

学位論文審査結果の要旨

氏名	丹下 和洋
審査委員	主査 金川 基 副査 山下 政克 副査 石丸 啓 副査 太田 雅明 副査 下川 哲哉

論文名

ヒト炭酸脱水酵素 I の経口投与は炎症性腸疾患モデルマウスにおける腸炎を抑制する

審査結果の要旨 (2,000 字以内)

【背景と目的】

潰瘍性大腸炎など炎症性腸疾患の病態には腸管由来蛋白の関与が想定されている。これまでの検討で、腸管の回盲部に発現する蛋白のプロテオーム解析を行った結果、炭酸脱水酵素 I (Carbonic Anhydrase I : CA I) が腸管由来蛋白の主要抗原であることを明らかにした。また、mouse CA I (mCA I) 抗原や CA I のエピトープ領域ペプチドと共培養した免疫寛容誘導性樹状細胞が腸炎モデルマウスの腸炎を抑制することから、CA I が腸炎における治療標的抗原であることを同定した。さらに、腸炎モデルマウスにおいて、mCA I 抗原の経口投与が、制御性の免疫寛容状態を誘導し、制御性 T 細胞の誘導と、それに引き続く炎症性サイトカインの低下を引き起こすことを明らかにした。しかし、マウス由来である mCA I とヒト由来の human CA I (hCA I) は、アミノ酸相同性が 78.2%あるものの、創薬のための臨床応用において、同様の治療効果が得られるのか検証を要する。また、既に使用されている治療薬との比較も必要である。hCA I の腸炎モデルマウスにおける腸炎抑制効果を明らかにして今後の創薬につなげることを研究の目的とした。

【材料と方法】

1. 重症複合免疫不全 (severe combined immunodeficient: SCID) マウスに、hCA I 蛋白、コントロール蛋白 (keyhole limpet hemocyanin: KLH)、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline: PBS) を 7 日間経口投与した。CD4⁺CD25⁻T 細胞の養子移入により大腸炎を誘発した。

腸炎誘発から 28 日後にマウスを解剖し大腸および腸間膜リンパ節を解析した。

2. マウスの糞便を回収し、腸炎初期、慢性期における、腸管から逸脱する CA I の動態を、免疫沈降法と Immunoblot 法を用い解析した。

3. マウスの直腸から hCA I 蛋白を投与し、腸管に補充する治療効果を検討した。既存薬である mesalazine (5-ASA)、prednisolone (PSL) と腸炎抑制効果について比較検討を行った。hCA I 投与による腸内細菌への影響についても検討した。

【結果と考察】

1. PBS 投与群マウスと比較して、hCA I 投与群マウスは、腸炎の発症を有意に抑制した。

2. PBS 群と比較して、hCA I 群は、腸間膜リンパ節(mesenteric lymph nodes: MLNs)における Interleukin(IL)-6、IL-17A、および Retinoic acid-related orphan receptor gamma t(ROR γ t) の発現が低下した。IL-6、IL-17、および Interferon-gamma(IFN- γ) の産生は MLNs で有意に低下した。

3. 経口投与した hCA I は盲腸まで到達すること、また、腸炎の慢性期において腸管上皮細胞から逸脱した CA I は糞便中で枯渇していくことを同定した。

4. 腸管上皮細胞、あるいは腸管から逸脱した内因性の糞便中 CA I が枯渇する腸炎の慢性期において、hCA I を直腸投与で大腸に補うと腸炎の増悪が抑制されることを同定した。

5. 既存薬との比較試験においては、hCA I は、PSL と同等、かつ 5-ASA 製剤よりも腸炎の発症を抑制することを同定した。hCA I 投与時には、*Bacteroidetes* 門が増加することを同定した。

本動物実験は、愛媛大学動物実験委員会より承認されている(承認番号 TI-71-16、TI-93-1)。

【結論】

hCA I の経口投与はモデル動物の腸炎を抑制し、抗原特異的に制御性の免疫応答を誘導することを証明した。hCA I の経口投与は PSL と同等の抑制効果を持つこと、さらには腸内細菌の組成に対して影響を持つことを同定した。さらに、hCA I の直腸投与により、腸炎の増悪を抑制することを明らかにした。hCA I は自己抗原であり、副作用の発現が乏しいことを考慮すると、hCA I の経口投与は、高い安全性と有効性を兼ねた炎症性腸疾患の新たな治療オプションとして提案される可能性がある。また腸炎の増悪時において、CA I が腸管上皮細胞や糞便中において減少することから、炎症性腸疾患の活動性を評価するバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

本論文は、腸炎モデルマウスにおける hCA I の腸炎抑制効果を初めて明らかにし、明瞭な結果と十分な考察が提示されており、今後の創薬につながる重要な知見となる。公開審査会は、令和 5 年 1 月 6 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表し、1) hCAI 全長タンパク質を用いた理由、2) 疾患モデルおよび未治療対照群の妥当性、3) 病理学的スコアと治療効果の相関、4) 投与ルート及び投与量の設定法、5) 既存薬との優位性、6) 腸内細菌叢変化の理由、7) CAI の発現様式とバイオマーカーとしての有効性、8) 発がんとの関連性、9) 創薬と治験に向けた戦略など、多くの質問に対し日本語で的確に応答した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。