

Evidence for the critical role of interleukin-12 but not interferon- γ in the pathogenesis of experimental colitis in mice

メタデータ	言語: en 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 戸澤, 孝太郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1177

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 324号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏名	戸澤 孝太郎		
論文題目	Evidence for the critical role of interleukin-12 but not interferon- γ in the pathogenesis of experimental colitis in mice (実験的大腸炎の病態においては、IFN- γ ではなくIL-12がきわめて重要な役割をもつ証拠)		

博士(医学) 戸澤 孝太郎

論文題目

Evidence for the critical role of interleukin-12 but not interferon- γ in the pathogenesis of experimental colitis in mice

(実験的大腸炎の病態においては、IFN- γ ではなくIL-12がきわめて重要な役割をもつ証拠)

論文の内容の要旨

[はじめに]

潰瘍性大腸炎やクローン病などの慢性炎症性腸疾患の原因は未だ不明であるが、その病因として腸管粘膜における免疫調節の異常が推定されている。すなわち、CD4 helper T(Th)細胞にはTh1とTh2タイプが存在し、それぞれinterferon(IFN)- γ とinterleukin(IL)-4を介して互いに調節し炎症を回避していると考えられている。しかし、慢性炎症性腸疾患ではこの機構が破綻している可能性がある。マウスの2、4、6-trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS)大腸炎は、ハプテンによる遅延型過敏反応の結果生じる大腸炎症のモデルでありクローン病と類似した病変を形成する。このモデルは上記のTh1系優位の炎症モデルにあたり、IFN- γ は炎症発症機序における重要なサイトカインと考えられる。実際、Neurathらは、マウスTNBS大腸炎モデルにおいてIFN- γ の産生が亢進し、またIFN- γ に対する中和抗体を投与すると部分的にTNBSにより誘発された大腸炎が改善したと報告している(J. Exp. Med. 1995, 182:1281-1290)。しかしながら、DohiらはIFN- γ ^{-/-}マウスにおいてもTNBS大腸炎が生じたと報告(J. Exp. Med. 1999, 189:1169-1179)している。また、Davidsonらは他のTh1系優位の炎症モデルであるIL-10^{-/-}マウスにおいてIFN- γ は大腸炎に関与していないと報告している(J. Immunol. 1998, 161:3134-3149)。

本研究では、このマウスTNBS大腸炎モデルにおいてIFN- γ receptor(R)^{-/-}マウスおよびIFN- γ に対する中和抗体を投与した野生型マウスを用いることにより、TNBS腸炎においてIFN- γ がどのような役割を演じているか検討を行った。また、IL-12はTh1系優位の炎症モデルでは重要な役割を果たすサイトカインであるため、IL-12 p40^{-/-}マウスおよびIL-12に対する中和抗体を投与した野生型マウスでTNBS腸炎モデルを作成しその役割の検討を行った。

[材料ならびに方法]

- (1) マウスは129/Sv/EvのIFN- γ R^{-/-}マウスおよび同wild-typeマウス、C57BL/6のIL-12 p40^{-/-}マウスおよび同wild-typeマウスを使用した。
- (2) TNBS大腸炎はTNBS2.5mgを50%エタノールに溶解、その100 μ lを注腸し作成した。コントロールとして50%エタノール100 μ lを注腸した。誘発された大腸炎による下痢によりマウスの体重は減少するため、注腸前後でマウス体重を測定した。また注腸後1週間後にマウス大腸を切除し、hematoxylin and eosin(HE)染色を行った。
- (3) 中和抗体は単クローン抗体、R4-6A2(抗IFN- γ 抗体)とC17.8(抗IL-12抗体)を使用した。これらの抗体を産生するハイブリドーマをBALB/cヌードマウスに接種し、同マウスの腹水よりE-Z-SEP kitを使い抗体の精製を行った。投与方法は、TNBS注腸1時間前に抗IFN- γ 抗体あるいは抗IL-12抗体2mgを腹腔投与した。コントロールとして抗Rat IgG抗体2mgの投与を行った。
- (4) 病理組織所見での炎症の程度はHE染色でリンパ球の浸潤の程度と腺管の破壊の程度により以下の分

類でscore 0~4の5段階評価を行った。

- 0、炎症所見無し；
- 1、きわめて少ない白血球浸潤；
- 2、すくない白血球浸潤；
- 3、多数の白血球浸潤、血管壁の肥厚、腸管壁の肥厚；
- 4、全層性の白血球浸潤、杯細胞の脱落、血管壁の肥厚、腸管壁の肥厚。

(5) Th1優位の炎症であることを確認するため、免疫組織化学的染色にてCD4単クローン抗体を使い大腸炎症局所にCD4陽性T細胞の浸潤を確認した。さらに大腸組織からsemi-quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR)を行い、IFN- γ 、IL-4およびTNF- α のmRNAの発現を検討した。

[結果]

(結果1) wild-typeマウスでの検討： 体重の変化；TNBS注腸後1週間でwild-typeマウス(n=8)の体重減少を認めた。50%エタノール100 μ lの注腸を行ったコントロール群(n=7)は軽度の体重増加を認めた。両群の体重の変化は3, 5, 7日時点で有意差($P < 0.01$)を認めた。検定はMann-Whitney *U*-testでおこなった。病理組織所見；コントロール群はscore 0から1の炎症であったが、TNBS注腸群はscore 2から4の炎症を認めた。

(結果2) ノックアウトマウスでの検討： IFN- γ R^{-/-}マウスにTNBSを注腸した群(n=7)では大腸炎が生じ、体重の減少を認め、病理組織の炎症score 2から4の炎症が認められた。エタノール投与群(n=11)は体重減少および大腸炎は認めなかった。それぞれの群の体重変化は3, 5, 7日時点で有意差($p < 0.01$)を認めた。次にIL-12 p40^{-/-}マウスにTNBSを注腸した群(n=9)では体重減少は認めず、病理組織の炎症score 0から1で大腸炎は認めなかった。エタノール投与群(n=6)も体重減少および大腸炎は認めなかった。それぞれの群の体重変化は3, 5, 7日時点で有意差はなかった。

(結果3) 中和抗体を投与したwild-typeマウスでの検討： IFN- γ 抗体投与により中和したwild-typeマウス(n=8)ではコントロールの抗Rat IgG抗体を投与したwild-typeマウス(n=8)と同様にTNBS注腸により体重の減少を認め、score 2から4の大腸炎を生じた。次にIL-12を中和したwild-typeマウス(n=8)では体重減少は認めず、病理組織の炎症score 0から1で大腸炎は認めなかった。コントロールの抗Rat IgG抗体を投与したwild-typeマウス(n=8)では体重の減少および大腸炎を認め、体重変化は3, 5, 7日時点で有意差($p < 0.01$)を認めた。

(結果4) 免疫組織化学的染色；CD4単クローン抗体を使い大腸炎症局所にCD4陽性T細胞が多数浸潤しているのを確認した。RT-PCR; TNBS注腸群の大腸組織ではIFN- γ の発現が認められたがコントロール群では認めなかった。IL-4の発現は両群とも認めなかった。またTNBS注腸群の大腸組織ではコントロール群に比較しTNF- α の強い発現を認めた。TNBSを注腸したIFN- γ R^{-/-}マウスにおいても大腸炎症局所にCD4陽性T細胞が多数浸潤しているのを確認した。RT-PCRでIFN- γ R^{-/-}マウスにおけるTNBS注腸群の大腸組織ではIFN- γ の発現が認められた。コントロール群でも若干の発現が認められた。しかし、IL-4の発現は認めなかった。TNF- α もTNBS注腸群の大腸組織で強い発現を認めた。

[考察]

Th1系優位の炎症モデルであるTNBS大腸炎において、Th1サイトカインであるIFN- γ とIL-12の役割の検討を行った。予想に反してIFN- γ R^{-/-}マウスおよびIFN- γ を中和したwild-typeマウスでTh1系優位の大腸炎を認めた。TNBS大腸炎においてIFN- γ が強く発現しているが、このIFN- γ の大腸炎における役割は

不明である。一方、IL-12 p40^{-/-}マウスでは炎症は認めず、IL-12を中和した同wild-typeマウスでも炎症は抑制され、IL-12がTh1系優位の大腸炎の発症に重要な役割を果たしていることが判明した。これらのことから、IL-12はIFN- γ の強い誘導因子であるが、TNBS大腸炎においてはIFN- γ 非依存性に関与していたことが示唆された。

[結論]

IL-12はTNBS大腸炎の病態にきわめて重要な役割をもつサイトカインであるが、IFN- γ はその発症に必ずしも必要ないと考えられた。

論文審査の結果の要旨

慢性炎症性腸疾患には潰瘍性大腸炎、クローン病などがあり、全国の推定患者数はそれぞれ6万人、1.8万人にのぼり、国指定の難病である。発症には免疫異常、ストレスなど多くの因子が関与していると想定されているが、免疫抑制剤、リンパ球除去などが有効であることから、炎症部位のサイトカインプロファイルの解析から、潰瘍性大腸炎はTh2細胞が、またクローン病ではTh1細胞が病変形成に主要な役割をはたしているとおもわれる。様々なサイトカインのノックアウトマウスで腸炎が自然発症することから、炎症のエフェクター分子としてのサイトカインが注目されている。とくにクローン病では、Th1サイトカインであるIFN- γ やIL-12の関与が示されているが、いずれのサイトカインが発症の中心的分子であるかについては、あきらかな結論はまだでていない。

申請者らはクローン病のマウスモデルである2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)注腸による大腸炎を作成して、サイトカインの関与の面からクローン病の病因をあきらかにしようと試みた。とくに本研究の特徴は、IFN- γ 、IL-12系に異常を持つマウスにTNBS大腸炎を誘導し、これらサイトカインの病態への関与を調べたことにある。

結果としては、IFN- γ レセプター欠損マウスおよび特異的抗体投与によるIFN- γ 中和マウスでは、wild-typeマウス同様、TNBS投与により7日目をピークとする大腸炎が誘導された。病変は大腸の下半分に限局し、また局所的潰瘍も半数以上のマウスでみられた。下痢のための体重減少がおき、大腸の病理組織検査では単核球浸潤、血管壁の肥厚、腸管壁の浮腫による肥厚を強く認めた。主要な浸潤細胞はCD4陽性T細胞であり、CD8陽性T細胞の浸潤はわずかであった。サイトカインプロファイルとしては、病変部でIL-12およびIFN- γ の発現がみられた。一方、IL-12p40^{-/-}マウスおよび特異的抗体投与によるIL-12中和マウスでは大腸炎は起きず、体重減少はなく、大腸の病理組織標本でもわずかな炎症を認めるのみであった。これらの結果から、TNBS注腸による大腸炎では、IL-12が重要な炎症のメディエーターとして働くことが強く示唆された。一方、IFN- γ はこのマウス実験的大腸炎の誘導に重要ではなく、むしろ創傷の修復に働く可能性が示された。

審査委員会では、サイトカイン中和抗体の投与のみならず、サイトカイン遺伝子の異常を持ったマウスをもちいて、実験的大腸炎におけるIFN- γ およびIL-12の関与をきわめて厳密に検討した点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) TNBS大腸炎が遅延型反応である証拠
- 2) TNBSは大腸のどの部分に注入されるのか。また、炎症はどの部分に起きるのか
- 3) 炎症の経過、とくに病理組織学的な面から
- 4) 中和抗体を腹腔内投与するタイミングの重要性、効果持続期間は
- 5) マウスの遺伝的背景とくにH-2によるTNBS感受性の違いは
- 6) マクロファージの炎症への関与について
- 7) ヒトの炎症性腸疾患とノックアウトマウスでの腸炎との比較

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 瀧川 雅 浩
副査 山 下 昭 副査 永 田 年