

令和元年6月5日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04927

研究課題名(和文) Exosome, マイクロRNAに着目した機能性食品成分の新しい作用機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the food functions focused on exosome and microRNA

研究代表者

関 泰一郎 (SEKI, Taiichiro)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20187834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：食品は3つの異なる機能を有しており、そのうち私たちのからだの働きを調整し、健康増進につなげる機能(三次機能)が注目されている。本研究課題では、食品の機能性発現に関わる新しいメカニズムについて、miRNAに着目して研究を展開した。これまでに我々が抗肥満作用を明らかにしているガーリックの機能性成分ジアリルトリスルフィド(DATS)をラットに投与後、脂肪組織におけるmiRNAの変化を中心に網羅的に解析し、いくつかのmiRNAがDATSの抗肥満作用と関連していること、DATSによりいくつかの代謝系が制御されていること、miRNAによる新しい遺伝子発現調節の可能性などを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロRNA(miRNA)と呼ばれる21-25塩基の1本鎖のRNAが関与する遺伝子発現調節機構と食品成分の機能性の関係に着目した。miRNAはがんをはじめとした様々な疾患との関連が注目されてきたが、食品の機能性との関連については研究途上であった。これまでの研究では、食品由来の機能性成分とその標的分子の直接的な相互作用による作用メカニズムが多く報告されていたが、本研究ではmiRNAを介した食品の新しい機能性発現機構を解明し、さらにはmiRNAによる新しい転写調節機構解明の糸口を提供できた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the novel mechanisms governing food function, we focused on miRNA in this research project. As a model compound, we selected diallyl trisulfide derived from garlic, which we have demonstrated the anti-obesity effect. We performed both mRNA and miRNA microarray analyses to explore the changes in the levels of miRNAs in the adipose tissue after administration of DATS to rats. We found several miRNAs had been changed with the anti-obesity effects by DATS. Analyses of transcriptome data by weighted Parametric Gene Set Analysis (wPGSA) predicted the transcription regulators responsible for observed gene expression. We also clarified by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) that regulation by DATS of some metabolic systems, and the novel gene expression system by the miRNAs.

研究分野：栄養生理化学

キーワード：miRNA garlic obesity

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

### 1. 研究開始当初の背景

近年、わが国においては、生活習慣病の増加に伴い、食品の機能を担う成分の同定、生体内・細胞内の分子標的、機能性発現メカニズムに関する研究が活発に展開されてきた。特に平成 27 年 4 月の消費者庁による食品機能性表示食品制度の創設により、食品の安全性と有効性をより慎重に議論する機運が高まった。一方、食品やその成分の機能性発現メカニズムに関しては、成分と効果(介入試験)を結びつけた研究が多く、本研究開始時点においても本質的な機能発現メカニズムに関して言及した研究は少ない状況であった。これまでに我々は、食品の機能性について栄養生理化学的な観点から追究し、食品由来成分の分子・細胞レベルでの解析を行い、ネギ科植物由来の含硫化合物の生理機能を解明してきた。これらの研究の過程で、*in vitro*での分子間反応による制御と *in vivo*での経口投与実験で得られる知見に乖離があることに気づき、何らかの第三の因子の存在・関与を考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、食品の機能性発現メカニズムにマイクロ RNA (以下 miRNA) が関与していると仮定し、機能性食品成分の個体、臓器、細胞レベルでの機能発現と miRNA の発現を網羅的に関連付けて解析し、食品の新しい機能性発現メカニズムを明らかにすることを目的としている。miRNA は、遺伝子の転写後調節を行う最も重要な因子であると考えられている。これまでに 2000 種類を超える miRNA が発見されているが、その機能に関する知見は乏しく、ほとんどが、がんに関するものである。miRNA は生体内の様々な細胞から exosome と呼称される脂質二重膜の vesicle に包含されて血液中に放出される。本研究では、すでに申請者らが機能性を明らかにしている食用植物由来の sulfide 類を中心に検討を開始し、これらの成分が(1)高脂肪食誘導の肥満、脂肪組織の炎症、脂質代謝に及ぼす影響と miRNA の血中発現動態を網羅的に解析する。また、(2)血栓形成、血管合併症に及ぼす影響を、血管内皮、血小板などの細胞レベル、血液凝固因子、plasminogen などの allosteric disulfide bond を形成する因子に対する影響を、分子、遺伝子発現のレベルで解析する。ここでは特に(1)に関する研究成果について報告する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物と飼育方法

Sprague-Dawley オスラット(5 週齢)に標準固型飼料と滅菌水を 1 週間自由摂取させた後に、AIN-76 に準拠した高脂肪食(60 kcal% fat)と滅菌水を 1 週間自由摂取させ予備飼育を行った。その後、高脂肪食を給餌しながら DATS を投与する DATS 群と、高脂肪食を給餌しながら DATS を懸濁した溶媒のみを投与する Vehicle 群の 2 群に分けた。DATS 群には Methyl Cellulose(MC, Wako)に懸濁した DATS を 500  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  b.w.の投与量で、Vehicle 群には MC のみを 5 ml/kg b.w.の投与量で 2 日に 1 回明期開始時(午前 8 時)に経口投与した。投与は 10 週間行った。試験期間中、水及び餌は自由に摂取させ、室温  $22 \pm 2$  , 12 時間の明暗サイクルで飼育した。

#### (2) 血漿ならびに臓器の回収

実験終了時には心臓より採血後、血漿を調製し、各種血液生化学的解析を行った。採血後 PBS で全身灌流を行い、各種臓器、白色脂肪組織を摘出した。

#### (3) 肝臓ならびに精巢上体白色脂肪組織からの total RNA の抽出と解析

肝臓、脂肪組織からの total RNA の抽出には miRNeasy Mini Kit(Qiagen)を用いた。各種 mRNA の定量は、cDNA を合成後、KOD SYBR qPCR Mix(TOYOBO)を用いて Step one リアルタイム PCR(Applied Biosystems)により行った。内在性コントロールとして Gapdh を用いた。目的遺伝子の発現量は  $\Delta\Delta\text{Ct}$  法で算出した。miRNA 定量用の cDNA 合成には Universal cDNA synthesis kit(Exiqon)を用いた。cDNA を合成後、ExiLent SYBR Green master mix(Exiqon)と各 primer を加え Step one リアルタイム PCR(Applied Biosystems)により各 miRNA 発現の解析を行った。内在性コントロールとして U6 を用いた。目的遺伝子の発現量は  $\Delta\Delta\text{Ct}$  法で算出した。

#### (4) mRNA および miRNA のマイクロアレイ解析

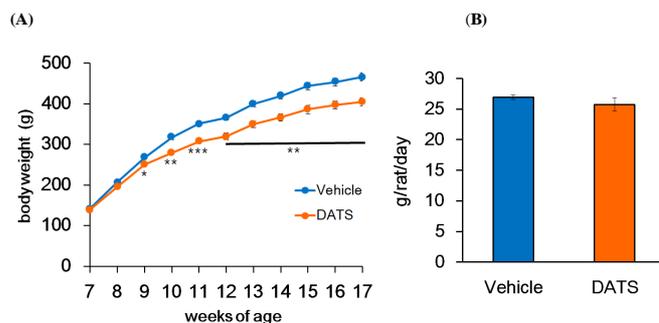
精巢上体白色脂肪組織から抽出した total RNA を用いて、白色脂肪組織における mRNA および miRNA の網羅的な発現解析を行った。mRNA および miRNA のマイクロアレイ解析は 3D-Gene Rat Oligo chip 20k、3D-Gene Rat miRNA Oligo chip(Toray)を用いて実施した。分析によって得られたデータから、DATS 処理によって発現レベルが 1.5 倍以上変化し、 $p$  値が 0.05 より小さい遺伝子を発現変動遺伝子として抽出した。また、有意に変化した生物学的プロセスおよび代謝経路を特定するために、Gene Set Enrichment Analysis を実施した。発現が変動した遺伝子群を制御する転写因子は weighted Parametric Gene Set Analysis(wPGSA)によって推定した。

### 4. 研究成果

#### (1) DATS の抗肥満作用

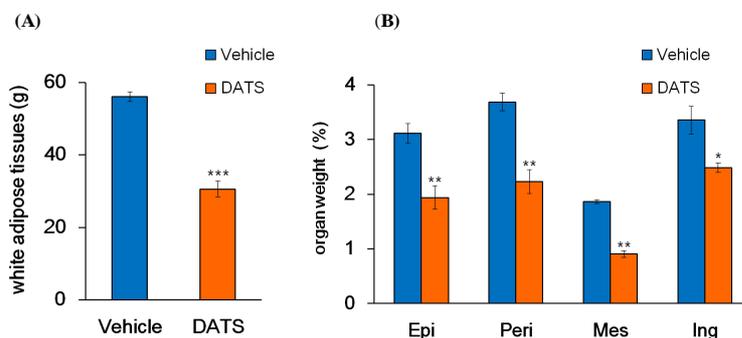
本研究では、DATS が白色脂肪組織の mRNA や miRNA 発現に及ぼす影響について検討し、DATS の抗肥満作用メカニズムを明らかにしようとした。DATS は高脂肪食給餌による体重増加

を有意に抑制した。試験期間中の摂餌量に群間で差はなかった (Fig. 1)。また、Vehicle 群と比較して DATS 群では白色脂肪組織重量の増加が有意に抑制された (Fig. 2)。Vehicle 群と比較して DATS 群の血漿トリアシルグリセロール (TG) 濃度は有意に減少した。また、肝臓中の TG 含有量やコレステロール含量は DATS 投与により有意に減少した。さらに、Vehicle 群と比較して DATS 群では脂肪細胞のサイズが小さく、細胞の肥大化が抑制されていた。



**Fig. 1. DATS 投与ラットの体重推移 (A) 摂餌量 (B)**

試験開始時から試験終了時までの体重を 2 日に 1 回測定し、各個体の体重の平均値をプロットした (A)。試験開始時から試験終了時までの摂餌量を毎日測定し、1 日の摂餌量の平均値を示した (B)。Mean  $\pm$  S.E.,  $n = 5$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  v.s. Vehicle 群



Epi, Epididymal white adipose tissue; Peri, Perirenal white adipose tissue; Mes, Mesenteric white adipose tissue; Ing, Inguinal white adipose tissues

**Fig. 2. DATS 投与ラットの実験終了時の白色脂肪組織重量**

(A) 総白色脂肪組織重量。(B) 各種白色脂肪組織重量の体重に占める比率。Mean  $\pm$  S.E.,  $n = 5$ , \*\*\* $p < 0.001$  v.s. Vehicle 群

### (2) DATS が肝臓の mRNA 発現に及ぼす影響

DATS の肝臓での脂質代謝に及ぼす影響を明らかにするために、肝臓中の脂質代謝関連遺伝子の解析を行った。Vehicle 群と比較して DATS 群では Sterol regulatory element-binding protein 1 (Srebp1) とその下流の Fatty acid synthase (Fasn) 発現が有意に減少し、Stearoyl-CoA desaturase-1 (Scd1) 発現の減少傾向が認められた。DATS 投与は Diacylglycerol O-acyltransferase 1 (Dgat1) と Diacylglycerol O-acyltransferase 2 (Dgat2) 発現には影響を及ぼさなかった。脂質酸化に関わる Carnitine palmitoyltransferase I (Cpt1) 発現に群間で差はなかった。これらの結果から、Vehicle 群と比較して DATS 群では肝臓において脂質合成関連遺伝子の発現が減少していることが明らかとなった。

### (3) 発現変動遺伝子の特定

肥満誘導ラットにおける DATS の効果を検証する目的で、精巣上体脂肪組織の mRNA および miRNA 発現を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した (Fig. 3)。DATS 投与により 629 の mRNA 発現および 9 の miRNA 発現が有意に変動した。

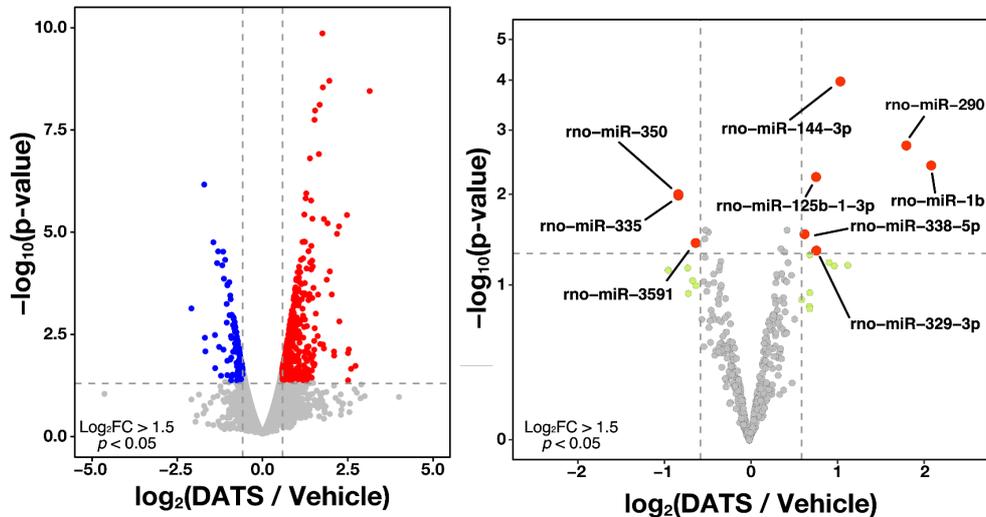


Fig. 3. 肥満誘導ラットの精巢上体脂肪組織における網羅的遺伝子発現解析

肥満誘導ラットにおいて、Vehicle 群と比較して DATS 投与によって 522 の mRNA 発現レベルが上昇し、107 の mRNA 発現レベルが低下した。また、6 つの miRNA 発現レベルが上昇し、3 つの miRNA 発現レベルが低下した。

(4) DATS 投与によって変動した生物学的プロセスおよび代謝経路の特定

エンリッチメント解析により、アラキドン酸代謝やアディポサイトカインシグナル経路が DATS 投与によって活性化することが示された。一方、細胞周期にかかわるプロセスやコレステロール恒常性にかかわるプロセスは DATS 投与によって抑制された。

(5) DATS 投与による影響を制御していると推定される転写因子の推定

DATS 投与によって発現が変動した遺伝子群を制御する転写因子を推定する目的で、wPGSA を実施した。その結果、Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) などの転写因子が DATS の標的として下流の遺伝子群の発現レベルを制御している可能性が明らかになった。

(6) DATS 投与の影響を受けていると推定される mRNA-miRNA の組み合わせ

mRNA-miRNA 統合解析の結果、相互作用が予測される 14 の mRNA-miRNA セットが得られた。これらはデータベース上に存在しておらず、より詳細な検証が必要であるが (e.g. rno-miR-335/Foxo1, rno-miR-1b/Bcat1) 興味深いセットも多数得られており、今後のさらなる実験によって新たな遺伝子発現制御機構が解明される可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Miyamoto A, Masuhiro Y, Seki T, Hanazawa S, Shiba H. A designed cell-penetrating human SOCS2 protein suppresses GH-dependent cancer cell proliferation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019 Feb; 83(2): 300-308 【査読有】  
doi: 10.1080/09168451.2018.1536516.

細野 崇, 関 泰一郎, 硫黄, 成人病と生活習慣病, 48(6), 696-700, 2018 【査読なし】

Miura A, Ishiguro K, Koizumi K, Yaita Y, Ozaki-Masuzawa Y, Hosono T, Seki T. Effects of pharmacological inhibition of plasminogen binding on liver regeneration in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017 Nov; 81(11): 2105-2111 【査読有】  
doi: 10.1080/09168451.2017.1372180.

関 泰一郎, 細野 崇, 増澤(尾崎)依. ニンニクの食文化と機能性, *Functional Food*, 32(11), 117-121, 2017 【査読なし】

細野 崇, 増澤(尾崎)依, 関 泰一郎. 食品因子による生活習慣病予防・改善機構の解明を目指して — miRNA を介した新しい食品機能の発現機構 — *化学と生物*(日本農芸化学会誌) 54(12), 909-914, 2016 【査読有】

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu/54/12/54\\_909/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu/54/12/54_909/_pdf)

〔学会発表〕(計 20 件)

池田彩菜、三浦 徳、瀬尾希来、渡辺高大、増澤(尾崎)依、細野 崇、関 泰一郎：miRNA に着目したガーリック由来香氣成分の抗肥満作用に関する研究、日本農芸化学会 2019 年度大会(東京) 2019 年

世良悠夏、児山有希、渡邊美優、三浦 徳、増澤(尾崎)依、細野 崇、関 泰一郎：高脂食給餌マウスのエネルギー代謝に関する研究【2019 年度大会・優秀発表】

日本農芸化学会 2019 年度大会(東京) 2019 年

A. Ikeda, N. Ishikura, K. Han, R. Abiru, T. Watanabe, A. Miura, Y. Ozaki-Masuzawa, T. Hosono, T. Seki: Studies on Lipid Metabolism-related miRNAs in a Mouse Model of Non-alcoholic Steatohepatitis Asia-Pacific Nutrigenomics & Nutrigenetics Organisation (APNNO 2018), BIENNIAL CONFERENCE 2018

T. Seki, T. Hosono, Y. Ozaki-Masuzawa: Anti-thrombotic effect of garlic attributes inhibition of platelet function and coagulation pathway by allyl sulfide, 256th American Chemical Society(ACS) National Meeting & Exposition, Division of Agricultural and Food Chemistry, Symposia Functional Foods-Their Novel Biofunctions & Underlying Mechanisms 2018. 【Invited Speaker】

石倉菜奈、三浦 徳、増澤(尾崎)依、細野 崇、関 泰一郎：コリン欠乏・メチオニン減量高脂肪食による非アルコール性脂肪肝炎モデルの病態解析、第 72 回日本栄養・食糧学会大会(岡山) 2018 年

池田彩菜、石倉菜奈、三浦 徳、増澤(尾崎)依、細野 崇、関 泰一郎：非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスにおける脂質代謝関連因子の発現動態に関する研究、第 72 回日本栄養・食糧学会大会(岡山) 2018 年【学生優秀発表賞・受賞】

森下裕菜、奥江紗知子、増澤(尾崎)依、細野 崇、関 泰一郎

ガーリック由来香氣成分 diallyl trisulfide は IkB 分解阻害を介さずに抗炎症作用を発揮する第 72 回日本栄養・食糧学会大会(岡山) 2018 年

瀬尾希来、増澤(尾崎)依、細野 崇、関 泰一郎：ガーリック由来香氣成分は、体熱産生非依存的に肥満を抑制する、日本農芸化学会 2018 年度大会(名古屋) 2018 年

有賀彩和子、田村千尋、矢口真実、増澤(尾崎)依、細野 崇、関 泰一郎：ニンニク由来香氣成分が血管内皮における外因系血液凝固因子の発現に及ぼす影響について、日本農芸化学会 2018 年度大会(名古屋) 2018 年

中口夏美、増澤(尾崎)依、細野 崇、関 泰一郎：ADP による血小板凝集に着目したガーリック由来香氣成分の抗血栓作用メカニズムの解明、日本農芸化学会 2018 年度大会(名古屋) 2018 年

瀬尾希来、増澤(尾崎)依、細野 崇、関 泰一郎：体熱産生に着目したガーリック由来香氣成分の抗肥満作用に関する研究、第 22 回日本フードファクター学会学術集会(藤沢) 2017 年

榮 まな、伊藤 翼、大倉拓海、増澤(尾崎)依、細野 崇、関 泰一郎：魚油含有高脂肪食は熱産生亢進を介さずに肥満を抑制する、第 22 回日本フードファクター学会学術集会(藤沢) 2017 年【Young Investigator Award 受賞】

中口夏美、忠 俊弥、岩崎莉子、増澤(尾崎)依、細野 崇、関 泰一郎：外因系血液凝固ならびに血小板機能に及ぼす食品成分の影響、第 22 回日本フードファクター学会学術集会(藤沢) 2017 年

T. Seki, T. Hosono, Y. Ozaki-Masuzawa: The food function of garlic: active principles and a molecular mechanism responsible for health promoting functions, American Chemical Society Asia-Pacific International Chapter Conference. Agricultural and Food Chemistry Session, Keynote Lecture, South Korea, 2017

N. Nakaguchi, Y. Ozaki-Masuzawa, T. Hosono, T. Seki: Garlic-derived compound diallyl trisulfide suppresses platelet aggregation by inhibiting both PI3K/Akt and cAMP pathways, American Chemical Society Asia-Pacific International Chapter Conference. South Korea, 2017

中口夏美、佐藤 明日香、増澤(尾崎)依、細野 崇、関 泰一郎：ガーリック由来香氣成分 diallyl trisulfide の血小板凝集抑制作用の解明、第 39 回日本血栓止血学会学術集会(名古屋) 2017 年

関 泰一郎：食品由来含硫化合物の生活習慣病予防に関する基礎的研究

第 71 回日本栄養・食糧学会大会(沖縄) 2017 年【日本栄養食糧学会・学会賞受賞講演】

瀬尾希来、佐々木 佳菜、増澤(尾崎)依、細野 崇、関 泰一郎：温度環境が UCP-1 発現と脂質代謝に及ぼす影響、第 71 回日本栄養・食糧学会大会(沖縄) 2017 年

中口夏美、佐藤 明日香、増澤(尾崎)依、細野 崇、関 泰一郎：ADP による血小板凝集に着目したガーリック由来香氣成分の血液凝固抑制作用の解明、第 71 回日本栄養・食糧学会大会(沖縄) 2017 年

T. Seki, T. Hosono: Structure and function of garlic derived organo-sulfur compounds

253rd American Chemical Society (SCS) National Meeting & Exposition, Division of Agricultural and Food Chemistry, Symposia: Chemistry of Korean Foods & Beverages, California, USA, 2017

〔図書〕(計2件)

Taiichiro Seki, Takashi Hosono, Yori Ozaki-Masuzawa

Chemistry of sulfur containing compounds derived from garlic and their functions. *Chemistry of Korean Foods and Beverages*. ACS Books, American Chemical Society. 2019 *in press*

Taiichiro Seki, Takashi Hosono, Hitomi Kumagai, Toyohiko Ariga. *Functional Foods,*

*Nutraceuticals and Natural Products-Concepts and applications* (Vattem DA, Maitin V Edts)

(*Allium: Garlic and Onion*, pp417-456), DEStech Publications, Inc. USA, 2016

ISBN 978-1-60595-101-0 (全 820 ページ)

〔その他〕

ホームページ等

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~eiyo/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：細野 崇

ローマ字氏名：(HOSONO, takashi)

所属研究機関名：日本大学

部局名：生物資源科学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：80445741

研究分担者氏名：増澤・尾崎 依

ローマ字氏名：(OZAKI-MASUZAWA, yori)

所属研究機関名：日本大学

部局名：生物資源科学部

職名：助手

研究者番号(8桁)：70614717

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：三浦 徳

ローマ字氏名：MIURA, atsushi

研究協力者氏名：奥江紗知子

ローマ字氏名：OKUE, sachiko

研究協力者氏名：池田彩菜

ローマ字氏名：IKEDA, ayana

研究協力者氏名：瀬尾希来

ローマ字氏名：SEO, kiki

研究協力者氏名：中口夏美

ローマ字氏名：NAKAGUCHI, natsumi

研究協力者氏名：渡辺高大

ローマ字氏名：WATANABE, takahiro

研究協力者氏名：石倉菜奈

ローマ字氏名：ISHIKURA, nana

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。