別表５
⑶

主　論　文　要　旨　No.1

報告番号	甲　乙　第　　　　　号	氏　名	木梨　祐輔

主 論 文 題 名 :

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

（内容の要旨）

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、腸上皮細胞による密着結合の形成、ムチンや抗菌ペプチドの産生が挙げられる。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、トランスサイトーシス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 µ1B 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。µ1B をコードする遺伝子 *Ap1m2* 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、管腔内の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。

そこで、本博士論文研究では、腸上皮バリアの破綻と腸管外疾患発症との因果関係を検証するためのモデルとして、タモキシフェン誘導性かつ腸上皮特異的 *Ap1m2* 欠損（*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$）マウスを作出した。本マウスを用いて、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を目指した。すなわち、8–10 週齢の *Villin*-Cre-ER^{T2} *Ap1m2*$^{fl/fl}$ マウスにタモキシフェンを投与して欠損を誘導し、15–20 日目に表現型を調べた。同様に処置した同性、同腹仔の *Ap1m2*$^{fl/fl}$ マウスをコントロールとした。

主　　論　　文　　要　　旨

まず、腸管恒常性や腸上皮バリア機能への影響を解析した結果、本実験条件では回腸および大腸の病態組織学的解析から炎症像は認められなかった。デキストランの腸管腔から血中への移行を指標として腸管透過性を評価したところ、*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$マウスでは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。つまり、*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$マウスでは腸上皮極性は顕著には破綻せず、細胞間隙の透過性が増大したと考えられた。

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、*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$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、*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$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。

また、*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$マウスの腸管腔内 IgA は減少傾向を示す一方、血中では顕著に増加した。血清を分子サイズごとに分画して IgA を測定すると、*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$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 が血中へ流入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、*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$マウスの回腸上皮における mRNA 発現量が減少していた。*Ap1m2* 欠損回腸オルガノイドに pIgR の発現誘導が知られる IL-17A を添加したところ、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、*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$マウスでは pIgR が細胞質に凝集し、IgA やリソソームマーカー分子である 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。つまり、基底膜で IgA と結合した pIgR の頂端膜への輸送は AP-1B 複合体依存的であり、*Ap1m2* 欠損は IgA トランスサイトーシスを破綻させ、血中への IgA の流入を引き起こしたと考えられる。したがって、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。

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流入が示唆された 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。IgA に注目し解析した結果、*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$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 沈着には IgG や補体因子 C3 も存在しており、IgA 腎症と類似した病態が観察された。IgA 腎症における免疫複合体の沈着は、IgA の糖鎖のうちガラクトースが欠損した IgA が血中で IgG と複合体を形成することで引き起こされる。*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$マウスの

主　論　文　要　旨

血中 IgA においても同様に糖鎖修飾の減少が示唆された。また、血中の IgA-IgG 複合体も増加していた。一方で、血中、尿中腎機能マーカーの測定から、著明な腎機能低下は認められなかった。そのため、*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$ マウスは IgA 腎症に類似した病態の初期段階を呈したと考えられた。

IgA 沈着メカニズムの解明に向け、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、*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$ マウスの腸管由来 IgA の投与で腎沈着が再現された。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 量は *Ap1m2*$^{\Delta IEC}$ マウスで多い傾向にあった。さらに、*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$ マウスの回腸粘膜固有層から取得した 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。

腸内細菌は腸管の IgA 産生に影響することから、*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$ マウスにおける IgA 腎症の徴候に腸内細菌が関与するかを検証した。抗生物質の投与により腸内細菌を除去した結果、*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$ マウスの血中 IgA の濃度および糖鎖修飾、IgG との複合体形成は改善し、IgA の腎沈着も抑制された。これより、*Ap1m2*$^{\Delta IEC}$ マウスにおける IgA 腎症の発症は腸内細菌依存的であることが明らかになった。

最後に、腎臓以外への影響を検討した。興味深いことに、当初より *Ap1m2*$^{\Delta IEC}$ 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の過程で、CD31 で染色された血管壁への IgA、IgG 沈着が認められた。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。現在のところ、この IgA 沈着と後肢麻痺との関連は不明であり、病態の解明にはさらなる解析が必要であるが、IgA を含む免疫複合体の影響が全身に波及している可能性が示された。

腸上皮特異的な AP-1B 複合体欠損は pIgR の発現と機能の異常により IgA の管腔への輸送を障害した。同時に腸管で IgA 糖鎖修飾異常をきたしたことで糖鎖修飾不全 IgA が血中に流入し、IgG と免疫複合体を形成して腎糸球体に沈着した。IgA 糖鎖修飾異常は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引き起こ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って示されている。また、IgA 腎症のリスク遺伝子座に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、機能低下をきたす 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。