

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590933

研究課題名(和文)上皮細胞と樹状細胞による腸管免疫と宿主恒常性の制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of mucosal immunity and homeostasis by epithelial cells and dendritic cells

研究代表者

平田 喜裕 (HIRATA, YOSHIHIRO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10529192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：腸管の恒常性制御機構の解明のため、腸管上皮細胞と樹状細胞の役割を検討した。上皮特異的IKKノックアウトは、Citrobacter感染腸炎の減弱を認めなかった。一方血球細胞ではIKKシグナルが樹状細胞と病原体の制御に重要であった。上皮細胞の細胞間接着分子は腸管内細菌の制御と腸炎の抑制作用があると考えられた。一方樹状細胞ではTGFβシグナルが、大腸、胃など消化管の抗炎症作用に必須であった。樹状細胞のTGFβR2のヘテロノックアウトマウスではCitrobacter腸炎の悪化がみられた。樹状細胞のTGFβシグナルは腸内細菌を感知、制御し個体の恒常性維持に寄与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to understand the roles of epithelial cell and dendritic cell in the regulation of immune responses and homeostasis in colon. Epithelial cell-specific IKK knockout mice showed comparable inflammatory responses to WT mice in Citrobacter-induced colitis. In contrast, hematopoietic IKK signals are critical to mucosal accumulation of dendritic cells and regulation of Citrobacter. Dendritic cell-specific TGFβR2 knockout mice showed severe gastrointestinal inflammation and died before 12 week. Dendritic cell-specific TGFβR2 heterozygote mice also exhibited susceptibility to Citrobacter-induced colitis. The results in this study indicate TGFβ signaling on dendritic cells is an important regulator of colonic homeostasis by sensing and regulating microbiota of colon.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：免疫 シグナル伝達 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

近年ヒトと腸内細菌叢の共存関係が、宿主の恒常性に影響を与えていることが明らかになってきた。腸管は個体のなかで最も大きな二次免疫系をもち、腸管免疫によって病原体から個体を防御する一方で、食物アレルギーや炎症性腸疾患などの病態にも関与しており、腸管免疫は厳密に制御されている。腸管免疫において細菌の認識に重要な役割を果たすのが、個体と腸管内をへだてる一層の上皮細胞と、おもに粘膜固有層とリンパ節を移動し抗原認識にかかわる樹状細胞である。この免疫寛容と免疫誘導がどのように制御されているのか、特に上皮細胞と樹状細胞の相互反応機序に関しては大部分が不明である。

2. 研究の目的

本研究では腸管免疫の制御機構について、細菌の認識に関与する上皮細胞と樹状細胞の役割と相互作用について検討する。上皮および樹状細胞に特異的な遺伝子制御マウスを用いてそれぞれの細胞の炎症性シグナルや細胞間接着分子が常在菌や病原性細菌の認識や免疫応答に果たす役割を明らかにする。また腸管免疫の破綻による腸内細菌叢の変化が個体に与える影響を検討し、腸管免疫制御による肥満、腸炎などの治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

上皮細胞特異的な IKK ノックアウトマウスは Foxa-cre マウスと IKK flox マウスを交配して作成した(Foxa-IKK)。血球特異的 IKK ノックアウトマウスは Mx1-cre マウスと IKK flox マウスを交配(Mx1-IKK)し、polyIC を腹腔内投与して作成した。誘導性カドヘリンノックアウトマウスは CAG-creERT マウスと CDH flox マウスを交配した個体(CAGcreERT-CDH)にタモキシフェンを腹腔内投与して作成した。樹状細胞特異的 TGFbR2 ノックアウトマウスは Itg-cre マウスと TGFbR2 flox マウスを交配して作成した(DC-TGFbR2KO)。これらマウスに Citrobacter 感染により大腸炎を作成し、大腸組織の病理像の検討、免疫組織染色、定量的 PCR 法による遺伝子発現検討を行った。炎症細胞の定量は遺伝子発現やフローサイトメトリー、免疫染色で行った。腸内細菌叢の検討は、糞便から抽出した DNA を用いた定量的 PCR 法、培養法などで行った。

4. 研究成果

(1) 上皮細胞における NF-kB シグナルが腸管の恒常性に与える影響の検討
樹立した Foxa-cre:IKK F/F マウス(Foxa-IKK)の大腸組織とコントロールマウスの大腸組織を免疫プロットで検討した。図 1 に示すように Foxa-IKK マウスの大腸上皮細胞における IKK の欠失を確認した。こ

のマウスは正常に生まれ、発育し明らかな体重減少も認めなかった。

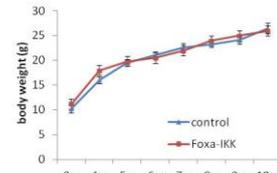
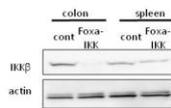


図1: Foxa-IKKマウスの作成

次にマウスに大腸炎モデルである Citrobacter 感染腸炎を適用してコントロールマウスと比較した。糞便試料をもちいた感染細菌数の比較では、3 週までの検討でコントロールと Foxa-IKK マウスで有意な違いを認めなかった。また体重減少についても両群で有意な違いを認めなかった(図 2)。続いて腸炎の評価の目的で大腸組織の病理像を比較した。粘膜下層、粘膜固有層への炎症細胞浸潤や反応性の上皮細胞の肥厚も両群に同程度に認められた(図 3)。また Citrobacter に対する血清抗体価も ELISA で調べたが有意な違いを認めなかった。IKK が制御する NF-kB の標的遺伝子である炎症性サイトカインの発現や炎症細胞のマーカーを大腸組織で定量したところ、Foxa-IKK マウスで有意な低下を認めなかった(図 4)。

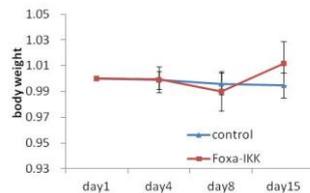


図2: Citrobacter感染後の体重変化

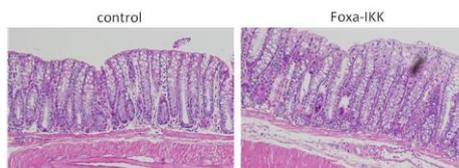


図3: Citrobacter感染2w後の大腸病理組織像

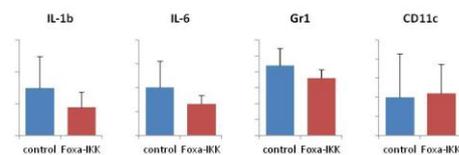
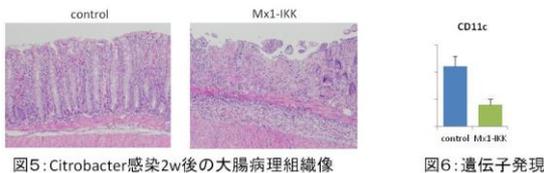


図4: Citrobacter感染2w後の大腸粘膜の遺伝子発現

これらの結果から上皮細胞の NF-kB シグナルが細菌性腸炎の制御に与える影響は限局的であると考えられ、腸管免疫や宿主恒常性は別の細胞やシグナルが重要であることが明らかになった。

(2) 上皮細胞以外の NF-kB シグナルの検討
上皮細胞の NF-kB シグナルが細菌性腸炎の制御に与える影響が限定的であったため、次に血球系の細胞の NF-kB シグナルについて

検討した。Mx1-IKK マウスに polyIC (250ug/body 2 日間)を腹腔内投与し誘導性に血球系に遺伝子改変(IKKb ノックアウト)を起こし *Citrobacter* 感染腸炎の影響を検討した。これらのマウスではコントロールマウスに比較し体重の有意な減少(103% vs 95%)、高い死亡率 (0% vs 63%)が認められた。また病理像の検討でも Mx1-IKK マウスはコントロールマウスでは見られない、広範な潰瘍形成や強い炎症細胞浸潤を認めた(図 5)。炎症性サイトカインの発現は Mx1-IKK マウスとコントロールで有意な差が見られなかったが、腸管粘膜の樹状細胞数は定量的 PCR で著明に減少していた(図 6)。糞便中の *Citrobacter* 数を定量的に評価したところ、コントロールに比較し Mx1-IKK マウスでは有意に細菌数が増加していた(7.6 ± 0.2 vs $9.3 \pm 0.5 \log_{10}CFU/g$)。これらの結果から血球系の IKK シグナルは腸管内病原性細菌の制御と腸炎の抑制に重要であり、樹状細胞が関与している可能性が示唆された。



(3) 樹状細胞特異的 TGFβR2 ノックアウトマウスを用いた樹状細胞による腸管恒常性制御機構の検討

樹状細胞は外来性の病原体や食事抗原などを認識し免疫の発動や寛容を制御する炎症細胞である。TGFβ シグナルはリンパ球の抑制などに関与する細胞内シグナルであり、炎症性腸疾患への関与も指摘されている。そこで樹状細胞における TGFβ シグナルの役割を検討する目的で *Itg-cre;TGFβR2F/F* マウス(DC-TGFβR2KO マウス)を樹立しコントロールマウスと比較した。

まず、樹状細胞における TGFβR2 の発現と TGFβ に対する反応性を検討した。DC-TGFβR2KO、DC-TGFβR2 heterozygote (HT)、コントロールマウスの骨髄から樹状細胞を分化させイムノプロットで検討した。図 7 に示すように DC-TGFβR2KO では TGFβR2 の発現が消失し、シグナル下流の SMAD2 のリン酸化がほぼ消失していた。HT マウスからの樹状細胞は減弱がみられた。DC-TGFβR2KO マウスは生後 8-12 週で死亡した。組織の病理像の検討で胃、大腸などの消化管に広範な炎症を認めた(図 8)。腸管内への樹状細胞の浸潤を検討すると、野生型マウスに比較して有意に高度であった(図 9)。コントロールマウスと DC-TGFβR2HT マウスは定常状態では病理像、成長などに全く差が見られなかった(図 10)。そこでこのマウスを用いて *Citrobacter* 感染における樹状細胞の TGFβ シグナルの役割を検討した。*Citrobacter* 腸炎モデルにおける便中の細菌

量は DC-TGFβR2HT マウスで有意に高値であり、病理学的な炎症も高度であった(図 11)。これらの結果より樹状細胞における TGFβ シグナルは腸内病原性細菌の制御に重要であり、腸炎の抑止に働いている可能性が考えられた。

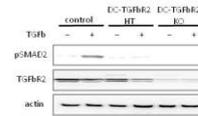


図7: DC-TGFβR2KO/HTマウスの樹状細胞



図8: DC-TGFβR2KOマウスの消化管病理像 (100x)

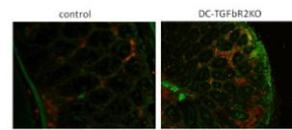


図9: 大腸組織のCD11c免疫染色

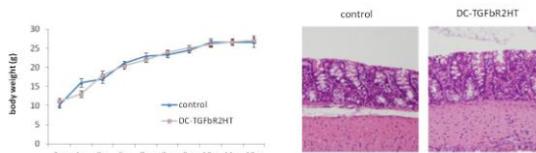


図10: コントロールマウスとDC-TGFβR2HTマウスの成長曲線と大腸病理像

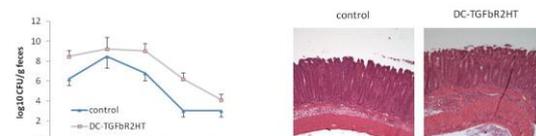


図11: 糞便中のCitrobacter菌量と大腸病理像

(4) 上皮細胞の細胞間接着と腸管恒常性の検討

次に上皮細胞の細胞接着が宿主の腸管恒常性に与える影響を明らかにするために上皮細胞の重要な細胞間接着分子である E-cadherin に着目した。タモキシフェンの腹腔内投与により誘導性に遺伝子改変を惹起する *CAGcreERT-CDH* マウスを用いて検討した。コントロールマウスはタモキシフェンの投与により病理学的に炎症がみられなかった。しかし *CAGcreERT-CDH* マウスは投与後 1 週で著明な上皮の脱落と炎症細胞浸潤を認めた(図 12)。免疫染色で E-cadherin はコントロールマウスの上皮細胞のとくに腸管内腔側に強く発現していたが *CAGcreERT-CDH* マウスでは著明な減弱が見られた(図 13)。それぞれのマウスより糞便を採取し、定量的 PCR で細菌数の比較を行った。DNA 当たりの総細菌数、クロスト

リジウム属細菌数に有意差がみられなかったが、エンテロバクテリア科の細菌は CAG-creERT; CDH マウスで約5倍増加していた(図14)。この結果からは上皮細胞の細胞間接着シグナルは腸管内細菌の菌種によった制御を行っている可能性が考えられた。

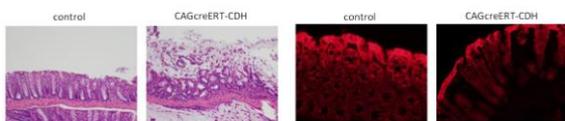


図12:大腸病理像

図13: E-cadherinの免疫染色

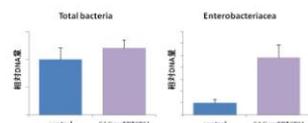


図14:糞便中DNA量

(5) 腸炎における腸管膜脂肪組織の変化
近年肥満などの代謝性疾患が宿主の恒常性制御に影響を与えることが明らかになってきた。そこで腸炎における腸管の脂肪組織の変化を検討した。

野生型 B6 マウスに Citrobacter を感染させ腸管膜脂肪組織の病理像を検討したが、経時的に有意な変化は見られなかった。しかし炎症性サイトカインの定量を行うと、mRNA レベルでは CXCL1、CXCL2 の有意な増加がみられた(図15)。よって腸管内細菌叢の変化による腸炎が脂肪細胞のケモカイン発現を引き起こす可能性が考えられた。

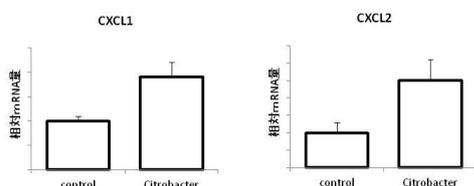


図15:脂肪組織内ケモカイン量

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 1 件)

- ① 早河翼、平田喜裕、自然免疫と腸炎関連大腸癌発生メカニズム、医学のあゆみ、査読なし、241 巻、3 号、2012 年、202-206

[学会発表] (計 4 件)

- ① 平田喜裕、細菌認識機構と腸管の炎症における NF- κ B シグナルの役割、第 96 回消化器病学会総会、2011 年 5 月 13 日、東京
- ② 井原聡三郎、平田喜裕、The role of transforming growth factor-beta signaling on dendritic cells in the development of murine colitis、米国消

化器病学会週間、2013 年 5 月 18 日、Orland USA

- ③ 井原聡三郎、平田喜裕、樹状細胞の TGF-beta シグナルによる腸内細菌叢の恒常性維持、第 100 回日本消化器病学会総会、2014 年 4 月 24 日、東京
- ④ 井原聡三郎、平田喜裕、Transforming Growth Factor- β on dendritic cells regulates bacterial communities and gut homeostasis、米国消化器病学会週間、2014 年 5 月 5 日、Chicago USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 喜裕 (HIRATA YOSHIHIRO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10529192

(2) 研究分担者

大塚 基之 (OTSUKA MOTOYUKI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90518945

山田 篤生 (YAMADA ATSUO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80534932