

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07607

研究課題名(和文) 腸内細菌由来の代謝分子を起点とした抗腫瘍免疫増強の解析

研究課題名(英文) Role of the microbial metabolite-macrophage axis in tumor immunity

研究代表者

梅本 英司 (Umemoto, Eiji)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：90452440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌由来の代謝分子ピルビン酸および乳酸は、小腸CX3CR1+貪食細胞上のG蛋白質共役型受容体GPR31に結合し、その樹状突起伸長を促進する。GPR31欠損マウスに大腸癌細胞株を接種したところ、腫瘍形成の増大傾向が認められた。そこで、腸管における制御性T細胞(Treg)を解析したところ、GPR31の欠損により小腸RORgt+ Tregの減少が認められた。さらに、ピルビン酸の経口投与はGPR31依存的に経口免疫寛容を増強した。すなわち、ピルビン酸-GPR31シグナルは腸管恒常性維持に重要な役割を果たすと考えられた。腫瘍免疫におけるGPR31シグナルの詳細な役割については更なる解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、腸内細菌由来の代謝産物であるピルビン酸が、小腸貪食細胞上のG蛋白質共役型受容体GPR31に結合することで制御性T細胞サブセットを誘導し、経口免疫寛容を促進することが明らかになった。すなわち、ピルビン酸・乳酸-GPR31シグナルは腸管恒常性維持に重要な役割を果たすと考えられる。経口免疫寛容は食物アレルギーの成立に重要な役割持つことから、本研究の成果は将来的に食物アレルギーの予防や治療に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Gut microbial products pyruvate and lactic acid bind to G protein-coupled receptor GPR31 and induce dendrite protrusion of CX3CR1+ phagocyte in the small intestine. Here we found that GPR31 deficiency tends to promote tumorigenesis. Therefore, we analyzed regulatory T cells (Tregs) in the intestine. The number of Treg expressing RORgt+ in the small intestine was significantly reduced in GPR31-deficient mice. Oral administration of sodium pyruvate enhances oral tolerance in a GPR31-dependent manner. Thus, the pyruvate-GPR31 axis may play important roles in maintenance of gut homeostasis by inducing RORgt+ Tregs. The detailed role of the GPR31 signaling in tumor immunity needs to be addressed in further analyses.

研究分野：免疫学

キーワード：粘膜免疫 代謝分子 GPCR

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腸管に多数存在する腸内細菌は多種多様な代謝産物を産生するが、腸内細菌が生み出す個々の生理活性分子の実体およびその機能については不明な点が多い。近年、腸内細菌が腫瘍に対する免疫療法の感受性を決定する重要な因子であることが報告された。PD-1 は細胞傷害性 T 細胞の表面に発現する免疫チェックポイント受容体であり、PD-1 経路の阻害は悪性黒色腫や非小細胞肺癌など種々の腫瘍に抗腫瘍効果を発揮する。PD-1 阻害治療に奏効を示す癌患者と示さない患者では腸内細菌叢が異なり (Rounty B et al. *Science* 359: 91-97, 2018, Gopalakrishnan V et al. *Science*, 359: 97-103, 2018, Matson V et al. *Science* 359:104-108, 2018)。PD-1 阻害抗体に奏効を示す患者の腸内細菌を無菌マウスに移植すると T 細胞の反応性が増加し、抗 PD-1 抗体による治療効果が亢進することが報告された。マウスではビフィズス菌が腫瘍に対する PD-1 経路阻害の奏効を高めることが報告されたが、死菌投与ではその効果が認められないことから (Sivan A et al. *Science*, 350: 1084-1089, 2015)。ビフィズス菌等が産生する何らかの代謝分子が PD-1 経路阻害による治療効果を増強する可能性がある。しかし、特定の腸内細菌がどのように PD-1 阻害剤による抗腫瘍効果を調節しているのか、その分子機構には不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

小腸粘膜固有層には多くの免疫細胞集団が存在するが、特に CX3CR1<sup>+</sup> 貪食細胞は独特な機能を有するミエロイド系細胞集団である。CX3CR1<sup>+</sup> 貪食細胞は腸管上皮細胞間から樹状突起を管腔面に伸長することで管腔内の細菌を捕捉し、病原性細菌の排除に寄与する (Niess JH et al. *Science*, 307:254-258, 2005)。申請者らは腸内細菌由来の代謝産物であるピルビン酸および乳酸が CX3CR1<sup>+</sup> 貪食細胞上の G 蛋白質共役型受容体 GPR31 に作用することを見出した。GPR31 は小腸 CX3CR1<sup>+</sup> 貪食細胞に選択的に発現する。ピルビン酸・乳酸を経口投与すると、GPR31 依存的に CX3CR1<sup>+</sup> 貪食細胞による腸管管腔面への樹状突起伸長が促進し、病原性細菌の一種ネズミチフス菌に対する免疫応答および抵抗性が増強した (Morita N and Umemoto E et al. *Nature* 566:110-114, 2019)。すなわち、腸内細菌由来のピルビン酸・乳酸は腸管免疫系を制御する生理活性分子として機能することが示唆された。一方、他の研究グループは、小腸 CX3CR1<sup>+</sup> 貪食細胞が腸管管腔面だけでなく、小腸の有窓型毛細血管近傍に樹状突起を伸長し、血液中の抗原を効率的に捕捉すること、ならびに古典的な腸管樹状細胞と異なり、CD8<sup>+</sup> T 細胞の活性化を直接、調節することを報告している (Chang SY et al. *Immunity*, 38: 153-165, 2013)。

そこで、本研究では、ピルビン酸・乳酸 - GPR31 シグナルによる小腸 CX3CR1<sup>+</sup> 貪食細胞の活性化が、T 細胞の機能調節および抗腫瘍免疫に及ぼす影響を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 腫瘍細胞の接種

マウス大腸癌細胞 MC38 ( $1 \times 10^6$  cells) を野生型マウスおよび GPR31 欠損マウスの脇腹に皮下投与し、経時的に腫瘍塊の大きさを測定した。

#### 腸管組織における免疫細胞の調製

マウスから小腸組織を摘出し、パイエル板を除去した後、縦に切開した腸管を PBS 中で洗浄し、腸管内容物を取り除いた。腸管組織を 10 mM EDTA/PBS 中で 37 °C、30 分処理し、上皮細胞をなるべく除去した。腸管組織を、collagenase D (400 U/ml)、DNase I (100 µg/ml)、ウシ胎児血清 (10%) を含む RPMI 1640 培地中で細切し、37 °C で 45 分間処理した。リンパ球が多く含まれる画分として 40%/80% Percoll 処理した界面の細胞を使用した。

#### 遅延型過敏反応の評価

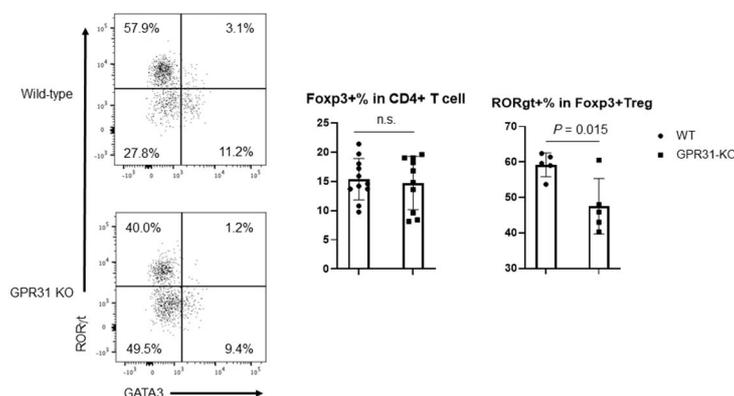
ピルビン酸ナトリウム (50 mM) 水溶液をマウスに経口免疫寛容誘導の 3 週間前から自由飲水させた。次いで、マウスに 10 mg オボアルブミン (OVA) を 2 日間、胃内投与して、経口免疫寛容を誘導した。1 週間後、300 µg の OVA とフロイント完全アジュバント (CFA) のエマルジョン (200 µl PBS/CFA) を尾根の背側部に皮下注射した。免疫の 2 週間後、右側の耳介には OVA/PBA (20 µl) を、左側の耳介には PBS を同量皮下注射し、その 48 時間後に左右の耳の厚さをマイクロメーターで測定した。耳の腫脹は、48 時間後の (右耳の厚さ - 左耳の厚さ) - 0 時間の (右耳の厚さ - 左耳の厚さ) で算出した。

### 4. 研究成果

まず、ピルビン酸・乳酸および GPR31 を介したシグナルが抗腫瘍免疫に与える影響を明らかにするため、野生型マウスおよび GPR31 欠損マウスの皮下に大腸癌細胞株 MC38 を接種し、経時的に腫瘍の大きさを評価したところ、GPR31 欠損マウスでは腫瘍の増大が抑制される傾向が認められた。すなわち、当初の予想に反し、GPR31 シグナルは免疫系を負に調節する可能性が

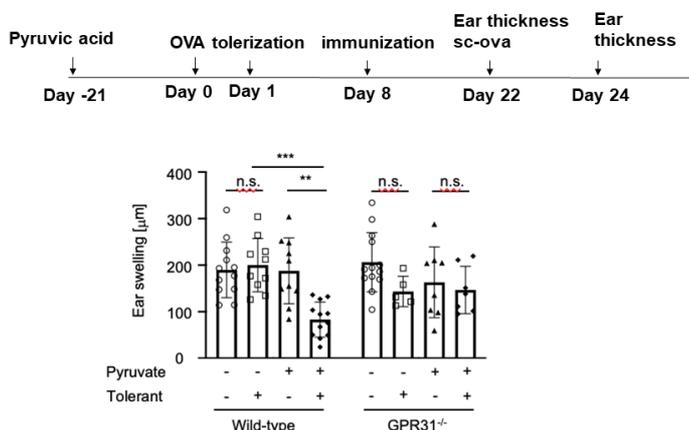
考えられた。

そこで、GPR31 シグナルが定常状態の腸管において免疫抑制的に作用し、腫瘍免疫に影響を与える可能性を考えて以下の実験を行った。まず、野生型および GPR31 欠損マウスに乳酸塩またはピルビン酸塩を 4 週間、自由飲水させ、小腸における CD4 T 細胞サブセットおよび IgA 産生細胞を解析したところ、乳酸塩、ピルビン酸塩の投与の有無にかかわらず、CD8<sup>+</sup>T 細胞、IL-17 産生 CD4 T 細胞 (Th17)、IFN $\gamma$  産生 CD4<sup>+</sup> T 細胞 (Th1)、Foxp3<sup>+</sup> CD4 T 細胞 (Treg)、IL-10 産生 CD4 T 細胞、IgA<sup>+</sup> B220-細胞の各集団に有意差は認められなかった。転写因子 ROR $\gamma$ t は Th17 や 3 型自然リンパ球 (ILC3) への分化誘導に必須であることが知られているが、近年、一部の Treg にも発現することが示された。Treg 特異的に ROR $\gamma$ t を欠損させたマウスを用いた実験から、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> Treg は 2 型免疫サイトカインである IL-4 や IL13 に依存的な潰瘍腸炎モデルとして知られるオキサゾロン誘導性腸炎に対して防御的に作用することや、経口免疫寛容の誘導に寄与することが報告されている。そこで、野生型マウスおよび GPR31 欠損マウスにおける ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> Treg を解析したところ、GPR31 欠損マウスで Treg の総数に変化は認められなかったが、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> Treg が有意に減少することが明らかになった (図 1)。ナイーブ T 細胞を野生型マウスおよび GPR31 欠損マウスに移入し、オボアルブミンをマウスに経口投与したところ、GPR31 欠損マウスではオボアルブミン特異的な ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> Treg 数が減少したことから、GPR31 シグナルは小腸における抗原特異的な ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> Treg の誘導を促進すると考えられた。



**図 1. GPR31 欠損マウスにおける ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> Treg の減少。**野生型マウスおよび GPR31 欠損マウス的小腸における Treg を解析した。ドットプロットは CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg を示す。

そこで、経口免疫寛容における GPR31 の役割を検討した。耳介腫脹を指標とした遅延型過敏反応 (DTH) の実験系でオボアルブミン (OVA) に対する経口免疫寛容を評価したところ、野生型マウスでは耳介腫脹が抑制されたのに対して、GPR31 欠損マウスでは耳介が腫脹し、経口免疫寛容が誘導されなかった。また、ピルビン酸をあらかじめ経口投与すると、GPR31 シグナル依存的に経口免疫寛容の増強が認められた (図 2)。



**図 2. ピルビン酸の経口投与による経口免疫寛容の増強。**ピルビン酸ナトリウム (50 mM) を、経口免疫寛容誘導 3 週間前から野生型マウスおよび GPR31 欠損マウスに自由飲水させた。OVA (10 mg/日、2 日間、tolerant) によって経口免疫寛容を誘導した後、耳介腫脹を指標にして遅延型過敏反応を解析した。

さらに、この時、GPR31 欠損マウスでは CX3CR1<sup>+</sup> 貪食細胞における IL-10 産生が低下したことから、CX3CR1<sup>+</sup> 貪食細胞特異的に IL-10 を欠損するマウス (Cx3cr1-cre × Il10-flox マウス) を

用いて経口免疫寛容を評価したところ、DTHにおける耳介腫脹が抑制されず、 $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$  Treg 数の減少が認められた。したがって、ピルビン酸 - GPR31 シグナルは小腸  $\text{CX3CR1}^+$ 細胞の IL-10 産生を誘導することで  $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$  Treg 数を誘導し、経口免疫寛容を誘導すると考えられた。したがって、ピルビン酸・乳酸 - GPR31 シグナルは、腸管恒常性維持に重要な役割を果たすと考えられる。

ピルビン酸・乳酸 - GPR31 シグナルの抗腫瘍免疫における詳細な役割については、今後のさらなる解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Qizhi Liu, Eiji Umemoto, Naoki Morita, Hisako Kayama, Yoshihiro Baba, Tomohiro Kurosaki, Ryu Okumura, Kiyoshi Takeda	4. 巻 in press
2. 論文標題 Pyruvate enhances oral tolerance via GPR31	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxac010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梅本英司
2. 発表標題 腸内細菌由来の代謝物ピルビン酸および乳酸は GPR31を介して小腸CX3CR1+貪食細胞の 樹状突起伸長を促進する
3. 学会等名 日本抗加齢医学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅本英司
2. 発表標題 腸内細菌由来の代謝物ピルビン酸、乳酸による腸管マクロファージの機能制御
3. 学会等名 日本リンパ学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------