

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	稲 場 勇 平
学 位 論 文 題 目 IL-10 欠損マウス実験腸炎における小腸パネート細胞 α-defensin 産生低下 未公表 研 究 目 的 炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) の病因として、最近の研究から、腸管上皮細胞や免疫担当細胞には、NOD2 など外部からの異物、特に細菌性抗原を処理する重要な遺伝子が存在し、その遺伝子異常の結果生じる炎症であるとする説が有力視されている[1]。IBD の成因を明らかにするには、ヒトのそれに類似した症状を示すモデル動物を利用することが欠かせないが、これまでに報告されてきた遺伝子改変マウス(IL-2 欠損マウス,IL-10 欠損マウス,TCRa 鎖欠損マウス)では、腸管内の微生物性抗原存在下に長期間持続する炎症を自然発症することが報告され、無菌飼育下では炎症が発症しない。これまでは、これらの動物モデルにおける炎症発症機序として、獲得免疫システムの異常が主に論じられてきた。すなわち、ヒトやマウスの正常腸管内に備わっている免疫寛容機構が破綻した結果、腸管炎症を発症すると考えられてきた。その結果、炎症腸管では破綻した粘膜から腸内細菌が侵入し、菌体成分による刺激が炎症性サイトカインの過剰産生を生じ、抗原提示細胞が慢性的に活性化されているとされ、特にヒトのクローン病では CD4 陽性 T リンパ球の IFN γ や IL-12 などのいわゆる Th1 型サイトカイン産生が優位となっていることが知られている。			

IL-10欠損 (KO) マウスは、自然環境の飼育で容易に全腸炎をきたすIBDモデルで、腸炎発症の一因としてTh1型サイトカイン産生を抑制する作用を持つIL-10の欠損により、Th1型サイトカイン産生T細胞の過剰反応を引き起こし、腸内細菌に対する免疫寛容誘導が不十分となることが原因と考えられている。この点でIL-10欠損マウスの腸炎はヒトクローン病との類似性が指摘されている。

一方、腸管や皮膚など外界と接する生体バリアー領域においては、非特異的に細菌、真菌、ウイルスなどの病原微生物を不活化する自然免疫機構の存在とその役割の重要性も認識されてきた。この自然免疫機構の主体をなすものの一つは、抗菌活性を有するペプチド型の分子であり、腸管においては、小腸パネート細胞より分泌される α -defensinが自然免疫機構の主役のひとつである[2]。野観点からIBDにおいても自然免疫機構の破綻がその病因に関与する可能性が示唆され、筆者らのグループはクローン病の腸管においてはパネート細胞からの抗菌活性物質の分泌が低下していることを明らかにしてきた[3]。しかし、これまで前述の動物モデルにおける自然免疫機構の解析をおこなった報告はなかった。そこで本研究においては、IL-10 KOマウスの腸炎モデルを用い、小腸パネート細胞からの α -defensin発現量の解析をおこなった。その結果、IL-10 KOマウスでは、明らかな腸管炎症が組織学的に顕在化する以前より α -defensin産生が低下していることが明らかとなり、これまで報告されてきたTh1有意のサイトカイン産生過剰に加えて、腸炎の発症に自然免疫の異常が早期から関与していることを実験的に明らかにした。

材 料 ・ 方 法

1)動物と組織

マウスは5週齢～15週齢までの野生型 C57BL/6J(WT)および C57BL/6J-Il10tm1Cgn(IL-10KO)を用いた。germ free 環境で飼育されたこれらのマウスは到着後より通常飼育条件下(ノーマルコロニー)での飼育をおこなった。WT,KO マウスともに5週齢から15週齢まで2週間毎に屠殺し、体重、大腸長(盲腸-肛門)、大腸重量、小腸長(十二指腸-回腸末端)について計測を行った後、組織学的検索に供した。

2)小腸陰窩の採取

WT、KOマウスのそれぞれの週齢において小腸組織を採取し、EDTA添加 Ca^{2+} - MG^{2+} -free PBS内で振動させることにより小腸陰窩の分離を行った。陰窩に富む分画を遠心処理し、上清を除き-30℃で保存した。

3) α -defensin mRNA発現量の定量RT-PCRによる解析

それぞれの週齢マウスの凍結した小腸陰窩よりRNAを抽出した。1 μ gのRNAを鋳型とし、逆転写反応を行いcDNAを作成した。マウスの α -defensin である Cryptdin-1、-4、-5、および GAPDH につい

て、PCR 反応を行い発現量を定量した。

4) α -defensin 蛋白発現量の解析

6. 小腸陰窩の蛋白分画は、30%酢酸を用いて抽出し-30℃で保存した。defensin分画は、抽出した蛋白を12.5% acid/urea-polyacrylamide gelで電気泳動を行い(AU-PAGE)、Coomassie Blue染色後蛋白量の比較を行った。また、小腸陰窩から抽出した蛋白をPolyacrylamid GELで分離した後、ラビット抗Cryptdin-1抗血清とHRP標識抗ラビットIgG抗体を用いたWestern blotでCryptdin-1蛋白量を比較した。

成 績

1. IL-10KOマウスの体重および臓器重量

WT、KOマウスそれぞれを5週齢から15週齢まで2週間毎にマウスの体重、大腸長および大腸重量、小腸長の計測を行った。その結果、体重はWT群と比較しKO群で9週および11週で有意に低かったが、15週齢では同体重となっており、明らかな腸管炎症に基づく栄養障害、羸瘦は認められなかった。マウスの大腸組織重量は、13週齢よりKO群で増加傾向を認め、15週齢時にはWT群と比較し有意差な増加を認めた。

2. 腸管の病理組織学的炎症所見の推移

WT、KOマウスの5週齢から15週齢まで、小腸、遠位大腸組織の腸管炎症を病理学的に検討した。5週齢のマウスでは、WT、KOのいずれも遠位大腸には殆ど炎症性変化を認めなかった。15週齢のKOマウス遠位大腸では、粘膜固有層、粘膜下層への炎症性細胞浸潤と、粘膜の杯細胞の減少、腺管構造の乱れ、粘膜上層の上皮細胞過形成を認めた。小腸組織でも同様に、5週齢では炎症所見は両群とも認められないが、15週齢のKOマウス小腸では、絨毛の肥厚化と粘膜固有層、粘膜下層の炎症細胞浸潤が認められた。炎症の程度についてはHistological scoreを使用して数値化し経時的に評価した。遠位大腸はKO群において5週齢よりスコア値が平均1点と軽度の炎症を認めており、13週齢より平均2点以上となり炎症所見が明らかになる傾向がみられた。小腸組織では7週齢より軽度の炎症所見が出現し11週齢より炎症所見が顕著になる傾向を認めた。

3. α -defensin mRNA発現量の解析

WT、KOマウスの5週齢、7週齢、11週齢、15週齢における α -defensin (Cryptdin-1,-4,-5)mRNAの発現について定量-RTPCRを用いて検討を行った。Cryptdin-1, Cryptdin-4, Cryptdin-5の発現量は、WT,KOのいずれの群も週齢を経るに従い低下し、11週目以降はほぼ一定となった。KO群はWT群に比較し7週目以降の各週齢でいずれの α -defensin mRNAも発現量が低値を示した。

4. α -defensin蛋白発現量の解析

小腸陰窩より蛋白を抽出し、7週齢のWT、KOマウスの α -defensin蛋白発現量を解析した。AU-PAGE

法では、WTマウスに比較しKOマウス小腸蛋白に含まれる α -defensinは、蛋白発現量が低下していることが示された。またSDS-PAGE-Western blot解析では、WTマウスに比較しKOマウス小腸蛋白を材料とした場合にCrptdin-1の発現量が低下していた。

考 案

本研究の結果、IL-10KOマウスでは、生後比較的早い時期から遠位大腸にわずかな炎症を発症し、生後7週頃ノーマルコロニー条件下では小腸にも組織学的炎症所見が見いだせるようになり、生後10週以降、すなわちノーマルコロニー条件下飼育後5週以降においてその炎症が強くなることが明らかとなった。このモデルの報告者によれば、脱肛や体重減少を伴う強い炎症は、生後15週以降に発生するとされ、我々の施設でも生後17週以降のKOマウスで同様の所見が観察されている。従って本研究で用いた週齢の動物は、症状を伴う腸管病変形成前の発症初期と考えることができる。この時期のIL-10KOマウスにおいて、小腸Paneth細胞で産生・分泌される α -defensinのmRNA,蛋白の発現が低下していることが明らかとなった。この結果は、 α -defensinの発現量低下が、小腸・大腸における炎症の発生に関与するか、組織学的炎症所見の発現前に現れる最初の変化である可能性を示唆しており、自然免疫系の機能低下が炎症性腸疾患の発症原因と密接な関係があることを示すひとつの根拠となると考えられる。

Paneth細胞の細胞質顆粒に含まれる内因性抗菌ペプチドである α -defensinは腸管感染症の防御因子として極めて重要であるとされている。ヒトの炎症性腸疾患においても、筆者らの施設の前本らは、クローン病患者の単離小腸陰窩から分泌される抗菌活性が減弱していること、 α -defensin (HD-5) mRNA発現の低下した陰窩が認められることを見出し、炎症性腸疾患に対する α -defensin 分泌低下の関与を報告しているように、 α -defensinを主体とする自然免疫機構が破綻していることが推察されている[3]。

本研究では、T細胞産生性サイトカインの異常がヒトのクローン病と類似しているとされるIL-10KOマウスにおいて、ヒトクローン病の場合と同様に α -defensinの発現の低下が認められた。しかし、組織学的検索ではPaneth細胞数や形態異常は認められなかった。この結果は、IL-10の欠損がPaneth細胞における α -defensinの産生を直接低下させている可能性、あるいはIL-10の欠損によってもたらされた、ヒトのクローン病と同様のTh1型サイトカインの相対的増加が α -defensinの産生に影響を与えた可能性の両者が原因として考えられる。生後5週齢のKOマウスにおける検討で、Crptdine1,4,5mRNAの発現はいずれもWTマウスよりも低値を示しているがその差は統計学的に有意ではなかった。この結果は、むしろIL-10の欠損そのものではなく、炎症発生に先立って生じるサイトカインのバランスの異常がPaneth細胞の α -defensin産生に影響している可能性を示唆していると考えられる。

結 論

1)IL-10 KOマウスを生後5週齢より通常環境で飼育すると、この時期より遠位大腸にわずかに認められる炎症性変化は生後12週齢より悪化し、小腸は生後7週齢より炎症所見が出現し始め11週より顕著になる経過をとった。

2)IL-10KOマウス小腸の α -defensinであるCryptdin-1, Cryptdin-4, Cryptdin-5のmRNA発現量は、炎症が顕在化する前の生後7週目より野生型マウスに比較していずれの発現量も低値を示し、以降の各週齢も同様であった。

3)IL-10KOマウス小腸の α -defensin蛋白発現量も、AU-PAGE, Western blot解析で野生型マウスに比較して低値を示した。

これらの結果から、ヒトのクローン病と同様にTh1型優位のサイトカイン環境となっていることが知られているIL-10KOマウスでは、腸炎発症の初期に、小腸Paneth細胞からの α -defensin産生が低下していることが明らかとなった。

引用文献

- [1] Korzenik JR, Podolsky DK. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; **5(3)**: 197–209.
- [2] Ayabe T, et al. Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nature Immunol* 1: 113–8, 2000.
- [3] 前本篤男. クロウン病における小腸パネート細胞の自然免疫機能解析. 北海道医学雑誌 2004; **79(2)**: 129–36.

参考文献

- [1] Jiro Watari, Yusuke Saitoh, Mikihiro Fujiya, Naomi Shibata, Hiroki Tanabe, Yuhei Inaba, Kotaro Okamoto, Atsuo Maemoto, Tomoyuki Ohta, Atsumi Yasuda, Tokiyoshi Ayabe, Toshifumi Ashida, Kinichi Yokota, Takeshi Obara, and Yutaka Kohgo. Reduction of syndecan-1 expression in differentiated type early gastric cancer and background mucosa with gastric cellular phenotype. *J Gastroenterol.* 39: 104–112, 2004.
- [2] Jiro Watari, Yusuke Saitoh, Mikihiro Fujiya, Nakamura Kazumasa, Yuhei Inaba, Kotaro Okamoto, Hiroki Tanabe, Atsumi Yasuda, Naoyuki Miyokawa, and Yutaka Kohgo. Spontaneous remission of primary diffuse large B-cell gastric lymphoma. *J Gastroenterol.* 40: 414–420, 2005.

学位論文の審査結果の要旨

報 告 番 号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	稲 場 勇 平
<u>審査委員長</u> 立 野 正 敏 ㊞ <u>審査委員</u> 高 後 裕 ㊞ <u>審査委員</u> 若 宮 伸 隆 ㊞			
学 位 論 文 題 目			
IL-10 欠損マウス実験腸炎における小腸パネート細胞の α -defensin 産生低下			
クローン病と潰瘍性大腸炎は、原因不明の非特異的炎症性腸疾患であり、若年者から発症し繰り返す難治性の炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease; IBD)であり、患者の QOL の問題から病因解明・治療法の開発が急務と考えられる。IBD の成因を明らかにするため、免疫関連因子欠損マウスを用いたヒト IBD 類似の症状を示す動物モデルの作成が試みられている。その中で IL-10 欠損マウスは自然環境での飼育で容易に全腸炎を発症し、その原因として IL-10 欠損による Th1 型サイトカインが優位に産生され腸内細菌に対する免疫寛容誘導が不十分となるため IBD 様の病態を発症すると考えられている。 論文提出者である稲場氏は、本 IL-10 欠損マウスを用いて初期 IBD モデルマウスを作成し、小腸パネート細胞由来の α-defensin を基盤にその病態を解析しようとした。 実験結果として IL-10 欠損マウスでは腸管炎症が生じる非常に早期の段階においても、α-defensin の産生が低下していることを RTPCR 法あるいは Western-Blotting 法を用いて明らかにした。また、研究の過程でマウスの発育過程において、加齢とともに α-defensin の産生低下が起こることを見出し、マウスの成長と抗原に対する腸管の免疫寛容に対する新しい知見を発見した。			

これらの研究成果は IL-10 などのサイトカインにおけるノックアウトマウスで初期 IBD モデルマウスが作成できることを分子基盤で証明し、さらに α -defensin 分泌低下と並行した Th1 型優位型サイトカイン環境の成立が難治性腸炎症性疾患の進展に関わることを提唱した非常に貴重な知見であり、本研究分野の研究発展に寄与するものであると考えられる。

また、諮問審査においても非常に適切で論理的な回答がなされ、関連する分野においても十分な知識を有していることを確認した。

以上の結果から、申請者の論文が医学博士の学位に値するものと判定した。