

抗体の突然変異障害によって起こる病態の解析

長浜バイオ大学 バイオサイエンス学部 バイオサイエンス学科
遺伝子生命科学コース 生体応答学教室
新蔵 礼子

1. 背景と目的

腸管内には多種多様な細菌が常に生息し、宿主と平和的な共生関係を築いている。この共生関係が崩れると、炎症性腸疾患や肥満、糖尿病をはじめとする生活習慣病、大腸ガンなど各種疾患の発症に繋がり、腸内環境を恒常的に維持することは健康維持に重要である。IgA は粘膜面の病原菌防御だけでなく腸内常在細菌の制御にも重要であり、このような共生関係の維持にもきわめて重要であると考えられる。腸管に分泌される IgA は腸内細菌に対して poly-reactive に反応すること、また、低親和性を示すことから、粘膜面の第一線防御に重要と考えられてきた。しかし、具体的に IgA が腸内細菌をどのように認識し制御するかは明らかではなく、IgA の腸内細菌認識異常がどのような病態を引き起こすかも明らかではない。

申請者は、AID (Activation- Induced Cytidine Deaminase) 遺伝子変異による体細胞突然変異の障害を解析するため、体細胞突然変異に障害のある AID 変異体 (G23S) をノックインして、低親和性の IgA 抗体しか作れないマウス (G23S マウス) を作製した。このマウスでは、腸管 IgA の分泌量は正常であったが、IgA の体細胞突然変異は野生型マウスに比べて著しく低下していた。G23S マウスはコレラ毒素の投与で野生型マウスより死に易いことを報告した (参考文献)。この現象は、野生型マウスでは、IgA に突然変異を蓄積することにより、コレラ菌以外の細菌に強い結合を持つ抗体が産生されており、この抗体がコレラ毒素に対しても交叉反応を示すために生じた可能性がある。すなわち、IgA が腸管粘膜で十分な防御機能を果たすためには、単に一定濃度の IgA が腸管内において存在するだけでは不十分であり、IgA 抗体遺伝子に体細胞突然変異が蓄積し、その結果、多種類の腸内細菌に対して高親和性を持つ IgA 抗体が存在すること、が必要であることを示していると考えられる。

一方、このマウスでは腸内細菌の異常増殖、腸管リンパ臓器の過形成 (特にパイエル板胚中心 B 細胞の増加) が見られることも報告した (参考文献)。十分な高親和性を獲得した IgA 抗体を産生できないため、IgA の腸内細菌認識異常が原因で腸管バリア機能が損なわれた結果、異常増殖した常在腸内細菌が宿主の免疫系を過剰刺激した結果と考えられた。このように G23S マウスでは宿主と腸内細菌との平和的な共生関係が崩れており、ヒトで報告されている炎症性腸疾患などの疾病につながるのではないかと予想され、本研究では G23S マウスの主に大腸における病態を解析した。

2. 方法

① G23S マウスと野生型マウスの大腸の免疫組織学的検討

30 週齢以上の G23S マウスと野生型マウスを解剖して、大腸全長の凍結切片を作成した。HE 染色、および各種蛍光抗体 (CD11b, CD4, CD8, B220, CD3, PNA, IL-6, IL-17) による免疫組織染色を行い大腸の炎症性病変の評価を行った。

② 硫酸デキストラン (DSS) の経口投与による腸管バリア機能の検討

潰瘍性大腸炎 (IBD) のモデルとして、薬剤 (硫酸デキストラン、DSS) の経口投与による腸炎発症モデルがよく利用される。腸管バリア機能が損なわれた IgA 欠損マウス、TLR5 欠損マウス、Myd88 欠損マウスなどでは野生型マウスに比べて DSS 投与により顕著な大腸炎が起こることが知られている。G23S マウスは IgA の機能異常による腸管バリア機能の低下が予想されるので、3% DSS 経口投与による腸炎の重篤度を野生型マウスと比較した。指標は体重減少、HE 染色による炎症像、また組織切片のトルイジンブルー染色を行うことで DSS の腸管組織内への浸潤度を比較した。

3. 結果

①高週齢マウスにおける被毛の観察

今回の研究の発端は SPF 領域で飼育しているにもかかわらず、高週齢の G23S マウスの被毛が同週齢の野生型マウスに比較して粗くなることを見出したことであった。被毛の状態の悪化は C57BL/6 バックグラウンドより BALB/c バックグラウンドの G23S マウスで顕著であった。

②大腸の免疫組織学的検討

1例として35週齢のG23Sマウスの大腸の組織像を以下に示す。(図 1) 絨毛の破壊像、リンパ球や単球浸潤とそれに一致したIL-6などの炎症性サイトカインの産生が認められた。高週齢のG23Sマウスは自然発症の大腸炎を起こしていた。

図 1

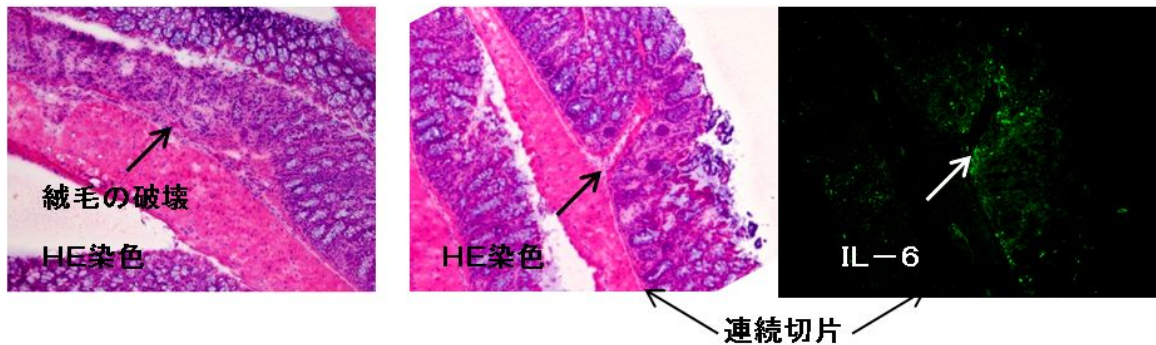
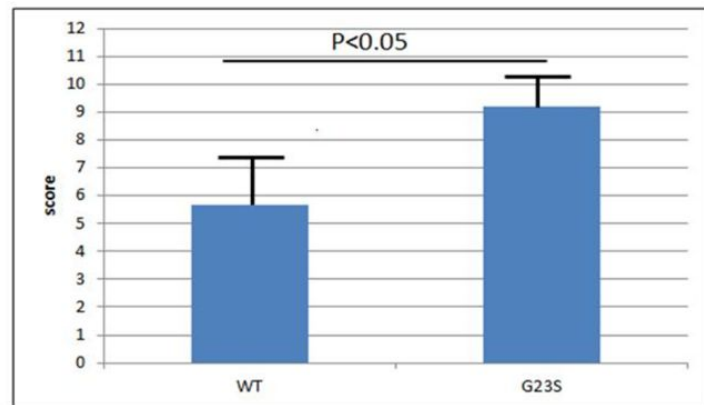


図 2

スコアの判定

- ①炎症の重症度(0-3点)
- ②炎症細胞の数(0-3点)
- ③クリプトの損傷(0-4点)
- ④炎症の範囲(0-4点)

(①+②+③) × ④
最大40点で計算



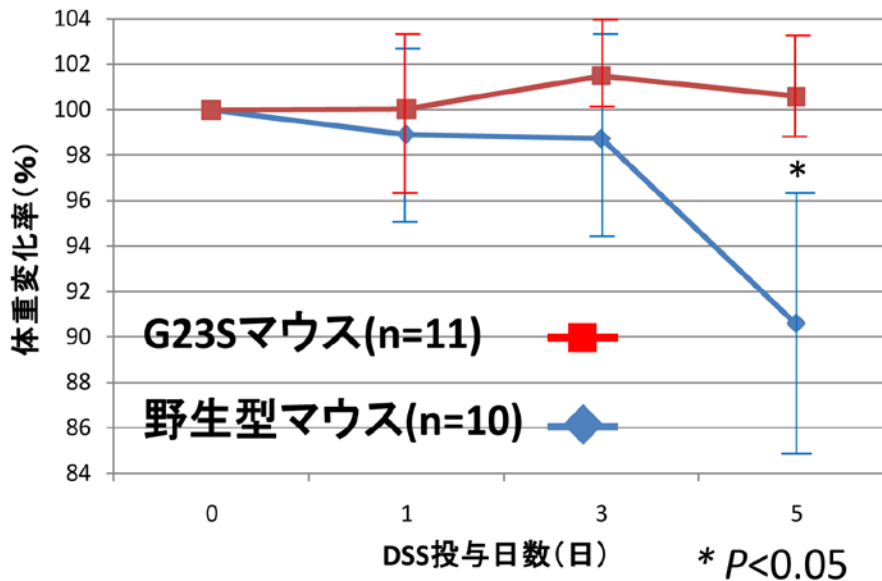
43週齢以上のマウス

図2は43週齢以上のマウスにおける大腸の炎症性病変をスコア化したデータである。G23Sマウスは同週齢の野生型マウスに比較してより重篤な炎症を起こしていた。

③ DSSの経口投与による腸管バリア機能の検討

図 3は3% DSSを飲料水に混ぜてマウスに経口投与させたときの体重変化率のグラフである。予想に反してG23Sマウスよりも野生型マウスの方が大きな体重減少を示した。軟血便の程度も野生型マウスの方が顕著であった。データは示さないが、HE染色による組織像の観察でも野生型マウスの方がより広範囲に重篤な大腸の炎症が観察された。また、トルイジンブルー染色によりDSSの腸管組織内への浸潤を調べたところ、潰瘍部分において粘膜下にトルイジンブルーが染色されているのは野生型マウスの大腸で容易に観察できたが、G23Sマウスの大腸ではトルイジンブルーは上皮の腸管腔側に付着しているものがほとんどで粘膜下が染色されている部位はごく稀であった。このことから、G23Sマウスは経口投与したDSSが大腸に達していたが粘膜バリアにより上皮への接触が相対的に妨げられていたと考えられる。そのため、体重減少も少なく、また炎症の重篤度も軽度だったと考えられる。

図 3



4. 考察とまとめ

体細胞突然変異の障害によって低親和性のIgA抗体しか作れないマウス（G23Sマウス）では、腸内常在細菌により過剰に免疫系が刺激された結果、胚中心B細胞の過形成が起こることを以前に報告した。今回の研究では過剰刺激が持続すると約30週齢以上のG23Sマウスでは同週齢の野生型マウスに比較してより重篤な大腸の炎症病変が観察された。DSSなどの薬剤の投与と関係なくG23Sマウスは自然に炎症性大腸炎を発症した。原因が特定できない難病疾患の一つである潰瘍性大腸炎の病態に類似しており、その発症メカニズムを探る良いモデルマウスになると考えられる。最近の研究で、ある特定の腸内細菌と炎症性腸疾患との関連が報告されているが、必ずしも原因菌が各症例で特定できないのが現状である。同様にG23Sマウスの腸内細菌叢の構成が野生型マウスと異なるという証拠はまだない（現在メタゲノム解析中）。これらの知見から、炎症性腸疾患の根本の原因は、特定の細菌に帰するというよりも腸管粘膜バリアがなんらかの原因で弱まり腸内細菌や食物成分によって腸管免疫系が持続的に過剰に刺激されることにあると考える。

この仮説に基づき、G23Sマウスの腸管粘膜バリアの機能を検討するためDSS経口投与を行った。G23SマウスはIgAの機能異常があるのでバリア機能が低下しており、野生型マウスよりDSSに対する感受性が高いであろうと予想したが、それに反してDSSに対して抵抗性を示した（体重減少率による評価）。この理由として考えられるのは、G23SマウスではIgA抗体の機能異常を補完するための生体応答として自然免疫応答が亢進しており、そのためにDSSという化学物質に対しては非特異的ないわゆる物理的バリア機能が亢進して抵抗性を示したのではないだろうか。一方でIgAが認識すべき腸内細菌に対するバリア機能は十分でなく、宿主の免疫系が過剰刺激される結果になったのではないだろうか？

今後はこの仮説を証明するために、自然免疫応答の指標としてムチンやマイクロペプチドの産生量、また炎症反応の指標として炎症性サイトカインとそれを分泌するT細胞の種類など、G23Sマウスにおける免疫応答を詳細に調べる予定である。

5. 参考文献

Wei M*, [Shinkura R*](#), Doi Y, Maruya M, Fagarasan S. and Honjo T. (*equal contributors)

Knock-in mice carrying a somatic hypermutation-defective *Aicda* mutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. *Nat Immunol.* 12(3), 264-270,2011.