

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08838

研究課題名(和文) G蛋白質共役型受容体を介した腸管脂溶性分子の認識による小腸貪食細胞の機能制御

研究課題名(英文) Recognition of bacterial metabolites by GPCR expressed on intestinal phagocytes

研究代表者

梅本 英司 (Umemoto, Eiji)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90452440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：小腸粘膜固有層の貪食細胞(CX3CR1陽性細胞)は上皮細胞間から管腔面に樹状突起を伸長することで管腔内の細菌等を取り込む。申請者らは腸内細菌が産生する代謝分子の乳酸およびピルビン酸がG蛋白質共役型受容体GPR31に結合し、小腸貪食細胞の樹状突起伸長を誘導することを明らかにした。実際、乳酸・ピルビン酸をマウスに経口投与すると、小腸貪食細胞はGPR31依存的に樹状突起を伸長し、乳酸・ピルビン酸-GPR31を介したシグナルはサルモネラ菌に対する免疫応答を亢進した。以上より、GPR31による乳酸・ピルビン酸の認識は小腸貪食細胞の樹状突起伸長および病原性細菌に対する免疫応答に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

数ある腸内細菌由来の代謝分子の中で、生理活性を有する分子の実体およびその生理的役割については不明な点が多い。特に腸管の免疫細胞が乳酸・ピルビン酸の受容体を持つことはこれまで知られておらず、乳酸・ピルビン酸がG蛋白質共役型受容体を介して腸管の免疫細胞に作用する仕組みを解明した本研究の成果は、腸内細菌と免疫細胞との相互作用を理解する上で重要だと考えられる。本研究により、乳酸やピルビン酸の摂取が病原性細菌に対する免疫応答を高める可能性が明らかになったことから、乳酸・ピルビン酸およびGPR31は免疫機能活性化の新たな標的として、今後、腸内細菌叢の改善や効果的な経口ワクチン開発への応用等が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Small intestinal mononuclear cells expressing CX3CR1 (CX3CR1+ cells) uptake luminal antigens by protruding their dendrites into the lumen. We showed that bacterial metabolites, pyruvic acid/lactic acid, induce dendrite protrusion via GPR31 in CX3CR1+ cells. Oral administration of lactate and pyruvate enhanced dendrite protrusion of CX3CR1+ cells in the small intestine of wild-type mice, but not GPR31-deficient mice. In addition, lactate/pyruvate-treated wild-type mice showed enhanced immune response and high resistance to intestinal Salmonella infection. These findings demonstrate that lactate and pyruvate, which are produced in the intestinal lumen in a bacteria-dependent manner, contribute to enhanced immune responses by inducing GPR31-mediated dendrite protrusion of intestinal CX3CR1+ cells.

研究分野：免疫生物学

キーワード：粘膜免疫 腸内細菌 生理活性分子 マクロファージ G蛋白質共役型受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 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、宿主の代謝作用と相まって多種多様な代謝産物を産生するが、腸内細菌が生み出す生理活性分子およびその役割については不明な点が多い。一方、小腸粘膜固有層には多くの免疫細胞が存在することが知られている。とりわけ CX3CR1⁺ 貪食細胞は腸管上皮細胞間から樹状突起を管腔面に伸ばす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。

申請者らは腸内細菌により産生される生理活性分子を探索するため、マウスの小腸内容物から有機画分を調製した。この画分を小腸 CX3CR1⁺ 貪食細胞に添加したところ、SPF マウス由来の有機画分を添加した群で、顕著な樹状突起の伸長が認められたが、無菌マウス由来の同画分では見られなかったことから、腸内細菌が産生する何らかの分子が小腸 CX3CR1⁺ 貪食細胞の樹状突起伸長を誘導すると考えられた。次に申請者らは遺伝子発現プロファイル解析から小腸 CX3CR1⁺ 貪食細胞に高発現する G タンパク質共役型受容体 GPR31 に着目した。GPR31 欠損マウスの小腸 CX3CR1⁺ 貪食細胞に小腸内容物由来の有機画分を添加したところ、樹状突起の伸長はほぼ完全に抑制された。したがって、小腸有機画分の中には GPR31 反応性分子が含まれ、この分子を介したシグナルが CX3CR1⁺ 貪食細胞の形態を制御する可能性が考えられたが、この GPR31 反応性分子は不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、マウス小腸内容物に含まれる GPR31 反応性分子を生理学的な手法を用いて明らかにすることを目的とする。また、その生理学的役割を明らかにするため、GPR31 反応性分子および GPR31 を介したシグナルが小腸 CX3CR1⁺ 貪食細胞の形態および細菌の取り込み能などに果たす役割を評価する。小腸 CX3CR1⁺ 貪食細胞は病原性細菌の排除に関与することから、GPR31 シグナルが病原性細菌感染時の免疫応答に果たす役割を解明し、GPR31 反応性分子が腸管免疫系を制御する新たな生理活性分子として機能する可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) GPR31 反応性分子の分離精製およびその同定

ドキシサイクリン添加により GPR31 の発現が誘導される HEK293T 細胞株を構築し、細胞内 cAMP の濃度上昇を指標に、GPR31 反応性分子の分離精製を進めた。小腸内容物を種々の有機溶媒で抽出したところ、メタノール可溶性画分に cAMP の上昇が認められた。この画分をメチル tert ブチルエーテル、メタノール、酢酸の混合物によりさらに分離した。さらにこの画分に含まれる GPR31 反応性分子を、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲル浸透クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィーにより、段階的に精製し、最終的に質量分析解析により、GPR31 反応性分子の分子量および構造式を決定した。

(2) CX3CR1⁺ 貪食細胞の樹状突起伸長の評価

In vitro での解析においては、*Cx3cr1*^{gfp/+} マウス小腸より調製した低密度細胞をフィブロネクチンでコートしたプレートに播種し、乳酸、ピルビン酸等を添加した後、4 時間後の樹状突起を顕微鏡下で自動的に解析した。*In vivo* 解析においては、乳酸ナトリウムまたはピルビン酸ナトリウムを経口投与したマウスから摘出した小腸組織を CellTracker Orange CMRA Dye にて染色した後、二光子顕微鏡を用いて絨毛の立体画像を取得した。

(3) ネズミチフス菌 (*Salmonella Typhimurium*) 感染実験

非侵襲性ネズミチフス菌 *invA* 欠損株をマウスに経口投与し、感染 5 日後に小腸組織を回収した。ホモジェナイズした組織を、ストレプトマイシンを含む LB プレートに播種して力価を測定した。また、乳酸ナトリウムおよびピルビン酸ナトリウム溶液 (100 mM) を飲水に加えて 3 週間マウスに投与した後、非病原性ネズミチフス菌 *S. Typhimurium* (*invA aroA* 欠損株) を経口投与した。加熱殺菌した *S. Typhimurium* を用いて、血清中のサルモネラ特異的 IgG 産生量を ELISA 法により測定した。非病原性ネズミチフス菌感染の 6 週間後、病原性ネズミチフス菌 (SL1344 株) を感染させ、マウスの生存率を経時的に評価した。

4. 研究成果

(1) GPR31 反応性分子の同定

小腸内容物に含まれる GPR31 反応性分子を種々の有機溶媒を用いて分離した後、生化学的に多段階の精製を行った。GPR31 に対する反応性が高い親水性相互作用クロマトグラフィー画分を質量分析法で解析したところ、この画分には $m/z = 89.023$ の分子が多く含まれることが明らかになり、目的分子は $C_3H_8O_3$ 、すなわち乳酸であると推測された。実際、乳酸および乳酸に構造がよく似たピルビン酸が選択的に GPR31 に結合することが明らかになった (図 1)。無菌マウスの小腸内容物では、SPF マウスに比べてこれら分子の産生量が低かったことから、小腸

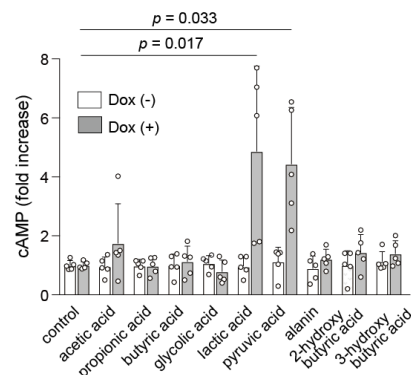


図 1 種々の分子に対するヒト GPR31 の反応性

管腔内における乳酸・ピルビン酸は腸内細菌依存的に産生されることが示唆された。

(2) 乳酸・ピルビン酸が小腸 CX3CR1⁺ 貪食細胞の樹状突起伸長に与える影響

単離した小腸 CX3CR1⁺ 貪食細胞に乳酸またはピルビン酸を添加したところ、*Cx3cr1^{gfp/+} Gpr31b^{+/+}* マウス由来の CX3CR1⁺ 貪食細胞では樹状突起の伸長が亢進したが、*Cx3cr1^{gfp/+} Gpr31b^{-/-}* マウスの CX3CR1⁺ 貪食細胞ではこれら分子の添加の有無にかかわらず、樹状突起伸長は僅かであった。また、乳酸またはピルビン酸を飲水に加えて3週間マウスに経口投与したところ、小腸 CX3CR1⁺ 貪食細胞は GPR31 シグナル依存的に樹状突起の伸長を亢進した(図2)。また、種々の乳酸菌株における乳酸およびピルビン酸の産生量を測定したところ、*Lactobacillus helveticus* が乳酸およびピルビン酸を高産生した。実際、*L. helveticus* を8日間、経口投与すると GPR31 依存的に小腸 CX3CR1⁺ 貪食細胞の樹状突起伸長が観察された。以上より、乳酸・ピルビン酸は GPR31 を介して CX3CR1⁺ 貪食細胞の樹状突起伸長を制御することが示された。

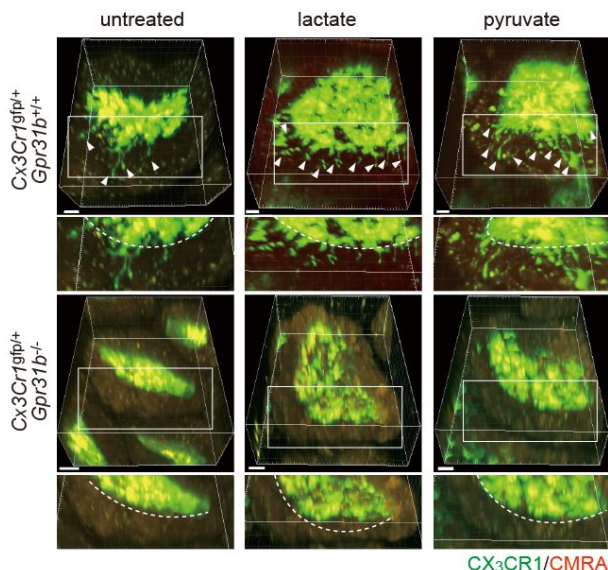


図2 乳酸・ピルビン酸の経口投与が小腸 CX3CR1⁺ 貪食細胞の樹状突起伸長に及ぼす影響

(3) 乳酸・ピルビン酸 - GPR31 シグナルの病原性細菌感染における影響

次に乳酸・ピルビン酸 - GPR31 シグナルの細菌感染防御における役割を解析した。乳酸またはピルビン酸を経口投与した野生型および *Gpr31b* 欠損マウスに非侵襲性ネズミチフス菌株を経口的に感染させ、5日後の小腸における細菌数を測定したところ、野生型マウスでは乳酸塩もしくはピルビン酸塩の投与により、ネズミチフス菌の菌数の増加が認められた。一方、*Gpr31b* 欠損マウスでは、乳酸塩・ピルビン酸塩非投与群におけるネズミチフス菌の菌数が野生型マウスよりも少なく、乳酸塩およびピルビン酸塩を投与しても菌数の増加は認められなかった。乳酸またはピルビン酸を3週間与えた後、非病原性ネズミチフス菌 *invA aroA* 欠損株を感染させ、血清中のネズミチフス菌特異的 IgG を経時的に測定したところ、野生型マウスでは乳酸およびピルビン酸の前投与により、ネズミチフス菌特異的な IgG 産生が亢進したのに対し、*Gpr31b* 欠損マウスでは乳酸およびピルビン酸を投与しても IgG 産生の増加は認められなかった。非病原性ネズミチフス菌株投与6週間後に病原性(野生型)ネズミチフス菌を投与したところ、野生型マウスでは乳酸塩・ピルビン酸塩の前投与により、生存率が増加したのに対し、*Gpr31b* 欠損マウスでは生存率が低く、乳酸塩やピルビン酸塩を投与しても生存率の上昇は見られなかった(図3)。以上より、乳酸・ピルビン酸 - GPR31 シグナルは小腸 CX3CR1⁺ 貪食細胞による病原性細菌の取り込みおよびその感染防御に重要な役割を果たすことが示された。

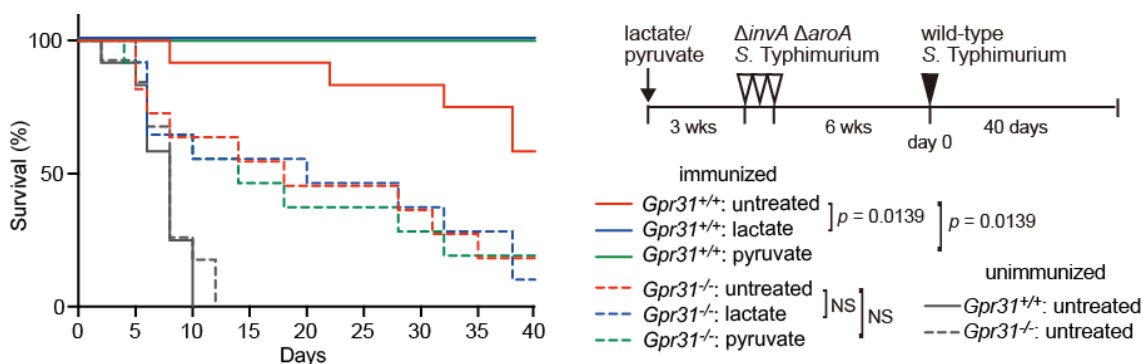


図3 乳酸・ピルビン酸-GPR31 シグナルが病原性細菌感染に及ぼす影響

病原性細菌に対して効率的に免疫を誘導することは社会的な課題であることから、今後、乳酸・ピルビン酸および GPR31 は免疫機能を活性化するための新たな標的として、効果的なワクチン開発などに応用できる可能性が考えられる。また、近年、腸内細菌叢のバランスを整えることにより健康を維持する動きが高まっているが、本研究は小腸における腸内細菌叢を整えることにより、腸管の病原性細菌に対する免疫機能を高めることができる可能性を示しており、日常生活

活への応用が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. *Morita N, *Umemoto E, Fujita S, Hayashi A, Kikuta J, Kimura I, Haneda T, Imai T, Inoue A, Mimuro H, Maeda Y, Kayama H, Okumura R, Aoki J, Okada N, Kida T, Ishii M, Nabeshima R, Takeda K. (*equal contribution). GPR31-dependent dendrite protrusion of intestinal CX3CR1⁺ cells by bacterial metabolites. *Nature*. 566:110-114. 2019. doi: 10.1038/s41586-019-0884-1. 査読有り
2. Takeda A, Miyasaka M, *Umemoto E. (*corresponding author). Two-Photon Imaging of T-Cell Motility in Lymph Nodes: In Vivo and Ex Vivo Approaches. *Methods Mol Biol*. 1763:43-52. 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-7762-8_5. 査読なし

〔その他〕

ホームページ等

ResOU: 腸内細菌がつくる乳酸・ピルビン酸により免疫が活性化される仕組みを解明

https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2019/20190124_1

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。