

研究課題名	腸内細菌由来の代謝物による経口免疫寛容誘導機構の解析
フリガナ	ウメモト エイジ
代表者名	梅本 英司
所属機関 (機関名) (役職名)	静岡県立大学薬学部・免疫微生物学 教授
本助成金による 発表論文, 学会発表	投稿準備中

## 研究結果要約

小腸粘膜固有層に存在する CX3CR1+貪食細胞は腸管上皮細胞間から樹状突起を伸長することで腸管管腔内の細菌を効率的に取り込む。申請者らは、これまでに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小腸 CX3CR1+貪食細胞上の G 蛋白質共役型受容体 GPR31 に作用することで、小腸 CX3CR1+貪食細胞の樹状突起伸長を誘導することを見出している。小腸 CX3CR1+貪食細胞は経口免疫寛容の成立に重要な役割を果たすことから、本研究課題では、ピルビン酸、乳酸が GPR31 を介して経口免疫寛容の誘導に寄与する可能性を検討した。

遅延型過敏反応 (DTH) を指標にした実験系で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 CX3CR1 欠損マウスと同様に耳介が腫脹し、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。小腸粘膜固有層における免疫細胞を解析したところ、GPR31 欠損マウスにおいて選択的に特定の制御性 T 細胞数集団が減少したことから、GPR31 を介したシグナルは小腸 Treg の分化を誘導する可能性が考えられた。以上のように、腸内細菌由来の代謝産物であるピルビン酸は GPR31 シグナルを介して、経口免疫寛容を誘導することが示唆された。現在、GPR31 欠損マウスで経口免疫寛容が誘導される分子メカニズムについてさらに解析を行っている。

## 研究目的

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およびその機能には不明な点が多い。一方、小腸粘膜固有層に存在するミエロイド系細胞サブセットのひとつ 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長することで管腔内の細菌を捕捉し、病原性細菌の排除を行う<sup>1)</sup>。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小腸 CX3CR1+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だした。ピルビン酸や乳酸をマウスに経口投与すると、GPR31 依存的に CX3CR1+貪食細胞における腸管管腔面への樹状突起伸長およびサルモネラ菌の取り込みが亢進するとともにサルモネラ菌に対する免疫応答および抵抗性が増強した<sup>2)</sup>。すなわち、ピルビン酸・乳酸-GPR31 シグナルは病原性細菌に対する免疫応答に重要な役割を果たすと考えられる。しかし、ピルビン酸・乳酸-GPR31 シグナルの定常状態における役割については不明である。小腸 CX3CR1+貪食細胞は経口免疫寛容の成立に重要な役割を果たすことから、本研究課題では、ピルビン酸、乳酸が GPR31 を介して経口免疫寛容の誘導に寄与する可能性を検討し、その分子機構を解明することを目的とする。

ピルビン酸および乳酸はもともと腸内に存在する分子であることから安全性が高く、臨床的に応用しやすいと考えられる。本研究課題による成果は、将来的にこれら腸内細菌由来の代謝産物による食物アレルギーの軽減に臨床応用できる可能性がある。

## 研究計画及び研究手法

経口免疫寛容の誘導を、遅延型過敏反応 (DTH) を指標にした実験系により評価する。野生型マウスおよび GPR31 欠損マウスに卵白アルブミンを経口投与して、経口免疫寛容を誘導した。1 週間後、OVA とフロイント完全アジュバント (CFA) のエマルジョン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 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測定した (図 1)。

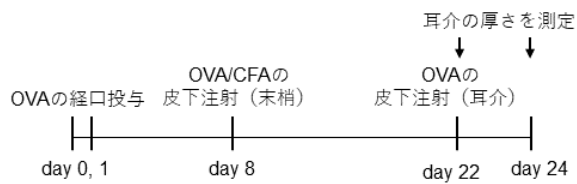


図 1. DTH の誘導スケジュール

DTH による耳介腫脹を指標にした実験系では、乳酸およびピルビン酸の投与による経口免疫寛容の増強作用を評価するのが難しいため、当初、経口抗原誘導性下痢モデルを用いた解析も計画していた。しかし、経口免疫寛容の誘導に用いた OVA の量を少なくして経口免疫寛容が僅かしか誘導されないよう実験条件を至適化することで、ピルビン酸投与による経口免疫寛容の増強作用を評価できるようにした。

また、GPR31 欠損マウスを用いて、小腸粘膜固有層における各白血球サブセットをフローサイトメトリーにより解析した。T 細胞サブセットの中でも制御性 T 細胞 (Treg) は経口免疫寛容の誘導に必須と報告されている<sup>3)</sup>。近年、Treg のなかでも転写因子 ROR $\gamma$ t を発現する細胞集団が食物アレルギーを抑制することが示されていることから<sup>4)</sup>、野生型マウスと GPR31 欠損マウス間で Treg 集団の比較を行った。

小腸粘膜固有層において GPR31 シグナル依存的に抗原特異的な Treg が誘導されるか検討するため、コンジェニック系統マウスを用いた実験を行った。そのため、まず OVA 特異的に反応する T 細胞受容体 (TCR) をもつ OT-II マウスと、CD45.1 マウスを交配して、OT-II CD45.1 マウスを作成した。次に、OT-II CD45.1 マウスから単離したナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を野生型マウスおよび GPR31 欠損マウス (これらは CD45.2 陽性である) に静脈投与したのち、OVA を経口的に投与した。ナイーブ T 細胞の移入 12 日後、小腸粘膜固有層において OVA 特異的に反応する TCR をもつ CD45.1<sup>+</sup> Treg の割合を解析した。

当初の計画では、乳酸およびピルビン酸を高産生する乳酸菌株を GPR31 欠損マウスに投与して DTH を評価する計画をしていたが、この点については今後の検討課題とする。

## 結果と考察

申請者らはこれまで GPR31 の発現が CX3CR1 シグナルにより誘導されることを見出している<sup>2)</sup>。CX3CR1 欠損マウスでは経口免疫寛容が誘導されないとの報告されていることから<sup>3)</sup>、GPR31 欠損マウスにおける抗原特異的な免疫寛容の成立を DTH の評価系を用いて検討した。図 2 に示すように、野生型マウスでは OVA の経口投与によって、耳介の腫脹が減少して免疫寛容が誘導されたのに対し、GPR31 欠損マウスでは、CX3CR1 欠損マウスと同様に、OVA を経口投与しても耳介が腫脹し、免疫寛容が誘導されなかった。

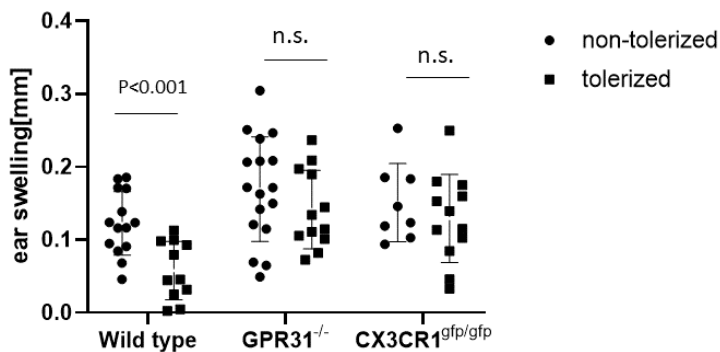


図 2. GPR31 欠損マウスにおける経口免疫寛容誘導の評価

ピルビン酸の GPR31 に対する親和性は乳酸の GPR31 に対する親和性より高いため、ピルビン酸を用いて GPR31 リガンドによる免疫寛容増強作用を検討した。免疫寛容の誘導に用いる OVA の濃度を下げた上で、ピルビン酸を 3 週間自由飲水させ、DTH による耳介腫脹を評価した。その結果、野生型マウスではピルビン酸投与により耳介腫脹が減少にしたのに対し、GPR31 欠損マウスでは耳介腫脹は認められなかった。すなわち、ピルビン酸の経口投与によって GPR31 依存的に免疫寛容の増強が誘導されたと考えられた。

次に野生型および 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。その結果、乳酸塩、ピルビン酸塩の投与の有無にかかわらず、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<sup>+</sup> 細胞の各集団に有意差は認められなかった (図)。

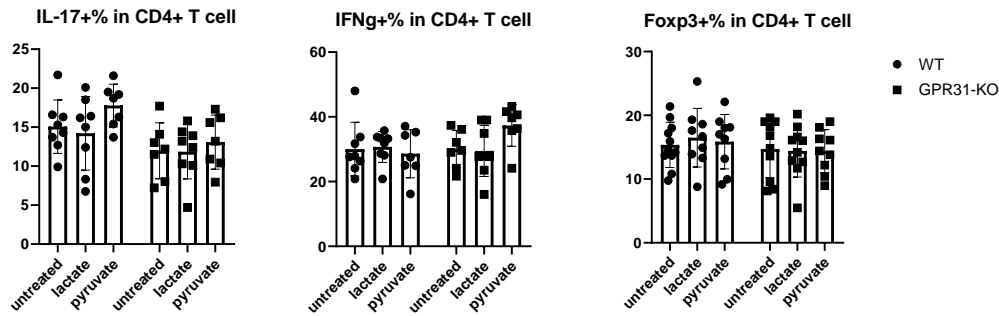


図 3. GPR31 欠損マウスにおける白血球サブセットの解析

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が報告されている<sup>5)</sup>。また、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> Treg は食物アレルギーの抑制に重要な役割を果たす<sup>4)</sup>。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 数に変化は認められなかったが、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> Treg が減少することが明らかになった (図 4)。

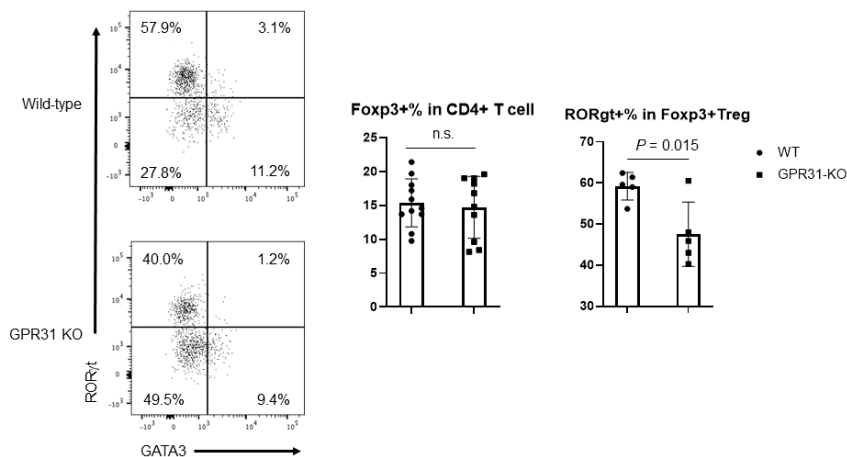


図 4. GPR31 欠損マウスにおける Treg 細胞集団の解析

そこで、GPR31 シグナルが RORgt<sup>+</sup> Treg の分化を誘導する可能性を検討した。OT-II CD45.1 マウスから単離したナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を野生型マウスおよび GPR31 欠損マウス(これらは CD45.2 陽性である)に静脈投与したのち、OVA を経口的に投与し、10 日後、OVA 特異的に反応する CD45.1+ Treg 細胞における RORgt の発現を解析した。その結果、野生型マウスに比べて GPR31 欠損マウスでは移入細胞における RORgt<sup>+</sup> Treg の減少が認められた。すなわち GPR31 を介したシグナルは RORgt<sup>+</sup> Treg の分化を促進することで、経口免疫寛容を誘導する可能性が考えられた。

以上のように、本研究課題において、ピルビン酸・乳酸は小腸 CX3CR1+ 貪食細胞上の GPR31 を介して経口免疫寛容の誘導を促進すること、また、GPR31 シグナルは小腸粘膜固有層における RORgt<sup>+</sup> Treg の分化を促進することが明らかになった。したがって、本研究課題は基本的に所期の結果を得ることができたと考えられる。その一方で、GPR31 シグナルがどのように RORgt<sup>+</sup> Treg の分化を誘導するかその分子機構は不明であり、今後解析を進める予定である。この点を明らかにしたうえで、速やかに論文を投稿することを目指している。

#### 今後の研究活動について

本研究により、GPR31 を介したシグナルは RORgt<sup>+</sup> Treg の分化を促進することで、経口免疫寛容を誘導する可能性が考えられたが、その分子機構については不明である。小腸 CX3CR1+ 貪食細胞は GPR31 シグナル依存的に上皮細胞間から樹状突起を伸長し、病原性細菌などの腸管管腔内の抗原を捕捉することから、定常状態では CX3CR1+ 貪食細胞は GPR31 シグナルを介して管腔内の食事抗原を捕捉し、抗原特異的な免疫応答を抑制する可能性が考えられる。申請者らはこれまで GPR31 の発現が CX3CR1 シグナルにより誘導されることを見出しているが、CX3CR1 の欠損により小腸貪食細胞における OVA の取り込みが低下するという文献<sup>6)</sup>と変化しないという文献<sup>3)</sup>があり、議論が分かれる。GPR31 欠損マウスの CX3CR1+ 貪食細胞における食餌取り込みは今後の注意深い解析が必要である。一方、小腸 CX3CR1+ 貪食細胞は IL-10 を高産生することが知られることから、GPR31 シグナルが CX3CR1+ 貪食細胞における IL-10 産生を促進し、この IL-10 が RORgt<sup>+</sup> Treg の分化誘

導に影響を与える可能性も考えられる。これらの点について検討を加え、ピルビン酸や乳酸が経口免疫寛容を増強する分子機構をさらに解明したいと考えている。

#### 参考文献

- 1) Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*. 2005 Jan 14;307(5707):254-8.
- 2) \*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<sup>+</sup> cells by bacterial metabolites. *Nature*. 2019 Feb;566(7742):110-114.
- 3) Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N, Müller W, Sparwasser T, Förster R, Pabst O. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity*. 2011 Feb 25;34(2):237-46.
- 4) Abdel-Gadir A, Stephen-Victor E, Gerber GK, Noval Rivas M, Wang S, Harb H, Wang L, Li N, Crestani E, Spielman S, Secor W, Biehl H, DiBenedetto N, Dong X, Umetsu DT, Bry L, Rachid R, Chatila TA. Microbiota therapy acts via a regulatory T cell MyD88/ROR $\gamma$ t pathway to suppress food allergy. *Nat Med*. 2019 Jul;25(7):1164-1174.
- 5) Ohnmacht C, Park JH, Cording S, Wing JB, Atarashi K, Obata Y, Gaboriau-Routhiau V, Marques R, Dulauroy S, Fedoseeva M, Busslinger M, Cerf-Bensussan N, Boneca IG, Voehringer D, Hase K, Honda K, Sakaguchi S, Eberl G. MUCOSAL IMMUNOLOGY. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> T cells. *Science*. 2015 Aug 28;349(6251):989-93.
- 6) Mazzini E, Massimiliano L, Penna G, Rescigno M. Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1<sup>+</sup> macrophages to CD103<sup>+</sup> dendritic cells. *Immunity*. 2014 Feb 20;40(2):248-61.

以上