







## 学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第 521 号	氏 名	中野 聡子
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	宮崎 英士	
	副査氏名	小尾 岳	
	副査氏名	藤原 作平	
<p>研究題目：Commensal microbiota contributes to chronic endocarditis in TAX1BP1 deficient mice. (TAX1BP1 欠損マウスの心内膜炎に常在細菌が関与する)</p> <p>論文掲載雑誌名：PLOS ONE</p> <p>論文要旨：</p> <p>【目的】：TAX-binding protein 1 (TAX1BP1)は自然免疫系において、転写因子 NF-<math>\kappa</math>B を負に制御する。TAX1BP1-KO マウスは NF-<math>\kappa</math>B 過剰活性化により全身炎症が亢進し、突然死する。本研究では、生体内での TAX1BP1 の役割を解明するため、KO マウスの局所慢性炎症（心弁膜）、全身炎症（血液）、急性炎症（エンドトキシン誘発ぶどう膜炎：EIU）について評価した。</p> <p>【方法】：まず、局所炎症が最も強く生じる僧帽弁をレーザーマイクロダイセクションで切除し、cDNA マイクロアレイで網羅的遺伝子発現解析を行った。著変遺伝子を RT-PCR と免疫染色、血清 ELISA で検証し、遺伝子変化をもたらす病態について透過電子顕微鏡で観察した。次に、常在細菌叢が心病変に与える影響を検討するために、抗菌薬を投与し無菌化したマウスに対して HE・免疫染色と心電図を用いて評価した。さらに、その機序を分子病態学的に検証するため、TAX1BP1 の上流にある MyD88 と TAX1BP1 の二重欠損マウス (DKO マウス) を作成し、心病変の評価を行った。次に、KO マウスの全身病変について、血清中サイトカインを多項目同時に測定した。最後に、TAX1BP1 欠損が急性炎症に与える影響を評価するため、自然免疫を介する急性炎症モデルである EIU を用いて、眼内の炎症性サイトカイン変化について検討した。</p> <p>【結果】：心弁膜のマイクロアレイ解析から 588 個の遺伝子変化が判明した。最亢進例は急性相反応物質 Saa3 (Serum Amyloid A3) の 1180 倍で、僧帽弁の RT-PCR と免疫染色、血清の ELISA でも亢進が確認された。電子顕微鏡で KO マウス心臓に強い炎症性細胞浸潤・浮腫が観察され、徐脈と PQ 間隔の延長を認めた。無菌化した KO マウス僧帽弁組織では炎症性肥厚が軽減し、免疫染色で Saa3 発現が低下、心電図異常も改善した。MyD88 と TAX1BP1 の DKO マウスにおいても同様に炎症性肥厚が軽減し、血清中 Saa3、CXCL13 は低下した。全身病変について、KO マウスでは血清中炎症性サイトカイン発現が亢進した。EIU 急性炎症眼においても、KO マウスで炎症性サイトカインが増加していた。</p> <p>【考察】：TAX1BP1 欠損による自然免疫シグナルの亢進は、生体内の慢性および急性炎症反応の増悪をもたらす、その機序に常在細菌が関与している可能性が示唆された。</p> <p>本研究は、TAX1BP1 遺伝子欠損や遺伝子多型が、常在細菌による刺激を契機として炎症性疾患の発症もしくは重症化に関与する可能性を示した報告であり、自己免疫疾患の病態解明に発展する可能性を有する意義ある研究と考えられるため、審査委員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

## 最終試験

## の結果の要旨

## 学力の確認

審査区分 課・論	第521号	氏名	中野 聡子
審査委員会委員	主査氏名	宮崎 英士	
	副査氏名	寺尾 岳	
	副査氏名	藤原 淳平	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. SPF という環境下でも腸内常在細菌はいるのか？</li> <li>2. 異なる遺伝的バックグラウンドを有する TAX1BP1 欠損マウスを作成したのか？ もしそうならその間に形質の違いはあるのか？</li> <li>3. 僧帽弁に着目しているが、乳頭筋には異常がなかったとのことであるが、PQ 間隔は延長しているし、刺激伝導系や心筋には異常はなかったのか？</li> <li>4. 電子顕微鏡観察を行う必要があったのか？ 図4で plasma cell と書いてあるが、どこにあるのか？ また角括弧型の矢印は何を意味するのか？</li> <li>5. 皮膚の所見はあまり言及されていないが、真皮も皮下組織も両方肥厚していたのか？ 掻破痕などは見られたのか？</li> <li>6. 発現が低下する分子として UCMA があり、これは軟骨と関連する蛋白質のようであるが、その意味をどのように考えるか？</li> <li>7. I-kB<math>\alpha</math> は発現が低下する分子のリストに含まれていないが、なぜか？</li> <li>8. TAX1BP1 欠損マウスは自己炎症症候群のモデルにもなるのか？</li> <li>9. 統計学的解析に関して、パラメトリックな方法での解析を主に行っているのに、ノンパラメトリックな解析が一部混じっているのはなぜか？</li> <li>10. Figure 1 で、<math>p &lt; 0.05</math> でなく、<math>p &lt; 0.03</math> を有意差ありとしているのはなぜか？</li> <li>11. Figure 1 で、TAX1BP1 が2ヶ所、図に出ているのはなぜか？</li> <li>12. TAX1BP1 のノックアウトマウスには、甲状腺炎や脳炎の所見はなかったのか？</li> <li>13. Figure 7 で、TAX1BP1 のノックアウトマウスに抗生剤を投与した場合としなかった場合で Saa3 や Cxcl13 には有意差があったのか？</li> <li>14. 今回の研究の結果を臨床の眼科領域に発展させるとすると、どのような展望が考えられるか？</li> <li>15. TAX1BP1-KO マウスに生じる心内膜炎は、ヒトの感染性心内膜炎と類似点はあるのか？</li> <li>16. TAX1BP1-KO マウスは生直後に死亡するとの報告もあるが、このマウスが比較的長く生存できるのはなぜか？</li> <li>17. Caecum surface area はどのような測定方法で実施したか？</li> <li>18. Figure 5 の legends が図の説明になっていなかったり、Figure 6 のパネルIとパネルJが入れ替わったりしているが、査読者からの指摘はなかったのか？</li> <li>19. 本研究により、常在細菌が心膜炎に関与することを検証したと考えていいのか、あるいは、さらに補強しないといけない点はないのか？</li> <li>20. 病態特異性などの点で Saa3 に着目した理由があるのか？</li> </ol> <p>これらの質疑に対し、申請者は概ね適切に回答した。よって、審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者であると認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 中 野 聡 子

## 論 文 題 目

Commensal microbiota contributes to chronic endocarditis in TAX1BP1 deficient mice.

( TAX1BP1 欠損マウスの心内膜炎に常在細菌が関与する )

## 要 旨

### 【目的】

Tax1-binding protein 1 (TAX1BP1)は自然免疫系において、転写因子 NF- $\kappa$ B を負に制御する。TAX1BP1 欠損マウス (以下 KO マウス) は NF- $\kappa$ B 過剰活性化により全身炎症が亢進し、突然死する。我々は、生体内での TAX1BP1 の役割を解明するため、KO マウスの局所慢性炎症(心弁膜)、全身炎症(血液)、急性炎症(エンドトキシン誘発ぶどう膜炎)について総合的に評価した。

### 【方法】

まず、局所炎症が最も強く生じる僧帽弁をレーザーマイクロダイセクションで切除し、cDNA マイクロアレイで網羅的遺伝子発現解析を行なった。著変遺伝子を RT-PCR と免疫染色、血清 ELISA で検証し、遺伝子変化をもたらす病態について透過電子顕微鏡で観察した。

近年、心疾患や免疫疾患に、非病原性常在細菌叢が関与するとの報告がある。我々はマウスに抗菌薬を投与し、常在細菌叢が心病変に与える影響について、HE・免疫染色と心電図を用いて評価した。

さらに、その機序を分子病態学的に検証するため、TAX1BP1の上流にあるMyD88とTAX1BP1の二重欠損マウス(DKOマウス)を作成し、心病変の評価を行なった。

次に、KOマウスの全身病変について、血清中サイトカインを多項目同時に測定した。

最後に、TAX1BP1欠損が急性炎症に与える影響を評価するため、自然免疫を介する急性炎症モデルであるエンドトキシン誘発ぶどう膜炎(EIU)を用いて、眼内の炎症性サイトカイン変化を多項目同時測定、RT-PCRで検証した。

### 【結果】

心弁膜のマイクロアレイ解析から588個の遺伝子変化が判明した。最亢進例は急性相反応物質Saa3(Serum Amyloid A3)の1180倍で、僧帽弁のRT-PCRと免疫染色、血清のELISAで確認された。電子顕微鏡でKOマウス心臓に強い炎症性細胞浸潤・浮腫が観察され、徐脈とPQ間隔の延長を認めた。

無菌化したKOマウス僧帽弁組織では炎症性肥厚が軽減し、免疫染色でSaa3発現が低下、心電図異常も改善した。MyD88とTAX1BP1のDKOマウスにおいても、同様に炎症性肥厚が軽減し、血清中のSaa3、CXCL13の低下を認めた。

全身病変について、KOマウスでは血清中炎症性サイトカイン発現が亢進した。EIU急性炎症眼においても、KOマウスで炎症性サイトカインが増加していた。

### 【考察】

TAX1BP1欠損による自然免疫シグナルの亢進は、生体内の慢性および急性炎症反応の増悪をもたらし、その機序に常在細菌が関与している可能性が示唆された。

### 【結語】

TAX1BP1の共役因子であるA20の一塩基多型は、全身性エリテマトーデスや関節リウマチなどの多くの免疫疾患との関連が指摘されている。TAX1BP1遺伝子の一塩基多型やスプライシングバリエントが、常在細菌による刺激を契機として、炎症性疾患の発症もしくは重症化に関与する可能性が考えられた。