

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16200

研究課題名(和文) プロバイオティクスの刺激情報を伝達する貪食細胞エキソソームの解析

研究課題名(英文) Exosomes secreted by phagocytes mediate transduction of probiotic stimulation

研究代表者

鶴田 剛司 (Tsuruta, Takeshi)

岡山大学・環境生命科学研究科・准教授

研究者番号：90728411

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)：これまで乳酸菌株の刺激が腸管から脂肪組織へ伝達される仕組みは不明であった。本研究では、その伝達を媒介する因子として乳酸菌を貪食した細胞が分泌する細胞外小胞(EVs)に着目し、これを検証した。乳酸菌を貪食した細胞が分泌したEVsは脂肪細胞に作用し、脂肪蓄積に関わる遺伝子発現を調節することで脂肪蓄積を抑制した。また、EVsの作用は脂肪細胞特異的にみられることが示唆された。本研究から、プロバイオティクスが脂肪組織で効果を発揮する際に、EVsが脂肪組織に刺激を伝達する役割を果たしていることが明らかとなった。今後は、EVsを指標とした脂肪組織の脂肪蓄積を抑制するプロバイオティクス株の探索を行う。

研究成果の概要(英文)：Lactobacillus plantarum strain No. 14 (LP14) has been known to exert anti-adipogenic effect in mice adipose tissue. However, underlying mechanism of anti-adipogenic effect of LP14 remains to be elucidated. In this study, we confirmed one hypothesis that anti-adipogenic effect of LP14 is mediated by extracellular vesicles (EVs) shed by macrophage phagocytizing LP14. The results indicated that LP14 EVs suppressed fat accumulation in 3T3L1 cells via down-regulation of gene expression related to differentiation of adipocytes such as KLF-5 and C/EBP. Moreover, LP14 EVs suppressed glucose uptake in 3T3L1 cells through the down-regulation of GLUT1 and GLUT4, but not in skeletal muscle cell line C2C12 cells. Our study suggest that macrophage might transfer LP14 stimuli to adipocytes via EVs and regulate fat accumulation and glucose uptake specific in adipocytes.

研究分野：食品機能学

キーワード：細胞外小胞 プロバイオティクス

## 1. 研究開始当初の背景

経口摂取したプロバイオティック乳酸菌は腸管のパイエル板より取り込まれ、マクロファージをはじめとする食食細胞によって食食される。その後、脂肪組織などの末梢組織の生理状態に影響を与え、抗肥満効果などの様々な健康機能を発揮することが知られている。我々の研究においても、*Lactobacillus plantarum* No. 14 株を高脂肪食摂取マウスに経口投与すると、脂肪組織の脂肪蓄積が抑制されることが明らかとなっている。しかしながら、プロバイオティック乳酸菌が、腸管から離れた脂肪組織を構成する細胞にいかにしてその刺激を伝達し、健康機能を発揮しているかは不明であった。以下に示す過去の2つの報告から、我々はプロバイオティック乳酸菌の刺激伝達を媒介する因子として「食食細胞が分泌する細胞外小胞」に着目した。報告①食食細胞が細菌を食食後、細胞外小胞を分泌し、その細胞外小胞を取り込んだ細胞の免疫応答を調節する。報告②食食細胞(マクロファージ)が分泌した細胞外小胞は脂肪細胞のインスリン感受性を下げる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、No. 14 株による脂肪細胞の脂肪蓄積抑制作用が No. 14 株を食食した食食細胞(マクロファージ)が分泌した細胞外小胞によって媒介されていることを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨髄由来マクロファージの培養

マウス骨髄細胞由来のマクロファージ(BMDM)を供試した。7週齢のC57BL/6Jマウスの大腿骨から骨髄細胞を採取した。マウス繊維芽細胞株 L929 細胞の培養上清を添加した DMEM 培地で培養することによりマウスマクロファージへの分化を誘導した。

### (2) No. 14 株とマクロファージの共培養

No. 14 株は MRS 培地にて 24 時間培養し、吸光度(OD600)と Colony forming unit (CFU) からあらかじめ作成した検量線より培養液中の細菌数を算出した。分化誘導したマウス BMDM を 15 cm ディッシュに 80%コンフルエントになるまで培養し、No. 14 株を添加した ( $5 \times 10^7$  CFU/ディッシュ)。No. 14 株を添加後、72 時間培養し、培養上清を回収した。No. 14 株非添加のマクロファージも同様に培養し、培養上清を回収した。

### (3) 培養上清中の細胞外小胞の回収

No. 14 株非添加のマクロファージおよび No. 14 株を添加したマクロファージが産生した細胞外小胞(それぞれ Control EVs および No. 14 EVs) を超遠心分離法により回収した。培養上清を段階的に遠心分離(200 g、10 分×1 回、500 g、10 分×2 回、2000 g、

15 分×1 回) した後、上清を回収し、フィルター濾過(0.2  $\mu$ m) した。濾過後、上清を超遠心分離した(100,000 g、2 時間)。超遠心分離後、上清を除去し、5 mL の PBS で洗浄した。洗浄後、超遠心分離を行い(100,000 g、2 時間)、上清を除去した。PBS で再懸濁後、フィルター濾過(0.2  $\mu$ m) を行った。回収した EVs 量を BCA 法により定量した。

(4) 細胞外小胞の定性解析および形態観察  
回収した EVs の形態を、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

また、EVs のマーカータンパク質である CD9 の発現をウェスタンブロッティング法により評価した。

(5) 細胞外小胞の細胞内取り込み量の評価  
3T3L1 細胞および C2C12 細胞(マウス骨格筋細胞)への EVs の取り込み量を評価した。Control EVs および No. 14 EVs をそれぞれ蛍光色素 PKH67 で染色し、各細胞に添加した。細胞内に取り込まれた EVs の取り込み量を蛍光プレートリーダーで定量した。また、蛍光顕微鏡により EVs の取り込みを観察した。

(6) EVs が脂肪細胞の脂肪蓄積に及ぼす影響  
3T3L1 細胞(マウス前駆脂肪細胞株)を供試した。各細胞株を培養し、Control EVs または、No. 14 EVs (0.1、1 または 10  $\mu$ g/mL) を添加した分化誘導培地を用いて成熟脂肪細胞への分化を誘導した。分化誘導後、10 日目に脂肪蓄積量を Adipored 法により評価した。Adipored Reagent を添加し、脂肪細胞内の脂肪滴に結合した Adipored の蛍光量を蛍光マイクロプレートリーダーを用いて脂質に結合した Adipored の蛍光量を測定した(励起波長: 485 nm、蛍光波長: 572 nm)。

また、脂肪蓄積に関係する遺伝子の発現量に及ぼす影響を検証するために EVs (10  $\mu$ g/mL) を添加した分化誘導培地を添加後 6 時間目に細胞を回収し、細胞から全 RNA を抽出・精製した。回収した細胞の全 RNA から逆転写反応により cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として脂肪蓄積に関係する遺伝子の発現量を Real time PCR 法により定量した。

(7) EVs が脂肪細胞および骨格筋細胞の糖取り込みに及ぼす影響

3T3L1 細胞および C2C12 細胞を供試した。各細胞に Control EVs または、No. 14 EVs (0.1、1 または 10  $\mu$ g/mL) を添加し、12 時間培養したのちに、インスリン存在下で蛍光グルコース 2-NBDG の取り込み量を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 細胞外小胞の定性解析および形態観察  
Control EVs および No. 14 EVs を透過電子顕微鏡観察した結果を図 1a に示した。Control EVs および No. 14 EVs の形態および

サイズに明確な違いは見られなかった。CD9の発現解析の結果を図2に示した。Control EVs および No. 14 EVs のどちらにおいてもEVsのマーカートンパク質であるCD9が検出された。

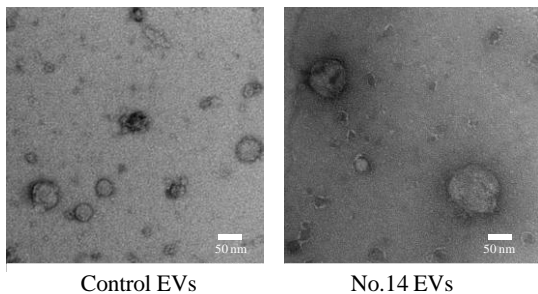
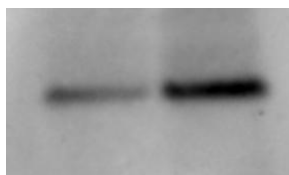


図1 EVsの形態観察



Control EVs No.14 EVs

図2 EVsのCD9発現

(2) 細胞外小胞の細胞内取り込み

3T3L1細胞およびC2C12細胞へのEVsの取り込み量の経時変化を図3Aおよび3Bにそれぞれ示した。両細胞株ともに、EVsの取り込み量は経時的に増加することが明らかとなった。また、No. 14 EVsの取り込み量はControl EVsと比較して有意に低い値を示した。

EVs添加量を段階的に増加させた際の、EVsの取り込み量の変化を図4A(3T3L1)および4B(C2C12)に示した。両細胞株ともに、EVs添加量を5 μg/mLにした際にEVsの取り込み量は飽和状態になることが明らかとなった。

EVs取り込みの観察結果を図5A(3T3L1)および5B(C2C12)に示した。青色は核(DAPI)、緑色はPKH67染色したEVsをそれぞれ示している

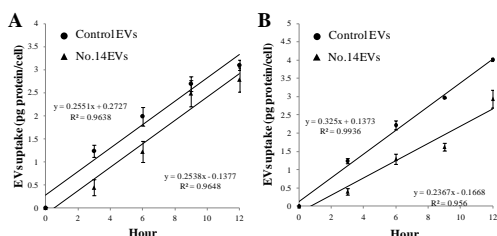


図3 EVs取り込み量の経時変化

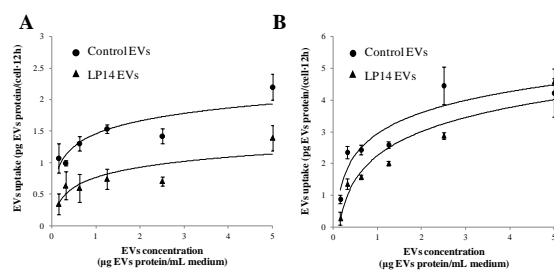
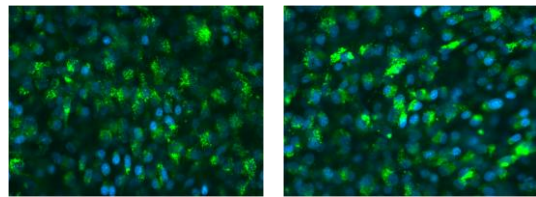
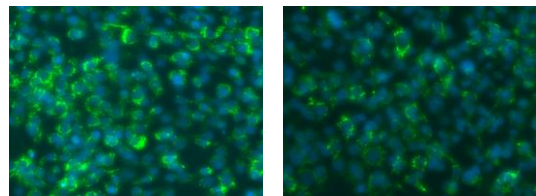


図4 EVs添加量によるEVs取り込み量の変化

A 3T3L1



B C2C12



Control EVs

No.14EVs

図5 EVsの取り込み観察

(3) EVsが脂肪細胞の脂肪蓄積に及ぼす影響  
①脂肪蓄積量への影響

3T3L1細胞の脂肪蓄積量の定量結果を図6に示した。Control EVsおよびNo. 14 EVsともに添加量依存的に脂肪蓄積を抑制した。No. 14 EVsを添加した細胞はControl EVsを添加した細胞と比較して有意に脂肪蓄積量が少なかった。この結果から、マクロファージが分泌したEVsによる脂肪蓄積抑制作用はNo. 14株の食食によって強化されることが示唆された。また、マウスへのNo. 14株の投与実験でみられた脂肪蓄積抑制作用は細胞外小胞によって媒介されていることが示唆された。

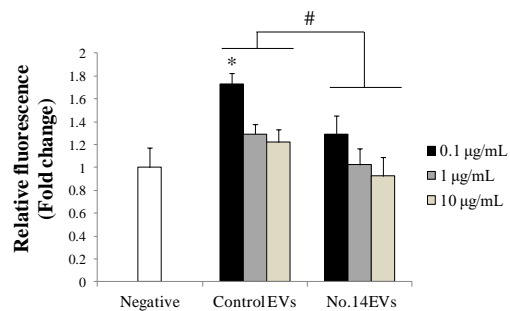


図6 EVsが3T3L1の脂肪蓄積に及ぼす影響

②脂肪蓄積関連遺伝子の発現に及ぼす影響

脂肪蓄積に関わる遺伝子として転写因子であるKLF5、C/EBPα、C/EBPβ、C/EBPδ、PPARγを、脂肪蓄積関連遺伝子としてACCI、FAS、Acy1、LPL、GPD、Gpm、AGPAT2を、脂肪分解関連遺伝子としてPLIN1、CGI58、HSL、ATGL、GOS2の遺伝子発現をそれぞれ定量した。転写因子のうち、KLF5およびその下流の転写因子であるC/EBPαのみNo. 14 EVs添加群で有意に発現が抑制された。また、C/EBPαの下流遺伝子である脂肪酸合成・取り込みに関わるFASおよびLPLもNo. 14 EVs添加群で有

意に発現が抑制された。中性脂肪合成に関わる GPD、Gpam、AGPAT2 のうち Gpam のみ No. 14 EVs 添加群で有意に発現が抑制された。脂肪分解関連遺伝子は PLIN1 のみ No. 14 EVs 添加群で有意に発現が抑制された。これらの結果から、上流の転写因子である KLF-5 に No. 14 EVs が作用することで、その下流の転写因子である C/EBP $\alpha$  の発現が抑制され、脂肪細胞の分化が抑制されたことが示唆された。

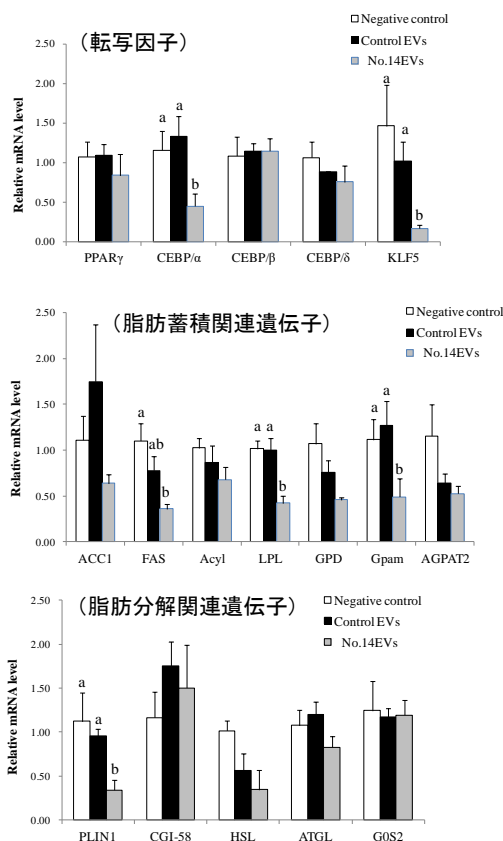


図7 EVsが3T3L1の遺伝子発現に及ぼす影響

(4) EVs が脂肪細胞および骨格筋細胞の糖取り込みに及ぼす影響

3T3L1 および C2C12 細胞の糖取り込み量の定量結果を図 8A および 8B にそれぞれ示した。3T3L1 細胞では、EVs 非添加・インスリン処理細胞と比較して 10  $\mu$ g/mL の Control EVs を添加した細胞およびすべての添加濃度の No. 14 EVs を添加した細胞で糖取り込みが有意に抑制された (図 8A)。また、No. 14 EVs を添加した細胞の糖取り込み量は Control EVs を添加した細胞と比較して有意に低い値を示した (図 8A)。

一方、C2C12 細胞では、EVs の添加量に関係なく、Control EVs および No. 14 EVs は糖取り込みに影響を及ぼさなかった。

これらの結果から、No. 14 EVs は脂肪細胞の糖取り込みを抑制するが、骨格筋細胞の糖取り込みには影響を及ぼさないことが明らかとなった。

(3) および (4) の結果から、No. 14 EVs はインスリン依存的な脂肪細胞の脂肪蓄積

および糖取り込みを抑制することが明らかとなった。これは、No. 14 EVs が脂肪細胞のインスリン感受性を低下させることを示唆している。骨格筋細胞ではインスリン依存的な糖取り込みに及ぼさなかったことから、No. 14 EVs によるインスリン感受性の低下作用は脂肪細胞に特異的に起こる現象であることが示唆された。

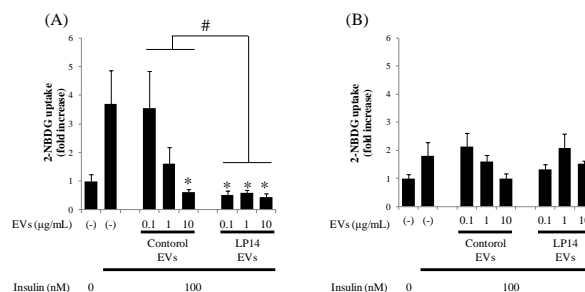


図8 EVsが3T3L1およびC2C12の糖取り込みに及ぼす影響

## 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 10 件)

- 1) Aoki-Yoshida A, Saito S, Tsuruta T, Ohsumi A, Tsunoda H, Exosomes isolated from sera of mice fed Lactobacillus strains affect inflammatory cytokine production in macrophages in vitro, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, in press (2017)
- 2) Phan YTN, Tang MT, Tran TMT, Nguyen VH, Nguyen TH, Tsuruta T and Nishino N, Diversity of lactic acid bacteria in vegetable-based and meat-based fermented foods produced in the central region of Vietnam, *AIMS Microbiol*, 査読有, 3(1), 61-70, DOI: 10.3934/microbiol.2017.1.61 (2017)
- 3) Ni K, Tang TM, Tran TMT, Tsuruta T, Pang H & Nishino N. Comparative microbiota assessment of wilted Italian ryegrass, whole crop corn, and wilted alfalfa silage using denaturing gradient gel electrophoresis and next generation sequencing. *Applied Microbiology Biotechnology*, 査読有, DOI: 10.1007/s00253-016-7900-2. (2016)

- 4) Yajima M, Karaki S, Tsuruta T, Kimura S, Nio-Kobayashi, Kuwahara A & Yajima T. Diversity of the intestinal microbiota differently affects non-neuronal and atropine-sensitive ileal contractile responses to short-chain fatty acids in mice. *Biomedical Research*, 査読有, 37 (5), 319-328 (2016)
- 5) Bai G, Ni K, Tsuruta T & Naoki Nishino. Dietary Casein and Soy Protein Isolate Modulate the Effects of Raffinose and Fructooligosaccharides on the Composition and Fermentation of Gut Microbiota in Rats. *J Food Sci*, 査読有, DOI: 10.1111/1750-3841.13391, 81: 2093-2098, (2016)
- 6) Romero-Pérez GA, Egashira M, Harada Y, Tsuruta T, Oda Y, Ueda F, Tsukahara T, Tsukamoto Y & Inoue R. Orally Administered *Salacia reticulata* Extract Reduces H1N1 Influenza Clinical Symptoms in Murine Lung Tissues Putatively Due to Enhanced Natural Killer Cell Activity. *Front Immunol*, 査読有, 7: 1-9. (2016)
- 7) Yajima M, Kimura S, Karaki S, Nio - Kobayashi J, Tsuruta T, Kuwahara A, Yajima T, Iwanaga T. Non-neuronal, but atropine-sensitive ileal contractile responses to short-chain fatty acids: age-dependent desensitization and restoration under inflammatory conditions in mice. *Physiol Reports*, 査読有, 4: 1-11. (2016)
- 8) Tsuruta T, Shinichi Saito, 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. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 474: 161-167. (2016)
- 9) 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. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 458: 362-368. (2015)
- 10) Asano M, Yamamoto T, Tsuruta T, Nishimura N & Sonoyama K. Dual-labeling with 5-bromo-2'-deoxyuridine and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine for estimation of cell migration rate in the small intestinal epithelium. *Dev Growth Differ*, 査読有, 57: 68-73. (2015).
- [学会発表] (計 15 件)
1. 鶴田剛司、伊藤洋平、西野直樹、Terry Muhomah、園山慶 *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細胞種選択的に細胞の栄養代謝に影響を及ぼす、日本栄養・食糧学会、沖縄コンベンションセンター (沖縄)、2017 年 5 月 20 日
  2. 尾崎 洋輔, 鶴田 剛司, 斉藤 伸一, 園山 慶 1-ケストースの摂取がマウス腸粘膜上皮におけるセロトニン動態に及ぼす影響の解析、日本食物繊維学会、静岡大学 (静岡)、2016 年 11 月 28 日
  3. 関 真美、尾崎 洋輔、鶴田 剛司、園山 慶、1-ケストースの摂取はマウスの回腸粘膜における RegIII  $\beta$  の遺伝子発現と血漿中タンパクレベルを増加させる、日本食物繊維学会、静岡大学 (静岡)、

- 2016年11月28日
4. 鶴田剛司、伊藤洋平、西野直樹、Terry Muhomah、園山慶 *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白色脂肪細胞の脂肪蓄積を抑制する、日本栄養・食糧学会中四国支部会、徳島大学(徳島)、2016年11月12日
  5. 福田久仁香、西野直樹、園山慶、鶴田剛司 牛乳中の細胞外小胞によるヒト大腸癌細胞株 Caco-2 細胞の増殖抑制作用、日本栄養・食糧学会中四国支部会、徳島大学(徳島)、2016年11月12日
  6. 鶴田剛司、福田久仁香、西野直樹、牛乳中に含まれる微小膜小胞の大腸癌細胞株の増殖抑制作用、岡山大学知恵の見本市2016、岡山大学(岡山)、2016年11月11日
  7. 鶴田剛司、伊藤洋平、西野直樹、Terry Muhomah、園山慶 *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白色脂肪細胞の脂肪蓄積を抑制する、日本食品免疫学会、伊藤謝恩ホール(東京)、2016年11月10日
  8. Takeshi Tsuruta、Terry Muhomah、Yohei Ito、Naoki Nishino、Kei Sonoyama The influence of exosome secreted by macrophage phagocytizing probiotics on adipocyte differentiation、Kenia-Africa Day 2016、岡山大学(岡山)、2016年10月10日
  9. 尾崎洋輔、鶴田剛司、斉藤伸一、園山慶 短鎖脂肪酸がマウス結腸オルガノイドのセロトニンシステムにおよぼす影響、日本栄養・食糧学会、武庫川女子大学(兵庫)、2016年5月13日
  10. 西野直樹・Kuikui Ni・Ngoc Phan Thi Yen・Wu Baiyila・鶴田剛司 「DGGE および NGS によるイタリアンライグラス、アルファルファおよびトウモロコシサイレージの細菌叢解析、日本畜産学会、日本獣医生命科学大学(東京)、2016年3月27日
  11. 呉浩銘・杉本裕亮・田辺裕司・鶴田剛司・西野直樹 Bacterial community of dairy cow milk with various levels of somatic cell count、日本畜産学会、日本獣医生命科学大学(東京)、2016年3月27日
  12. 石宮聡美、角田妃菜子、鶴田剛司、青木(吉田)綾子、斉藤伸一、園山慶 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 伊那食品工業株式会社 2015年11月28日
  13. 尾崎洋輔、鶴田剛司、斉藤伸一、園山慶 R-spondin および Noggin の発現細胞株の作成とマウス腸管オルガノイドへの応用、日本農芸化学会北海道支部会、とかちプラザ(帯広)、2015年8月8日
  14. 鶴田剛司、青木(吉田)綾子、大角有里沙、石宮聡美、斉藤伸一、園山慶、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 日本農芸化学会北海道支部会、とかちプラザ(帯広)、2015年8月8日
  15. Tsuruta T、Aoki-Yoshida A, Sonoyama K. The influence of exosome secreted by macrophage phagocytizing probiotics on adipocyte differentiation. 12<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition. Yokohama, Japan. 14<sup>th</sup> May, 2015
- [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  
 6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 鶴田 剛司 (TSURUTA Takeshi)  
 岡山大学・大学院環境生命科学研究所・准教授  
 研究者番号: 90728411  
 (2) 研究協力者  
 伊藤 洋平 (ITO Yohei)