

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660092

研究課題名(和文)腸内細菌によるエクソソームを介した生体機能調節機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of exosomes in biological regulatory function of microbiota

研究代表者

青木 綾子 (Aoki, Ayako)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所畜産物研究領域・任期付研究員

研究者番号：60610368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸内細菌による生体調節機構におけるエクソソームの役割を明らかにすることを目的として、無菌マウスとSPFマウスの血液由来エクソソームの構成成分と機能を比較した。その結果、無菌マウスとSPFマウスの血液由来エクソソームに含まれるmicroRNAの種類に違いがあることが判明した。さらに、無菌マウスとSPFマウスの血液由来エクソソームのマウスへの移入により、臓器特異的に遺伝子発現が変動することが明らかになった。以上より、腸内細菌がエクソソームの構成成分を変動させること、また、腸内細菌がエクソソームを介して臓器の遺伝子発現を制御している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated the differences of components and biological functions of serum exosomes between germ-free (GF) and specific pathogen-free (SPF) mice. The microarray analysis for microRNA expression revealed that microRNAs of serum exosomes were expressed differentially between them. Furthermore, vein injection of serum exosomes from GF or SPF mice made different mRNA expressions on the spleen and the liver of the exosomes-injected mice. These data suggest that microbiota modulate biological functions via serum exosomes.

研究分野：食品免疫学

キーワード：エクソソーム 腸内細菌 microRNA

1. 研究開始当初の背景

腸管内に生息する腸内細菌は生体機能において重要な役割を果たしている。例えば、腸内細菌が存在しない無菌マウスにおいては腸管免疫系の発達も悪く、経口免疫寛容も誘導されにくい(Sudo et al, *J Immunol*, 1997)。一方で、プロバイオティクス研究にみられるように、体外から新たに微生物を投与することで生体の機能を調節することも明らかになってきている。申請者も、プロバイオティクスの投与がマウス血液中の抗体応答を変化させること(Yoshida et al, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2011)や経口免疫寛容を強化することも明らかにしている。しかしながらこれまでのところ、腸内細菌やプロバイオティクスがどのようにして全身の免疫機能を制御しているかについては完全には解明されていない。

エクソソーム(図1)は、血液、尿、母乳などの体液中を循環する50~90 nmの膜小胞のことで、体内の離れた細胞や組織に情報を伝達し、生体機能を調節する役割を担っている。例えば、腸管上皮細胞から分泌されるエクソソームは、T細胞への抗原提示に関わっている(Van Niel G et al, *Am J Physiol Gastro Liv Physiol*, 2002)。また、エクソソームが異種細胞に mRNA や microRNA を運搬するなど、核酸による細胞間情報伝達に関わっている(Hadi Valadi et al, *Nat Cell Biol*, 2007)。

申請者らは、微生物が腸管局所でのエクソソーム産生を制御し、それにより生体機能を調節するという仮説を立て、本研究を遂行した。

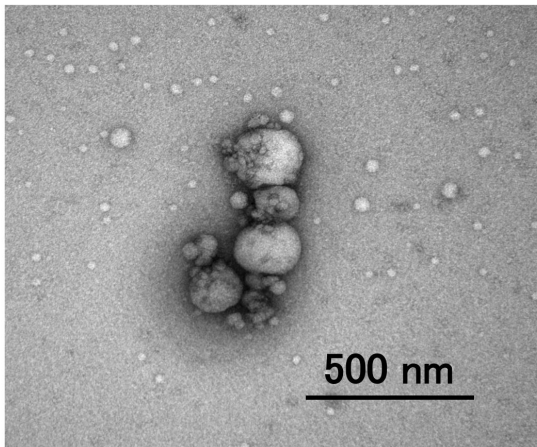


図1. マウス血清に含まれるエクソソームの電子顕微鏡写真

2. 研究の目的

本研究では、腸内細菌によるエクソソームの制御と、腸内細菌による生体機能の調節機構におけるエクソソームの役割を明らかにすることを目的に、腸内細菌を欠損した Germ-free (GF) マウスと腸内細菌を有する Specific Pathogen Free (SPF) マウスの血清由来エクソソームを精製し、その構成成分およびその機能を解析した。

3. 研究の方法

(1) GF マウスと SPF マウスの血清由来エクソソームに含まれるタンパク質および microRNA の比較

GF マウスと SPF マウスの血清をイソフルランによる麻酔下で腹大静脈から採血を行い調製した。得られた血清からエクソソームを精製し、エクソソーム量をタンパク質濃度を定量することで比較した。さらに、エクソソーム中に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で比較するとともに、エクソソームから microRNA を精製し、microRNA のマイクロアレイ解析を実施した。

(2) GF マウスと SPF マウスの血清由来エクソソームの移入によるマウス肝臓および脾臓の mRNA 発現の網羅的解析

GF マウスと SPF マウスの血清をイソフルランによる麻酔下で腹部大静脈から採血を行い調製した。得られた血清からエクソソームを精製し、タンパク質濃度を指標にエクソソーム濃度を合わせた。調製したエクソソームを、別の SPF マウスに移入し、24 時間後に解剖を行った。肝臓および脾臓を摘出し、RNA を抽出した。得られた RNA サンプルを DNA マイクロアレイに供した。

(3) 経口免疫寛容における血中エクソソームの役割の解明

Balb/c マウスに水、または 0.1%オボアルブミン(OVA)、または 1%OVA 水を自由摂取させた。24 時間後、それぞれのマウスから血液を採取し、エクソソームを精製した。調製したエクソソームはタンパク質濃度を指標に濃度をあわせ、それぞれ別の Balb/c マウスに 1 日おきに 3 回尾静脈経由で移入した。3 回目の移入から 3 日後に OVA を完全フロイントアジュバントとともに足せきに免疫した。免疫から 10 日後に膝下部よりリンパ節を摘出し、細胞を調製した。リンパ節細胞を OVA とともに培養し、培養上清に産生されるサイトカイン量を ELISA により定量した。

4. 研究成果

(1) GF マウスと SPF マウスの血清由来エクソソームに含まれる microRNA の網羅的比較

GF マウスと SPF マウスの血中に含まれるエクソソーム濃度を、タンパク質濃度を指標に測定したところ、SPF マウスの方が GF マウスより有意にエクソソーム濃度が高いことが明らかになった。さらに、SDS-PAGE によりエクソソームに含まれるタンパク質を解析したところ、SPF マウスと GF マウスでその構成に違いがあることが明らかになった(図2)。また、microRNA のマイクロアレイ解析の結果、血清エクソソームに含まれる microRNA については、GF マウスに比べ SPF マウスのエクソソームで発現量が 0.5 倍以下だった microRNA が 70 個、逆に、2 倍以上だった microRNA が

23 個、確認された。腸内細菌の存在により、ダウンレギュレートされる microRNA の数が多いことが判明した。これらの結果より、腸内細菌がマウス血清中エクソソームの構成成分に影響を与えることが強く示唆された。

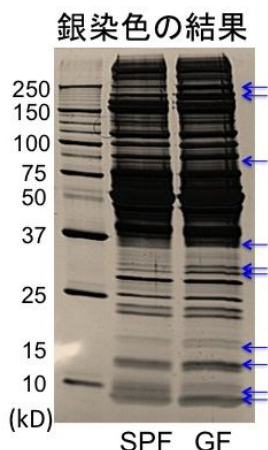


図 2. SPF マウスおよび GF マウス由来血清エクソソームの SDS-PAGE (銀染色)
矢印:SPF マウスと GF マウスの血清エクソソームで差が認められるバンド

(2) GF マウスと SPF マウスの血清由来エクソソームの移入によるマウス肝臓および脾臓の mRNA 発現の網羅的解析

GF マウスと SPF マウス由来血清エクソソームを別の SPF マウスにそれぞれ移入し、24 時間後の脾臓および肝臓のマイクロアレイ解析を実施した。その結果、肝臓 (図 3) および脾臓 (図 4) において、mRNA 発現に違いが生じることが明らかになった。肝臓では脂質代謝や免疫関連遺伝子群の発現に差が認められた。また、興味深いことに、エクソソームの移入により肝臓および脾臓で発現量に差が生じた遺伝子は臓器ごとでことなっていた。これらの結果から、腸内細菌はエクソソームを介して、組織特異的に遺伝子発現を制御している可能性が示唆された。

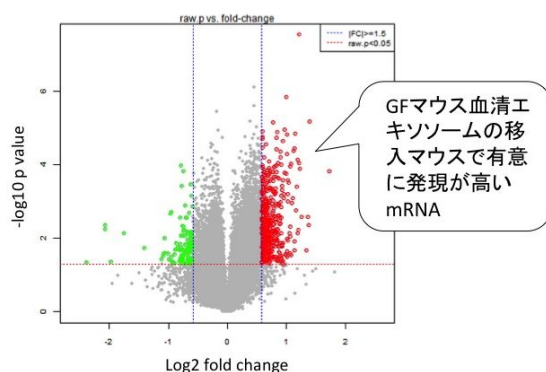


図 3. 肝臓のマイクロアレイ解析結果
横軸を fold change、縦軸を p 値の対数でプロットした。赤い点は GF マウス血清由来エクソソームの移入マウスで有意に発現が高い mRNA を示し、緑の点は有意に発現が低い mRNA を示す。

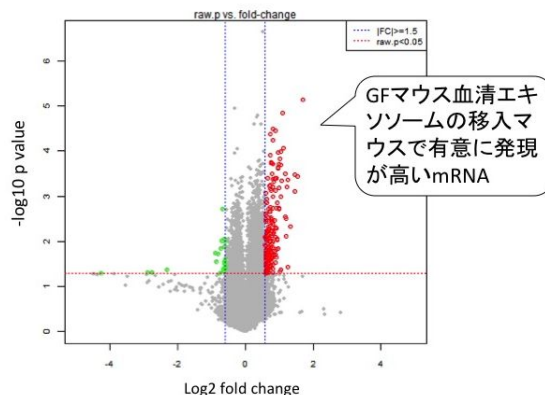


図 4. 脾臓のマイクロアレイ解析結果
横軸を fold change、縦軸を p 値の対数でプロットした。赤い点は GF マウス血清由来エクソソームの移入マウスで有意に発現が高い mRNA を示し、緑の点は有意に発現が低い mRNA を示す。

(3) 経口免疫寛容における血中エクソソームの役割の解明

OVA を経口投与したマウス由来の血清エクソソームを移入したことにより、OVA で免疫された膝下部のリンパ節が抗原に対して産生するサイトカインは、IL-10 および IL-4 が高められ、逆に IFN- γ が低く抑えられた。この効果は OVA の経口投与時の濃度に依存して、高まった。以上のことから、血中のエクソソームは食餌由来の抗原の提示に関与しており、免疫応答を Th1 側から Th2 側にシフトさせることが明らかになった。経口免疫寛容誘導では Th1 応答が強く抑えられる一方、IL-10 応答が高まることが報告されていることから、血中のエクソソームが経口免疫寛容機構の一端を担っている可能性が示唆された。

(4) 研究成果のまとめ

本研究では、腸内細菌叢の有無により、血清エクソソームの量および構成成分に違いが生じること、また、血清エクソソームが臓器の遺伝子発現を制御しており、腸内細菌叢の有無によりその制御が異なることを明らかにした。さらに、血中のエクソソームが免疫応答を修飾することを見出し、生体機能の調節に関与していることを明らかにした。

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 0 件)
なし

[学会発表](計 0 件)
なし

[図書](計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

なし

取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 綾子 (AOKI, Ayako)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研

構 畜産草地研究所 畜産物研究領域

任期付研究員

研究者番号：60610368

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし