

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏 名 八木 専

学位論文名 炎症性腸疾患モデルマウスを用いた炭酸脱水酵素 I エピトープの
同定とその腸炎抑制効果

学位論文の要約

[背景と目的]

炎症性腸疾患は原因不明の慢性炎症性疾患である。申請者らは炎症性腸疾患の病態に主要な腸内細菌抗原である炭酸脱水酵素 I (Carbonic anhydrase I: CA I) が関与していることを同定し、同抗原でパルスした制御性樹状細胞 (Reg-DC) を用いた細胞療法と経口免疫寛容療法が、炎症性腸疾患モデルマウスにおける腸炎抑制に有用であることを報告した。本研究では、同抗原による免疫治療の開発を想定して、CA I のアミノ酸配列の中で免疫寛容を誘導するエピトープ領域を同定し、同 CA I ペプチドによる腸炎抑制効果をみることを目的として研究した。

[材料と方法]

- CA I 蛋白の配列の中で、MHC class II と強結合しうる、つまり二次構造、親水性、抗原性、翻訳後修飾がないペプチド配列を網羅的に検索した。
- 8~12 週齢の BALB/c マウスの脾臓から 3×10^5 個の $CD4^+CD25^-$ T 細胞を分離し、8~12 週齢の SCID マウスに一度腹腔内投与し腸炎を誘発した。
- 腸炎モデルマウスの腸間膜リンパ節 (MLN) のリンパ球と候補ペプチドを共培養し、培養上清中の interleukin (IL) -17 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定した。
- 8~12 週齢の BALB/c マウスの骨髄細胞を IL-10、transforming growth factor (TGF) $-\beta 1$ 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子で 8 日間培養後、lipopolysaccharide で 24 時間培養して Reg-DC を作成した。
- 同定した候補ペプチドでパルスした 1×10^6 個の Reg-DC を腸炎誘発と同時にマウスに投与した。コントロールとしてリン酸緩衝液 (PBS)、scramble ペプチドでパルスした Reg-DC を用いた。
- 腸炎誘発後 7 日毎に体重測定を行い、4 週目に腸管長および結腸の組織所見を検討した。

7. 腸炎誘発後 4 週目に MLN および腸管の転写因子、炎症性サイトカインの mRNA 量を、real-time RT-PCR 法で測定した。MLN 細胞 (PMA、ionomycin 刺激下)、結腸切片を 72 時間培養した上清のサイトカイン濃度を測定した。
8. 腸炎誘発後 7 日目に MLN と腸管を採取し、Foxp3⁺制御性 T 細胞及び CD103⁺樹状細胞についてフローサイトメトリーで解析を行った。

[結果と考察]

1. CA I アミノ酸配列のうち MHC class II に強結合する候補ペプチド配列として KPLSISYNPAT AKEIVNVGHSFHVIFD (AA46-72)、KEIVNVGHSFHVIFDD (AA58-73)、KVLDALNSVKTGKRAPFTNFD (AA160-181)、EGEPAVPVLSNHRPPQLKGRTVRAS (AA235-261) の 4 つを同定した。
2. 3 つのペプチドで CA I 蛋白全長と同様の IL-17 産生パターンを示した。
3. 候補ペプチドのうち CA I 58-73 をパルスした Reg-DC (Reg-DC_{CA I 58-73}) だけが腸炎モデルマウスに投与したところコントロールと比較して、体重減少、腸管長の短縮はみられず、腸管組織において炎症像 (炎症細胞浸潤、腸管壁の肥厚、杯細胞、粘液の減少) が改善していた。
4. Reg-DC_{CA I 58-73} 群では、MLN の *Foxp3*, *Il10*, *Tgfb* mRNA 発現が増加、retinoic acid-related orphan receptor gamma t (*Rorγt*) mRNA 発現は低下し、IL-6、tumor necrosis factor (TNF)- α 、interferon- γ 産生は低下していた ($p < 0.05$)。
5. Reg-DC_{CA I 58-73} 群では、腸管の *Tgfb* mRNA 発現は増加、*Rorγt* mRNA 発現は低下し、IL-17、TNF- α 産生は低下していた ($p < 0.05$)。
6. Reg-DC_{CA I 58-73} 群は PBS 群、Scramble 群と比較し、MLN 及び腸管の Foxp3⁺制御性 T 細胞、CD103⁺樹状細胞が増加していた ($p < 0.05$)。

CA I 蛋白の配列から MHC class II に強結合するペプチドを同定した。その中で AA58-73 をパルスした Reg-DC では腸炎を改善した。腸炎改善機序として Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞、CD103⁺樹状細胞の誘導及び Th17 細胞誘導の抑制が考えられた。

[結論]

CA I アミノ酸配列の中で、炎症性腸疾患モデルマウスの腸炎を抑制できるペプチド領域を同定した。同ペプチドでパルスした Reg-DC が抗原特異的に免疫を抑制し、腸炎を改善することを明らかにした。本研究で明らかとした CA I ペプチドにより、炎症性腸疾患に対する免疫治療を構築しうる可能性が示唆された。なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に採択済である。

主論文 : Sen Yagi, Masanori Abe, Masakatsu Yamashita, Kenichirou Mori, Hirofumi Yamanishi, Eiji Arimitsu, Yasunori Yamamoto, Eiji Takeshita, Yoshio Ikeda, and Yoichi Hiasa. Carbonic anhydrase I epitope peptide improves inflammation in a murine model of inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2016 年 採択済