

京都大学	博士（ 医学）	氏 名	杉野 善雄
論文題目	BALB/c-Fcgr2b ^{-/-} Pdcd1 ^{-/-} mouse expressing anti-urothelial antibody is a novel model of autoimmune cystitis (抗尿路上皮抗体を発現する BALB/c-Fcgr2b ^{-/-} Pdcd1 ^{-/-} マウスは自己免疫性膀胱炎の新しいモデルである)		
（論文内容の要旨） 【背景と目的】 自己免疫はヒト膀胱の非細菌性炎症性疾患の病因となっている可能性が提唱されている。しかし、膀胱の機能的変化と自己免疫との具体的な関連は解明されておらず、動物モデルも確立されていない。一方、膀胱上皮の最上層を縁取るアンブレラ細胞といわれる細胞層は、ウロプラキン(UPK)という分子を発現して上皮表層にプラークを形成することにより、蓄尿時の上皮の尿に対するバリア機能において重要な役割を果たしており、UPK を欠損したマウスでは尿路上皮のバリア機能の低下に関連して膀胱容量の低下を認めることが報告されている。膀胱上皮に対する自己免疫病変が生じるノックアウトマウスにおける膀胱の表現型を生化学的、生理学的に評価することで、自己免疫関連膀胱炎の病態モデルを確立することを目標とした。【方法】 Fcγ IIB, PD-1 ダブルノックアウト(DKO)マウスの雌 13 匹と、ワイルドタイプ(WT)の BALB/c マウス（日本クレア）の雌 10 匹を用いた。血清中の抗尿路上皮抗体(AUAb)の発現は、各マウスの血清を別の WT マウスの膀胱切片に対する蛍光抗体法の一次抗体として用いることで評価した。排尿行動を、Voided Stain on Paper(VSOP)法（参考論文参照）を用いて 4-16 週齢にわたって計測した。その後全身臓器を採取し、各マウスの膀胱組織を抗 UPK3A 抗体による免疫染色や電子顕微鏡で形態学的に評価し、炎症性分子の発現パターンを TaqMan Arrays (Applied Biosystems) を用いたサイトカインアレイで解析した。全身組織のサイトカイン発現量については RT-PCR 法で検討した。さらに AUAb 含有血清とコントロールの WT 血清を WT の雌 BALB/c マウスに腹腔内投与し、排尿行動および膀胱の形態的評価を行った。【結果】 DKO マウスは、13 匹中 7 匹(53.8%)で AUAb を 継続して発現し、その抗体のターゲットは UPK3A であった。WT マウスでは AUAb 発現は 0 匹(0%)であった。VSOP 法による 1 回排尿量の検討では、4 週齢では各マウスともほぼ同等であったが、16 週齢の AUAb 陽性 DKO マウスでは WT と比較して有意な低下を認めた（DKO:AUAb+ vs. コントロール; 96.3±18.4 μl vs. 223.9±19.7 μl, p<0.01）。採取した AUAb 陽性 DKO マウスの膀胱においては AUAb 陰性 DKO マウスおよび WT マウスと比較して、上皮における UPK3A の染色性の低下と、上皮プラークの消失およびアンブレラ細胞の縮小を認めるとともに、膀胱上皮下に c-kit 陽性細胞や活性型 B 細胞中心の炎症細胞の集簇を認めた。またサイトカインアレイでは、AUAb 陽性 DKO マウスの膀胱において TNFα (DKO AUAb+/WT= 6.2, p<0.01) などの炎症性サイトカインの有意な上昇が見られた。TNFα の上昇は胃を除く他臓器や血清では認められず、炎症反応は臓器特異的と考えられた。さらに血清投与実験では、13 週齢の時点で AUAb 含有投与群において WT 血清を投与したコントロールと比較して 1 回排尿量の有意な低下を認め、組織学的に膀胱上皮の変性が認められた。【結語】 本研究は AUAb 発現 DKO マウスについて、自己免疫関連膀胱炎モデルとしての性質を明らかにした。			

（論文審査の結果の要旨） 【背景と目的】 自己免疫は非細菌性炎症性疾患の病因である可能性が提唱されているが、膀胱の機能的変化と自己免疫との関連は未解明である。膀胱上皮の最上層ではウロプラキン(UPK)を含むプラークが上皮の尿に対するバリア機能を持つことが知られている。膀胱上皮に対する自己免疫病変が生じるダブルノックアウト(DKO)マウスの膀胱表現型を評価し、自己免疫関連膀胱炎の病態モデル確立を目指した。 【方法】 Fcγ RIIB, PD-1 DKO マウスを用いた。血清中の抗尿路上皮抗体(AUAb)の発現を蛍光抗体法で評価。排尿行動を計測、各マウスの膀胱組織を免疫染色などで評価し、炎症性分子の発現をサイトカインアレイで解析した。AUAb 含有血清を WT 雌マウスに腹腔内投与し、排尿行動および膀胱の形態的評価を行った。 【結果】 1 回排尿量の検討では、16 週齢の AUAb 陽性マウスで有意な低下を認めた ($p < 0.01$)。採取した AUAb 陽性マウスの膀胱では上皮における UPK3A の染色性低下と、アンブレラ細胞の縮小を認めると共に、上皮下に c-kit 陽性細胞などの炎症細胞の集簇を認めた。サイトカインアレイでは、AUAb 陽性 DKO マウスの膀胱において $\text{TNF}\alpha$ ($p < 0.01$) などの炎症性サイトカインの有意な上昇が見られた。血清投与実験では、AUAb 含有血清投与群で 1 回排尿量の有意な低下を認め、組織学的に膀胱上皮の変性が認められた。 以上の研究は自己免疫関連膀胱炎の病態解明に貢献し、排尿障害の診断や治療法開発に寄与するところが多い。従って本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものとみとめる。 なお、本学位授与申請者は、平成 24 年 5 月 16 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			