



Role of Eosinophils in a Murine Model of Inflammatory Bowel Disease

Wang, Zi

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2019-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7546号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007546>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Role of Eosinophils in a Murine Model of Inflammatory Bowel Disease

炎症性腸疾患マウスモデルにおける好酸球の役割

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
内科学講座消化器内科学
(指導教員：児玉 裕三 教授)
王 梓

炎症性腸疾患の一つである潰瘍性大腸炎は、再燃と寛解を繰り返す慢性の大腸炎を呈する疾患であり、原因は未だ不明である。日本を含むアジア諸国での患者数は増加傾向を認め、新規治療の開発が盛んに行われているが、根本的な疾患の克服を目指すためにも、疾患発生のメカニズムの解明は急務である。

好酸球は、定常状態の大腸にも散見される白血球であるが、好酸球顆粒タンパク質が炎症性腸疾患患者の腸管組織や便中に増加しているとの報告がなされている。更に、もう一つの炎症性腸疾患であるクローン病がIFN- γ を主としたヘルパーT細胞タイプ1のサイトカインが上昇しているのに対し、潰瘍性大腸炎患者ではIL-4、IL-5やIL-13などタイプ2サイトカインが優位に上昇することが過去に複数の論文で報告されている。好酸球もタイプ2サイトカインを分泌することが知られているが、潰瘍性大腸炎における好酸球の役割については、詳細な検討がなされていない。そこで本研究では、好酸球に主に発現し、遊走に重要であるケモカイン受容体3が欠損したマウス(CCR3^{-/-}マウス)と、大腸炎を自然発症するインターロイキン10欠損マウス(IL-10^{-/-}マウス)を交配し、CCR3^{-/-}; IL-10^{-/-}二重欠損マウスを作成し、大腸炎が修飾されるか検討を行った。

実験群 CCR3^{-/-}; IL-10^{-/-}の対照群として CCR3^{+/+}; IL-10^{-/-}を使用し、非腸炎コントロール群として、C57BL/6J マウスを使用した。CCR3^{-/-}; IL-10^{-/-}マウスは、発生と成長において、明らかな異常を認めなかった。また、CCR3^{-/-}; IL-10^{-/-}と CCR3^{+/+}; IL-10^{-/-}の大腸組織固有粘膜層から血球細胞を採取し、CCR3^{+/+}; IL-10^{-/-}では CD11b+CD11c- のミエロイド細胞中で20%ほど認められる Siglec-F+好酸球が、CCR3^{-/-}; IL-10^{-/-}ではほぼ0%となることをフローサイトメトリーにて確認した。5週齢よりマウス内視鏡を使用して腸炎発症の動態を観察し、15週齢においては組織評価なども行った。内視鏡による評価から、CCR3^{-/-}; IL-10^{-/-}の発症と増悪において、腸炎レベルに CCR3^{+/+}; IL-10^{-/-}と差を認めなかった。15週齢での評価では、大腸の肉眼的所見に差をみとめず、ヘマトキシリン・エオジン染色による炎症細胞浸潤、陰窩の伸張による評価においても両群間で差を認めなかった。これらの結果から、腸管組織における好酸球の欠損が、炎症所見に粗大な影響を及ぼさないことが示唆された。

IL-10欠損腸炎では、Th1細胞、Th17細胞浸潤が増加することが知られている一方で、Th1細胞の分化誘導が阻害されるマウスでも腸炎が発症することも知られており、これは、炎症の有無にかかわらず、大腸組織が常に同様の免疫学的なプロファイルを示すとは限らない事を示唆する。そこで、IL-10欠損腸炎で上昇する前炎症性サイトカイン TNF- α とTh1細胞、Th17細胞の分化誘導に必要なIL-12p40について、腸管組織からmRNAを抽出して遺伝子発現レベルを定量PCRで検討したが、CCR3^{+/+}; IL-10^{-/-}と CCR3^{-/-}; IL-10^{-/-}共に非腸炎群の C57BL/6J よりも有意な上昇をみとめるものの、この2群間では差を認めなかった。T細胞については、腸間膜リンパ節細胞を抗CD3抗体で刺激し、細胞上清を回収してELISAにてIL17-AとIFN- γ の蛋白レベルを測定したが、推測されたとおり、CCR3^{+/+}; IL-10^{-/-}と CCR3^{-/-}; IL-10^{-/-}の2群間では差を認めなかった。

本研究の結果からは、好酸球は IL-10 欠損腸炎においては、腸炎発症とその増悪において、明らかな役割を担わないものと考えられた。IL-10 欠損腸炎は、腸内細菌依存性であり、かつ、Th17 細胞の分化阻害による腸炎減弱が報告されており、好酸球の関与は比較的弱いという考察は可能である。しかし、他の腸炎モデルを使用した既報告においては、好酸球の欠損により腸炎の改善が有意に速やかとなることや、IL-4 欠損と IL-10 欠損マウスの二重欠損マウスでは好酸球浸潤の軽減とともに、腸炎発症が抑制されたなど、好酸球の腸炎における機能の重要性を示唆する報告が認められる。腸炎は、使用する腸炎モデルや、マウスの系統の背景、各施設での腸内細菌叢の違いにより腸炎レベルに大きな違いが生じることが広く認識されていることから、今回得られた結果は、本研究の条件下での結果であるという解釈は必要と考える。マウス飼料の変更や他施設といった異なる腸内環境の設定の元、同様の検討を行う事が、本結果の普遍性の確認には望ましいと考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲第 2890 号	氏 名	王 梓
論 文 題 目 Title of Dissertation	炎症性腸疾患マウスモデルにおける好酸球の役割 Role of Eosinophils in a Murine Model of Inflammatory Bowel Disease		
審 査 委 員 Examiner	主 査 森 康子 Chief Examiner 副 査 西 慎一 Vice-examiner 副 査 根本 香樹 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0字～2, 0 0 0字程度)

要旨

炎症性腸疾患の一つである潰瘍性大腸炎は、再燃と寛解を繰り返す慢性の大腸炎を呈する疾患であり、原因は未だ不明である。日本を含むアジア諸国での患者数は増加傾向を認め、新規治療の開発が盛んに行われているが、根本的な疾患の克服を目指すためにも、疾患発生のメカニズムの解明は急務である。

好酸球は、定常状態の大腸にも散見される白血球であるが、好酸球顆粒タンパク質が炎症性腸疾患患者の腸管組織や便中に増加しているとの報告がなされている。更に、もう一つの炎症性腸疾患であるクローン病がIFN- γ を主としたヘルパーT細胞タイプ1のサイトカインが上昇しているのに対し、潰瘍性大腸炎患者ではIL-4、IL-5やIL-13などタイプ2サイトカインが優位に上昇することが過去に複数の論文で報告されている。好酸球もタイプ2サイトカインを分泌することが知られているが、潰瘍性大腸炎における好酸球の役割については、詳細な検討がなされていない。そこで本研究では、好酸球に主に発現し、遊走に重要であるケモカイン受容体3が欠損したマウス(CCR3 $^{-/-}$ マウス)と、大腸炎を自然発症するインターロイキン10欠損マウス(IL-10 $^{-/-}$ マウス)を交配し、CCR3 $^{-/-}$; IL-10 $^{-/-}$ 二重欠損マウスを作成し、大腸炎が修飾されるか検討を行った。

実験群CCR3 $^{-/-}$; IL-10 $^{-/-}$ の対照群としてCCR3 $^{+/+}$; IL-10 $^{-/-}$ を使用し、非腸炎コントロール群として、C57BL/6Jマウスを使用した。CCR3 $^{-/-}$; IL-10 $^{-/-}$ マウスは、発生と成長において、明らかな異常を認めなかった。また、CCR3 $^{-/-}$; IL-10 $^{-/-}$ とCCR3 $^{+/+}$; IL-10 $^{-/-}$ の大腸組織固有粘膜層から血球細胞を採取し、CCR3 $^{+/+}$; IL-10 $^{-/-}$ ではCD11b+CD11c-のミエロイド細胞中で20%ほど認められるSiglec-F+好酸球が、CCR3 $^{-/-}$; IL-10 $^{-/-}$ ではほぼ0%となることをフローサイトメトリーにて確認した。5週齢よりマウス内視鏡を使用して腸炎発症の動態を観察し、15週齢においては組織評価なども行った。内視鏡による評価から、CCR3 $^{-/-}$; IL-10 $^{-/-}$ の発症と増悪において、腸炎レベルにCCR3 $^{+/+}$; IL-10 $^{-/-}$ と差を認めなかった。15週齢での評価では、大腸の肉眼的所見に差をみとめず、ヘマトキシリン・エオジン染色による炎症細胞浸潤、陰窩の伸張による評価においても両群間で差を認めなかった。これらの結果から、腸管組織における好酸球の欠損が、炎症所見に粗大な影響を及ぼさないことが示唆された。

IL-10欠損腸炎では、Th1細胞、Th17細胞浸潤が増加することが知られている一方で、Th1細胞の分化誘導が阻害されるマウスでも腸炎が発症することも知られており、これは、炎症の有無にかかわらず、大腸組織が常に同様の免疫学的なプロファイルを示すとは限らない事を示唆する。そこで、IL-10欠損腸炎で上昇する前炎症性サイトカインTNF- α とTh1細胞、Th17細胞の分化誘導に必要なIL-12p40について、腸管組織からmRNAを抽出して遺伝子発現レベルを定量PCRで検討したが、CCR3 $^{+/+}$; IL-10 $^{-/-}$ とCCR3 $^{-/-}$; IL-10 $^{-/-}$ 共に非腸炎群のC57BL/6Jよりも有意な上昇をみとめるものの、この2群間では差を認めなかった。T細胞については、腸間膜リンパ節細胞を抗CD3抗体で刺激し、細胞上清を回収してELISAにてIL17-AとIFN- γ の蛋白レベルを測定したが、推測されたとおり、CCR3 $^{+/+}$; IL-10 $^{-/-}$ とCCR3 $^{-/-}$; IL-10 $^{-/-}$ の2群間では差を認めなかった。

本研究の結果からは、好酸球はIL-10欠損腸炎においては、腸炎発症とその増悪において、明らかな役割を担わないものと考えられた。IL-10欠損腸炎は、腸内細菌依存性であり、かつ、Th17細胞の分

化阻害による腸炎減弱が報告されており、好酸球の関与は比較的弱いという考察は可能である。しかし、他の腸炎モデルを使用した既報告においては、好酸球の欠損により腸炎の改善が有意に速やかとなることや、IL-4 欠損と IL-10 欠損マウスの二重欠損マウスでは好酸球浸潤の軽減とともに、腸炎発症が抑制されたなど、好酸球の腸炎における機能の重要性を示唆する報告が認められる。腸炎は、使用する腸炎モデルや、マウスの系統の背景、各施設での腸内細菌叢の違いにより腸炎レベルに大きな違いが生じることは広く認識されていることから、今回得られた結果は、本研究の条件下での結果であるという解釈は必要と考える。マウス飼料の変更や他施設といった異なる腸内環境の設定の元、同様の検討を行う事が、本結果の普遍性の確認には望ましいと考えられる。

本研究は、ケモカイン受容体 3 が欠損したマウス(CCR3^{-/-}マウス)と、大腸炎を自然発症するインターロイキン 10 欠損マウス(IL-10^{-/-}マウス)を交配し、CCR3^{-/-}; IL-10^{-/-}二重欠損マウスを作成し、大腸炎が修飾されるか検討を行った研究であり、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。