

腸内細菌由来代謝分子を介した腸管血管バリア機能制御

静岡県立大学 薬学部 免疫微生物学教室
梅本 英司

研究目的

腸管に多数存在する腸内細菌は宿主（ヒト）の恒常性維持に重要な役割を果たすが、腸内細菌が宿主に及ぼす影響については不明な点が多い。一方、腸管組織には腸内細菌や食物などの様々な外来抗原の侵入を防ぐためのバリア機能が発達している。近年、粘液や腸管上皮細胞によるバリア機能と異なり、抗原の血液への侵入を防ぐ腸管血管関門（GVB: Gut-Vascular Barrier）の存在が新たに提唱された（Spadoni I. et al. *Science*, 350, 830-834, 2015）。GVBの破綻は、腸内細菌や腸上皮がん細胞の血管を介した全身への移行を誘発し、非アルコール性脂肪肝炎、大腸がんの肝転移といった病態の悪化に関わるとの報告がある（Brescia P. et al. *Trends Mol Med.* 27, 844-855, 2021）。腸内細菌は腸管上皮細胞に発現する組織因子を機能修飾し、アンジオポエチン1の産生を促進することで、血管構築を促進することが報告されているものの（Reinhardt C. et al. *Nature* 483: 627-631, 2012）、常在性腸内細菌が血管バリア機能を制御する機構については不明な点が多い。

小腸粘膜固有層に存在するCX3CR1⁺マクロファージは上皮細胞間から樹状突起を管腔面に伸長して管腔内抗原を捕捉する。我々は腸内細菌の代謝産物であるピルビン酸および乳酸がCX3CR1⁺マクロファージ上のGタンパク質共役型受容体GPR31に作用することを見出した。GPR31は小腸CX3CR1⁺マクロファージに選択的に発現し、GPR31シグナルはマクロファージの管腔面への樹状突起伸長を誘導することで病原性細菌の捕捉を促進する。実際、ピルビン酸・乳酸を経口投与すると、GPR31依存的にCX3CR1⁺マクロファージによる腸管管腔面への樹状突起伸長が促進し、サルモネラ菌に対する免疫応答および抵抗性が増強する（*Morita N, *Umamoto E. et al. *equal contribution, *Nature*, 566: 110-114, 2019）。また、定常状態では、小腸CX3CR1⁺マクロファージは経口免疫寛容の維持に重要であることから、経口免疫寛容におけるGPR31の役割を検討したところ、ピルビン酸の経口投与によりGPR31シグナル依存的に経口免疫寛容の増強が認められた。経口免疫寛容の維持過程において、GPR31シグナルはCX3CR1⁺マクロファージによるIL-10産生を増強することでROR γ ⁺制御性T細胞を誘導した（Liu Q, Umamoto E. et al. *Int. Immunol.* 34: 343-352, 2022）。すなわち、ピルビン酸・乳酸-GPR31シグナルは、小腸マクロマージにおける新たな制御機構として腸管免疫系に重要な役割を果たすと考えられる。

CX3CR1⁺マクロファージは粘膜固有層内でも樹状突起を伸長し、血管と接触していたことから、我々はGPR31シグナルが小腸CX3CR1⁺マクロファージの樹状突起伸長を誘導することでCX3CR1⁺マクロファージの血管への接着を増加させ、CX3CR1⁺マクロファージによる血管バリア機能維持を増強する可能性を考えた。本研究では、CX3CR1⁺マクロファージと血管構成細胞（血管内皮細胞および血管周皮細胞）との相互作用に注目し、ピルビン酸-GPR31シグナルの血管バリア機能における役割を解明することを目的とする。

研究結果

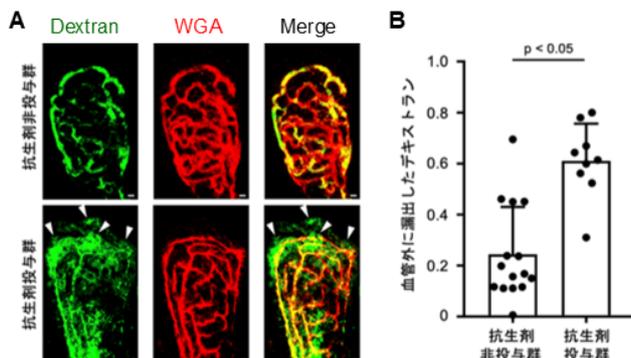


図1. 抗生剤投与マウスの小腸における血管透過性

抗生剤を4週間自由飲水させたマウスにFITC標識デキストラン（緑）とAlexa Fluor 594標識WGA（赤）の混合液を静脈内投与し、30分後、小腸を摘出して共焦点顕微鏡で観察した（A）。得られた画像から、以下の式（血管外に漏出したデキストランの割合）=（FITC陽性領域の面積）-（FITC, Alexa Fluor 594両陽性領域の面積）/（FITC陽性領域の面積）により、血管外に漏出したデキストラン量を評価した（B）。

我々はまず抗生剤投与マウスにおける小腸血管透過性を評価した。4週間、マウスに抗生剤を経口投与した上でFITC標識dextran（150 kDa）を静脈投与し、30分後に血管から漏出したFITC-dextranを評価したところ、抗生剤投与マウスでは、血管外に漏出したdextranが顕著に認められたことから、腸内細菌は血管バリア機能を増強させることが示唆された（図1）。

次にGPR31欠損マウスの小腸において、血管外に漏出するdextranを画像解析により評価したところ、有意な増加が見られた（図2A, B）。さらに、GPR31欠損マウスに

FITC-dextranを投与した後、30分後の門脈血を回収し、蛍光強度を測定したところ、GPR31欠損マウスではデキストラン量の低下が認められた(図2C)。一方、GPR31欠損マウスの大腸では、血管透過性の亢進は認められなかった(図3)。したがって、GPR31シグナルは小腸選択的に血管バリア機能を亢進させることが示唆された。

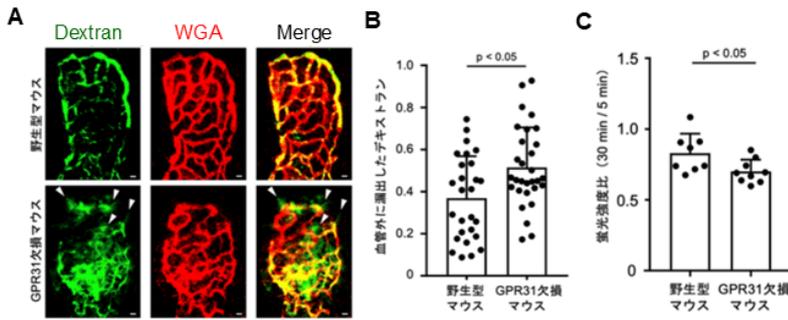


図2. GPR31欠損マウスの小腸における血管透過性

(A, B) 野生型マウスおよびGPR31欠損マウスに FITC 標識デキストラン (緑) と Alexa Fluor 594 標識 WGA (赤) の混合液を静脈内投与し、30 分後、小腸を摘出して共焦点顕微鏡で観察し、得られた画像から血管外に漏出したデキストラン量を評価した。(C) 野生型マウスおよびGPR31欠損マウスに FITC 標識デキストランを静脈投与した。投与後30分後の門脈血を回収し、蛍光強度を測定した。

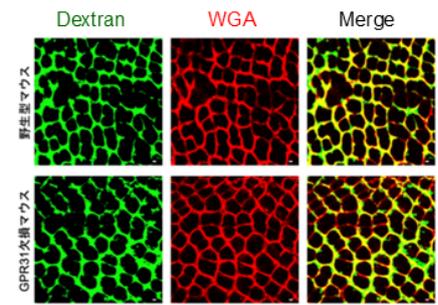


図3. GPR31欠損マウスの大腸における血管透過性

野生型マウスおよびGPR31欠損マウスに FITC 標識デキストラン (緑) と Alexa Fluor 594 標識 WGA (赤) の混合液を静脈内投与し、30 分後、大腸を摘出して共焦点顕微鏡で観察した。

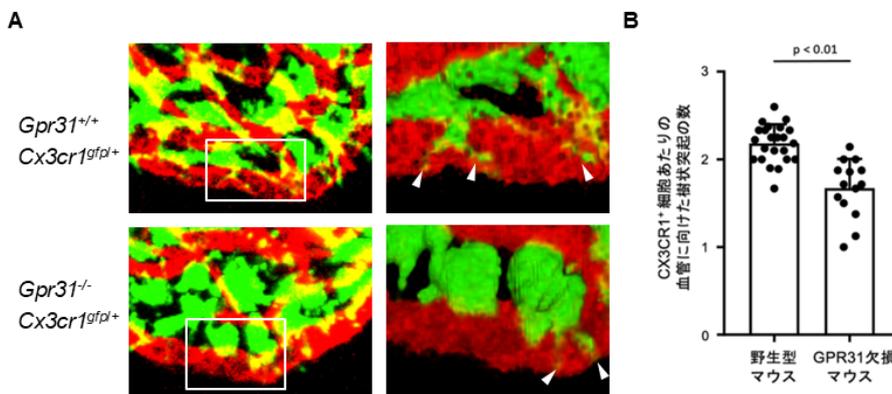


図4. GPR31欠損CX3CR1⁺マクロファージの小腸血管への樹状突起伸長

Gpr31^{+/+} *Cx3cr1*^{gfp/+} マウスおよび *Gpr31*^{-/-} *Cx3cr1*^{gfp/+} マウスに Alexa Fluor 594 標識 WGA (赤) を静脈内投与し、小腸血管近傍のマクロファージ (緑) を共焦点顕微鏡で観察した。右の画像は左枠内の領域を拡大し、surface rendering法を用いて表した (A)。得られた画像から、CX3CR1⁺マクロファージ1細胞あたりの血管外周に接触する樹状突起数を算出した (B)。

次に、血管とCX3CR1⁺マクロファージの相互作用を組織学的に解析した。GPR31^{+/+} CX3CR1^{gfp/+} マウスおよび GPR31^{-/-} CX3CR1^{gfp/+} マウスに Alexa Fluor 594-WGA を静脈投与し、CX3CR1⁺マクロファージと血管の相互作用を観察したところ、野生型マウスのCX3CR1⁺マクロファージでは発達した樹状突起伸長が認められた。これらの樹状突起の多くは血管と接触していたのに対し、GPR31欠損マウスでは、小腸血管への樹状突起伸長が減少したことから(図4)、GPR31シグナルはマ

クロファージの血管における接着面積を増加させると考えられた。

GPR31欠損マウス的小腸血管における物質透過性上昇を誘導する分子機構として、血管内皮細胞上の細胞表面分子PV-1/PLVAPに着目した。PV-1はカベオラや血管内皮小孔で分子ふるいとして機能することが知られ、バリア血管では分子の透過性を亢進させることが知られる(Deezer L et al. *Cell and Tissue Research*, 392: 393-412, 2023, Review)。また、PV-1は細菌感染に伴う小腸の血管バリア機能損傷時に発現上昇することが示されている(Spadoni I et al. *Science*, 350: 830-834, 2015)。野生型マウスおよびGPR31欠損マウス的小腸血管内皮細胞におけるPV-1の発現をフローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡で解析したところ、いずれの手法においてもGPR31欠損マウスではPV-1の発現亢進が認められた(図5)。すなわち、CX3CR1⁺マクロファージはGPR31依存的に、血管内皮細胞上のPV-1の発現を負に制御することで、血管透過性を亢進させる可能性がある。

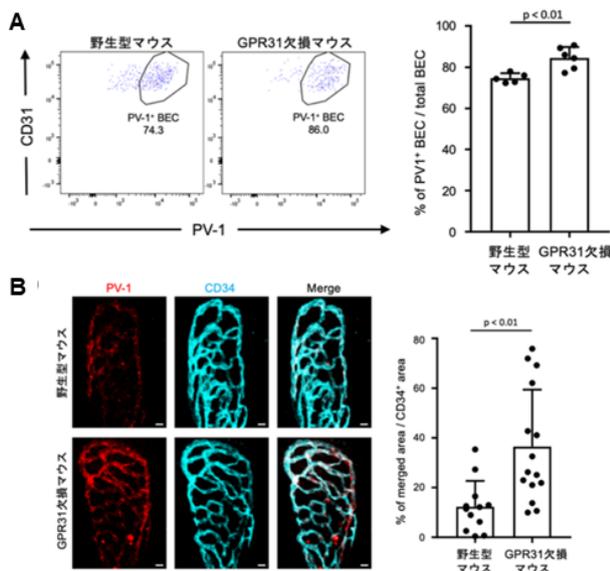


図5. GPR31欠損マウス的小腸血管におけるPV-1の発現

(A) 野生型マウスおよびGPR31欠損マウス的小腸血管内皮細胞(CD45⁺ gp-38⁺ CD31⁺ CD146⁺細胞)におけるPV-1の発現を、フローサイトメトリーを用いて解析した。BEC: blood endothelial cells。(B) 小腸血管上のPV-1発現を免疫組織学的に解析した。CD34陽性領域の面積に占めるPV-1陽性領域の面積をグラフに示した。

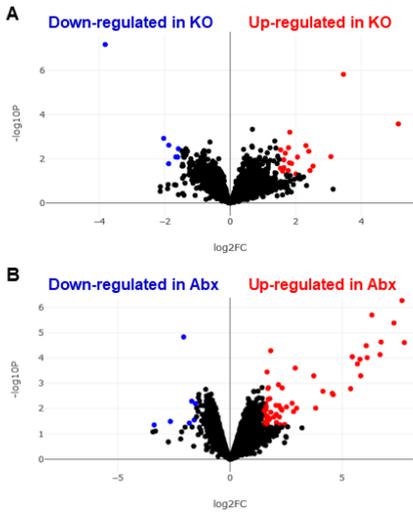


図6. GPR31欠損マウスおよび抗生剤投与マウスの小腸血管内皮細胞における遺伝子発現解析
野生型マウス、GPR31欠損マウス、抗生剤投与マウスの小腸血管内皮細胞をソーティングし、RNA-シークエンス解析を行った。(A) 野生型マウスとGPR31欠損マウスの比較。(B) 抗生剤非投与マウスと抗生剤投与マウスの比較。

次に野生型マウス、GPR31欠損マウス、抗生剤投与マウスから血管内皮細胞およびペリサイト(血管周皮細胞)を単離し、RNA-seq解析を行った。その結果、特にペリサイトにおいて、GPR31欠損および抗生剤投与による遺伝子変動が大きく認められた(図6, 図7)。GPR31欠損マウスのペリサイトで発現低下した遺伝子のパスウェイ解析を行ったところ、ECM (Extracellular matrix) interactionやprotein digestion and absorptionに関連する遺伝子が多く認められた。また抗生剤投与マウスのペリサイトで変動のあった遺伝子の解析を行ったところ、同様にこれらのパスウェイで大きな変動が見られた。GPR31欠損マウスや抗生剤投与マウスで発現が低下したECM interaction関連遺伝子の中には、ECM分解酵素であるADAMTSファミリー分子のADAMTS12やADAMTS13が含まれていた。これらのECM分解酵素は、血管新生を制御することが知られる(El Hour M et al. *Oncogene*, 29:3025-32, 2010, Lee M et al. *Cell. Mol. Life. Sci.* 72:349-356, 2015)。

また、GPR31欠損マウスのペリサイトで発現が亢進した遺伝子としてCaspase-8が認められたため、GPR31欠損マウスおよび抗生剤投与マウスのペリサイトにおける7-AAD陽性細胞を評価したところ、野生型(抗生剤非投与)マウスと比較し、有意にその割合が高かった(図8)。

以上より、GPR31シグナルによる小腸マクロファージの樹状突起伸長は、血管内皮細胞およびペリサイトに作用することで、血管バリア機能を亢進する可能性が考えられた。

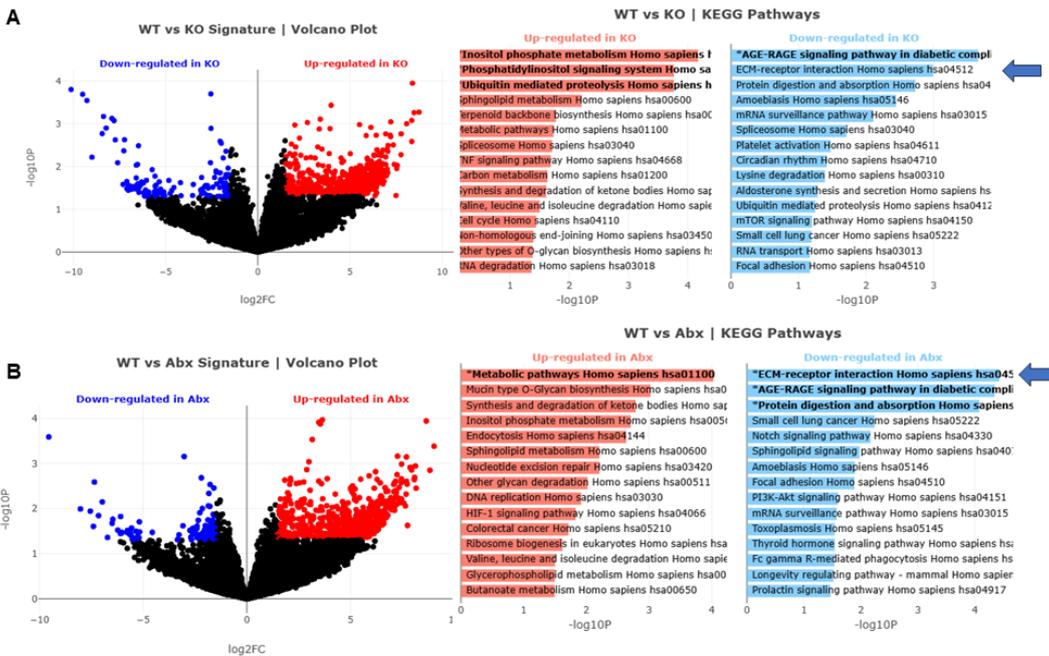


図7. GPR31欠損マウスおよび抗生剤投与マウスの小腸ペリサイトにおける遺伝子発現解析
野生型マウス、GPR31欠損マウス、抗生剤投与マウスの小腸ペリサイト (CD45⁺ gp-38⁺ CD31⁺ CD146⁺ Integrin- α 7⁺) をソートし、RNA-シークエンス解析を行った。(A) 野生型マウスとGPR31欠損マウスの比較。(B) 抗生剤非投与マウスと抗生剤投与マウスの比較。

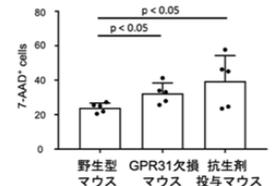


図8. GPR31欠損マウスおよび抗生剤投与マウスの小腸ペリサイトにおける7-AAD⁺細胞の割合
各マウスの小腸血管ペリサイト (CD45⁺ gp-38⁺ CD31⁺ CD146⁺ Integrin- α 7⁺) における 7-AAD陽性率をフローサイトメトリーで解析した。

考察

本研究において、我々はGPR31欠損マウスにおいて、小腸の血管透過性が亢進し、血管バリア機能を制御する血管内皮細胞上の細胞膜貫通タンパク質PV-1の発現が亢進することを見出した。また、GPR31欠損マウスのペリサイトではECM分解酵素のADAMTSファミリー分子の発現が低下していた。GPR31は小腸のCX3CR1⁺マクロファージに発現するが、血管内皮細胞やペリサイトには発現が認められなかったことから、ピルビン酸・乳酸はCX3CR1⁺マクロファージ上のGPR31に作用し、マクロファージの樹状突起を伸長することで、血管バリア機能を制御すると考えられる。マクロファージが直接、血管内皮細胞に作用するのか、ペリサイトへの作用を介して血管バリア機能を制御するのか現時点では不明であるが、RNA-seq解析ではGPR31欠損の影響はペリサイトで特に大きく認められたことから、マクロファージはGPR31シグナルを介してペリサイトの機能調節に大きく関与する可能性が考えられた。

近年、小腸絨毛の先端に存在するLGR5⁺間質系細胞がADAMTS18の産生を介して、フィブロネクチンの蓄積

を制限することで、VEGFシグナルを血管から隔離し、血管内皮細胞の有窓構造を維持することが報告された。ADAMTS18欠損マウスでは絨毛先端のVEGF発現が亢進し、絨毛先端部の血管における有窓構造および血管漏出が増加する(Bernier-Latmani J et al. *Nat. Commun.* 13:3983, 2022)。GPR31欠損マウスのペリサイトではADAMTS12やADAMTS13の発現が減少していた。ADAMTS13はvon Willebrand因子を切断するが、ADAMTS13およびvon Willebrand因子はいずれも血管新生を制御する(Lee M et al. *Cell. Mol. Life. Sci.* 72:349-356, 2015, Starke RD, *Blood*, 117:1071-1080, 2011)。また、ADAMTS12は血管新生を抑制することが報告されている(El Hour M et al. *Oncogene*, 29:3025-32, 2010)。今後、GPR31によるマクロファージの樹状突起伸長が、ペリサイト上のADAMTS分子の活性を制御することで、小腸の血管バリア機能を亢進する可能性について検討を行う予定である。

最後になりましたが、多大な研究ご支援をいただいた公益財団法人アステラス病態代謝研究会に厚く御礼申し上げます。