

氏 名 ・ (本籍)	中村 亮太郎 (大阪府)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	医博甲第 889 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科 ・ 専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	<b>Alterations in Intestinal Permeability Cause Colonic Inflammation and Fibrosis in Type III Phosphatidylinositol Phosphate Kinase-Deficient Mice</b> (Type III ホスファチジルイノシトールリン酸キナーゼ欠損マウスの大腸における炎症および線維化は大腸壁の透過性の異状による腸内細菌の侵入に起因する)
論文審査委員	(主査) 教授 石井 聡 (副査) 教授 大西 洋英 教授 後藤 明輝

## 学位論文内容要旨

ALTERATIONS IN INTESTINAL PERMEABILITY CAUSE COLONIC INFLAMMATION AND FIBROSIS IN TYPE III PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHATE KINASE-DEFICIENT MICE (Type III ホスファチジルイノシトールリン酸キナーゼ欠損マウスの大腸における炎症および線維化は大腸壁の透過性の異状による腸内細菌の侵入に起因する)

申請者指名：中村 亮太郎

### 研究目的

炎症性腸疾患 (IBD) であるクローン病および潰瘍性大腸炎は遺伝性の高い疾病である。近年のゲノムワイド関連研究から、phosphoinositides phosphatase myotubularin-related protein 3 (MTMR3) が IBD 発症における原因遺伝子候補の一つである事が報告されている。MTMR3 はホスファチジルイノシトール-3-リン酸 (PI3P) およびホスファチジルイノシトール-3,5-ニリン酸 (PI(3,5)P<sub>2</sub>) を基質とする脱リン酸化酵素であるが、細胞内小胞輸送に重要な役割を果たすこれらのホスホイノシタイドと IBD 発症との関連は未解明であった。我々は PI3P を基質に PI(3,5)P<sub>2</sub> を産生する Type III ホスファチジルイノシトールリン酸キナーゼ (PIP3KIII) の腸特異的欠損マウスが線維化を伴う重篤な炎症性腸疾患のモデルとなることを報告している。本研究は PI3P、PI(3,5)P<sub>2</sub> 代謝異常を伴う本モデルマウスを用いて、大腸における炎症発生の原因を明らかにする事を目的とした。

### 研究方法

Pip3KIII flox マウスと、腸上皮特異的に働く Vilin プロモーターを利用した Vilin Cre マウスを掛け合わせる事で腸特異的 PIP3KIII 欠損マウスを得た。イミペネムおよびバンコマイシンを飲料水に含ませ、母体時から離乳後実験に用いるまでの 4~5 週齢まで経口投与を継続的に行う事で、腸内細菌の関与を検証した。マウスの大腸組織をホルマリン固定後にパラフィン包埋したものを薄切し、HE、アザン、PAS 染色後に組織学的に解析した。蛍光標識した大腸菌およびデキストランをマウスの直腸に直接注入して、1 時間後に摘出した大腸から凍結切片を作製し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて観察した。大腸壁における腸内細菌の易侵入性の検討のため、大腸組織を摘出後、抗生物質溶液を用いて組織表面に付着した細菌を殺菌し、組織の懸濁液を LB 寒天培地上で 24 時間培養した後、生育したコロニー数を測定した。

### 研究成績

組織学的解析の結果、腸特異的 PIP3KIII 欠損マウスの大腸において白血球の浸潤、粘膜肥厚、線維化の亢進、杯細胞の消失が認められた。これらの病態への抗生物質投与の影響を評価したところ、投与群において腸内炎症および線維化が非投与群に比べ有意に減少していた。この事から、変異マウスの大腸で認められた炎症および線維化の発症に腸内細菌が関与する事が考えられた。次に、変異マウスの腸上皮細胞間の傍細胞透過性を評価した。変異マウスでは外部より注腸した蛍光標識大腸菌およびデキストランの腸粘膜内における数が対照マウスに対して有意に増加しており、大腸粘膜バリア機構が破綻している事が確認された。さらに、この異常が実際に腸内細菌の粘膜層への易侵入性をもたらすか否かを検証したところ、変異マウス大腸粘膜内の細菌数が対照と比較し有意に増加していた。以上の結果から、腸特異的 PIP3KIII 欠損マウスにおける大腸炎および線維化の発生は、大腸粘膜のバリア機能の低下に起因した腸内細菌の腸粘膜への侵入が原因である事が明らかになった。

### 結論

腸特異的 PIP3KIII 欠損マウスは下痢を伴う成長障害が認められ、生存率が著しく低下する。その背景には腸管における重篤な炎症細胞浸潤と線維化があると考えられており、これらの病理所見は炎症性腸疾患 (IBD) であるクローン病の病態と類似している。変異マウスでは炎症性腸疾患のマーカー遺伝子 (TNF $\alpha$ 、IL1 $\beta$ 、IL-6、IL-12b) の発現上昇が観察されていたが、発症の主たる要因は不明であった。本研究では、PIP3KIII の欠損が大腸上皮組織の破壊を引き起こす事で惹起される腸内細菌の組織内への侵入が炎症を引き起こす事を見出した。現在のところ、PIP3KIII の遺伝子異常が見られるヒト疾患は角膜斑点状ジストロフィーを除き報告がないが、今後 IBD を含むヒト疾患への PIP3KIII の関与が明らかになる事が期待される。本研究で得られた知見は、ホスホイノシタイド代謝と腸疾患の関連の解明と、IBD の新たな治療法開発の一助となるものであると期待される。

## 学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 石井 聡

申請者： 中村 亮太郎

論文題名：

ALTERATIONS IN INTESTINAL PERMEABILITY CAUSE COLONIC INFLAMMATION AND FIBROSIS IN  
TYPE III PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHATE KINASE-DEFICIENT MICE

(Type III ホスファチジルイノシトールリン酸キナーゼ欠損マウスの大腸における炎症および線維化は大腸壁の透過性の異状による腸内細菌の侵入に起因する)

要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、Type III ホスファチジルイノシトールリン酸キナーゼ (PipkIII) の腸管上皮特異的欠損マウスの大腸で起こる炎症および線維化の機序を明らかにするために行われたものである。変異マウスに抗生物質を継続的に経口投与した結果、炎症・線維化が緩和した事から、PipkIII 欠損大腸で見られる病態に腸内細菌が関与する事が認められた。また、外部より注腸した蛍光標識大腸菌の粘膜固有層における数が対照と比較して有意に増加しており、PipkIII 欠損大腸の粘膜バリア機構の破綻が確認された。さらに、マウスの大腸組織をホモジナイズし LB 寒天培地に播種した際、24 時間後に形成されたコロニー数が変異マウスで有意に多かった事から、PipkIII 欠損によって腸内細菌の大腸粘膜への侵入性が高くなっている事が確認された。

本研究によって、PipkIII 欠損に基づいて大腸粘膜バリア機構が破綻し、腸内細菌が粘膜層に侵入する事で炎症および線維化が起こる事が明らかとなった。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

#### 1) 斬新さ

本研究で用いた腸管上皮特異的 **PipkIII** 欠損マウスは、既報の腸炎マウスモデルとは異なり、腸炎に激しい線維化を伴う点が特徴的で希少な疾患モデルである。このような独自の疾患モデルマウスを用いた病態発症機序の解明は斬新な研究である。

#### 2) 重要性

腸管上皮特異的 **PipkIII** 欠損マウスは線維化を伴う腸炎というクローン病に類似した病態を呈する。本マウスにおける腸炎発症機序の解明は、クローン病の病態の更なる理解に繋がりうる重要なものである。

また、近年のゲノムワイド関連解析から、 **phosphoinositides phosphatase myotubularin-related protein 3 (Mtmr3)** が **IBD** の関連遺伝子である事が報告されている。**MTMR3** はホスファチジルイノシトールイノシトール-3-リン酸 (**PI3P**) および ホスファチジルイノシトール-3,5-二リン酸 (**PI(3,5)P2**) の 3 位を脱リン酸化するホスファターゼであるが、**IBD** 発症との関連は未解明であった。本研究は **PI3P** および **PI(3,5)P2** の代謝異常を伴う **PipkIII** 欠損マウスを用いて炎症・線維化の機序に迫ったものであり、イノシトールリン脂質代謝と **IBD** の関連を考える上でも重要な研究である。

#### 3) 研究方法の正確性

腸炎が発症していない状態においても、**PipkIII** の欠損のみによって大腸壁の透過性の異状が引き起こされるという直接的な根拠が示されなかった点は今後検討する必要があるが、組織染色法による炎症・線維化の定量的評価、**GFP** 大腸菌の粘膜層への侵入の評価、大腸粘膜への腸内細菌の評価は客観的で正確性がある。

#### 4) 表現の明瞭さ

研究の背景、目的、結果および考察が明瞭に示されており、文章も簡明である。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。