



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the molecular pathogenesis and the novel disease-associated genes in dogs with inflammatory colorectal polyps [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	永田, 矩之
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第7164号
Issue Date	2022-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87239
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	NAGATA_Noriyuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：永田 矩之

学位論文題名

Studies on the Molecular Pathogenesis and the Novel Disease-Associated Genes in Dogs with Inflammatory Colorectal Polyps

(犬の炎症性結直腸ポリープの分子病態および新規疾患関連遺伝子に関する研究)

犬の炎症性結直腸ポリープ（Inflammatory colorectal polyp, ICRP）は、下行結腸から直腸の粘膜における原因不明の多発性あるいは孤立性の炎症性ポリープ形成を特徴とする疾患である。免疫抑制療法が有効であることから免疫異常が病態に関与していることが示唆されており、犬の炎症性腸疾患（Inflammatory bowel disease, IBD）の一つと考えられている。

ICRP の病理組織学的な特徴として、過剰な粘液を伴う杯細胞の過形成が知られている。粘液の主成分であるムチンの発現様式は臓器によって異なり、大腸粘膜では MUC2 が主に分泌されている。ヒト医療における IBD の一つである潰瘍性大腸炎の患者では、病変部において MUC2 遺伝子発現が上昇する可能性が示されている。また、MUC2 と同じ分泌型ムチンの一種である MUC5AC の遺伝子発現の上昇も報告されている。一方、杯細胞は潰瘍性大腸炎で減少することがわかっており、特に陰窩の上部領域において杯細胞が減少する。ICRP におけるムチンの発現パターンは報告されておらず、杯細胞の分布に関する詳細な評価もなされていない。

ICRP のもう一つの病理組織学的な特徴として、炎症細胞の浸潤、特に好中球とマクロファージの浸潤が挙げられる。炎症細胞の病変部への遊走および細胞外マトリックス（Extracellular matrix, ECM）の分解においては、プロテアーゼが重要な役割を担っている。ヒト IBD の病変部において、ゼラチナーゼ（MMP-2 および MMP-9）の活性が上昇していることが報告されている。慢性腸症の犬の腸粘膜においても MMP-2 や MMP-9 活性の上昇が報告されているが、ICRP の犬における MMP 活性についてはこれまでに検討されていない。

ICRP の最も重要な特徴の一つが、明らかな犬種特異性である。ミニチュア・ダックスフンド（Miniature Dachshund, MD）が発症例の 80%以上を占め、本疾患の病態における遺伝的素因の関与が強く疑われている。しかし、疾患発症と関連する遺伝子は明らかになっていない。

ICRP の病態に関する過去の研究では、病変部における炎症性サイトカインの発現解析、自然免疫と上皮バリアの解析および腸内細菌叢の解析が行われてきた。しかし、ICRP の病態については依然として不明な点が多い。そこで本研究では、ICRP に特徴的な病理組織学的所見に注目した分子病態の検討および新規疾患関連遺伝子の探索を行った。

第 1 章では、ICRP の病理組織学的特徴の一つである杯細胞の過形成と粘液の過剰に注目し、ムチン遺伝子の発現解析と杯細胞の分布について検討した。ICRP の病変部において、MUC2 遺伝子の発現の上昇は認められなかった。一方、病変部においては MUC5AC 遺伝子の発現が上昇していた。杯細胞の分布に関して、陰窩上部領域の杯細胞には変化が認められなかつ

たが、陰窩下部領域の杯細胞は ICRP 病変部において減少していた。以上の結果から、*MUC5AC* 遺伝子発現の上昇と陰窩下部領域における杯細胞の減少は、ICRP の病態と関連している可能性が考えられた。

第 2 章では、ICRP の病理組織学所見におけるもう一つの特徴である好中球やマクロファージの浸潤に注目し、炎症細胞の遊走と ECM の分解に重要な役割を担う MMP-2、MMP-9 およびセリンプロテアーゼの活性について検討した。ICRP の病変部では、MMP-2、proMMP-9、MMP-9、およびセリンプロテアーゼの活性が上昇していた。これらの結果から、ICRP の病変部においてはゼラチナーゼ活性とセリンプロテアーゼ活性が上昇しており、これらの酵素による炎症細胞の遊走や ECM の分解が本疾患の病態に関与していることが示唆された。

過去の研究において、ICRP の犬では炎症性サイトカイン、自然免疫と上皮バリアに関わる因子、および腸内細菌叢が変化していることが明らかになってきた。また、本研究の第 1 章および第 2 章の結果から、ムチン遺伝子や杯細胞の変化に加え、炎症細胞の遊走や ECM の分解に関わるゼラチナーゼやセリンプロテアーゼの上昇が確認された。しかし、これらの変化は炎症によっても生じるため、ICRP の発症と関連しているかどうかを結論づけることはできない。そこで第 3 章では、ICRP の直接的な原因となる因子について解析することを目的とし、新規疾患関連遺伝子を網羅的に探索した。MD とビーグル各 2 頭において全エクソームシーケンスを実施した結果、MD のみに存在する 31 個のミスセンスバリエーションが 25 遺伝子にみつかった。このうち、*PLG*、*TCOF1*、*TG*、*COL9A2*、および *COL4A4* 遺伝子のバリエーションは様々な 10 犬種においても存在せず、MD に特異性が高いバリエーションと考えられた。セリンプロテアーゼの一種であるプラスミンの酵素前駆体、プラスミノゲンコードする *PLG* 遺伝子のバリエーション (c.478A>T) に注目し、バリエーション頻度を ICRP に罹患した MD (ICRP-MD) とコントロールの MD において比較した。その結果、*PLG* 遺伝子のバリエーション頻度は ICRP-MD で有意に高かった。T/T のリスクアレルを持つ ICRP-MD は、リスクアレルを持たない ICRP-MD と比較して、病変部におけるプラスミノゲン発現およびプラスミン活性が低かった。血清中のプラスミノゲン発現およびプラスミン活性に差はみられなかった。さらに、MMP-9 は *in vitro* でリスクアレルを持つプラスミノゲンの減少を引き起こした。以上の結果から、リスクアレルが引き起こすアミノ酸置換は、ICRP 病変部におけるプラスミノゲン分子の安定性を低下させ、病変局所における MMP-9 活性がプラスミノゲンを分解することで、ICRP の発症と関連する可能性が示された。

本研究の成果により、ICRP 病変部においてムチン遺伝子の発現量、杯細胞の分布、および MMP 活性が変化することが明らかとなった。網羅的な新規疾患関連遺伝子探索の結果、本疾患の発症と関連する MD に特異的なバリエーションがみつかった。このバリエーションは *PLG* 遺伝子上に存在し、プラスミノゲン分子の安定性を低下させることで ICRP の発症と関連することが示唆された。安定性の低下したプラスミノゲンの分解には MMP-9 が関与している可能性が示された。