HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	A study on the colorectal mucosal immunopathology of inflammatory colorectal polyps in dogs : analyses of innate immunity and epithelial barrier [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	横山, 望
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12815号
Issue Date	2017-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66523
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Nozomu_Yokoyama_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：横　山　　望

審査委員	主査　教　授	滝　口　満　喜
	副査　教　授	大　橋　和　彦
	副査　代表取締役	賀　川　由美子
	副査　講　師	大　田　　寛

学位論文題名

A study on the colorectal mucosal immunopathology of inflammatory colorectal polyps in dogs — analyses of innate immunity and epithelial barrier
（炎症性結直腸ポリープの犬における結直腸粘膜の免疫病態に関する研究 ― 自然免疫と上皮バリアの解析）

炎症性結直腸ポリープ（Inflammatory colorectal polyps, ICRP）は、国内のミニチュア・ダックスフンドに好発する大腸の炎症性ポリープ病変である。ICRP は肉眼的に結腸から直腸領域に多発性に形成され、病理組織学的には好中球、マクロファージを主体とした炎症細胞の浸潤を特徴とする。いまだその発症原因は不明であるが、病理組織学的特徴や好発犬種の存在、また免疫抑制剤に対して良好な治療反応性を示すことから、近年、新たな型の犬種特異的な炎症性腸疾患（Inflammatory bowel disease, IBD）として認識されつつある。

ヒトや犬の IBD の発症仮説では、腸内細菌叢とそれを認識する宿主の粘膜免疫との過剰な相互作用が病因として考えられている。粘膜免疫の中でも自然免疫系の異常は、IBD 発症初期に腸管の過剰な炎症を誘導し、さらに慢性化と増悪にも関与すると考えられている。腸管の自然免疫系は、好中球、マクロファージといった免疫細胞と腸管上皮など腸管粘膜を構成する非免疫細胞によって構成されており、とりわけ腸管上皮は腸管の物理的なバリアとしての役割のみならず、消化管内の病原体を認識し、腸管に適切な免疫反応を誘導する役割を担っている。これら腸管上皮の機能異常は、消化管内抗原の体内への侵入や消化管の異常な抗原認識を引き起こし、腸管に過剰な慢性炎症を引き起こすと考えられている。

そこで本研究では、ICRP の病態における粘膜免疫の役割を明らかにすることを目的に、細菌抗原の認識を担う受容体である Toll-like receptor (TLR)と上皮バリアを構成する Apical junction complex (AJC)の発現および局在解析を行った。さらに

TLR については､細菌抗原のリガンド刺激による炎症性サイトカイン合成能を測定し、機能解析を行った。

第 1 章では、*in situ* hybridization 法により *TLR2* と *TLR4* の局在解析を行い、加えてポリープ病変内の上皮細胞における発現量を定量した。その結果、*TLR2* と *TLR4* は、ポリープ病変部内の結腸上皮、炎症細胞、線維芽細胞に発現が認められた。特にポリープ病変部の結腸上皮では、健常犬と比較して、*TLR2* と *TLR4* の mRNA 発現量の増加が認められ、ICRP の病態への関与が示唆された。

続いて第 2 章では、ICRP 症例の正常結直腸粘膜を用いて TLR のリガンド刺激試験を行い､TLR の機能の一つである炎症性サイトカインの発現誘導について解析した。ICRP 症例の肉眼的に正常な結直腸粘膜を内視鏡下で採取し、各種 TLR リガンド（TLR1/2, TLR4, TLR5, TLR9）を培養液に添加して、37℃、4 時間培養した。また対照群として、健常犬の結直腸粘膜を用いて、同様の処置を行った。培養した組織から cDNA を合成し、定量的リアルタイム PCR により炎症性サイトカイン(*IL-1β*, *IL-6*, *IL-8*, *TNF-α*)の mRNA 発現量を定量した。各リガンド刺激後の mRNA 発現量は、培養液のみで培養したサンプルの発現量に対する相対値として算出した。その結果、培養 4 時間後の ICRP 結直腸粘膜では、TLR4 刺激下における *IL-6* と *TNF-α*、TLR9 刺激下における *IL-8* の発現比が、健常群と比較して有意に上昇していた。以上の結果から、ICRP 症例のポリープ病変部境界の結直腸粘膜では、TLR4 ならびに TLR9 のリガンド刺激によって、炎症性サイトカインの発現誘導が生じやすい可能性が示唆された。

第 3 章では、AJC を構成する Tight junction (TJ)と Apical junction (AJ)の発現および局在解析を行った。ICRP 症例犬の病変部ならびに肉眼的に正常な下行結腸粘膜を内視鏡下で採取し、対照として健常犬下行結腸粘膜を用いた。採取した組織から蛋白質を抽出し、イムノブロット法にて claudin-1、-2、-3、-4、-5、-7、-8、E-cadherin、および β-catenin の発現解析を行った。またイムノブロット法によって発現を認めた蛋白質について酵素抗体法により局在解析を行った。その結果、ICRP 症例犬と健常犬において､いずれの TJ と AJ も発現および局在に変化は認められなかった。

本研究の結果から､ICRP 症例の結直腸粘膜の TLR は発現､機能ともに変化が認められ、結直腸の過剰な炎症誘導への関与が示唆された。その一方で、AJC の蛋白発現には変化が認められず、病態への関与は示唆されなかった。

よって，審査委員一同は，上記学位論文提出者横山　望氏の学位論文は，北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。