

氏 名 たむら けんたろう
田村 賢太郎

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 126 号

学位授与年月日 平成 26 年 3 月 21 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 医学領域 博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 **Increased production of intestinal immunoglobulins in
Syntenin-1 deficient mice**
（Syntenin-1 欠損マウスでは腸管免疫グロブリン産生が亢進する）

論文審査委員

（主査）	教 授	齋藤 滋
（副査）	教 授	山本 善裕
（副査）	教 授	白木 公康
（副査）	教 授	布施 秀樹
（指導教員）	教 授	足立 雄一

論文内容の要旨

〔目的〕

Syntenin-1 (Syndecan binding protein, Sdcbp) は、PDZ ドメインをもつ細胞内タンパクであり、他の細胞膜タンパク等と相互作用することで、タンパク輸送、悪性黒色腫細胞の転移促進、神経細胞の発達などに関与すると考えられている。また、Syntenin-1 は IL-5 受容体 α サブユニットの細胞内ドメインと直接相互作用し、IL-5 シグナル伝達に関連すると報告されている。しかし、生体内で Syntenin-1 の機能について解析した報告はない。

本研究では、標的遺伝子組換え法により *Syntenin-1* ノックアウト (KO) マウスを作製した。生体内での Syntenin-1 と IL-5 シグナル伝達との関連を解明するため、IL-5 の主要な役割の 1 つである腸管免疫系の制御に注目して免疫学的解析を行った。

〔方法並びに成績〕

Syntenin-1 遺伝子のエクソン 2 の両端に loxP 配列を挿入した標的遺伝子組換えベクターを作製し、薬剤選択により相同組換え ES 細胞株を樹立した。Cre/loxP 部位特異的組換えシステムを用いてエクソン 2 を欠失させ、得られた ES 細胞を ICR マウスの 8 細胞期胚に注入してキメラマウスを作製した。さらに C57/BL6 マウスと交配させ、*Syntenin-1* KO マウス系統を確立した。*Syntenin-1* KO マウスはメンデルの法則に従って出生し、Specific pathogen free 環境下で明らかな異常なく成育、繁殖した。

Syntenin-1 KO マウスを陰性コントロールとして、野生型 (WT) マウスにおける臓器別の Syntenin-1 タンパク発現パターンをウエスタンブロッティング法で解析した。Syntenin-1 は各臓器に広く存在するが、特に免疫関連臓器 (脾臓、胸腺) と中枢神経系でより多く発現していた。

次に、*Syntenin-1* と IL-5 シグナル伝達との関連を調べるため、IL-5 により維持される腸管関連リンパ組織の IgA 陽性細胞、好酸球、および腹腔細胞の B-1 B 細胞の細胞数をフローサイトメトリー法で解析したが、WT マウスと *Syntenin-1* KO マウスの間に有意差は認められなかった。次に糞便中の IgA、IgG1、IgM 濃度を ELISA で測定すると、*Syntenin-1* KO マウスでは IgG1、IgM が WT マウスと比較して有意に高値で、IgA も高い傾向があることがわかった。さらに、それぞれのマウスの脾臓から磁気細胞分離法で休止期 B 細胞を分離し、LPS、TGF- β 、IL-5 存在下で 7 日間培養後、上清中の IgA 濃度を測定すると、*Syntenin-1* KO マウス由来 B 細胞では IgA 分泌が有意に亢進していた。これらの結果から、*Syntenin-1* は腸管での免疫グロブリン産生を抑制的に調節していることが示唆された。

〔総括〕

生体の腸管内腔には多種類の腸内細菌が存在し、粘膜上皮を介して宿主の免疫系と密接な相互関係が維持されている。腸管内免疫グロブリンは病原体からの防御や正常細菌叢の維持に重要な役割を果たしており、*Syntenin-1* は腸管免疫のホメオスターシス維持に寄与している可能性がある。また、*Syntenin-1* KO マウスをさらに解析することで、腸管免疫の他、癌転移や神経発達など *Syntenin-1* が関わる新たな生理機能や病態における役割が明らかとなる可能性がある。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

富山大学小児科学教室では、ヒト初乳中に含まれる児の免疫能を賦活する物質のスクリーニングを行ない、*Syntenin-1* 蛋白が *in vitro* の実験系で臍帯血 B 細胞からの IgA 産生を促進することを報告している (Sira MM et al. Int. Immunol 2009; 21, 1-11)。*Syntenin-1* は、IL-5 受容体 α サブユニットと直接相互作用し、IL-5 シグナル伝達に関連すると報告されている。その他の作用として癌細胞の転移促進、神経細胞の発達に関与することが *in vitro* 実験系で知られているが、生体内で *Syntenin-1* の機能を解析した報告はない。そこで、田村賢太郎君は、*Syntenin-1* ノックアウト (KO) マウスを作製し、生体内での *Syntenin-1* の作用を腸管免疫系の立場から解析を行なった。

(方法)

①*Syntenin-1* 遺伝子のエクソン 2 の両端に loxP 配列を挿入した標的遺伝子組み換えベクターを作製し、薬剤選択により相同組換え ES 細胞株を作製した。Cre/loxP 部位特異的組換えシステムを用いてエクソン 2 を欠失させ、得られた ES 細胞を ICR マウスの 8 細胞期胚に注入してキメラマウスを作製した。さらに C57/BL6 マウスと交配させ、*Syntenin-1* KO マウス系統を確立した。このマウスを specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育した。

②*Syntenin-1* ならびに野生型 (WT) マウスにおける臓器別の *Syntenin-1* 蛋白発現を Western Blot 法にて解析した。

③腸管関連リンパ組織の IgA 陽性細胞、好酸球および腹腔の B-1 B 細胞を Flow cytometry で検討した。

④糞便中の IgA、IgG1、IgM 濃度を ELISA で測定した。

⑤脾臓から磁気細胞分離法で休止期 B 細胞を分離し、LPS、TGF- β 、IL-5 存在下で 7 日間

培養後、上清中の IgA 濃度を ELISA 法で測定した。

(成績)

①WT では、*Syntenin-1* は腸管を含む各臓器に広く存在したが、特に免疫関連臓器（脾臓、胸腺）と中枢神経系（小脳、海馬に強く、大脳に中等度）に多く発現していた。*Syntenin-1* ノックアウトマウスでは、いずれの臓器にも、*Syntenin-1* の発現は認めなかった。

②*Syntenin-1* 欠失による腸管免疫系への影響をみたところ、小腸、大腸粘膜固有層における表面 IgA 陽性細胞、好酸球の割合は、WT 群、*Syntenin-1* KO マウス群との間に差はなく、パイエル板、腸管膜リンパ節においても表面 IgA 細胞陽性率に差がなく、腹腔内 B-1 細胞の割合にも両群で差を認めなかった。

③糞便中の IgG1、IgM 濃度は *Syntenin-1* KO マウスで有意に高値で、IgA 濃度も高値の傾向を認めた。一方、血清免疫グロブリン値には両群間で差を認めなかった。

④脾臓休止期 B 細胞を LPS、TGF- β 、IL-5 で刺激した際、*Syntenin-1* KO マウス由来 B 細胞で有意に IgA 産生が亢進した。

(総括)

田村賢太郎君は、世界で初めて *Syntenin-1* KO マウスを樹立し、以下の新知見を得た。*Syntenin-1* KO マウスで糞便中の IgG1、IgM 濃度が有意に高値で、IgA 濃度も高値である傾向であることを見出し、さらに *in vitro* 実験系で *Syntenin-1* KO マウス由来休止期 B 細胞では LPS、TGF- β 、IL-5 存在下で、IgA 分泌が有意に亢進していることを見出した。即ち、*Syntenin-1* により免疫グロブリン産生が抑制されることを示した今回の成績は、*in vitro* で *Syntenin-1* が臍帯血 B 細胞からの IgA 産生を亢進させるという、これまでの報告と逆の結果であったが、今回の成績は *in vivo* の成績であり、より忠実に生体现象を反映していると考え

えられる。今後、*in vitro* の現象と *in vivo* での乖離につき明らかにする必要がある。また今回の *Syntenin-1* KO マウスの実験系は SPF 環境下であるため conventional な環境下での *Syntenin-1* KO マウスの腸管免疫系を検討する必要がある。

以上、田村賢太郎君は、独自に *Syntenin-1* KO マウスを作製し、*Syntenin-1* が免疫グロブリン産生を抑制するということを初めて明らかにした点は新規性があり、*Syntenin-1* の持つ生理学的役割を *in vivo* で初めて明らかにした点で、医学における学術的重要性も高く、*Syntenin-1* KO マウスをさらに解析することで腸管免疫の他、癌転移や神経発達など *Syntenin-1* が関わる新たな生理機能や病態における役割が明らかになる可能性があり、今後の臨床的発展性が期待できる。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。