

## 審査の結果の要旨

井原 聡三郎

本研究は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を明らかにするため、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、樹状細胞の TGF- $\beta$  シグナルと腸上皮細胞および腸内細菌との関連に着目して解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. *CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/fl</sup>* マウスは大腸炎を自然発症し、その大腸病理は炎症細胞浸潤と上皮傷害ともにみられ、特に杯細胞の減少が目立った。*CD11c-cre Tgfbr2<sup>fl/+</sup>* マウスは非刺激時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- $\beta$  シグナルは腸炎を抑制していることが示唆された。
2. 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。*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。

糞便微生物移植実験では、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。

3. *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。

さらに、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ところ、*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、*Enterobacteriaceae* 量の増加がみられた。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。

4. 最後に、樹状細胞と Notch シグナルの関連を検討した。in vivo で *CD11c-cre Tgfbr2<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 Tgfbr2<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。

以上、本論文は樹状細胞の TGF- $\beta$  シグナルが、大腸において樹状細胞-腸管上皮間の Notch シグナルを抑制することで、大腸杯細胞と粘液層を維持し、腸内常在細菌とくに *Enterobacteriaceae* の増殖を抑制して、腸管恒常性の維持に関与している可能性を示した。本研究はこれまで十分には明らかにされていなかった、樹状細胞の TGF- $\beta$  シグナルを介した腸管免疫の制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。