

氏名	きなし ゆうすけ 木梨 祐輔
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	博士甲 第 号
学位授与の日付	2025年3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	極性輸送因子 AP-1B 複合体の腸上皮特異的な欠損が腸管外器官に与える影響
論文審査委員	(主査) 教授 長谷 耕二 (博士 (薬学)) (副査) 教授 登美 斉俊 (博士 (薬学)) 准教授 松崎 潤太郎 (博士 (医学))
慶應義塾大学学位規程第 11 条に基づく審査委員会実施日： 2024 年 2 月 4 日	

論文内容の要旨

背景

腸管腔には食事由来の抗原や共生微生物など、膨大な数の異物が存在する。これらの異物の侵入を防ぐために、腸管腔との境界に位置する腸上皮細胞が物理的、生化学的なバリアを構築する。例えば、密着結合による物質透過性の調節、ムチンや抗菌ペプチドの産生による微生物の上皮層からの隔絶が挙げられる。また、腸上皮細胞は、形質細胞が産生する immunoglobulin A (IgA) を polymeric Ig receptor (pIgR) と結合させて細胞内に取り込み、トランスサイトosisにより腸管腔へ分泌する。分泌された IgA は病原性微生物を排除する一方で、共生細菌の定着を促すことにより腸内細菌叢のバランス維持に貢献する。

腸上皮バリア機能の維持には、管腔側の頂端膜と体内側の側基底膜にそれぞれ異なるタンパク質を極性輸送することが重要である。このうち、側基底膜タンパク質の一部は adaptor protein (AP)-1B 複合体によって認識され細胞内輸送される。AP-1B 複合体のサブユニットである μ 1B は標的タンパク質の特定のモチーフを認識し、クラスリン依存的に標的タンパク質を側基底膜へ輸送する。 μ 1B をコードする遺伝子 *Aplm2* の全身欠損マウスでは腸上皮細胞においてサイトカイン受容体などの側基底膜タンパク質の局在に異常をきたし、バリア機能の低下によって大腸炎を自然発症する。そのため、AP-1B 複合体による極性輸送は腸上皮バリア機能の維持に必須であると考えられた。

腸上皮バリアの破綻は腸管透過性を亢進させ、管腔内異物が体内へ侵入して炎症を引き起こす。この状態はリーキーガット症候群と呼ばれており、しばしば腸内細菌叢

のバランス異常（ディスバイオーシス）を合併する。こうした腸管異常は消化管疾患だけでなく、腸管外疾患でも認められることが報告されているが、リーキーガットと腸管外疾患の発症との因果関係や病態形成メカニズムには不明な点が多い。

以上を踏まえ、腸上皮バリア機能の低下を引き起こす *Aplm2* 欠損はリーキーガットのモデルとなる可能性が予想され、その腸管外器官への影響を解析することによってリーキーガットと腸管外疾患の発症との因果関係を検証できると考えた。ただし、*Aplm2* は腸管外器官においても発現が認められ、また *Aplm2* 全身欠損マウスは大腸炎により成獣期前にその半数が死に至り、生存を続けるマウスでも免疫系の発達に異常をきたす可能性があった。そこで、タモキシフェン誘導性、腸上皮特異的 *Aplm2* 欠損マウスを作出し、腸管に限局したバリア機能低下が腸管外器官に与える影響を詳細に解析することで、腸管外疾患の発症機序を明らかにすることを目指した。本博士論文研究では、*Villin-Cre-ER^{T2} Aplm2^{fl/fl}* (*Aplm2^{ΔIEC}*) マウスにタモキシフェンを投与して *Aplm2* 欠損を誘導し、同様に処置した同性、同腹仔の *Aplm2^{fl/fl}* マウスをコントロールとして実験を実施した。

結果

1. *Aplm2* 欠損が腸上皮の物理バリアに与える影響

まず、*Aplm2* 欠損が腸管恒常性や物理的バリアに与える影響を解析した。回腸および大腸の病態組織学的解析から、本実験条件では上皮層の損傷や免疫細胞の浸潤といった炎症像は認められなかった。続いて、デキストランの腸管腔から血中への移行を指標に腸管透過性を評価したところ、*Aplm2^{ΔIEC}* マウスでは血中濃度が増加し、腸管透過性の亢進が示唆された。しかし、蛍光免疫染色像から、密着結合分子 ZO-1、接着結合分子 E-cadherin の発現や局在に変化は認められなかった。また、マウスから摘出した回腸における経上皮電気抵抗も変化しなかった。つまり、*Aplm2^{ΔIEC}* マウスでは腸上皮の極性や構造は顕著には変化せず、細胞間隙の透過性が増大したと考えられた。

2. *Aplm2* 欠損が腸上皮の生化学バリアに与える影響

次に、生化学的なバリア因子を解析した。Alcian-Blue 染色像から、ムチンを分泌する杯細胞に変化は認められなかった。抗菌レクチンである RegIIIγ は、*Aplm2^{ΔIEC}* マウスの回腸上皮において mRNA およびタンパク質ともに発現量の低下が認められた。また、RegIIIγ の誘導に関わる STAT3 シグナルも有意に減少していた。さらに、腸内細菌叢の解析から、*Aplm2^{ΔIEC}* マウスの回腸において *Candidatus Arthromitus* の増加を特徴とするディスバイオーシスが観察されたが、これは RegIIIγ の減少によるものと推察された。

Aplm2^{ΔIEC}マウスの腸管腔内IgAは減少傾向を示した一方、血中では顕著に増加した。血清をサイズ排除クロマトグラフィーによって分子サイズごとに分画してIgAを測定すると、コントロールでは単量体IgAが主要であった一方、*Aplm2*^{ΔIEC}マウスでは主に粘膜組織で存在する二量体またはそれ以上の多量体IgAの占める割合が増加していた。これは腸管由来のIgAが血中に移行することを示唆していた。そこで、IgA輸送因子pIgRを解析すると、*Aplm2*^{ΔIEC}マウスの回腸上皮におけるmRNA発現量が減少した。pIgRの発現誘導が知られるIL-17Aを*Aplm2*欠損回腸オルガノイドに添加した場合、コントロールで誘導された発現量の半分程度に抑制されたことから、IL-17Aシグナルの減弱がpIgRの発現低下の原因と考えられた。さらに、蛍光免疫染色による解析から、コントロールではpIgRは細胞核の近傍、ゴルジ体と考えられる領域に検出されたが、*Aplm2*^{ΔIEC}マウスではpIgRの凝集が細胞質に散在し、IgAやリソソームマーカー分子LAMP-1と共局在していた。免疫電子顕微鏡解析からも、pIgRがリソソーム様の細胞内小胞に検出された。そのため、*Aplm2*^{ΔIEC}マウスでは側基底膜でIgAと結合したpIgRの頂端膜への輸送過程が障害されており、pIgRの機能低下がIgAの血中移行をきたしたと考えられた。以上により、腸上皮細胞におけるAP-1B複合体の消失はサイトカインシグナル減弱によるバリア関連分子の発現減少、また細胞内輸送の破綻によって腸上皮バリア機能の低下を招くことが示された。

3. *Aplm2*^{ΔIEC}マウスの腸管外器官における表現型

続いて、腸管外器官への影響を探索するにあたり、腸管から全身循環への移行が示唆されたIgAが腸管から離れた器官に直接影響することが予想された。そのため、IgAに注目して解析を進めた結果、*Aplm2*^{ΔIEC}マウスでは腎臓の糸球体領域にIgAが沈着することを見出した。このIgA腎沈着にはIgGや補体因子C3も存在しており、IgA腎症に特徴的な徴候が観察された。

IgA腎症の病態形成は、IgAに修飾される糖鎖のうちガラクトースが欠損したIgAが産生され、血中でIgGと免疫複合体を形成することで腎沈着を引き起こし、この沈着によって腎障害をきたすと考えられている。そのため、ガラクトース特異的なレクチンを用いてガラクトース修飾を評価したところ、の血中IgAとレクチンとの反応性が低下しており、糖鎖修飾の減少が示唆された。また、血中におけるIgA-IgG免疫複合体も増加していたことから、*Aplm2*^{ΔIEC}マウスではIgA腎症に類似した病態が形成されていると考えられた。しかし、血中や尿中の腎機能マーカーは顕著に変化しておらず、腎障害は認められなかった。そのため、本実験条件においては、*Aplm2*^{ΔIEC}マウスはIgA腎症の初期段階を呈したと考えられた。

4. IgA 腎症様の徴候を招くメカニズム

血中 IgA は腸管から移行したと想定されたため、まず腸管で産生された IgA が沈着を引き起こすか検証した。回腸組織の培養により得られた IgA を野生型マウスの静脈内に投与すると、*Aplm2*^{ΔIEC} マウスの腸管由来 IgA の投与で腎沈着が再現された。続いて、腸管免疫系を調べると、回腸粘膜固有層でのみ IgA 産生細胞を含む、CD45 陽性細胞が増加していた。この結果と一致して、回腸組織の培養上清中に分泌された IgA は *Aplm2*^{ΔIEC} マウスで多い傾向にあった。さらに、*Aplm2*^{ΔIEC} マウスの回腸粘膜固有層から得た B 細胞では、複数のガラクトース転移酵素 B4GalT サブタイプの mRNA 発現量が有意に減少した。これらの結果により、回腸粘膜固有層が糖鎖修飾不全 IgA の産生場所であることが示唆された。

腸内細菌は腸管における IgA 産生に影響することから、腸内細菌が *Aplm2*^{ΔIEC} マウスの IgA 腎症様の徴候に関与するか検証した。抗生物質の投与により腸内細菌を除去した条件で IgA 腎症の徴候を解析した結果、*Aplm2*^{ΔIEC} マウスの血中 IgA の濃度および糖鎖修飾、IgG との複合体形成はコントロールと同程度まで改善され、さらに IgA 腎沈着も抑制された。これより、*Aplm2*^{ΔIEC} マウスにおける IgA 腎症様の徴候は腸内細菌依存的であることが明らかになった。

5. *Aplm2*^{ΔIEC} マウスの腎臓以外の器官における表現型

最後に、腎臓以外の器官への影響を検討した。興味深いことに、研究当初より *Aplm2*^{ΔIEC} マウスのおよそ 10–20% で後肢麻痺が観察されたため、脊髄を解析していた。蛍光免疫染色による解析過程で、CD31 で染色された血管内皮細胞に IgA や IgG が沈着する様子が認められた。血管壁への IgA を含む免疫複合体の沈着は IgA 血管炎という疾患の徴候である。しかし、IgA 血管炎患者では麻痺症状は観察されず、脊髄における血管壁に IgA 沈着が認められるかは不明である。そのため、*Aplm2*^{ΔIEC} マウスの脊髄への IgA 沈着と後肢麻痺との関連についても不明であるが、IgA を含む免疫複合体の影響は全身に波及している可能性が示された。

考察・展望

腸上皮特異的な *Aplm2* 欠損は、腸上皮細胞間隙の透過性の亢進、腸上皮バリア機能の低下とともにディスバイオーシスを引き起こした。なかでも pIgR の発現、機能低下によって腸管から血中移行したと考えられた IgA は糖鎖修飾不全をきたし、IgG と免疫複合体を形成することで腎臓に沈着する、IgA 腎症に類似した徴候を呈した。この糖鎖修飾不全 IgA は腸内細菌依存的に、腸管透過性の亢進やディスバイオーシスによる腸管

免疫系の活性化で産生されたと考えられる。実際、IgA 腎症患者で腸管透過性の亢進やディスバイオーシスが認められ、糖鎖修飾不全 IgA の存在量との相関が臨床研究により示されている。また、IgA 腎症のリスク遺伝子座には腸上皮バリアや腸管免疫系に関連する遺伝子が多数含まれるほか、IgA トランスサイトosis機能の低下をきたす pIgR 遺伝子の一塩基多型も報告されている。本博士論文研究の成果は、腸上皮バリアの機能低下やそれに伴う腸管免疫系の活性化が IgA 腎症の原因となることを示す実験的根拠であると考えている。

近年になり、腸管を標的とした IgA 腎症の治療戦略が立てられつつある。例えば、腸管局所で徐放されて腸管免疫系に作用する経口ステロイド製剤 Nefecon[®]が IgA 腎症患者を対象にした第3相臨床試験で治療効果を示している。また腸内細菌移植によっても、IgA 腎症の症状を改善させることが報告されている。今後、*Aplm2*^{ΔIEC} マウスの IgA 腎症やその関連疾患のさらなる病態解析によりその発症機序の解明に、さらに新規治療法の開発やエビデンス創出に貢献できると考えている。

論文審査結果の要旨

本審査委員会では、申請者は *Aplm2* 欠損が 1) 腸上皮バリア、2) 腎臓、3) その他の器官に与える影響という 3 つのセクションから構成される 25 分間の発表後、約 40 分間の質疑応答を行った。最後に申請者が退室し、審査委員による協議を行った。

1) ではまず、審査委員より回腸上皮細胞における pIgR の mRNA 発現低下と頂端膜への pIgR-IgA の輸送障害との関連について質問を受けた。これに対し、pIgR の新たな細胞膜への発現が減少したとともに、すでに細胞膜に発現していた pIgR も細胞内輸送が障害されたため、これらが相乗的に IgA の管腔分泌を低下させたと考えられると回答した。また、AP-1B 複合体の pIgR-IgA 輸送への関与は既知かという質問に対して、*Aplm2* 欠損マウスにおける pIgR 解析は本研究が初で、当初は側基底膜への発現が損なわれると予想されたが、IgA と pIgR が細胞質に蓄積する結果から、AP-1B 複合体が pIgR-IgA の頂端膜への輸送に関与することを初めて示したと回答した。さらに、血清に secretory component が検出された結果の解釈についての質問に対して、一度管腔へ輸送された IgA が流入した、もしくは側基底膜において pIgR と結合した IgA が細胞に取り込まれずにそのまま切断され血中に移行した、2つの可能性があるとして回答した。回答に対して、管腔への IgA 輸送が低下し、また分泌型 IgA ほどの巨大な分子が細胞間隙を通過するとは考えにくいと、後者の可能性が高いのではとのコメントをいただいた。

2) では、腸内細菌と IgA 腎症の関連について多くの質問を受けた。まず、*Aplm2*^{ΔIEC} マウスにおける腸内細菌と IgA 腎症との関連について質問を受け、抗生物質処置は血中 IgA 濃度や糖鎖修飾を改善させることから、腸内細菌は IgA の量と質の両方に影響していると回答した。続けて、腸内細菌のガラクトース転移酵素発現への関与について質問を受け、腸内細菌の定着によって産生増加する APRIL や BAFF などの液性因子は糖鎖修飾に影響を与えるため、その可能性は十分に考えられると回答した。さらに、*Aplm2*^{ΔIEC} マウスでは何らかの IgA 腎症を増悪させる腸内細菌が増加し、抗生物質処置によりその細菌が減少し徴候が改善したという可能性について質問された。その可能性は否定できないが、今回の実験ではスペクトルの異なる 4 種類の抗生物質を用いたためほぼ全ての腸内細菌が除去されたと考えられ、特定の細菌を探索することは困難であると回答した上で、幅広い腸内細菌に共通して保持されるリガンドに対する Toll-like receptor のシグナルは液性因子の産生増加を介して糖鎖修飾不全に関与することが報告されているため、*Aplm2*^{ΔIEC} マウスにおける IgA 腎症を引き起こす責任細菌は単独ではない可能性を補足した。次に、腎障害が認められなかった点について指摘を受けると、先行文献において IgA 腎症モデルマウスで腎障害が認められるまでに半年ほどかかる

ため、欠損誘導から約2週間で観察している本条件で腎障害を観察することは難しいと回答した。最後に、臨床の観点から *Aplm2*^{AIEC} マウスと臨床データと一致する点はこの質問に対しては、IgA の輸送低下をきたす pIgR の遺伝子多型が IgA 腎症で認められることから、pIgR の機能障害が IgA 腎症の発症に関与する可能性がある旨を回答した。続けて、IgA 腎症における GWAS について質問を受け、腸上皮バリア関連分子、例えば抗菌ペプチド *DEF* が IgA 腎症のリスク遺伝子座に含まれる既報があると回答した。

3) では麻痺症状について、*Aplm2* 全身欠損マウスで観察されるかという質問に対し、全身欠損マウスでは認められないが、これは大腸炎が重篤なためではないかと回答した。また、脊髄の IgA 沈着は一般的か、脳など他の中枢部位ではどうかという質問に対し、IgA 血管炎であるならば皮膚にも沈着が認められるはずだが、脊髄への沈着については臨床的なデータはなく、また脳の解析は実施できておらず不明であると回答した。

最後に、全体を通して、*Aplm2*^{AIEC} マウスで変化した IgA の量と質のうちのどちらが IgA 腎症に重要かという質問に対し、IgA 腎症の全患者で血中 IgA が高値を示すわけではないため、質の変化が重要と考えられると回答した。続けて、質が重要であるならば、pIgR の機能低下による腸管 IgA の血中移行は関係ないのではという指摘を受けたが、腸管で糖鎖修飾不全 IgA が産生されても pIgR が正常であれば管腔へ輸送されるために腎臓への影響はないと推察され、腸管における糖鎖修飾不全と pIgR の機能低下が同時に起こることが IgA 腎症の発症に重要ではないかと考えていると回答した。

公聴会ではまず、データについて、B 細胞で *B4galt* 発現が低下しているが、産生後に IgA の糖鎖修飾が切断される可能性について質問を受け、マウスで管腔に分泌された IgA の糖鎖が腸内細菌によって切断されて IgA 腎沈着を引き起こすという報告を挙げ、その可能性も否定できない旨を回答した。さらに、*Aplm2*^{AIEC} マウスの血中で増加した二量体 IgA は腎沈着の原因となるかという質問に対しては、二量体 IgA を含むことが予想される対照マウスの回腸培養上清を投与しても腎沈着は認められないため、やはり糖鎖修飾不全が重要であると回答した。臨床の観点から IgA 腎症と消化器疾患との関連に関する質問に対し、本邦では多くないが、欧州では炎症性腸疾患やセリアック病との併発が見られると回答した。また、腸内細菌による IgA 腎症治療について質問を受け、健常者の糞便移植により症状が改善する報告があり、実現の可能性は高いと回答した。

申請者の博士学位論文、学位審査委員会および公聴会での発表や試問への回答は概ね妥当であった。リーキーガットのモデルを作出し、IgA 腎症という腸管外疾患との因果関係を実証し、そのメカニズムの一端を明らかにした。本研究は学術的価値があるものと考えられ、博士（薬科学）を付与するに必要な能力を有すると判断した。

論文目録

Yusuke Kinashi, Keisuke Tanaka, Shunsuke Kimura, Masato Hirota, Seiga Komiyama, Tomoko Shindo, Akinori Hashiguchi, Daisuke Takahashi, Shinsuke Shibata, Shin-Ichiro Karaki, Hiroshi Ohno, Koji Hase. Intestinal epithelium dysfunctions cause IgA deposition in the kidney glomeruli of intestine-specific *Ap1m2*-deficient mice. *EBioMedicine*. 106:105256. 2024.