

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 21 年度博士課程入学

氏名 前田 真吾

指導教員名 辻本 元

論文題目

Investigation on imbalanced mucosal immunity in canine inflammatory bowel disease

(イヌの炎症性腸疾患における粘膜免疫の不均衡に関する研究)

消化管は「内なる外」を形成しており、常時膨大な数の抗原に曝露されている。正常な消化管内では、病原体に対しては速やかに免疫応答が惹起されるのに対し、食物や共生細菌に対しては免疫寛容が誘導される。この巧妙な腸管免疫システムのバランスが破綻することにより、炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease; IBD)で認められる消化管粘膜の慢性炎症が形成されると考えられている。

イヌの IBD は、消化管粘膜における慢性炎症を特徴とし、持続性または再発性の消化器症状を呈する疾患である。イヌ IBD の病態はよくわかっていないが、①腸内環境、②腸管粘膜免疫、③粘膜バリアの 3 つの異常が複雑に関わり合うことで消化管の慢性炎症が引き起こされると考えられている。

本論文における一連の研究は、イヌ IBD における粘膜免疫の不均衡を明らかにすることを目的とし、上記の 3 つの要因のそれぞれに関して検討を行ったものである。第一の要因である腸内環境の異常に関しては、これまでのマイクロバイーム解析により、イヌ IBD 症例における腸内細菌叢の変化が明らかにされている。Immunoglobulin A (IgA)は、粘膜免疫の最前線において作用し、腸内細菌叢の形成や維持に関与していることが知られている。そこで第 1 章では、イヌ IBD 症例における血清、糞便、十二指腸、および末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)の IgA レベルを検討した。第二の要因である腸管粘膜免疫の異常に関しては、これまでイヌ IBD では主に病変部におけるサイトカイン遺伝子発現の検討が行われてきた。しかし、ヒトの IBD で認められるような Th1/Th2 サイトカインバランスの偏りはイヌ IBD 症例では認められておらず、これらサイトカイン以外の炎症性メディエーターの重要性が推測された。そこでケモカインに着目して予備実験を行っ

たところ、イヌ IBD 症例の病変部では様々なケモカイン発現の上昇が認められた。その中で、リガンド・受容体ともに発現の増加を認めたフラクタルカインとその受容体である CX₃CR1 に焦点を絞ってより詳細な検討を第 2 章で行った。第三の要因である粘膜バリアの異常に関しては、これまでに腸粘膜透過性の亢進がイヌ IBD 症例で報告されている。げっ歯類において、Protease-activated receptor-2 (PAR-2) と呼ばれるプロテアーゼをリガンドとする受容体が腸粘膜透過性を制御していることが知られている。また粘膜透過性の制御以外に、PAR-2 は腸炎の発症にも重要であることが複数の IBD モデルマウスにより証明されているが、イヌやヒトの IBD における役割については不明な点が多い。そこで第 3 章では、イヌ IBD 症例の病変部における PAR-2 発現および糞便中セリンプロテアーゼ活性を解析するとともに、イヌ小腸組織において PAR-2 の活性化による炎症性サイトカインおよびケモカインの誘導に関して検討した。

第 1 章：イヌ IBD 症例における粘膜 IgA レベルの低下

IgA は、補体活性化能が他の免疫グロブリンアイソタイプよりも弱く、一方で効果的な中和作用を有しており、抗原と結合しても炎症を誘導しないアイソタイプであると考えられている。そのため、IgA は消化管の免疫寛容に重要であることが古くから指摘されているが、その IBD における役割はよくわかっていない。そこで本章ではイヌ IBD 症例における IgA 発現を検討した。

IBD 症例においては、血清中の IgA 濃度に変化は認められなかったが、糞便および十二指腸ホモジェネート中の IgA 濃度は有意に低下していた。さらに、免疫組織化学法により十二指腸組織の IgA を染色すると、IBD 症例では IgA 陽性リンパ球数が有意に減少していた。腸管で IgM からクラススイッチした IgA 陽性 B 細胞は、一度血流に入り、全身循環を経て再び腸管へ遊走し、IgA 分泌プラズマ細胞に分化する。そこで PBMC 中の IgA 陽性 CD21 陽性 B 細胞数を測定したところ、IBD 症例において有意に減少していることが明らかになった。これらの IgA 発現の低下は、IBD と類似した消化器症状を呈する消化器型リンパ腫症例では認められなかった。本章で明らかになったイヌ IBD 症例における IgA レベルの低下は、慢性腸炎の原因あるいは結果のいずれを反映するものかは不明であるが、イヌ IBD 症例で報告されている腸内細菌叢の変化の一要因であることが示唆された。

第 2 章：イヌ IBD 症例におけるフラクタルカインおよび CX₃CR1 の発現増強とその上皮内リンパ球集簇における役割

イヌ IBD の病理組織学的特徴として、消化管粘膜の固有層や上皮内にリンパ球が高度に浸潤していることが挙げられる。最近、ヒトの IBD 患者においてケモカインのひとつであるフラクタルカインとその受容体である CX₃CR1 がリンパ球や樹状細胞の腸管組織への浸潤に重要であることが報告された。さらに IBD モデルマウスに抗フラクタルカイン抗体を投与することによって腸炎の発症が抑制されることから、フラクタルカインの制御による

IBD に対する新しい治療法も提唱されている。そこで本章ではイヌ IBD の病態におけるフラクタルカインおよび CX₃CR1 の関与について検討した。

十二指腸におけるフラクタルカインおよび CX₃CR1 の mRNA 発現は、健常犬と比べ IBD 症例で有意に高かった。フラクタルカインの蛋白量も IBD 症例の十二指腸で有意に多く、その発現は上皮細胞の細胞質に局限していた。PBMC における CX₃CR1 陽性率は、健常犬と比べ IBD 症例で有意に高く、上皮内リンパ球浸潤の病理学的重症度と正の相関を示した。PBMC における CX₃CR1 陽性細胞と上皮内リンパ球の表面抗原を解析したところ、CX₃CR1 陽性 PBMC の多くが CD8 陽性 T 細胞であり、同様に十二指腸上皮内リンパ球もその多くが CD8 陽性 T 細胞であった。以上の結果より、イヌ IBD 症例におけるフラクタルカインおよび CX₃CR1 の発現が mRNA および蛋白レベルのいずれにおいても増加していることが明らかになった。十二指腸におけるフラクタルカイン発現の局在が上皮細胞に局限していたこと、PBMC における CX₃CR1 陽性率と上皮内リンパ球の浸潤程度の間には正の相関を認めたこと、さらに CX₃CR1 陽性 PBMC と上皮内リンパ球の表面抗原プロファイルが類似していたことから、イヌ IBD 症例における腸上皮内リンパ球の浸潤にフラクタルカインと CX₃CR1 が重要な役割を果たすことが示唆された。

第 3 章:イヌ IBD 症例の小腸における PAR-2 発現および糞便中セリンプロテアーゼ活性およびその腸炎発症への関与

PAR-2 は腸粘膜における炎症制御分子の一つであり、セリンプロテアーゼにより活性化し、炎症反応を惹起する受容体である。セリンプロテアーゼには消化管に豊富に存在するトリプシンやトリプターゼなどが含まれる。最近、IBD モデルマウスにおいて PAR-2 の欠損が腸炎発症を抑制することが報告された。さらに、PAR-2 アゴニストの直腸内投与がマウスに大腸炎を誘導することから、少なくともマウスモデルにおいて PAR-2 の活性化が腸炎発症に関与していることが示されている。そこで本章ではイヌ IBD の病態における PAR-2 の関与を検討した。

IBD 症例の十二指腸において、PAR-2 の発現が mRNA および蛋白レベルのいずれにおいても増加していた。一方、IBD 症例の糞便中において PAR-2 のリガンドとなるセリンプロテアーゼ活性が上昇していることが示され、さらにその活性と臨床症状の重症度との間に正の相関を認めた。疾患コントロールとして用いた急性下痢症例の糞便では、セリンプロテアーゼ活性の上昇は認められなかった。また、イヌ小腸組織の PAR-2 をトリプシンまたは PAR-2 アゴニストにより活性化することにより、IL-1 β 、IL-8 およびフラクタルカインの遺伝子発現が誘導された。以上の結果より、セリンプロテアーゼ・PAR-2 経路が炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を介してイヌ IBD における慢性腸炎発症に関与している可能性が示唆された。

総括

以上の一連の研究成果により、イヌ IBD の病態における粘膜免疫の制御不全を複数の側面から明らかにした。すなわち、①管腔内(IgA およびセリンプロテアーゼ)、②腸粘膜(フラクタルカイン)、③境界面(PAR-2)という 3 領域の異常が組み合わさることにより、イヌ IBD における慢性腸炎が起こると考えられる。IgA は腸内細菌叢の形成・維持に関与しているため、消化管粘膜における IgA の減少は、イヌ IBD 症例で認められる腸内細菌叢の変化の原因となりうる。腸内細菌叢の変化により、IBD 症例ではセリンプロテアーゼ産生菌が増加している可能性がある。また IgA は、病原体や毒素ばかりではなく、プロテアーゼのような酵素に対する中和作用も示すため、消化管粘膜における IgA の減少は直接的・間接的に管腔内のセリンプロテアーゼ活性を増加させている可能性がある。実際、本研究において、糞便中における IgA 濃度とセリンプロテアーゼ活性の間には有意な負の相関が認められた。IBD 症例における管腔内のセリンプロテアーゼ活性の亢進は、腸上皮細胞に発現している PAR-2 を過剰に活性化し、フラクタルカインを含む炎症性メディエーターの産生を介して腸炎を誘導している可能性が推測される。以上のような本研究によって示唆された病態を総合すると、セリンプロテアーゼインヒビターを用いた PAR-2 活性化の阻害は、イヌ IBD に対する新しい治療戦略になりうるものと考えられた。

現在、セリンプロテアーゼインヒビターの経口薬であるメシル酸カモスタットのイヌ IBD における治験が進行中である。本論文執筆段階において、5 頭の IBD 症例にメシル酸カモスタットによる単独治療を行ったところ、1 頭で完全寛解、2 頭で部分寛解が得られている。現時点では、メシル酸カモスタットによる重大な副作用は認められていない。まだ臨床応用に関しては予備的な段階ではあるが、セリンプロテアーゼインヒビターを用いたプロテアーゼ・PAR-2 経路の阻害はイヌ IBD に対する効果的な治療法となる可能性がある。

本論文における一連の研究は、臨床的に重要なイヌ IBD の病態を解明するための重要な知見を提供するものであり、新規治療法の確立につながるものと考えられる。