

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460586

研究課題名(和文) 腸管上皮細胞による樹状細胞コンディショニング機構の解明

研究課題名(英文) A conditioning machinery of dendritic cells by epithelial cells in the gut

研究代表者

手塚 裕之 (TEZUKA, HIROYUKI)

星薬科大学・先端生命科学研究センター・特任准教授

研究者番号：30375258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腸管の樹状細胞(DC)は末梢リンパ節のDCとフェノタイプや機能の点で明らかに異なる。腸管におけるDCのコンディショニング機構は、同所に豊富に存在するTGF- β が重要であることを見出した。DCのみがTGF- β シグナルを受容できないDC特異的II型TGF- β 受容体欠損マウスは、炎症性細胞の主要臓器への浸潤や自己抗体の生産など、自己免疫疾患様の病態が自発的に発症した。本病態を発症したマウスの末梢リンパ節では腸内常在菌が検出され、重要なことに、同マウスへの抗生物質の投与は腸内常在菌の体内移行を妨げ、症状や生存率を改善させた。

研究成果の概要(英文)：Gut dendritic cells (DC) are distinct from peripheral lymph node DC in terms of their phenotypes and functions. We found that TGF- β , which is an abundant cytokine in the gut, is essential for the conditioning of DC in the gut. We generated conditional knockout mice with DC-specific deletion of type II TGF- β receptor (TbRII-DCKO), and found that TbRII-DCKO mice develop spontaneously autoimmune-like diseases, which are characterized by inflammatory cell migration into several organs and autoantibody production. Interestingly, in TbRII-DCKO mice that had developed the diseases, some commensal bacteria were detected in peripheral lymphoid organs, and the symptom and host survival were partly improved by treatment with antibiotics.

研究分野：免疫学

キーワード：腸管上皮細胞 樹状細胞 TGF- β IgA 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

腸管は食物や腸内常在菌など生体の恒常性を維持する上で重要な成分や、感染症をもたらす病原体が常時混在する臓器であり、食物や腸内常在菌成分に対しては免疫寛容(負の応答)を、病原体や一部の常在菌に対してはIgAを主体とした防御応答(正の応答)を誘導する。この相反する応答は、全身免疫系とは異なる腸管独自の粘膜免疫系によって制御されており、パイエル板、腸間膜リンパ節、および粘膜固有層から構成される腸管関連リンパ組織(GALT)で誘導される。GALTには代表的な抗炎症性サイトカインであるTGF- β が豊富に存在しており、この理由から腸管は免疫寛容誘導の場として理解されてきた。近年、この誘導機序に樹状細胞(DC)が中心的な役割を担っていることが相次いで報告された。しかしながら、粘膜免疫系を司るGALT DCに固有の機能の付与(コンディショニング)機構は不明である。

2. 研究の目的

申請者は、この点を解明する上で重要となるのは、GALTに固有の微小環境に着目することであると考えた。本研究課題では、腸管粘膜組織に固有の上皮細胞および同所に豊富に存在するTGF- β に着目し、GALTにおけるDCのコンディショニング機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

C57BL/6J 野生型(B6)、B6.CD11c-cre、B6.Villin-cre、B6.T β RII^{lox/flox} マウスは日本クレアおよびJackson Laboratoryから購入した。TGF- β 1-GFP レポーターマウスはFlavell 博士より分与された。すべての動物実験は東京医科歯科大学および星薬科大学の組換えDNA実験安全委員会および動物実験委員会の審査・承認を経て遂行した。実験に当たっては、各大学動物実験指針を遵守した。

(2) 免疫組織化学染色法

マウスから摘出した臓器をOCTコンパウンドに包埋し、凍結組織を作製した後、クリオスタットを用いて薄切(8 μ m)した。凍結組織切片をAPRIL、BAFF、CD11b、CD11c、IgD、IgG、Ki67に特異的な蛍光標識抗体で染色後、共焦点レーザー顕微鏡(FV10i)を用いて解析した。

(3) フローサイトメーター

マウスの腸管粘膜固有層細胞を細胞表面分子(B220、CD4、CD11b、CD11c、CD45.2、IgA)および細胞内分子(IFN- γ 、IL-17、Foxp3)に特異的な蛍光標識抗体で染色し、FACSCaliburおよびFACSCantIIを用いて解析した。

(4) 炎症性腸疾患モデル

マウスに2%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を7日間飲水摂取させ、その後通常の水に置き換えさらに7日間飼育し、経時的に体重変化および肉眼的所見(大腸短縮、大腸出血)を評価した。

(5) 腸内常在菌の検出

リンパ節における腸内常在菌の検出・同定は、16S rRNAを標的としたq-PCR法を用いておこなった。また、*Enterococcus* spp.の同定およびコロニー数の測定はEF選択培地を用いておこなった。

4. 研究成果

(1) TGF- β 生産細胞の同定

TGF- β は粘膜組織に豊富に存在するサイトカインであり、さまざまな細胞から生産されることが知られている。TGF- β -GFP レポーターマウスを用いて、腸管粘膜組織における主要なTGF- β 生産細胞の同定を試みたところ、同細胞は粘膜固有層の上皮細胞直下に存在するCD45.2⁺CD11b⁺細胞であることが判明した。

(2) DC コンディショニングにおける上皮細胞TGF- β シグナルの重要性

II型TGF- β 受容体遺伝子領域をloxP配列間で挟んだT β RII^{lox/flox}マウスと上皮細胞特異的マーカーVillin-creマウスを交配することで、上皮細胞のみTGF- β シグナルを受容できないT β RII^{IECKO}マウスを作製した。TGF- β 欠損マウスは胎生致死であることから、T β RII^{IECKO}マウスでは腸炎が自発的に発症することが予測されたが、同マウスは同腹対照(T β RII^{lox/flox})マウスと同様、正常な発育を示した。小腸および大腸における陰窩の数や絨毛の高さも正常であった。また、定常状態における腸管粘膜固有層のDCサブセット、Th17細胞、制御性T細胞、およびIgA⁺細胞の頻度も正常であった。

T β RII^{IECKO}マウスにDSS大腸炎を発症させ、炎症時における上皮細胞TGF- β シグナルの重要性についても検討したが、体重変化および大腸短縮などに有意な差異は認められなかった。これらの結果から、DCコンディショニングは上皮細胞の受容するTGF- β シグナルに依存しないことが判明した。

(3) DC コンディショニングにおけるDC TGF- β シグナルの重要性

T β RII^{lox/flox}マウスとDC特異的マーカーCD11c-creマウスを交配することで、DCのみTGF- β シグナルを受容できないT β RII^{DCKO}マウスを作製した。T β RII^{DCKO}マウスは8週齢までは対照(T β RII^{lox/flox})マウスと同様の体重増加を示すが、興味深いことに、およそ80%の個体(雄性マウスは100%)でそれ以降の体重増加は認められず、15週齢前後に全頭死亡することが判明した(図1)。

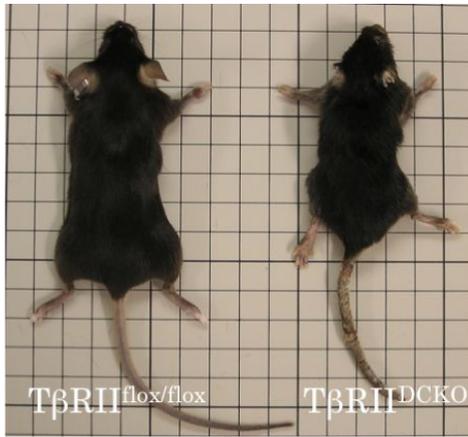


図1. 12週齢のTβRII^{DCKO}マウスで認められる発育不良.

TβRII^{DCKO} マウスの早期死亡の原因を追求するために、病態を発症したマウス(12 週齢)のリンパ組織(脾臓、胸腺、腸間膜リンパ節)、心臓、肝臓、腎臓、胃、および腸管の凍結組織切片を作製し、解析をおこなったところ、同マウスでは各臓器の萎縮、CD11b⁺およびCD11b⁺CD11c⁺炎症性細胞の浸潤、リンパ濾胞(tertiary lymphoid organs)の形成が認められた。なかでも、胸腺と胃粘膜における炎症性細胞の浸潤およびリンパ濾胞の形成は著明であった(図 2)。

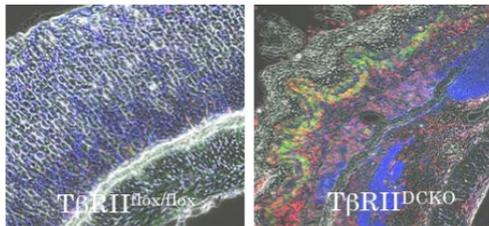


図2. TβRII^{DCKO}マウスの胃粘膜では炎症性細胞の浸潤およびリンパ濾胞の形成が認められた。CD11b(赤), CD11c(緑), DAPI(青)。

また対照マウスと比較して、TβRII^{DCKO} マウスでは、末梢血中の BAFF 生産レベル、胸腺および胃粘膜における APRIL 発現レベルの著しい亢進が認められた(図 3)。この結果と相関するように、末梢血中の IgG および IgA 生産レベルの亢進、リンパ濾胞の周囲に IgG⁺細胞の存在が確認された(図 3)。

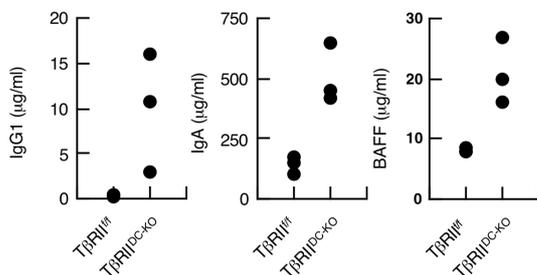


図3. TβRII^{DCKO}マウスではBAFF生産量の増加に伴う抗体生産量の増加が認められた。

重要なことに、二重鎖 DNA に対する自己抗体(IgG)の生産も病態を発症した半数のマウスで検出された。さらに腸管粘膜固有層では、Th17 細胞および IFN- γ 生産性 T 細胞の頻度の増加が確認されたが、制御性 T 細胞の頻度に変化は認められなかった。

(4) 自己免疫疾患様病態形成における腸内常在菌の重要性

近年、腸内常在菌が自己免疫疾患の病態形成に重要であることが報告されている。病態を発症した TβRII^{DCKO} マウスのリンパ組織における腸内常在菌の有無を調べたところ、脾臓、腸間膜リンパ節、および腸管粘膜固有層において代表的な腸内常在菌 *Enterococcus faecalis* および *E. faecium* が高頻度で検出され、興味深いことに、その多くが DC によって取り込まれていることが認められた(図 4)。

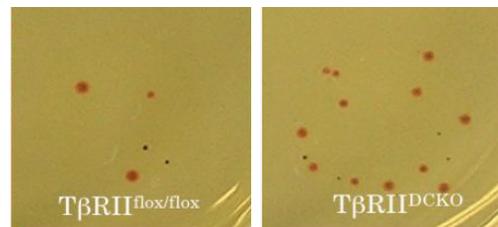


図4. TβRII^{DCKO}マウスの脾臓では腸内常在菌 *Enterococcus* spp.の頻度が増加していた。

TβRII^{DCKO} マウスの自己免疫疾患様の病態が腸内常在菌の刺激依存性である可能性を明らかにする目的で、同マウスの離乳後から抗生物質(アンピシリン、メトロニダゾール、ネオマイシン、バンコマイシン)を飲水投与させた。予想した通り、抗生物質処理によりリンパ組織における腸内常在菌数の減少に伴う、発症時期の遅延および生存率の改善が認められた。また同時に、炎症性細胞の浸潤、リンパ濾胞の形成、および自己抗体の生産が抑制された。

これら一連の実験を通じて得られた結果から、DC における TGF- β シグナルは粘膜面での腸内常在菌の体内移行を制限しており、同時に常在菌に対する免疫寛容の維持機構であり、これにより自発的な炎症性疾患の発症を未然に防いでいることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Liu J, Guo YM, Onai N, Ohyagi H, Hirokawa M, Takahashi N, Tagawa H, Ubukawa K, Kobayashi I, Tezuka H, Minamiya Y, Ohteki T, Sawada K. Cytosine-phosphorothionate-guanine oligodeoxynucleotides exacerbates hemophagocytosis by inducing TNF- α production in mice following bone marrow transplantation. **Biology of**

Blood and Marrow Trasplantation 22, 627-636 (2016). 査読有.

Tezuka H, Imai S. Immunomodulatory effects of soybeans and processed soy food compounds. **Recent patents on food, nutrition & agriculture** 7(2) 92-99 (2015). 査読有.

手塚裕之, 安部由紀子, 黒田聖子, 樽木俊聡「IgA 生産を制御する樹状細胞サブセット」臨床免疫・アレルギー科 62(6) 593-599 (2014). 査読無.

Ichikawa A, Kuba K, Morita M, Chida S, Tezuka, H, Hara H, Sasaki T, Ohteki T, Ranieri M, dos Santos CC, Kawaoka Y, Akira S, Luster AD, Lu, B, Penninger JM, Uhling S, Slutsky AS, Imai Y. CXCL10-CXCR3 enhances the development of neutrophil-mediated fulminant lung injury of viral and nonviral origin. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** 187, 65-77 (2013). 査読有.

〔学会発表〕(計 3 件)

劉嘉嘉, 郭永梅, 大八木秀明, 広川誠, 高橋直人, 鶴生川久美, 小林五十鈴, 南谷佳弘, 手塚裕之, 小内伸幸, 樽木俊聡, 澤田賢一「TLR9 signaling exerts HPS in BMT mice and is effectively treated through TNF- α inhibition」第 77 回 日本血液学会学術集会, ホテル日航金沢, 2015.10.16.

Tezuka H, and Ohteki T. Autophagy-dependent regulation of intestinal homeostasis by dendritic cells. 第 43 回 日本免疫学会総会・学術集会, 国立京都国際会館, 2014.12.10.

Tezuka H, and Ohteki T. TNF/iNOS-producing dendritic cells are originated from inflammatory monocytes and regulate gut IgA production. 第 42 回 日本免疫学会総会・学術集会記録, 幕張メッセ, 2013.12.12.

〔その他〕

アウトリーチ活動

本研究に関する市民向けの公開講座を以下の通りおこなった.

手塚裕之「粘膜バリア：病原体と戦う免疫システム」東京医科歯科大学難治疾患研究所市民講座 -最先端生命科学講座シリーズ 第 11 回- (東京) 2015 年 2 月 20 日.

ホームページ等

星薬科大学先端生命科学研究センターHP

<http://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsu/sentanken/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

手塚 裕之 (Hiroyuki TEZUKA)

星薬科大学・先端生命科学研究センター

特任准教授

研究者番号 : 30375258