

氏名	田下 智栄子
学位の種類	博士(医療科学)
学位記番号	甲第13号
学位授与の日付	2021年3月14日
学位論文題名	Kynurenine plays an immunosuppressive role in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis in mice 「キヌレニン誘発性マウス大腸炎を免疫抑制する」
指導教員	教授 齋藤 邦明
論文審査委員	主査 教授 秋山 秀彦 副査 教授 竹松 弘 准教授 毛利 彰宏

#### 論文内容の要旨

クローン病(CD)や潰瘍性大腸炎(UC)のような炎症性腸疾患(IBD)は腸粘膜のダメージを招く慢性腸炎症を特徴とする。最近の研究において、IBDは粘膜のT細胞、特にCD4<sup>+</sup>T細胞の機能不全が原因であるとされ、腸炎症や粘膜バリアの破壊を導くことが報告されていることから、CD4<sup>+</sup>T細胞が産生する種々のサイトカインの調節障害はIBDの重要な特徴であると考えられる。我々は以前、インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)の活性が硫酸トリニトロベンゼン(TNBS)誘発性大腸炎の病態進行を抑制することを示した。IDOはTrpを代謝し、代謝生成されたキヌレニン(Kyn)はT細胞のアポトーシスの誘導や増殖を抑制し、ナイーブT細胞からTreg細胞の分化を誘導することが知られている。従って、KPの代謝産物の調整は大腸炎治療の新しいターゲットとして期待されるが、Trp代謝産物とKP酵素の免疫抑制作用の関係性はまだ十分に理解されていない。キヌレニン-3-モノオキシゲナーゼ(KMO)はKPの律速酵素でKynから3-ヒドロキシキヌレニン(3-HK)を生合成する。近年、我々の研究において、KMO遺伝子欠損マウス(KMO<sup>-/-</sup>)がKynの著明な増加と3-HKの減少を示したことから、KMO欠損マウスの使用は、大腸炎におけるT細胞の分化や免疫細胞の誘導とTrp代謝産物の関係を明らかにできる可能性がある。

本研究は、免疫調整におけるKMOの役割を調べるためにC57BL/6Nマウスの野生型マウス(KMO<sup>+/+</sup>)とKMO<sup>-/-</sup>を用いてTNBS大腸炎を誘発した(実験動物許可番号: APU19145)。また、TNBS処置KMO<sup>+/+</sup>へKyn、キヌレニン酸(KA)、アントラニン酸(AA)を投与し、同様にKMO<sup>-/-</sup>へ3-HK、3-ヒドロキシアントラニル酸(3-HAA)を投与しKP代謝産物の炎症への影響を検討した。TNBS投与後3日目に大腸組織を摘出し、HE染色により大腸組織の炎症評価をし、免疫組織化学染色(抗KMO抗体、抗F4/80抗体、抗CD11c抗体、抗CD19抗体、抗CD4抗体、抗Foxp3抗体、抗TGF- $\beta$ 抗体、抗IL-10抗体)により大腸中のKMO陽性細胞の同定とTreg細胞におけるサイトカイン産生能の評価を行った。また、

HPLCで大腸のKP代謝産物(Trp、Kyn、3-HK、KA、AA、3-HAA)測定とフローサイトメトリーを用いてTregおよびCD103<sup>+</sup>DCの構成割合を評価した。大腸より産生されるサイトカイン(TGF- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IL-17)の評価はRT-PCR法で行った。

大腸組織の炎症はKMO<sup>+/+</sup>では広範囲の潰瘍や凝固壊死など著明な病的変化が観察されたが、KMO<sup>-/-</sup>は局所的な潰瘍や軽度の炎症であった。TNBS投与によりF4/80やCD11c陽性細胞でKMOの発現が見られ、これらの細胞がTNBS誘発大腸炎の病的進行に関与していることが示唆された。大腸組織におけるKP代謝産物の変動を確認したところ、KMO<sup>-/-</sup>ではKyn、KA、AAの顕著な増加と3HK、3HAAの低下を示した。次に、粘膜固有層のFoxp3<sup>+</sup>Treg細胞数は、KMO<sup>+/+</sup>よりKMO<sup>-/-</sup>で高値を示し、腸間膜リンパ節のCD103<sup>+</sup>DCも同様の結果であった。誘導されたTreg細胞は、抗炎症性サイトカインTGF- $\beta$ 、IL-10を産生しており、一方で、炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ を抑制していた。KP代謝産物によるTreg誘導への影響とそれに伴う大腸炎への影響を調べたところ、Kynの投与によりIL-10<sup>+</sup>Tregを誘導し、結果として大腸炎の進展を抑制することを明らかにした。

これらの結果は、KMO阻害によるKyn量の増加によりTreg細胞を誘導し、IL-10やTGF- $\beta$ の産生を通してTNBS誘発性大腸炎を抑制したと推察された。すなわち、KMOをターゲットとした新しい大腸炎の治療は、Tregの誘導を特徴とした新規免疫療法の発展に寄与することが期待された。

#### 論文審査結果の要旨

World J Gastroenterology (IF:3.665) 2020 March 7; 26(9): 918-932 Kynurenine plays an immunosuppressive role in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis in miceとして受理された論文をもとに説明が行われた。審査員からの質疑について、文献などの考察も加えてわかりやすい説明がされ、今後の新規免疫療法への寄与が期待されるものであった。博士論文の評価基準に基づいて審査した結果、基本要件、論文の構成は要件を満たしており、学位論文として認められる論文である。