

論文の内容の要旨

氏名：岡 西 広 樹

博士の専攻分野の名称：博士(獣医学)

論文題名：犬の慢性腸症における NF-kappa B 活性と発現遺伝子に関する研究

犬の慢性腸症(CE)は、慢性の消化器症状と消化管の炎症細胞の浸潤を特徴とする原因不明の疾患である。CE は、治療反応により3つに分類され、炎症性腸疾患(IBD)もその1つであり、病理学的にリンパ球形質細胞性腸炎(LPE)と診断されることが多い。症例によっては、難治性の慢性の消化器症状を呈し、衰弱死する例も少なくない。CE の病因は特定されていないが、遺伝的素因と関連した免疫の異常によって、腸内細菌や食事抗原に対して不適切な反応が引き起こされ発症に至ると考えられている。

核内因子 κ B (NF-kappa B) は、炎症性サイトカイン、ケモカイン、また炎症部位への接着に関わる細胞接着分子やセレクチンなどの最も重要な核内転写因子の一つであり、自然免疫機構の中心的な役割を担う。人の IBD であるクローン病や潰瘍性大腸炎では、以前から獲得免疫の異常に注目が集められていたが、近年、NF-kappa B を中心とした自然免疫の異常の可能性が示唆されてきている。しかしながら、犬の CE の病態機構の研究では、ジャーマンシェパードなどの Toll 様受容体 (TLR) の発現検討に関する報告はあるが、自然免疫における異常についての検討は、ほとんどなされていない。

本研究では、犬の CE の病態解明を目的とし、CE の疫学調査ならびに難治性の IBD を呈する柴犬の臨床的特徴と予後不良因子の検討、さらに、慢性炎症を伴う消化管における NF-kappa B の活性ならびにその関連分子について、分子生物学的手法を用いて検討した。

1. 犬の CE の疫学調査ならびに柴犬の IBD における臨床的特徴と予後不良因子の検討

CE を呈する症例は数多いものの、わが国では今まで大規模な臨床データの検討がほとんどなされていない。したがって、本研究では CE の症例の現状と実態の把握を目的として疫学調査を行った。対象は、2007年から2009年まで日本大学動物病院に来院した犬 2330 頭に対する CE の症例の割合と犬種、年齢、性別について調査した。来院した犬 2330 例中、86 例が CE と診断され、そのうち柴犬、ジャーマンシェパードが他の犬種と比較して有意に発症頻度が高いことがわかった。性別は、オス 51 頭、メス 35 頭とオスが若干多い傾向があった。年齢は平均で約 6 歳という結果だった。

柴犬は、一般にアトピー性皮膚炎のような自己免疫性疾患になりやすく、IBD の柴犬も食餌や細菌に対するアレルギー反応が起きていることが予想される。さらに柴犬は、他の犬種に比べ治療に対する反応が悪く、6 ヶ月生存率が約 50 %と報告されており、これ程までに予後の悪い IBD の犬種の報告はない。しかしながら、柴犬の中にも比較的長期生存するものも存在する。したがって、柴犬の短期生存群と長期生存群の違いにおいて臨床的、血液学的な特徴、病理、治療反応、予後を比較検討し、予後不良の予測因子の解析をした。

対象は、3 週間以上の慢性消化器症状を呈する柴犬 25 頭で、短期生存(Ss)群(生存期間 6 ヶ月以下)は 16 頭、長期生存(Ls)群(生存期間 6 ヶ月以上)は 9 頭であった。全ての症例がリンパ球形質細胞性十二指腸炎を伴う IBD と診断された。年齢の中央値は Ss 群で 7.5 歳、Ls 群で 5 歳と Ss 群が有意に高かった。年齢において最も良いカットオフ値は 7 歳で、感度 0.7、特異度 0.78、曲線下面積(AUC)は、0.81 であった。臨床症状の重症度スコア(CIBDAI)の中央値は Ss 群で 12、Ls 群で 7 と Ss 群が有意に高かった。CIBDAI において最も良いカットオフ値は 9 で、感度 0.88、特異度 0.68、曲線下面積(AUC)は、0.75 であった。したが

って高齢(> 7 歳)の症例、CIBDAI(> 9 point)の症例では、短期間で死亡するリスクが高く予後に注意が必要であることが示唆された。病理の重症度スコアでは重度の腸炎は、Ss 群で 14/16 (87.5%)、Ls 群で 6/9 (66.6%)であり予後不良予測因子として十二指腸の病理の重症度は、使用するには難しかった。25 頭中 21 頭で初期治療に反応した。しかしながら初期治療に反応をした症例のうち、治療に反応していた日数の中央値は、有意に Ss 群が短かった(Ss:42.5 日(20-91 日) Ls:285 日(196-1026 日))。したがって初期治療の反応日数が短い(約 3 ヶ月)症例は、早期に死亡する可能性があることが示唆された。初期治療の反応が悪くなってから死亡するまでの日数の中央値は、有意に Ss 群で短かった(Ss:19.5 日 Ls:151 日)。死亡率は、全症例の 84%(21/25)で、Ss 群で 100%、Ls 群の 55.5%であった。また 6 ヶ月と 1 年生存率にあまり差は認められず、このことを考慮すると 6 ヶ月生存する症例は、1 年以上生存する可能性があることが示唆された。しかしながら長期生存群の約半数が、最終的に腸炎により死亡していることを考えると長期間の経過観察が重要であることが明らかとなった。

2. リンパ球形質細胞性結腸炎(LPC)の犬におけるNF-kappa B活性とNOD2の発現の検討

NF-kappa B は、炎症性サイトカインなどの最も重要な核内制御因子の一つであり、自然免疫機構の中心的な役割を担う。Nucleotide oligomerization domain two (NOD2)も自然免疫において重要である。NOD2 は、病原体関連分子パターンを認識する TLR と同じパターン認識受容体の一つで、単核球、マクロファージ、樹状細胞、上皮細胞、パネート細胞などに発現する。また、NOD2 を介し NF-kappa B を活性化することで細菌からの防御反応を担っている。人の IBD では、この NOD2 と NF-kappa B が結腸において活性化しているとの報告がある。しかしながら、犬においては、これらの細胞内伝達分子についての研究は少ない。したがって、本研究では、NOD2 mRNA と NF-kappaB が LPC の犬の結腸粘膜で健常犬より発現亢進している可能性を検討した。

対象は、LPC の犬 19 頭とコントロール群として健常犬 5 頭から下部消化管内視鏡検査により採材した結腸組織を用いた。組織の NF-kappa B 活性は、Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)により解析し、NOD2 mRNA は、半定量的 RT-PCR により解析した。NF-kappa B の活性は、LPC 群においてコントロール群に比べ有意に上昇していた。また NOD2 mRNA は、LPC 群においてコントロール群に比べ有意に上昇していた。以上の結果から、LPC の犬では、消化管において食餌抗原や腸内細菌に対し NOD2 を介し過剰に反応しその結果 NF-kappa B の活性化が起こり炎症性サイトカインやケモカインの発現を誘導している可能性があると考えられた。また、NF-kappa B がさらなる NOD2 の発現を誘導するという正のフィードバックが確立され、慢性炎症の病態構築に寄与している可能性が示唆された。

3. LPE の犬におけるセレクトインファミリーと P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1)の発現の検討

セレクトインは、消化管の炎症動態において中心的な役割を担っており、白血球の循環血液から血管内皮へのローリングに関わっている。セレクトインファミリーとこれらのリガンドである PSGL-1 が、犬の LPE の病態に関与している可能性を考え、セレクトインファミリー(E-, L-, P-セレクトイン) mRNA とセレクトインリガンド PSGL-1 の mRNA の発現を検討した。

対象は、LPE の犬 21 頭、コントロール群として健常犬 10 頭から上部消化管内視鏡検査により採材した十二指腸組織を用い、リアルタイム RT-PCR により mRNA の発現量を定量した。また、セレクトイン、PSGL-1 の相関は、スピアマンの順位相関係数にて解析した。

E セレクトイン、P セレクトイン、PSGL-1 mRNA は健常犬に比べ、LPE 犬で有意に増加していた。しかしながら L セレクトインにおいては、健常犬と有意な差はなかった。相関関係においては、E セレクトインと L セレクトイン、また P セレクトインと L セレクトインで正の相関関係が認められた。しかしながら、それぞれのセレクトインと PSGL-1 の間には相関関係は認められなかった。

したがって、これらの結果から、セレクトインやそのリガンドは、犬のLPEの炎症細胞の集積に寄与している可能性が示唆された。

4. LPEの犬におけるNF-kappa B活性と免疫グロブリンスーパーファミリーの検討

炎症細胞の血管内皮へのローリングに関わる免疫グロブリンスーパーファミリーである細胞接着分子(CAMs)の発現もまたNOD2と同様に、NF-kappa Bによって制御されていることが知られている。CAMsは、白血球のホーミングと遊走性に重要な役割を果たし、セレクトインと同様に細胞接着に関わる。本研究では、犬のLPEの腸粘膜においてNF-kappa Bの活性化の程度とそれに関わる炎症性サイトカイン(TNF α 、IL-1 β)、NOD2、CAMsのmRNAの発現を検討した。

対象は、LPEの犬21頭、コントロール群として健常犬8頭から上部消化管内視鏡検査により採材した十二指腸組織を用いた。組織のNF-kappa B活性は、EMSAにより解析し、NOD2、TNF α 、IL-1 β 、CAMs(ICAM-1、VCAM-1、MAdCAM-1)mRNAは、リアルタイムRT-PCRにより解析した。

NF-kappa Bの活性は、LPE群においてコントロール群に比べ有意に上昇していた。しかしTNF α 、IL1 β 、NOD2 mRNAは、LPE群とcontrol群の間に有意な差はなかった。一方、ICAM-1 mRNAは、LPE群においてコントロール群に比べ有意に上昇していた。また、MAdCAM-1 mRNAは、LPE群においてコントロール群に比べ有意に上昇していたが、VCAM-1 mRNAは、LPE群においてコントロール群に比べ有意に低下していた。これらの結果はNF-kappa Bと接着分子がLPEの病態に重要な役割を果たしていることを示唆している。

本研究では、CEの疫学調査により、好発犬種の特定に至った。またその好発犬種の一つである柴犬において、短期生存群と長期生存群のそれぞれの臨床的、血液学的な特徴、病理、治療反応、予後についての違いを示し、その予後不良の予測因子を明らかにした。また犬のLPCにおいて、NOD2の発現亢進とそのシグナル伝達経路の下流にあるNF-kappa Bにおける活性を明らかにすることができた。一方、LPEにおいては、NF-kappa Bの活性とともに細胞接着分子の発現亢進を明らかにした。さらに、セレクトインファミリー、セレクトインリガンドの発現も犬のLPEでは亢進していることを明らかにした。

本研究により、NF-kappa Bを中心とした病態機構を明らかにしたことは、今後、犬におけるCEの病態解明に向けた研究の発展に貢献することが期待される。