

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14736

研究課題名(和文)種を超えたエクソソームシグナル伝達による画期的食品機能性発現の可能性

研究課題名(英文)Evaluation of a novel food function mechanism by the interspecies exosome crosstalk

研究代表者

山崎 正夫 (Yamasaki, Masao)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：80381060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：果実および野菜類の搾汁液をサンプルとし、連続的な超遠心法ですべての果実、野菜類からナノ粒子の調製法を確立した。この粒子は多様な脂質やタンパク質によって構成され、タマネギ由来の粒子にはRNAやフラボノイド類の存在が確認された。また、マクロファージの炎症応答抑制効果が認められたが、内包するフラボノイド類の作用ではないことが示唆された。100℃以下の加熱ではその効果は失活しなかった。また、ウコンからは少なくとも3種類のナノ粒子が回収でき、これらはエンドサイトーシスを介してベシクルが細胞内に取り込まれることで抗炎症活性を発揮することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have established the method for the preparation of nano-particle derived from fruits and vegetables. This particle consists of diverse lipids and proteins, and RNA and flavonoids were occurred in *Allium cepa* derived one. This particle suppressed inflammatory response in macrophage and flavonoids were not responsible for this effect. Heat treatment of this particle did not affect on the anti-inflammatory effect of particle. Three subfractions were recovered from *Curcuma longa* derived nano-particle and all of them were incorporated into the macrophages and showed anti-inflammatory effects.

研究分野：食品機能化学

キーワード：ナノ粒子 抗炎症作用 種間相互作用

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは細胞から分泌されるナノサイズの微粒子であり、細胞間シグナル伝達手段の一つと考えられている。エクソソームの分泌はほとんどのヒトの細胞において観察される現象であり、細胞の生理条件下でエクソソームの質が大きく変化する。一方で、植物中にもエクソソーム (PDEx) の存在は知られているが、食品成分として PDEx がヒトの生理機能に与える影響は未知数である。近年、食品中の PDEx に関する唯一の情報として、ブドウの果汁中に PDEx が発見された (Ju et al *Mol Ther* 2013)。PDEx は他の植物性食品にも幅広く存在すると想定され、これらは日常的に摂取していると考えられる。一方で、PDEx は脂質からなる膜構造を有し、核酸やタンパク質を内包しており、調理過程における加熱、加圧、物理的剪断力などによって崩壊する可能性が考えられる。このような背景から、『精製された食品成分』よりも植物性食品そのものを摂取し、PDEx がインタクトに存在することが、その機能性発現に重要ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は植物性食品中における PDEx に着目し、その物理的特性・成分分析を通じて PDEx の実体を明らかとする。また、様々な植物性食品から PDEx を単離し、腸管炎症予防・改善を標的とした *in vitro* スクリーニングの後、腸管炎症モデルを用いた機能性実証試験を行うことで、PDEx の有用性を検証する。さらには調理・加工工程が PDEx の構造的安定性、機能性に及ぼす影響を検証する。これらの研究成果を通じて、新規食品機能性因子として PDEx の存在を提案するとともに、調理・加工による影響についても提言することを目標とする。本研究成果は、『PDEx が種を超えてヒトの生理機能に作用する』ことを示し、機能性農産物や食品における画期的な機能性成分の存在を提唱する。

3. 研究の方法

PDEx の分離・精製と物性解析

植物性食品として、野菜、果物を準備し、それらの搾汁液を調製する。PDEx はエクソソームの調製法に倣い、現在超遠心法および密度勾配遠心法を併用した。PDEx の粒度分布を確認するため、動的光散乱装置を用いて測定を行なった。エクソソームは、スフィンゴ脂質やリン脂質から構成される膜構造を有している。そこで、PDEx の脂質組成を薄層クロマトグラフィーによって評価した。また、SDS-PAGE 銀染色によってタンパク質プロファイルの解析、

Folin-Ciocalteu 法および HPLC 法によるポリフェノール含量の解析、スピнкаラム精

製による total および small RNA の解析を行った。

In vitro における抗炎症性評価

PDEx の機能性として、腸管内にて PDEx と腸管上皮細胞や腸管に出現する免疫細胞が直接接触して機能性を発現するメカニズムを想定し、腸管における炎症応答に対する影響を評価した。本研究ではマクロファージおよび腸管上皮細胞を用い、それぞれ Toll-like receptor-4, 5 に対するアゴニスト添加により炎症応答を誘発した。炎症応答の指標として、一酸化窒素、IL-8 の分泌量を測定した。また、細胞内での PDEx の挙動を解析するため、PKH26 によって PDEx を蛍光染色し、エンドサイトーシス阻害剤存在下でマクロファージへの取り込み活性を評価した。

PDEx の機能と構造への加熱の影響

PDEx を 20~100°C までの温度で加熱し、粒子径とマクロファージでの炎症応答抑制作用を指標に粒子の安定性を評価した。

4. 研究成果

本研究は、果実、野菜から PDEx を調製する方法の確立から研究を開始した。PDEx の調製は連続的な超遠心法を採用することで、サンプルとして用いたすべての果実、野菜類から PDEx の調製が可能であった。また、得られた PDEx をさらに密度勾配遠心で分離することによって複数の PDEx に分離することができた。遠心強度 (17000xg と 200000xg) の違いによって得られる粒径が多少異なっていたが、動的光散乱法による解析結果から、最も小さなもので、100 nm 程度の粒子を得ることができた。この結果より、PDEx 調製法が確立されたとともに、果実および野菜類中にはほぼ普遍的に PDEx が存在していることが示された。また、粒子の化学的、生理学的特性を解析したところ、多様な脂質やタンパク質によって構成されることが示された。また *Allium cepa* 由来 PDEx からは RNA の存在が確認され、一部は低分子 RNA であり、動物細胞におけるエクソソームに類似した細胞間伝達物質としての役割を持つ可能性が示された。一方で、柑橘由来の PDEx 中には RNA の存在が明確に確認できず、粒子内は強い酸性を示した。

Allium cepa 中の機能性成分として、ケルセチン及びその配糖体類が挙げられるため、これらが PDEx 中に封入されている可能性を検証した。その結果、17000xg 及び 200000xg 沈殿画分として得られた PDEx には、いずれもケルセチン及びその配糖体 2 種類が含まれていた。計算上、*Allium cepa* 果汁中に含まれるケルセチン類の全量のうち 2% 程度はそれぞれの PDEx 中に含まれることが明らかとなり、PDEx がポリフェノール封入体であることが明らかとなった。また、ケルセチン類組成は、可溶性画分での組成に比べて大きな違いは認められなかった。また、*Curcuma longa* を用いて PDEx を調製したところ、重量あたりの回収量が極

めて多く、0-40%スクロースを用いた密度勾配超遠心法により、PDExは3種に分画することが可能であった。これらの平均粒子径は122~182 nmであり、少なくとも3種のクルクミノイドを含有していた。また、40%スクロースを重層した際に得られるPDExはクルクミノイド含量が高く、他の2種のPDExのおよそ10倍を含有していた。

炎症関連細胞への作用として、腸管上皮細胞およびマクロファージをフラジェリンおよびLPSで刺激し、これらの炎症刺激に対する応答へのPDExの作用を評価したところ、*Allium cepa*および*Curcuma longa*由来PDExは炎症応答抑制効果を示した。前述のケルセチン類に着目して、マクロファージへのケルセチン類の移行を定量したが、細胞内でのケルセチン量は極めて微量か、検出限界以下であり、ケルセチン類がナノ粒子の機能性における活性本体ではないことが推察された。また、*Curcuma longa*由来PDExをPKH26で蛍光染色し、*in vitro*での動体を検討したところ、PDExはエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれることが示された (図3)。

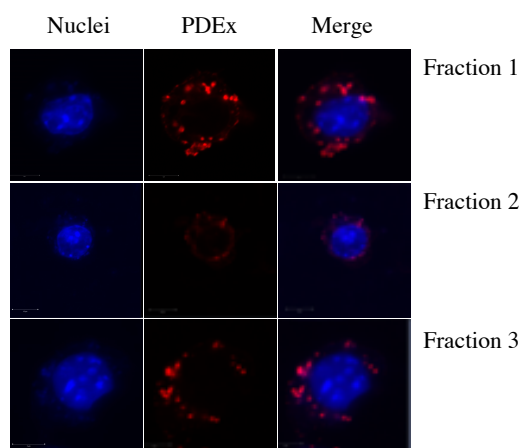


図3 *Curcuma longa*由来PDExのマクロファージへの取り込み

PDExの熱安定性を検証するため、20~100°CでPDExを加熱した後、粒子径の測定とマクロファージでの炎症応答抑制効果の評価した。その結果、加熱によってわずかな粒径の変化や活性の低下が認められたが、概ね活性は高温でも維持されていた。従って、PDExに含有される炎症応答抑制物質は熱耐性があることが示唆された。

以上の結果から、本研究によって果実・野菜からPDExの調製法が確立できたと考えられる。また、PDExの物理化学的性質は物体のサイズや成分組成から考えてエクソソームに類似していることが示された。また、PDExは植物由来のファイトケミカルを含有するものが存在し、細胞膜透過性や腸管吸収性の低いファイトケミカルの利用性がPDExに封入されることでどのように変化するか興味深い点である。一方で、*in vitro*において確認されたPDExの炎症応答抑制効果に関して、少なくとも*Allium cepa*および*Curcuma longa*由来PDEx

の作用は内包するフラボノイドやクルクミノイドの作用では説明できないことが示された。

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8件)

- ① M. Yamasaki, Y. Matsuyama, R. Hayasegawa, K. Hamada, K. Nishiyama, T. Kai, K. Kamenaga, T. Arakawa, H. Tari, Y. Shimizu, Y. Matsuura, C. Yukizaki, Blueberry (*Vaccinium virgatum* Aiton) leaf extract ameliorates insulin resistance in mice fed a high-fat, high-sucrose diet. *Food Sci Technol Res* 21 827-833 (2015) DOI: 10.3136/fstr.21.827 (査読あり)
- ② M. Yamasaki, H. Kanazaki, R. Fujioka, K. Kishita, K. Nishiyama, K. Yamamoto, S. Hamayama, M. Shimizu, Nano-emulsions of conjugated linoleic acid suppresses inflammatory response in macrophage but not in experimental inflammatory bowel disease condition. *Eur J Sci Res* 135, 317-330 (2015) (査読あり) http://www.europeanjournalofscientificresearch.com/issues/EJSR_135_3.html
- ③ T. Nakanishi, Y. Tokunaga, M. Yamasaki, L. Erickson, S. Kawahara, Orally administered conjugated linoleic acid ameliorates allergic dermatitis induced by repeated applications of oxazolone in mice. *Anim Sci J* 87, 1554-1561 (2016) (査読あり) DOI: 10.1111/asj.12603.
- ④ K. Kishita, K. Ibaraki, S. Itakura, Y. Yamasaki, N. Nishikata, K. Yamamoto, M. Shimizu, K. Nishiyama, M. Yamasaki, Preparation of conjugated linoleic acid microemulsions and their biodistribution. *J Oleo Sci* 65, 949-954 (2016) (査読あり) DOI: <https://doi.org/10.5650/jos.ess16099>
- ⑤ K. Yamasaki, H. Nagatomo, Y. Kawamura, K. Sugamoto, T. Kai, K. Kamenaga, M. Takeshita, Y. Kikuchi, Y. Matsuura, C. Yukizaki, K. Nishiyama, M. Yamasaki, A single dose of blueberry leaf extract suppresses serum ethanol levels after oral ethanol administration in rats. *Eur J Sci Res* 140, 352-365 (2016) (査読あり) http://www.europeanjournalofscientificresearch.com/issues/EJSR_140_4.html
- ⑥ 木下和昭、野見山将太、山崎正夫：共役脂肪酸の多様な機能性とその利用臨床利用への足掛かり、日本農芸化学会誌「化学と生物」 54, 72-74 (2016) <https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.54.72> (査読あり)
- ⑦ R. Fujioka, K. Nishiyama, M. Yamasaki, Dietary borage oil promotes

gamma-linoleic acid accumulation in dextran sulfate sodium-treated mice but does not manipulate the severity of colitis. *J Food Nutr Res* 5, 151-155 (2017) (査読あり)

DOI: 10.12691/jfnr-5-3-2

- ⑧ M. Yamasaki, K. Hamada, K. Fujii, K. Nishiyama, H. Tari, K. Araki, T. Arakawa, *Vaccinium ashei* leaves extract alleviates insulin resistance via AMPK independent pathway in C2C12 myotube model. *Biochemistry and Biophysics* (in press) (査読あり)

[学会発表](計15件)

- ① Study on Physiological Function of Lipid Nanoemulsions: K. Kishita, K.. Yamamoto, S. Hamayama, M. Shimizu, K. Nishiyama, M. Yamasaki 12th Asian Congress of Nutrition (ACN) 2015 (Yokohama) 2015年5月
- ② 接着分子 integrin を標的とした α -リポ酸によるガン細胞の転移・浸潤抑制: 山崎正夫, 早田昌然, 岩瀬将弘, 池田正浩, 西山和夫 第8回トランスポーター研究会九州部会(鹿児島) 2015年7月
- ③ トコトリエノールによる ATL 細胞死誘導効果とメバロン酸代謝: 山崎正夫, 西村海里, 榊原陽一, 水光正仁, 森下和広, 西山和夫 第18回 Vitamin E Update Forum (東京) 2015年8月
- ④ プロポリス、メリンジョ種子含有食がアルコール代謝とアルコール性肝障害に与える影響: 山崎楓, 長友宏賢, 西山和夫, 山崎正夫 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会(沖縄) 2015年10月
- ⑤ 宮崎伝統野菜糸巻きダイコンの栄養成分及び抗酸化活性解析: 山崎有美, 山崎楓, 杉村和実, 谷口寛俊, 山崎正夫 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会(沖縄) 2015年10月
- ⑥ ブルーベリー葉抽出物 (BLEx) 摂取がアルコール代謝とアルコール性肝障害に与える影響: 山崎楓, 長友宏賢, 菅本和寛, 甲斐孝憲, 亀長浩蔵, 竹下正彦, 菊地幸治, 松浦靖, 柚木崎千鶴子, 西山和夫, 山崎正夫 日本農芸化学会 2016年度(平成28年度)大会(北海道) 2016年3月
- ⑦ ブルーベリー葉抽出物 (BLEx) によるインスリン抵抗性改善作用: 濱田健作, 田里博之, 荒川輝晃, 甲斐孝憲, 亀長浩蔵, 松浦靖, 柚木崎千鶴子, 西山和夫, 山崎正夫 日本農芸化学会 2016年度(平成28年度)大会(北海道) 2016年3月

- ⑧ 共役脂肪酸の機能性探索と応用: 山崎正夫 第70回日本栄養・食糧学会シンポジウム『脂質素材の新たな展開』(兵庫) 2016年5月
- ⑨ ブルーベリー葉抽出物 (BLEx) 投与がアルコール代謝とアルコール性肝障害に与える影響: 山崎楓, 河村由樹, 長友宏賢, 菅本和寛, 甲斐孝憲, 亀長浩蔵, 竹下正彦, 菊地幸治, 松浦靖, 柚木崎千鶴子, 西山和夫, 山崎正夫 フードサイエンスフォーラム第22回学術集会(岡山) 2016年9月
- ⑩ タマネギ由来エクソソーム様ナノ粒子の基礎的分析: 古庄利菜, 山崎水優, 高島沙季, 花本由輝, 園田紘子, 池田正浩, 亀井一郎, 大島達也, 山崎有美, 西山和夫, 山崎正夫 日本農芸化学会 2017年度(平成29年度)大会(京都) 2017年3月
- ⑪ 食用植物由来エクソソーム様ナノ粒子のヒト乳がん抑制作用: 山崎有美, 亀井一郎, 大島達也, 池田正浩, 園田紘子, 山崎正夫 日本農芸化学会 2017年度(平成29年度)大会(京都) 2017年3月
- ⑫ ブルーベリー葉抽出物の抗肥満作用におけるポリフェノール類の役割: 藤井健斗, 太田優磨, 荒川輝晃, 荒木佳織, 田里博之, 西山和夫, 山崎正夫 第71回日本栄養・食糧学会大会(沖縄) 2017年5月
- ⑬ 9-ニトロオレイン酸はヒト膀胱がん細胞の増殖を抑制するが遊走を促進する: 一万田晃, 松木美佐, 児玉大輔, 野見山将太, 菅本和寛, 山崎正夫, 西山和夫 フードサイエンスフォーラム第23回学術集会(宮崎) 2017年9月
- ⑭ *Cordyceps Militaris* の抽出物による腸管上皮細胞の炎症応答抑制作用: 南大喬, 西山和夫, 山崎正夫 日本食品科学工学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会(長崎) 2017年10月
- ⑮ 9-ニトロオレイン酸とスルフォラファンはヒト膀胱がん細胞の増殖を抑制するが遊走を促進する: 児玉大輔, 一万田晃, 松木美佐, 野見山将太, 菅本和寛, 山崎正夫, 西山和夫 日本食品科学工学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会(長崎) 2017年10月

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

(研究室)

http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~abs/nishiyama_yamasaki/

(宮崎大学 重点領域研究プロジェクト
“学部横断的細胞ベジクル研究拠点形成”)

<http://www.miyazaki-u.ac.jp/research/project-2/18-18.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 正夫 (YAMASAKI Masao)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号:80381060

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし