The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	GPR31-dependent dendrite protrusion of intestinal CX3CR1+ cells by bacterial metabolites
Author(s)	森田, 直樹
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72489
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　森田 直樹

		（職）	氏　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	竹田 潔
	副　査	大阪大学教授	山崎 晋
	副　査	大阪大学教授	熊ノ郷 淳

論文審査の結果の要旨

小腸の自然免疫細胞である CX_3CR1^+細胞は腸管上皮細胞間から樹状突起を伸ばして管腔内の細菌を捕捉することで、取り込んだ細菌に対する免疫反応を誘導するが、その詳細な分子メカニズムは不明であった。学位申請者は小腸の CX_3CR1^+細胞が樹状突起を伸ばす仕組みを解析するため、マウス小腸の内容物から得た抽出物を分離、精製したところ、乳酸およびピルビン酸が CX_3CR1^+細胞の樹状突起を伸ばす作用をもつことが明らかにした。また、これらの分子が小腸 CX_3CR1^+細胞にどのように認識されるか解析したところ、乳酸およびピルビン酸は G タンパク質共役型受容体のひとつである GPR31 を活性化することを明らかにした。乳酸やピルビン酸をマウスに投与した後に、病原性細菌であるサルモネラ菌に感染させたところ、小腸 CX_3CR1^+細胞によるサルモネラ菌の取り込みが増加し、サルモネラ菌に対する免疫応答およびサルモネラ菌に対する抵抗性が GPR31 依存的に増加した。これらの研究成果は学位申請者が博士（医学）の学位授与に価すると認める。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	森田　直樹
論文題名 Title	GPR31-dependent dendrite protrusion of intestinal CX3CR1^{+} cells by bacterial metabolites （腸内細菌由来代謝産物による小腸CX3CR1^{+}細胞におけるGPR31依存的な樹状突起の伸長）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

小腸においてCX_3CR1を発現するミエロイド系細胞（以下CX_3CR1^{+}細胞）はケモカイン受容体CX_3CR1依存的に樹状突起を小腸管腔へ伸ばすことにより、小腸管腔内の食事由来抗原や腸内細菌を捕捉することが報告されている。しかし、CX_3CR1のリガンドであるCX_3CL1の発現は小腸上皮細胞基底膜に限局しており、小腸上皮細胞基底膜を越えて樹状突起を小腸管腔へと伸長する詳細な分子メカニズムは不明であった。抗生剤を経口投与し、腸内細菌を除去したマウスでは樹状突起の伸長が有意に抑制されることから、私たちは腸内細菌由来のシグナルがCX_3CR1^{+}細胞における樹状突起の伸長を制御するのではないかと仮説を立て、このメカニズムの解明を試みた。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

まずSPFマウス由来の小腸由来内容物に含まれる代謝産物の抽出を種々の有機溶媒にて行った。*in vitro*において抽出した画分と$CX_3CR1^{gfp/+}$マウス由来の小腸細胞とを共培養することで、小腸CX_3CR1^{+}細胞が樹状突起を誘導する画分を同定した。無菌マウスの小腸由来内容物を用いて抽出した画分ではCX_3CR1^{+}細胞において樹状突起が誘導されないことから、腸内細菌由来の分子が小腸CX_3CR1^{+}細胞における樹状突起の伸長を制御することが示された。小腸CX_3CR1^{+}細胞に作用する腸内細菌由来分子の受容体を明らかにするために、腸内細菌が産生する代謝産物の受容体として知られるGタンパク共役型受容体(GPCR)に注目した。小腸CX_3CR1^{+}細胞に発現するGPCRのスクリーニングを行ったところ、G-protein coupled receptor 31(GPR31)が小腸CX_3CR1^{+}細胞に特異的に高発現することを見出した。このGPR31が小腸CX_3CR1^{+}細胞における樹状突起伸長に関わるかを明らかにするために、*Gpr31b*遺伝子欠損マウスを作成した。*in vivo*において*Gpr31*遺伝子欠損マウスは野生型と比較して有意に小腸における樹状突起の伸長が低下していた。また*in vitro*においても抽出した画分と*Gpr31b*遺伝子欠損マウス由来の小腸CX_3CR1^{+}細胞を共培養しても、CX_3CR1^{+}細胞における樹状突起は誘導されなかった。これらの結果から腸内細菌が産生する分子がGPR31に認識されることで、CX_3CR1^{+}細胞において樹状突起の伸長が誘導されることを明らかにした。次に腸内細菌によって産生されるGPR31の反応性分子の同定を試みた。有機溶媒を用いて抽出した画分を種々の生化学的手法により分離、精製した。最終的に精製画分に含まれる分子を質量分析法にて同定した。質量分析法によって最終精製画分に多量の乳酸が含まれることが明らかになった。乳酸または乳酸と類似する構造式を持つ分子のGPR31に対する結合活性を評価したところ、乳酸とピルビン酸がGPR31に対する反応性を持つことが明らかになった。実際に乳酸とピルビン酸が腸内細菌依存的に産生されるかを調べたところ、小腸内容物において野生型マウスに比較して無菌マウスでは有意にD/L乳酸またはピルビン酸の濃度が低下していた。これらの結果から、腸内細菌依存的に産生される乳酸またはピルビン酸が小腸CX_3CR1^{+}細胞が発現するGPR31に作用することで樹状突起の伸長を誘導することが示唆された。実際に乳酸またはピルビン酸を野生型マウスに経口投与するとGPR31依存的に小腸CX_3CR1^{+}細胞における樹状突起の伸長が亢進された。乳酸またはピルビン酸を経口投与した後、非侵襲性非病原性のネズミチフス菌で経口的に免疫したマウスでは、乳酸またはピルビン酸非投与群に比較して有意にネズミチフス菌に対する血清中のIgG抗体の産生がGPR31依存的に亢進していた。加えて野生型マウスにおいて非侵襲性非病原性のネズミチフス菌で免疫した後、侵襲性ネズミチフス菌感染後の生存率も非投与群に比較して乳酸またはピルビン酸を経口投与したマウスでは感染抵抗性が亢進していた。これらのネズミチフス菌に対する感染抵抗性の亢進は*Gpr31b*遺伝子ノックアウトマウスに乳酸またはピルビン酸を経口投与しても確認されなかった。これらの結果から腸内細菌によって産生される乳酸またはピルビン酸がGPR31に作用することで小腸CX_3CR1^{+}細胞における樹状突起伸長を介した腸管免疫制御機構が明らかになった。

〔総　括(Conclusion)〕

小腸CX_3CR1^{+}細胞に高発現するGタンパク共役型受容体の一つであるGPR31は腸内細菌依存的に産生される乳酸またはピルビン酸の受容体として働き、小腸CX_3CR1^{+}細胞の樹状突起の伸長を誘導することで、感染時において腸管免疫機能を亢進することが明らかとなった。