

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07428

研究課題名(和文) 腸上皮細胞から再放出される断片化ラクトフェリンによる腸内細菌制御に関する研究

研究課題名(英文) Study for gut microbial regulation by lactoferrin fragments released from intestinal epithelial cells

研究代表者

大島 健司 (OSHIMA, Kenzi)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：90391888

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)：腸内細菌叢のバランスは全身の健康状態に影響し、様々な疾患の発症に関連すること
ため、望ましい腸内細菌叢を形成することは、多くの疾患の予防にもつながる。細菌叢の形成を促進的に制御す
る宿主の内在的因子については研究が進んでいない。ラクトフェリン(LF)は細菌から真菌まで広い菌に対して殺
菌・静菌作用を持つ一方で、ビフィズス菌の増殖を促進する。我々はこれまで培養腸上皮細胞により未消化LFが
取り込まれ、細胞内で分解され細胞外へと再放出されることを報告している。本研究は、腸上皮細胞でのLF断片
化と再放出の機構およびLF断片による腸内細菌叢制御機能や生理的機能について検討することを目的とする。

研究成果の概要(英文)：Balance of intestinal gut microflora is deeply related to the host health
and onset of various diseases. Thus formation of eligible gut flora will lead to prophylaxis of
infections and metabolic syndromes. However, studies are still insufficient about endogenous
promoting factors for establishing eligible gut flora. Lactoferrin (LF) widely prevents growth of
pathogens from bacteria to fungi while it promotes growth of Bifidobacterium. Our group previously
reported intracellular fragmentation of endocytosed LF in cultured intestinal epithelial cells and
subsequent release to the outside. In this study we will analyze the degradation and release process
of LF, and evaluate the functions of LF fragments in establishment of gut flora and physiology.

研究分野：細胞生物学 生化学

キーワード：腸内細菌 ラクトフェリン 腸上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌は、宿主の免疫系の成熟を促進し、難消化性食物の消化を助け栄養素の供給を行うなど宿主に有益な働きをする。その一方で、体内への細菌の侵入は炎症や敗血症などの原因となり、病原菌感染により産生される毒素は宿主の健康を脅かすことになる。そのため望ましい腸内細菌叢を形成・維持することは、疾病予防に貢献すると期待できる。宿主が腸内細菌叢の形成を制御するシステムについては、抗菌タンパク質や腸管免疫系により菌の増殖を抑制することについて多くの解析がなされている。その一方、有用菌の定着を促し望ましい腸内細菌叢の形成を促進する宿主の内在的因子についてはほとんど明らかとなっていない。授乳中の乳児腸内細菌叢は乳酸菌、ビフィズス菌が優勢であり、離乳直後から形成される大人型腸内細菌叢とは大きく異なっているため、乳児型腸内細菌叢の形成には強い選択性があると考えられる。これまでに母乳成分が乳酸菌、ビフィズス菌の増殖に大きく寄与していることが明らかとなっている。母乳に含まれるラクトフェリン (LF) は 80 kDa の鉄結合タンパク質であり、消化酵素分解により抗菌ペプチドのラクトフェリシンやビフィズス菌増殖活性を持つペプチド断片が生じる。さらに LF はインテレクチン (IntL) など腸上皮細胞や免疫系細胞上の受容体を介して PI3K/Akt 経路や NF- κ B 経路を活性化することにより、また核内に移行して転写因子として作用することにより、間接的に腸内細菌を制御していることも考えられる。本研究では腸内細菌叢形成制御因子として LF に着目し、その機能メカニズムについて解析する。

2. 研究の目的

腸内細菌叢のバランスが疾患の発症に関連し、健康の維持に重要であることが明らかにされつつある。望ましい腸内細菌叢を形成するためには、疾病関連菌の増殖を抑制しつつ有用菌を腸管内へと生着させる必要がある。LF は広い腸内細菌種の増殖を抑制する一方で、ビフィズス菌の増殖を促進する。消化酵素により分解された LF 断片はより高い抗菌活性およびビフィズス菌増殖活性を持つが、その一方で消化酵素への抵抗性があることも知られている。特に消化能力の未熟な乳児期では、糞便中からも未分解 LF が多量に検出される。これまでに本申請者の研究グループは、LF が培養腸上皮細胞のエンドサイトーシスにより取り込まれ、その後 30~50kDa の断片として培養上清中へと再放出されることを明らかとしている。腸上皮細胞に取り込まれた LF は、消化酵素とは異なるリソソームプロテアーゼで切断されると考えられ、分解産物の構造や生理活性も既知の LF 消化酵素分解物とは異なると予想される。本研究では、腸上皮細胞から再放出された LF 断片も、腸内細菌への抗菌活性やビフィズス菌増

殖促進作用、免疫制御機能を発揮することで腸内細菌叢形成に影響するという仮説を立て、これを検証することを目的とした。また腸上皮細胞内での受容体依存的 LF エンドサイトーシスと細胞内輸送および分解に関連する分子細胞学的解析と、分解断片の構造解析も目的とした。

LF は抗菌作用のほか、経口摂取により免疫活性化や抗腫瘍作用など様々な生理機能を発揮し、また好中球や気道上皮細胞などからも産生され血中に 0.1~1 μ g/mL 程度存在するが、分子細胞生物学レベルでの作用機序メカニズムは明らかではない。未消化 LF が細胞内で断片化され活性化される可能性を検証することは、LF の摂取や分子的作用機序について基礎的な理解を助けるものである。細胞内消化による再放出 LF 断片に着目する点が、本研究の独創的な点である。本研究で新たな LF の活性断片とその機能が明らかになれば、新たなペプチド性薬品や機能性食品の開発へと繋がることに意義がある。LF は乳成分であるため、経口摂取の安全性が保証されている点が優れた利点である。

3. 研究の方法

ライブイメージングに用いる hLF-GFP 融合タンパク質の作成と大量調製

C 末端側に GFP を融合させたヒト LF (hLF-GFP) の発現ベクターを作成し、ヒト由来 HEK293T 細胞およびショウジョウバエ由来 S2 細胞で発現を試みた。S2 細胞の hLF-GFP 安定発現株を作成し、大量培養系により hLF-GFP を発現させた。大量発現した hLF-GFP をアフィニティ精製により単離、濃縮した。

培養腸上皮細胞にエンドサイトーシスされた hLF-GFP のライブイメージ解析

ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 を 3 日間培養したのち、hLF-GFP と乳由来精製ウシ LF (bLF) を同時に培地に加え 3 時間培養したのち、蛍光免疫染色を行った。

Caco-2 細胞、HEK293 細胞を 3 日間培養したのち、hLF-GFP または蛍光標識 ovalbumin を含む培地に交換し保温装置付き共焦点レーザー顕微鏡を用いてリアルタイムで観察した。ライブイメージングで観察したのち、細胞内および培地中の hLF-GFP について Western blotting により解析した。マトリゲルまたは多孔膜フィルター上で培養した Caco-2 細胞についても、同様に hLF-GFP エンドサイトーシスのライブ観察を行った。

hLF-GFP の局在を解析するため、hLF-GFP と同時に蛍光標識 dextran (10,000 MW) または蛍光標識 transferrin、蛍光標識脂肪酸を添加した。リソソームを可視化するため、観察直前に LysoTracker® を添加した。

hLF-GFP のエンドサイトーシスに関連する経路を解析するため、hLF-GFP 添加前にク

ラスリン依存的エンドサイトーシス阻害剤 Dynasore またはマクロピノサイトーシス阻害剤 cytochalasin D で 1 時間細胞を処理した。また微小管形成を阻害するため、nocodazole を添加し氷上で 30 分細胞を処理した。

得られた画像は imageJ により画像処理を行い、ノイズを除いた。

乳児消化管内 LF 断片の構造解析

2-3 日齢の乳児マウスに 100 μ g の bLF を経口投与し、300 分まで経時的に腸内容物をサンプリングした。抗 LF 抗体による Western blotting により生成される分解断片について解析した。またトリプシンにより in vitro で分解した LF 断片を調製し、乳児腸内容物と比較した。

LF と IntL による協調的ビフィズス菌増殖活性

LF 受容体として解析していた IntL について、2015 年に広い細菌種の糖鎖構造を認識するレクチンであることが明らかとなった。乳児腸管に存在する IntL と LF がビフィズス菌生育に対する影響を調べるため、培養細胞によりヒト IntL (hIntL) を大量発現させ精製を試みた。また、精製 hIntL を bLF と共にビフィズス菌生育培地に添加した。*Bifidobacterium longum* 2 株と *Bifidobacterium breve* 2 株について吸光度測定法により菌の増殖変化を解析した。

効率的にビフィズス菌を検出するため、抗ビフィズス菌抗体を作成した。

4. 研究成果

ライブイメージングに用いる hLF-GFP 融合タンパク質の作成と大量調製

S2 細胞で完全長の hLF-GFP タンパク質を培地中へ分泌させることができた。大量発現させた hLF-GFP を Ni カラムによりアフィニティ精製することを試みたが、精製の過程で目的タンパク質が分解してしまい、十分な量の精製タンパク質を得ることができなかった。そのためライブイメージングには hLF-GFP を含む培養上清を限外濾過し濃縮して使用した。

培養腸上皮細胞にエンドサイトーシスされた hLF-GFP のライブイメージ解析

hLF-GFP と精製 bLF のほとんどは細胞内で共局在していた。そのため、S2 細胞から調製した hLF-GFP はインタクトな LF と同等の挙動を示すと考えられた。

生細胞内で hLF-GFP の局在をライブイメージング観察することに成功した。詳細な観察により、hLF-GFP の大部分は受容体を介してエンドサイトーシスされることが示唆された。hLF-GFP は、食餌性タンパク質モデルである ovalbumin とは異なるエンドサイトーシス経路により細胞内を輸送され、多くがリソソームに輸送されず数時間にわたり細胞

内に止まっていた。また、核内および核近傍で染色体と LF が相互作用する結果が得られ、これまでの報告と一致して LF が転写因子として作用する可能性が示唆された。上記の通り特殊な LF の細胞内輸送が示されたため、今後詳細について解析する予定である。

乳児消化管内 LF 断片の構造解析

マウス乳児小腸上部から中部にかけて、45 kDa の bLF 断片が大量に検出された。LF は、乳児消化管内では消化酵素によりペプチド断片に分解されることなく、比較的大きな構造を保っていることが示唆された。Western blotting により検出された乳児腸管内 bLF 分解断片は、トリプシン分解物とは異なるパターンであったため、乳児特異的なプロテアーゼによる分解物であることが示唆された。今後はマウス乳児消化管内で検出された bLF 断片の精製、構造解析およびその機能解析を行う予定である。

LF と IntL による協調的ビフィズス菌増殖活性

HEK293T 細胞により hIntL を大量発現させた。Oshima らの方法に従い Sepharose-Based を用いて hIntL の精製を試みた (Oshima Y, et al. Biological & Pharmaceutical Bulletin 2016 39 435-39) が、十分な量の精製タンパク質を得ることができなかった。そのため、hIntL を含む培養上清を限外濾過により濃縮しビフィズス菌生育培地に添加した。しかしながら今回の条件では、hIntL はビフィズス菌の生育には影響しなかった。

Bifidobacterium longum 2 株と *Bifidobacterium breve* 2 株混合死菌をマウスに免疫し、ビフィズス菌を免疫染色により特異的に検出できる抗体を得た。この抗体を用いてビフィズス菌を ELISA 法により定量する系を確立することを試み、現在は 10^7 ~ 10^8 cells の間でビフィズス菌を定量することが可能となった。しかし少量および 10^9 cells 以上では定量性がないため、より広い範囲の差を定量できるよう改良する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. 長江明日香、灘野大太、松田幹、若林裕之、山内恒治、阿部文明、大島健司 「GFP 融合ラクトフェリンの腸管上皮細胞内輸送分岐の解析」ラクトフェリン 2017 (日本ラクトフェリン学会第 7 回学術集会 2016 年度臨床ラクトフェリン研究会合同大会プロシーディング、日本医学館) 2017 年 12 月 25 日(査読無し)

〔学会発表〕(計 2件)

1. 「GFP 融合ラクトフェリンの腸管上皮細胞内輸送分岐の解析」長江明日香、灘野大太、松田幹、若林裕之、山内恒治、阿部文明、大島健司 日本ラクトフェリン学会第7回学術集会 2016 年度臨床ラクトフェリン研究会合同大会 2016年10月30日 東京 昭和大学旗の台キャンパス

2. “Time-lapse analysis of lactoferrin-uptake mechanisms into intestinal epithelial cells” Asuka Nagae, Yuka Akiyama, Kouichirou Shin, Hiroyuki Wakabayashi, Fumiaki Abe, Daita Nadano, Tsukasa Matsuda, Kenzi Oshima, XIIth International Conference on Lactoferrin, (2015.11.2-7) Nagoya

()

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 健司 (OSHIMA, Kenzi)
名古屋大学大学院・生命農学研究科・助教
研究者番号：90391888

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者