

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 23 年度博士課程入学

氏 名 五十嵐寛高

指導教員名 辻本 元

論文題目: Studies on mucosal innate immunity and microflora in miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps
(炎症性結直腸ポリープに罹患したミニチュア・ダックスフンドにおける自然免疫および腸内細菌叢に関する研究)

炎症性結直腸ポリープ (ICRP) はミニチュア・ダックスフンド (MD) に特に好発し、慢性的な粘血便やしづりといった臨床症状を一般的に呈する。ICRP は近年国内での報告が増加している結直腸の炎症性疾患であり、結直腸移行部を中心に多発性の小型ないしは大型のポリープ病変を形成し、病理組織学的には好中球やマクロファージを主体とした炎症浸潤を特徴とする。ICRP は免疫抑制療法に比較的によく反応することから、新しい犬種特異的な炎症性腸疾患 (IBD) の一種ではないかと考えられている。

これまでに ICRP のポリープ病変部における炎症性サイトカインや Th17 サイトカイン遺伝子の発現上昇が報告されており、なかでも好中球の浸潤を誘導する IL-8/CXCL8 の発現がポリープ病変部内のマクロファージで亢進していることが明らかとなっている。これらの所見はいずれも炎症を誘導する要因として重要な役割を担っていると思われるが、これらのサイトカインの発現上昇の原因は未だ明らかとなっていない。同時に、MD に好発する遺伝的背景についての情報もまた皆無である。

ヒトや犬の慢性腸炎は腸内細菌叢などの腸管内抗原と粘膜免疫の過剰な相互作用により発生すると考えられている。MD における ICRP の病変は一般的に結直腸に限局したものであり、また研究の前段階として ICRP の病変の発生角度の分布を調べたところ、結直腸の背側面よりも腹側面により好発することが明らかとなった (第 0 章)。この原因として、腹背側間の解剖学的な相違や糞便との物理的な摩擦、および糞便抗原に対する過剰反応が ICRP の病態に関与することが推測された。

腸内細菌叢は腸上皮や粘膜内の樹状細胞などがパターン認識受容体（PRR）を介して認識し、非特異的な免疫応答（自然免疫）が誘導されることで侵入性細菌や病原性菌は排除されている。これと同時に粘液や抗菌ペプチドなどの産生も誘導され、腸内細菌叢と宿主の腸粘膜との接触も抑制されることにより、粘膜免疫は恒常性を保っている。しかしながら、この自然免疫の起点となる PRR の発現や機能の異常が存在すると、粘膜免疫の恒常性が破綻して炎症が発生すると考えられている。また、病原性菌などのいわゆる悪玉菌の増加や乳酸菌などのいわゆる善玉菌の減少といった腸内細菌叢の変動も粘膜免疫の恒常性破綻に寄与することがヒトや犬の IBD で報告されている。そのため、本論文ではこの自然免疫、特に PRR および腸内細菌叢における異常が ICRP の病態に関与しているのではないかと仮説を立て、第 1 章では ICRP 症例犬における PRR の発現および機能、ならびに遺伝的背景を検討した。続いて第 2 章では ICRP 症例犬の腸内細菌叢の構成および腸内細菌叢の代謝産物である短鎖脂肪酸（SCFA）の糞便中濃度を解析した。

第 1 章 ICRP 症例犬における自然免疫異常の解析

自然免疫とは細菌の LPS やペプチドグリカン、フラジェリン、DNA、RNA など普遍的な抗原に対する非特異的な免疫応答であり、炎症細胞だけではなく上皮細胞も含めた全身のあらゆる細胞が持つ Toll 様受容体(TLR)や NOD 様受容体などの PRR がそのスタート地点である。PRR の刺激により NF- κ B などの細胞内シグナル応答が活性化され、各種サイトカインや抗菌ペプチド・粘液の分泌を誘導し、同時にタイトジャンクションなどの発現が調節されている。これまでに、ヒトや犬の IBD でも様々な PRR の発現異常や遺伝子変異による機能異常が腸炎の発生に関わっていることが多く報告されているため、本章では ICRP 症例犬におけるこの PRR の動態について検討した。

まず、24 頭の ICRP 症例犬のポリープ病変部および非病変部結腸、ならびに 21 頭の健常な実験ビーグル犬の結腸の内視鏡生検サンプルを使用し、ICRP のポリープ病変部における TLR1-10 および NOD1、NOD2 の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により定量した。その結果、ICRP 症例犬のポリープ病変部における TLR1、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10 および NOD2 の遺伝子発現量の有意な上昇が観察された。これらの遺伝子の発現上昇はいずれも炎症性サイトカイン（IL-1 β 、IL-6、IL-8/CXCL8 および TNF- α ）の発現上昇と有意に相関していた。しかしながら、この発現上昇は病変部に限局して認められ、症例犬の非病変部結腸での発現レベルは健常犬の結腸と同等であった。そのため、この PRR の発現上昇は炎症の結果として発生したものであり、サイトカイン産生を増強することで更なる炎症を誘導していることが示唆された。

次に、ICRP 症例犬における PRR の機能を評価するために、ICRP 症例犬 26 頭および対照の MD16 頭より末梢血由来単球を分離・培養し、IL-1 β の遺伝子発現および蛋白産生量を指標として NOD1、NOD2、TLR1/2、TLR2、TLR2/6、TLR4、TLR5 および TLR9 のリガンド刺激に対する反応性を評価した。その結果、IL-1 β の遺伝子発現レベルは NOD2

のリガンド刺激時に ICRP 症例犬でより高値となり、IL-18 の蛋白産生量は NOD2、TLR1/2、TLR2 および TLR2/6 のリガンド刺激時に ICRP 症例犬で亢進していることが明らかとなった。このことより、ICRP 症例犬では NOD2、TLR1/2、TLR2 および TLR2/6 の反応性が亢進していることが示唆された。

そこで、この NOD2、TLR1、TLR2、TLR6 に遺伝的変異が存在するのではないかと考え、各遺伝子のシーケンス解析を実施した。まず、データベース上の塩基配列 (NM_001287039.1) を参照し、健常な実験ビーグル犬 3 頭の結腸の内視鏡生検サンプルから RNA を抽出して犬の NOD2 遺伝子の全翻訳領域 (3,042 bp) をクローニングした。次に、ICRP 症例犬 6 頭、対照の MD5 頭および健常な実験ビーグル犬 5 頭のゲノム DNA を用いて NOD2、TLR1、TLR2 および TLR6 遺伝子の全長をダイレクトシーケンスにより解析したところ、合計で 13 ヶ所の一塩基多型 (SNP) が同定された。ICRP 症例犬に特異的な SNP は認められなかったが、NOD2 のエクソン 3 に存在する 4 つの SNP (A1532G、T1573C、C1688G および G1880A) は実験ビーグル犬よりも ICRP 症例犬および対照 MD で多く認められる傾向にあった。そのため、これらの変異アレル頻度をより大きな母集団で検討する必要があると考え、ICRP 症例犬 63 頭、対照 MD82 頭および対照の様々な犬種 237 頭について、ゲノム DNA をダイレクトシーケンスすることによりこの 4 つの SNP の遺伝子型を決定した。その結果、ICRP 症例犬群の変異アレル頻度は対照 MD 群よりも有意に高く、不完全優性遺伝モデルにおいて有意に ICRP の発生と関連することが明らかとなった。一方、対照 MD 群におけるこの変異アレル頻度はその他の様々な犬種群よりも高い傾向にあったが、いずれの群においても大半がこの変異した遺伝子型のアレルを保有していたため、これはあくまで ICRP の発生する一つの素因であり、これだけが原因遺伝子ではないことが示唆された。

第 2 章 ICRP 症例犬における腸内細菌叢の解析

腸内には宿主自身の細胞数を超える細菌が常在菌として生息しており、宿主動物の健康と密接に関連している。腸内細菌叢は腸上皮や免疫細胞の分化・成熟化による腸内環境の恒常性の維持および病原性菌の感染防御に関わるとされている。また、腸内細菌叢は食物繊維や難消化性糖類などを代謝することで宿主の消化・吸収を補助するが、そこで産生される酢酸・プロピオン酸・酪酸などの SCFA は結腸上皮の栄養源となるとともに結腸における抗炎症・抗腫瘍効果を示すことが数多く報告されている。さらに近年、腸内細菌由来の SCFA が結腸における制御性 T 細胞の分化・誘導を促進していることが明らかとなった。

これまでにこの腸内細菌叢の変動はヒトの IBD や大腸癌、肥満、糖尿病などとも関連することが明らかとなっており、また IBD や大腸癌患者は低い糞便中 SCFA 濃度を示すことが報告されている。獣医領域でも、犬の IBD や慢性腸症、出血性下痢における腸内細菌叢の変動が報告されているため、本章では ICRP 症例犬における腸内細菌叢の変動、およびそれに伴う糞便中 SCFA 濃度の変化について検討した。

まず、ICRP 症例犬 6 頭および健常な MD12 頭より糞便を採取し、その腸内細菌叢構成について次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) による 16S rRNA 解析を実施したところ、ICRP 症例犬は健常犬とは異なる細菌叢を有し、ICRP の寛解にしたがって細菌叢構成も健常化していくことが明らかとなった。また、ICRP 症例犬では *Fusobacteriaceae* の増加や *Lachnospiraceae* の減少が顕著に認められた。特に *Lachnospiraceae* は主要な SCFA 産生菌であるため、ICRP 症例犬では糞便中 SCFA 濃度が減少していることが示唆された。

そこで、次に ICRP 症例犬の糞便中 SCFA 濃度の低下を検証すべく、19 頭の ICRP 症例犬および 25 頭の対照 MD より糞便を採取し、高速液体クロマトグラフィーにより SCFA 濃度を解析した。その結果、ICRP 症例犬では糞便中の SCFA 濃度、特に酢酸およびプロピオン酸濃度が低下していることが明らかとなり、このことが ICRP における腸炎の発生に関連していることが示唆された。

これら一連の研究により、ICRP 症例犬における PRR の発現および機能異常と遺伝的素因、ならびに腸内細菌叢の変動とその代謝産物である糞便中 SCFA の減少が明らかになり、それぞれが ICRP の発生に関連していることが示唆された。

今回着目した PRR の遺伝的変異は IBD に限らず様々な炎症性疾患の原因となることが知られている。実際、今回認められたような NOD2 の機能亢進症はヒトではブラウ症候群として知られており、これは全身性の肉芽腫性炎症が特徴的な疾患である。MD は縫合糸関連性肉芽腫を初めとした様々な炎症性疾患を好発するため、今回の NOD2 変異とこれらの疾患との関連性も検討することで、ブラウ症候群を初めとした自己炎症性疾患の病態解明につながる比較医学的知見をもたらすのではないかと考えている。一方、腸内細菌叢および SCFA の変動は食事療法や抗菌薬、プロ/プレバイオティクス、SCFA の浣腸なども ICRP の有効な治療オプションである可能性を示唆している。今後さらなる検討を重ねることで ICRP の新規治療プロトコルの開発につながると信じている。