

審査の結果の要旨

氏名 五十嵐 寛高

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、結直腸移行部を中心とした多発性のポリープ病変および好中球やマクロファージを主体とした炎症浸潤が特徴的な病理組織像を示す疾患である。また、免疫抑制剤に対する良好な反応性から、犬種特異的な炎症性腸疾患 (IBD) の一種とも考えられている。ICRP の病態については、これまでに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いるが、これらのサイトカインの発現上昇の原因は明らかとなっていない。また、MD に好発することから遺伝的背景が強く疑われるが、これに対する検討も未だなされていない。

本論文では、研究の前段階 (第 0 章) として ICRP の発生角度について Prospective study を行った結果、ICRP は腹側面で好発することが明らかとなった。これは腹背側間における解剖学的な相違や蠕動時における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などの因子が病態に関与していることが考えられた。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ことから、本論文では ICRP 症例犬における腸内細菌叢およびそれらを認識する自然免疫機構、特にパターン認識受容体 (PRR) についての検討を行った。

第 1 章 ICRP 症例犬における自然免疫についての検討

自然免疫は細菌の LPS やペプチドグリカン、フラジェリン、DNA、RNA など普遍的な抗原を認識する非特異的免疫応答であり、Toll 様受容体 (TLR) や NOD 様受容体などの PRR がその起点となる。そのため、この PRR の発現異常や遺伝子変異による機能異常がヒトおよび犬の IBD の発生に関与することが報告されている。そこで、本章ではまず ICRP ポリープ病変部における PRR の発現解析を行った。その結果、ポリープ病変部では 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認められた。しかしながら、この上昇は病変部に限局して認められたため炎症の結果としての変化であることが示唆された。次に末梢血由来単球による IL- β の mRNA 発現および蛋白産生を指標として ICRP 症例犬における PRR の機能解析を行ったところ、ICRP 症例犬では NOD2 および TLR1/2、TLR2、TLR2/6 の反応性が亢進していることが示唆された。そのため、これらの PRR

における遺伝子変異を疑い、各 PRR の遺伝子全長をシーケンス解析した結果、NOD2 遺伝子における 4 ヶ所の一塩基多型 (A1532G, T1573C, C1688G, G1880A) は ICRP の発生と有意に関連していることが明らかとなった。しかしながら、大半の対照 MD およびその他の対照犬種が変異アレルを保有していることから、これらの一塩基多型はあくまで ICRP の発生する一つの素因であり、原因遺伝子はこれだけではないと考えられる。

第 2 章 ICRP 症例犬における腸内細菌叢についての検討

腸内細菌叢は粘膜免疫の分化・成熟化の誘導や病原菌の感染防御、および食物繊維や難消化性糖類の代謝による宿主の消化・吸収の補助を行い、腸管におけるホメオスタシスに貢献している。また、この代謝過程で産生される短鎖脂肪酸 (SCFA) は結腸における抗炎症効果や制御性 T 細胞の分化誘導能を保有する。そのため、腸内細菌叢の異常は IBD を初めとしたさまざまな疾患と関連することが多く報告されている。そこで、本章ではまず ICRP 症例犬における腸内細菌叢構成を次世代シーケンサーである Illumina MiSeq システムを使用した 16S rRNA 遺伝子解析により検討した。その結果、ICRP 症例犬では健常犬と異なる細菌叢構成を有しており、特に *Fusobacteria* の増加および *Lachnospiraceae* の減少に特徴づけられることが明らかとなった。*Fusobacteria* の病原性はヒトの IBD や大腸癌でも指摘されているものの、ICRP との関連性については今後さらなる菌種レベルでの検討やモデル動物を使用した検討が必要と考えられる。一方、*Lachnospiraceae* は SCFA の有力な産生菌であることから、SCFA の減少が ICRP の病態に関連していることが示唆された。そこで、次に ICRP 症例犬における糞便中 SCFA 濃度を高速液体クロマトグラフィーにより検討した。その結果、ICRP 症例犬では SCFA、とくに酢酸およびプロピオン酸が有意に減少していることが明らかとなった。

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 の減少が明らかとなった。これらはそれぞれが ICRP の発生に関連していることが示唆され、ICRP の病態の一端が解明された。

今回認められた NOD2 の機能亢進症はヒトでは Blau 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、Blau 症候群のような自己炎症性疾患に対する比較医学的知見をもたらすことが期待される。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なども ICRP の治療オプションとなりうることを示唆している。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考えられる。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。