

## 学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏 名 森 健一郎

学位論文名 炎症性腸疾患に対する炭酸脱水酵素 I を治療標的抗原とした経口免疫寛容療法の開発

### 学位論文の要約

#### [背景と目的]

潰瘍性大腸炎とクローン病を含む炎症性腸疾患は、原因不明の慢性炎症性腸疾患で厚生労働省の特定疾患に指定されている。これまで炎症性腸疾患に対する抗原特異的な免疫療法は確立されておらず、ステロイド、免疫抑制剤、抗体療法など抗原非特異的な免疫抑制療法が中心であり、感染症などの副作用が課題となっている。申請者の共同研究者らは、炭酸脱水酵素 I (Carbonic anhydrase I : CA1) が主要抗原であることを明らかにし、CA1 と免疫寛容誘導性樹状細胞を用いた細胞療法が炎症性腸疾患に有用であることを報告した。[Yamanishi H, Murakami H, Ikeda Y, Abe M, Kumagi T, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M, 2012 : 参考論文] しかし、細胞療法は患者の負担が強く、細胞を用いずに CA1 そのものによる経口的な治療ができることが望ましい。そこで、申請者は CA1 を用いた経口免疫寛容誘導による炎症性腸疾患の治療法を確立することを目的として、以下の実験を行った。[Mori K, Yamanishi H, Ikeda Y, Kumagi T, Hiasa Y, Matsuura B, Abe M, Onji M, 2013 : 主論文]

#### [材料と方法]

1. 炎症性腸疾患モデルマウスの作成 : 8~12 週齢の BALB/c マウスの脾臓より磁気分離法を用いて高純度の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 細胞を分離した。8~12 週齢の SCID マウスに  $3 \times 10^5$  個の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 細胞を腹腔内投与して炎症性腸疾患モデルマウスを作成した。
2. 経口免疫寛容療法 : CA1 (0.3 mg/day) または keyhole limpet hemocyanin (KLH : 0.3 mg/day) を SCID マウスに 5 日間経口投与した。対照群にはリン酸緩衝液 (PBS) を投与した。経口投与終了 2 日後に CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 細胞を腹腔内投与し腸炎を惹起した。
3. 治療効果の評価 : 腸炎誘発後 7 日毎に体重測定を行った。腸炎誘発後 28 日目に腸管を採取し、大腸の長さ、腸炎の組織所見を検討した。  
腸炎誘発後 28 日目に腸間膜リンパ節及び腸管を採取し、経口免疫寛容に関与する aldehyde dehydrogenase family 1a2 (ALDH1a2)、transforming growth factor (TGF) - $\beta$  の mRNA 発現量を real-time PCR 法を用いて測定した。また、炎症性腸疾患の病態に関与する T-hel

per 17 細胞に関連する因子 (interleukin (IL) -17A、retinoic acid-related orphan receptor gamma t (ROR  $\gamma$  t) ) の mRNA 発現量を real-time PCR 法を用いて測定した。

4. 同様に腸間膜リンパ節及び腸管を採取し、腸間膜リンパ節細胞、横行結腸切片を 72 時間培養し、上清のサイトカイン濃度を ELISA 法、cytometric bead array 法により測定した。
5. また、腸間膜リンパ節及び腸管を採取し、腸間膜リンパ節、腸管粘膜固有層より単核球を分離し、Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞及びCD103<sup>+</sup>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]

1. CA1 群は PBS 群、KLH 群と比較して、体重減少、大腸の短縮が抑制され、組織学的にも腸炎の程度は軽度であった (いずれも  $p < 0.05$ ) 。
2. CA1 群は PBS 群と比較して腸間膜リンパ節の ALDH1a2 mRNA 発現は増加し、IL-17A、ROR  $\gamma$  tmRNA 発現は低下していた。また、腸間膜リンパ節細胞からの IL-6、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  産生は低下していた (いずれも  $p < 0.05$ ) 。
3. CA1 群は PBS 群と比較して腸管の ALDH1a2、TGF- $\beta$  発現は増加し、ROR  $\gamma$  t 発現は低下していた。また、腸管切片からの IL-6、TNF- $\alpha$  産生は低下していた (いずれも  $p < 0.05$ ) 。
4. CA1 群は PBS 群と比較して、腸間膜リンパ節及び腸管粘膜固有層の Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞、CD103<sup>+</sup>樹状細胞が増加していた ( $p < 0.05$ ) 。

#### [考察]

CA1 を用いた経口免疫寛容療法は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞移入炎症性腸疾患モデルマウスの腸炎を抑制した。その抑制機序としては ALDH1a2 を介した Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞、CD103<sup>+</sup>樹状細胞の誘導及び T-helper 17 細胞誘導の抑制が関与していることが示唆された。

#### [結論]

CA1 を用いた経口免疫寛容療法が炎症性腸疾患モデルマウスの腸炎を抑制できることを明らかにした。CA1 を標的抗原とした経口免疫寛容誘導療法は炎症性腸疾患の新たな治療法となる可能性がある。

主論文 : Mori K, Yamanishi H, Ikeda Y, Kumagi T, Hiasa Y, Matsuura B, Abe M, Onji M: Oral administration of carbonic anhydrase I ameliorates murine experimental colitis induced by Foxp3-CD4+CD25- T cells. *J Leukoc Biol.* 2013 Jun;93(6):963-72. doi : 10.1189/jlb.1212612.

参考論文 : Yamanishi H, Murakami H, Ikeda Y, Abe M, Kumagi T, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M: Regulatory dendritic cells pulsed with carbonic anhydrase I protect mice from colitis induced by CD4+CD25- T cells. *J Immunol.* 2012 Mar 1;188(5):2164-72. doi: 10.4049/jimmunol.1100559.