

## 論文の内容の要旨

### 腸管免疫における樹状細胞の TGF- $\beta$ シグナルの役割に関する検討

井原 聡三郎

#### 序文

樹状細胞は消化管における宿主の免疫応答を司っており、炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) の病態に重要な役割を担っている。樹状細胞は抗原提示細胞の一つで、病原体に対する炎症性免疫応答と、常在細菌に対する免疫寛容を調整している。TGF- $\beta$  は免疫抑制性のサイトカインで、腸管免疫において免疫担当細胞の TGF- $\beta$  シグナルが免疫寛容に重要であることが報告されている。しかしながら、樹状細胞の TGF- $\beta$  シグナルによる腸管免疫の制御機構は十分には解明されていない。本研究では樹状細胞特異的 TGF- $\beta$  受容体欠損マウス (*CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/+</sup>* マウスおよび *CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/fl</sup>* マウス) を用いて、腸管免疫における樹状細胞の TGF- $\beta$  シグナルが果たす役割について検討した。

#### 樹状細胞の TGF- $\beta$ シグナルは腸炎を惹起する。

*CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/fl</sup>* マウスは大腸炎を自然発症し、5 から 14 週令で早期に死亡した。*CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/fl</sup>* マウスの大腸病理は炎症細胞浸潤と上皮傷害ともに強く、杯細胞の減少が目立った。*CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/+</sup>* マウスは定常状態では腸炎を発症しなかったが、DSS で腸炎を誘導するとコントロールマウスに比してより重度の潰瘍を伴う大腸炎を呈した。これらの結果から樹状細胞の TGF- $\beta$  シグナルは腸炎を抑制していることが示唆された。

#### 樹状細胞の TGF- $\beta$ シグナルの欠損で腸内細菌の乱れ (dysbiosis) が生じ、腸炎を惹起する。

樹状細胞の TGF- $\beta$  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<sup>fl/fl</sup>* マウスの便中の細菌量を比較したところ、培養法および PCR 法ともに *CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/fl</sup>* マウスで便中の *Enterobacteriaceae* 量が 50 倍以上多かった。

前述した *CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/+</sup>* マウスを用いた DSS 腸炎モデルに抗生剤を併用したところ、コントロールマウスと *CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/+</sup>* マウスともに腸炎が等

しく抑制された。便中の細菌量を比較すると、コントロールマウスに比して *CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/+</sup>* マウスで DSS 投与により *Enterobacteriaceae* 量は 10 倍以上多くなったが、DSS 投与前および DSS+ 抗生剤の投与では両マウスの *Enterobacteriaceae* 量に差はみられなかった。

さらに糞便微生物移植(Fecal microbiota transplantation; FMT)を行い DSS で腸炎を誘導する実験を実施した。コントロールマウスの便を移植した野生型マウスに比して *CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/fl</sup>* マウスの便を移植した野生型マウスにおいて、DSS 誘導性腸炎の悪化がみられた。さらに、*CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/fl</sup>* マウスの便を MacConkey 培地で培養した菌 (*Enterobacteriaceae*)、あるいは血液寒天培地で培養した菌 (Total bacteria) を移植したところ、Total bacteria を移植した野生型マウスに比して *Enterobacteriaceae* を移植した野生型マウスにおいて、DSS 誘導性腸炎の悪化がみられた。

これらの結果から、樹状細胞の TGF- $\beta$  シグナルの欠損により生じた腸内細菌の変化、特に *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。

#### 大腸杯細胞と粘液層の減少は dysbiosis と関連する。

*CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/fl</sup>* マウスにおいて杯細胞減少と大腸粘液層の菲薄化がみられた。そこで、杯細胞と粘液層の変化が、腸内細菌および腸炎の制御にどのように関与するかを検証した。杯細胞分化を促進する Notch シグナル阻害剤  $\gamma$ -secretase inhibitor (Dibenzazepine; DBZ) を野生型マウスに投与すると、大腸杯細胞の増加と粘液層の肥厚がみられ、DSS を投与しても *Enterobacteriaceae* の増殖は抑制され、誘導性腸炎は軽減された。これらの結果から、杯細胞と粘液層の維持が *Enterobacteriaceae* の増殖と腸炎を抑制しており、*CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/fl</sup>* マウスではこの機構が破綻していることが示唆された。

杯細胞の減少や *Enterobacteriaceae* の増加が樹状細胞の TGF- $\beta$  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野生型マウスに後天的に *CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/fl</sup>* 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野生型マウスは 6 匹中 5 匹が 4 週以上生存したのに対して、*CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/fl</sup>* マウスの骨髄細胞を移植した野生型マウスは、移植後 4 週までに 6 匹全て死亡した。また、*CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/fl</sup>* マウスの骨髄細胞を移植した野生型マウスは、大腸により顕著な炎症像を呈し、杯細胞と粘液層の減少がみられ、*Enterobacteriaceae* 量が増加する傾向にあった。これらの結果から、樹状細胞の TGF- $\beta$  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。

樹状細胞の TGF- $\beta$  シグナルは Notch シグナルを介して腸上皮細胞の分化と粘液分泌を制御する。

*CD11c-cre Tgfb2<sup>fl/fl</sup>* マウスの樹状細胞の遺伝子発現プロファイルを調べると Notch リガンドである *Jagged1* が高発現していることが分かった。そこで樹状細胞と Notch シグナルの関連を検討した。in vivo で *CD11c-cre Tgfb2<sup>fl/fl</sup>* マウスの腸管樹状細胞では *Jagged1* と *Jagged2* の発現が増加し、腸管上皮で *Hes1* の発現が増加していた。

樹状細胞における TGF- $\beta$  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 マウスの骨髄由来樹状細胞 (Bone Marrow-derived Dendritic Cell; BMDC) を TGF- $\beta$ 1 で刺激すると BMDC の *Jagged1* と *Jagged2* の発現は低下した。さらに、*cre* を導入したアデノウイルスを *cre-negative Tgfb2<sup>fl/fl</sup>* マウスの BMDC に感染させて TGF- $\beta$  シグナルを減弱させたところ BMDC の *Jagged1* と *Jagged2* の発現が上昇した。

これらの結果から、樹状細胞における TGF- $\beta$  シグナルは *Jagged1* と *Jagged2* の発現を抑制し、腸管上皮の Notch シグナルを抑えることで、大腸杯細胞の分化を促進している可能性が示唆された。

## 結語

樹状細胞の TGF- $\beta$  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、杯細胞と粘液層を維持し、常在細菌とくに *Enterobacteriaceae* の増殖を抑制して、腸管恒常性の維持に関与していると考えられる。