を排除する必要があった。そのため DSS 水溶液の自由飲水により腸炎を誘導する従来のモデルではなく、経口ゾンデによる DSS 投与を 12 時間毎に合計 4 回行うことにより腸炎を誘導するモデルを確立した。DSS の初回投与から 24 時間後 (Day1)、48 時間後 (Day2)に唾液を採取し、Day2 でマウスを sacrifice し大腸及び顎下腺組織を採取した。本モデルでは Day2 の時点で有意な体重減少及び血便が認められ、また Hematoxylin & Eosin (以下 H&E)染色による組織学的観察でも大腸において免疫細胞の浸潤や粘膜上皮層の損傷といった炎症所見が認められたことから、Day2 の時点で腸炎が成立していると考えられた。この DSS 誘導性腸炎モデルの唾液中  $\alpha 1,2$ -フコースの ELLA による定量解析を行ったところ、Day1、Day2 とともに DSS 投与群において唾液中  $\alpha 1,2$ -フコースは有意に増加しており、特に Day2 において顕著であった。また顎下腺組織の免疫組織化学染色でも、DSS 誘導性腸炎モデルにおいて  $\alpha 1,2$ -フコースが多く発現していた。

DSS 誘導性腸炎モデルにおいて唾液中  $\alpha 1,2$ -フコースの増加が確認されたので、次にその機序について検討した。唾液腺における FUT2 誘導機構に関してはこれまで報告が無いが、小腸上皮細胞と同様に IL-22 依存性に FUT2 発現が亢進し唾液中  $\alpha 1,2$ -フコースの増加が認められるという仮説を立てた。IBD 患者では血清 IL-22 が増加していることが知られているため、DSS 誘導性腸炎モデルにおいても血清 IL-22 が増加している可能性をまず考え、ELISA により血清 IL-22 の定量を行った。しかし血清 IL-22 レベルは DSS 投与群と対照群のいずれも測定感度以下であり、有意な増加は認められなかった。次に IL-22 以外のサイトカイン環境の変化により腸管外においても IL-22 産生が亢進している可能性を考え、ナイーブ T 細胞が IL-22 を産生する Th17 細胞や Th22 細胞に分化するのに重要なサイトカインである IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  について検討した。血清中のこれらのサイトカインレベルを ELISA により定量したところ、IL-6、IL-1 $\beta$  は DSS 投与群において対照群と比べて有意な増加が認められた。さらに、大腸粘膜固有層、脾臓、顎下リンパ節から単離した単核細胞における IL-22 の発現を real time PCR により確認したところ、DSS 誘導性腸炎モデルにおいて有意な発現増加が認められた。

ここまでの実験で DSS 誘導性腸炎モデルにおいて唾液中  $\alpha 1,2$ -フコースが増加していること、大腸のみならず顎下リンパ節でも IL-22 産生が亢進していることを確認した。次に IL-22 産生亢進が唾液中  $\alpha 1,2$ -フコース増加への影響を検討するため、IL-22 欠損マウスを用いた実験を行った。IL-22 欠損マウスに対して先述の方法で DSS 経胃投与を施行して腸炎を発症させ、DSS 投与前の唾液と DSS 投与 Day2 の唾液を用いて  $\alpha 1,2$ -フコースの定量解析を行った。IL-22 欠損マウスの唾液中  $\alpha 1,2$ -フコースは、DSS 投与を施行しても野生型のように著明に増加することはなく、この結果から唾液中  $\alpha 1,2$ -フコースの増加に IL-22 が関与していると考えられた。

最後に、recombinant IL-22 (以下 rIL-22)の投与により唾液中  $\alpha$ 1,2-フコースが増加するか検討した。野生型マウスに rIL-22 (1 $\mu$ g)を腹腔内投与し、投与前、投与後 3 時間、6 時間、24 時間の各時点で唾液採取を行ったところ、投与 24 時間後の投与前に対する唾液中  $\alpha$ 1,2-フコース変化率は、rIL-22 投与群において PBS 投与群 (対照群)と比べて有意に高かった。この結果からも唾液中  $\alpha$ 1,2-フコースの誘導に IL-22 が寄与していると考えられた。

以上の結果をまとめると、1) 唾液中  $\alpha$ 1,2-フコースは FUT2 依存性により合成されており FUT2 欠損マウスでは検出されないこと、2) DSS 誘導性腸炎モデルでは唾液中  $\alpha$ 1,2-フコースが増加していること、3) 唾液中  $\alpha$ 1,2-フコースの誘導には IL-22 が寄与していることが示された。以上の結果から、唾液中  $\alpha$ 1,2-フコースは、IL-22 が全身で増加する疾患である IBD においても増加している可能性があり、唾液中  $\alpha$ 1,2-フコースの定量は、疾患の活動性を反映するバイオマーカーとしての有用性が期待されると考えられた。