

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14360

研究課題名(和文) マウスモデルを用いたIgA腎症発症における腸内細菌叢と腸管免疫の役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of gut microbiota and gut immunity in the development of IgA nephropathy using its mouse model

研究代表者

浅野 雅秀 (ASANO, MASAHIDE)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：50251450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々が作製した 4GalT-1欠損マウスはIgA腎症を自然発症する。このマウスのIgA腎症発症機構を明らかにする目的で、腸内細菌叢や抹消リンパ組織でのIgA産生細胞、腸管での血球細胞の分布、ムチン型糖鎖の解析などを行った。4GalT-1欠損マウスの腸内細菌叢に顕著な異常は検出できなかったが、抹消のリンパ組織、特にパイエル板でのIgA産生細胞の増加が認められた。また、腸管の癒着部位にもB細胞の集積がみられ、これらが高IgA血症に関与していると思われる。IgA産生細胞および腸管上皮細胞特異的 4GalT-1欠損マウスの作製のためにターゲティングベクターをES細胞にノックインするところまで進めた。

研究成果の概要(英文)： 4GalT-1 KO mice that we generated spontaneously develop IgA nephropathy. To elucidate the mechanisms of IgA nephropathy in the mice, we examined gut microbiota, IgA producing cells in peripheral lymphoid tissues, distribution of blood cells in the gut and mucin-type carbohydrates. Whereas any significant differences were not observed in gut microbiota population between 4GalT-1 KO and control mice, the increase of IgA producing cells in peripheral lymphoid tissues, especially in mesenteric lymphnodes. Furthermore, B cells were accumulated in gut adhesive regions, suggesting these results might contribute hyper IgA in 4GalT-1 KO mice. Our project to generate IgA producing cell-specific or intestinal epithelial cell-specific conditional 4GalT-1 KO mice progressed to obtain ES cells in which a 4GalT-1 flox vector was knocked in.

研究分野：実験動物学

キーワード：IgA腎症 糖鎖 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は我が国の慢性糸球体腎炎の 30% 以上を占める代表的な腎疾患である。IgA が腎糸球体に沈着することにより発症し、発症後 20 年で患者の 30-40% が末期腎不全に移行する。IgA 腎症患者において IgA が糸球体に沈着する原因として、現在のところ、IgA の糖鎖不全による IgA の多量体化および血中の IgA 濃度が高いこと (高 IgA 血症) の 2 点が考えられている。扁桃の摘出により IgA 腎症が軽減することが知られているので、感染等による扁桃での IgA の過剰産生が疑われている。しかし、消化管の炎症が IgA 腎症の引き金になっている可能性も指摘されている。そこで、我々は主要な IgA 産生場である消化管に注目した。

我々はこれまでに、タンパク質への糖鎖付加を担うガラクトース転移酵素 (β 4GalT-1) を全身で欠損させたマウス (Asano *et al*, EMBO J, 1997) において、IgA への糖鎖付加が十分に行われず IgA 腎症を自然発症することを報告してきた (Nishie *et al*, Am J Pathol, 2007)。この β 4GalT-1 欠損マウスは患者と同様に血中 IgA 濃度が高く (図 1)、IgA が多量体を形成していた。したがって、IgA の糖鎖不全がこのマウスの IgA 腎症発症の原因である可能性が考えられる。

一方、腸内細菌叢が腸管免疫に大きな影響を与えることが様々な研究により明らかにされ、最近、腸管内の IgA 産生と腸内細菌は互いに影響を及ぼし合っている (Kawamoto *et al*, Immunity, 2014) ことも報告されている。しかし、IgA 腎症の発症と腸内細菌叢や腸管免疫との関連を研究した報告はこれまでにほとんどない。予備的な実験で、 β 4GalT-1 欠損マウスの腸内細菌叢に変化が検出されたことから、IgA 腎症発症の原因として腸内細菌叢の異常の可能性も考えられる。

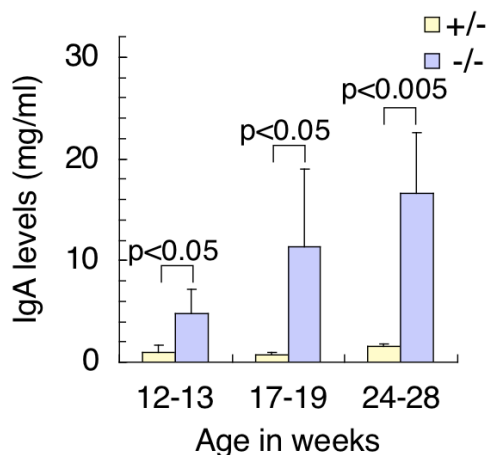


図1 血中の IgA 濃度

2. 研究の目的

β 4GalT-1 欠損マウスの IgA 腎症発症の原因究明には、高 IgA 血症の原因を明らかにする必要がある。抹消のリンパ組織や腸管のリンパ組織での IgA 産生細胞数を定量して、IgA を過剰産生するリンパ組織を明らかにする。また、 β 4GalT-1 欠損マウスの腸内細菌叢を、IgA 腎症発症前の 2 ヶ月齢と発症後の 6 ヶ月齢について解析を行い、コントロールマウスとの違いを明らかにする。さらに、 β 4GalT-1 欠損マウスにおける糖鎖欠損が腸内細菌叢の変化や高 IgA 血症へ与える影響を明らかにするために、IgA 産生細胞特異的および腸管上皮細胞特異的 β 4GalT-1 欠損マウスを作製する。以上の解析で腸内細菌叢や腸管免疫の異常が高 IgA 血症の原因であることがわかれば、IgA 腎症の治療に新しい考えを提唱することができると考えている。

3. 研究の方法

(1) β 4GalT-1 欠損マウスの腸内細菌叢の解析

IgA 腎症発症前の 2 ヶ月齢 (それぞれ 2 匹ずつ) と発症後の 6 ヶ月齢 (それぞれ 3 匹ずつ) の β 4GalT-1 欠損マウスとコントロールのヘテロマウス (IgA 腎症は発症しない) から新鮮糞便を採取し、液体窒素で凍結した。サンプルを実験動物中央研究所に送付して、TRFLP 法 (Restriction Fragment Length Polymorphism) による腸内細菌叢の解析を委託した。糞便中に含まれる微生物群から全 DNA を抽出し、リボソーム RNA 遺伝子上に存在する全細菌に共通な配列を対象に蛍光標識されたプライマーによる PCR を行い、細菌のリボソーム RNA 遺伝子を増幅した。この PCR 産物を複数の制限酵素で処理し、電気泳動で PCR 産物を検出した。この検出結果から DNA 断片の数や、蛍光強度を測定することにより、細菌の群衆構造を解析した。

(2) ELISpot 法及び FACS による IgA 産生細胞数の定量

脾臓 (SPL)、パイエル板 (PPL)、腸間膜リンパ節 (MLN) を採取して細胞を調製し、Enzyme-linked immunospot (ELISpot) 法にて IgA 産生細胞数 (抗 IgA 抗体と反応するスポット数) をカウントした。

上記のリンパ組織に加えて、末梢血 (PBL) と骨髓細胞 (BMC) から細胞を調製し、FACS を用いて IgA 産生細胞 (B220⁺, IgA⁺) 数をカウントした。

(3) 腸管の組織学的解析

β4GalT-1 欠損マウスとコントロールマウス（それぞれ2ヶ月齢3匹と6ヶ月齢3匹、10ヶ月齢3匹）を頸椎脱臼により安楽殺を行い、十二指腸と空腸、回腸、結腸、直腸を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。脱水、透徹後、パラフィンに包埋し、4 μm の切片を作製した。切片を脱パラフィンした後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、顕微鏡下に形態的な観察を行った。

また、腸管のムチン型糖鎖を定量するために、切片を脱パラフィンした後、アルシアンブルー染色を行った。アルシアンブルーは酸性粘液多糖類の中のカルボキシル基と硫酸基に結合することにより、ムチン型糖鎖を青色に染色する。Image Jを用いて青色部分を定量し、絨毛組織中のムチン型糖鎖の量として測定した。

免疫染色は以下の1次及び2次抗体を用いて行った。1次抗体として、ヤギ由来 DyLight 488 標識マウス IgA 抗体、ウサギ由来抗 CD3 抗体、ラット由来抗 CD45R(B220)抗体、アルメニアンハムスター由来 FITC 標識抗 CD11c 抗体を用いた。またネガティブコントロールとしてヤギ由来 IgG、ラット由来 IgG、ウサギ由来 IgG を用いた。2次抗体として、Alexa Fluor 488 標識抗ラット IgG 抗体、Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体、Alexa Fluor 488 標識抗ヤギ IgG 抗体を用いた。

(4) β4GalT-1 コンディショナル KO マウスの作製

IgA 産生細胞特異的および腸管上皮細胞特異的 β4GalT-1 欠損マウスを作製するために、β4GalT-1 flox のターゲティングベクターを作製した。Crispr/Cas9 システムを用いてマウスの受精卵あるいはマウスの ES 細胞にターゲティングベクターと gRNA 及び Cas9 を導入して、β4GalT-1 flox のターゲティングベクターのノックインを試みた。

4. 研究成果

(1) β4GalT-1 欠損マウスの腸内細菌叢の解析

金沢大学に在籍中に予備実験として、β4GalT-1 欠損マウスとコントロールマウスをそれぞれ1匹ずつで、腸内細菌叢の解析をヤクルト中央研究所の松本博士に依頼して行った。その結果、*Proteobacteria* (大腸菌などを含む真性細菌属) が大きく減少しているのに対して、*Bacteroidetes* が顕著に増加していることを見いだした。しかし、1匹ずつの結果であったので、京都大学に移ってからあらためて、IgA 腎症発症前の2ヶ月齢（それぞれ2匹ずつ）と発症後の6ヶ月齢（それぞれ3匹ずつ）のそれぞれの

マウスの糞便中の腸内細菌叢を TRFLP 法で解析した。

2ヶ月齢では両マウスにほとんど違いは見られなかった。6ヶ月齢については、β4GalT-1 欠損マウスにおいて *Lactobacillus* と *Parasutterella* がコントロールの約70%に減少していた（前者は有意差なし、後者は有意差あり）が、*Bacteroidetes* には差がなく、予備実験のような顕著な差は検出できなかった（図2）。解析方法も異なり、飼育環境も変化したので、金沢大学での結果は追試できなかった。*Lactobacillus* が減少していることが高 IgA 血症と関連があるかもしれないが、差が顕著ではないので、これ以上の解析は行わなかった。

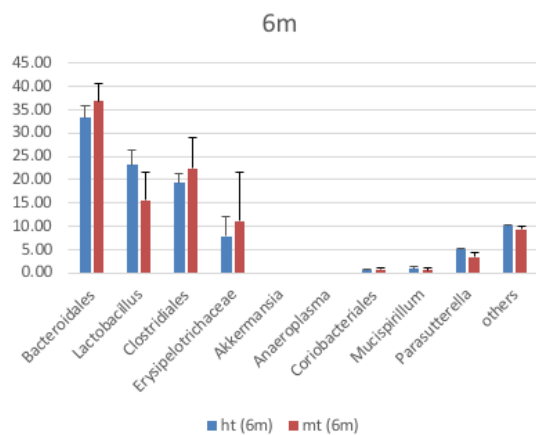


図2 6ヶ月齢の腸内細菌叢の解析

(2) ELISpot 法及び FACS による IgA 産生細胞数の定量

β4GalT-1 欠損マウスの血中 IgA 濃度は 8-10 倍コントロールマウスより高値を示した（図1）。そこで IgA を過剰に産生しているリンパ組織を同定するために、まず ELISpot 法により SPL, PPL, MLN の IgA 産生細胞数をカウントした。いずれのリンパ組織でも β4GalT-1 欠損マウスの方が IgA 産生細胞が多い傾向にあったが、有意な差ではなかった。なお、MLN では約 2.5 倍に増加していた（図3）。

次に FACS を用いて上記のリンパ組織に PBL と BMC を加えて、IgA 産生細胞 (B220⁺, IgA⁺) 数をカウントした。BMC 以外のいずれのリンパ組織や血球細胞でも β4GalT-1 欠損マウスの方が IgA 産生細胞が多い傾向にあったが、その差は 2 倍以下で有意な差ではなかった。なお、この解析でも MLN では約 2 倍に増加していた。以上のことから、8-10 倍の血中 IgA 濃度の増加を説明できるほどではないが、β4GalT-1 欠損マウスでは多くのリンパ組織で IgA の産生が亢進しており、特に MLN では 2 倍以上の増加が認められ、高 IgA 血症の原因

の一つとして、MLNでのIgAの産生亢進が考えられた(図4)。

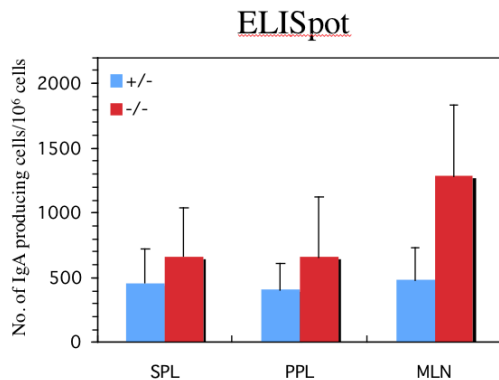


図3 ELISpotによるIgA産生細胞数のカウント

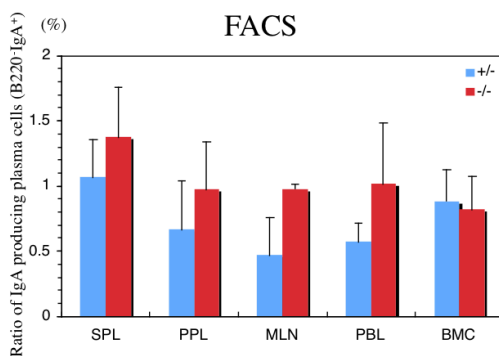


図4 FACSによるIgA産生細胞数のカウント

(3) 腸管の組織学的解析

十二指腸と空腸、回腸、結腸、直腸の切片について、まずヘマトキシリン・エオジン染色を行った。6ヶ月齢や10ヶ月齢のβ4GalT-1欠損マウスでは腸管同士あるいは腸管と腹膜との癒着が見られる個体があり、このような病変部ではリンパ球の集積が認められた。しかし、それ以外の部位ではいずれの月齢でもコントロールマウスとの形態的な違いは検出されなかった。

次にCD3抗体、CD45R(B220)抗体、CD11c抗体、IgA抗体を用いて免疫染色を行った。癒着部位には特にCD45R(B220)抗体陽性のB細胞の集積が認められたが、他の部位についてはいずれの月齢でも両マウスの間で違いは検出されなかった。また、いずれの腸管上皮でも両マウスにおいてIgA抗体のシグナルの違いは見られなかった。以上のことから癒着部位ではB細胞が集積してIgA産生が亢進している可能性が考えられたが、全体として免疫染色では顕著な違いは検出できなかった。

最後に腸管でのムチン型糖鎖の発現を調べるために、アルシアンブルー染色を行った。10ヶ月齢のβ4GalT-1欠損マウスの小腸(十二指腸や空腸)において、2倍程度アルシアン

ブルー染色の強いシグナルが得られた。このことは月齢が進むとムチン型糖鎖の発現が上昇する可能性が示唆された。β4GalT-1の欠損によりムチン型糖鎖が亢進する直接の因果関係はわからないが、ムチン型糖鎖の変化が腸内細菌叢や腸管免疫に影響を与えている可能性が考えられた。

(4) β4GalT-1コンディショナルKOマウスの作製

β4GalT-1欠損によるIgA腎症の発症原因がIgA分子の糖鎖不全にあるのか、腸管上皮などの糖鎖不全による腸管免疫の異常によるのかを明らかにするために、IgA産生細胞特異的および腸管上皮細胞特異的β4GalT-1欠損マウスを作製することにした。当初はEUCOMMに登録されていたloxPサイトを導入したβ4GalT-1のターゲティングベクターを利用することを考えて注文したが、結局入手することができず時間を無駄にしてしまった。そこで、自分たちでエクソン2をloxP配列で挟んだターゲティングベクターを作製した。Crispr/Cas9法によるノックインを受精卵で成功している研究室は限られており、難しいと言われていたが、受精卵で直接ノックインができるので早く目的のマウスを得ることができるので、まずはこのターゲティングベクターをノックインサイトに設定したgRNAとCas9タンパク質ともに受精卵に導入した。受精卵を卵管に移植せずに培養で胚盤胞まで発生させて、PCRでターゲティングベクターのノックインを調べたが、結果は陰性であった。そこでES細胞への導入に変更し、予想通りにノックインできたクローンを2つ得ることができた。本研究費は30年度末で終了するが、今後もこのクローンをを用いて、IgA産生細胞特異的および腸管上皮細胞特異的β4GalT-1欠損マウスの作製を続けていく予定である。

(5) まとめ

腸内細菌叢とIgA腎症については興味のあるところであったが、β4GalT-1欠損マウスとコントロールマウスの間ではIgA腎症発症前は腸内細菌叢にほとんど差がなく、発症後も*Lactobacillus*と*Parasutterella*に若干の減少がみられたが有意差はなく、はっきりした違いは検出できなかった。ELISpotとFACSによるIgA産生細胞数のカウントでは、多くのリンパ組織でβ4GalT-1欠損マウスの方がIgA産生細胞数が若干増加しており、特にMLNでは2倍以上の違いがあった。しかし、血中のIgA濃度が10倍も高いことを完全に説明できるほどではなかった。他にIgAを過剰産生する細胞があるのか、血中の糖鎖不全IgAは分解されにくいのか、さらなる検討が必要と思われる。その意味では免疫染色による免疫担当細胞の数は顕著な違いがなかったが、癒着部位ではB細胞の集積がみられ、この癒着部分でのIgAの過剰産生が重要なかもしれない。

β 4GalT-1 欠損マウスの小腸において、ムチン型糖鎖の亢進がみられたことから、このことが腸内細菌叢や腸管免疫に影響を与えている可能性が考えられた。引き続き IgA 産生細胞特異的および腸管上皮細胞特異的 β 4GalT-1 欠損マウスの作製を進めており、今後このマウスを用いて、糖鎖不全による IgA 腎症の発症機構についてさらなる知見が得られることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 浅野雅秀, 発生過程と神経系における LacCer 合成酵素の役割分担, 第 18 回関西グライコサイエンスフォーラム, 招待講演, 2018 年

[その他]

ホームページ等

<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/research/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅野 雅秀 (ASANO Masahide)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：5 0 2 5 1 4 5 0

(2)研究分担者

成瀬 智恵 (NARUSE Chie)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：3 0 3 7 2 4 8

(3)連携研究者

杉原 一司 (SUGIHARA Kazushi)
京都大学・大学院医学研究科・技術職員
研究者番号：1 0 3 7 7 4 1 8