

博士学位論文 2024 年度

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

慶應義塾大学大学院薬学研究科

木梨 祐輔

目次

1. 序論	3
2. 方法	5
2.1 動物実験	
2.2 <i>Aplm2</i> 遺伝子欠損の誘導	
2.3 抗生物質の処置	
2.4 生化学検査	
2.5 組織化学染色	
2.6 FITC-dextran 試験	
2.7 器官培養	
2.8 Ussing chamber を用いた経上皮電気抵抗の測定	
2.9 マウス小腸オルガノイドの作製と培養	
2.10 定量 PCR	
2.11 血清タンパク質のサイズ分画	
2.12 Enzyme-linked immunosorbent assay	
2.13 レクチン結合試験	
2.14 ウェスタンブロット	
2.15 蛍光免疫染色	
2.16 電子顕微鏡による解析	
2.17 組織からの免疫細胞の単離	
2.18 フローサイトメトリー	
2.19 B 細胞のエンリッチメント	
2.20 細菌の DNA 抽出および 16S rRNA 遺伝子のシーケンシング解析	
2.21 統計解析	
3. 結果	14
3.1 腸上皮特異的 <i>Aplm2</i> 欠損マウスの確立	
3.2 AP-1B 複合体の欠損は腸上皮細胞間隙の透過性を亢進させた	
3.3 AP-1B 複合体の欠損は RegIII γ の産生を低下させ、ディスバイオーシスを招いた	
3.4 AP-1B 複合体の欠損は pIgR の発現および管腔への IgA 輸送を障害した	
3.5 <i>Aplm2</i> ^{ΔIEC} マウスは IgA 腎症に類似した徴候を呈した	

3.6	<i>Aplm2</i> ^{ΔIEC} マウスの回腸で産生される IgA は腎沈着を引き起こした	
3.7	<i>Aplm2</i> ^{ΔIEC} マウスの回腸粘膜固有層で IgA 産生が増加した	
3.8	抗生物質処置は <i>Aplm2</i> ^{ΔIEC} マウスにおける IgA 腎症様の徴候を改善した	
3.9	<i>Aplm2</i> ^{ΔIEC} マウスでは IgA を含む免疫複合体が脊髄の血管壁にも沈着した	
4.	考察	19
5.	図	23
6.	表	38
7.	参考文献	42
	謝辞	48

1. 序論

腸管粘膜面は、管腔に存在する食物抗原や病原体、共生細菌などの大量の異物に常に曝露されている。こうした異物の体内への侵入を防ぐために、腸上皮細胞は物理的、生化学的なバリアを構築している¹。腸上皮細胞は密着結合により細胞同士を強固に結合し、細胞間隙の物質透過性を調節する²。特定の腸上皮細胞、例えば、Paneth 細胞は抗菌ペプチドを産生し、また杯細胞はムチンを分泌して粘液層を形成しており、いずれも細菌の上皮層への接近を防ぐ^{3,4}。さらに、腸上皮細胞はバリアの構築のために免疫細胞と協調する。腸上皮細胞は形質細胞が産生する immunoglobulin A (IgA) を polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) を介してトランスサイトシスにより細胞内輸送し、腸管腔へ分泌する⁵。分泌された IgA は病原体の増殖抑制や毒素の中和など異物に対してはクリアランスに働く一方、共生細菌に対しては定着を促し腸管恒常性の維持に寄与する⁶。

バリアを含め腸上皮細胞の機能維持には、管腔側である頂端膜と体内側である側基底膜それぞれに異なるタンパク質を配置させることで細胞極性を形成することが重要である。例えば、頂端膜には消化吸收を担う刷子縁酵素やトランスポーターなどの膜タンパク質を局在させる。対して、側基底膜には粘膜固有層の免疫細胞が産生するサイトカインに対する受容体や IgA 輸送を担う pIgR を局在させ、腸上皮バリア機能を調節する。このうち、主にエンドソームから側基底膜へのタンパク質輸送の一端を担う因子が adaptor protein (AP)-1B 複合体である⁷。AP-1B 複合体は γ 、 $\beta 1$ 、 $\sigma 1$ 、 $\mu 1B$ サブユニットからなるヘテロ四量体分子で、 $\mu 1B$ はタンパク質の tyrosine-based motif を認識して clathrin 依存的に標的タンパク質を側基底膜へ輸送する^{8,9}。 $\mu 1B$ をコードする遺伝子 *Ap1m2* を全身で欠損させたマウスでは、腸上皮細胞で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た結果、バリア機能が低下し大腸炎を発症する¹⁰。また、十二指腸において、E-cadherin の局在異常によってその裏打ちタンパク質 β -catenin が遊離して核移行が亢進し、上皮細胞の過増殖が認められる¹¹。さらに、*Ap1m2* 欠損は腸内細菌叢のバランス異常（ディスバイオーシス）を引き起こすほか、パターン認識受容体 Toll-like receptor (TLR) 3 や腸上皮間リンパ球と相互作用する分子 CD166 の側基底膜への局在を障害し、サイトカイン産生や腸管免疫系に異常をきたすことが近年報告された¹²⁻¹⁴。このように、AP-1B 複合体の極性輸送は腸上皮バリア機能を含めた腸管恒常性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、その結果、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、ディスバイオーシスと互いに増悪させる関係にある。腸上皮バリアの構成因子のうち、抗菌ペプチドや IgA 産生の減少はディスバイオーシスの原因となることが知られている^{15,16}。ディスバイオーシスは

腸上皮バリアを高める機能を有する細菌の消失や病原性細菌の増殖を引き起こし、腸上皮バリア機能の低下を招く可能性がある¹⁷。興味深いことに、このような腸管透過性の亢進やディスバイオーシスは炎症性腸疾患やセリアック病などの消化管疾患のみならず、腸管外器官における疾患でも認められる¹⁸。その一例として IgA 腎症が挙げられる¹⁹⁻²³。IgA 腎症は腎臓の糸球体、特にメサンギウム領域への IgA を含む免疫複合体の沈着が特徴で、免疫複合体の沈着が炎症を惹起して腎障害をきたす糸球体腎炎である²⁴。IgA 腎症の発症は糖鎖修飾不全 IgA、特にガラクトース欠損 IgA が引き金となる。この IgA 糖鎖を認識する IgG が結合することで免疫複合体が形成され、腎糸球体へ沈着すると考えられている²⁵⁻²⁷。現在のところ、糖鎖修飾不全 IgA が産生される場所やメカニズムは特定されておらず、IgA 腎症の発症と腸管透過性の亢進やディスバイオーシスとの関連は明らかになっていない。

臨床的な知見を裏付けるように、いくつかの疾患、例えばセリアック病や関節リウマチのモデルマウスでは腸管透過性の亢進が認められる^{28,29}。さらに、腸管透過性の亢進の改善により症状の改善が認められることから、腸管透過性の亢進は疾患増悪と関連があることが示唆されている。しかしながら、腸上皮バリアの破綻が疾患発症の原因となりうるか、その全容は十分に解明されていない。

AP-1B 複合体の知見を踏まえ、*Aplm2* 欠損は腸上皮バリア機能を低下させることから、リーキーガット症候群のモデルとなりうる。よって、*Aplm2* 欠損マウスの腸管外器官への影響を解析することにより、腸上皮バリアの破綻と腸管外疾患との因果関係を検証できると考えた。ただし、*Aplm2* は極性上皮細胞特異的に発現するが、腎臓をはじめ一部の腸管外器官においても発現が認められる。また、*Aplm2* 全身欠損マウスでは成獣期前から大腸炎を発症するため、腸管免疫系の発達に異常をきたす可能性が高い。そこで、正常な免疫系が形成された成獣期に *Aplm2* 欠損を誘導し、腸管に限局したバリア機能低下が原因で生じる腸管外器官への影響の検証を可能にするために、タモキシフェン依存的かつ腸上皮特異的に *Aplm2* 欠損を誘導することができる *Villin-Cre-ER^{T2} Aplm2^{fl/fl}* マウスを作出した。本博士論文研究では、腸上皮特異的 *Aplm2* 欠損マウスの腸上皮バリアの機能を解析するとともに腸管外器官への影響を探索し、腸管外器官における疾患の発症メカニズムを明らかにすることを目指した。

2. 方法

2.1 動物実験

全ての動物実験は慶應義塾動物実験委員会の承認 (A2022-201) を受けて、薬学部の動物施設にて明暗周期 12/12 時間、自由飲水、自由摂食条件で飼育した。Ussing chamber 実験は、静岡県立大学研究倫理委員会および静岡県立大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認 (215328、782-2203) を受けて、マウスを静岡県立大学食品栄養科学部に輸送し実験までの間同条件で飼育した。

Ap1m2^{n/n} マウスは大野博司氏らの研究グループによって作製され、分与された¹¹。また、*Villin-Cre-ER*^{T2} マウスは Sylvie Robine 氏より分与された³⁰。Specific pathogen-free 飼育室で、*Ap1m2*^{n/n} マウスと *Villin-Cre-ER*^{T2} マウスとの交配によって *Villin-Cre-ER*^{T2} *Ap1m2*^{n/n} マウスを作出し維持した。タモキシフェン処置の約 1 週間前にコンベンショナル飼育室に移動させ、馴化後に実験を開始した。腸管 IgA 投与実験に用いた野生型マウスは、C57BL/6JJcl マウス (CLEA, Tokyo, Japan) を購入し、実験までの期間コンベンショナル飼育室で飼育した。図 7 を除き、雌性マウスを用いた。

2.2 *Ap1m2* 遺伝子欠損の誘導

Ap1m2 欠損誘導のために、8–10 週齢 *Villin-Cre-ER*^{T2} *Ap1m2*^{n/n} マウスに対して 5 日おきに 3 回、10 mg/mL tamoxifen (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) を溶解した sunflower seed oil (Sigma Aldrich) を 100 μ L 投与し、初回の投与から 15–20 日目に実験に用いた。同腹仔、同性の *Ap1m2*^{n/n} マウスに対しても同様に処置し、コントロールとした。

2.3 抗生物質の処置

腸内細菌の除去のために、1.0 g/L ampicillin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、1.0 g/L neomycin (Nacalai Tesque)、1.0 g/L metronidazole (FUJIFILM Wako, Tokyo, Japan)、0.5 g/L vancomycin (FUJIFILM Wako) を水に溶かして抗生物質混合液とした。この抗生物質混合液を飲用水として自由飲水にてタモキシフェン投与開始 2 週間前よりマウスに与えた。同時に、抗生物質への馴化のために最初の 1 週間は 1 日 1 回、抗生物質混合液を 500 μ L 経口投与した。

2.4 生化学検査

イソフルランによる麻酔下で心臓から採血して 20–25°C で 0.5–1 時間静置したのち、25°C、10,000 $\times g$ で 1 分間遠心分離し、上清を回収して血清検体を得た。また、マウスを空ケージ中で排尿させ、尿検体を得た。オリエンタル酵母 (Tokyo, Japan) に生化学検査を依頼して、

血清クレアチニンと尿素窒素、尿アルブミン、総タンパク質、クレアチニン濃度を測定した。

2.5 組織化学染色

マウスより回腸末端部および大腸中央部をサンプリングし、zinc-formalin (Polysciences, Marlborough, MA) 中で約 1 時間固定した。その後、70%から 100% ethanol (Nacalai Tesque) へ段階的に移して脱水、xylene (Nacalai Tesque) に置換したのち、パラフィンに包埋した。切片は xylene で脱パラフィン後、100%から 70% ethanol に段階的に移して親水化させた。Hematoxylin-Eosin 染色は、切片を Mayer's Hematoxylin Solution (FUJIFILM Wako) に浸漬後、水で洗浄した。続いて、Eosin Y (FUJIFILM Wako)-Phloxine B (FUJIFILM Wako) 溶液に浸漬した。Alcian-blue 染色は、切片を 3% 酢酸 (FUJIFILM Wako) 溶液、Alcian Blue Solution (FUJIFILM Wako) に浸漬後、3% 酢酸および水で洗浄した。続いて、Nuclear Fast Red (Vector Laboratories, Burlingame, CA) により核を染色した。脱水および透徹後、切片を Mount-Quick (Daido Sangyo, Tokyo, Japan) により封入した。作製した標本は System Microscope BX53 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察、撮影した。

2.6 FITC-dextran 試験

4 時間の絶食後に、Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Nacalai Tesque) で調整した 4 kD または 70 kDa FITC-dextran (Sigma Aldrich) を 60 mg/100 g bodyweight で経口投与した。投与 45 分後に採血し、Infinite 200Pro plate reader (TECAN, Männedorf, Switzerland) を用いて励起波長 485 nm、蛍光波長 528 nm で蛍光強度を測定し血中 FITC-dextran 濃度を算出した。検量線作成のスタンダードは野生型マウスの血清で段階希釈した FITC-dextran を用いた。

2.7 器官培養

回腸より直径 3 mm の組織片を採取し、100 U/mL Penicillin and Streptomycin Mixed Solution (Nacalai Tesque)、12.5 mM HEPES (Nacalai Tesque)、2-Mercaptoethanol (Gibco, Grand Island, NY) (1:1000)、GutaMax (Gibco) (1:100) 含有 RPMI 1640 (Nacalai Tesque) 培地に移し、37°C、5% CO₂ の培養条件下で 6 時間培養した。培養上清を回収し、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) とマウス投与実験に用いた。投与実験では、上清を希釈して 200 ng の IgA を野生型マウスに投与し、2 時間後に PBS で灌流して腎臓を採取し、蛍光免疫染色に用いた。

2.8 Ussing chamber を用いた経上皮電気抵抗の測定

Ussing chamber への組織調製と経上皮電気抵抗 (trans-epithelial electrical resistance: TEER) の測定は先行文献に従った³¹。摘出した回腸末端部を腸間膜との境界に沿って切り開いて

Krebs-Ringer 溶液で洗浄後、実体顕微鏡下において、Krebs-Ringer 溶液中で漿膜と平滑筋層を組織から剥離した。粘膜と粘膜下層を slider (Recording area 0.25 cm², Physiologic Instruments, San Diego, CA) 間に装着し、Ussing chamber (Physiologic Instruments) に挿入した。5 mM glucose 含有 Krebs-Ringer 溶液または Krebs-Ringer 溶液を 1 mL 基底側チャンバーと管腔側チャンバーにそれぞれ入れた。実験中は 37°C に保温し、95% O₂、5% CO₂ 混合ガスを通気し続けた。

TEER の測定のために、クランプ電圧を 0 から 10 mV まで 1 分間隔で 3 秒間変化させた。クランプ電圧を変化させるのに必要な電流の変化量 (ΔI_{10mV}) を測定することで、TEER を $TEER (m\Omega cm^2) = 10 (mV) / \Delta I_{10mV} (\mu A / cm^2)$ により算出した。なお、Ussing chamber へ組織を固定して 1 時間安定化させた後の測定値を用いた。

2.9 マウス小腸オルガノイドの作製と培養

小腸オルガノイドの作製は先行文献の方法に従った³²。タモキシフェン末処置の *Ap1m2*^{n/n} および *Villin-Cre-ER*^{T2} *Ap1m2*^{n/n} マウスより摘出した回腸からカバーガラスを用いて絨毛を除去し、5 mm 幅に切り分けてから 2 mM EDTA (Nacalai Tesque) 含有 PBS に移して勢いよくピペッティングした。静置後に上清を捨て、2 mM EDTA/PBS 中で 30 分間再び静置した。上清を捨てたのち、HBSS(-) without Ca, Mg, with Phenol Red (Nacalai Tesque) 中で勢いよくピペッティングした。静置後、上清を回収して等量の 100 U/mL Penicillin and Streptomycin Mixed Solution と Glutamax (1:100) を含む Advanced DMEM/F12 (Gibco) を加え、70 μ m cell strainer (Corning, Corning, NY) に通した。70 × g で 3 分間遠心分離してペレット中に陰窩を回収した。調製した陰窩を Matrigel (Corning) に再懸濁して IntestiCult Organoid Growth Medium (Mouse) (Stemcell Technologies, Cologne, Germany) が入った 48-well plate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) に移し、37°C、5% CO₂ の培養条件下で培養した。

Cre-ER^{T2} recombinase 活性化のために、播種から 1 日後に 1 μ M 4-hydroxytamoxifen (Selleckchem, Houston, TX) で 24 時間処理した。5 日後に 10 ng/mL recombinant mouse IL-17A (Abcam, Cambridge, MA) で処理した。翌日、オルガノイドを TRIzol LS reagent (Thermo Fisher Scientific) に回収し、定量 PCR に用いた。

2.10 定量 PCR

先行文献の方法を一部改変して実施した³³。回腸中央部の組織 1 cm 程度を、30 mM EDTA 含有 Hanks' balanced salt solution (HBSS) (Gibco) に 5–10 分浸漬し、実体顕微鏡下で針により上皮層を剥離した。RNA は TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) により製品プロトコルに従って抽出し、cDNA は ReverTra Ace qPCR Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO,

Osaka, Japan) により合成した。その後、SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) により、CFX Connect real-time PCR detection system (Bio-Rad) を用いて定量 PCR を実施した。使用したプライマーは表 1 に記載した。

2.11 血清タンパク質のサイズ分画

各群プールした血清検体を PBS で希釈後、Superose 6 10/300GL (GE Healthcare Life Science, Wauwatosa, WI) によるゲル濾過クロマトグラフィーで分画した。キャリブレーションは High-molecular-weight gel filtration calibration kits (GE Healthcare Life Science) により実施した。画分は ELISA およびウエスタンブロットに用いた。

2.12 Enzyme-linked immunosorbent assay

IgA の測定には、0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (Nacalai Tesque) で希釈した anti-mouse IgA antibody (1:100; Cat. No. A90-103A; Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) を 96-well plate (Thermo Fisher Scientific) に 100 μ L 入れて 20–25°C で 1 時間静置した。以下、温度は同様である。IgA-IgG 免疫複合体の測定は anti-mouse IgG antibody (1:100; Cat. No. A90-131A; Bethyl Laboratories) をコーティングした。Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBS-T) (Takara, Shiga, Japan) で洗浄したのち、2% bovine serum albumin (BSA) (Nacalai Tesque) 含有 PBS を 200 μ L 入れて 30 分間静置した。TBS-T で洗浄後、cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim, Germany) で処理した腸管内容物または血清を 2% BSA/PBS で希釈した検体を 100 μ L 入れて 1 時間静置した。TBS-T で洗浄後、2% BSA/PBS で希釈した HRP-conjugated anti-mouse IgA antibody (1:50,000–100,000; Cat. No. A90-103P; Bethyl Laboratories) を 100 μ L 入れて 1 時間静置した。TBS-T で洗浄後、100 μ L の 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate solution (Thermo Fisher Scientific) または ELISA POD Substrate TMB Kit (Popular) (Nacalai Tesque) と 5–10 分間反応させ、1.2 M H₂SO₄ (Nacalai Tesque) 溶液を 100 μ L 加えて反応停止後、Infinite 200Pro plate reader で 450 nm および 570 nm における吸光度を測定した。

2.13 レクチン結合試験

先行文献を一部改変して実施した³⁴。Anti-mouse IgA antibody でコーティングした 96-well plate に PBS で希釈した 1 μ g/mL IgA を含む血清検体を 100 μ L 入れて 20–25°C で 1 時間静置した。以下、温度は同様である。TBS-T で洗浄後、2% BSA/PBS で希釈した biotinylated *Ricinus communis* agglutinin I (1:1,000; B-1085-5; Vector Laboratories, Burlingame, CA) 、 biotinylated *Sambucus nigra* lectin (1:400; B-1305-2; Vector Laboratories) を 100 μ L 入れて 1 時間静置した。TBS-T で洗浄後、2% BSA/PBS で希釈した HRP-conjugated streptavidin (1:10,000; Cat. No. 3999;

Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を 100 μ L 入れて 1 時間静置した。検出および吸光度の測定は ELISA の項で記した方法と同様に実施した。

2.14 ウェスタンブロット

剥離した腸上皮を 1 mM NaF (Nacalai Tesque) 含有 1 $\times$ RIPA Buffer with 1% SDS (10 $\times$) (Nacalai Tesque) 溶液中で氷上に 30 分間静置し、タンパク質を溶解した。4 $^{\circ}$ C、10,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離し、上清を等量の 2 $\times$ Sample Buffer Solution with 2-ME for SDS-PAGE (Nacalai Tesque) と混合して 95 $^{\circ}$ C で 5 分間静置した。腸上皮タンパク質を SDS-PAGE によって分離し、Immobilon-P membrane (Merck, Kenilworth, NJ) へ転写した。メンブレンを PVDF Blocking Reagent (TOYOBO) でブロッキング後に TBS-T で洗浄し、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO) で希釈した anti-phospho-STAT3 antibody (1:2000; clone D3A7; Cell Signaling Technology) と、続いて HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:2000; Cat. No. 7074; Cell Signaling Technology) と反応させた。化学発光および明視野画像の撮影は Chemi-Lumi One series (Nacalai Tesque) および Amersham ImageQuant800 (Cytiva, Marlborough, MA) を用いた。その後、WB Stripping Solution (Nacalai Tesque) で 20–25 $^{\circ}$ C、15 分間処理して抗体をメンブレンから除去した。同様に、anti-STAT3 antibody (1:1000; clone D3Z2G; Cell Signaling Technology) または anti- β -actin antibody (1:2000; clone 6D1; FUJIFILM Wako) と、続いて HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody または HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (1:2000; Cat. No. 7076; Cell Signaling Technology) と反応させた。化学発光および明視野画像の撮影は前述と同様に実施した。バンドの強度は Fiji を用いてデンシトメトリーにより測定した³⁵。

サイズ分画した血清タンパク質についても、SDS 処理からメンブレンへの転写を同様に実施した。TBS-T で希釈した 5% Skim Milk (Nacalai Tesque) 溶液でブロッキング後、5% Skim Milk/TBS-T で希釈した anti-pIgR antibody (1:2,000; Cat. No. AF2800; R&D Systems, Minneapolis, MN)、続いて HRP-conjugated anti-goat IgG antibody (1:2,000; Cat. No. 705-035-147; Jackson ImmunoResearch) と反応させた。化学発光および明視野画像の撮影も同様に実施した。

2.15 蛍光免疫染色

腎臓切片の作製について、マウスを PBS で灌流後に腎臓を摘出し、4% paraformaldehyde (PFA) (Nacalai Tesque) 含有 PBS 中で一晩浸漬固定した。30% sucrose (Nacalai Tesque) 溶液に置換後、OCT compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) に包埋して凍結切片を作製した。抗生物質実験では、未灌流のマウスから腎臓を摘出して同様に固定した。70%から 100% ethanol の段階的な処理により脱水、xylene に置換後、パラフィンに包埋してパラフィン切片を作製した。

回腸切片の作製について、pIgR 染色用に、摘出した回腸組織を 4% PFA/PBS 中で 1 時間、浸漬固定した。30 % sucrose 溶液に置換後、OCT compound に包埋して凍結切片を作製した。また、ZO-1 と E-cadherin 染色用に、回腸組織を摘出した直後に OCT compound に包埋した。10 μ m の切片を作製後、4% PFA/PBS 中で 1 時間固定した。さらに、RegIII γ 染色用に、組織化学染色の項で記した方法と同様に回腸組織を zinc-formalin 中で 1 時間浸漬固定し、脱水、置換後にパラフィンに包埋した。

脊髄切片の作製について、マウスを 0.1 M phosphate buffer (PB) (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) 、続いて 4% PFA/PBS で灌流後に腰髄付近を採取し、4% PFA/PBS 中で一晩浸漬固定した。30 % sucrose 溶液に置換後、OCT compound に包埋して凍結切片を作製した。

凍結切片は PBS で洗浄して OCT compound を除去した。また、パラフィン切片は、組織化学の項で記した方法と同様、脱パラフィンおよび親水化を実施した。0.3% Triron X-100 (Nacalai Tesque) 含有 PBS による前処理、10% normal donkey serum (Sigma Aldrich) 含有 PBS によるブロッキング後、0.2% BSA/PBS で希釈した一次抗体と 20–25°C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、0.2% BSA/PBS で希釈した二次抗体と 20–25°C で 2–3 時間反応させた。ProLong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) で封入した標本を共焦点レーザー顕微鏡 FV3000 (Olympus) によって観察、撮影した。使用した抗体は表 2 に記載した。腎臓切片における IgA、IgG および C3 の定量のために、一定値以上の蛍光強度を示す面積と糸球体の面積を Fiji により測定した。

2.16 電子顕微鏡による解析

電子顕微鏡による解析は、先行文献の方法に従って実施した³⁶。透過型電子顕微鏡による腎臓における高電子密度沈着物の観察のため、摘出した腎臓を 2.5% glutaraldehyde (TAAB Laboratories, England, UK) 含有 PB 中で 4°C、12–24 時間固定した。0.1 M PB で洗浄して、1% osmium tetroxide (FUJIFILM Wako) 中で 4°C、2 時間固定した。その後、50%から 100% ethanol に段階的に移し、acetone (Sigma Aldrich) および n-butyl glycidyl ether (QY1; Okenshoji, Tokyo, Japan) に浸漬した。段階的にエポキシ樹脂の濃度を上げ、最終的に 100% エポキシ樹脂 (27.0 g MNA, 51.3 g EPOK-812, 21.9 g DDSA, 1.1 mL DMP-30/100 g Epon; Okenshoji) に浸漬して包埋した。ウルトラミクロトーム EM UC7 (Leica, Wetzlar, Germany) によって厚さ 80 nm の切片を作製して uranyl acetate および lead citrate で染色したのち、透過型電子顕微鏡 JEM-1400 Plus (JEOL, Tokyo, Japan) によって 100 keV で観察、撮影した。

免疫電子顕微鏡解析による腸上皮細胞の pIgR の検出のため、腸管の凍結切片を 0.1 M PB で希釈した 0.01% saponin (Merck, Darmstadt, Germany) 含有 5.0% Block Ace (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) でブロッキングした。その後、anti-pIgR antibody (1:100)、続いて

Hoechst 33258 (1:1000; Sigma Aldrich) および Alexa Fluor 488 FluoroNanogold-conjugated anti-goat IgG antibody (1:100; Nanoprobes, Yaphank, NY) と反応させた。Alexa Fluor 488 シグナルを共焦点レーザー顕微鏡 Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Baden Wurttemberg, Germany) によって観察し、電子顕微鏡で観察する領域を決定した。切片を 2.5% glutaraldehyde/PB 中で 1 時間固定して nanogold シグナルをエンハンスさせ、1.0% osmium tetroxide 中で 1.5 時間再度固定した。uranyl acetate により染色後、50–100% ethanol、acetone、QY1、QY1:エポキシ樹脂 (1:1)、100% エポキシ樹脂に浸漬して包埋した。切片の作製から観察は透過型電子顕微鏡の解析と同様である。

走査型電子顕微鏡による腸上皮細胞に接着するセグメント細菌の観察のため、摘出した回腸を 2.5 % glutaraldehyde/PB 中で 4°C、12–24 時間固定し、洗浄後、さらに 1% osmium tetroxide 中で 4°C、2 時間固定した。その後、検体を段階的濃度の ethanol によって脱水し、臨界点乾燥装置 EM CPD300 (Leica Biosystems) によって乾燥させた。検体を aluminum scanning stage に置きクイックコーター sc-701 (SANYU ELECTRON, Tokyo, Japan) を用いて 30 秒間 5 mA で Pt-Pd コートさせ、走査型電子顕微鏡 SU6600 (Hitachi High Tech, Tokyo, Japan) によって 5 kV で観察、撮影した。

2.17 組織からの免疫細胞の単離

回腸粘膜固有層からの免疫細胞の単離は、以前に報告された方法を改変して実施した³⁷。パイエル板を採取した後の回腸を PBS で vortex 洗浄後、1 mM dithiothreitol (Nacalai Tesque)、20 mM EDTA、100 U/mL Penicillin and Streptomycin Mixed Solution、12.5 mM HEPES 含有 HBSS (–) without Ca, Mg, with Phenol Red 中で 37°C、20 分間振盪した。Vortex を用いて PBS による洗浄後に解剖バサミを用いてミンスし、0.2 U/mL Liberase (Roche)、0.125 mg/mL DNase I (Sigma Aldrich)、2% newborn calf serum (NBCS) (Gibco)、100 U/mL Penicillin and Streptomycin Mixed Solution、12.5 mM HEPES 含有 RPMI 1640 中で 37°C、30 分間振盪した。その後、40/80% Percoll (Cytiva) 勾配によって免疫細胞を回収した。

パイエル板および腸間膜リンパ節からの免疫細胞は、100 µm nylon mesh cell strainer (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) 上でシリンジを用いて破碎し免疫細胞を回収した。

2.18 フローサイトメトリー

単離した細胞を 2% NBCS/PBS で希釈した TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) antibody (1:200; clone S17011E; BioLegend, San Diego, CA) で Fc 受容体をブロッキングした。その後、IgA 陽性細胞の解析のために、表 3A に記載した抗体で細胞表面の抗原を染色し、7-AAD Viability Staining Solution (BioLegend) で死細胞を染色した。また、胚中心反応に関与

する細胞の解析のために、パイエル板および腸間膜リンパ節から単離した細胞については表 3B に記載した抗体で細胞表面の抗原を染色し、Fixable Viability Stain 780 (BD Biosciences) で死細胞を染色した。洗浄したのち、Transcription Factor Buffer Set (BD Biosciences) で固定および透過処理し、表 3C に記載した抗体で転写因子を染色した。染色した細胞は FACSCelesta flow cytometer、BD FACS Diva software version 8.0 (BD Biosciences) で測定し、FlowJo version 10.7 (FlowJo, Ashland, OR) を用いて解析した。

細胞数測定は 200 μ L の細胞懸濁液、50 μ L の Precision Count Beads (BioLegend)、150 μ L の eFluor 450-conjugated anti-mouse CD45 (clone 30-F11; Thermo Fisher Scientific)、TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) antibody、7-AAD Viability Staining Solution 含有 2% NBCS/PBS を混合し、CD45 陽性 7-AAD 陰性細胞数と Precision Count Beads 数との比により算出した。

2.19 B 細胞のエンリッチメント

回腸粘膜固有層から免疫細胞を単離後、B 細胞を MojoSort Mouse Pan B Cell Isolation Kit II (BioLegend) によってエンリッチメントし、定量 PCR に用いた。

2.20 細菌の DNA 抽出および 16S rRNA 遺伝子のシーケンシング解析

16S rRNA 遺伝子ライブラリーの調製は、以前に報告された方法を改変して実施した³⁸。QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、回腸内容物からゲノム DNA を抽出した。その後、KAPA HiFi HS ReadyMix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA) と 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 可変領域に対するプライマーを用いた PCR により DNA を増幅した。アンプリコンを AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, CA) によって精製したのち、Nextera XT Index kit (Illumina, San Diego, CA) を用いて 2 種類のインデックスを付加した。再び AMPure XP beads で精製後、ライブラリーを 4 nM になるように 10 mM Tris-HCl (Nacalai Tesque) 溶液で希釈した。プールしたライブラリーを MiSeq system (Illumina) により 300 bp ペアエンドでシーケンスした。使用したプライマーは表 4 に記載した。

データ解析も同様に、以前に報告された方法にいくつかの改変を加えて実施した³⁸。FASTQ ファイルを QIIME2 (QIIME2 version 2022.2) を用いて解析した³⁹。qza 形式に変換後、QIIME2 paired-end-demux により demultiplex し、DADA2 plugin for QIIME2 によりノイズを除去した。Taxonomy assignment には SILVA database (version 138) で学習させた naïve Bayes fitted classifier による feature-classifier plugin for QIIME2 を用いた⁴⁰。系統樹作成は QIIME2 align-to-tree-mafft-fasttree を、多様性解析は QIIME2 core-metrics-phylogenetic を、相対存在量の算出は taxa collapse QIIME2 plugin を用いた。

2.21 統計解析

全ての統計解析は Prism version 10.2.0 (GraphPad, La Jolla, CA) を用いて実施した。2 群間における群間差は unpaired two-tailed Mann-Whitney test を用いた。オルガノイド、抗生物質の実験における群間差は two-way analysis of variance with Bonferroni's multiple comparison test を用いた。Feature taxa の同定には Liner Discrimination Analysis Effect Size (LEfSe) を用いた⁴¹。

3. 結果

3.1 腸上皮特異的 *Ap1m2* 欠損マウスの確立

成獣期の *Villin-Cre-ER^{T2}* *Ap1m2^{fl/fl}* マウスに 5 日おきに 3 回タモキシフェンを経口投与し腸上皮特異的 *Ap1m2* 欠損を誘導した (図 1A)。同様にタモキシフェン処置を施した同性、同腹仔の *Ap1m2^{fl/fl}* マウスをコントロールとして、初回の投与から 15–20 日目に解析した。この条件で、回腸上皮で *Ap1m2* の発現がコントロールの 20%程度にまで抑制された (図 1B)。*Villin* および *Ap1m2* は腸管のみならず、腎臓の上皮細胞でも発現が認められるが、腎臓では *Ap1m2* 発現量は変化しなかった (図 1B)。これより、腸上皮特異的な *Ap1m2* 欠損マウスが確立され、以降本マウスを *Ap1m2^{ΔIEC}*、およびそのコントロールを *Ap1m2^{fl/fl}* と表記する。

3.2 AP-1B 複合体の欠損は腸上皮細胞間隙の透過性を亢進させた

まず、*Ap1m2* 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。大腸炎を自然発症する *Ap1m2* 全身欠損マウスと異なり¹⁰、Hematoxylin-Eosin や Alcian-Blue 染色像から *Ap1m2^{ΔIEC}* マウスの回腸、大腸ともに上皮層の損傷や免疫細胞の浸潤といった炎症の所見は認められなかった (図 1C,D)。さらに、Paneth 細胞や杯細胞も正常に観察されたことから、腸上皮特異的な *Ap1m2* 欠損は細胞分化に影響を与えず、重篤な炎症反応も引き起こさないことが示された。

Ap1m2^{ΔIEC} マウスの腸管透過性を評価するために、分子量の異なる 2 種類の FITC-dextran をそれぞれマウスに経口投与し、血中移行した濃度を測定した。*Ap1m2^{fl/fl}* マウスと比較して 4 kDa および 70 kDa いずれの血中濃度も有意な増加が認められ、ある程度分子量の大きな物質の透過性まで亢進していることが示唆された (図 1E)。一方、蛍光免疫染色による解析から、回腸では、密着結合を構成する分子 ZO-1 や接着結合の構成を分子する E-cadherin の発現は変化していなかった (図 1F)。また、電解質の移動により管腔側と基底側の間に形成される電位差から測定される TEER は透過性の指標としてしばしば用いられる。Ussing chamber を用いて、マウスから摘出した回腸における TEER を測定したが、*Ap1m2^{fl/fl}* と *Ap1m2^{ΔIEC}* マウスで差は認められなかった (図 1G)。これらのデータは、*Ap1m2^{ΔIEC}* マウスの腸管は上皮層の損傷を伴う経路や電解質特異的な経路ではなく、細胞間隙を通過する経路の物質透過性が亢進したことを示唆した。

3.3 AP-1B 複合体の欠損は RegIIIγ の産生を低下させ、ディスバイオーシスを招いた

次に、生化学的バリアへの影響を解析した。先の Alcian-Blue 染色から、杯細胞の分布やムチンの発現は変化していないため、粘液層は正常に形成されていると予想された (図 1D)。

抗菌レクチンの一つに、グラム陽性細菌を標的とし、特にセグメント細菌の増殖や上皮への接着を抑制する RegIII γ がある⁴²。定量 PCR と蛍光免疫染色解析から、*Ap1m2* ^{Δ IEC} マウスの回腸上皮細胞で RegIII γ の mRNA とタンパク質の発現量が減少した (図 2A, B)。RegIII γ の発現は interleukin (IL)-22 が腸上皮細胞の IL-22Ra1 に作用し STAT3 を活性化することで誘導される^{43,44}。リン酸化 STAT3 をウェスタンブロットにより調べると、そのシグナル強度が *Ap1m2* ^{Δ IEC} マウスで有意に減少していた (図 2C)。よって、*Ap1m2* 欠損腸上皮細胞における IL-22-STAT3 経路の活性化レベルの低下が RegIII γ の減少の原因である可能性が示された。

RegIII γ による腸内細菌の制御が失われた *Ap1m2* ^{Δ IEC} マウスの回腸では、セグメント細菌が増殖し腸上皮細胞への接着が増加している様子が走査型電子顕微鏡で観察された (図 3A)。さらに、16S rRNA 遺伝子のシーケンシング解析によって回腸内細菌叢を調べたところ、 α 多様性が有意に減少し、 β 多様性の変動も認められた (図 3B, C)。属レベルで細菌の相対存在量と比較すると、*Ap1m2* ^{Δ IEC} マウスでセグメント細菌 *Candidatus Arithromitus* の増加、*Turicibacter*、*Dubosiella*、unclassified Muribaulaceae の減少が認められ、これらの細菌は有意に変化していた (図 3D, E)。

3.4 AP-1B 複合体の欠損は pIgR の発現および管腔への IgA 輸送を障害した

糞便抽出物を用いて管腔に分泌された IgA を測定すると、*Ap1m2* ^{Δ IEC} マウスで減少傾向を示した一方で、血中においては顕著に増加した (図 4A, B)。血清タンパク質をサイズ排除クロマトグラフィーによって分子量ごとに分画して各画分に含まれる IgA を測定すると、*Ap1m2* ^{Δ /n} マウスの血中 IgA は、主要な構成単位である単量体と考えられる画分 (No. 8) がほとんどであった。対して、*Ap1m2* ^{Δ IEC} マウスでは単量体も増加したが、主に粘膜面で産生される二量体やそれ以上の多量体 IgA と考えられる画分 (No. 4-6) が主要であった (図 4C)。さらに、これらの画分では secretory component が検出された (図 4D)。したがって、*Ap1m2* 欠損は腸管で産生された二量体や多量体 IgA を血中へ流入させる可能性が示された。

この可能性を検証するために、腸上皮細胞における IgA を粘膜固有層から腸管腔へ輸送する因子 pIgR を解析した。*Ap1m2* ^{Δ IEC} マウスの回腸上皮細胞では、mRNA 発現量の有意な減少が認められた (図 5A)。pIgR は IL-17A によって誘導されることが知られている^{45,46}。*Ap1m2* ^{Δ /n} および *Villin-Cre-ER*^{T2} *Ap1m2* ^{Δ /n} マウスから作出した回腸オルガノイドを用いて、*Ap1m2* 欠損が IL-17A シグナルによる *Pigr* 発現への影響を評価した。オルガノイド実験ではタモキシフェン活性体 4-ヒドロキシタモキシフェンを処理して *Ap1m2* 欠損を誘導したのち、IL-17A を添加した (図 5B, C)。その結果、コントロールでは IL-17A による *Pigr* 発現誘導が確認されたが、*Ap1m2* 欠損オルガノイドではその発現誘導が半分程度に減弱した (図 5D)。これらは *Ap1m2* 欠損が IL-17A シグナルを障害して *Pigr* 発現を低下させたことを示唆する。

続いて、pIgR の細胞内局在を観察した。蛍光免疫染色解析から先行研究と同様に⁴⁷、*Ap1m2^{fl/fl}*マウスの回腸上皮細胞ではpIgRは主に核周囲のゴルジ体と思われる細胞内小器官に局在していた(図 5E)。対して、*Ap1m2^{ΔIEC}*マウスではpIgRは大きな顆粒状に蓄積して、細胞質全体に散在していた。また、*Ap1m2^{fl/fl}*マウスの回腸上皮細胞内ではIgAは検出されない一方、*Ap1m2^{ΔIEC}*マウスではpIgR陽性顆粒においてIgAの共局在が認められた(図 5E)。さらに、pIgRの蓄積はリソソームマーカー分子であるLAMP-1で共染色された(図 5F)。免疫電子顕微鏡による解析からも、pIgRシグナルが高電子密度構造物を含むリソソーム様の巨大な膜面分で検出された(図 5G)。これより、AP-1B複合体の欠損はpIgR-IgAの管腔への輸送を破綻させ、リソソームへの蓄積を引き起こしたと想定された。

3.5 *Ap1m2^{ΔIEC}* マウスは IgA 腎症に類似した徴候を呈した

腸上皮バリア機能の低下により血中へ流入したIgAは、全身循環を経て腸管から離れた器官に影響を与える可能性が考えられた。そこで、IgAに注目し網羅的解析を進めたところ、蛍光免疫染色解析から*Ap1m2^{ΔIEC}*マウスではIgAが腎臓の糸球体に沈着していた(図 6A)。このIgA沈着にはIgGや補体因子C3も認められた(図 6A)。透過型電子顕微鏡による解析からも、高電子密度沈着物が*Ap1m2^{ΔIEC}*マウスのメサングウム領域で観察された(図 6B)。こうした徴候はIgA腎症に特有である。

臨床およびモデルマウスの研究から、IgA腎症ではガラクトースの欠損を特徴とする糖鎖修飾不全IgAの存在が認められ、そのIgAがIgGと複合体を形成することで腎臓への沈着を招くと考えられている^{25-27,48-50}。そこで、ガラクトース結合レクチン *Ricinus communis* agglutinin-I (RCA)、ガラクトースに続くシアル酸結合レクチン *Sambucus nigra* lectin (SNA) を用いてIgA糖鎖を評価した。その結果、*Ap1m2^{fl/fl}*マウスと比較して、*Ap1m2^{ΔIEC}*マウスの血中IgAはRCAおよびSNAとの反応性も有意に低下したため、ガラクトースやシアル酸修飾の減少が示唆された(図 6C)。さらに、IgA-IgG免疫複合体は*Ap1m2^{ΔIEC}*マウスの血中で有意に増加した(図 6D)。しかしながら、血中腎機能マーカーのクレアチンは*Ap1m2^{ΔIEC}*マウスで有意な増加、尿素窒素は増加傾向を示したが、これらの差は僅かであった(図 6E)。また、尿中腎機能マーカーであるアルブミンおよび総タンパク質のクレアチニン比は変化していなかった(図 6F)。したがって、本条件において、*Ap1m2^{ΔIEC}*マウスは腎機能障害をきたしておらず、IgA腎症の初期段階を呈したと考えられた。なお、本博士論文研究の実験では雌性マウスを用いたが、雄性マウスでもIgA糖鎖修飾不全、免疫複合体の形成、腎沈着などのIgA腎症の徴候は観察され、*Ap1m2^{ΔIEC}*マウスの表現型に性差は認められなかった(図 7)。

3.6 *Ap1m2*^{ΔIEC} マウスの回腸で産生される IgA は腎沈着を引き起こした

次に、腸上皮特異的な *Ap1m2* の欠損が IgA の腎沈着を引き起こすメカニズムを解析した。pIgR の機能低下により腸管 IgA が血中に流入したという仮説を踏まえ、実際に腸管で産生された IgA が腎沈着を引き起こすかを検証した。回腸組織の培養によって腸管に由来する IgA を培養上清中に回収し、両群で等量の IgA を含むよう希釈した培養上清を野生型マウスの静脈内に投与した (図 8A)。その結果、*Ap1m2*^{ΔIEC} マウスの回腸培養上清の投与は野生型マウスの腎臓で IgA、IgG の沈着を引き起こした (図 8B)。よって、IgA の糖鎖修飾不全は回腸で生じたことが示唆された。

3.7 *Ap1m2*^{ΔIEC} マウスの回腸粘膜固有層で IgA 産生が増加した

IgA 糖鎖は B 細胞内の糖転移酵素により修飾されるため、腸管免疫系を詳細に解析した。腸管の実行組織で、主要な IgA 産生場所である粘膜固有層における免疫細胞構成をフローサイトメトリーにより調べた (図 9A)。*Ap1m2*^{ΔIEC} マウスでは回腸粘膜固有層中の免疫細胞数が有意に増加し、それに伴って IgA 陽性形質細胞数も有意に増加した (図 9B, C)。この結果と一致して、回腸の器官培養により上清に分泌された IgA は *Ap1m2*^{ΔIEC} マウスで有意に増加したことから、回腸粘膜固有層における IgA 産生の増加が示唆された (図 9D)。一方、腸管の誘導組織であり、胚中心反応によって IgA へのクラススイッチを促すパイエル板や腸管膜リンパ節中の IgA 陽性 B 細胞、胚中心 B (germinal center B: GCB) 細胞および濾胞性ヘルパー T (follicular helper T: Tfh) 細胞の割合や細胞数に変化は認められなかった (図 10)。したがって、*Ap1m2*^{ΔIEC} マウスの回腸で認められる IgA 産生の増加は、胚中心反応の T 細胞依存的な経路ではなく、粘膜固有層における T 細胞非依存的な経路で誘導された可能性が示唆された。

マウス IgA に修飾される N 型糖鎖である N-アセチルグルコサミンに対してガラクトースを β-1,4 結合で付加する酵素が β-1,4-galactosyltransferase (β4GalT) ファミリーであり、このうち B4GalT1 欠損マウスは IgA 腎症の徴候を呈する⁴⁸。回腸粘膜固有層の B 細胞における β4GalT ファミリーの mRNA 発現量を定量 PCR により測定したところ、*Ap1m2*^{ΔIEC} マウスで *B4galt2*, *B4galt3*, *B4galt7* が有意に減少した。そのため、*B4galt* ファミリーの発現低下は糖鎖修飾不全 IgA の産生メカニズムの一端である可能性が示された (図 11)。

3.8 抗生物質処置は *Ap1m2*^{ΔIEC} マウスにおける IgA 腎症様の徴候を改善した

腸内細菌は腸管における IgA 産生の維持に必要不可欠であり、またディスバイオーシスは腸管免疫系に影響を及ぼす⁵¹。*Ap1m2*^{ΔIEC} マウスの IgA 腎症の徴候にディスバイオーシスが関与するか検証するために、タモキシフェン処置前からスペクトルの異なる 4 種の抗生

物質を与え、徴候を観察した (図 12A)。抗生物質を処置した *Ap1m2*^{ΔIEC} マウスの血中 IgA 濃度は有意に減少した (図 12B)。また、*Ap1m2*^{ΔIEC} マウスの血中 IgA のガラクトースおよびシアル酸修飾、IgG との複合体形成は、抗生物質処置によって未処置の *Ap1m2*^{n/n} マウスと同程度まで回復したが、*Ap1m2*^{n/n} マウスにおいてもこれらのレベルは抗生物質処置により増加していた (図 12C, D)。さらに、IgA の腎沈着は抗生物質処置によって改善が見られた (図 12E)。したがって、*Ap1m2*^{ΔIEC} マウスの IgA 腎症の徴候は腸内細菌依存的であることが示され、IgA 糖鎖修飾不全は腸内細菌に対する免疫応答の亢進により生じた可能性がある。

3.9 *Ap1m2*^{ΔIEC} マウスでは IgA を含む免疫複合体が脊髄の血管壁にも沈着した

最後に、*Ap1m2* 欠損が腎臓以外の器官に与える影響をさらに解析した。観察のなかで、*Ap1m2*^{ΔIEC} マウスのおよそ 10–20%において、後肢が正常に動かず引きずりながら歩行する様子が観察された (図 13A)。後肢麻痺の病態の解析のため、脊髄を観察すると組織損傷や炎症の所見はなかったが、蛍光免疫染色による解析から CD31 で染色された小血管に IgA や IgG が沈着する様子が認められた (図 13B, C)。この沈着は後肢麻痺を呈していなかった *Ap1m2*^{ΔIEC} マウスにおいても認められた (図 13B, C)。小血管壁への 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。IgA 血管炎でも IgA 腎症と同様に糖鎖修飾不全 IgA が産生され、血管壁への沈着に関与すると考えられている⁵²。現在のところ、脊髄における血管壁への複合体沈着と下肢麻痺との関連、また脊髄以外の血管への沈着は不明であるが、*Ap1m2*^{ΔIEC} マウスにおける糖鎖修飾不全 IgA やそれにより形成される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。

4. 考察

Ap1m2^{ΔIEC} マウスはその全身欠損マウスと異なり顕著な腸管炎症は認められなかったが、腸管透過性の亢進、RegIIIγ の発現低下、pIgR の発現や機能低下による腸管腔 IgA の減少を特徴とする腸上皮バリア機能の低下、それに伴うディスバイオーシスが観察された。pIgR の異常は管腔への IgA 輸送を障害し、IgA を血中へ流入させた。血中で IgA は糖鎖修飾不全のために IgG と免疫複合体を形成し、C3 とともに糸球体に沈着するという IgA 腎症の徴候を招いた。*Ap1m2*^{ΔIEC} マウスの腸管由来 IgA は野生型マウスで腎沈着を招き、さらに抗生物質処置による腸内細菌除去は IgA 腎症の徴候を抑制したことから、IgA 糖鎖修飾不全は腸管で引き起こされた可能性が高いと考えられた。以上の結果を踏まえ、腸上皮バリア機能の低下やディスバイオーシスが腸管における IgA の糖鎖修飾不全をきたし、同時に pIgR の異常が生じることで糖鎖修飾不全 IgA が血中へ流入し、免疫複合体が形成されて腎沈着に至るといふ IgA 腎症の病態形成メカニズムの一端となりうる仮説が立てられた (図 14)。

近年の研究によって、IgA 腎症と腸管との関連を示唆する報告がいくつもなされている。IgA 腎症患者では腸管透過性の亢進やディスバイオーシスが認められ、血中のガラクトース欠損 IgA 存在量と腸管バリア機能や有意に変動していた腸内細菌との間に相関があることが示された^{22,23}。ヨーロッパにおける疫学調査では、IgA 腎症患者のおよそ 20%が炎症性腸疾患やセリアック病などの炎症を伴う消化管疾患を併発していることが報告されている⁵³。さらに、ゲノムワイド関連解析から、IgA 腎症のリスク遺伝子座には炎症性腸疾患や腸上皮バリア機能、腸管病原体に対する免疫応答に関連するものが含まれ、また血中 IgA 価との遺伝的な正の相関や腎不全の早期発症との関連も認められた^{54,55}。これらの知見は、腸上皮バリアや腸管免疫系が IgA 腎症の発症や増悪に寄与していることを示唆している。*Ap1m2*^{ΔIEC} マウスは腸管に局限したバリア機能の低下が起点になって IgA を含む免疫複合体の腎沈着を呈したことから、本博士論文研究の成果は、IgA 腎症における腸管－腎臓軸 (gut-kidney axis) の存在を示す新たな実験的根拠になると考えられる。

Ap1m2 欠損によって腸上皮細胞における pIgR の発現および機能が低下していた。また、血中において主に粘膜面で存在する二量体や多量体 IgA が存在していたことから、pIgR の異常が IgA を腸管から血中に流入させる原因である可能性が想定された。実際に、IgA 腎症患者の腎臓に沈着した IgA で二量体 IgA を構成する J 鎖が検出されている⁵⁶。さらには、pIgR の遺伝子多型も報告されている^{57,58}。このうち、A580V ミスセンス変異体 pIgR を発現させた Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞では、野生型 pIgR と比較して管腔への IgA 輸送の低下が示された⁵⁹。このように、pIgR の異常による IgA 輸送の障害は IgA 腎症との関連が示唆されてきたが、*Ap1m2*^{ΔIEC} マウスはその可能性を実証するものと考えられる。

Ap1m2 欠損による pIgR の発現低下は IL-17A シグナル減弱による可能性がオルガノイド実験によって示された。*Ap1m2* 欠損による IL-17 受容体の局在異常が *in vitro* で観察されているため¹⁰、このシグナル減弱は AP-1B 複合体による IL-17 受容体の側基底膜への輸送が損なわれたためだと考えられた。また、pIgR は IgA とともにリソソームと考えられる画分に集積していた。これは、pIgR が側基底膜において IgA と結合後に、pIgR-IgA が頂端膜へ輸送される過程でリソソームに誤輸送されたことを示唆する。したがって、AP-1B 複合体は pIgR の側基底膜への発現ではなく、pIgR-IgA のエンドソームから頂端膜への輸送に必須と考えられた。実際、トランスゴルジネットワークにおいて、AP-1 (AP-1A と予想される) により pIgR が側基底膜へ輸送されるため⁶⁰、*Ap1m2*^{ΔIEC} マウスにおける pIgR の側基底膜への輸送は AP-1A によって維持されたと考えられる。さらに、*Ap1m2* 全身欠損マウスの腸上皮細胞では、頂端膜に局在する Villin や Sucrase が細胞質へ蓄積する様子が認められる¹¹。MDCK 細胞の細胞表面タンパク質の定量プロテオミクス解析から、*Ap1m2* のノックダウンによって側基底膜タンパク質に加え、頂端膜タンパク質の局在も異常をきたすことが報告された⁶¹。これらは AP-1B 複合体がリサイクリングエンドソームから頂端膜への輸送にも関与することを示唆するため、AP-1B 複合体がリサイクリングエンドソームから頂端膜への pIgR-IgA 輸送を担う可能性もある。以上から、AP-1B 複合体はサイトカインシグナルの維持により mRNA の発現、また直接輸送に関与することにより IgA トランスサイトーシス機能という二つの側面で pIgR を制御する可能性が示された。さらに、pIgR 欠損マウスでは血中 IgA や小腸粘膜固有層に存在する IgA 陽性形質細胞の増加、腸管透過性の亢進などの *Ap1m2*^{ΔIEC} マウスと類似した特徴を示す⁶²⁻⁶⁴。そのため、pIgR の異常は腸管の IgA 産生増加や腸管透過性の亢進をきたし、IgA 腎症の病態形成に寄与している可能性がある。

Ap1m2^{ΔIEC} マウスの回腸に由来する IgA は野生型マウスにおいて腎沈着を再現したため、糖鎖修飾不全 IgA の産生場所は腸管であることが示唆された。さらに、回腸粘膜固有層に存在する B 細胞では、IgA ヘガラクトースを修飾する責任酵素である B4GalT ファミリーのうち、いくつかの分子の発現が低下していた。*Ap1m2*^{ΔIEC} マウスで認められた腸管透過性の亢進やディスバイオーシスなどの腸管異常を踏まえ、腸内細菌の菌体成分や代謝物の移行が腸管免疫系に影響を与え、糖鎖修飾不全 IgA の産生を招いた可能性が考えられた。実際、2 型サイトカインなどの炎症性サイトカインは IgA の糖鎖修飾不全を招く⁶⁵。いくつかの TLR シグナル活性化は、糖鎖修飾不全 IgA の産生を介して IgA 腎症発症に寄与することがモデルマウスによって示されている^{23,66,67}。B 細胞の生存や IgA へのクラススイッチを促進させる因子 a proliferation-inducing ligand や B-cell activation factor は IgA 腎症患者で高値を示し、これらの阻害で症状が改善されることが臨床試験やモデルマウスで認められる^{49,68,69}。そのため、こうした因子が *Ap1m2*^{ΔIEC} マウスの腸管において増加している可能性がある。

Ap1m2^{ΔIEC} マウスにおける IgA 腎症の徴候は抗生物質処置により改善したことから、腸内細菌依存的であった。これは IgA 腎症モデルマウスを無菌化あるいは抗生物質処置により症状が改善されたという先行研究と一致した^{49,70,71}。また、ディスバイオーシスをきたした IgA 腎症患者の糞便を C57BL/6J マウスに移植すると、ガラクトース欠損 IgA の産生、免疫複合体の形成、腎沈着、腎機能低下が認められ、IgA 腎症を発症することが報告された²³。興味深いことに、このマウスでは密着結合の構成分子の発現が低下して腸管透過性が亢進していたことから、ディスバイオーシスをきたした腸内細菌は腸上皮バリア機能の破綻を介して IgA 腎症を発症させるという本博士論文研究から得られた仮説が支持された。

Ap1m2^{ΔIEC} マウスの回腸粘膜固有層では IgA 陽性形質細胞数が増加し、IgA 産生量が増加した。これは、腸内細菌のディスバイオーシスのなかで、17 型免疫応答や IgA 産生を増加させることが知られている *Candidatus Arithromitus* の増加による可能性がある⁷²⁻⁷⁴。また、*Candidatus Arithromitus* によって誘導された抗原特異的 IgA はその過増殖を抑制する一方⁷⁵、成熟した IgA を持たない activation-induced cytidine deaminase 欠損マウスではその過増殖が認められる⁷⁶。さらに、腸上皮特異的な IL-17 受容体の欠損は *Pigr* 発現および腸管腔 IgA を減少させ、*Candidatus Arithromitus* の過増殖を引き起こした⁴⁶。そのため、*Candidatus Arithromitus* の過増殖は、RegIIIγ の産生減少に加え、IL-17A-pIgR による腸管腔 IgA の維持機構の破綻によっても引き起こされた可能性も考えられる。RegIIIγ の産生減少は IL-22 による STAT3 経路の活性化の減弱が原因と考えられたが、これは *Ap1m2* 欠損が IL-22 受容体 IL-22RA1 の側基底膜への発現を減少させ、シグナル伝達を障害した可能性がある。

IgA 腎症の徴候に加えて、*Ap1m2*^{ΔIEC} マウスは後肢麻痺をきたすとともに、脊髄における血管壁への IgA と IgG の沈着が観察された。血管壁への IgA 沈着は IgA 血管炎の可能性があった。日本皮膚科学会が作成した皮膚血管炎・血管障害診療ガイドライン 2023 によると、IgA 血管炎は皮膚への紫斑、消化器症状、紫斑の付随症状としての関節炎、IgA 腎症と類似した腎炎が主な症候である⁷⁷。下肢の麻痺症状は臨床的に認められないため、脊髄における血管壁への IgA 沈着は後肢麻痺との直接的な関連がない可能性もあり、後肢麻痺の病態やメカニズムのさらなる解析が必要である。また、脊髄以外の器官における小血管壁への IgA 沈着を解析し、IgA 血管炎の可能性を検証すべきである。小血管沈着をきたす IgA 血管炎とは異なり、中血管に沈着をきたす疾患として川崎病という疾患がある。*Lactobacillus casei* の細菌壁抽出物の腹腔内投与によって誘導される川崎病モデルマウスでは、腸管透過性の亢進とともに小腸での IgA 産生増加が認められ、薬剤により腸管透過性の亢進を抑制することで心血管や腹部大動脈の血管炎が抑制された⁷⁸。さらに、このマウスでは IgA と C3 の腎沈着も認められたことから、やはり腸管透過性の亢進や腸管における IgA 産生の増加は IgA 腎症や IgA 血管炎の発症に関連する可能性がある。

本博士論文研究ではタモキシフェン投与により腸上皮特異的な *Aplm2* 欠損を誘導できる *Aplm2*^{ΔIEC} マウスを用いたことで、腸管に局限した上皮細胞の極性輸送障害で生じたバリア機能の低下やディスバイオーシスが原因で IgA 腎症を引き起こすという因果関係の実証に至った。近年になって、腸管をターゲットにした IgA 腎症の治療戦略が立てられつつある。腸管局所で徐放され腸管免疫系に作用するステロイド製剤 Nefecon[®]が IgA 腎症患者を対象にした臨床試験で良好な成績を示し、腸内細菌移植もまた IgA 腎症症状を改善させることが報告されつつある⁷⁹⁻⁸¹。今後、*Aplm2*^{ΔIEC} マウスのさらなる解析によって IgA 腎症やその関連疾患の病態解明、さらには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。

5. 図

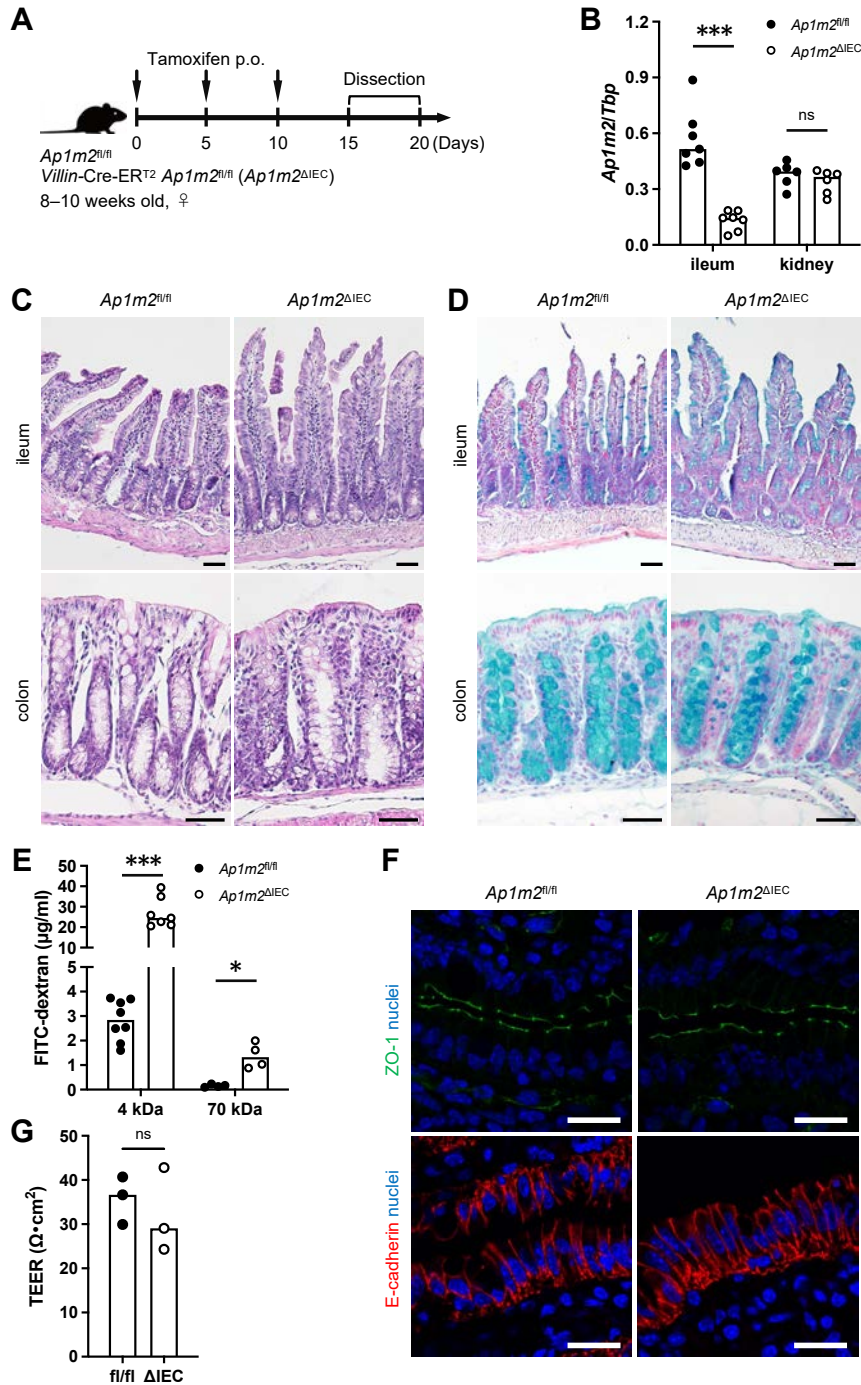


図1 腸上皮特異的な*Ap1m2*欠損は腸管透過性を亢進させた

(A) *Ap1m2*欠損誘導スケジュールの概要図 1mgのタモキシフェンを5日おきに3回経口投与 (per os: p.o.) し、15–20日目に実験した。(B) 定量PCRによる回腸 ($n = 7$) および腎臓 ($n = 6$) の*Tbp*に対する*Ap1m2*発現量の測定 (C) Hematoxylin-Eosin染色、(D) Alcian-Blue染色による回腸と大腸の組織像 (E) 血中の4 kDa ($n = 8, 7$) および70 kDa ($n = 4$) FITC-dextran濃度の測定による腸管透過性の評価 (F) 回腸におけるZO-1 (緑) またはE-cadherin (赤) の蛍光免疫染色像 (G) Ussing chamberを用いた回腸の経上皮電気抵抗 (trans-epithelial electrical resistance: TEER) の測定 $n = 3$ 全ての実験で*Ap1m2^{fl/fl}*と*Ap1m2^{ΔIEC}*雌性マウスを比較した。バープロットは中央値、スケールバーは(C), (D) 50 μm, (F) 20 μmを示す。ns: not significant, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (unpaired, two-tailed Mann-Whitney test)

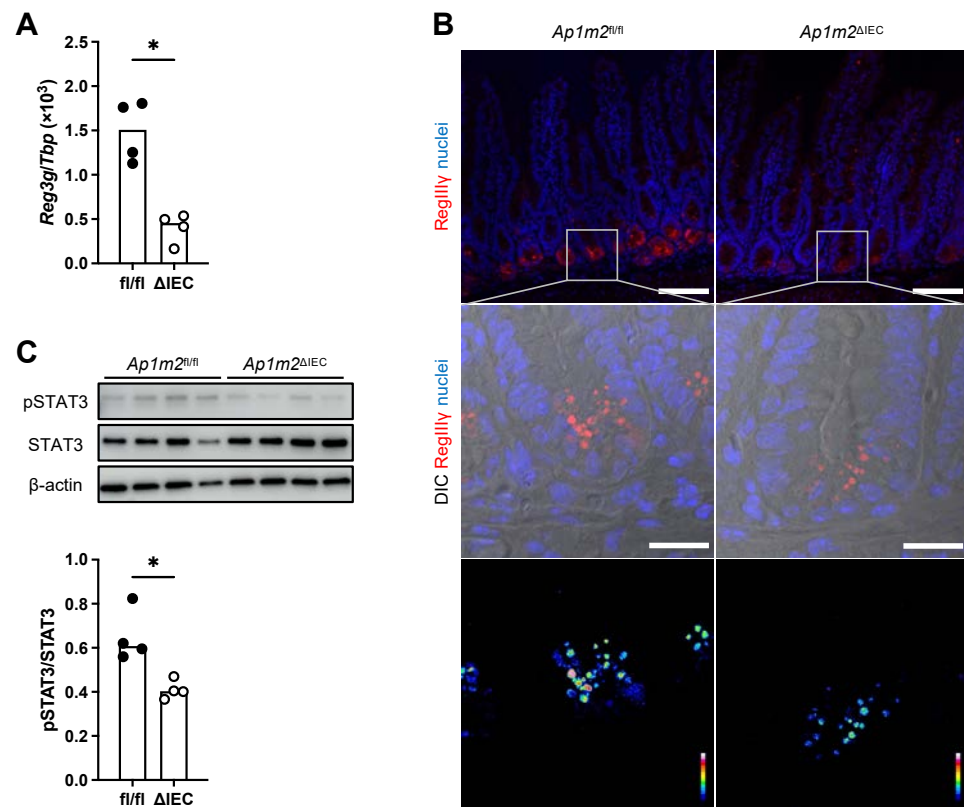


図2 *Ap1m2*欠損は腸上皮細胞におけるIL-22-STAT3シグナルを減弱させ、RegIIIγ発現を低下させた (A) 定量PCRによる回腸の*Tbp*に対する*Reg3g*発現量の測定 $n = 4$ (B) 回腸におけるRegIIIγ (赤) の蛍光免疫染色像 カラースケールは蛍光強度を示す。(C) ウェスタンブロットによる回腸のphosphorylated STAT3 (pSTAT3)、STAT3、β-actinの検出 $n = 4$ 全ての実験で*Ap1m2^{fl/fl}*と*Ap1m2^{ΔIEC}*雌性マウスを比較した。バープロットは中央値、スケールバーは100 μmを示す。* $p < 0.05$ (unpaired, two-tailed Mann-Whitney test)

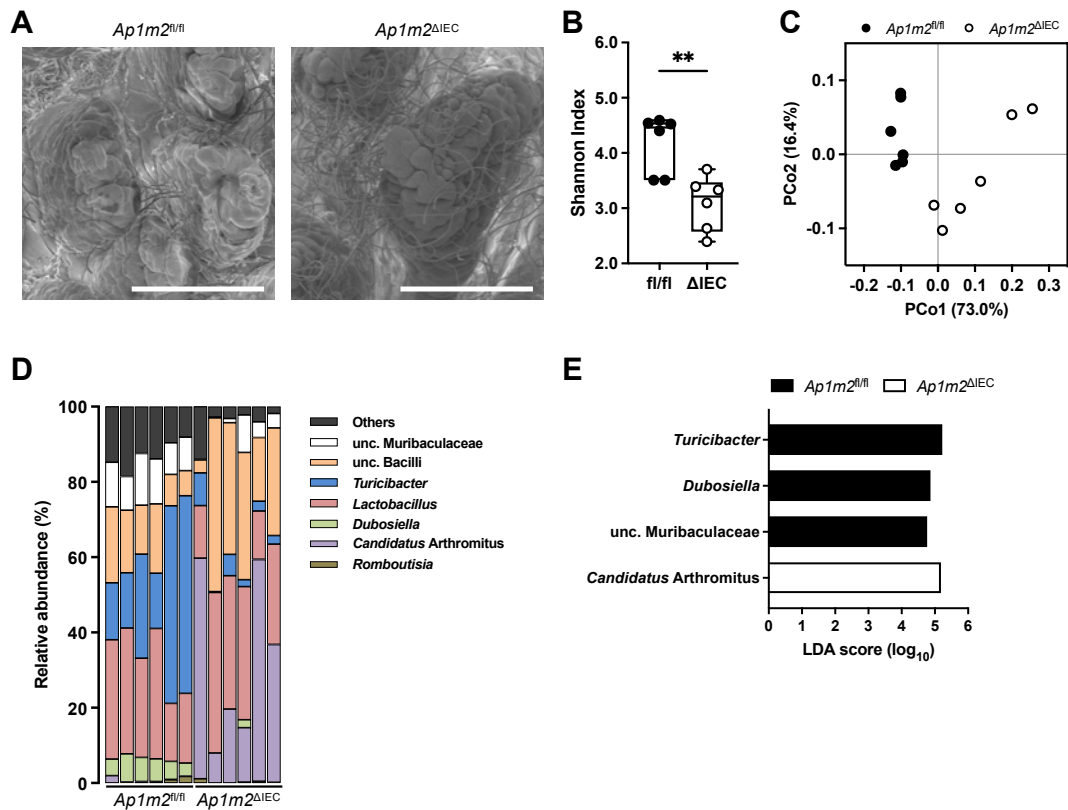


図3 *Ap1m2^{ΔIEC}* マウスは回腸内細菌叢のディスバイオーシスをきたした

(A) 回腸の走査型電子顕微鏡像 (B)–(E) 16S rRNA遺伝子のシーケンシング解析による回腸内細菌叢構成の比較 $n = 6$ (B) Shannon index (C) Weighted UniFrac解析に基づく主座標分析プロット (D) 属レベルでの細菌の構成割合 (E) Linear discriminant analysis effect sizeにより属レベルで有意に割合が変化した細菌 データは average relative abundance > 0.3%、LDA score > 2.0の細菌を示す。全ての実験で*Ap1m2^{fl/fl}*と*Ap1m2^{ΔIEC}*雌性マウスを比較した。ボックスプロットは中央値、四分位範囲、最大および最小値、スケールバーは100 μm を示す。** $p < 0.01$ (unpaired, two-tailed Mann-Whitney test)

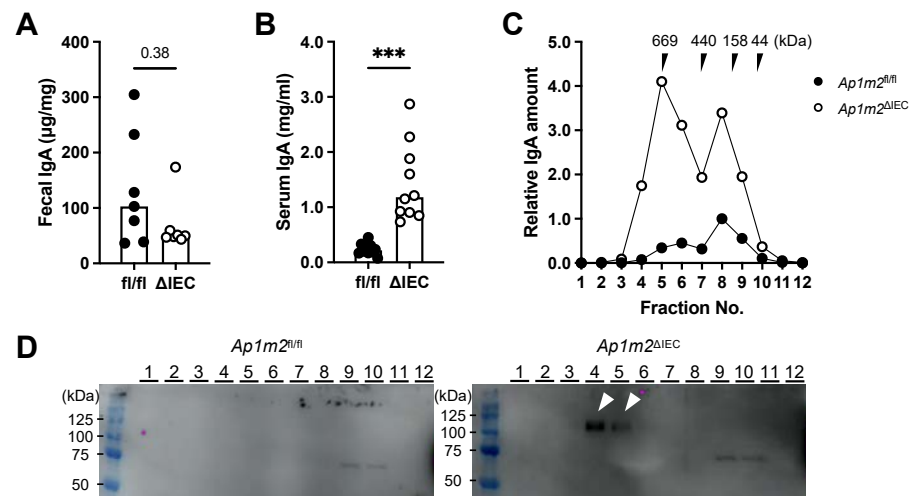


図4 $Ap1m2^{\Delta IE C}$ マウスでは血中IgAが増加し、特に二量体や多量体IgAの占める割合が増加した

(A), (B) ELISAによる糞便中 ($n = 7$) または血中 ($n = 10$) IgA濃度の測定 (C), (D) サイズ分画した血清中IgAのサイズ分布およびsecretory component (SC) の検出 プールした血清をサイズ排除クロマトグラフィーにより分画し、ELISAにより各画分に含まれるIgA濃度を測定し、抗pIgR抗体を用いたウエスタンブロットによりSCを検出した。データは $Ap1m2^{fl/fl}$ マウスの単量体IgA (Fraction No. 8) 濃度との相対値を、矢頭はSCのシグナルを示す。全ての実験で $Ap1m2^{fl/fl}$ と $Ap1m2^{\Delta IE C}$ 雌性マウスを比較した。バープロットは中央値を示す。

*** $p < 0.001$ (unpaired, two-tailed Mann-Whitney test)

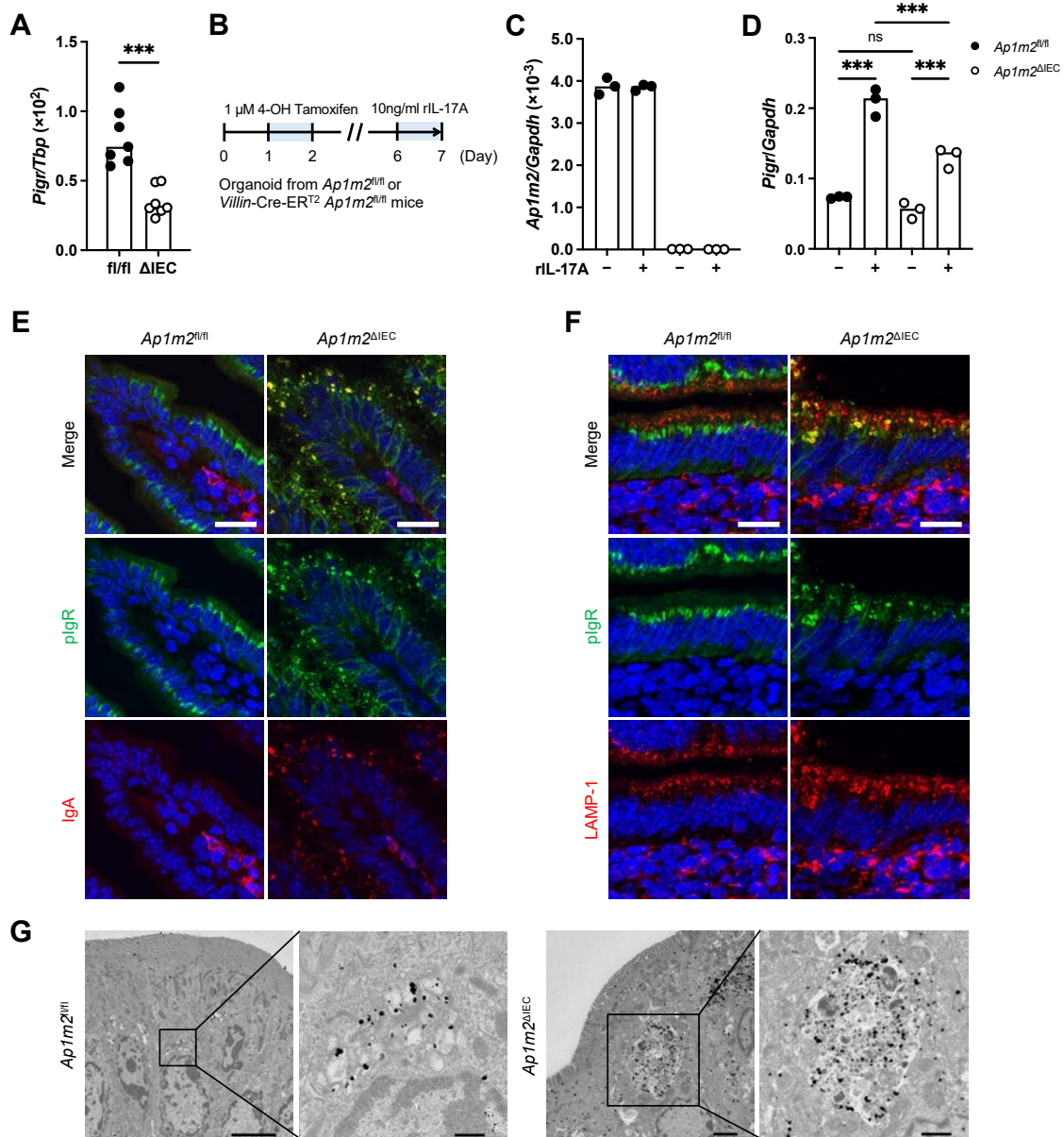


図5 *Ap1m2*欠損は腸上皮細胞におけるpIgR発現を低下させ、またpIgR-IgA複合体の細胞内輸送を障害した (A) 定量PCRによる回腸の*Tbp*に対する*Pigr*発現量の測定 $n = 7$ (B) オルガノイド実験スケジュールの概要図 *Ap1m2^{fl/fl}*と*Ap1m2 ^{Δ IEC}*マウスの回腸よりオルガノイドを作成して、播種後1日目に1 μ M 4-hydroxytamoxifen、6日目にrecombinant IL-17Aを処理したのち、解析した。(C), (D) 定量PCRによる回腸オルガノイドの*Gapdh*に対する*Ap1m2*または*Pigr*発現量の測定 $n = 3$ (E), (F) 回腸におけるpIgR (緑) とIgAまたはLAMP-1 (赤) の蛍光免疫染色像 (G) 回腸のpIgR免疫電子顕微鏡像 全ての実験で*Ap1m2^{fl/fl}*と*Ap1m2 ^{Δ IEC}*雌性マウスを比較した。バープロットは中央値、スケールバーは(E), (F) 20 μ m、(G) *Ap1m2^{fl/fl}* 5 μ mまたは0.5 μ m、*Ap1m2 ^{Δ IEC}* 2.0 μ mまたは1.0 μ mを示す。ns: not significant, *** $p < 0.001$ (unpaired, two-tailed Mann-Whitney test, two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test)

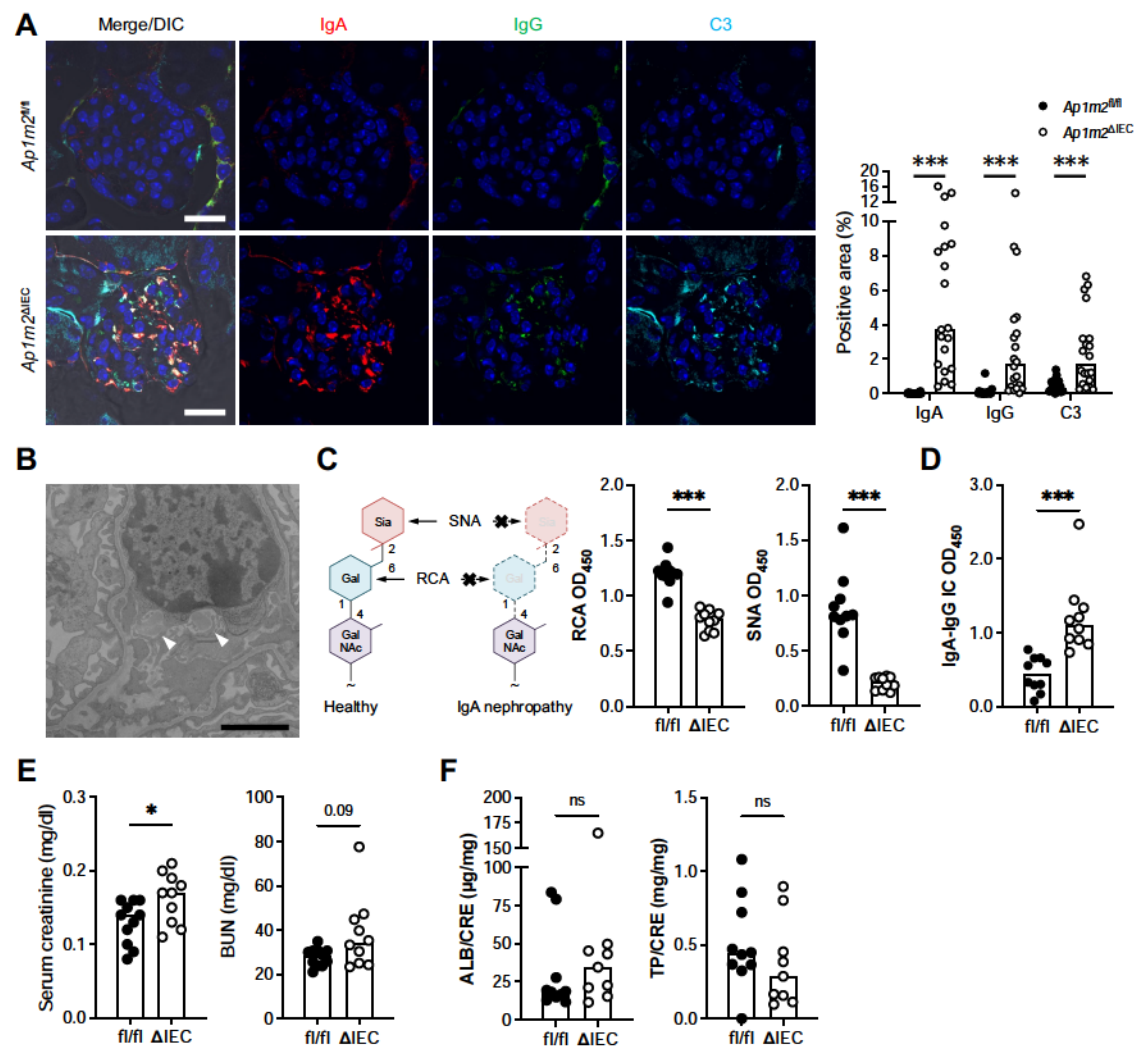


図6 *Ap1m2*^{ΔIEC}マウスではIgA腎症に類似した徴候を呈した

(A) 腎臓におけるIgA (赤)、IgG (緑)、C3 (シアン) の蛍光免疫染色像とその定量。定量データは糸球体のなかでIgA、IgG、C3それぞれで染色された面積の割合を示す。 $n = 20$ (4匹のマウスの糸球体をそれぞれ5つ観察) (B) 腎臓の透過型電子顕微鏡像 (C) レクチン結合試験による血中IgAに修飾されたガラクトースおよびシアル酸の定量。100 ngの血中IgAをガラクトース結合*Ricinus communis* agglutinin I (RCA) またはシアル酸結合*Sambucus nigra* lectin (SNA) と反応させ、吸光度を測定した。 $n = 10$ (独立した2つの実験による) (D) ELISAによる血中IgA-IgG免疫複合体の定量。血清中IgA-IgG免疫複合体を抗IgG抗体で捕捉、抗IgA抗体で検出して、吸光度を測定した。 $n = 10$ (独立した2つの実験による) (E) 血中クレアチニンおよび尿素窒素濃度の測定。 $n = 11, 10$ (独立した2つの実験による) (F) 尿中クレアチニンに対するアルブミンおよび総タンパク質比の測定。 $n = 10, 9$ (独立した2つの実験による) 全ての実験で*Ap1m2*^{fl/fl}と*Ap1m2*^{ΔIEC}雌性マウスを比較した。バープロットは中央値、スケールバーは(A) 20 μm 、(B) 2.0 μm を示す。ns: not significant, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (unpaired, two-tailed Mann-Whitney test)

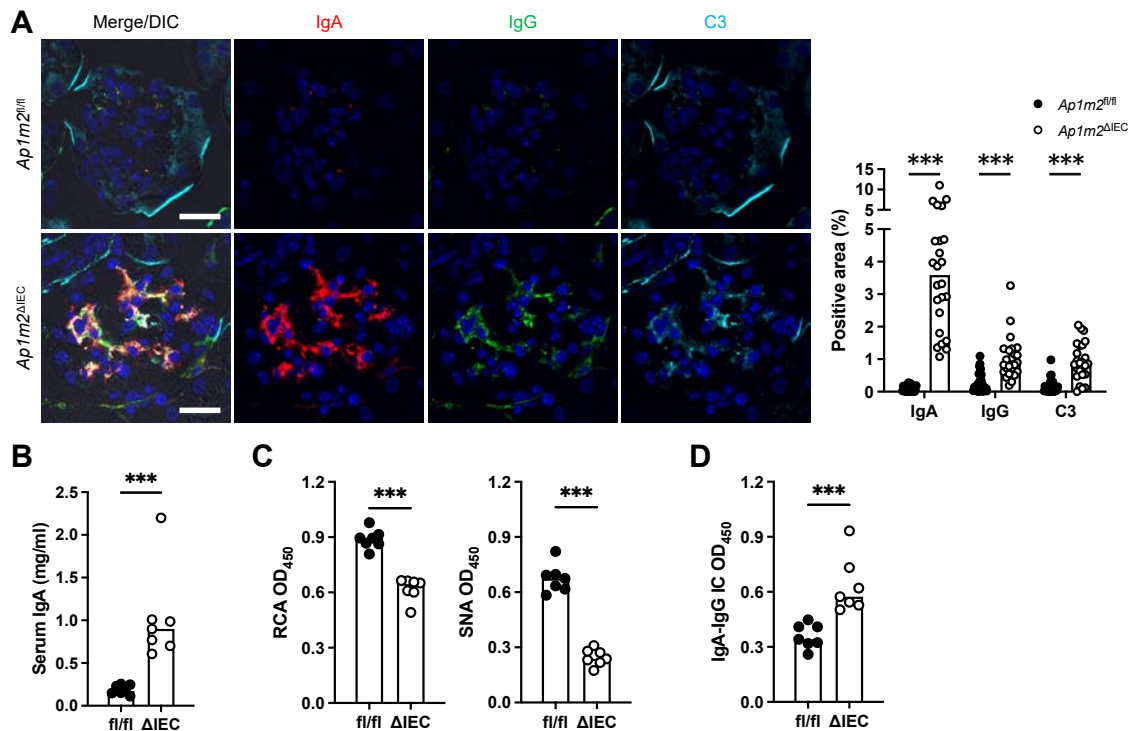


図7 *Ap1m2^{ΔIEC}*雄性マウスでも、*Ap1m2^{ΔIEC}*雌性マウスで認められたIgA腎症様の徴候を呈した

(A) 腎臓におけるIgA（赤）、IgG（緑）、C3（シアン）の蛍光免疫染色像とその定量。定量データは糸球体のなかでIgA、IgG、C3それぞれで染色された面積の割合を示す。 $n = 24$ （6匹のマウスの糸球体をそれぞれ4つ観察）(B) ELISAによる血中IgA濃度の測定。 $n = 7$ （独立した2つの実験による）(C) レクチン結合試験による血中IgAに修飾されたガラクトースおよびシアル酸の定量。100 ngの血中IgAをガラクトース結合*Ricinus communis* agglutinin I (RCA) またはシアル酸結合*Sambucus nigra* lectin (SNA) と反応させ、吸光度を測定した。 $n = 7$ （独立した2つの実験による）(D) ELISAによる血中IgA-IgG免疫複合体の定量。血清中IgA-IgG免疫複合体を抗IgG抗体で捕捉、抗IgA抗体で検出して、吸光度を測定した。 $n = 7$ （独立した2つの実験による）全ての実験で*Ap1m2^{fl/fl}*と*Ap1m2^{ΔIEC}*雄性マウスを比較した。バープロットは中央値、スケールバーは20 μm を示す。*** $p < 0.001$ (unpaired, two-tailed Mann-Whitney test)

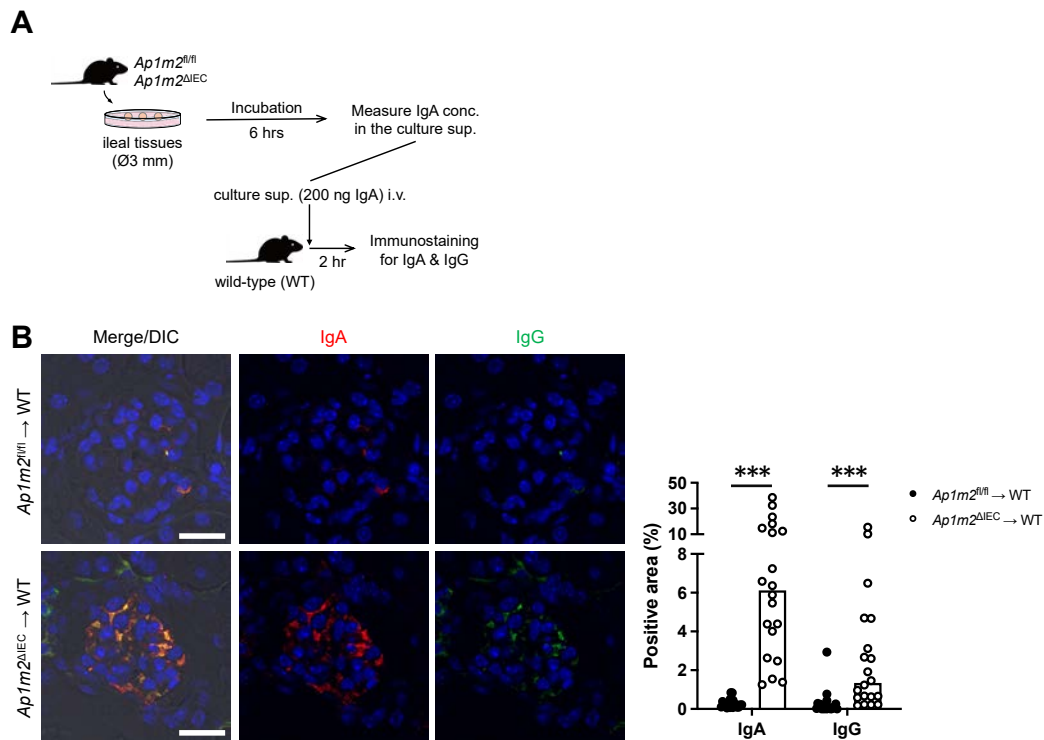


図8 *Ap1m2^{ΔIEC}*マウスの腸管由来IgAは野生型マウスに腎沈着を引き起こした

(A) 器官培養実験の概要図 *Ap1m2^{fl/fl}*と*Ap1m2^{ΔIEC}*雌性マウスより摘出した回腸を培養して上清中に腸管由来IgAを得たのち、200 ngのIgAを含むように希釈した培養上清を野生型雌性マウスに静脈内投与 (intravenous injection: i.v.) して、2時間後に解剖した。(B) 腎臓におけるIgA (赤) およびIgG (緑) の蛍光免疫染色像とその定量 定量データは糸球体のなかでIgA、IgGそれぞれで染色された面積の割合を示す。 $n = 20$ (4匹のマウスの糸球体をそれぞれ5つ観察) スケールバーは20 μm を示す。 *** $p < 0.001$ (unpaired, two-tailed Mann-Whitney test)

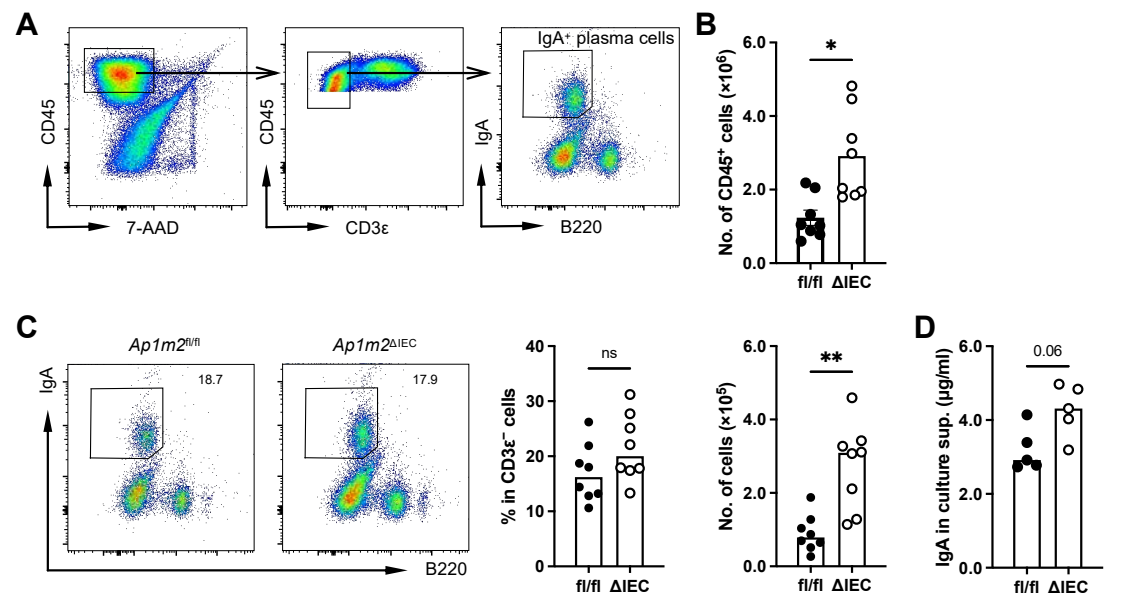
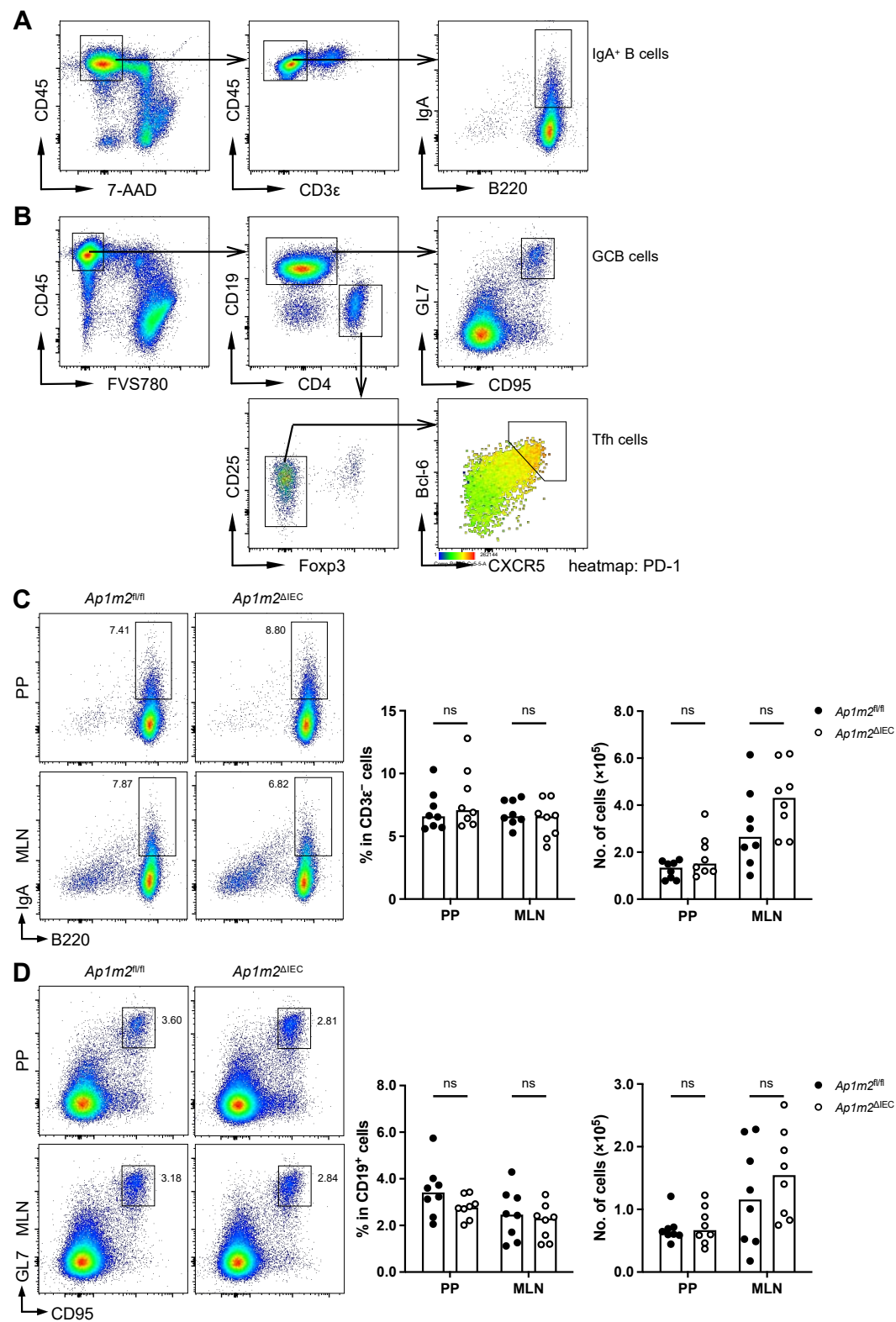


図9 *Ap1m2^{ΔIEC}*マウスの回腸粘膜固有層において、IgA陽性形質細胞を含む総免疫細胞数が増加した (A)–(C) フローサイトメトリーによる*Ap1m2^{fl/fl}*と*Ap1m2^{ΔIEC}*雌性マウスの回腸粘膜固有層より単離した免疫細胞解析 $n = 8$ (独立した2つの実験による) (A) IgA陽性形質細胞のゲーティングストラテジー (B) CD45陽性の総免疫細胞数 (C) IgA陽性形質細胞のフローサイトメトリープロット、割合および細胞数 (D) ELISAによる回腸培養上清中IgA濃度の測定 図8Aに示した実験で得られた培養上清を用いた。 $n = 5$ バープロットは中央値を示す。ns: not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (unpaired, two-tailed Mann-Whitney test)



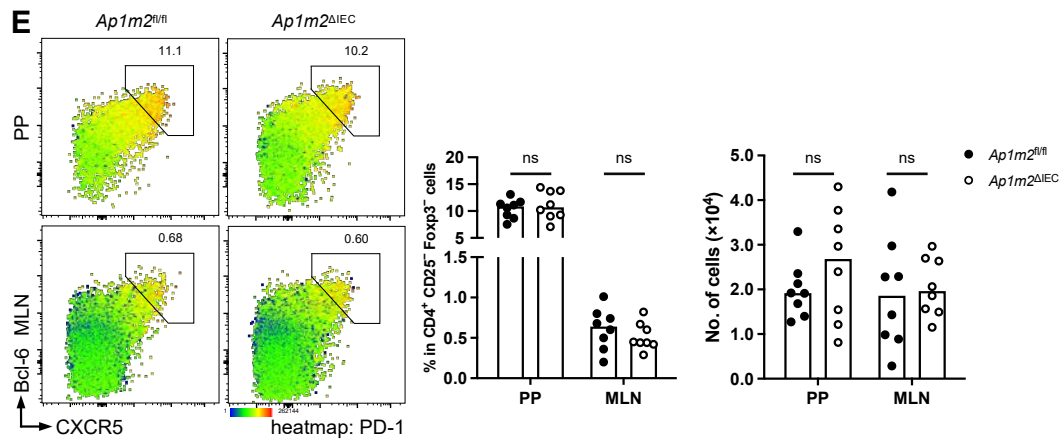


図10 *Ap1m2^{ΔIEC}*マウスのパイエル板や腸管膜リンパ節において、免疫細胞の構成は変化しなかった (A)–(E) フローサイトメトリーによる*Ap1m2^{fl/fl}*と*Ap1m2^{ΔIEC}*雌性マウスのパイエル板 (Peyer's patch: PP) および腸管膜リンパ節 (mesenteric lymph node: MLN) より単離した免疫細胞解析 $n = 8$ (独立した2つの実験による) (A) IgA陽性B細胞、(B) 胚中心B (germinal center B: GCB) 細胞および濾胞性ヘルパーT (follicular helper T: Tfh) 細胞のゲーティングストラテジー (C) IgA陽性B細胞、(D) GCB細胞、(E) Tfh細胞のフローサイトメトリープロット、割合および細胞数 バープロットは中央値を示す。ns: not significant (unpaired, two-tailed Mann-Whitney test)

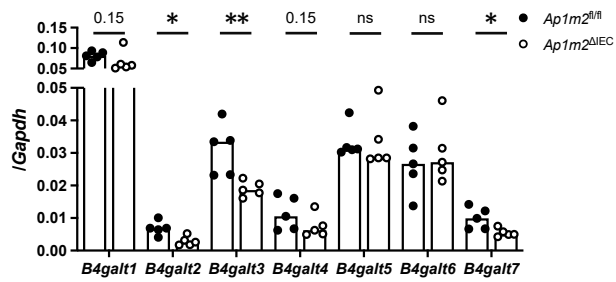


図11 *Ap1m2^{ΔIEC}*マウスの回腸粘膜固有層中B細胞において、いくつかの*B4galt*ファミリー発現が低下した
 定量PCRによる*Ap1m2^{fl/fl}*と*Ap1m2^{ΔIEC}*雌性マウスの回腸粘膜固有層中B細胞の*Gapdh*に対する*B4galt1-7*発現量の測定 $n = 5$ バープロットは中央値を示す。ns: not significant, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (unpaired, two-tailed Mann-Whitney test)

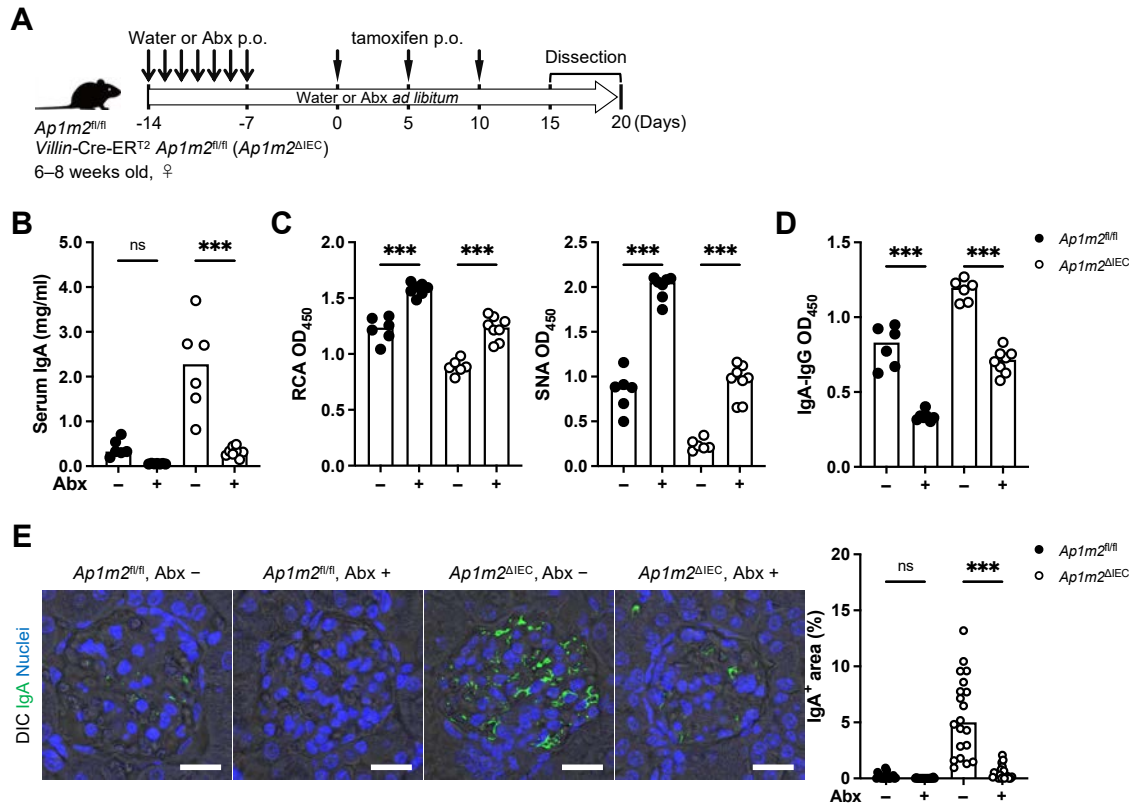


図12 抗生物質処置は*Ap1m2^{ΔIEC}*マウスのIgA腎症様の徴候を抑制した

(A) 抗生物質処置スケジュールの概要図 抗生物質 (antibiotic: Abx) の混合液をタモキシフェン処置の2週間前から解剖まで*Ap1m2^{fl/fl}* ($n = 6, 7$) と*Ap1m2^{ΔIEC}* ($n = 6, 8$) 雌性マウスに自由飲水で与え、最初の1週間は1日1回経口投与した。(独立した2つの実験による) (B) ELISAによる血中IgA濃度の測定 (C) レクチン結合試験による血中IgAに修飾されたガラクトースおよびシアル酸の定量 100 ngの血中IgAをガラクトース結合*Ricinus communis* agglutinin I (RCA) またはシアル酸結合*Sambucus nigra* lectin (SNA) と反応させ、吸光度を測定した。(D) ELISAによる血中IgA-IgG免疫複合体の定量 血清中IgA-IgG免疫複合体を抗IgG抗体で捕捉、抗IgA抗体で検出して、吸光度を測定した。(E) 腎臓におけるIgA (緑) の蛍光免疫染色像とその定量 定量データは糸球体のなかでIgAで染色された面積の割合を示す。 $n = 20$ (4匹のマウスの糸球体をそれぞれ5つ観察) バープロットは中央値、スケールバーは20 μm を示す。ns: not significant, *** $p < 0.001$ (two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test)

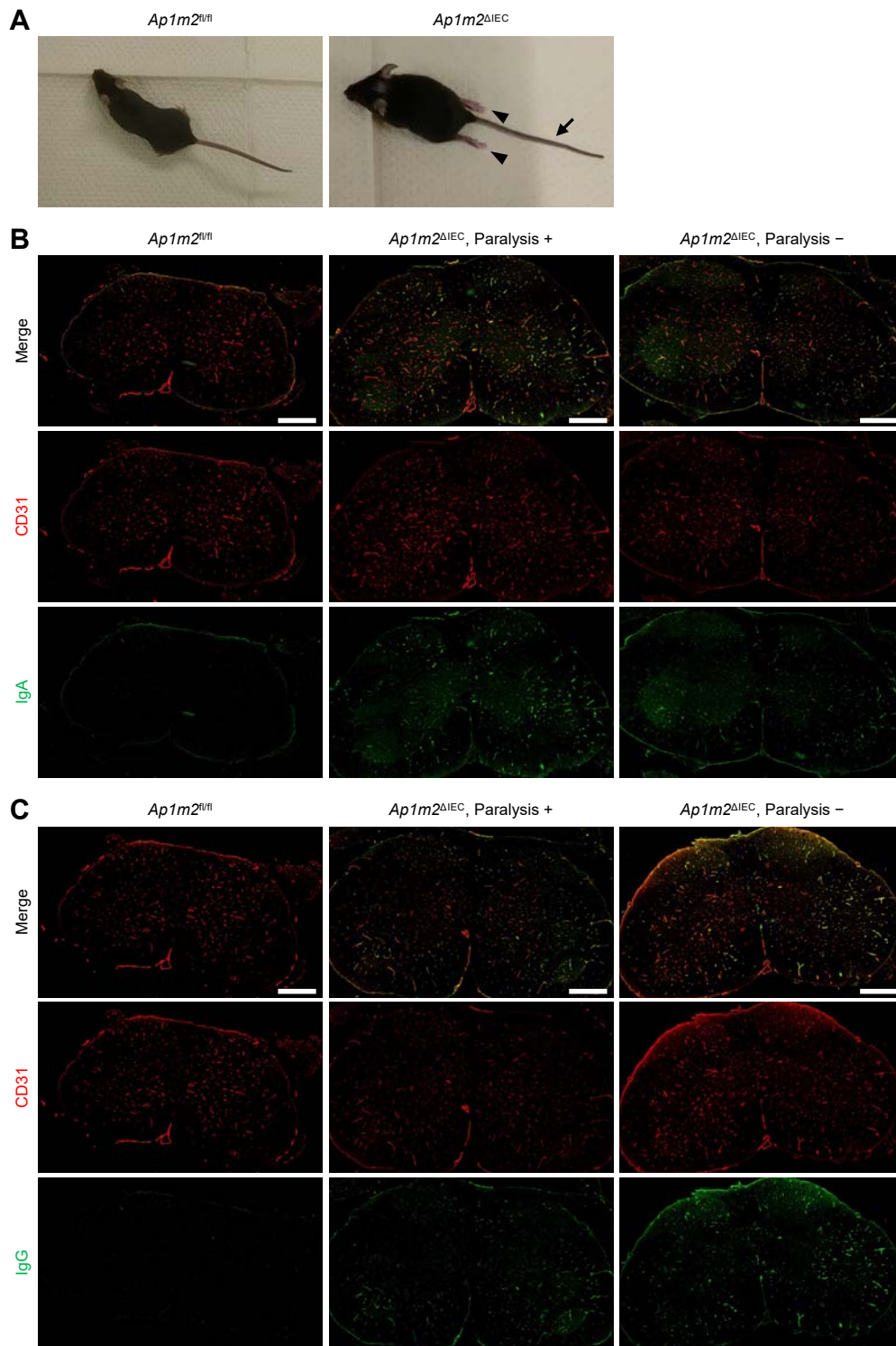


図13 *Ap1m2*^{ΔIEC}マウスは後肢麻痺をきたし、脊髄の血管壁にIgA、IgGが沈着した
(A) 歩行時の様子 矢頭は後肢を引きずる様子を、矢印は尾の緊張が失われている様子を示す。(B), (C) 脊髄におけるCD31 (赤) とIgAまたはIgG (緑) の蛍光免疫染色像 全ての実験で*Ap1m2*^{fl/fl}と*Ap1m2*^{ΔIEC}雌性マウスを比較した。スケールバーは300 μ mを示す。

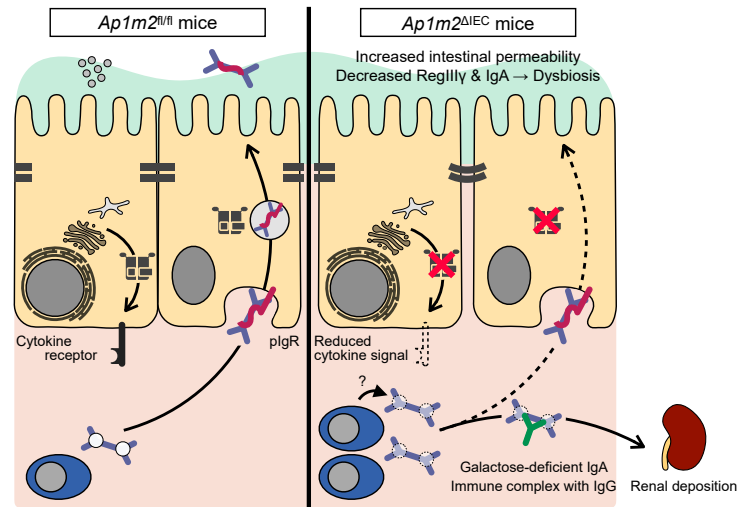


図14 *Ap1m2^{ΔIEC}*マウスの解析結果から予想された腸管を起点としたIgA腎症の発症機序の仮説

腸上皮特異的なAP-1B複合体の欠損は腸管透過性を亢進させるとともに、サイトカインシグナルの減弱やpIgRによるIgAの管腔輸送の障害により抗菌ペプチドや管腔内IgAの減少などの腸上皮バリア機能の低下、それに伴うディスバイオーシスをきたした。腸管から流入したと考えられるIgAは血中で顕著に増加したが、糖鎖修飾不全を起こしていたために血中でIgGと免疫複合体を形成し、腎臓に沈着した。実際、腸管で産生されるIgAは腎沈着を引き起こした。これらの結果から、腸管透過性の亢進やディスバイオーシスによって管腔内の異物が流入して腸管におけるIgA応答が亢進し、糖鎖修飾不全IgAが産生されると同時に、pIgRの異常でIgAトランスサイトosis障害が併発すると、このIgAを血中へ流入させて腎沈着を引き起こすという発症機序が予想された。

6. 表

表 1 定量 PCR に用いたプライマー配列のリスト

遺伝子名	プライマー配列
mouse <i>Ap1m2</i>	Forward: 5'-GGCGCTCTGAGGGCATTAAAGTA-3'
	Reverse: 5'-CTGAGCAAGACACTCCCATTAGCA-3'
mouse <i>B4galt1</i>	Forward: 5'-AATGATCCGGCATTCAAGAG-3'
	Reverse: 5'-CGATGTCCACTGTGATTTGG-3'
mouse <i>B4galt2</i>	Forward: 5'-AGCCAGCAGCAGTACCAACT-3'
	Reverse: 5'-TGAGGTGAATTCGATGACCA-3'
mouse <i>B4galt3</i>	Forward: 5'-GGAACGTTTAAACAGGGCAAA-3'
	Reverse: 5'-GTACGGGAGGCTGTATCCAA-3'
mouse <i>B4galt4</i>	Forward: 5'-AACCCACCTTATCACCTCTCC-3'
	Reverse: 5'-TAGCACCCACAAAGTAGTTGC-3'
mouse <i>B4galt5</i>	Forward: 5'-CTCGCTGCTCTACTTCGTCTA-3'
	Reverse: 5'-GCACCGATGGTCCTCACAT-3'
mouse <i>B4galt6</i>	Forward: 5'-GGGTCTCCAATCGCTCTCTG-3'
	Reverse: 5'-ATAAAGAGGTACGTGTTGGCG-3'
mouse <i>B4galt7</i>	Forward: 5'-GCCGGAAATGCTCCATCTTC-3'
	Reverse: 5'-ACCTGGGCCATATCTCCAGAA-3'
mouse <i>Gapdh</i>	Forward: 5'-AGGTCGGTGTGAACGGTTTG-3'
	Reverse: 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTC-3'
mouse <i>Pigr</i>	Forward: 5'-AGAACTCCAGGTTGCCGAAG-3'
	Reverse: 5'-ACGGATAGTGGCAGGAAACG-3'
mouse <i>Tbp</i>	Forward: 5'-CAAACCCAGAATTGTTCTCCTT-3'
	Reverse: 5'-ATGTGGTCTTCCTGAATCCCT-3'
mouse <i>Reg3g</i>	Forward: 5'-ATGGCTCCTATTGCTATGCC-3'
	Reverse: 5'-GATGTCCTGAGGGCCTCTT-3'

表 2 蛍光免疫染色に用いた抗体のリスト

一次抗体

抗体	クローン、型番	メーカー
Goat anti-mouse IgA	Cat. No. A90-103A	Bethyl Laboratories
Goat anti-pIgR	Cat. No. AF2800	R&D System
Rabbit anti-human C3d complement	Cat. No. A006302	DAKO
Rabbit anti-mouse E-cadherin	Cat. No. M108	Takara
Rabbit anti-RegIII γ	Cat. No. ab198216	Abcam
Rat anti-mouse CD31	clone MEC13.3	BioLegend
Rat anti-mouse CD107a (LAMP-1)	clone 1D4B	BioLegend
Rat anti-mouse IgA	clone RMA-1	BioLegend
Rat anti-ZO-1	Cat. No. 61-7300	Thermo Fisher Scientific

二次抗体

抗体	型番	メーカー
Alexa Flour 488 anti-goat IgG	Cat. No. A-11055	Thermo Fisher Scientific
Alexa Flour 555 anti-goat IgG	Cat. No. A-21432	Thermo Fisher Scientific
Alexa Flour 488 anti-mouse IgG	Cat. No. 715-545-150	Jackson ImmunoResearch
Alexa Flour 488 anti-rabbit IgG	Cat. No. A-21206	Thermo Fisher Scientific
Alexa Flour 555 anti-rabbit IgG	Cat. No. A-31572	Thermo Fisher Scientific
Alexa Flour 647 anti-rabbit IgG	Cat. No. A-31573	Thermo Fisher Scientific
Cy3 anti-rat IgG	Cat. No. 712-165-153	Jackson ImmunoResearch

表3 フローサイトメトリーに用いた抗体のリスト

(A) IgA 陽性細胞の解析に用いた細胞表面抗原に対する抗体

抗体	クローン	メーカー
BV650 anti-mouse CD45	30-F11	BioLegend
BV510 anti-mouse B220/CD45R	RA3-6B2	BD Bioscience
BV421 anti-mouse CD3ε	145-2C11	BioLegend
FITC anti-mouse IgA	C10-3	BD Bioscience

(B) GCB 細胞および Tfh 細胞の解析に用いた細胞表面抗原に対する抗体

抗体	クローン	メーカー
BV786 anti-mouse CD19	1D3	BD Bioscience
BV650 anti-mouse CD25	PC61	BD Bioscience
BV605 anti-mouse CD4	RM4-5	BD Bioscience
BV510 anti-mouse CD45	30-F11	BioLegend
Pacific Blue anti-mouse/human GL7	GL7	BioLegend
PerCP-eFlour 710 anti-CD279 (PD-1)	J43	Thermo Fisher Scientific
R718 anti-mouse CD95 (Fas)	Jo2	BD Bioscience
APC anti-mouse CD185 (CXCR5)	L138D7	BioLegend

(C) GCB 細胞および Tfh 細胞の解析に用いた転写因子に対する抗体

抗体	クローン	メーカー
PE anti-mouse FOXP3	FJK-16s	Thermo Fisher Scientific
PE-CF594 anti-mouse Bcl-6	K112-91	BD Bioscience

表 4 16S rRNA 遺伝子の V3–V4 領域の増幅に用いたプライマー配列

プライマー配列
Forward: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'
Reverse: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

7. 参考文献

1. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(3):141-153.
2. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(4):631-659.
3. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(5):356-368.
4. Johansson ME V, Hansson GC. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(10):639-649.
5. Rojas R, Apodaca G. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(12):944-955.
6. Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(12):821-832.
7. Fölsch H. Role of the epithelial cell-specific clathrin adaptor complex AP-1B in cell polarity. *Cell Logist.* 2015;5(2):e1074331.
8. Ohno H, Tomemori T, Nakatsu F, et al. Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett.* 1999;449(2-3):215-220.
9. Fölsch H, Ohno H, Bonifacino JS, Mellman I. A Novel Clathrin Adaptor Complex Mediates Basolateral Targeting in Polarized Epithelial Cells. *Cell.* 1999;99(2):189-198.
10. Takahashi D, Hase K, Kimura S, et al. The epithelia-specific membrane trafficking factor AP-1B controls gut immune homeostasis in mice. *Gastroenterology.* 2011;141(2):621-632.
11. Hase K, Nakatsu F, Ohmae M, et al. AP-1B-mediated protein sorting regulates polarity and proliferation of intestinal epithelial cells in mice. *Gastroenterology.* 2013;145(3):625-635.
12. Jangid A, Fukuda S, Seki M, et al. Association of colitis with gut-microbiota dysbiosis in clathrin adapter AP-1B knockout mice. *Blachier F, ed. PLoS One.* 2020;15(3):e0228358.
13. Stanifer ML, Mukenhirn M, Muenchau S, et al. Asymmetric distribution of TLR3 leads to a polarized immune response in human intestinal epithelial cells. *Nat Microbiol.* 2020;5(1):181-191.
14. Matsumoto R, Ogata K, Takahashi D, et al. AP-1B regulates interactions of epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Cell Mol Life Sci.* 2024;81(1):425.
15. Salzman NH, Bevins CL. Dysbiosis--a consequence of Paneth cell dysfunction. *Semin Immunol.* 2013;25(5):334-341.

16. Berbers RM, Franken IA, Leavis HL. Immunoglobulin A and microbiota in primary immunodeficiency diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2019;19(6):563-570.
17. Kinashi Y, Hase K. Partners in Leaky Gut Syndrome: Intestinal Dysbiosis and Autoimmunity. *Front Immunol*. 2021;12:673708.
18. Horowitz A, Chanez-Paredes SD, Haest X, Turner JR. Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2023;20(7):417-432.
19. Kovács T, Kun L, Schmelcz M, Wagner L, Davin JC, Nagy J. Do intestinal hyperpermeability and the related food antigens play a role in the progression of IgA nephropathy? I. Study of intestinal permeability. *Am J Nephrol*. 1996;16(6):500-505.
20. De Angelis M, Montemurno E, Piccolo M, et al. Microbiota and metabolome associated with immunoglobulin A nephropathy (IgAN). Moura IC, ed. *PLoS One*. 2014;9(6):e99006.
21. Lauriero G, Abbad L, Vacca M, et al. Fecal Microbiota Transplantation Modulates Renal Phenotype in the Humanized Mouse Model of IgA Nephropathy. *Front Immunol*. 2021;12:694787.
22. Tang Y, Zhu Y, He H, et al. Gut Dysbiosis and Intestinal Barrier Dysfunction Promotes IgA Nephropathy by Increasing the Production of Gd-IgA1. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:944027.
23. Zhu Y, He H, Sun W, et al. IgA nephropathy: gut microbiome regulates the production of hypoglycosylated IgA1 via the TLR4 signaling pathway. *Nephrol Dial Transplant*. 2024;39(10):1624-1641.
24. Lai KN, Tang SCW, Schena FP, et al. IgA nephropathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2(1):16001.
25. Tomana M, Matousovic K, Julian BA, Radl J, Konecny K, Mestecky J. Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney Int*. 1997;52(2):509-516.
26. Tomana M, Novak J, Julian BA, Matousovic K, Konecny K, Mestecky J. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *J Clin Invest*. 1999;104(1):73-81.
27. Hiki Y, Odani H, Takahashi M, et al. Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy. *Kidney Int*. 2001;59(3):1077-1085.
28. Lamas B, Hernandez-Galan L, Galipeau HJ, et al. Aryl hydrocarbon receptor ligand production by the gut microbiota is decreased in celiac disease leading to intestinal inflammation. *Sci Transl Med*. 2020;12(566):eaba0624.
29. Tajik N, Frech M, Schulz O, et al. Targeting zonulin and intestinal epithelial barrier function

- to prevent onset of arthritis. *Nat Commun.* 2020;11(1):1995.
30. El Marjou F, Janssen KP, Chang BHJ, et al. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis.* 2004;39(3):186-193.
 31. Karaki SI. A Technique of Measurement of Gastrointestinal Luminal Nutrient Sensing and These Absorptions: Ussing Chamber (Short-Circuit Current) Technique. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2023;69(3):164-175.
 32. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009;459(7244):262-265.
 33. Kimura S, Nakamura Y, Kobayashi N, et al. Osteoprotegerin-dependent M cell self-regulation balances gut infection and immunity. *Nat Commun.* 2020;11(1):234.
 34. Chintalacharuvu SR, Emancipator SN. The glycosylation of IgA produced by murine B cells is altered by Th2 cytokines. *J Immunol.* 1997;159(5):2327-2333.
 35. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-682.
 36. Shibata S, Iseda T, Mitsuhashi T, et al. Large-Area Fluorescence and Electron Microscopic Correlative Imaging With Multibeam Scanning Electron Microscopy. *Front Neural Circuits.* 2019;13:29.
 37. Weigmann B, Tubbe I, Seidel D, Nicolaev A, Becker C, Neurath MF. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nat Protoc.* 2007;2(10):2307-2311.
 38. Komiyama S, Yamada T, Takemura N, Kokudo N, Hase K, Kawamura YI. Profiling of tumour-associated microbiota in human hepatocellular carcinoma. *Sci Rep.* 2021;11(1):10589.
 39. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.* 2019;37(8):852-857.
 40. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D590-6.
 41. Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011;12(6):R60.
 42. Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, et al. The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science.* 2011;334(6053):255-258.
 43. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against

- attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med*. 2008;14(3):282-289.
44. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med*. 2009;206(7):1465-1472.
 45. Cao AT, Yao S, Gong B, Elson CO, Cong Y. Th17 cells upregulate polymeric Ig receptor and intestinal IgA and contribute to intestinal homeostasis. *J Immunol*. 2012;189(9):4666-4673.
 46. Kumar P, Monin L, Castillo P, et al. Intestinal Interleukin-17 Receptor Signaling Mediates Reciprocal Control of the Gut Microbiota and Autoimmune Inflammation. *Immunity*. 2016;44(3):659-671.
 47. Guzman M, Lundborg LR, Yeasmin S, et al. An integrin $\alpha E\beta 7$ -dependent mechanism of IgA transcytosis requires direct plasma cell contact with intestinal epithelium. *Mucosal Immunol*. 2021;14(6):1347-1357.
 48. Nishie T, Miyaishi O, Azuma H, et al. Development of immunoglobulin A nephropathy- like disease in beta-1,4-galactosyltransferase-I-deficient mice. *Am J Pathol*. 2007;170(2):447-456.
 49. McCarthy DD, Kujawa J, Wilson C, et al. Mice overexpressing BAFF develop a commensal flora-dependent, IgA-associated nephropathy. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3991-4002.
 50. Okazaki K, Suzuki Y, Otsuji M, et al. Development of a model of early-onset IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(8):1364-1374.
 51. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(5):313-323.
 52. Suzuki H, Yasutake J, Makita Y, et al. IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis have a shared feature involving galactose-deficient IgA1-oriented pathogenesis. *Kidney Int*. 2018;93(3):700-705.
 53. Suzuki Y, Monteiro RC, Coppo R, Suzuki H. The Phenotypic Difference of IgA Nephropathy and its Race/Gender-dependent Molecular Mechanisms. *Kidney360*. 2021;2(8):1339-1348.
 54. Kiryluk K, Li Y, Scolari F, et al. Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nat Genet*. 2014;46(11):1187-1196.
 55. Kiryluk K, Sanchez-Rodriguez E, Zhou XJ, et al. Genome-wide association analyses define pathogenic signaling pathways and prioritize drug targets for IgA nephropathy. *Nat Genet*. 2023;55(7):1091-1105.
 56. Waldherr R, Seelig HP, Rambašek M, Andrassy K, Ritz E. Deposition of polymeric IgA1 in idiopathic mesangial IgA-glomerulonephritis. *Klin Wochenschr*. 1983;61(18):911-915.
 57. Narita I, Kondo D, Goto S, et al. Association of gene polymorphism of polymeric immunoglobulin receptor and IgA nephropathy. *Intern Med*. 2001;40(9):867-872.

58. Obara W, Iida A, Suzuki Y, et al. Association of single-nucleotide polymorphisms in the polymeric immunoglobulin receptor gene with immunoglobulin A nephropathy (IgAN) in Japanese patients. *J Hum Genet.* 2003;48(6):293-299.
59. Su T, Chapin SJ, Bryant DM, Shewan AM, Young K, Mostov KE. Reduced immunoglobulin A transcytosis associated with immunoglobulin A nephropathy and nasopharyngeal carcinoma. *J Biol Chem.* 2011;286(52):44921-44925.
60. Orzech E, Schlessinger K, Weiss A, Okamoto CT, Aroeti B. Interactions of the AP-1 Golgi adaptor with the polymeric immunoglobulin receptor and their possible role in mediating brefeldin A-sensitive basolateral targeting from the trans-Golgi network. *J Biol Chem.* 1999;274(4):2201-2215.
61. Caceres PS, Gravotta D, Zager PJ, Dephoure N, Rodriguez-Boulan E. Quantitative proteomics of MDCK cells identify unrecognized roles of clathrin adaptor AP-1 in polarized distribution of surface proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(24):11796-11805.
62. Shimada S, Kawaguchi-Miyashita M, Kushiro A, et al. Generation of polymeric immunoglobulin receptor-deficient mouse with marked reduction of secretory IgA. *J Immunol.* 1999;163(10):5367-5373.
63. Uren TK, Johansen FE, Wijburg OLC, Koentgen F, Brandtzaeg P, Strugnell RA. Role of the polymeric Ig receptor in mucosal B cell homeostasis. *J Immunol.* 2003;170(5):2531-2539.
64. Simpfendorfer KR, Wang N, Tull DL, et al. Mus musculus deficient for secretory antibodies show delayed growth with an altered urinary metabolome. *Mol Med.* 2019;25(1):12.
65. Person T, King RG, Rizk D V, Novak J, Green TJ, Reily C. Cytokines and Production of Aberrantly O-Glycosylated IgA1, the Main Autoantigen in IgA Nephropathy. *J Interferon Cytokine Res.* 2022;42(7):301-315.
66. Makita Y, Suzuki H, Kano T, et al. TLR9 activation induces aberrant IgA glycosylation via APRIL- and IL-6-mediated pathways in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2020;97(2):340-349.
67. Zheng N, Xie K, Ye H, et al. TLR7 in B cells promotes renal inflammation and Gd-IgA1 synthesis in IgA nephropathy. *JCI Insight.* 2020;5(14):e136965.
68. Kim YG, Alvarez M, Suzuki H, et al. Pathogenic Role of a Proliferation-Inducing Ligand (APRIL) in Murine IgA Nephropathy. *Rastaldi MP, ed. PLoS One.* 2015;10(9):e0137044.
69. Mathur M, Barratt J, Chacko B, et al. A Phase 2 Trial of Sibeprenlimab in Patients with IgA Nephropathy. *N Engl J Med.* 2024;390(1):20-31.
70. Chemouny JM, Gleeson PJ, Abbad L, et al. Modulation of the microbiota by oral antibiotics treats immunoglobulin A nephropathy in humanized mice. *Nephrol Dial Transplant.*

- 2019;34(7):1135-1144.
71. Di Leo V, Gleeson PJ, Sallustio F, et al. Rifaximin as a Potential Treatment for IgA Nephropathy in a Humanized Mice Model. *J Pers Med*. 2021;11(4):309.
 72. Klaasen HLBM, Van der Heijden PJ, Stok W, et al. Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice. *Infect Immun*. 1993;61(1):303-306.
 73. Snel J, Bakker MH, Heidt PJ. Quantification of antigen-specific immunoglobulin A after oral booster immunization with ovalbumin in mice mono-associated with segmented filamentous bacteria or *Clostridium innocuum*. *Immunol Lett*. 1997;58(1):25-28.
 74. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 2009;139(3):485-498.
 75. Oemcke LA, Anderson RC, Altermann E, Roy NC, McNabb WC. The Role of Segmented Filamentous Bacteria in Immune Barrier Maturation of the Small Intestine at Weaning. *Front Nutr*. 2021;8:759137.
 76. Suzuki K, Meek B, Doi Y, et al. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(7):1981-1986.
 77. 川上 民裕, 有村 義宏, 池田 高治, 他. 皮膚血管炎・血管障害診療ガイドライン 2023—IgA 血管炎, クリオグロブリン血症性血管炎, 結節性多発動脈炎, リベド様血管症の治療の手引き 2023—. *日皮会誌*. 2023;9(133):2079-2134.
 78. Noval Rivas M, Wakita D, Franklin MK, et al. Intestinal Permeability and IgA Provoke Immune Vasculitis Linked to Cardiovascular Inflammation. *Immunity*. 2019;51(3):508-521.e6.
 79. Zhao J, Bai M, Yang X, Wang Y, Li R, Sun S. Alleviation of refractory IgA nephropathy by intensive fecal microbiota transplantation: the first case reports. *Ren Fail*. 2021;43(1):928-933.
 80. Zhi W, Song W, Abdi Saed Y, Wang Y, Li Y. Fecal Capsule as a Therapeutic Strategy in IgA Nephropathy: A Brief Report. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:914250.
 81. Lafayette R, Kristensen J, Stone A, et al. Efficacy and safety of a targeted-release formulation of budesonide in patients with primary IgA nephropathy (NefIgArd): 2-year results from a randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2023;402(10405):859-870.

謝辞

本博士論文研究を進めるにあたり、研究全般に渡ってご指導を賜りました慶應義塾大学薬学部生化学講座 長谷耕二教授、実験手技のご指導や研究方針についてアドバイスなど多大なサポートをしていただきました木村俊介准教授、高橋大輔専任講師、鈴木功一郎特任助教、本博士論文を校閲、校正していただきました小口宙之特任助授に感謝申し上げます。

本博士論文研究のなかで、腸上皮特異的な *Ap1m2* 欠損マウスを分与していただきました理化学研究所 大野博司チームリーダー、タモキシフェン処置プロトコルの作成や基礎的な実験手技をご指導していただきました慶應義塾大学薬学部 廣田雅人さん（研究当時、現沖縄科学技術大学院大学・博士研究員）、小腸オルガノイドの作出ならびに培養を実施していただきました慶應義塾大学薬学部 田中啓介さん、電子顕微鏡を用いた解析を実施していただきました慶應義塾大学医学部 芝田晋介専任講師（研究当時、現新潟大学・教授）、信藤知子技術員、IgA 腎症に関するデータについて臨床的な観点からご助言いただきました慶應義塾大学医学部 橋口明典専任講師、Ussing chamber を用いた TEER の測定を実施していただきました静岡県立大学 唐木晋一郎助教に感謝申し上げます。

本博士論文研究の遂行にあたり、ディスカッションの機会を設け、ご助言いただきました慶應義塾大学薬学部 三澤日出巳教授、復旦大学 王継揚教授、東京大学 新藏礼子教授、後肢麻痺の病態解析のための実験手技をご指導していただきました北海道大学 渡辺雅彦教授、山崎美和子准教授、今野幸太郎助教に感謝申し上げます。さらに、円滑な実験のため多大なご協力をいただきました慶應義塾大学薬学部生化学講座並びに動物管理室の皆様にご感謝申し上げます。

後期博士課程在学中、大学院生給与奨学金＜ドクター21＞に採用していただき、経済的なご支援をいただきました公益財団法人吉田育英会の皆様にご感謝申し上げます。

2024 年度は潮田記念基金による慶應義塾博士課程学生研究支援プログラム（全塾選抜枠）に採択していただき、研究遂行のためのご支援いただきました。感謝申し上げます。

最後に、日頃より多岐に渡ってサポートしていただいた家族に心より感謝申し上げます。