

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成10年度博士課程 入学

氏名 藤原 俊介

指導教官 辻本 元

Studies on Th1/Th2 cytokine profiles in dogs with immunologic diseases

(イヌの免疫疾患におけるTh1/Th2サイトカインプロファイルに関する研究)

マウスのクローン化 CD4⁺ ヘルパー T 細胞 (Th) は、そのサイトカイン産生パターンから、機能的に異なる 2 種類のサブセットに分類できることが 1986 年に Mosmann により報告された。Th1 細胞は IL-2、IFN- γ 、TNF- β を主に産生して細胞性免疫の誘導に関与し、Th2 細胞は IL-4、IL-5、IL-6 を主に産生し、体液性免疫の活性化に関与する。これらのサブセットはその後ヒトにおいても存在することが確認され、現在では種々の疾患において Th1/Th2 バランスの不均衡が存在することが報告されている。例えば、アレルギーや全身性の自己免疫疾患は Th2 優位な状態にあり、逆に臓器特異的な自己免疫疾患は Th1 優位であることが多い。近年ヒトにおいては、これらの疾患における Th1/Th2 バランスの不均衡を是正するような治療法が検討されている。一方イヌでは、免疫異常による疾患が臨床的に大きな問題になっているにも関わらず、それらのサイトカインプロファイルに関してはほとんど研究が行われていない。そこで本論文では、イヌの種々の免疫疾患における Th1/Th2 サイトカインプロファイルを明らかにするため、第 1 章では炎症性腸疾患 (IBD) の自然発症例における粘膜面でのサイトカインプロファイルの検討を行い、次いで第 2 章ではアトピー性皮膚炎 (AD) の自然発症例における末梢血単核球 (PBMC) でのサイトカインプロファイルの検討を行い、さらに第 3 章ではヒトのスギ花粉症の動物モデルである実験的スギ抗原感作犬における末梢血単核球 (PBMC) でのサイトカインプロファイルの検討および DNA ワクチンが Th1/Th2 バランスに及ぼす効果の検討を行った。

IBD は慢性消化器症状を示すイヌにおいて高頻度に認められる疾患であり、その発生には粘膜面での免疫学的な異常が存在することが示唆されているが、その病因は未だ

明らかではない。ヒトにおける IBD は潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) の二つに大別され、粘膜面でのサイトカインプロファイルの解析から、UC は Th2 型、CD は Th1 型の疾患であることが示唆されている。そこで第 1 章では、イヌの IBD の自然発症例における粘膜面でのサイトカインプロファイルの検討を行った。内視鏡下で得た十二指腸粘膜サンプルにおける各種サイトカインの mRNA の発現量を real-time PCR によって定量したところ、IBD 症例においては健常犬と比較して IL-6 の mRNA の発現量が有意に増加しており、IFN- γ と TGF- β_1 の mRNA の発現量が有意に減少していた。また、IL-1 と IL-5 の mRNA の発現は IBD 症例において増加傾向にあった。さらに、健常犬では認められない IL-4 の mRNA の発現が、IBD 症例の 13 頭中 2 頭で検出された。これらの結果から、イヌの IBD の粘膜面においては Th2 型の免疫応答が主体であることが示され、そのサイトカインプロファイルはヒトの UC におけるものと類似していた。さらに経口免疫寛容に重要なサイトカインである TGF- β_1 の mRNA の発現が低下していたことから、その病態に免疫寛容の破綻が存在することが示唆された。近年、ヒトの IBD に対する抗サイトカイン療法に注目が集まっており、イヌの IBD において抗サイトカイン療法を開発する上において、本章の結果はきわめて有用な知見を提供するものと思われる。

AD は皮膚における環境中のアレルゲンに対する I 型過敏症であり、イヌでもヒトと同様に慢性皮膚炎の主要な原因となっている。イヌおよびヒトにおいて、AD の感作抗原としてはハウスダストマイト (HDM) が最も高頻度に認められている。第 2 章では、HDM に自然感作されたイヌの AD 症例における PBMC の Th1/Th2 サイトカインプロファイルを検討した。分離直後の PBMC における各種サイトカインの mRNA の発現を定量したところ、AD 症例においては健常犬と比較して TNF- α の mRNA の発現が有意に低下していた。IL-4 の mRNA の発現は AD 症例 12 頭中 1 頭でのみ認められ、健常犬では認められなかった。次に、これら症例から分離した PBMC を HDM 抗原存在下および非存在下で 24 時間培養し、各種サイトカインの mRNA の発現を定量したところ、AD 症例の 9 頭中 7 頭において抗原特異的な IL-4 の発現誘導が認められた。これらの結果から、イヌの AD の PBMC においては抗原特異的な IL-4 の産生が認められ、本疾患が全身的な Th2 型の免疫反応による疾患であること、および末梢血中に抗原特異的な Th2 細胞が存在することが示された。TNF- α の発現低下の理由は不明であるが、ヒトの AD においても同様な所見が認められているため、イヌの AD に特異的なものではないと思われる。以上のことから、イヌの AD に関与する免疫反応が明らかになると同時に、イヌの AD はヒトの AD の良い自然発症モデルとなるものと考えられた。

スギ花粉症はスギ花粉抗原に対する I 型過敏症であり、ヒトでは季節性のアレルギー性鼻炎および結膜炎が高頻度に認められる。イヌにおいてはアトピー性皮膚炎の症例の約 10% がスギ花粉抗原によって感作されていることが報告されており、自然感作および実験感作によるスギ感作犬はヒトのスギ花粉症の動物モデルとして注目されている。そこで第 3 章では、実験的にスギ花粉抗原によって感作したイヌにおいて、PBMC におけるサイトカインプロファイルを測定するとともに、スギ花粉抗原の DNA ワクチンが Th1/Th2 サイトカインバランスに及ぼす影響を検討した。分離直後の PBMC における各

種サイトカイン mRNA の発現を real-time PCR によって定量したところ、実験的感作犬においては健常犬と比較して IL-8 と TNF- α の mRNA の発現量が有意に増加しており、IFN- γ mRNA の発現量が有意に減少していた。さらに、実験的感作犬および健常犬の PBMC をスギ花粉抗原存在下で 24 時間培養し各種サイトカインの mRNA の発現を定量したところ、実験的感作犬でのみ IL-4 mRNA の発現が誘導された。また、実験的感作犬においては健常犬と比較して IL-2 の mRNA の発現量が有意に増加していた。実験的感作犬では炎症性サイトカインである IL-6 および TNF- α の mRNA 量が培養後に有意に減少しており、IL-4 による炎症性サイトカインの抑制が示唆された。次に、実験的感作犬を 3 群に分け、スギ花粉抗原の主要アレルゲンである Cry j 1 の遺伝子を導入した DNA ワクチンを高用量あるいは低用量で毎月 1 回計 5 回投与し、遺伝子を導入していない DNA ワクチンを投与したコントロール群を設定した。PBMC における IL-4 と IFN- γ の mRNA 量を比較したところ、各群間における明らかな発現の違いは認められなかった。以上の結果より、この実験的感作モデルにおいては抗原特異的にリンパ球の増殖と Th2 型反応が起こっているものと思われた。また、分離直後の PBMC において単球由来の炎症性サイトカインの mRNA が増加していたことから、恒常的に単球が活性化しているものと思われた。抗原特異的な IgE の存在や皮内反応の陽性化に加えて、抗原特異的な IL-4 の産生が確認されたことから、この実験的感作モデルはヒトのスギ花粉症研究の良い動物モデルになるものと思われた。DNA ワクチンによる Th1 サブセットの誘導は本研究では認められなかった。今後は、実験的感作の方法についてさらに検討を進めるとともに、DNA ワクチンの臨床応用に向けたさらなる研究が必要であるものと考えられた。

本研究では、イヌの免疫疾患における Th1/Th2 サイトカインプロファイルに関する一連の研究を行った。第 1 章では IBD の病態を理解するために重要な所見を明らかにし、第 2 章および第 3 章ではアレルギー性疾患のサイトカインプロファイルを解明した。最近になって、リーシュマニア感染犬における Th1 サブセットの存在が報告され、今回の研究結果と合わせて考えた場合、イヌにおいてもヒトやマウスと同様の Th1/Th2 サブセットが存在することが示唆された。また、これらのイヌの免疫疾患においてヒトの類似疾患と同様のサイトカインプロファイルを認めたことから、サイトカインおよびサイトカインレセプターを標的とした治療法の開発において、イヌの免疫疾患はヒトの免疫疾患の好適な動物モデルとなり得る可能性が示された。