

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21474

研究課題名(和文) 果実ナノ粒子含有マイクロRNAを介した食品由来高分子による消化管機能調節

研究課題名(英文) Regulation of intestinal function via microRNA from fruit-derived microvesicles

研究代表者

玉井 郁巳(Tamai, Ikumi)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：20155237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：食品機能はタンパク質などの高分子の消化管での代謝物であるアミノ酸や金属、フラボノイドなど低分子が生体に作用することで説明される。一方食品中にはエクソソーム様の微粒子が含まれ、その中には食品由来高分子が含有される。本研究では、食品として果物(リンゴ)を選択し、含有される微粒子が保持する食品由来高分子であるマイクロRNAが微粒子として小腸組織内にまみ取り込まれ、生体に直接高分子として作用するという新しい食品機能の提唱を目指した。その結果、リンゴ中の粒子径100nm程度の微粒子にはリンゴ由来マイクロRNAが存在し、それが小腸上皮細胞中に移行し、ヒト遺伝子の発現調節に働くことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質など食品由来高分子がヒトに作用する場合は消化産物であるアミノ酸のような低分子である。その他、単糖、金属、フラボノイドなどいずれも直接作用するのは低分子であるというのが現在の栄養学である。一方本研究では、食品中には微粒子が含まれ、それはマイクロRNAなど食品由来高分子を含有することを示した。さらに微粒子はマイクロRNAなど高分子を安定に保ち、小腸上皮細胞内に移行させ、内包したマイクロRNAが直接的に小腸細胞のタンパク質機能を調節することを見出した。即ち、食品由来高分子が直接栄養素として働くことを示す。従って、栄養素の定義として食品由来高分子も考慮する必要があることを示す意義がある。

研究成果の概要(英文)：Nutrients in food affect human (host) as small molecules such as metals, flavonoids and amino acids derived as digestive products of proteins, which are large molecules. However, recently it is demonstrated that food include many micro-vesicles and they contain variable large molecules such as food-derived microRNA. Accordingly, it is possible that large molecules of food may directly affect host function, though currently only small molecules are considered to cause physiological effect on host. In this study, we found that apple-derived micro-vesicles contain variable apple-derived microRNAs and they are delivered to intestinal epithelial cells in the form of micro-vesicles. Then, contained microRNAs directly regulate expression of several transporter proteins. Accordingly, by considering such micro-vesicles in food, we need to add direct effect of food-contained large molecules as food function in addition to currently well recognized nutrients definition as small molecules.

研究分野：薬物動態学

キーワード：食品作用 食品由来微粒子 マイクロRNA トランスポーター 発現調節 栄養素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品成分や医薬品類を含め「高分子化合物」は、経口摂取しても消化管内での代謝による不安定性と低い細胞膜透過性のために、高分子自体はホストに作用しないというのが一般的な認識である。すなわち、タンパク質など栄養素の消化産物であるアミノ酸やビタミン類など、ホストに直接作用するのは全て「低分子物質」であることが現状の認識である。一方、果物などの食品は細胞外ナノ粒子 (Edible-Nano Particle: eNP) を含んでおり、eNP に内包された成分がホストに直接作用することも示され始めた。eNP の特徴は、ペプチドやマイクロ RNA(miRNA)などの食品由来高分子を含有し、高分子は eNP 内では一定の安定条件下で維持でき、内包物を細胞内に導入できる可能性があることである。本特徴に基づき研究代表者は、果物から得た eNP を消化管由来培養細胞に作用させると、多様な遺伝子発現が変動することを見出した (*Mol Pharm*, 15:5772, 2018)。具体的には、小腸に発現し、薬物等の吸収に働くトランスポーター OATP2B1 の発現はリンゴ由来ナノ粒子(apple-derived nanoparticles: APNP)によって抑制され、本発現抑制には OATP2B1 の遺伝子 *SLCO2B1* の 3'-UTR が関与すること、リンゴ miRNA のデータベース中には *SLCO2B1* の 3'-UTR に結合性が高い miRNA が予測されること、さらに APNP 中の低分子成分は微量であることが見出され、「食品中の高分子である miRNA が eNP を介して直接ホストに作用する」という新しい食品機能が考えられるに至った。

2. 研究の目的

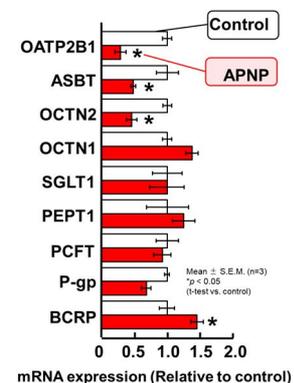
eNP を介することにより果物含有高分子がホストの生理機能を直接調節するという食品の新しい作用機構の提唱するための実例を示すことであり、具体的には食品含有高分子としてリンゴ由来 miRNA に着目し、Caco-2 細胞をモデルとして用い小腸トランスポーターである OATP2B1 の発現をダウンレギュレーションするリンゴ由来マイクロ RNA を同定することを本申請課題における目的とする。

3. 研究の方法

- ・小腸モデル細胞として Caco-2 細胞を用いる。
- ・食品としてリンゴを用い、リンゴを砕き、ホモジネートとして、超遠心法によりナノ粒子分画を得る。
- ・対象となる小腸トランスポーターとして OATP2B1 を選択し、その発現について mRNA (RT-PCR)、タンパク質(ウェスタンブロットティング)、活性 (エストロン 3 硫酸の取り込み活性) を測定する。
- ・複数の予測アプリケーションを用いて、OATP2B1 の 3'-UTR と相互作用するリンゴ由来 miRNA を予測する。その mimic あるいは阻害剤 (miRNA 類似体) を作成し、その作用を確認する。
- ・APNP の細胞内移行については、APNP 脂質を蛍光化合物 PKH-26 で標識し、蛍光顕微鏡で観測し、定量はフローサイトメトリーにより行った。

4. 研究成果

1) Caco-2 細胞に APNP を処理すると、複数の小腸トランスポーター遺伝子 mRNA の発現量が変動した。OATP2B1 を含む複数のトランスポーターについて発現量が低下した(図 1)。OATP2B1 は薬物吸収に関与するトランスポーターであり、以後 OATP2B1 に着目した。なお、図 1 の結果は既に報告済みである。(Fujita D. *et al.*, *Mol. Pharm.*, 15: 5772-80 (2018))



2) miRNA 予測として mirbase を用いて、OATP2B1 の 3' -UTR と相互作用するリング由来 miRNA を絞り込んだ。図 2 に示すような段階を経て、OATP2B1 発現を抑制する miRNA 分子を絞り込み、さらに以下に示す miRNA inhibitor を用いてさらに候補 miRNA を絞り込むこととした。

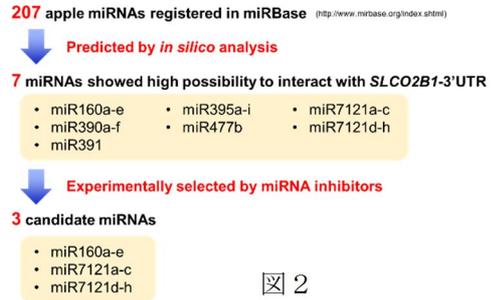


図 2

3) 上記の miRNA を絞り込む過程で、各候補 miRNA に対する inhibitor を作成し、APNP により低下した発現量の抑制程度をリバースする miRNA を選別した。図 3 に示すように、上記 3 種の miRNA が抑制作用をリバースする結果が得られた。リバースの程度が小さいのは、複数の miRNA が作用しているため、単独の miRNA では十分な miRNA 作用抑制が得られないものと考えられた。しかし、これらリバース作用があることはこれら miRNA が OATP2B1 発現抑制に働いていることを示す。

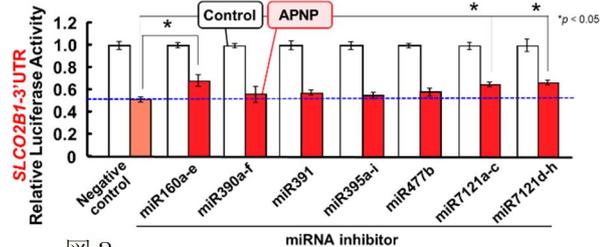


図 3

4) 上記 miRNA が用いた APNP 中に存在するかについて確認した。APNP をテンプレートに RT-PCR を行った。その結果を図 4 に示す。APNP の濃度依存的に対応するバンドが濃くなり、APNP 中に対象としたリング由来 miRNA の存在を確認することができた。

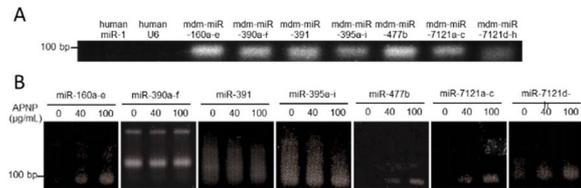


図 4

5) これら 3 種の miRNA が作用するかについて、各 miRNA の mimic を合成し、OATP2B1 の mRNA 発現の低下作用の有無を調べた。図 5 に示すように、Caco-2 細胞における発現は各 miRNA-mimic により低下し、これら miRNA は OATP2B1 発現を抑制することが確認された。

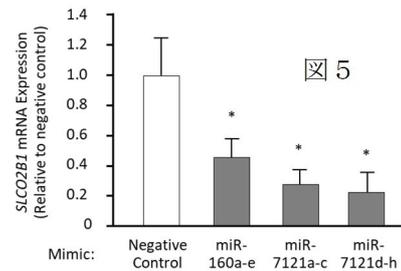


図 5

6) 各 miRNA の作用について、OATP2B1 遺伝子 3' -UTR 上で推測された相互作用部位を含む truncated プラスミドにおける塩基配列変異体を作成して、発現抑制作用の変化の有無を調べた。その結果を図 6 に示す。miRNA160a-e の予測結合部位は

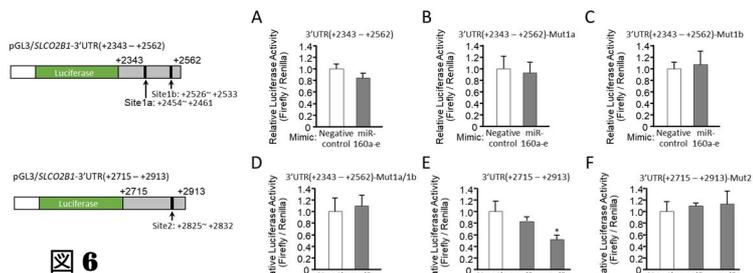


図 6

二か所あるが、各部位 (B,C) および両部位 (D) の変異によって miR160a-e の mimic 存在下では発現量は、野生型に対してより高くなり、抑制作用は減弱する傾向があった。しかし、truncated プラスミドの場合は野生型でも miR160a-e による有意な抑制作用が観測されず、明確な結論には至らなかった。一方、miR7121a-c についても同様に、変異体に対する作用は減弱する傾向 (E と F の比較) にはあったが、有意な発現低下が観測されず、明確な結論が得られなかった。一方、miR7121d-h については、truncated プラスミドに対して miR7121d-h の mimic は有意な発現抑制作用を示し (E) 変異体においてその作用は消失した (F) 以上の結果より、少なくとも miR7121d-h は OATP2B1 遺伝子上の予測部位と相互作用し、OATP2B1 の発現を抑制することがわかった。

7) 上記までに少なくとも選択された miR7121d-h が OATP2B1 遺伝子上の相互作用予測部位を介して発現抑制を示すことが示唆された。そこでさらに APNP による truncated プラスミドを用いた塩基変異の影響が同様に観測されるかについて確認した。その結果を図7に示す。

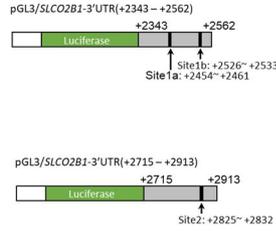
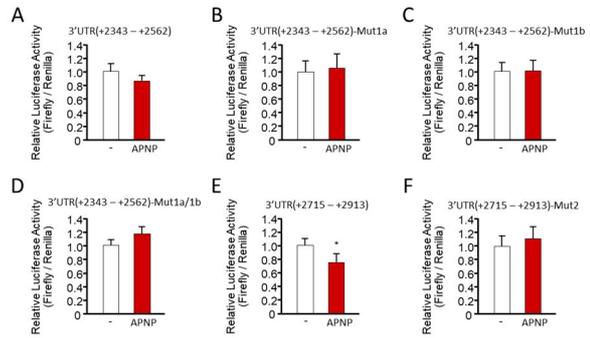


図7



APNP は miR160a-e の予測相互作用部位を想定したプラスミドでは有意な発現抑制を示さなかったが (A)、変異によって発現量は回復する傾向がみられた (B,C,D)。一方、miR7121d-h 作用部位を有したプラスミドでは、APNP 有意な発現低下作用を示し (E)、その作用は変異体においては消失した。本結果は図6と同様であった。

8) APNP が細胞内に内在化について APNP 粒子を PKH-26 で標識し、Caco-2 細胞を観察した。また、フローサイトメトリーで定量化した。その結果を図8に示す。APNP-PKH-26 を細胞とインキュベートすると細胞内傾向は時間とともに上昇し、内在化量は clathrin 依存的なエンドサイトーシス阻害薬により低下した。

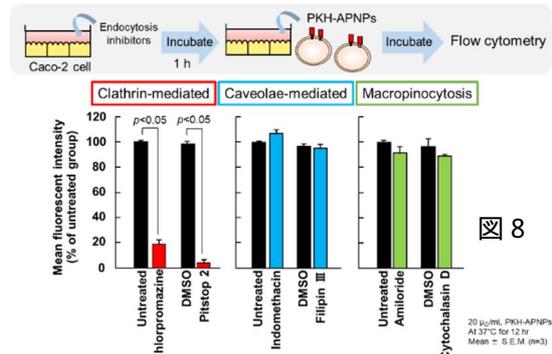


図8

9) APNP による OATP2B1 抑制作用に対する clathrin 依存的エンドサイトーシス阻害薬の作用を調べた。図9に示すように、APNP 処理により低下した OATP2B1 遺伝子 (SLCO2B1) の発現量は、Pitstop2 存在下で回復し、エンドサイトーシス阻害により APNP 作用は減弱した。したがって、APNP による OATP2B1 発現量の低下は、エンドサイトーシスによる APNP 内在化が必要であることが確認された。

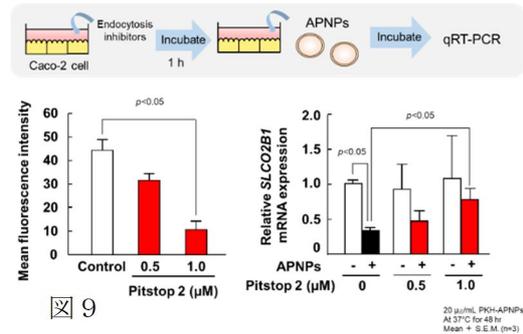


図9

まとめ：

以上、図1から図9までの結果等から、APNP は内包する miRNA とともに細胞内に clathrin 依存的なメカニズムで内在化され、少なくとも含有される miR7121d-h は予想された OATP2B1 の 3' - UTR 上の結合部位上で相互作用することで OATP2B1 の発現量を低下させることが見出された。miRNA は分子量が 10,000 弱の高分子であり、通常このような高分子は単体では不安定であり、また細胞膜を透過できない。しかし、このように APNP のようなナノ粒子に内包された形態である時は細胞内移行し、遺伝子特異的に miRNA として発現抑制作用を示すものと推測される。本検討で用いた APNP 量は十分にヒト in vivo でも到達できる程度の量(リンゴ一個程度)であり、ヒトがリンゴ摂取時において生じうると推測される。即ち、直品の生体作用として、食品含有ナノ粒子を経由することによって食品中高分子は、直接生体に作用するメカニズムの存在が示され、本研究で意図した結論を得ることができた。ナノ粒子中には食品由来成分として miRNA 以外の核酸分子やタンパク質もあるため、食品機能として高分子も考慮する必要のあることを示すことができた。

なお、細胞内移行したナノ粒子内成分の細胞内動態や遺伝子との相互作用機構については重要な残された課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Liu W, Nakano M, Nakanishi T, Nakajima M, Tamai I.	4. 巻 35
2. 論文標題 Post-transcriptional regulation of OATP2B1 transporter by a microRNA, miR-24.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 515-521
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2020.07.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhu Q, Komori H, Imamura R, Tamai I.	4. 巻 110
2. 論文標題 A novel fluorescence-based method to evaluate ileal apical sodium-dependent bile acid transporter ASBT.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 1392-1400
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2020.11.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arai M, Komori H, Fujita D, Tamai I	4. 巻 38
2. 論文標題 Uptake pathway of apple-derived nanoparticle by intestinal cells to deliver its cargo.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 523-530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11095-021-03018-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Komori H, Fujita D, Shirasaki Y, Zhu Q, Iwamoto Y, Nakanishi T, Nakajima M, Tamai I,	4. 巻 49
2. 論文標題 MicroRNAs in apple-derived nanoparticles modulate intestinal expression of organic anion-transporting peptide 2B1/ SLC02B1 in caco-2 cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Disposition	6. 最初と最後の頁 803-809
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/dmd.121.000380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 玉井 郁巳, 朱 秋楠	4. 巻 40-7
2. 論文標題 食品成分と薬物の相互作用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学増刊	6. 最初と最後の頁 70-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Qiunan Zhu, Hisakazu Komori, Rikako Imamura, Ikumi Tamai
2. 発表標題 A novel fluorescence-based method to evaluate the ileal apical sodium-dependent bile acid transporter ASBT
3. 学会等名 トランスポーター研究会、関東
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Qiunan Zhu, Takehiro Okaguchi, Ryusuke Iwai, Hisakazu Komori, Yoshiyuki Shirasaka, Ikumi Tamai
2. 発表標題 Constipation-relieving effect of apple due to down-regulation of ASBT,
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白井紳也, 小森久和, 岩本結, 稲永上輝, 白坂善之, 玉井郁巳
2. 発表標題 リンゴ由来ナノ粒子中の高分子成分による回腸胆汁酸輸送体ASBTの発現調節
3. 学会等名 第133回日本薬学会北陸支部
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hisakazu Komori, Daichi Fujita, Yuma Shirasaki, Mayumi Arai, Qiunan Zhu, Ikumi Tamai
2. 発表標題 Down-regulation of OATP2B1/SLC02B1 Expression by MicroRNAs in Apple-derived Nanoparticles
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中島 美紀 (Nakajima Miki) (70266162)	金沢大学・ナノ生命科学研究所・教授 (13301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小森 久和 (Komori Hisakazu)		
研究協力者	朱 秋楠 (Zhu Qiunan)		
研究協力者	荒井 まゆみ (Arai Mayumi)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	臼井 紳也 (Usui Shinya)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関