

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292062

研究課題名(和文) プレ/プロバイオティクスの健康機能を生体内で媒介する細胞分子基盤の解析

研究課題名(英文) Cellular and molecular bases for mediating health-promoting action of prebiotics and probiotics

研究代表者

園山 慶 (Sonoyama, Kei)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90241364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに、難消化性オリゴ糖および乳酸菌株がそれぞれアレルギーおよび肥満を抑制することを動物実験で示してきたが、その機序は不明である。本研究では、これらの機能は循環血中のエクソソームが媒介する予測し、これを調べた。その結果、*in vivo*で観察される乳酸菌株の抗肥満作用の少なくとも一部はエクソソームによって媒介されること、難消化性オリゴ糖および乳酸菌株の投与はエクソソームに含まれるmicroRNAのプロファイルに影響すること、および腸上皮オルガノイドが腸上皮細胞のmicroRNA発現やエクソソーム放出を解析する上で有用なモデルとなることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Our previous animal studies showed that indigestible oligosaccharides and *Lactobacillus plantarum* No.14 reduce allergic symptoms and obesity, respectively, whereas the cellular and molecular mechanisms remain unknown. We hypothesized that circulating exosomes are involved in the actions. The present study showed that anti-obese effect of *L. plantarum* No.14 is, at least in part, mediated by circulating exosomes. In addition, we found that supplementation of indigestible oligosaccharides and *Lactobacillus* strains alter the circulating microRNA profiles. Furthermore, we showed that intestinal organoids are useful for investigating the microRNA expression and exosome release in the intestinal epithelial cells.

研究分野：消化管生理学

キーワード：プレバイオティクス プロバイオティクス エクソソーム microRNA オルガノイド

### 1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢が宿主の生理や病態に多彩な影響をおよぼすことが明らかになるのにもない、腸内細菌叢を標的として健康増進・疾病予防を図るプレバイオティクスやプロバイオティクスの研究が精力的に展開されている。例えば、筆者らはこれまでに、難消化性オリゴ糖がアレルギーを抑制するプレバイオティクスであること (Fujiwara *et al.* 2010 *Br J Nutr*, Sasajima *et al.* 2010 *Br J Nutr*, Fujiwara *et al.* 2010 *J Nutr Sci Vitaminol* など)、乳酸菌株 *Lactobacillus plantarum* No.14 が肥満ならびにそれに関連した脂肪組織炎症およびインシュリン抵抗性を抑制するプロバイオティクスであること (Takemura *et al.* 2010 *Exp Biol Med*, Okubo *et al.* 2013 *Biosci Microb Food Health* など) を動物実験により示してきた。しかしながら、腸管腔すなわち体外に存在する腸内細菌叢の情報が腸管を飛び越えて各種の組織に伝達される機序については、腸内細菌の主要な代謝産物である短鎖脂肪酸、消化管ホルモン、迷走神経、および自然免疫系について研究されているものの、未解明な部分が多い。

エクソソームは、多様な細胞が体液中に放出する脂質二重膜で覆われた直径 30-100 nm の小胞で、カーゴとしてタンパク、mRNA および microRNA (miRNA) などを含む。体液中に放出されたエクソソームは別の細胞にとりこまれ、そのカーゴを介して細胞機能に影響するので、さまざまな生命現象における細胞間コミュニケーションに役割を担っていると考えられている。筆者らはこれまでに、*L. plantarum* No.14 を投与したマウスの血清から分離したエクソソームが、*in vitro* においてマクロファージの炎症性サイトカインの産生を抑制すること、また、血清エクソソームに含まれる miRNA およびタンパクの組成が、無菌マウスと通常マウスの間で異なることを観察した (投稿中)。これらのことから、腸内細菌叢が宿主の生理や病態におよぼす多彩な影響を循環血中のエクソソームが媒介するという仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究では、「プレ/プロバイオティクスの健康機能はエクソソームが媒介する」という仮説を動物実験および培養細胞実験により証明することを目的とした。具体的な目的は以下のとおりである。

- (1) *L. plantarum* No.14 を投与したマウスの血清エクソソームが脂肪細胞にとりこまれること、および脂肪細胞における脂肪蓄積を抑制することを示す。
- (2) プレ/プロバイオティクスの投与がラットおよびマウスの血清エクソソームのカーゴ (miRNA およびタンパク) に影響することを示す。
- (3) 血清エクソソームの放出細胞として腸上

皮細胞を想定し、腸上皮細胞がエクソソームを放出することを確認するとともに、miRNA のプロファイルを *in vivo* と比較する。

### 3. 研究の方法

- (1) *L. plantarum* No.14 の抗肥満作用を媒介するエクソソームの解析: C57BL/6 マウスに、*L. plantarum* No.14、*L. plantarum* type strain (それぞれ  $1 \times 10^8$  CFU) あるいは生理食塩水を毎日胃内投与し、7日間飼育した。飼育最終日にケタミンおよびキシラジン混液 (80 および 8 mg/kg 体重) の腹腔投与による麻酔下で無菌的な心臓穿刺による全採血により安楽死させた。血液から血清を分離して超遠心分離法によりエクソソームを分離した。エクソソームの一部は、PKH67 (Sigma) により蛍光標識した。一方、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を定法により成熟脂肪細胞に分化させ、その培地に PKH67 標識エクソソームを添加して 24 時間培養後、蛍光顕微鏡による観察を行った。また、3T3-L1 細胞の分化誘導期間 (10 日間) に培地にエクソソームを添加し (血清中の濃度を 100% として 10% 添加)、培養最終日の細胞中の中性脂質含量を AdipoRed (Lonza) により比較した。
- (2) プレ/プロバイオティクスの投与がラットおよびマウスの血清エクソソームのカーゴ (miRNA およびタンパク) におよぼす影響の解析: F344 ラットを 3 群に分け、精製飼料 (AIN93G) を摂取させる群、難消化性オリゴ糖 (フラクトオリゴ糖) を 5% 添加した精製飼料を摂取させる群、および精製飼料を摂取させて飲み水として抗生剤水溶液 (バンコマイシン 1 mg/mL およびネオマイシン 1 mg/mL) を摂取させる群として、2 週間飼育した。飼育最終日にケタミンおよびキシラジン混液 (80 および 8 mg/kg 体重) の腹腔投与による麻酔下で開腹し、門脈より採血後、腹大動脈からの放血により安楽死させた。また別の実験で、C57BL/6 マウスに、*L. plantarum* type strain、*L. plantarum* No.14、および *L. rhamnosus* GG の凍結乾燥菌体粉末を添加した精製飼料 (AIN93G) で 1 週間飼育した。飼育最終日にセボフルラン麻酔下で頸動脈より全採血して安楽死させた。以上のようにして得たラットおよびマウスの血液から血清を分離し、超遠心分離法によりエクソソームを得た。それらから、miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて miRNA を分離し、マイクロアレイ解析 (3D gene、東レ) に供した。また、miScript II RT Kit (Qiagen) を用いて逆転写した後、miScript SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) を用いて RT-qPCR を行い、マイクロアレイで得られたデータの確

認を行った。タンパクについては、2D PAGE で分離し、銀染色を行って得られたスポットを比較した。

- (3) 腸上皮細胞のモデルとしてのオルガノイドの培養と解析：C57BL/6 マウスをセボフルラン麻酔下で頸椎脱臼することにより安楽死させた後、小腸を摘出し、既報 (Sato *et al.* 2009 *Nature*) にしたがって陰窩を分離してオルガノイドを培養した。また別の実験で、小腸より陰窩と絨毛を別々に分離した。これらから miRNA を前述と同様に分離し、マイクロアレイおよび RT-qPCR に供した。変化が見られた miRNA については *in silico* 解析 (Miranda, miRDB, PicTar, TargetScan) により標的遺伝子の予測を行った。予測された mRNA については、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡) で逆転写後に GeneAce SYBR qPCR Mix No ROX (ニッポンジーン) を用いて RT-qPCR 解析を行った。また、オルガノイドの培養上清は電子顕微鏡による観察に供し、エクソソームの存在を確認した。

#### 4. 研究成果

- (1) *L. plantarum* No. 14 の抗肥満作用を媒介するエクソソーム：マウスの血清から分離したエクソソームが脂肪細胞に取り込まれることを確認するために、PKH67 で蛍光標識したエクソソームを 3T3-L1 脂肪細胞の培地に添加したところ、Nile Red で脂肪滴の蓄積が確認された 3T3-L1 細胞の細胞質に PKH67 のシグナルが認められ (図 1) エクソソームが脂肪細胞に取り込まれることが示唆された。PKH67 処理した PBS を添加した場合には細胞内にシグナルは認められなかった。また、3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化誘導期間に、マウスの血清から分離したエクソソームを添加して、最終日に細胞内中性脂肪含量を比較したところ、無処置の細胞に比して生理食塩水を投与したマウスのエクソソーム添加は有意な影響をおよぼさなかったが、*L. plantarum* No. 14 を投与したマウスのエクソソーム添加は中性脂肪含量を有意に低下させた (図 2)。このとき、脂肪合成関連酵素遺伝子の mRNA レベルも低値を示した (データ未記載)。以上のことから、*in vivo* で観察される *L. plantarum* No. 14 の肥満抑制作用の少なくとも一部

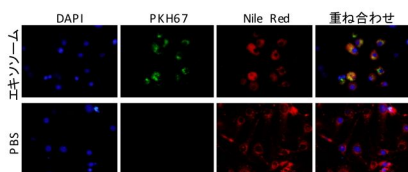


図1 マウスの血清エクソソーム (PKH67 標識) の 3T3-L1 脂肪細胞への取り込み

は循環血中のエクソソームによって媒介されるものと推察した。

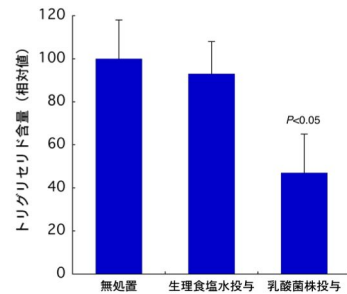


図2 乳酸菌株を経口投与したマウスの血清エクソソームの添加が 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪蓄積におよぼす影響

- (2) プレ/プロバイオティクスの投与がラットおよびマウスの血清エクソソームのカーゴ (miRNA およびタンパク) におよぼす影響：ラットおよびマウスにそれぞれ難消化性オリゴ糖 (プレバイオティクス) および乳酸菌株 (プロバイオティクス) を投与したときの血中エクソソームの miRNA プロファイルを網羅的に解析した。その結果、マイクロアレイ解析により示された miRNA プロファイルは難消化性オリゴ糖で変化し、抗生剤投与によ

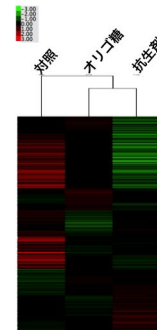


図3 難消化性オリゴ糖および抗生剤の投与がマウスの血清エクソソームの miRNA プロファイルにおよぼす影響

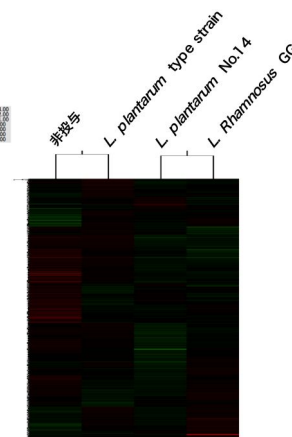


図4 乳酸菌株の投与がマウスの血清エクソソームの miRNA プロファイルにおよぼす影響

っても異なる影響をおよぼすことが示された (図 3)。これらの miRNA のいくつかは RT-qPCR によっても確認された (データ未記載)。これらの結果は、腸内細菌叢の変化が循環血中のエクソソーム

の miRNA プロファイルに影響をおよぼすことを示唆する。同様に、乳酸菌株の投与はマウスの血中エクソソームの miRNA プロファイルに異なる影響をおよぼした(図4)。IPAを用いた *in silico* 解析の結果、*L. plantarum* No.14 および *L. rhamnosus* GG の投与は NF- $\kappa$ B シグナリングに影響をおよぼすことが示唆された。すなわち、これらの乳酸菌株の炎症抑制効果の少なくとも一部は循環血中のエクソソームが媒介する可能性があると考えられた。

- (3) 腸上皮細胞のモデルとしてのオルガノイド：マウスの小腸粘膜から分離した陰窩画分および絨毛画分ならびにオルガノイドの培養1日目および5日目の miRNA プロファイルをマイクロアレイにより解析した結果、陰窩画分と培養5日目の成熟したオルガノイドのほとんどの miRNA の発現レベルは一致したので、成熟したオルガノイドは小腸陰窩のモデルとなると考えられた(図5)。陰窩画分と絨毛画分の間で発現レベルが大きく異なる miRNA が観察され(図6)、*in silico* 解析により予測されたこれらの miRNA の標的遺伝子の mRNA レベルも陰窩画分および絨毛画分の間で異なっており(データ未記載) さらにこれらの遺伝子は細胞増殖および分化の調節に関する遺伝子であった。すなわち、小腸粘膜の陰窩-絨毛軸に沿った上皮細胞増殖・分化の調節は miRNA によって制御を受けるものと推察される。しかしながら、陰窩-絨毛軸で変化の見られた miRNA はオルガノイドの成熟段階では変化が見られず(図6) したがって、オルガノイドは *in vivo* における陰窩-絨毛軸に沿った miRNA の発現解析のモデルには適さないと考えられた。また、培養5日目のオルガノイドの培養上清において電子顕微鏡によりエクソソームが確認され(図7) オルガノイドは *in vivo* の小腸上皮細胞と同様にエクソソームを放出すると推察された。

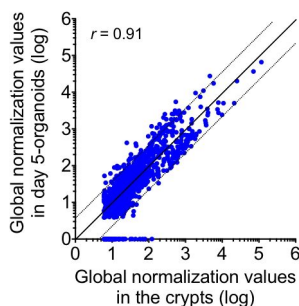


図5 マウスの小腸粘膜陰窩と小腸オルガノイドの miRNA レベルの相関

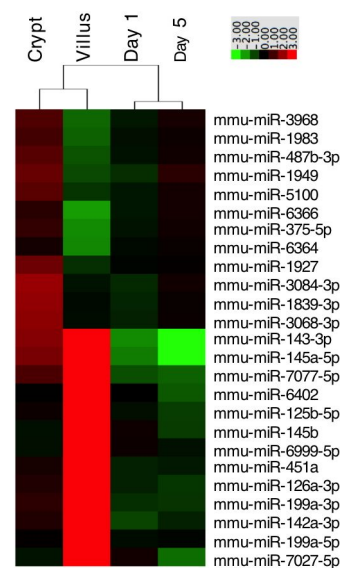


図6 マウスの小腸粘膜の陰窩-絨毛軸に沿って発現レベルが変化する miRNA と、小腸オルガノイドの成熟段階におけるそれらの miRNA 発現の比較

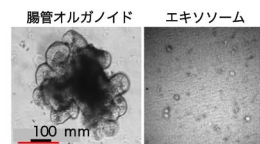


図7 マウスの小腸陰窩から培養したオルガノイドと(左)、オルガノイドの培地中に放出されたエクソソーム(右、電子顕微鏡像)

以上のように、本研究では、*L. plantarum* No. 14 の肥満抑制作用の少なくとも一部は循環血中のエクソソームによって媒介されることが示唆された。その機序に関して、エクソソームのカーゴである miRNA のプロファイルに、難消化性オリゴ糖および抗生剤による腸内細菌叢の変化ならびに乳酸菌株の投与が影響することが示された。さらに、腸内細菌叢の変化や投与した乳酸菌株に反応してエクソソームを放出する細胞として、それらの細菌が直接曝露する腸上皮細胞に着目し、腸上皮オルガノイドがそのことを解析するモデルとなり得ることを確認した。今後、オルガノイドを用いて、細菌の菌体成分や代謝産物が miRNA プロファイルやエクソソームの機能などにおよぼす影響について、解析を進めていく。

### 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5件)

- (1) 園山慶 . 腸内細菌叢とアレルギー。「自然免疫とアレルギー疾患-最新の病態-」アレルギーの臨床 2017; 37: 243-247. (査読無)
- (2) 園山慶 . プロバイオティクスを用いた肥満・メタボリックシンドロームの予防。「腸内細菌と脂質」*The Lipid* 2016; 27:

- 172-178. (査読無)
- (3) Aoki-Yoshida A, Saito S, Fukiya S, Aoki R, Takayama Y, Suzuki C, Sonoyama K. *Lactobacillus rhamnosus* GG increases Toll-like receptor 3 gene expression in murine small intestine *ex vivo* and *in vivo*. *Beneficial Microbes* 2016; 7: 421-429. (査読有) DOI:10.3920/BM2015.0169
- (4) Tsuruta T, Saito S, Osaki Y, Hamada A, Aoki-Yoshida A, Sonoyama K. Organoids as an *ex vivo* model for studying the serotonin system in the murine small intestine and colon epithelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2016; 474: 161-167. (査読有) DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.03.165
- (5) Ishihara R, Mizuno Y, Miwa A, Hamada A, Tsuruta T, Wabitsch M, Sonoyama K. Intestinal epithelial cells promote secretion of leptin and adiponectin in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015; 458: 362-368. (査読有) DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.01.118

[学会発表](計 17 件)

- (1) 逢坂文那: マウス腸管オルガノイド中の miRNA プロファイルの解析、日本食品免疫学会第 12 回学術大会、2016 年 11 月 9 日、東京大学(東京)
- (2) 鶴田剛司: *Lactobacillus plantarum* No.14 株を貪食したマクロファージが放出する細胞外小胞は脂肪細胞の脂肪チック咳を抑制する、日本食品免疫学会第 12 回学術大会、2016 年 11 月 9 日、東京大学(東京)
- (3) 逢坂文那: マウスの小腸粘膜上皮細胞における microRNA の発現プロファイル、日本栄養・食糧学会北海道支部会 第 46 回大会、2016 年 10 月 26 日、とかちプラザ(帯広)
- (4) 石宮聡美: フラクトオリゴ糖および抗生剤の摂取がラットの血中エキソソームの miRNA 組成におよぼす影響、第 70 回日本栄養・食糧学会大会、2016 年 5 月 14 日、武庫川女子大学(西宮)
- (5) 園山慶: 腸内細菌叢の情報を宿主に伝える血中エキソソームの miRNA、第 70 回日本栄養・食糧学会大会 シンポジウム、2016 年 5 月 14 日、武庫川女子大学(西宮)
- (6) 宇都侑莉子: 腸内細菌の有無によるマウス由来血清エキソソーム構成の違い、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 29 日、札幌コンベンションセンター(札幌)
- (7) 齊藤伸一: マウス生体位およびオルガノイドにおける回腸および結腸の機能性遺伝子発現の比較、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター(札幌)
- (8) 園山慶: 腸管オルガノイドを用いた腸粘膜上皮セロトニンシステムの解析、日本農芸化学会 2016 年度大会 シンポジウム、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター(札幌)
- (9) 石宮聡美: 腸内細菌叢は血中エキソソームの miRNA 組成に影響する、日本食物繊維学会 第 20 回学術集会、2015 年 11 月 29 日、伊那食品工業株式会社かんでんぱガーデンセンター(伊那)
- (10) 鶴田剛司: 乳酸菌株を経口投与したマウスの血中エキソソームの miRNA 組成、日本栄養・食糧学会 東北・北海道合同支部会、2015 年 10 月 25 日、東北大学(仙台)
- (11) Tsuruta T: The influence of exosome secreted by macrophage phagocytizing probiotics on adipocyte differentiation, 12th Asian Congress of Nutrition, 2015 年 5 月 15 日、パシフィコ横浜(横浜)
- (12) Sonoyama K: Communication tools mediating the health-promoting action of prebiotics and probiotics, 12th Asian Congress of Nutrition (Symposium), 2015 年 5 月 15 日、パシフィコ横浜(横浜)
- (13) 園山慶: 肥満、食餌および腸内細菌叢の関係における *Akkermansia muciniphila* の意義、第 35 回日本肥満学会 シンポジウム、2014 年 10 月 25 日、フェニックスシーガイアリゾートコンベンションセンター(宮崎)
- (14) 園山慶: メタボリックシンドロームとプロバイオティクス、日本臨床栄養学会特別セミナー、2014 年 7 月 21 日、北海道大学(札幌)
- (15) 園山慶: 腸粘膜バリアの維持・変容・破綻における腸内ムチン分解細菌の意義と難消化性糖類による修飾、第 68 回日本栄養・食糧学会大会 シンポジウム、2014 年 6 月 1 日、酪農学園大学(江別)
- (16) 角田妃菜子: 血清エキソソームはフラクトオリゴ糖の炎症抑制作用を媒介するか? 第 68 回日本栄養・食糧学会大会、2014 年 5 月 31 日、酪農学園大学(江別)
- (17) Phoosawat W: Characteristics of adiponectin associated with exosomes in mouse serum, 第 68 回日本栄養・食糧学会大会、2014 年 5 月 31 日、酪農学園大学(江別)

[その他]

ホームページ  
<http://www.agr.hokudai.ac.jp/fbc/sonoyama/index.htm>

(1)研究代表者

園山 慶 (SONOYAMA KEI)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：90241364

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)連携協力者

なし