

## 腸内細菌が作る乳酸・ピルビン酸による腸管免疫の活性化

森田 直樹<sup>1</sup>, 竹田 潔<sup>2</sup>

### 1. はじめに

我々の身体は約60兆程度の細胞で組織が構成されているが、腸管管腔中には1000兆を超える多種多様な細菌が腸内細菌叢を作り、我々と共生している。これまで腸内細菌は食事由来の食物繊維を分解することで、エネルギー源の一つである短鎖脂肪酸を産生し、宿主のエネルギーを補助的に供給することが主要な役割だと考えられてきた。しかしながら、近年の研究からこれら腸内細菌が作るさまざまな代謝産物が我々の生態恒常性維持に重要な役割を担うことが明らかとなり始めた。とりわけ腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸は、腸管における上皮細胞および免疫細胞が発現するG protein-coupled receptor (GPCR) に作用することで腸管免疫応答を制御することが広く知られている<sup>1)</sup>。上記のように腸内細菌由来の代謝産物は主として上皮細胞を含む腸管免疫細胞に作用することで、免疫細胞の正常な成熟とそれを介した腸管恒常性の維持に寄与することが示唆されている。我々は上記の短鎖脂肪酸に加えて、ピルビン酸および乳酸が腸管管腔中において*Lactobacillus*属菌により産生されることを明らかにした。加えて、*Lactobacillus*属菌由来のピルビン酸および乳酸が小腸貪食細胞特異的に高発現するGPCRの一つであるG protein-coupled receptor 31 (GPR31) に作用することで、病原性細菌に対する感染防御を誘導することを見いだした<sup>2)</sup>。本稿では、我々が明らかにした*Lactobacillus*属菌由来のピルビン酸および乳酸

を介した病原性細菌に対する感染防御機構を含め、これら腸内細菌由来代謝産物が制御する腸管恒常性の維持機構について紹介する。

### 2. 腸内細菌由来代謝産物を介した生体恒常性の維持機構

腸内細菌由来の代謝産物は、大きく分けて3種類の様式で我々の生体恒常性の維持に寄与することがこれまでに明らかとなっている(図1)。腸内細菌が食餌由来成分を原料に産生するインドール関連分子は、腸管上皮細胞およびリンパ球が主として発現する核内受容体の一種であるaryl hydrocarbon receptor (AhR) に認識されることで、細胞特異的な遺伝子発現を制御することが報告されている<sup>3)</sup>。AhRに加えて、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞の一つであるTh17細胞が発現する核内転写因子RAR-related orphan receptor gamma t (ROR $\gamma$ t) に対する新規アンタゴニストとして、腸内細菌依存的に産生される胆汁酸由来の代謝産物が近年明らかとなった<sup>4)</sup>。この他に腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸である酪酸は、ヒストン修飾酵素の一つであるhistone deacetylaseを介したエピジェネティクスな機構でFoxp3遺伝子発現を制御することで腸管におけるTreg細胞を誘導することが明らかになっている<sup>5)</sup>。上記2種類の作用の他に細胞膜受容体を介した生理活性作用も数多く報告されている。腸内細菌由来の代謝産物が作用する細胞膜受容体として多くのGPCRが同定されている。G protein-coupled receptor (GPR) 41, 43, 109aは短鎖脂肪酸の受容体として作用し、これらを発現する腸管上皮細胞および免疫細胞に作用することでTreg細胞の誘導を介して腸管恒常性の維持に寄与することが報告されている<sup>6,7)</sup>。また消化管における2型免疫応答誘導に関わることが明らかとなった上皮細胞の一種であるTuft細胞は、GPR91を高発現している。GPR91のリガンドはこれまでにコハク酸が同定されており、腸管管腔中細菌および原虫由来のコハク酸がTuft細胞の活性化に関わることが明らかとなっている<sup>8)</sup>。加えて近年の腸内細菌由来代謝産物およびそれらの受容体として働くGPCRに対する注目から、大規模なGPCR作用性の腸内細菌由来代謝産物スクリーニングが行われ、新規代謝産物の同定が進められている<sup>9)</sup>。

<sup>1</sup> 東京大学定量生命科学研究 免疫・感染制御研究分野 (〒113-0032 東京都文京区弥生1-1-1)

<sup>2</sup> 大阪大学大学院医学系研究科免疫制御学 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2)

#### Intestinal immune regulation by the commensal bacteria-derived lactic acid and pyruvic acid

Naoki Morita<sup>1</sup> and Kiyoshi Takeda<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Laboratory of Immunology and Infection Control, Institute for Quantitative Biosciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan, <sup>2</sup>Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

本論文の図版はモノクロ(冊子版)およびカラー(電子版)で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920231

© 2020 公益社団法人日本生化学会

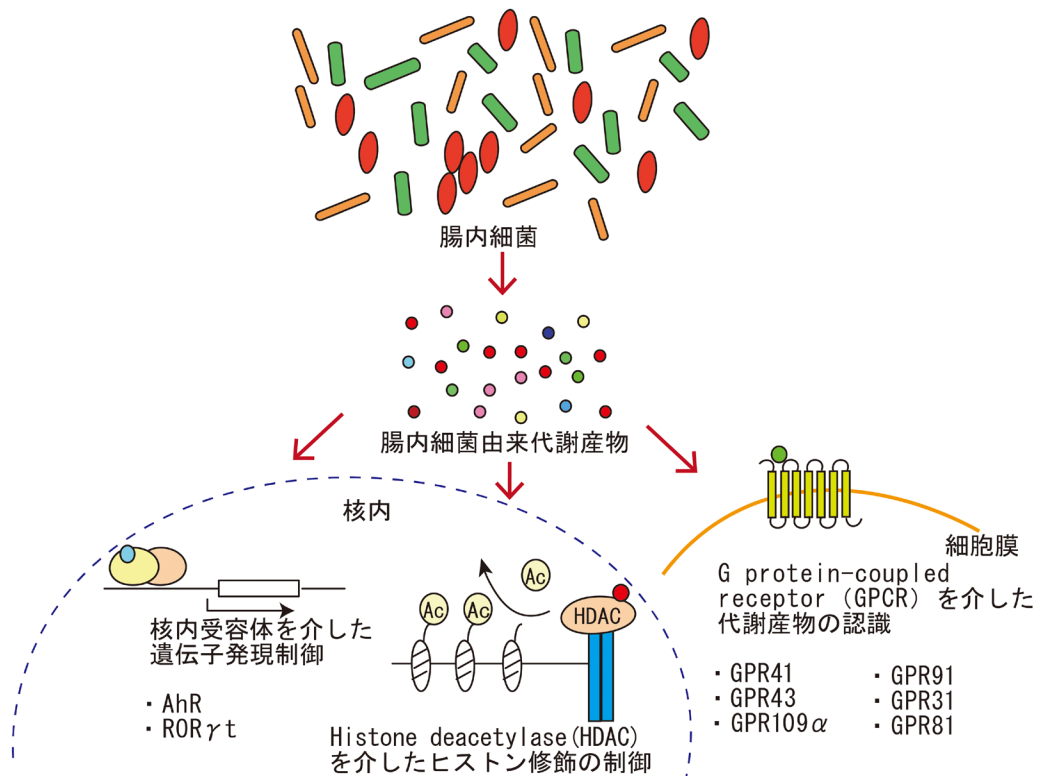


図1 腸内細菌由来代謝産物による主な作用機序

### 3. GPR31を介した腸内細菌由来ピルビン酸および乳酸の認識

我々は、新規の腸内細菌由来代謝の探索を行うために  $CX_3CR1^+$ 小腸貪食細胞に着目した。 $CX_3CR1^+$ 小腸貪食細胞はケモカイン受容体である  $CX_3CR1$  分子を細胞表面マーカーとして発現し、その多くが小腸上皮細胞の基底膜直下に位置している。 $CX_3CR1^+$ 小腸貪食細胞は他の小腸ミエロイド細胞集団とは異なり、樹状突起を上皮細胞間から小腸管腔中へ突出することで管腔中の細菌を捕捉するユニークな機能を持つことがこれまでに報告されている<sup>10)</sup>。しかしながら、 $CX_3CR1^+$ 小腸貪食細胞が樹状突起を伸長する詳細な分子メカニズムはこれまで不明であった。また  $CX_3CR1^+$ 小腸貪食細胞は腸内細菌依存的に樹状突起を管腔中へと伸長することが明らかになっているとともに、腸内細菌由来代謝産物が樹状突起伸長を制御することも我々の実験結果から示唆された。これらの知見から、 $CX_3CR1^+$ 小腸貪食細胞の発現するGPCRが腸内細菌由来代謝産物を認識することで樹状突起の伸長が制御されるのではないかと仮説を立てた。この仮説をもとに  $CX_3CR1^+$ 小腸貪食細胞に高発現するGPCRのスクリーニングを行ったところ、GPR31分子が本細胞に特異的に高発現することを見いだした。上記の結果を踏まえ、 $CX_3CR1^+$ 小腸貪食細胞が発現するGPR31が腸内細菌由来代謝産物を認識す

るのではないかと考え、腸内細菌由来のGPR31作用性分子の同定を試みた。GPR31発現誘導細胞株を樹立し、この細胞株と小腸管腔内容物からジエチルエーテルやクロロホルム、メタノールなどの有機溶媒を用いて抽出した代謝産物を共培養した。培養後、細胞内におけるGPCRのセカンドメッセンジャーであるcAMP濃度を定量することでGPR31に対する結合活性を評価した。結果、ジエチルエーテルおよびクロロホルム抽出画分に比較して、メタノール抽出画分においてcAMPの増加を伴うGPR31発現細胞の活性が確認された。このGPR31結合活性評価系を用いて、活性画分であるメタノール画分を他の有機溶媒であるメチル *tert*-ブチルエーテルを用いた抽出法や、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、親水性相互作用液体クロマトグラフィーを用いて段階的に精製を行った。最終的にGPR31結合活性を持つ画分の質量分析を行ったところ、本活性画分には多量の乳酸が含まれることが明らかになった。続いて乳酸に構造が近い分子のGPR31に対する反応性を評価したところ、乳酸およびピルビン酸がGPR31に対して反応性を持つことが明らかになった。乳酸の  $EC_{50}$  が  $\mu M$  オーダーであるのに対してピルビン酸の  $EC_{50}$  が  $nM$  オーダーであることから、乳酸に比較してピルビン酸がGPR31に対してより強いアフィニティーを持つことも明らかとなった。実際に小腸管腔内の乳酸およびピルビン酸が腸内細菌依存的に産生され

るかを無菌マウスおよびSPFマウスを用いて比較したところ、無菌マウスでは管腔中のピルビン酸および乳酸の濃度がSPFマウスに比較して有意に低下していた。これらの結果から、腸内細菌依存的に産生された乳酸およびピルビン酸がGPR31に作用することが明らかとなった。

#### 4. 乳酸およびピルビン酸を介した腸管恒常性の維持機構

続いて、腸内細菌由来の乳酸およびピルビン酸を認識するGPR31分子の生理的役割を解明するために*Gpr31*遺伝子欠損マウスの作製を行った。GPR31分子は腸管管腔中へと樹状突起を伸長するCX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>小腸貪食細胞に特異的に高発現していることから、GPR31分子がCX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>小腸貪食細胞の樹状突起伸長を制御することが示唆された。そこで、*Cx3cr1*遺伝子をGFPにより置換した*Cx3cr1<sup>gfp/+</sup>*マウスと*Gpr31*遺伝子欠損マウスを掛け合わせた*Cx3cr1<sup>gfp/+</sup>Gpr31*遺伝子欠損マウスを用いて、管腔中への樹状突起伸長を二光子顕微鏡にて評価した。野生型に比較して*Gpr31*遺伝子欠損マウスでは有意な樹状突起の伸長の低下が観察された。CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>小腸貪食細胞は管腔中への樹状突起伸長を介して管腔中の細菌を捕捉することで、それらの細菌に対する免疫応答を誘導することが示唆されている。そこで非侵襲性非病原性サルモネラを経口的に免疫し、サルモネラ特異的な抗体産生能を評価した。野生型のマウスに非侵襲性非病原性サルモネラを免疫した場合には血清中のサルモネラ特異的なIgG抗体の産生が認められたものの、*Gpr31*遺伝子欠損マウスでは有意なサルモネラ特異的なIgG抗体価の低下が認められた。この結果に相関して管腔中のサルモネラに対する捕捉能は、野生型に比較して*Gpr31*遺伝子欠損マウス由来のCX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>小腸貪食細胞では有意に低下していた。これらの結果から、GPR31分子はCX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>小腸貪食細胞において管腔中への樹状突起の伸長を制御すること、および樹状突起伸長を介した細菌の捕捉を介した免疫応答を制御することが示された。上記の結果を踏まえ、腸内細菌由来のGPR31反応性分子である乳酸およびピルビン酸をマウスに投与した際のCX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>小腸貪食細胞における樹状突起の誘導能および病原性細菌に対する免疫応答を評価した。我々は、野生型および*Gpr31*遺伝子欠損マウスに乳酸およびピルビン酸を経口的に4週間自由飲水させた後、これまで同様に管腔中への樹状突起伸長を二光子顕微鏡にて評価した。結果、野生型マウスに乳酸およびピルビン酸を経口的に投与した群では、非投与群に比較して有意な樹状突起の増加が観察された。一方で、*Gpr31*遺伝子欠損マウスに乳酸およびピルビン酸を経口的に投与した群では、非投与群に比較して有意な差は確認できなかった。これらの結果から、乳酸およびピルビン

酸はGPR31分子依存的にCX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>小腸貪食細胞における樹状突起の伸長を誘導することが確認された。加えて、乳酸およびピルビン酸の投与がGPR31分子依存的に管腔中細菌の捕捉を促進するかを評価した。上述した結果に相関して、野生型マウスに乳酸およびピルビン酸を経口的に投与した群では非投与群に比較して有意に管腔中細菌の捕捉を促進したが、*Gpr31*遺伝子欠損マウスに乳酸およびピルビン酸を経口的に投与した場合ではこれらの効果は確認できなかった。また野生型マウスへの乳酸およびピルビン酸の経口的投与は、非侵襲性非病原性サルモネラを経口的に免疫した際の血清中におけるサルモネラ特異的なIgG抗体価の有意な増加を認めた。一方で、*Gpr31*遺伝子欠損マウスでは乳酸およびピルビン酸投与による抗体価の増加は確認されなかった。これらの結果から、腸内細菌由来の乳酸およびピルビン酸は、GPR31分子を介してCX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>小腸貪食細胞における樹状突起の誘導および病原性細菌に対する免疫応答を誘導することで病原性細菌に対する感染防御に寄与することが明らかとなった。

#### 5. ピルビン酸および乳酸産生菌による腸管恒常性制御

上記の結果から腸内細菌が産生する乳酸およびピルビン酸が腸管感染防御において重要な役割を担うことを明らかとした。次に、どのような腸内細菌が腸管管腔中において乳酸およびピルビン酸の産生を担うのかを検討した。我々は異なる抗菌スペクトルを持つ抗生剤のゲンタマイシン、バンコマイシン、アンピシリン、ネオマイシンおよびメトロニダゾールをマウスに4週間飲水させた後、管腔中の乳酸およびピルビン酸の濃度を測定した。SPFマウスの管腔中における乳酸およびピルビン酸濃度に比較して、バンコマイシンまたはネオマイシンを経口投与した際に有意な乳酸およびピルビン酸の濃度低下が確認された。この結果に相関して、バンコマイシンおよびネオマイシンを投与したマウスにおいて、SPFマウスに比較して樹状突起伸長の顕著な低下を認めた。バンコマイシンまたはネオマイシンの投与は小腸管腔中における*Lactobacillus*属菌の割合を低下させることが報告されている。これに加えて乳酸を産生する主要な菌種として*Lactobacillus*属菌が広く知られている。そこで数種類の*Lactobacillus*属菌における乳酸およびピルビン酸の産生を検討したところ、*Lactobacillus helveticus*が乳酸およびピルビン酸の両分子を他の*Lactobacillus*属菌に比較して有意に産生していることが*in vitro*において認められた。またマウスに*Lactobacillus helveticus*を経口的に継続投与を行い、投与後の管腔中における乳酸およびピルビン酸の濃度を測定したところ、非投与群に比較して有意な管腔中における乳酸およびピルビン酸の濃度上昇を認めた。これらの結果から、腸管管腔中において*Lactoba-*

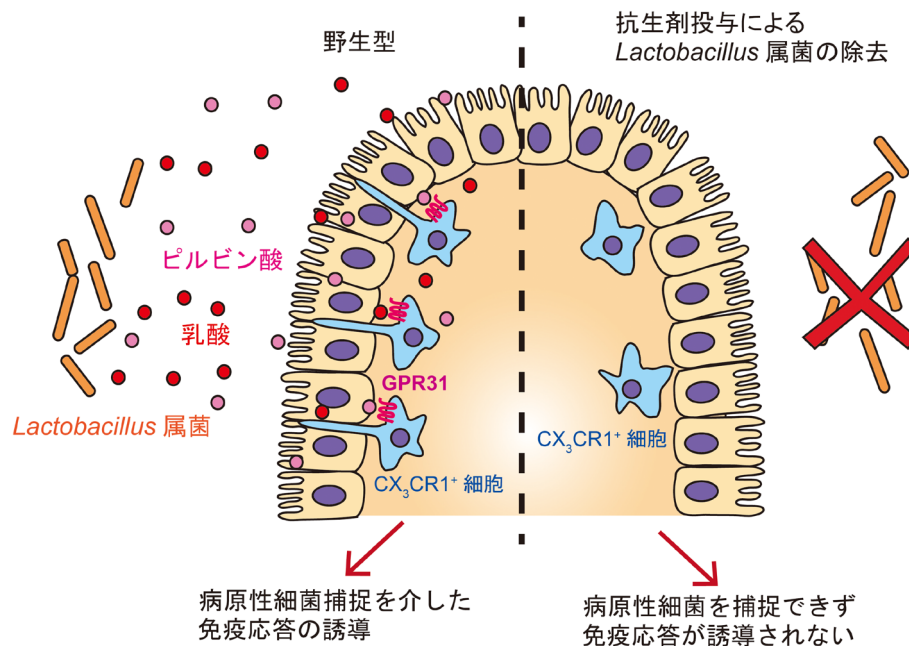


図2 *Lactobacillus* 属菌由来乳酸およびピルビン酸による感染防御機構

*cillus* 属菌が乳酸およびピルビン酸の産生に寄与していることが明らかとなった (図2)。

## 6. おわりに

我々は腸管において独自の機能を持つ  $CX_3CR1^+$  小腸貪食細胞に着目することで、本細胞が高発現する GPR31 分子が腸内細菌由来の代謝産物である乳酸およびピルビン酸を認識することを明らかにした。また、乳酸およびピルビン酸を介した GPR31 シグナルは、 $CX_3CR1^+$  小腸貪食細胞の管腔中への樹状突起の伸長および管腔中の病原性細菌の捕捉を介した免疫応答を制御することが明らかとなった。さらに、管腔中の乳酸およびピルビン酸は *Lactobacillus* 属菌によって産生されることが示された。これまでの研究で、乳酸を産生する *Lactobacillus* 属菌は、腸管ミエロイド細胞を介して TLR2 依存的にパイエル板における IgA 産生を誘導することが明らかになっている<sup>11)</sup>。IgA 産生以外にも、*Lactobacillus* 属菌の一種である *Lactobacillus murinus* は、腸管ミエロイド細胞における IL-10 および TGF- $\beta$  の産生制御を介して Treg 細胞を誘導することが報告されている<sup>12)</sup>。加えて、*Lactobacillus* 属菌が産生する乳酸が GPR81 に作用することで腸管上皮幹細胞の増殖を誘導することが報告されている。実際に放射線照射による腸管上皮細胞障害モデルによる実験では、GPR81 欠損マウスにおける腸管上皮幹細胞の有意な増殖低下、および乳酸の経口投与による GPR81 依存的な腸管上皮幹細胞の増殖の誘導が観察されている<sup>13)</sup>。これらの報告から、*Lactobacillus* 属菌およ

び *Lactobacillus* 属菌が産生する乳酸は、腸管組織において上皮細胞を含む種々の免疫細胞に作用することで腸管恒常性を維持することが示唆される。また、腸内細菌が産生するピルビン酸による腸管恒常性制御機構に関する知見は非常に限られており、今後の新たな解析が期待される。

## 文 献

- 1) Rooks, M.G. & Garrett, W.S. (2016) Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, **16**, 341–352.
- 2) Morita, N., Umemoto, E., Fujita, S., Hayashi, A., Kikuta, J., Kimura, I., Haneda, T., Imai, T., Inoue, A., Mimuro, H., et al. (2019) GPR31-dependent dendrite protrusion of intestinal  $CX_3CR1^+$  cells by bacterial metabolites. *Nature*, **566**, 110–114.
- 3) Lamas, B., Natividad, J.M., & Sokol, H. (2018) Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. *Mucosal Immunol.*, **11**, 1024–1038.
- 4) Hang, S., Paik, D., Yao, L., Kim, E., Jamma, T., Lu, J., Ha, S., Nelson, B.N., Kelly, S.P., Wu, L., et al. (2019) Bile acid metabolites control TH17 and Treg cell differentiation. *Nature*, **576**, 143–148.
- 5) Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., et al. (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, **504**, 446–450.
- 6) Sun, M., Wu, W., Liu, Z., & Cong, Y. (2017) Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J. Gastroenterol.*, **52**, 1–8.
- 7) Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., Thangaraju, M., Prasad, P.D., Manicassamy, S., Munn, D.H., et al. (2014) Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation

- and carcinogenesis. *Immunity*, **40**, 128–139.
- 8) Nadsjombati, M.S., McGinty, J.W., Lyons-Cohen, M.R., Jaffe, J.B., DiPeso, L., Schneider, C., Miller, C.N., Pollack, J.L., Nagana Gowda, G.A., Fontana, M.F., et al. (2018) Detection of succinate by intestinal tuft cells triggers a Type 2 innate immune circuit. *Immunity*, **49**, 33–41.e7.
  - 9) Cohen, L.J., Esterhazy, D., Kim, S.H., Lemetre, C., Aguilar, R.R., Gordon, E.A., Pickard, A.J., Cross, J.R., Emiliano, A.B., Han, S.M., et al. (2017) Commensal bacteria make GPCR ligands that mimic human signalling molecules. *Nature*, **549**, 48–53.
  - 10) Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B.A., Vyas, J.M., Boes, M., Ploegh, H.L., Fox, J.G., et al. (2005) CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, **307**, 254–258.
  - 11) Kotani, Y., Kunisawa, J., Suzuki, Y., Sato, I., Saito, T., Toba, M., Kohda, N., & Kiyono, H. (2014) Role of *Lactobacillus pentosus* Strain b240 and the Toll-like receptor 2 axis in Peyer's patch dendritic cell-mediated immunoglobulin A enhancement. *PLoS One*, **9**, e91857.
  - 12) Tang, C., Kamiya, T., Liu, Y., Kadoki, M., Kakuta, S., Oshima, K., Hattori, M., Takeshita, K., Kanai, T., Saijo, S., et al. (2015) Inhibition of Dectin-1 signaling ameliorates colitis by inducing lactobacillus-mediated regulatory T cell expansion in the intestine. *Cell Host Microbe*, **18**, 183–197.
  - 13) Lee, Y.S., Kim, T.Y., Kim, Y., Lee, S.H., Kim, S., Kang, S.W., Yang, J.Y., Baek, I.J., Sung, Y.H., Park, Y.Y., et al. (2018) Microbiota-derived lactate accelerates intestinal stem-cell-mediated epithelial development. *Cell Host Microbe*, **24**, 833–846.e6.

### 著者寸描

#### ●森田 直樹 (もりた なおき)

東京大学定量生命科学研究所免疫・感染制御研究分野助教。医学博士。

■略歴 2014年大阪大谷大学薬学部卒業。14年大阪大学大学院医学系研究科博士課程に進学。免疫制御学講座にて学位取得後、19年4月より現職。

■研究テーマと抱負 腸内細菌がどのようにして宿主の恒常性維持に寄与しているのか、また宿主はどのようにして正常な腸内細菌叢を維持しているのか、それら双方向性のバランス調節機構を分子レベルで明らかにしたい。

■ウェブサイト <http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/shinkuralab/>

■趣味 読書・美術鑑賞。