

博士論文

腸管免疫における樹状細胞の
TGF- β シグナルの役割に関する検討

井原 聡三郎

腸管免疫における樹状細胞の
TGF- β シグナルの役割に関する検討

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻

指導教員 小池和彦教授

井原 聡三郎

目次

	頁
目次	2
要旨	4
序文	5
方法	
1. マウス	8
2. デキストラン硫酸ナトリウム (DSS)誘導性腸炎マウスモデル	8
3. 糞便微生物移植 (FMT) マウスモデル	9
4. 骨髄キメラマウスの作成	10
5. 糞便の DNA 抽出・解析法および培養法	10
6. 樹状細胞の分離、培養および機能解析	11
7. フローサイトメトリー法	13
8. 病理スコア	13
9. 免疫組織染色およびウェスタンブロット法	14
10. RNA 解析	15
11. 統計解析	17

結果	頁
1. 樹状細胞の TGF- β シグナルの破綻は腸炎を惹起する。	18
2. 樹状細胞の TGF- β シグナルの欠損で腸内細菌の dysbiosis が生じ、 腸炎を惹起する。	26
3. 大腸杯細胞の減少と粘液層の菲薄化が dysbiosis と関連する。	34
4. 樹状細胞の TGF- β シグナルは Notch シグナルを介して杯細胞の 分化を制御する。	40
考察	47
結論	59
引用文献	60
謝辞	72

要旨

樹状細胞は抗原提示細胞の一つで、腸管における免疫応答を担っているが、その制御機構は十分には解明されていない。本研究は腸管免疫における樹状細胞の TGF- β シグナルの役割を検証した。樹状細胞特異的 TGF- β 受容体欠損マウスは *Enterobacteriaceae* の増加を特徴とした腸内細菌叢の乱れと杯細胞減少を伴う潰瘍性大腸炎類似の腸炎を発症した。TGF- β シグナル欠損で樹状細胞の Notch リガンド Jagged1 と Jagged2 の発現が上昇し、腸管上皮の Notch シグナルの亢進に伴って上皮における Hes1 の発現増加がみられた。樹状細胞の TGF- β シグナルは Notch シグナルを介し大腸杯細胞と腸内細菌の恒常性維持に関与している可能性が示唆された。

序文

炎症性腸疾患（Inflammatory Bowel Disease: IBD）は潰瘍性大腸炎とクローン病の二つの疾患を総称した病態であり、原因不明の慢性持続的な腸管の炎症や潰瘍を特徴とする(1)。IBD は遺伝的要因および環境的要因が複雑に絡み合っ
て発症すると考えられているが、IBD の病態や発症機序については十分には解
明されていない(2)。

IBD の遺伝的要因については GWAS（Genome-Wide Association Studies）に
よる解析で 100 座以上の IBD 感受性遺伝子が同定されているが(3)、これらの中
に TGF- β シグナルに関連した遺伝子である Smad3 が含まれている(4, 5)。TGF-
 β は多彩な機能を有したサイトカインであり、TGF- β 受容体に結合して細胞内
シグナル伝達因子 Smad2/3 のリン酸化を介して、細胞の分化・増殖、炎症、発
癌などに関わる遺伝子の発現に抑制的に作用する(6)。腸管免疫においては T 細
胞の TGF- β シグナルが炎症を抑制し免疫寛容に作用するなどの報告がある(7)。
IBD 患者の大腸粘膜および大腸粘膜固有リンパ球において Smad3 のリン酸化の
減弱がみられており(8)、TGF- β シグナルの異常が IBD の病態や発症に関与して
いる可能性が考えられる。

IBD の環境要因については腸内細菌が近年注目されている (9, 10)。常在細
菌に対する不適切な宿主免疫応答や、腸内細菌叢の構成変化が IBD の病因と関

連していることが報告されている(11, 12)。IBD 患者の腸内細菌叢では2つの主要な門(phylum)である *Bacteroides* や *Firmicutes* の菌量および多様性の減少がみられる一方で、大腸菌などの *Enterobacteriaceae* を含む *Probaobacteria* の増加がみられ、腸内細菌叢の変化 (dysbiosis) が腸炎の発症および進展に関与していると考えられている (12, 13) 。また、腸内細菌のある特定の菌種が腸管免疫の調節に直接的に関与していることが報告されており、 *Segmented Filamentous Bacteria* が樹状細胞を介して T 細胞のサブセットである Th17 細胞を誘導することや、 *Clostridium* 属の特定種が抑制性 T 細胞 (Treg) を誘導することなどが報告されている (14, 15) 。

樹状細胞は自然免疫を担う抗原提示細胞の一つであり、腸管や肺などの粘膜組織、皮膚などの末梢組織の他にも、肝臓、心臓、腎臓などの多くの臓器に広く分布しており、細菌などの抗原に対する前線として機能している (16)。腸管免疫において樹状細胞は病原体に対して炎症性免疫応答を示す一方で、常在細菌に対して免疫寛容に働くなど相反する免疫応答の調整しており、腸管免疫の恒常性維持において重要な役割を担っていると考えられている(15)。樹状細胞は樹状突起を介して腸管の管腔側の腸内細菌を直接的に認識する機能や、腸内細菌を認識した腸管上皮細胞からのシグナルを受けて間接的に免疫応答するなどの多様な機能が報告されている(17, 18)。腸内細菌を認識して樹状細胞は T 細

胞に抗原提示することで T 細胞および B 細胞の獲得免疫系細胞の免疫応答を調整している(18)。

樹状細胞の機能異常が腸管免疫の恒常を破綻させ腸炎を惹起することはいくつかの研究で報告されており(19、20、21、22)、例えば、骨髄細胞の分化・増殖に促進的に作用する顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF) を欠損させたマウスは腸管固有層への樹状細胞の誘導に障害をきたし *Citrobacter rodentium* 感染性腸炎に脆弱となる(19)。その他、樹状細胞特異的に変異型 β -catenin を発現したマウスを用いた研究では、樹状細胞の Wnt- β -catenin シグナルが IL-10 や TGF- β といった抗炎症性サイトカインの産生に関与することが報告されている (20)。しかしながら、腸管免疫における樹状細胞の TGF- β シグナルに関しては十分に検討されておらず、特に樹状細胞の TGF- β シグナルと腸内細菌との関連については明らかではない。

これらの背景から、本研究では樹状細胞特異的 TGF- β 受容体欠損マウスを用いて、腸管免疫における樹状細胞の TGF- β シグナルが果たす役割について検討した。

方法

1. マウス

TGF- β II型受容体 (TGFB2) のコンベンショナルノックアウトマウスである *Tgfr2 flox/flox* マウス (C57BL/6) (23) と樹状細胞の表面マーカーである *CD11c* のプロモーター領域下に *cre* 遺伝子を発現する *CD11c-cre* マウス (B6N.Cg-Tg(Itgax-cre)1-1Reiz/J) (24) を交配させ、*CD11c-cre Tgfr2 flox/flox* (*CD11c-cre Tgfr2^{flox}*) マウス、*CD11c-cre Tgfr2 flox/+* (*CD11c-cre Tgfr2^{flox/+}*) マウス、コントロールとして *Tgfr2^{flox}* マウス、*Tgfr2^{flox/+}* マウスあるいは野生型 C57BL/6 マウス (WT) を実験に用いた。全てのマウスは東京大学の動物実験施設で管理された。全ての実験計画は東京大学の動物実験委員会の承認を得ており、東京大学動物実験実施規則に沿って実施された。

2. デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性腸炎マウスモデル

性別および週令を揃えた 8 から 14 週令の *CD11c-cre Tgfr2^{flox/+}* マウスとコントロールマウスに 2.0% DSS 水溶液 (分子量 36 – 40 kDa; ICN Biomedicals, Irvine, CA) を飲水として 5 日間自由摂取させ、その後は水道水に切り替えた。各マウスの体重を連日計測した。病理組織学および遺伝子発現解析の目的で、実験開始 4, 7, あるいは 10 日目にマウスを解剖した。

DSS と抗生剤の併用実験では 2.0% DSS に硫酸ネオマイシン (1.0g/L;

Calbiochem) とメトロニダゾール (1.0g/L; Sigma) を混合した水溶液を飲水として用いた。DSS と Notch 阻害剤の併用実験では、2.0% DSS 投与期間に γ -セクレターゼ阻害剤 DBZ を 5 mg/kg/回、あるいは 10 % DMSO を連日で腹腔内投与した。

3. 糞便微生物移植 (FMT) マウスモデル

CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl} マウスとコントロールマウスの糞便を回収し、15%グリセリン溶液に懸濁し、-80°Cで保存した。糞便微生物移植の実験に使用する際には、保存した溶液の菌数を血液培地あるいはマッコンキー培地を用いて測定し、 5×10^8 CFU/200 μ l に細菌数を調整した溶解液 (糞便微生物溶解液) を作成した。また別の実験では、*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの糞便微生物溶解液を方法 6 の培養条件で、1. 血液寒天培地で培養した細菌群 (Total bacteria)、2. マッコンキー培地で培養した細菌群 (*Enterobacteriaceae*)、3. 2 の細菌群から単離した *E. coli* をマッコンキー培地で培養した細菌群 (*E. coli*) の 3 群を設定し、各細菌群の溶解液を 5×10^8 CFU ずつ注入接種した。前もって抗生剤 (硫酸ネオマイシンとメトロニダゾールを各 1.0g/L) の溶解液を 3 週間自由摂取した WT マウスに、糞便微生物溶解液、あるいは各細菌群の溶解液を、ゾンデで経口経胃的に注入接種した。注入接種後 3 日目から 2.0% DSS を 5 日間自由摂取させ腸炎を誘発した。

4. 骨髄キメラマウスの作成

*CD11c-cre Tgfb β 2^{fl/fl}*マウスとコントロールマウスの大腿骨および脛骨から骨髄細胞の懸濁液を採取した。X線 9 Gyを照射した雄のWTマウスに、 1×10^7 個に細胞数をそろえた*CD11c-cre Tgfb β 2^{fl/fl}*マウスあるいはコントロールマウスの骨髄懸濁液を尾静脈注射により移植した(25)。移植後2週間は硫酸ネオマイシンと硫酸ポリミキシンBを含んだ抗生剤水溶液を飲水として自由摂取させた。移植前および移植後1, 2, 3週目に各マウスの糞便を採取した。移植後2週目あるいは3週目にマウスを解剖し、大腸組織を病理学的解析の目的で保存した。

5. 糞便の DNA 抽出・解析法と培養法

糞便からの DNA 抽出には QIAamp DNA Stool Minikits (Qiagen, Valencia, CA) を用い、抽出した DNA 溶解液を -20°C で保存し、16S rRNA 遺伝子解析に用いた。16S rRNA 遺伝子プライマーは表 1 に記したプライマーを用いた。糞便微生物溶解液に含まれる細菌の培養には血液寒天培地（非選択培地）とマッコンキー培地（選択培地）を用いた。血液寒天培地で嫌気下・ 37°C ・3 日間培養した菌を培養可能な全細菌として用いた。マッコンキー培地で好気下・ 37°C ・1 日間培養した菌を *Enterobacteriaceae* として用いた。

表1. 16S rRNA遺伝子プライマー

Group	Primer	Sequence(5'-3')
Total bacteria	Forward	GGTGAATACGTTCCCGG
	Reverse	TACGGCTACCTTGTTACGACTT
<i>Enterobacteriaceae</i>	Forward	TGCCGTAACCTTCGGGAGAAGGCA
	Reverse	TCAAGGACCAGTGTTCAGTGTC
<i>Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae</i> <i>-Prevotellaceae</i>	Forward	GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT
	Reverse	CGGAYGTAAGGGCCGTGC
<i>Lachnospiraceae-Ruminococcaceae</i>	Forward	CGGTACCTGACTAAGAAGC
	Reverse	AGTTYATTCTTGCGAACG
<i>Enterococcaceae</i>	Forward	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT
	Reverse	ACTCGTTGTACTIONCCATTGT
<i>Segmented filamentous bacteria</i>	Forward	AGGAGGAGTCTGCGGCAC
	Reverse	CCTTCCTCTCCCTGCT
<i>Clostridial cluster IV</i>	Forward	CCTTCCGTGCCGSAGTTA
	Reverse	GAATTAAACCACATACTCCACTGCTT
<i>Clostridium cluster XIVa</i>	Forward	AAATGACGGTACCTGACTAA
	Reverse	GCTTCTTAGTCAGGTACCGTCAT

6. 樹状細胞の分離、培養および機能解析

マウスの骨髄由来樹状細胞 (Bone Marrow-derived Dendritic Cell; BMDC) を既報 (26) にならってマウスの骨髄血から分離・培養した。簡潔に記すと、マウスから両側の大腿骨および脛骨を採取し、25Gの注射針を用いて骨髄から骨髄

血を得る。骨髓血はRPMI-1640溶液に溶解し、 $100\ \mu\text{m}$ のメッシュに通した後に、溶血反応にて赤血球を除去する。溶血後に得られた細胞を 1×10^7 個ずつメディウム（抗生物質を含有した10%FBS RPMI-1640 10 mlにGM-CSF (PeproTech)を10~20 ng/ml加えた溶液）に溶解し10ccのディッシュで 37°C 培養した。メディウムは2日おきに交換し、5から8日間培養した。採取した樹状細胞は必要に応じてCD11c MACS microbeads (Miltenyi Biotec)にて分離し、CD11c陽性樹状細胞を得た。

大腸粘膜固有層からの樹状細胞の分離は既報 (27) にならって行った。簡潔に記すと、マウスから大腸を採取し、大腸を縦に切開した。PBSで糞便を除去した後に、5 mM EDTAを含有したHBSSに大腸を入れ 37°C で培養しながら20分間120rpmで回転させた。大腸をペーパータオルに擦りつけて、残った上皮を取り除いた後に、4%FBS RPMI-1640 10 mlに腸を入れ、鋏で大腸を細かく切った。腸を入れた溶液にCollagenase D (Roche) 1 mg/ml、Dispase (Roche) 0.5 mg/ml、DNase I (Roche) $40\ \mu\text{g/ml}$ を加え 37°C で培養しながら50分間140rpmで回転させた。その後Percollを用いた密度勾配遠心（40%と80%Percollを用いて室温にて20分間2000rpmで遠心）にて粘膜固有リンパ球を回収した。粘膜固有リンパ球からCD11c MACS microbeads (Miltenyi Biotec)を用いてCD11c陽性の腸管樹状細胞を得た。

7. フローサイトメトリー法

*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}*マウスとコントロールマウスの脾臓あるいは大腸粘膜固有層からリンパ球を分離した。細胞内染色が必要な場合にはFix & Permeabilization Kit (BioLegend)を用いて処理した。1ウェルあたり約 5×10^5 個に細胞数をそろえて、表2に記された抗体と反応させた。各サンプルはGuava easyCyte Cytometers (Millipore)により測定し、Guava Suit software (Millipore)を用いて解析した。

表2. フローサイトメトリーで用いた抗体試薬リスト

Antibody	Vendor	Dilution
PE anti-mouse CD11c	BD Biosciences	1:200
FITC anti-mouse CD11b	BioLegend	1:200
FITC anti-mouse I-Ab (MHC II)	BioLegend	1:200
FITC anti-mouse CD4	BioLegend	1:200
PE anti-mouse CD8	BD Biosciences	1:200
PE anti-mouse Gr-1	BioLegend	1:200
PE anti-mouse FOXP3	eBioscience	1:200
PE anti-mouse Jagged1	BioLegend	1:200
PE anti-mouse Jagged2	BioLegend	1:200
PE Armenian Hamster IgG (isotype)	BioLegend	1:200

8. 病理スコア

10%ホルマリン固定パラフィン包埋された大腸組織を用いて既報 (28) に習って病理スコアを計測した。簡潔に記すと、大腸上皮障害のスコア：0 = normal; 1 = hyperproliferation, irregular crypts, and goblet cell loss; 2 = mild to moderate crypt

loss (10–50%); 3 = severe crypt loss (50–90%); 4 = complete crypt loss, surface epithelium intact; 5 = small- to medium-sized ulcer (<10 crypt widths); 6 = large ulcer (≥10 crypt widths)。炎症細胞浸潤のスコア : mucosa (0 = normal, 1 = mild, 2 = modest, 3 = severe), submucosa (0 = normal, 1 = mild to modest, 2 = severe), and muscle/serosa (0 = normal, 1 = moderate to severe)。大腸上皮障害のスコアと炎症細胞浸潤のスコアの合計 (0-12点) を病理スコアとした。

9. 免疫組織染色およびウェスタンブロット法

免疫組織染色には、OCTコンパウンドに包埋された凍結組織、あるいはパラフィン包埋されたホルマリン固定組織を用いた。凍結組織を5 μ m厚に切り出し、アセトンで5分間固定した。PBSで洗浄後、2%BSA含有のPBSでブロッキングを行った。Avidin Biotin ブロッキングにはAvidin Biotin blocking kit, DAKOを用いた。パラフィン包埋ホルマリン固定組織は、脱パラフィン処理と抗原賦活処理(10 mM クエン酸溶液中に浸漬し121度で15分間オートクレーブ)を行った。各切片は1次抗体で一晩4°Cにて静置した。その後、2次抗体で常温1時間反応させた。蛍光顕微鏡の画像は画像ソフトウェア(PictureFrame)を用いて撮影した。デジタル画像はAdobe Photoshop Elements 10 (Adobe Systems)を用いて編集した。使用した抗体試薬のリストを表3に記した。

大腸組織および樹状細胞から抽出した全蛋白ライセートは、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いて分離され、ポリフッ化ビニリデン膜 (Millipore Corporation, Billerica, MA)に転写され、既報 (29) にならって免疫ブロッキングを用いて解析した。使用した抗体のリストを表2に記した。

表3. 免疫染色およびウェスタンブロットで用いた抗体試薬リスト

Antibody / Reagent	Vendor	Dilution
CD11c	BD Biosciences	1:400
FOXP3	Abcam	1:400
Jagged1	Novus Biologicals	1:400
Jaged2	Novus Biologicals	1:400
Hes1	MBL	1:100
Rhodamine labeled UEA-1	Vector Laboratories	1:2000
DAPI	Vector Laboratories	1:10000
Alexa Fluor 488	Life Technologies	1:500
Alexa Fluor 555	Life Technologies	1:500
TGFBR II	Santa Cruz Biotech	1:200
phospho-Smad2	Millipore	1:500
Smad2/3	BD Biosciences	1:500
F-Actin	Life Technologies	1:500
β -Actin	Sigma Aldrich	1:10000
HRP 標識二次抗体	GE Lifesciences	1:2000

10. RNA 解析

大腸組織および樹状細胞から RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて全 RNA を抽出した。RNA から ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI)を

用いて一本鎖 cDNA を生成し、ABI PRISM 7000 Quantitative PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて増幅させた。リアルタイム PCR で得られた結果は GAPDH で標準化した。リアルタイム PCR で用いたプライマーを表 4 に記した。

CD11c-cre Tgfb^{fl/fl} マウスとコントロールマウスの大腸粘膜固有層のリンパ球を分離し、MACS Microbeads (Miltenyi Biotec) を用いて磁器的に CD11c 陽性細胞（腸管樹状細胞）を分離した。用いたマウスの大腸粘膜固有層より分離した樹状細胞から RNA を抽出し、4 匹分プールした RNA を用いて PCR array 解析 (Mouse signal transduction pathwayfinder PCR array, Qiagen) に用いた。

表4. マウスプライマーのリスト

Group	Primer	Sequence(5'-3')
TNF- α	Forward	CTATGTCTCAGCCTCTTCTC
	Reverse	CAGCCTTGTCCTTGAAGAG
IFN- γ	Forward	TCTCGACAATGAACGCTAC
	Reverse	GCTTCCTGAGGCTGGATTCC
IL-1 β	Forward	TGAACTCAAATGTGAAATGC
	Reverse	TGTCCATTGAGGTGGAGAGC
TGF- β	Forward	TGCTCGTTTGTACAACAGC
	Reverse	ATCTTTGCTGTCACAAGGC
IL-10	Forward	AGCCGGGAAGACAATAACTG

	Reverse	TTCATGGCCTTGTAGACACC
CD11c	Forward	TGTGACGGTGTCTAATGATGG
	Reverse	AGTTGATGCTGACTGGCACG
Muc2	Forward	CTGACCAAGAGCGAACACAA
	Reverse	CATGACTGGAAGCAACTGGA
TFF3	Forward	CAGATTACGTTGGCCTGTCTCC
	Reverse	ATGCTTGCTACCCCTGGACCAC
Relm β	Forward	GCTCTTCCCTTTCCTTCTCAA
	Reverse	AACACAGTGTAGGCTTCATGCTGTA
Jagged1	Forward	AAAGGCTTCACCGGCACCTAC
	Reverse	CTCCCAGCCGTCCTACAGATACA
Jagged2	Forward	TGTGACGATGGCTGGAAGGG
	Reverse	GCTGCTGTTCTTGGCGATGG
Hes1	Forward	GCAGACATTCTGGAAATGACTGTGA
	Reverse	GAGTGCGCACCTCGGTGTTA
GAPDH	Forward	CGACTTCAACAGCAACTCCCCTCTTCC
	Reverse	TGGGTGGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT

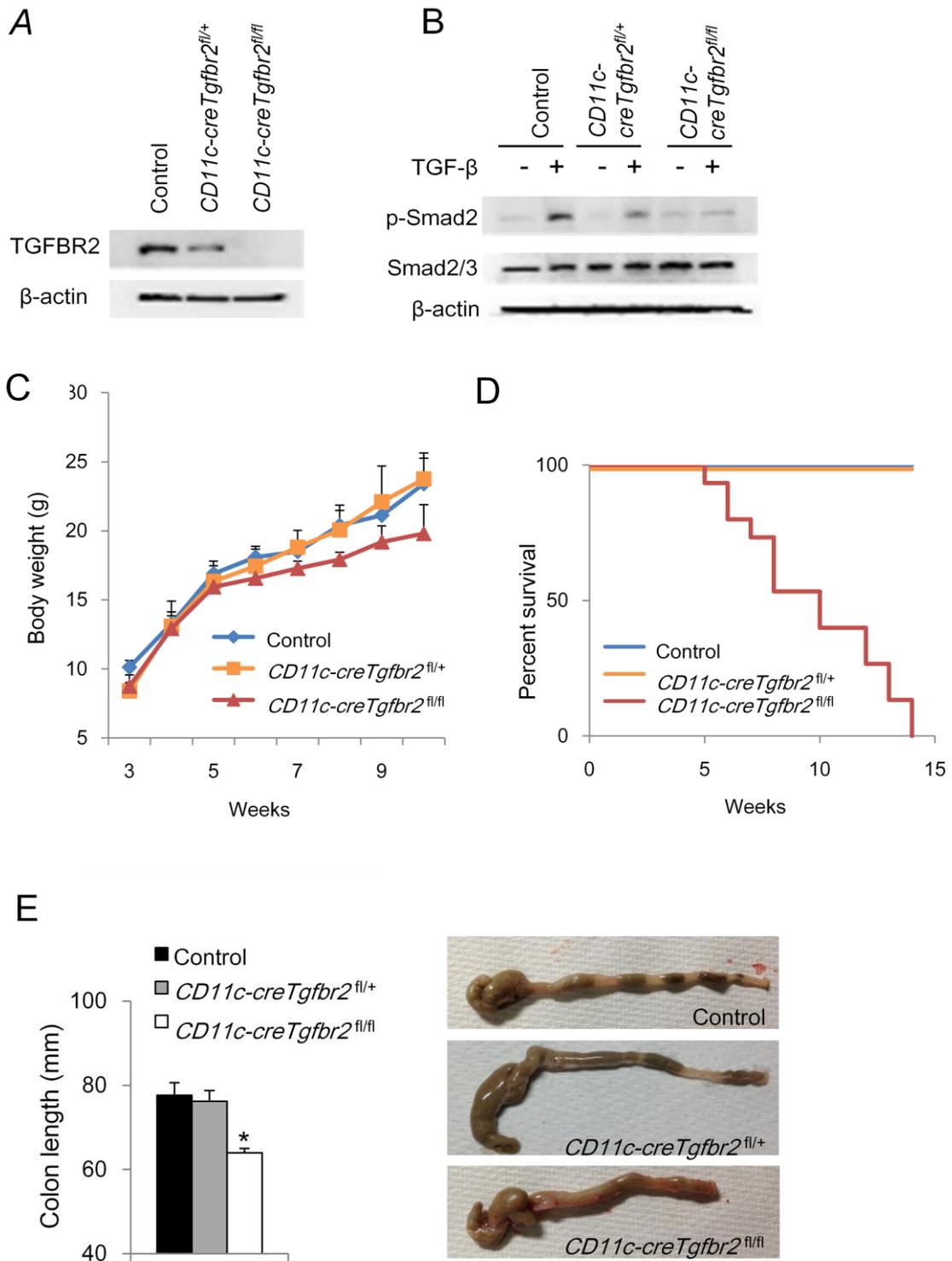
11. 統計解析

得られた値は各群の平均値 \pm 標準誤差として示した。結果は二群間の比較の検討に、Student の t 検定あるいは Mann-Whitney の U 検定を用いた。得られた P 値は 0.05 未満を統計学的に有意であるとした。

結果

1. 樹状細胞の TGF- β シグナルの破綻は腸炎を惹起する。

最初にコントロールマウス、*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}*マウス、および *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスにおける樹状細胞の TGF- β シグナルについてウェスタンブロット法を用いて解析した。マウスから分離培養した CD11c 陽性 BMDC における *Tgfbr2* の発現は、コントロールマウスに比して *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}* マウスで減弱がみられ、*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスで欠失していた (図 1A)。TGF- β 刺激後の Smad2 のリン酸化は、コントロールマウスに比して *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}* マウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスで減弱がみられた (図 1B)。コントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}* マウスは非刺激時では 15 週令以内の死亡はみられず、体重に有意な差はみられないが、それらに比して *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスは約 80% の体重 (図 1C) で、5 から 14 週令で早期に死亡した (図 1D)。コントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}* マウスに比して *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスは大腸腸管長の短縮がみられ (図 1E)、大腸病理像で粘膜固有層への炎症細胞浸潤と杯細胞減少がみられ (図 1F)、大腸病理スコアが高値であった (図 1G)。これらの結果から、樹状細胞の TGF- β シグナルは大腸炎の抑制に重要であると考えられる。



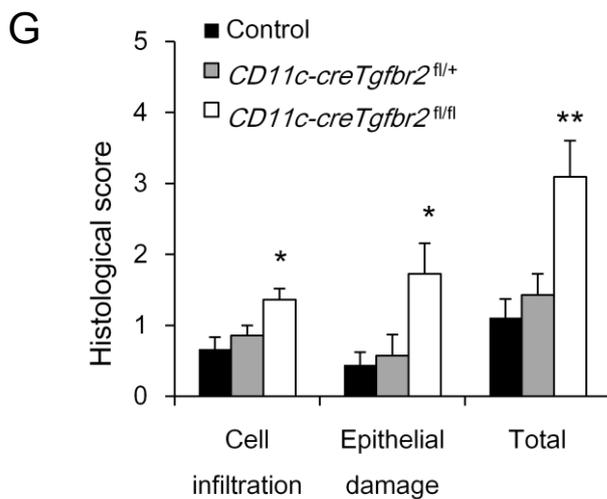
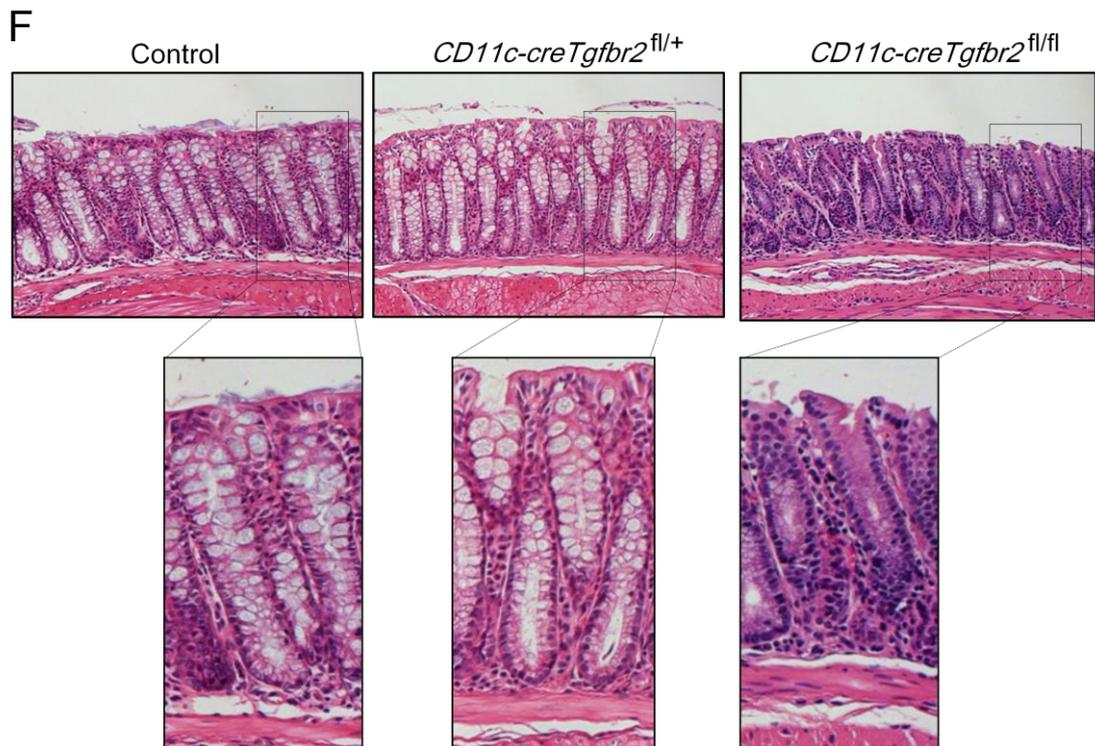


図 1. 樹状細胞特異的 TGF-βシグナル受容体欠損マウスの特徴

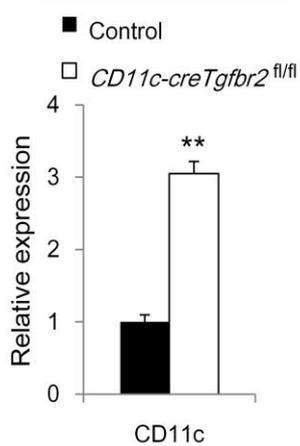
(A) コントロールマウス、*CD11c-cre Tgfr2^{fl/+}*マウス、*CD11c-cre Tgfr2^{fl/fl}*マウス由来の BMDC の蛋白ライゼートを抗 TGFBR2 抗体で免疫ブロットした。β-actin をコントロールとして用いた。(B) コントロールマウス、*CD11c-cre Tgfr2^{fl/+}*マウス、*CD11c-cre Tgfr2^{fl/fl}*マウス由来 BMDC を TGF-β1 (10ng/ml) で 30 分間刺激した。抗リン酸化 Smad2 抗体と抗 Smad2/3 抗体を用いて免疫ブロットした。(C)-(G) コントロールマウス、*CD11c-cre Tgfr2^{fl/+}*マウス、*CD11c-cre Tgfr2^{fl/fl}*マウスの体重 (各マウス n=3-6) (C)、生存曲線 (各マウス n=12) (D)、大腸腸管長と肉眼像 (E)、大腸 H.E 染色 (F)、大腸病理スコア (G)。* P<0.05、** P<0.005 (vs. コントロールマウス)。

樹状細胞の TGF- β シグナルの破綻による免疫細胞およびサイトカインへの影響を検討した。コントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの脾臓細胞を用いて血球の表面マーカーの発現を比較したが、単球・樹状細胞・マクロファージ (CD11c 陽性細胞、CD11b 陽性細胞、MHC-II 陽性細胞)、リンパ球 (CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞)、好中球 (Gr-1 陽性細胞) などの血球表面マーカーに有意な差はみられなかった (図 2A)。しかしながら、大腸組織における CD11c の発現はコントロールマウスに比して *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスで約 3 倍多く (図 2B)、免疫染色では *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの大腸粘膜固有層で CD11c 陽性細胞が多くみられた (図 2C)。大腸組織におけるサイトカインの発現を比較したが、TGF- β の発現はコントロールマウスに比して *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスで多くみられたが、その他のサイトカインに有意な差はみられなかった (図 2D)。脾臓細胞を用いて CD4 陽性 FOXP3 陽性 Treg の割合を調べたが、コントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスとの間で差はみられず (図 2E)、大腸切片を用いた FOXP3 の免疫染色では両者ともに FOXP3 の発現に差はみられなかった (図 2F)。これらの結果から、樹状細胞の TGF- β シグナルの破綻によって腸管粘膜固有層の樹状細胞は増加するが、その他の血球やサイトカインへの影響は少ない可能性が示唆された。

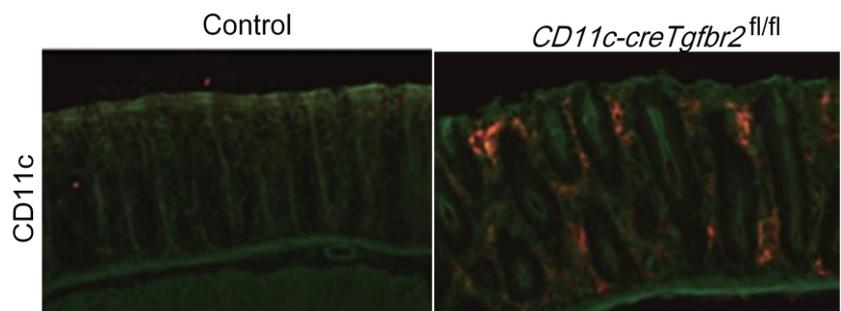
A

脾細胞 割合 (%)	Control	<i>CD11c-cre Tgfb2</i> ^{fl/fl}
CD11c	9.3 ± 2.0	6.1 ± 0.9
CD11b	20.5 ± 1.3	28.3 ± 8.9
MHC II	45.1 ± 10.1	52.1 ± 8.1
CD4	30.5 ± 8.4	25.0 ± 5.8
CD8	15.7 ± 1.2	10.8 ± 2.9
Gr-1	28.4 ± 7.6	41.9 ± 15.1

B



C



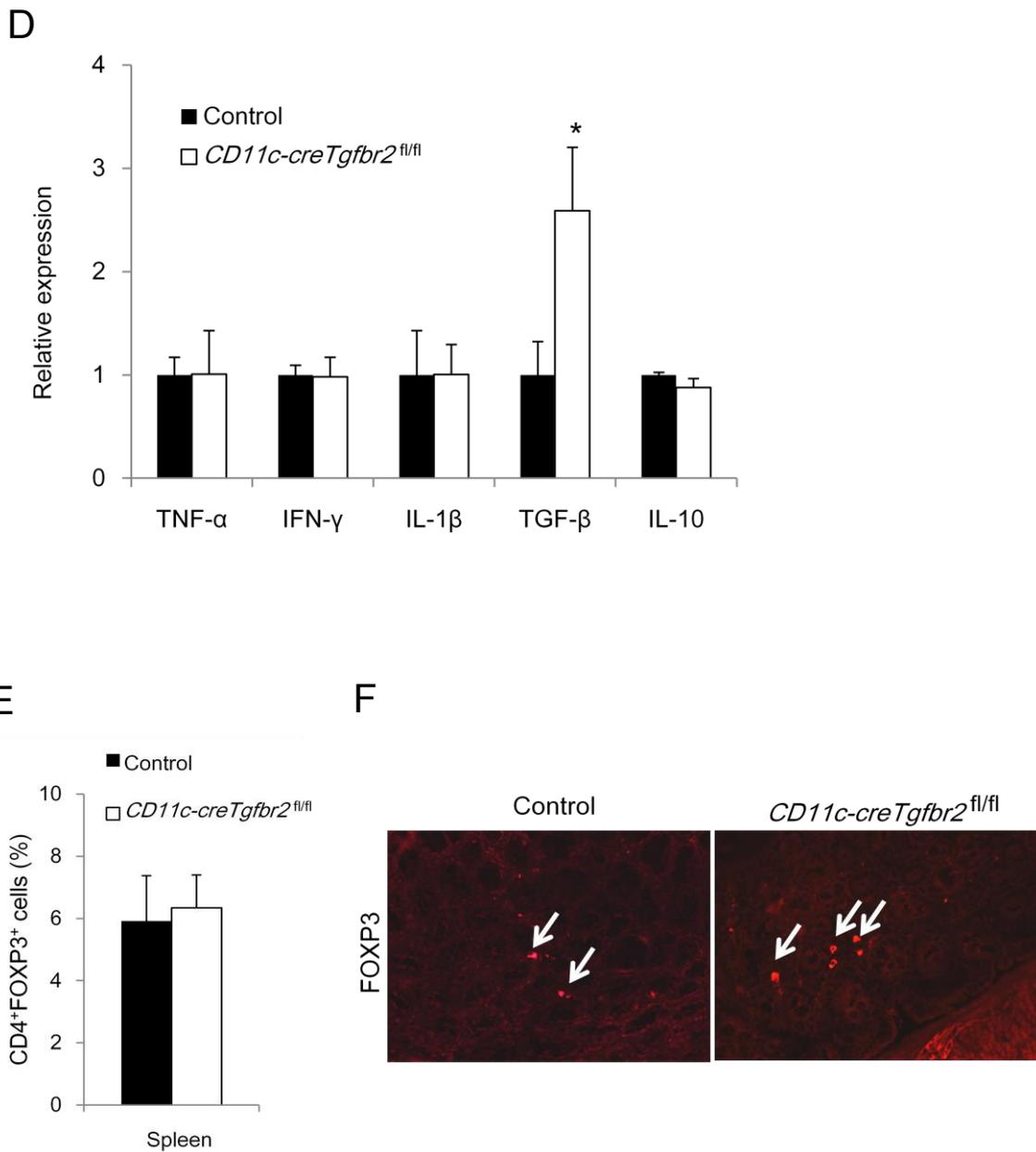


図 2. 樹状細胞の TGF- β シグナル欠損による免疫細胞およびサイトカインの変化

(A) コントロールマウスと *CD11c-cre Tgfb2^{fl/fl}* マウスの脾細胞の表面マーカーごとの割合をフローサイトメトリーを用いて測定した。実験は 3 回施行し、平均値と標準誤差を算出した。(B) 両マウスの大腸組織から RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて *CD11c* の発現を比較した。各マウス $n=5$ 。(C) 両マウスの大腸組織を用いた *CD11c* (赤)、F-Actin (緑) の免疫染色。(D) 両マウスの大腸組織の RNA を用いたサイトカイン発現の比較。各マウス $n=5$ 。(E) フローサイトメトリーによる両マウスの脾細胞を用いた CD4 陽性 FOXP3 陽性細胞の割合(各マウス $n=3$)、(F) 両マウスの大腸組織を用いた FOXP3 (赤) の免疫染色。* $P<0.05$ 、** $P<0.005$ (vs. コントロールマウス)。

大腸炎における樹状細胞の TGF- β シグナルの役割を解明するため、非刺激時では *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}* マウスには異常な表現型はみられないものの樹状細胞の TGF- β シグナルは減弱していることに着目して、コントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}* マウスに DSS で腸炎を誘導した。DSS 投与によりコントロールマウスに比して *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}* マウスでより顕著な体重減少 (図 3A)、大腸病理で重度の潰瘍を伴う炎症 (図 3B)、大腸腸管長の短縮 (図 3C)、および大腸病理スコアの悪化 (図 3D) がみられた。

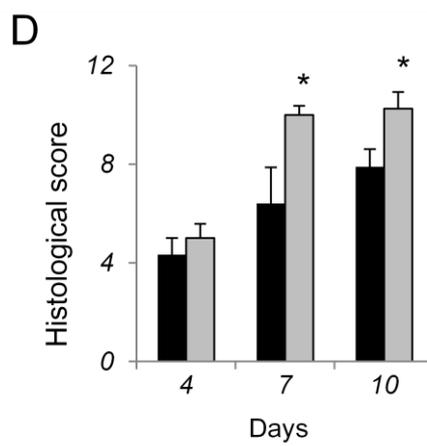
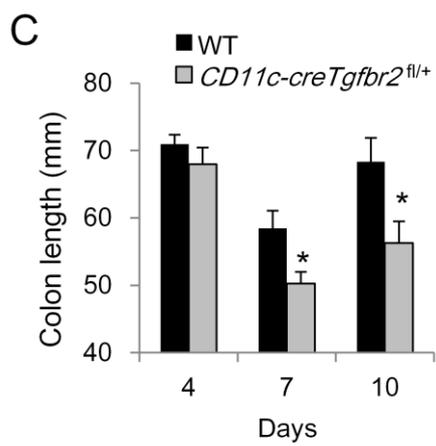
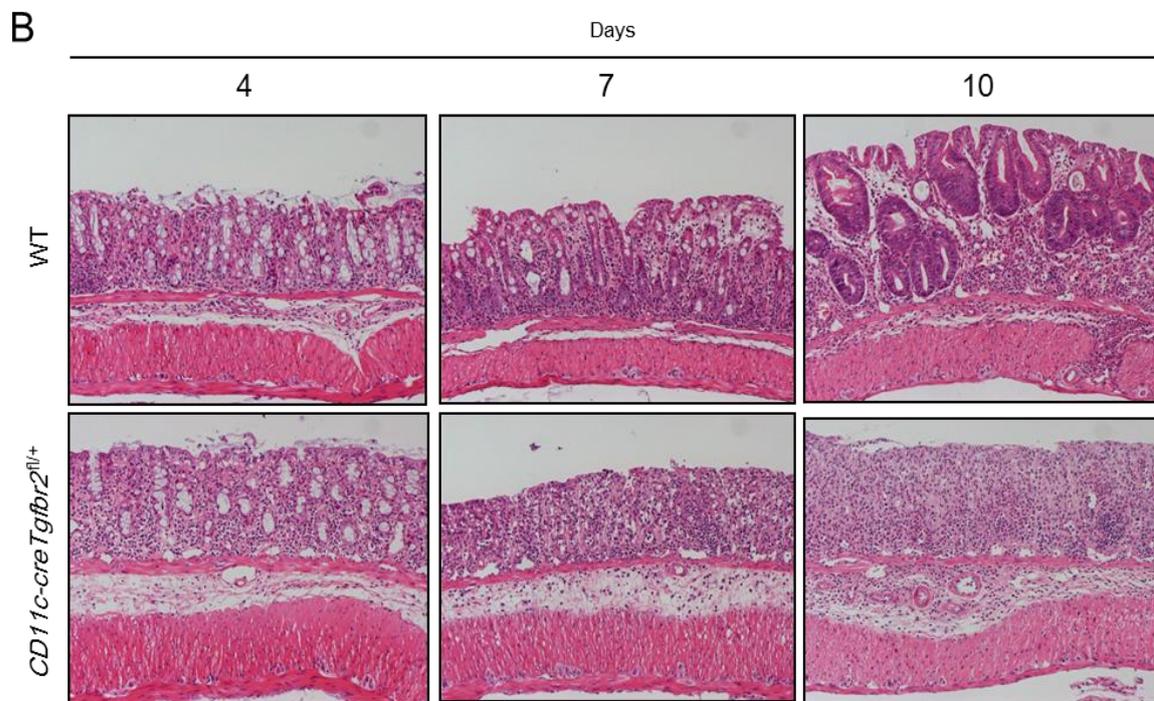
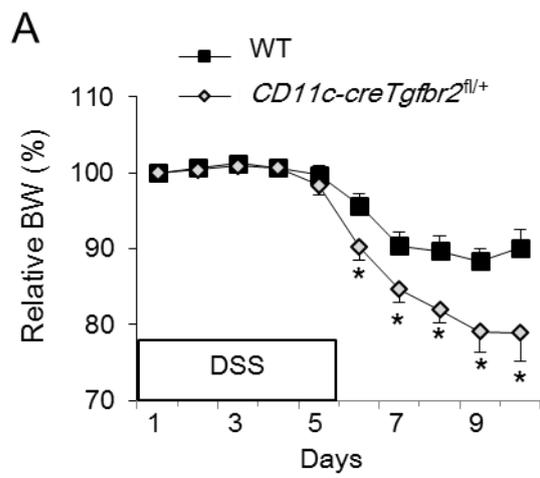


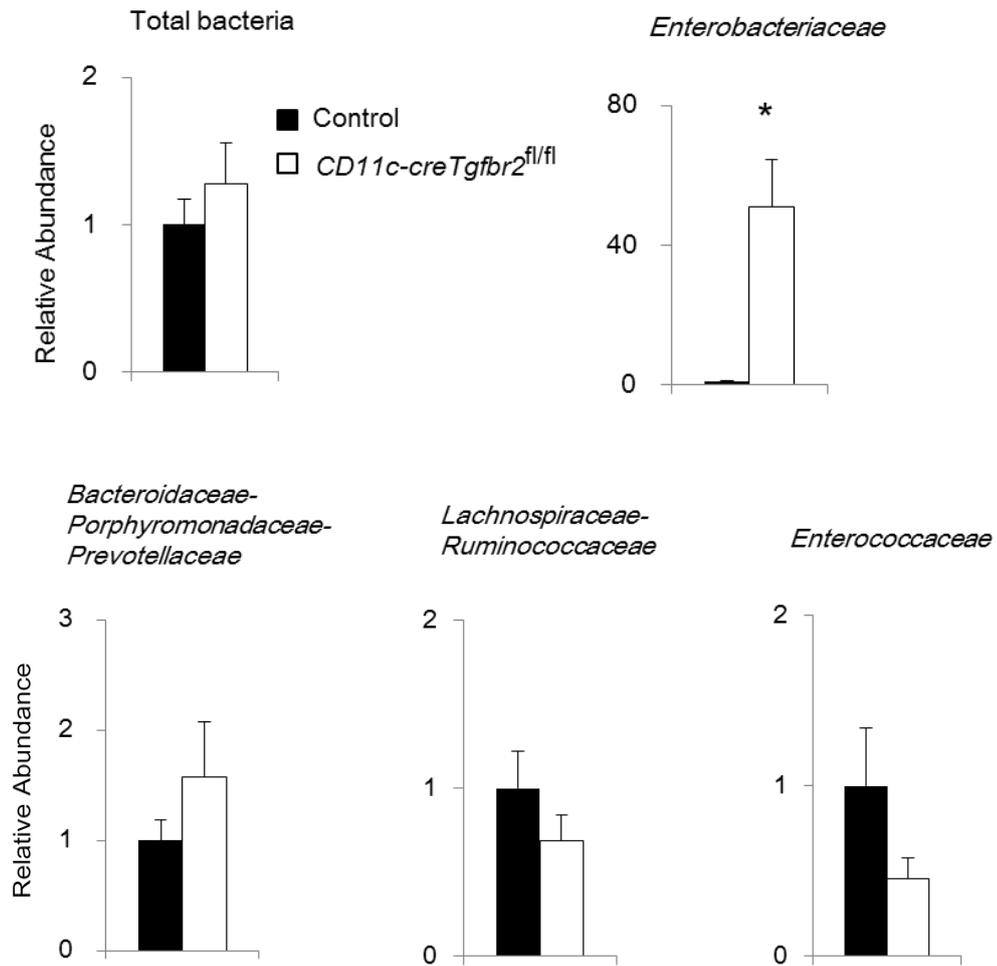
図 3. *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}*マウスを用いた DSS 誘導性腸炎の比較

(A) 2.0%DSS 投与後のコントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}*マウスの相対的体重変化率。(B) DSS 投与後 4 日目、7 日目、10 日目のコントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}*マウスの大腸組織の H.E.染色、(C) DSS 投与後 4 日目、7 日目、10 日目のコントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}*マウスの大腸腸管長、(D) DSS 投与後 4 日目、7 日目、10 日目のコントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}*マウスの大腸病理スコア。 * P<0.05。

2. 樹状細胞の TGF- β シグナルの欠損で腸内細菌の **dysbiosis** が生じ、腸炎を惹起する。

樹状細胞の TGF- β シグナルと腸内細菌叢との関連を調べるため、コントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの便中の細菌量を、培養法と細菌 16S rRNA を用いた定量的 PCR 法で比較した。定量的 PCR 法ではコントロールマウスに比して *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスで便中の *Enterobacteriaceae* 量が約 50 倍多かったが、全細菌量やその他の細菌科レベルの菌量には両マウスに有意な差はみられなかった (図 4A)。培養法でも同様に、*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスで便中の *Enterobacteriaceae* 量が多く、両マウスの全細菌に有意差はなかった (図 4B)。*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの便をマッコンキー培地で培養して得られた *Enterobacteriaceae* の単コロニーから DNA を抽出し、16S rRNA のシークエンス解析を行ったが、24/24 のコロニーが非病原性の *E. coli* であった。また、培養同定でも 4/4 コロニーとも非病原性の *E. coli* であった。

A



B

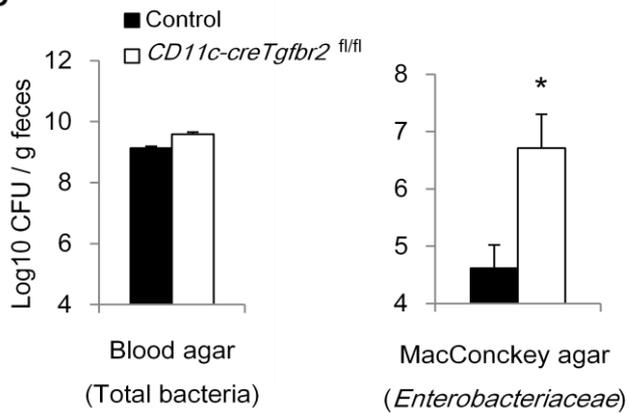


図 4. *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの腸内細菌叢の検討

(A)コントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの便から DNA を抽出し、図に示す全菌量および科レベルの 16S rRNA 遺伝子プライマーを用いて実施した定量的 PCR の相対値。(B) コントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの便を滅菌された PBS に溶解し、血液寒天培地およびマッコンキー培地を用いて培養し、細菌量を同定した。各群 n = 5。* P < 0.05。

腸内細菌叢の変化が腸炎の悪化と関連するかどうかを検討するため、*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}* マウスを用いた DSS 腸炎モデルに、抗生剤を併用する実験を行った。DSS と抗生剤を混ぜた溶液を投与しても、コントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}* マウスの両方で体重減少はみられず (図 5A)、大腸病理で炎症像は軽度で (図 5B)、腸管長の短縮はみられなかった (図 5C)。抗生剤投与によりコントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}* マウスともに腸炎が等しく抑制された。抗生剤非投与下の DSS 腸炎モデル (図 2) においてコントロールマウスに比して *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}* マウスで DSS 投与により糞便中 *Enterobacteriaceae* 量は 10 倍以上多くなった。それに対して、DSS 投与前および DSS + 抗生剤の投与で両マウスの *Enterobacteriaceae* 量に有意な差はみられなかった。便中の全菌量については DSS 投与前後、および DSS + 抗生剤のいずれにおいても両マウスで有意な差はみられなかった (図 5D)。これらの結果から、樹状細胞の TGF- β シグナルの欠損により生じた腸内細菌の変化、特に *E. coli* を含む *Enterobacteriaceae* の増加が腸炎の悪化と関連している可能性が示唆された。

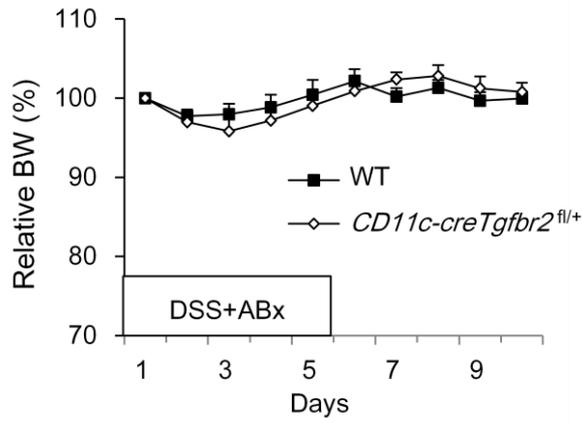
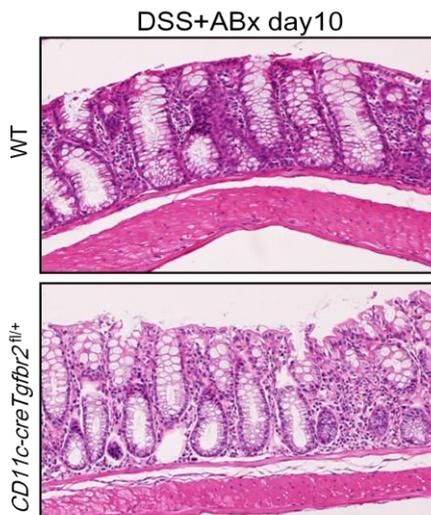
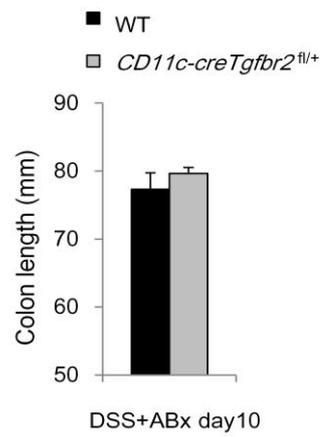
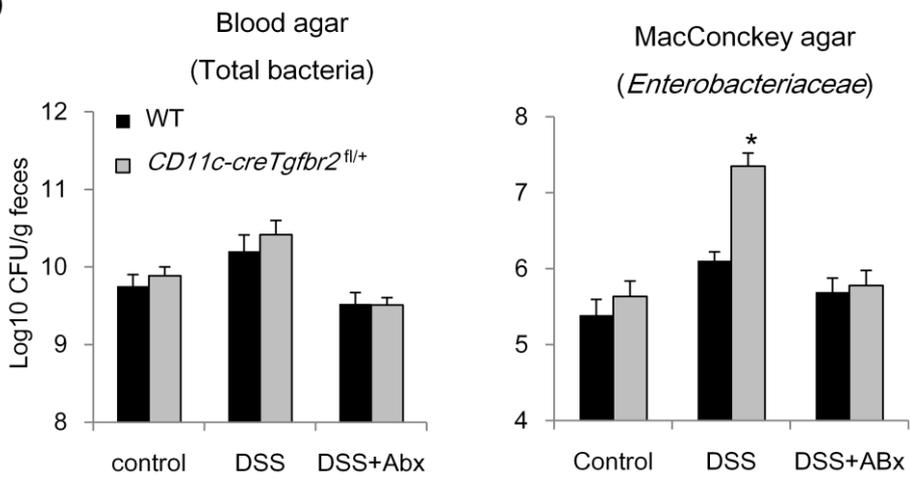
A**B****C****D**

図 5. *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの DSS 腸炎モデルの腸内細菌叢の検討

(A) 2.0%DSS+抗生剤 (1.0g/L 硫酸ネオマイシンと 1.0g/L メトロニダゾール) 投与後のコントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの相対的体重変化率。(B) DSS 投与後 10 日目のコントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの大腸組織の H.E.染色と (C) 大腸腸管長。(D) DSS 投与前、DSS 投与後 10 日目、および DSS+抗生剤投与後 10 日目のコントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの便を滅菌された PBS に溶解し、血液寒天培地およびマッコンキー培地を用いて培養し、細菌量を同定した。* P<0.05。

続いて、腸内細菌叢の変化が腸炎に与える影響を検討するため、糞便微生物移植(Fecal microbiota transplantation; FMT)を行った。既報に記された FMT の実験プロトコール(30)を参考にして、FMT 後に DSS 投与を行い腸炎を誘導する実験を実施した(図 6A)。FMT により、コントロールマウスの便を移植したマウスに比して *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの便を移植したマウスにおいて、DSS 誘導性腸炎でより顕著な体重減少 (図 6B) と大腸の炎症像(図 6C)がみられた。

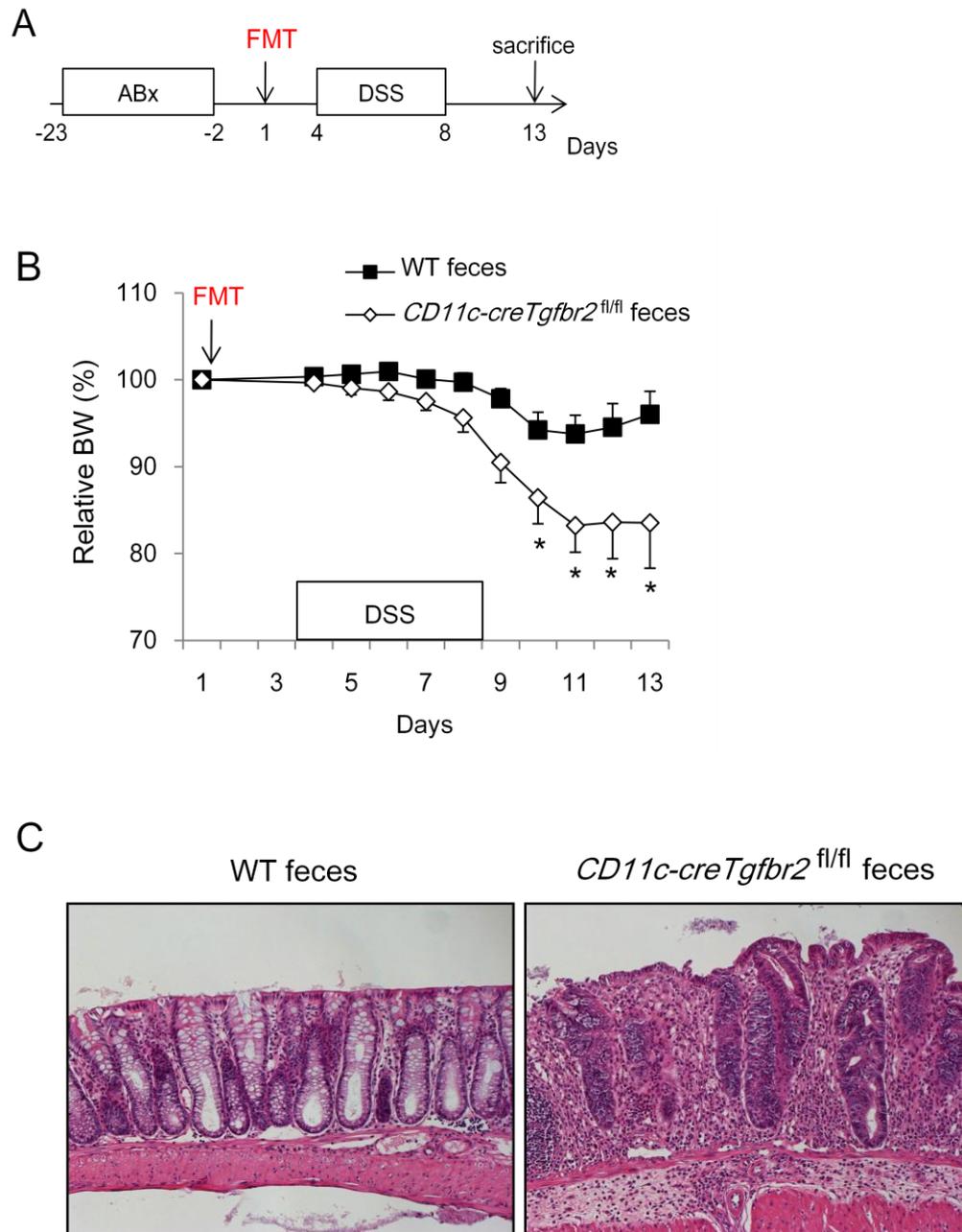


図 6. *CD11c-cre Tgfb2^{fl/fl}* マウスの便を用いた FMT の検討

(A) FMT の実験の時間的流れ。3 週間抗生剤投与した WT マウスに、抗生剤終了後 3 日目にコントロールマウスあるいは *CD11c-cre Tgfb2^{fl/fl}* マウスの便溶解液を移植した。移植後 3 日目から 2.0% DSS を 5 日間投与した。(B) 移植後の相対的体重変化率。各群 n = 9。(C) 移植後 13 日目 (DSS 投与後 10 日目) の便移植マウスの大腸組織の H.E. 染色。 * P < 0.05。

さらに、*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスのある特定の腸内細菌が腸炎発症に寄与しているかを検討するため、前述の FMT のプロトコールに従い、*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの便から培養した 5×10^8 CFU 相当の *Enterobacteriaceae*、*E. Coli*、あるいは全細菌を移植した。全細菌を移植したマウスに比して *Enterobacteriaceae* または *E. Coli* を移植したマウスで DSS 投与後に、より顕著な体重減少と（図 7A）、大腸に重度の潰瘍を伴う炎症像がみられ（図 7B）、大腸の病理スコアが有意に高値であった（図 7C）。これらの結果から、樹状細胞の TGF- β シグナル欠損による *Enterobacteriaceae*、特に *E. Coli* の増加が腸炎の悪化に関与している可能性が考えられた。

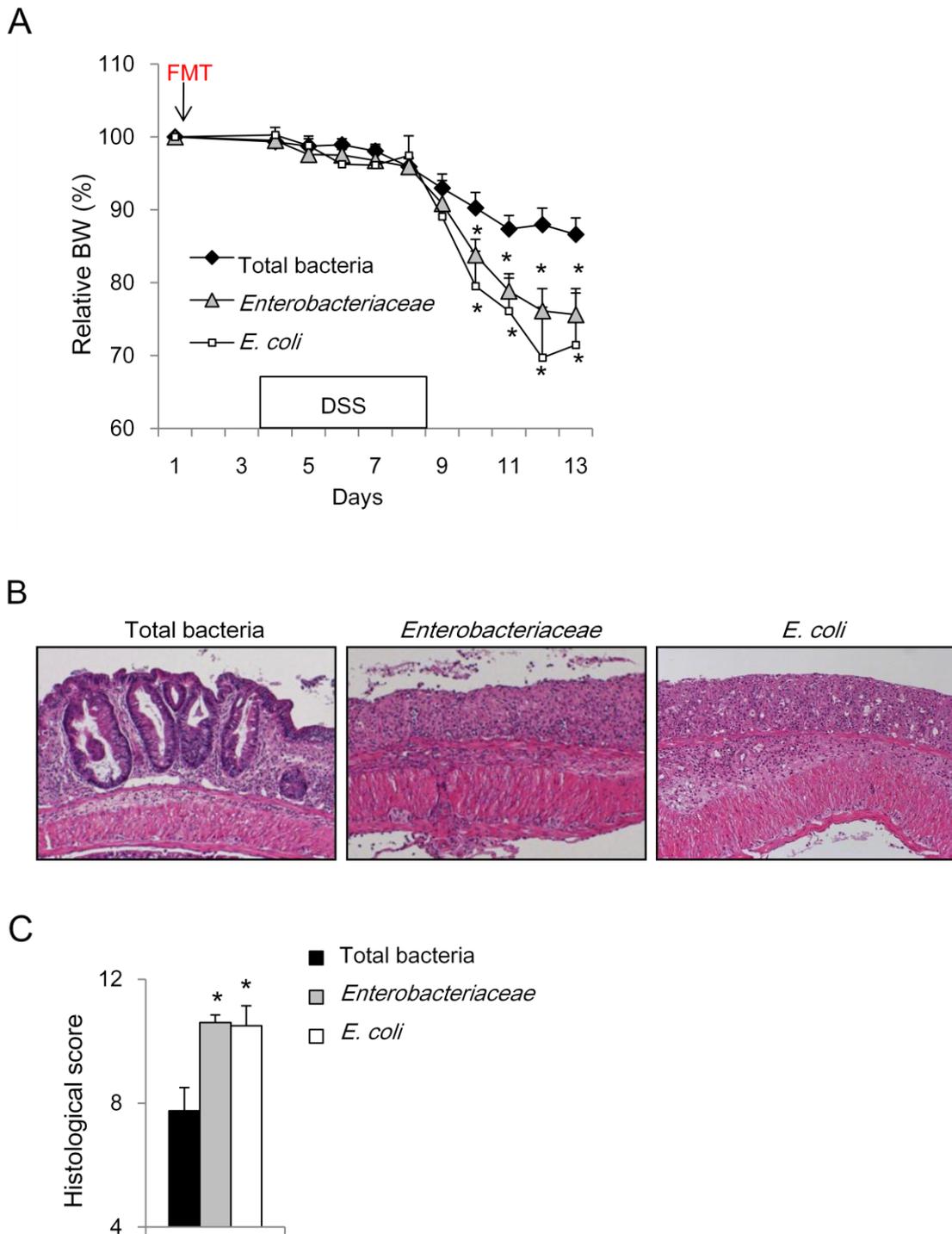


図 7. *CD11c-cre Tgfb2^{fl/fl}* マウス由来の腸内細菌を用いた FMT の検討

3 週間抗生剤投与した WT マウスに、*CD11c-cre Tgfb2^{fl/fl}* マウスの便から培養した細菌を移植した。Total bacteria (n = 9); 血液寒天培養を用いて嫌気培養して得られた細菌群で培養可能な全腸内細菌に相当、*Enterobacteriaceae* (n = 9); マッコンキー培地を用いて好気培養して得られた細菌

群、*E.coli* (n = 5); マッコンキー培地からコロニーを分離し、単培養して得られた大腸菌。(A) 腸内細菌を移植したマウスの相対的体重変化率。(B) FMT 後 13 日目 (DSS 投与後 10 日目)の腸内細菌移植マウスの大腸組織の H.E.染色、(C) 大腸の病理スコア。 * P<0.05。

3. 大腸杯細胞の減少と粘液層の菲薄化が *dysbiosis* と関連する。

ヒトの潰瘍性大腸炎において大腸杯細胞の減少(goblet cell depletion)と大腸粘液層の減少がみられ(31, 32)、*Enterobacteriaceae* が増加することが知られているが、その機序については十分には明らかではない(33, 34)。本研究では *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスにおいて大腸 H.E 染色で杯細胞の減少がみられ、腸内細菌では *Enterobacteriaceae* の増加がみられており、潰瘍性大腸炎類似の表現型と考えられる。そこで、樹状細胞の TGF- β シグナルと杯細胞および *Enterobacteriaceae* との関連について検討した。大腸切片の UEA-1 染色で杯細胞および粘液層を評価すると、コントロールマウスに比して *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスにおいて顕著に杯細胞数が減少しており (図 8A と 8B)、粘液層が菲薄化していた (図 8A と 8C)。杯細胞による粘液分泌能を評価するため、大腸表面の杯細胞特異的な遺伝子の発現を比較したところ、*muc2*、*tff3*、*relm β* といった杯細胞特異的遺伝子の発現がコントロールマウスに比して *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスにおいて有意に低下していた。これらの結果から、樹状細胞の TGF- β シグナルは杯細胞および粘液層の維持に関与していることが示唆された。

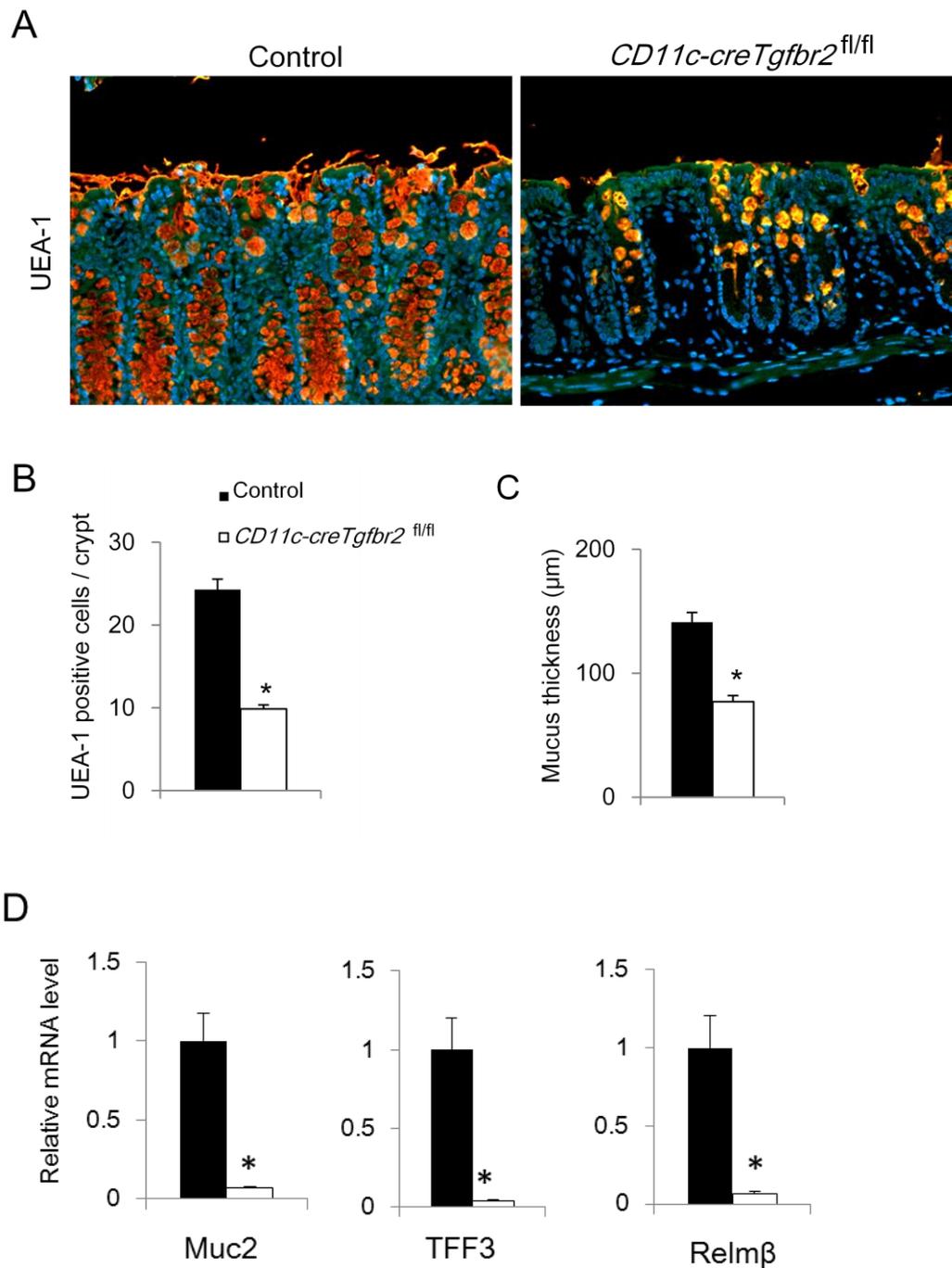


図 8. *CD11c-cre Tgfr2^{fl/fl}* マウスの杯細胞と粘液層に関する検討

(A) コントロールマウスと *CD11c-cre Tgfr2^{fl/fl}* マウスの大腸切片の UEA-1 (赤) による杯細胞と粘液層の比較。対比染色に DAPI (青) を用いた。(B) 大腸腺窩あたりの UEA-1 陽性細胞数の比較。(C) UEA-1 染色による粘液層の厚さの比較。(D) 大腸組織から抽出した RNA を用いたリアルタイム PCR による杯細胞特異的遺伝子の発現量の比較。 * P<0.05。

大腸杯細胞と粘液層が、腸内細菌および腸炎の制御にどのように関与するか検討するため、Notch シグナル阻害剤である γ -secretase inhibitor (Dibenzazepine; DBZ)を用いて検証した。Notch シグナルは腸上皮細胞の分化・維持に関与し、杯細胞の分化を抑制するため、DBZ の投与により杯細胞数が増加することが報告されている (35)。我々は DSS 腸炎モデルを用いて DBZ 投与により腸炎および *Enterobacteriaceae* 量の変化を解析した。DSS 腸炎モデルにおいて DBZ 投与により体重減少は軽減し (図 9A)、大腸病理では炎症像が軽減した (図 9B)。DSS 非刺激時において DMSO 投与に比して DBZ 投与により粘液層は肥厚した。DSS 投与後も DMSO 投与に比して DBZ 投与により粘液層は肥厚していた (図 9C と D)。便中の *Enterobacteriaceae* 量は DMSO 投与に比して DBZ 投与により増殖が抑制された (図 9E)。これらの結果から、杯細胞と粘液層の維持が、腸内細菌の増殖と腸炎を抑制しており、*CD11c-cre Tgfb β 2^{fl/fl}* マウスではこの機構が破綻していることが示唆された。

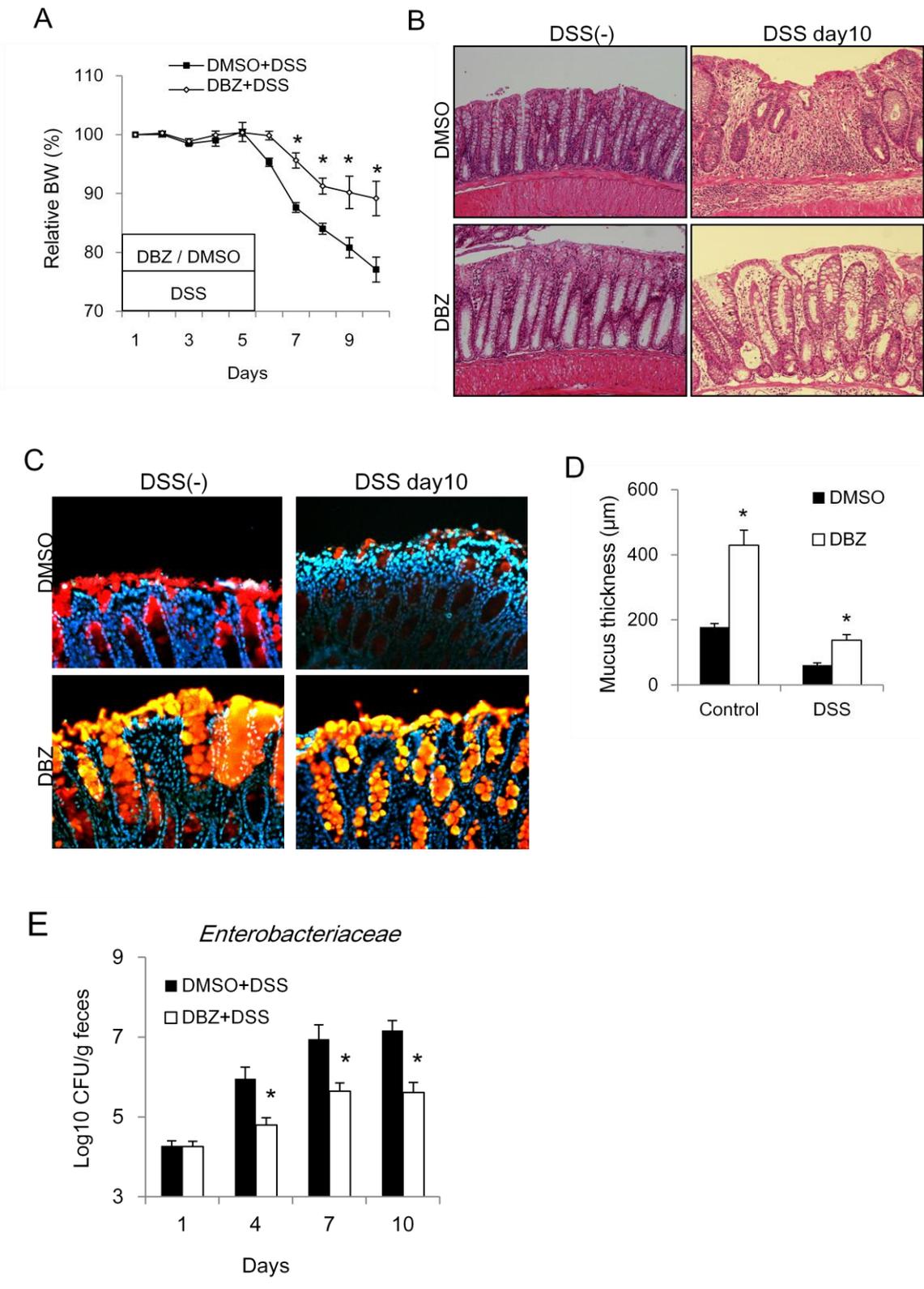
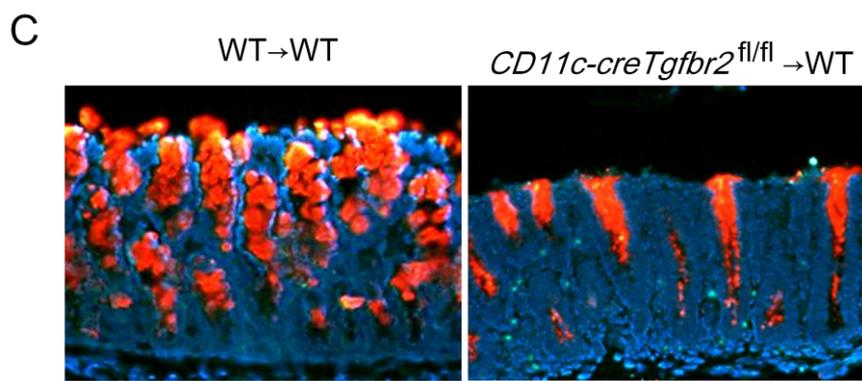
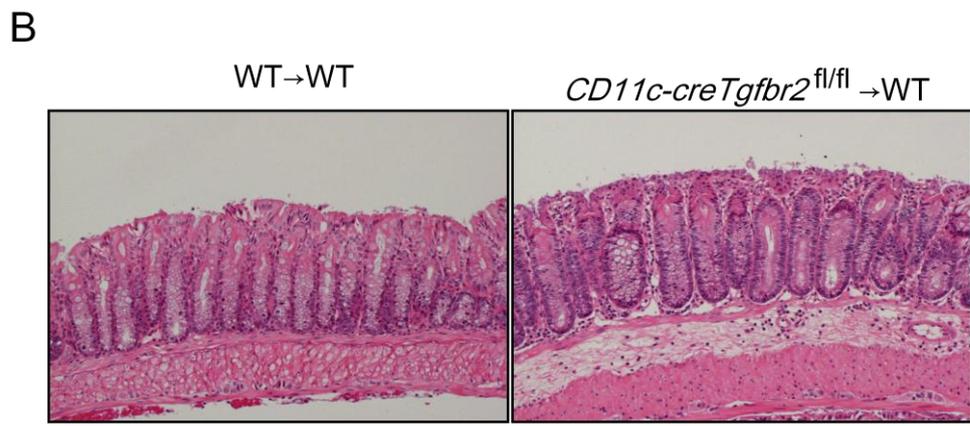
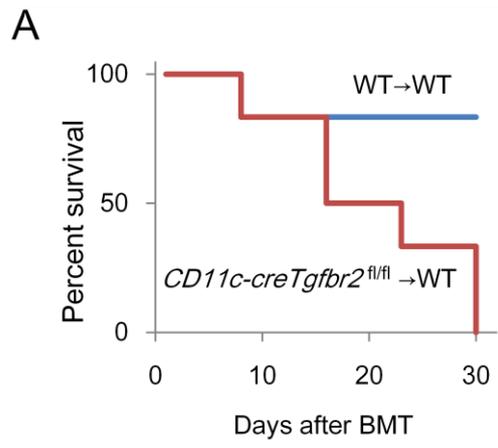


図 9. DSS 腸炎モデルにおける Notch シグナル阻害剤を用いた検討

(A) 2.0%DDS 投与開始後の DMSO 腹腔内投与マウス (n = 8) と DBZ 腹腔内投与マウス (n = 7) の相対的体重変化率。(B) DSS 投与前後の両マウスの H.E.染色による大腸病理像の比較。(C) DDS 投与前、投与後 4、7、10 日目の両マウスの便中 *Enterobacteriaceae* 量を培養法で定量した (n = 4)。(D) DSS 投与前後の両マウスの大腸切片の UEA-1 (赤) による杯細胞と粘液層の比較。対比染色に DAPI (青) を用いた。(E) DSS 投与前後の両マウスの粘液層の厚みを UEA-1 染色像から測定した。 * P<0.05。

杯細胞の減少や *Enterobacteriaceae* の増加が樹状細胞の TGF- β シグナルの破綻により誘導されるかを証明するため、正常な腸内細菌叢と正常な杯細胞を持つ WT マウスに後天的に *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスあるいはコントロールマウスの骨髄細胞を移植する実験を施行した。コントロールマウスの骨髄細胞を移植したマウスは 6 匹中 5 匹が 4 週以上生存したのに対して、*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの骨髄細胞を移植したマウスは、移植後 1 週から 4 週の間 6 匹全て死亡した (図 10A)。また、*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの骨髄細胞を移植したマウスは、大腸 H.E.染色でより顕著な炎症像を呈し (図 10B)、UEA-1 染色で杯細胞と粘液層の減少がみられた (図 10C)。さらに、便中の *Enterobacteriaceae* を比較すると、*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの骨髄細胞を移植したマウスの方が移植後に *Enterobacteriaceae* 量が増加する傾向にあった (図 10D)。これらの結果から、樹状細胞の TGF- β シグナルの破綻により杯細胞の減少や *Enterobacteriaceae* の増加が誘導されることが示された。



D

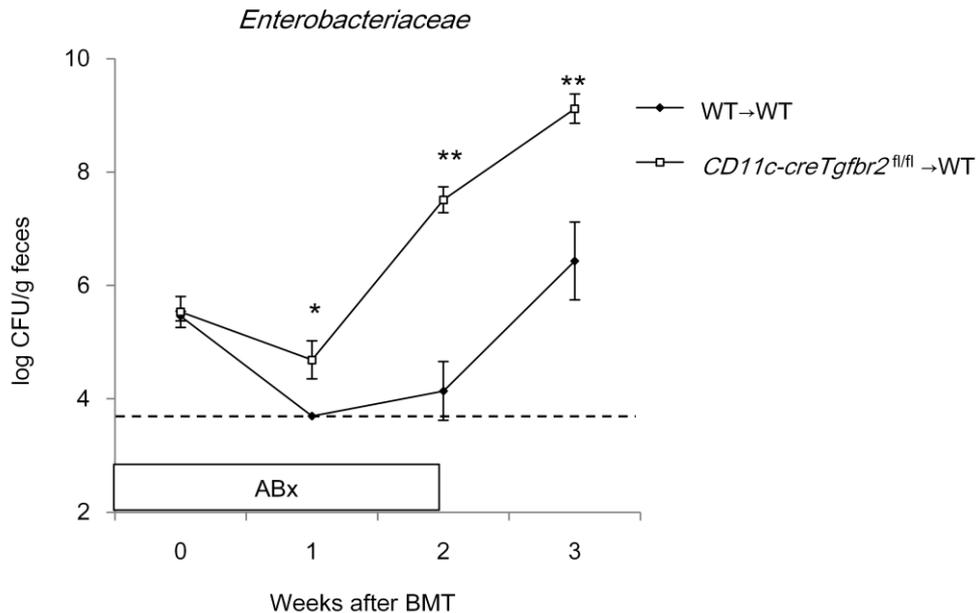


図 10. 骨髄キメラマウスを用いた検討

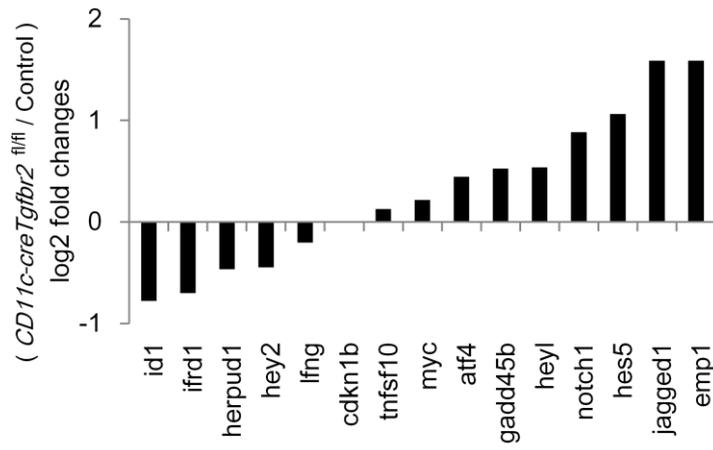
(A) コントロールマウスまたは *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの骨髄細胞を移植した WT マウスの移植後の生存曲線 (各群 n=6)。(B) 両マウスの大腸 H.E.染色。(C) 両マウスの大腸切片の UEA-1 (赤) による杯細胞と粘液層の比較。(D) 両マウスの便中 *Enterobacteriaceae* 量の経時的変化 (各群 n=5~7)。

4. 樹状細胞の TGF- β シグナルは Notch シグナルを介して杯細胞の分化を制御する。

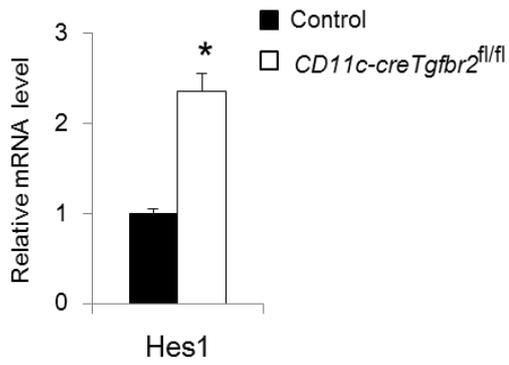
CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl} マウスの樹状細胞の遺伝子発現プロファイルを調べるため、腸管樹状細胞を分離して、TGF- β シグナルやその他の免疫関連のシグナルを検索できる PCR アレイを実施した。コントロールマウスに比して *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの腸管樹状細胞では Notch リガンドである *Jagged1* が高発現していることが分かった (図 11A)。大腸における樹状細胞と Notch シグナルとの関

連を調べるため、コントロールマウスと *CD11c-cre Tgfb β 2^{fl/fl}* マウスを用いて Notch の標的遺伝子あるいは Notch リガンドの発現を解析した。RT-PCR 解析では、コントロールマウスに比して *CD11c-cre Tgfb β 2^{fl/fl}* マウスの大腸組織において Notch の標的遺伝子である Hes1 の発現が増加していた。また、*CD11c-cre Tgfb β 2^{fl/fl}* マウスの腸管樹状細胞において Notch リガンドの Jagged1 と Jagged2 の発現が増加していた (図 11B と C)。免疫染色では Hes1 陽性細胞は *CD11c-cre Tgfb β 2^{fl/fl}* マウスの大腸陰窩の基底にみられた (図 11D)。蛍光多重染色では Jagged1 あるいは Jagged2 陽性の細胞は大腸粘膜固有層にみられ、CD11c 陽性の樹状細胞に多くみられた (図 11E)。さらに、フローサイトメトリー法を用いて、大腸粘膜固有リンパ球における Jagged1 および Jagged2 の発現を検討してみると、コントロールマウスでは殆ど発現していないが、*CD11c-cre Tgfb β 2^{fl/fl}* マウスの大腸粘膜固有リンパ球において Jagged1 および Jagged2 の陽性細胞が多みられた (図 11F)。CD11c 陽性細胞とそれ以外の分画の Jagged1 および Jagged2 の発現を比較したところ、CD11c 陽性細胞において Jagged1 および Jagged2 の発現が多くみられた (図 11G)。

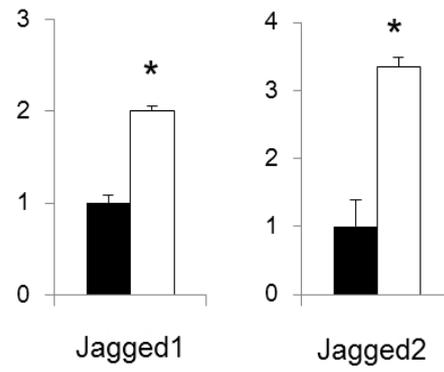
A



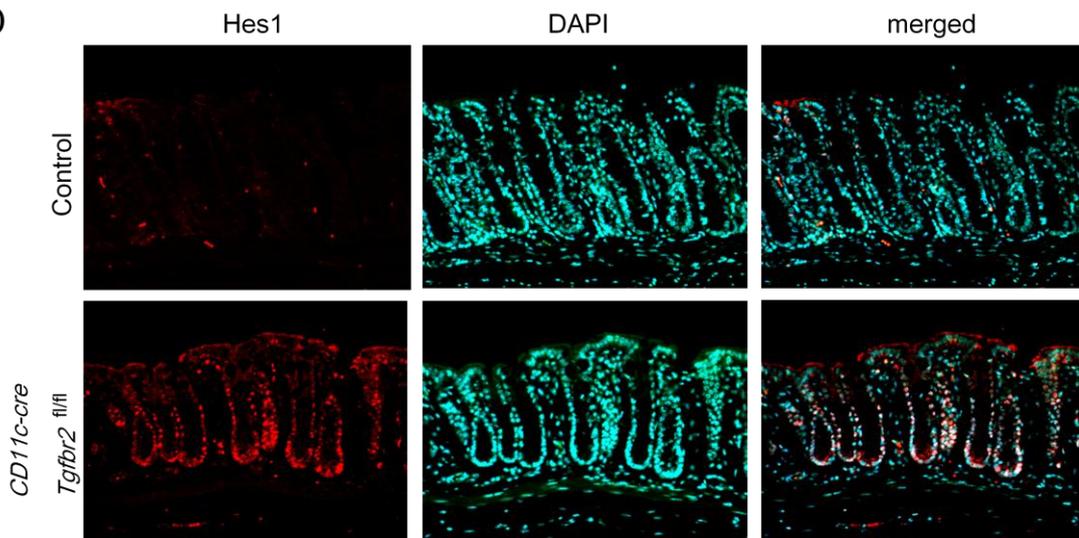
B

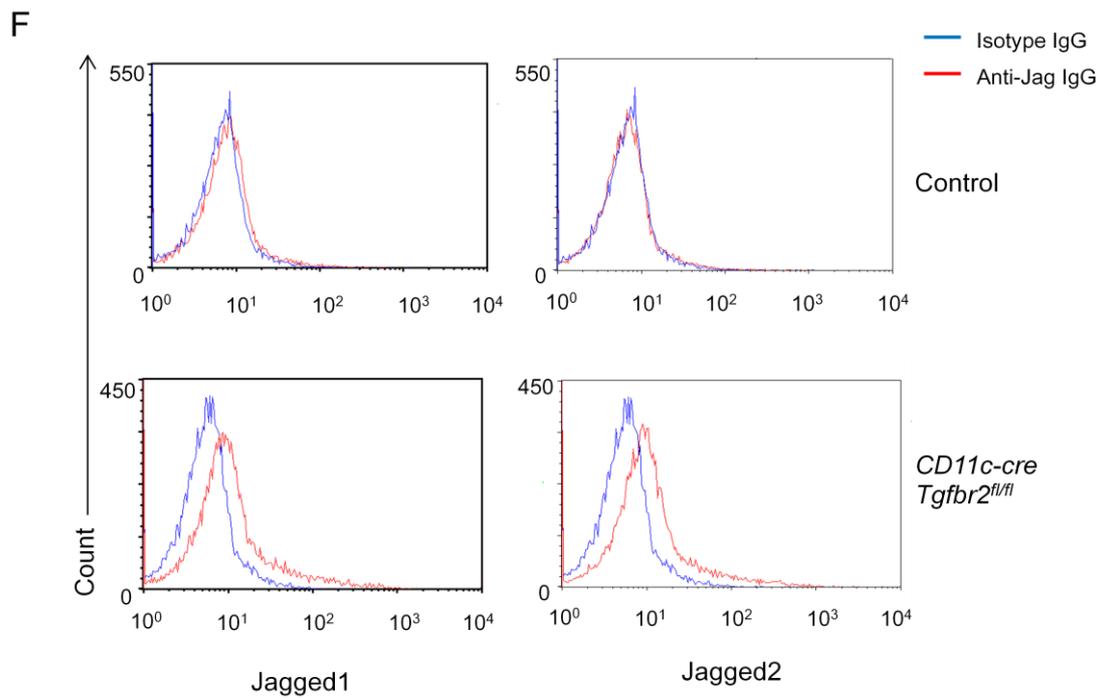
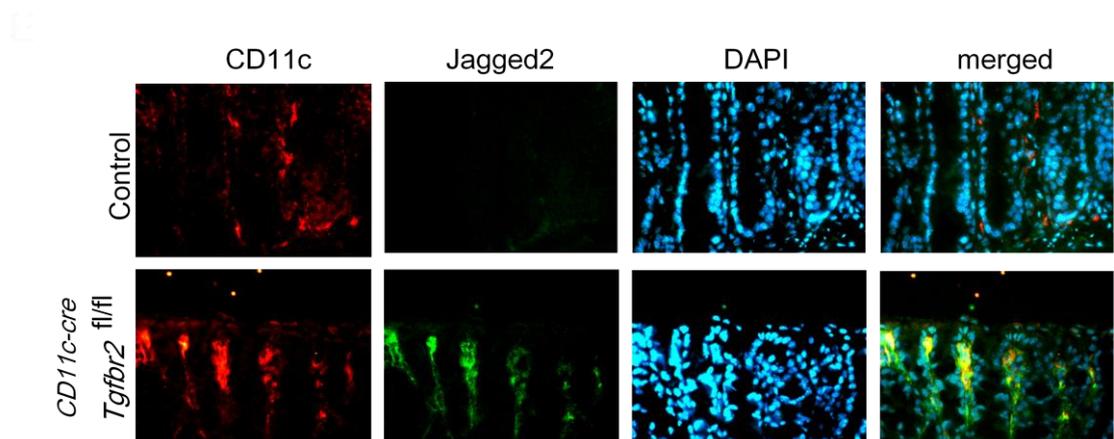
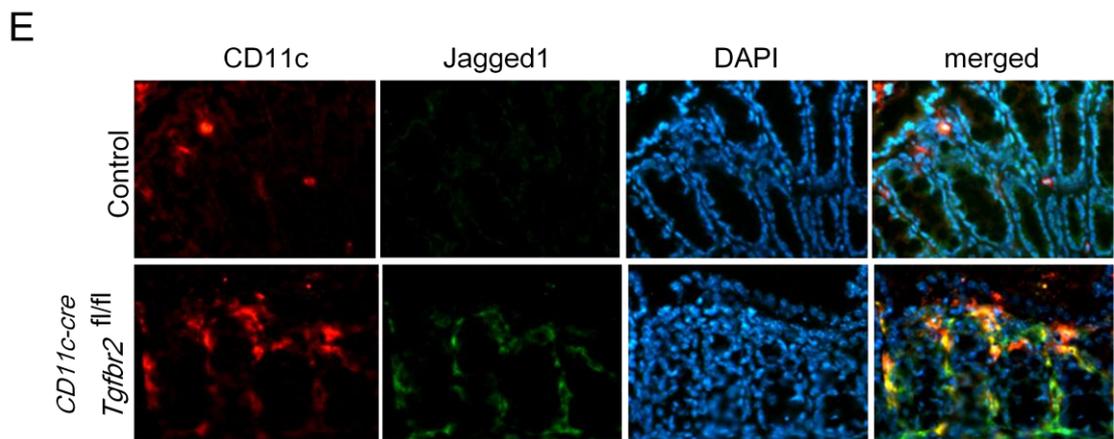


C



D





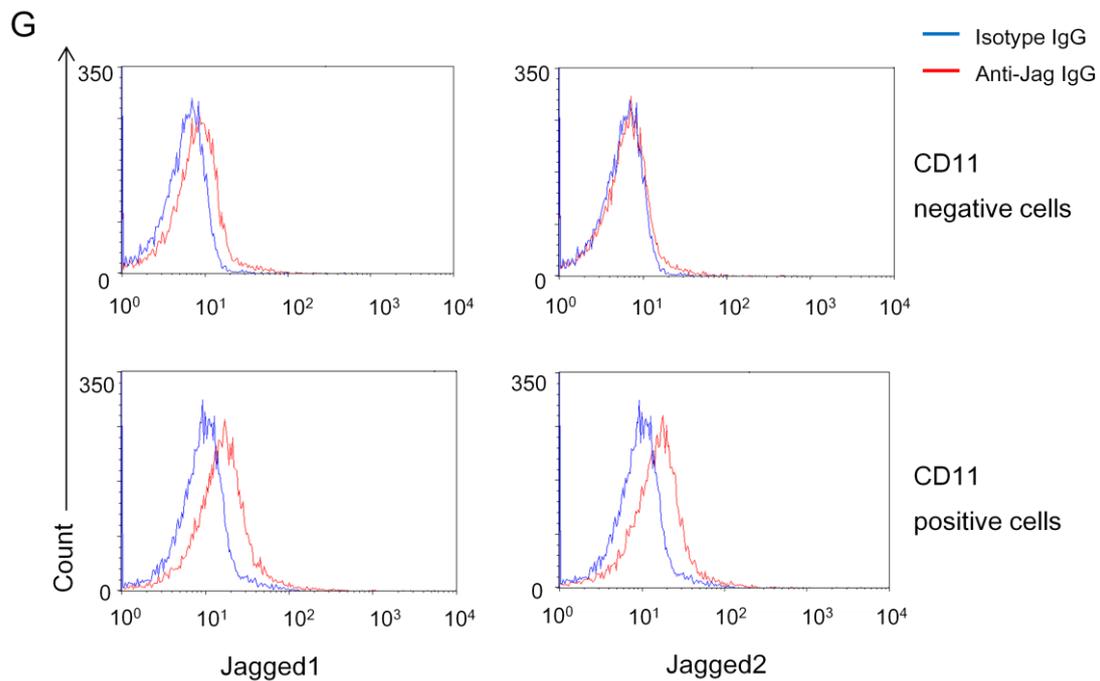


図 11. *CD11c-cre Tgfr2^{fl/fl}* マウスにおける Notch シグナルの検討

(A) コントロールマウスと *CD11c-cre Tgfr2^{fl/fl}* マウスの大腸粘膜固有層から腸管樹状細胞を分離し、RNA を抽出した。4 匹分ずつプールした RNA を用いて PCR アレイを施行した。(B) 両マウスの大腸組織から RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて *Hes1* の発現を比較した。各群 n = 5。(C) 両マウスの腸管樹状細胞の RNA を用いて *Jagged1*、*Jagged2* の発現を比較した。各群 n = 5。*P<0.05。(D) 両マウスの大腸組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた *Hes1* (茶) の免疫染色。対比染色にヘマトキシリンを用いた。(E) 両マウスの大腸組織の凍結切片を用いた蛍光多重染色。*CD11c* (赤)、*Jagged1* と *Jagged2* (緑)、および対比染色として DAPI (青) を用いた。(F) コントロールマウスと *CD11c-cre Tgfr2^{fl/fl}* マウスの大腸粘膜固有層リンパ球を PE-*Jagged1* 抗体あるいは PE-*Jagged2* 抗体と反応させ、フローサイトメトリー法を用いて *Jagged1*、*Jagged2* 陽性細胞を検出した。(G) *CD11c-cre Tgfr2^{fl/fl}* マウスの大腸粘膜固有層リンパ球から分離して得られた *CD11c* 陽性細胞、陰性細胞を PE-*Jagged1* 抗体あるいは PE-*Jagged2* 抗体と反応させ、フローサイトメトリー法を用いて *Jagged1*、*Jagged2* 陽性細胞を検出した。

樹状細胞における TGF- β シグナルと Notch リガンドの発現との関連を *in vitro* で検討した。WT マウス由来の BMDC を TGF- β 1 で刺激し Notch リガンドの発現の変化を調べたところ、TGF- β 1 刺激により BMDC の Jagged1 と Jagged2 の発現は低下した (図 12A)。次に、TGF- β シグナルの欠損による Notch リガンドの発現の変化を解析するため、*Tgfbr2^{fl/fl}* マウス由来の BMDC に *cre* 遺伝子を導入したアデノウイルスを感染させる実験を行った。*lacZ* を導入したアデノウイルスに比して *cre* を導入したアデノウイルスの感染により *cre-negative* *Tgfbr2^{fl/fl}* マウス由来の BMDC における Jagged1 と Jagged2 の発現は上昇した (図 12B)。

これらの結果から、樹状細胞における TGF- β シグナルは Jagged1 と Jagged2 の発現を抑制し、上皮細胞の Notch シグナルの活性を抑えることで、野生型マウスにおいて大腸杯細胞の分化を促進している可能性が示唆された。

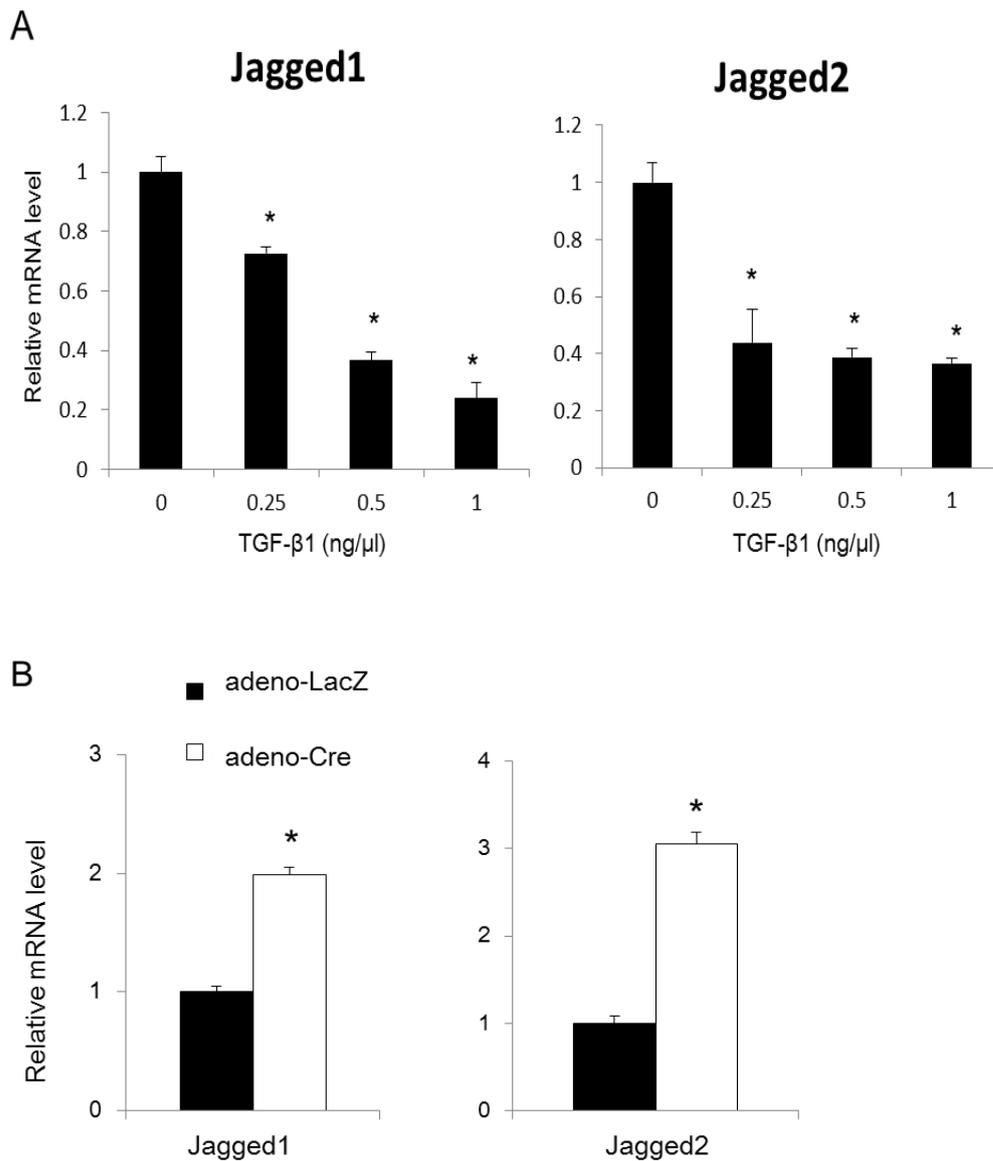


図 12. in vitro における樹状細胞の TGF-β シグナルと Notch リガンドの検討

(A) WT マウス由来の BMDC に TGF-β1 を 0.25, 0.5, 1 ng/ml 加え 24 時間培養した。培養した BMDC から RNA を抽出しリアルタイム PCR を用いて Jagged1、Jagged2 の発現を比較した。(B) *Tgfbr2^{fl/fl}* マウス由来の BMDC に *cre* を導入したアデノウイルス (adeno-cre) あるいは、コントロールとして *lacZ* を導入したアデノウイルス (adeno-lacZ) を MOI 50 で 3 時間感染させた。感染から 24 時間後に BMDC を採取し、Jagged1、Jagged2 の発現を比較した。実験はいずれも triplicate で施行した。

考察

樹状細胞は抗原提示細胞の一つであり、腸管では主に腸管粘膜固有層に存在し、腸管免疫応答の第一線として働く (36)。マクロファージも腸管に存在する抗原提示細胞で、樹状細胞と並んで腸管免疫で重要な役割を担っているが、樹状細胞は強力な抗原提示能の他に、樹状突起を伸ばして腸管の管腔側の抗原を認識する能力や、Treg を誘導し免疫寛容に働く作用など、様々な免疫機能を有している (17, 18)。樹状細胞は均一な細胞集団ではなく、いくつかのサブセットに分けられる。腸管樹状細胞においては主に二つのサブセットがあり、CD103 陽性樹状細胞と CX3CR1 陽性樹状細胞に分けられるが (17)、マウスにおいては全てのサブセットの樹状細胞に表面抗原である CD11c が発現しており、*vivo* における樹状細胞の機能解析として CD11c-cre マウスを用いた樹状細胞特異的な遺伝子改変マウスの研究が行われている (19, 20)。TGF- β シグナルは細胞の機能において多様な働きを示すが、主には細胞増殖や炎症を抑制することに関与している (38)。TGF- β シグナルは IBD を含めた炎症性疾患の病態において鍵となるサイトカインの一つである (39)。しかしながら、樹状細胞における TGF- β シグナルがどのように腸内の恒常性を調整しているかについては十分に解明されておらず、我々は *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスを用いた研究を開始した。

我々の研究中に他のグループより *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスを用いた論文

が報告された (40)。報告によると *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスは我々のモデルと同様に腸炎を自然発症し、その機序として *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスにおいて CD25 陽性 Foxp3 陽性 Treg が減少し、T 細胞および B 細胞の獲得免疫系の活性化がみられ、TNF- α や IFN- γ などの炎症性サイトカインの分泌促進が起こり、全身性の自己免疫疾患を発症するといった機序が示されている。しかし *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスに野生型マウスの Treg を移植しても部分的にしか自己免疫応答を抑制できないことから、樹状細胞の TGF- β シグナルは Treg 誘導の他に、別の機序で自己免疫応答を抑制している可能性が提唱されているが、上皮細胞の障害や細菌叢に関する検討はされていない。今回、我々は樹状細胞の TGF- β シグナルが Notch リガンドの発現を抑制し、大腸杯細胞の分化および粘液層の維持を介して、特定の腸内細菌の増殖を抑制して腸炎の抑制に寄与していることを明らかにした。既報論文では *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスにおいて T 細胞および B 細胞の活性化がみられているが、今回の我々の実験ではコントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスとの間で、IFN- γ や TNF- α などの炎症性サイトカインに有意な差は見られず、Foxp3 陽性 Treg の割合など、獲得免疫系への応答にも有意な差はみられなかった。差がみられなかった理由としては、飼育環境による違いや、獲得免疫系以外の免疫異常が我々の実験でみられた *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの表現型に強く寄与している可能性が考えられる。た

だし、末梢血球および免疫グロブリンの分画など、免疫学的なプロファイルについて今回の実験では十分に検討できていない項目もある。

CD11c はマウス樹状細胞に特異的な表面マーカーと考えられており、*CD11c-cre* マウスを用いた既報論文においては、樹状細胞特異的に遺伝子改変することを目的として使用されている (20, 21, 22)。ただし、CD11c は樹状細胞以外の血球においても少数発現していることが知られている (41)。今回の実験では、CD11c 陽性細胞の TGF- β シグナルについては検討したが、T 細胞・B 細胞・NK 細胞など CD11c 陽性細胞を少数有しうる血球の TGF- β シグナルについては十分に検討していない。また、今回の実験で *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの樹状細胞が腸管粘膜固有層に多く存在することが分かったが、CD103 や CX3CR1 など樹状細胞のサブセットについては今回の実験では検討していないため、サブセットごとの数・局在・腸炎への関与については分からない。

TGF- β シグナルの減弱と腸炎発症との関連は、ヒトの IBD やマウスモデルを用いた研究で報告されている (5, 42)。健常人の大腸において TGF- β 1 の産生がみられ、大腸粘膜および粘膜固有層の単核球において Smad3 のリン酸化が強くみられる一方で、IBD 患者の炎症状態にある大腸においては TGF- β 1 の産生がみられるにも関わらず Smad3 のリン酸化が減弱している (5, 43)。また、TGF- β 1 欠損マウスや Smad3 欠損マウスなど TGF- β シグナルを欠損したマウスモデ

ルにおいて腸炎を発症することが報告されている (42, 44)。

腸内細菌に対する不適切な免疫応答が IBD の病態や発症に深く関わっていることが報告されており、腸内細菌叢の変化と腸炎の発症との関連が注目されている(11, 12)。今回の我々の実験で *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスおよび DSS 投与後 *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}* マウスにおいて便中の *Enterobacteriaceae* の増加がみられ、さらには *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスから分離培養した *Enterobacteriaceae* を WT マウスに移植すると DSS 腸炎の悪化がみられた。このことから樹状細胞の TGF- β シグナルは腸炎惹起性の *Enterobacteriaceae* の増殖を抑制して腸炎の発症抑制に寄与している可能性が考えられる。今回の実験では、*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの便中細菌において、*Bacteroidetes*、*Firmicutes*、*Enterococcaceae* といった *Enterobacteriaceae* 以外の細菌科レベルでは有意な差がみられなかった。その他、IBD との関連が報告されている *Segmented filamentous bacteria*、*Clostridial cluster IV*、*Clostridial cluster XIVa* といった特定の細菌種にも有意な差はみられなかった。これらからも、*Enterobacteriaceae* の増加が *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスにおける腸炎の惹起に深く関わっていると考えられる。

Enterobacteriaceae の増加は活動期の IBD 患者や、IBD のモデルマウスにおいてもみられており、*Enterobacteriaceae* と腸炎との関連は多数の論文で検討されている (45, 46, 47)。*Enterobacteriaceae* はグラム陰性の腸内細菌科であり、

Salmonella enterica などの病原性を持つ菌の他に、非病原性大腸菌などの常在細菌も含まれる (46)。 *Enterobacteriaceae* に含まれる *Klebsiella pneumonia* や *Proteus mirabilis* が IBD モデルマウスにおいて腸炎発症と関連していることが報告されている (47)。 今回の我々の実験では、*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの便は腸炎惹起性であったが、マッコンキー培地を用いた *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの便培養では細菌同定された *Enterobacteriaceae* はいずれも非病原性の大腸菌であり、*Klebsiella pneumonia* や *Proteus mirabilis* は検出されなかった。細菌同定した数が 24 コロニーと限られているため、今回の実験では大腸菌以外の *Enterobacteriaceae* が検出できなかった可能性がある。今後、CHROMagar ECC (日本 BD) のように、大腸菌とその他のグラム陰性桿菌を鑑別できる培地を用いて大腸菌以外の *Enterobacteriaceae* が検出されるかどうか検討したい。

活動期の IBD 患者において大腸菌を含めた常在性の *Enterobacteriaceae* の増加が腸炎の原因なのか結果なのかについては未だ不明である。dysbiosis が IBD の発症や増悪に関与するといった報告はみられるが (47)、腸炎の結果として dysbiosis が起きているのか、あるいは dysbiosis が原因となって腸炎を発症しているのか、腸炎の病態を理解することはしばしば難しい。今回我々は *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの便あるいは腸内細菌を WT マウスに移植する実験を行うことで、*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスで生じた *Enterobacteriaceae* 特に大腸菌の増殖を特

徴とした *dysbiosis* が腸炎の悪化に関与している可能性を示した。糞便微生物移植は *dysbiosis* と腸炎との関連を検討する一つの手法として有用であり、近年ではマウスを用いた実験だけでなく(30)、ヒトにおける糞便微生物移植の臨床応用が行われており (48)、IBD 治療への応用が期待される。

これらの腸内細菌に対する生体の防御機構の一つとして大腸杯細胞がある(49)。大腸杯細胞は他の腸管上皮細胞と同じく、陰窩の基底部に存在する幹細胞から分化し 5~7 日程度生存するが、杯細胞のみが粘液分泌能を獲得しながら陰窩を上行する (50)。大腸杯細胞への分化・維持は腸内環境によって変化することが報告されており、たとえば、IFN- γ などの Th1 サイトカインが杯細胞の減少に作用するのに対して、IL-4 などの Th2 サイトカインが杯細胞の過形成を導く (51, 52)。また腸内細菌の刺激による IL-22 産生が大腸杯細胞の過形成を導くなど、腸内細菌の変化が大腸杯細胞の分化に影響する (53)。今回の我々の実験で、杯細胞特異的遺伝子の一つである *Relm β* が *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの大腸で減少していたが、*Relm β* は抗菌ペプチドの一つとしても知られている(54)。コントロールマウスに比して *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスにおいて *Relm β* を除いて defensin、CRMP、Reg3b、Reg3 γ といったその他の抗菌ペプチドには有意な差はみられなかったことから、*Relm β* の減少が *Enterobacteriaceae* の増加に関与している可能性がある。

大腸粘液層は腸内細菌と腸管上皮を分離するバリアの役割を担っているとされる (55, 56)。大腸粘液層は杯細胞から分泌される MUC2 などのムチン糖タンパクで主に構成されている (55)。大腸粘液層は外層 (outer layer) と内層 (inner layer) に分けられる(55)。外層は 700 μ m 程度の厚みがあり、接着がゆるく、腸内細菌を多く含む。一方で内層は 80 μ m 程度と薄い腸管上皮に強固に接着しており、定常状態では腸内細菌はほとんどみられない (55)。MUC2 欠損マウスは粘液層の消失によって腸内細菌と腸上皮との直接的な接触がみられ、腸炎を発症する (57)。IL-10 欠損マウスなど腸炎モデルマウスや IBD 患者において内層の障害による dysbiosis が報告されている(58, 59)。今回の DBZ と DSS を用いた実験で、大腸粘液層が *Enterobacteriaceae* の増殖を抑制し、DSS 腸炎を抑制していることが分かった。DBZ 投与により大腸杯細胞及び粘液層の厚みが維持されたことが dysbiosis と腸炎を抑制したと考えられる。DSS 腸炎モデルに DBZ 投与を併用する実験は既報 (60) があり、我々の結果と同様に、DBZ 投与により DSS 腸炎が軽減すると報告しているが、粘液層および腸内細菌叢の評価は十分に行われていない。今回の我々の検討で DBZ 投与による粘液層の維持と *Enterobacteriaceae* の増殖抑制が DSS 腸炎の軽減に寄与している可能性を示した。*CD11c-cre Tgfb β 2^{fl/fl}* マウスにおける *Enterobacteriaceae* の増加も、樹状細胞と腸内細菌の直接的な関与よりは大腸粘液層の減少によるものの可能性がある。

今回、*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* 骨髄キメラマウスを用いて *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* 骨髄細胞の移植による杯細胞、腸内細菌叢、および腸炎への影響を検討した。我々と同じ *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスを用いた既報論文 (40) では、B6 *Rag1* ノックアウトマウスにナイーブな $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞を移植した後に *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの BMDC を移植するモデルを用いている。しかし、BMDC の生存期間は短いため、我々のように移植後に週をおって経過をみることは難しい。今回の我々の検討においては、BMDC 移植よりも骨髄移植の方が実験モデルとして適していた可能性がある。

Notch シグナルは大腸杯細胞の分化において抑制的に作用することが報告されている (61)。Notch シグナルは Notch リガンドを発現する細胞と Notch 受容体を発現する細胞が直接的に接触することでシグナルを伝達する (62)。Notch リガンドには Delta like リガンド(DLL1, DLL3, DLL4)と Serrate like リガンド (Jagged1, Jagged2) が存在し、Notch 受容体は Notch1~4 の 4 つ存在する。Notch リガンドが Notch 受容体に結合すると γ -secretase により細胞内ドメイン(Notch intracellular domain; NICD)が受容体から分離する。NICD は核内に移行し Hes1 を含む細胞分化などに関連した遺伝子の発現を調整する (61)。腸管上皮では Notch シグナルは陰窩の基底部分で活動性が高く、陰窩周囲の筋繊維芽細胞と腸管上皮幹細胞間の Notch シグナルなどが報告されている(62)。今回の我々の実験で、

CD11c-cre Tgfb β 2^{fl/fl} マウスにおいて腸管樹状細胞の Jagged1 と Jagged2 の発現が上昇しており、大腸上皮細胞における Hes1 の亢進と、杯細胞への分化の抑制がみられた。これらの結果から WT マウスにおいて樹状細胞の TGF- β シグナルは Jagged1 と Jagged2 の発現を低下させ、腸上皮細胞の Notch シグナルを抑制することで、大腸杯細胞への分化を維持している可能性が示唆された。樹状細胞の Notch リガンドは T 細胞や NK 細胞など他の免疫細胞を活性化するという報告はあるが (63, 64)、腸上皮細胞の Notch 受容体に結合して樹状細胞-腸上皮細胞間で Notch シグナルを伝達するという報告はない。IBD 患者において大腸組織の Notch リガンドの発現上昇、および Notch シグナルの活性化が報告されており (59)、これらの現象が樹状細胞-腸上皮細胞間の Notch シグナルによるものか今後検討したい。

杯細胞の減少および粘液層の菲薄化は潰瘍性大腸炎に特徴的な所見である (59)。活動期の潰瘍性大腸炎において粘液層の菲薄化に伴って腸管上皮と腸内細菌が近接し、腸管上皮付近での細菌の増殖と、腸管バリアを超えて粘膜下に細菌の侵入がみられる。さらには寛解期にある潰瘍性大腸炎患者において健常者に比して粘膜層での細菌の透過性が亢進していることがあり、粘膜層の厚みだけでなく粘膜層の質も腸炎発症に寄与している可能性が考えられている (58)。

IBD 実験モデルには、マウスやラットなどの種を用いて、DSS、TNBS、T

細胞移植あるいは IBD 疾患感受性遺伝子を標的とした遺伝子改変などの操作により IBD 類似の腸炎を誘導するモデルが複数存在する。DSS 誘導性腸炎マウスモデルはマウスの実験的腸炎として広く用いられている (64)。DSS は化学的な毒性により直接的に粘液を傷害する (65)。DSS による大腸粘液層の障害で腸内細菌が直接的に腸管上皮と接触することが容易となり、腸炎を発症すると考えられている (58)。今回の我々の実験では *CD11c-cre Tgfbr2^{fl/+}* マウスという遺伝的に感受性を有した宿主に対して、DSS による上皮及び粘液層の障害で腸内環境を変化させることで、腸内細菌叢の変化をもたらし、腸炎が悪化することを示した。このように遺伝子改変マウスに DSS 誘導性腸炎マウスモデルを用いる方法は、遺伝的感受性を有する宿主、食事、粘液層などを変化させるような環境要因、腸内細菌などが複雑に関与する IBD の病態を模倣しており、有用と考えられる。しかし、いずれのモデルにおいても、実験動物とヒトとの種差による影響や、腸炎を誘導するための化学的あるいは人工的な操作がヒトの IBD の誘因とは異なっている可能性など、IBD 実験モデルで IBD の病態を検討する際には、それらの限界があることに留意する必要がある (66)。

今回の実験では、*CD11c-cre Tgfbr2^{fl/fl}* マウスでみられた、①樹状細胞の TGF- β シグナル欠損、②樹状細胞—腸上皮間の Notch シグナル亢進、③杯細胞・粘液層減少、④腸内細菌叢の変化、⑤腸炎といった項目について、相互の関連性

を含めて検証を行った。それらの結果、樹状細胞の TGF- β シグナルが腸上皮の Notch シグナル抑制・杯細胞維持・*Enterobacteriaceae* 増殖抑制を介して、腸内環境の恒常性を維持している可能性を示した (図 13

)。しかしながら、それぞれの検討項目において、限界あるいは関連性が弱い部分は残る。例えば、i) 樹状細胞の TGF- β シグナルが Notch リガンド Jagged1, 2 を制御する分子メカニズム、ii) Notch シグナル以外の経路を介した樹状細胞の TGF- β シグナルの働き、iii) 樹状細胞の Notch リガンドと腸上皮細胞の Notch 受容体が結合している証拠、iv) 杯細胞と粘液層の減少により *Enterobacteriaceae* が増加するメカニズム、v) 腸炎の結果として、杯細胞減少および *Enterobacteriaceae* 増加が生じている可能性など、今回の実験では十分には検討できておらず、今後の検討課題としたい。

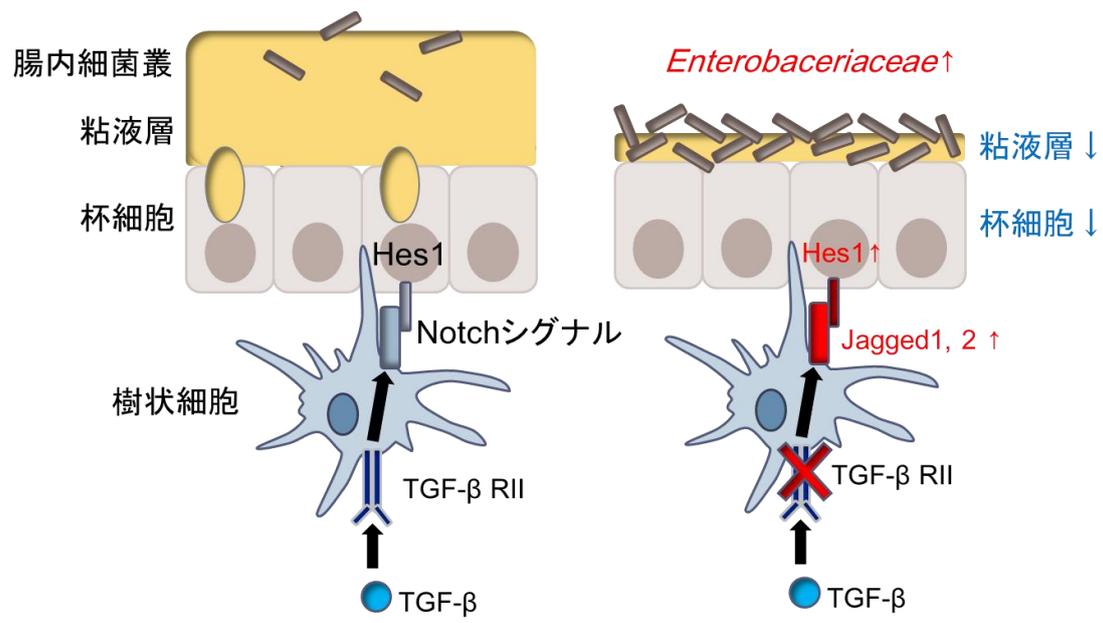


図 13. 樹状細胞の TGF-β シグナルによる腸内環境の恒常性維持

結論

樹状細胞の TGF- β シグナルは、樹状細胞-腸管上皮間の Notch シグナルを抑制することで、杯細胞の分化と粘液層を維持し、常在細菌の増殖を抑制して、腸炎発症を抑制していると考えられた。

引用文献

1. Manichanh C, Borruel N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9:599-608.2012.
2. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetic and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474:307-317. 2011.
3. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, Essers J, Mitrovic M, Ning K, Cleynen I, Theatre E, Spain SL, Raychaudhuri S, Goyette P, Wei Z, Abraham C, Achkar JP, Ahmad T, Amininejad L, Ananthakrishnan AN, Andersen V, Andrews JM, Baidoo L, Balschun T, Bampton PA, Bitton A, Boucher G, Brand S, Büning C, Cohain A, Cichon S, D'Amato M, De Jong D, Devaney KL, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Ferguson LR, Franchimont D, Fransen K, Gearry R, Georges M, Gieger C, Glas J, Haritunians T, Hart A, Hawkey C, Hedl M, Hu X, Karlsen TH, Kupcinskis L, Kugathasan S, Latiano A, Laukens D, Lawrance IC, Lees CW, Louis E, Mahy G, Mansfield J, Morgan AR, Mowat C, Newman W, Palmieri O, Ponsioen CY, Potocnik U, Prescott NJ, Regueiro M, Rotter JJ, Russell RK, Sanderson JD, Sans M, Satsangi J, Schreiber S, Simms LA, Sventoraityte J, Targan SR, Taylor KD, Tremelling M, Verspaget HW, De Vos M, Wijmenga C, Wilson DC, Winkelmann J,

- Xavier RJ, Zeissig S, Zhang B, Zhang CK, Zhao H. International IBD Genetics Consortium (IIBDGC), Silverberg MS, Annese V, Hakonarson H, Brant SR, Radford-Smith G, Mathew CG, Rioux JD, Schadt EE, Daly MJ, Franke A, Parkes M, Vermeire S, Barrett JC, Cho JH. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 491:119-124.2012.
4. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol*, 140:1704-12.2011.
 5. Monteleone G, Boirivant M, Pallone F, MacDonald TT. TGF-beta1 and Smad7 in the regulation of IBD. *Mucosal Immunol*, 1:S50-53.2008.
 6. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006;24:99-146.
 7. Zhang N, Bevan MJ. TGF- β signaling to T cells inhibits autoimmunity during lymphopenia-driven proliferation. *Nat Immunol*, 13:667-673.2012.
 8. Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*, 108:601-609.2001.
 9. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, Reyes JA, Shah SA, LeLeiko N, Snapper SB, Bousvaros A, Korzenik J, Sands BE, Xavier RJ,

- Huttenhower C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*, 13:R79.2012.
10. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol*, 134: 577-94.2008.
11. Dupaul-Chicoine J, Dagenais M, Saleh M. Crosstalk between the intestinal microbiota and the innate immune system in intestinal homeostasis and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 19:2227-37.2013.
12. Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, Fuchs D, Struck D, Niebergall J, Jahn HK, Dunay IR, Moter A, Gescher DM, Schumann RR, Göbel UB, Liesenfeld O. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, 177:8785-95.2006.
13. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterol*, 127:412-421.2004.
14. Goto Y, Panea C, Nakato G, Cebula A, Lee C, Diez MG, Laufer TM, Ignatowicz L, Ivanov III. Segmented filamentous bacteria antigens presented by intestinal

- dendritic cells drive mucosal Th17 cell differentiation. *Immunity*, 40:594-607.2014.
15. Cader MZ, Kaser A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut*, 62:1653-64.2013.
16. Roy RM, Klein BS. Dendritic cells in antifungal immunity and vaccine design. *Cell Host Microbe*, 11:436-446.2012.
17. Farache J, Koren I, Milo I, Gurevich I, Kim KW, Zigmond E, Furtado GC, Lira SA, Shakhar G. Luminal bacteria recruit CD103⁺ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. *Immunity*, 38:581-595.2013.
18. Worthington JJ, Czajkowska BI, Melton AC, Travis MA. Intestinal dendritic cells specialize to activate transforming growth factor- β and induce Foxp3⁺ regulatory T cells via integrin α v β 8. *Gastroenterol*, 141:1802-1812.2011.
19. Hirata Y, Egea L, Dann SM, Eckmann L, Kagnoff MF. GM-CSF-facilitated dendritic cell recruitment and survival govern the intestinal mucosal response to a mouse enteric bacterial pathogen. *Cell Host Microbe*, 7:151-163.2010.
20. Manicassamy S, Reizis B, Ravindran R, Nakaya H, Salazar-Gonzalez RM, Wang YC, Pulendran B. Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine. *Science*, 329:849-853.2010.

21. Han D, Walsh MC, Cejas PJ, Dang NN, Kim YF, Kim J, Charrier-Hisamuddin L, Chau L, Zhang Q, Bittinger K, Bushman FD, Turka LA, Shen H, Reizis B, Defranco AL, Wu GD, Choi Y. Dendritic cell expression of the signaling molecule TRAF6 is critical for gut microbiota-dependent immune tolerance. *Immunity*, 38(6):1211-1222.2013.
22. Hammer GE, Turer EE, Taylor KE, Fang CJ, Advincula R, Oshima S, Barrera J, Huang EJ, Hou B, Malynn BA, Reizis B, DeFranco A, Criswell LA, Nakamura MC, Ma A. Expression of A20 by dendritic cells preserves immune homeostasis and prevents colitis and spondyloarthritis. *Nat Immuno*, 12(12):1184-1193.2011.
23. Chytil A, Magnuson MA, Wright CV, Moses HL. Conditional Inactivation of the TGF- β Type II Receptor Using Cre:Lox. *Genesis*, 32:73-75.2002.
24. Caton ML, Smith-Raska MR, Reizis B. Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis CD8- dendritic cells in the spleen. *J Exp Med*, 204:1653-64.2007.
25. Hayakawa Y, Hirata Y, Nakagawa H, Sakamoto K, Hikiba Y, Otsuka M, Ijichi H, Ikenoue T, Tateishi K, Akanuma M, Ogura K, Yoshida H, Ichijo H, Omata M, Maeda S. Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Regulates Colitis and Colitis-Associated Tumorigenesis by the Innate Immune Responses. *Gastroenterology*, 38:1055-1067.2010.

26. Wang Z, Meng J, Xia Y, et al. Maturation of murine bone marrow dendritic cells induced by acidic Ginseng polysaccharides. *Int J Bio Macromol* 2013;53:93-100.
27. Inaba K, Swiggard WJ, Steinman RM. Isolation of Dendritic Cells. *Curr Protoc Immunol*, 86:3.7.1-3.7.19.2009.
28. Katakura K, Lee J, Rachmilewitz D, Li G, Eckmann L, Raz E. Toll-like receptor 9-induced type 1 IFN protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest*, 115:695-702.2005.
29. Takamatsu H, Takegahara N, Nakagawa Y, Tomura M, Taniguchi M, Friedel RH, Rayburn H, Tessier-Lavigne M, Yoshida Y, Okuno T, Mizui M, Kang S, Nojima S, Tsujimura T, Nakatsuji Y, Katayama I, Toyofuku T, Kikutani H, Kumanogoh A. Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nat Immunol*, 11:594-600.2010.
30. Bloom SM, Bijanki VN, Nava GM, Sun L, Malvin NP, Donermeyer DL, Dunne WM Jr, Allen PM, Stappenbeck TS. Commensal *Bacteroides* species induce colitis in host-genotype-specific fashion in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Cell Host Microbe*, 9(5):390-403.2011.
31. McCormick DA, Horton LW, Mee AS. Mucin depletion in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol*, 43:143-146.1990.

32. Podolsky DK, Isselbacher KJ. Composition of human colonic mucin. Selective alteration in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*, 72:142-53.1983.
33. Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, Sekirov I, Champion OL, Gaynor EC, Finlay BB. Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe*, 2:119–129.2007.
34. Garrett WS, Lord GM, Punit S, Lugo-Villarino G, Mazmanian SK, Ito S, Glickman JN, Glimcher LH. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell*, 131:33-45.2007.
35. Van Es JH, Van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, Cozijnsen M, Robine S, Winton DJ, Radtke F, Clevers H. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*, 435:959–963.2005.
36. Hammer GE, Ma A. Molecular control of steady-state dendritic cell maturation and immune homeostasis. *Annu Rev Immunol*, 31:743-91.2013.
37. Cader MZ, Kaser A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut*, 62:1653-64.2013.
38. Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls

- development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity*, 25:455-471.2006.
39. Konkel JE, Chen W. Balancing acts: the role of TGF- β in the mucosal immune system. *Trends Mol Med*, 17:668-676.2011.
40. Ramalingam R, Larmonier CB, Thurston RD, Midura-Kiela MT, Zheng SG, Ghishan FK, Kiela PR. Dendritic cell-specific disruption of TGF- β receptor II leads to altered regulatory T cell phenotype and spontaneous multiorgan autoimmunity. *J Immunol*, 189:3878-3893.2012.
41. Racine R, Chatterjee M, Winslow GM. CD11c expression identifies a population of extrafollicular antigen-specific splenic plasmablasts responsible for CD4 T-independent antibody responses during intracellular bacterial infection. *J Immunol*, 181(2):1375-1385.
42. Kulkarni AB, Karisson S. Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol*, 143:3-9.1993.
43. Di Sabatino A, Pickard KM, Rampton D, Kruidenier L, Rovedatti L, Leakey NA, Corazza GR, Monteleone G, MacDonald TT. Blockade of transforming growth factor beta upregulates T-box transcription factor T-bet, and increases T helper cell

- type 1 cytokine and matrix metalloproteinase-3 production in the human gut mucosa. *Gut*, 57:605-612.2008.
44. Gopalakrishnan A, Clinthorne JF, Rondini EA, McCaskey SJ, Gurzell EA, Langohr IM, Gardner EM, Fenton JI. Supplementation with galacto-oligosaccharides increases the percentage of NK cells and reduces colitis severity in Smad3-deficient mice. *J Nutr*, 142:1336-1342.2012.
45. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterol*, 127:412-21.2004.
46. Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA, Tsang J, Balish EJ, Braun J, Huycke MM, Sartor RB.. Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterol*, 128:891-906.2005.
47. Garrett WS, Gallini CA, Yatsunenko T, Michaud M, DuBois A, Delaney ML, Punit S, Karlsson M, Bry L, Glickman JN, Gordon JI, Onderdonk AB, Glimcher LH. *Enterobacteriaceae* act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host Microbe*, 8:292-300.2010.

48. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Visser CE, Kuijper EJ, Bartelsman JF, Tijssen JG, Speelman P, Dijkgraaf MG, Keller JJ. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*, 368(5):407-415.2013.
49. Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr*, 73:1131S-1141S.2001.
50. Knoop KA, McDonald KG, McCrate S, McDole JR, Newberry RD. Microbial sensing by goblet cells controls immune surveillance of luminal antigens in the colon. *Mucosal Immunol*, 10:1048.2014.
51. Johansson ME, Hansson GC. Mucus and the goblet cell. *Dig Dis* 2013;31:305-309.
52. Kahn WI. Physiological changes in the gastrointestinal tract and host protective immunity: learning from the mouse-*Trichinella spiralis* model. *Parasitology*, 135:671-682.2008.
53. Janice JK, Waliul IK. Goblet cells and mucins: Role in innate defense in enteric infections. *Pathogens*, 2:55-70.2013.
54. Nair MG, Guild KJ, Du Y, Zaph C, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy A, Stevens S, Karow M, Artis D. Goblet cell-derived resistin-like molecule beta augments CD4⁺ T cell production of IFN-gamma and infection-induced intestinal

- inflammation. *J Immunol*, 181:4709-4715.2008.
55. Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr*, 73:1131S-1141S.2001.
56. Shan M, Gentile M, Yeiser JR, Walland AC, Bornstein VU, Chen K, He B, Cassis L, Bigas A, Cols M, Comerma L, Huang B, Blander JM, Xiong H, Mayer L, Berin C, Augenlicht LH, Velcich A, Cerutti A.. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science*, 342:447-53.2013.
57. Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, Büller HA, Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB, Einerhand AW. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterol*, 131:117-129.2006.
58. Johansson ME, Gustafsson JK, Holmén-Larsson J, Jabbar KS, Xia L, Xu H, Ghishan FK, Carvalho FA, Gewirtz AT, Sjövall H, Hansson GC. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*, 63:281-291.2014.
59. Gersemann M, Becker S, Kubler I, et al. Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation*, 77:84-94.2009.
60. Shinoda M, Shin-Ya M, Naito Y, Kishida T, Ito R, Suzuki N, Yasuda H, Sakagami J,

- Imanishi J, Kataoka K, Mazda O, Yoshikawa T. Early-stage blocking of Notch signaling inhibits the depletion of goblet cells in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *J Gastroenterol*, 45(6):608-617.2010.
61. Noah TK, Shroyer NF. Notch in the intestine: regulation of homeostasis and pathogenesis. *Annu Rev Physiol*, 75:262-288.2013.
62. Shingo M, Daniel WR. The Role of Notch Signaling in Colon Homeostasis and Carcinogenesis, 102:1938-1942.2011.
63. Kared H, Adle-Biasette H, Foï_s E, Masson A, Bach JF, Chatenoud L, Schneider E, Zavala F. Jagged2-expressing hematopoietic progenitors promote regulatory T cell expansion in the periphery through notch signaling. *Immunity*, 25:823-834.2006.
64. Kijima M, Yamaguchi T, Ishifune C, Maekawa Y, Koyanagi A, Yagita H, Chiba S, Kishihara K, Shimada M, Yasutomo K. Dendritic cell-mediated NK cell activation is controlled by Jagged2-Notch interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:7010-7015.2008.
65. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Exp Anim*, 49:9-15.2008.
66. Perse M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol*, 718617.2012.

謝辞

本論文の作成にあたり懇切なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました東京大学医学部消化器内科小池和彦教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり以下の先生方に特に多大なるご協力を賜りましたことをここに記し、深く感謝申し上げます。

東京大学消化器内科

平田喜裕先生、伊地知秀明先生、中川勇人先生、木下裕人先生、
崎谷康佑先生、鈴木伸三先生、芹澤多佳子先生

東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 放射線分子医学教室

榎本敦先生、宮川清教授

その他、様々な点でご協力頂きました東京大学消化器内科の先生方に感謝いたします。