

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	森 健一郎
審査委員	主査 渡部 祐司 副査 鳥居 本美 副査 白方 裕司 副査 渡部 昌平 副査 東 太地

論文名 炎症性腸疾患に対する炭酸脱水素酵素 1 を治療標的抗原とした経口免疫寛容療法の開発  
審査結果の要旨 (2,000 字以内)

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問題となっていた。本研究は、申請者のグループが既に報告した炭酸脱水素酵素 I (Carbonic anhydrase I: CA1) が主要抗原であり、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明らかにした研究を発展させ、患者負担の少ない 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の確立をめざしたものである。

方法：

1. 炎症性腸疾患モデルマウスの作製：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、同週齢の SCID マウスに 3x10<sup>5</sup> 個の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を腹腔内投与し炎症性腸疾患モデルマウスを作製した。
2. 経口免疫寛容療法：CA1 (0.3mg/day) または keyhole limpet hemocyanin (KLH: 0.3mg/day) を SCID マウスに 5 日間経口投与した。対照群には 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および腸管を採取し、経口免疫寛容に關与する 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關与する T-helper17 細胞に關連する因子 (IL-17A, retinoic acid-related orphan receptor gamma t (ROR  $\gamma$  t)) の mRNA 発現量を real-time PCR 法で測定した。
4. 腸炎誘発後 28 日目に腸間膜リンパ節、腸管を採取し、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. 腸炎誘発後 28 日目に腸間膜リンパ節および腸管を採取し、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 細胞および 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、組織学的にも炎症程度は軽度であった ( $p < 0.05$ )。
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, TNF- $\alpha$  産生は低下していた ( $p < 0.05$ )。
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 発現は低下した。また、腸管切片からの IL-6, TNF- $\alpha$  産生は低下した ( $p < 0.05$ )。
4. CA1 群は PBS 群と比較して、腸間膜リンパ節およ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 ( $p < 0.05$ )。

#### 考察と結論：

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が、その機序は ALDH1a2 を介した Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞、CD103<sup>+</sup>樹状細胞の誘導および T-helper 17 細胞誘導の抑制が關与していることが示唆された。本研究の結果、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を示し、既に臨床試験に向けて準備を開始していることも併せて示した。

公開審査会は平成 24 年 12 月 3 日に開催され、申請者の発表後活発な質疑応答があった。主な論点は、1) 本実験モデルが、炎症性腸疾患の中で何に相当するか (UC)、2) CA1 至適投与量はどの程度か、3) CA1 投与のタイミングは活動期か寛解期か、4) CA1 の腸管外への影響はどうか、例えば合併疾患である虹彩炎や脊椎炎などへの効果は期待されるか、5) 潰瘍性大腸炎から発生する所謂 colitic cancer との關連などであった。申請者は、質疑に対して的確に応答した。

以上より、審査委員全員一致で本論文が学位論文として十分評価に値するものと判断した。