

令和元年6月4日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14929

研究課題名(和文) アンチエイジングエクソソームを介した食品の機能性とその分子基盤解明

研究課題名(英文) Molecular basis for the exosome-mediated food function

研究代表者

片倉 喜範 (Katakura, Yoshinori)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：50264106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：高機能ジペプチドとして知られているカルノシンは鶏ムネ肉に多く含まれており、最近のヒト介入試験により脳機能改善効果を有することが明らかになっている。しかしながらカルノシンの示す脳機能改善効果の分子基盤はこれまで全く明らかになっていなかった。本研究により、カルノシンが腸管細胞を刺激し、分泌小胞エクソソームの分泌を促すことで、そのエクソソームが神経細胞を活性化することが明らかとなった。つまりカルノシンは、神経細胞を活性化することのできるエクソソームの分泌を腸管細胞から促すことで神経・脳機能を制御するものと考えることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近になり脳機能を制御する食品の存在が明らかになりつつあるが、その分子メカニズムにまで迫る研究は少ない。本研究では、カルノシンが腸管細胞を刺激し、神経細胞を活性化しうる分泌小胞として知られるエクソソームの分泌を促すことで、それが脳に到達し、脳機能を制御する可能性を明らかにすることができた。食品による脳腸相関活性化の分子メカニズムに迫る非常に重要な研究であると言える。今後は、食品のもと様々な機能性に対するエクソソームの関与が明らかになっていくことが期待され、その礎となる研究であると言える。

研究成果の概要(英文)：Carnosine, known as imidazole dipeptide, is contained much in chicken breast meat. We demonstrated that carnosine improves brain function, which was evidenced by interventional trial. However, molecular basis of carnosine function has not yet been clarified. Here we demonstrated that carnosine induces intestinal cells to secrete functional exosome that activate neuronal cells, which might be one of molecular mechanisms of carnosine to activate neuronal cells in brain.

研究分野：食品機能学

キーワード：エクソソーム 脳腸相関 カルノシン 腸管細胞 神経細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

鶏ムネ肉中に多く含まれるイミダゾールジペプチドとして知られるカルノシンは、ヒト介入試験の結果から脳機能改善効果があることが明らかとなっているが、その機能性の分子基盤は全く明らかになっていない。特にカルノシンは、摂取後約 30 分ほどで血液中で分解されることが明らかになっており、カルノシンが直接脳にまで送達し機能性を発揮しているわけではないと考えられているが、その機能性の分子メカニズムに関しては全く明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

機能性食品成分の中には、腸管とは離れた臓器で機能を発揮するものが多く知られているが、その腸管を起点とした臓器間相互作用を規定する分子基盤の一つとして、細胞から分泌される小胞顆粒として知られるエクソソームに着目した。本研究では、食品成分による認知症抑制に関わるエクソソーム（アンチエイジングエクソソーム）の同定、そのデータベースを用いた食品成分の機能予測、さらには人工アンチエイジングエクソソームの創製とその機能性検証を目指す。

### 3. 研究の方法

① 腸を起点とした臓器間相互作用を通じて認知症抑制効果の期待される機能性食品成分の選抜：

認知症抑制効果の期待される機能性食品成分として、クルクミン（抗認知症、抗動脈硬化）、カルノシン（抗疲労、抗認知症、血糖値抑制）、カテキン（抗認知症）、GABA（抗動脈硬化、降圧効果、抗動脈硬化）等を用いる。

② 腸管アンチエイジングエクソソームの探索：

1. 疾患モデル細胞を用いた腸管エクソソームの同定：

上記食品群の臓器間相互作用活性化効果が、腸管エクソソームによるものと予想し、食品成分により分泌増強される腸管エクソソームの同定を目指す。ヒト結腸ガン由来細胞株 Caco-2 に対して上記食品成分を添加し培養後、エクソソームを単離し、ターゲット神経細胞株（ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞）に添加して培養を行う。表現型変化が認められた組み合わせについて、エクソソーム miRNA、mRNA 及びタンパク質のプロファイリングを行い疾患抑制特異的エクソソームプロファイルを明らかにするとともに、SH-SY5Y 細胞株の mRNA 発現プロファイリングからターゲット遺伝子の推定を行う。

2. 疾患モデルマウスを用いた腸管エクソソームの同定：

上記得られた腸管エクソソームの機能性を疾患モデルマウスを用いて評価する。単離した腸管エクソソームを、認知症モデルマウス（3×Tg-Ad マウス）に移入し、その認知症抑制効果を検証する（*J. Alzheimers Dis*, **33**: 983-997 (2013)）。脳機能は、脳組織解析（アミロイド β 蓄積、炎症マーカー、ミクログリア活性化）及び行動解析（モリス水迷路試験、恐怖条件付け試験）により行う。認知症抑制効果の認められたエクソソームについて、上記と同様の解析を行い、認知症抑制特異的エクソソームプロファイルを明らかにする。また、当該エクソソームのラベル化を行い、標的組織（脳）への送達を確認するとともに、脳組織の mRNA 発現プロファイリングからターゲット遺伝子の推定を行う。なお、認知症モデルマウスを用いた試験に関しては、研究協力者の指導の下、行うものとする。

③ 血中アンチエイジングエクソソームの探索：

1. 疾患モデル細胞を用いた血中エクソソームの同定：

つぎに、全身を循環する血中エクソソームに着目する。認知症モデルマウス（3×Tg-Ad マウス）に対して上記食品成分を投与し、認知症抑制効果の認められたマウスから血中エクソソームを単離する。次に、得られた血中エクソソームを認知症モデル細胞（SH-SY5Y 細胞）に添加し培養後、表現型変化が認められた組み合わせについて、上記と同様にエクソソームプロファイリングを行い、認知症抑制特異的エクソソームプロファイルを明らかにするとともに、SH-SY5Y 細胞の mRNA 発現プロファイルからターゲット遺伝子の推定をおこなう。

2. 疾患モデルマウスを用いた血中エクソソームの同定：

上記得られた血中エクソソームの機能性を、疾患モデルマウスを用いて検証する。単離した血中エクソソームを、認知症モデルマウス（3×Tg-Ad マウス）に移入し、認知症抑制効果を検証する。認知症抑制効果が認められた組み合わせについて、上記と同様の解析を行い、認知症抑制特異的エクソソームのプロファイルを明らかにする。また、当該エクソソームのラベル化を行い、標的組織（脳）への送達を確認するとともに、脳組織の mRNA 発現プロファイリングからターゲット遺伝子の推定を行う。

④ 認知症抑制性アンチエイジングエクソソーム由来因子の同定：

上記②及び③で得られたアンチエイジングエクソソームプロファイル情報をもとに、認知症抑制性アンチエイジングエクソソーム由来因子の同定を行う。

#### 4. 研究成果

これまで当研究室では、カルノシンによる脳腸相関活性化の分子基盤を明らかにするための研究を行ってきた。これまでに、様々な分泌性因子やエクソソームをその分子基盤として想定し、脳腸相関活性化への寄与を明らかにするための研究を行ってきた。腸管モデル細胞としては、ヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞を、神経細胞としてヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y 細胞を用いた。カルノシン処理をした Caco-2 細胞の培養上清から、MagCapture 法によりエクソソームを調製した。カルノシン処理をした Caco-2 細胞の培養上清から調製されたエクソソームは、SH-SY5Y 細胞の神経突起を伸長する活性を有していることが明らかとなった。そこで、その分子基盤を明らかにするために、カルノシン処理した Caco-2 細胞から分泌されたエクソソーム内の miRNA のマイクロアレイ解析及びそのエクソソームで処理をした SH-SY5Y 細胞における mRNA のマイクロアレイ解析の統合解析により、カルノシン処理により発現増強し、さらに SH-SY5Y 細胞での神経突起伸長に関わる miRNA とそのターゲット遺伝子の同定に成功した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Yuka Sugihara, Shiori Onoue, Kosuke Tashiro, Mikako Sato, Takanori Hasegawa, Yoshinori Katakura, Carnosine induces intestinal cells to secrete exosomes that activate neuronal cells, PLoS ONE (in press) (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① カルノシンによる筋脳相関活性化とその分子基盤  
阿部佳世子、佐藤三佳子、片倉喜範 東京農大 2019年3月24日
- ② カルノシンによる筋脳相関活性化とその分子基盤  
尾上詩織、佐藤三佳子、片倉喜範 横浜パシフィコ 東京ビッグサイト 2018年11月28日
- ③ カルノシンによるエクソソームを介した脳腸相関活性化の分子基盤 (ポスター賞)  
内村佳奈子、杉原由佳、片倉喜範 日本食品免疫学会 東京大学 2017年11月9日
- ④ 食肉成分カルノシンによるエクソソームを介した脳腸相関活性化 (優秀演題)  
片倉喜範、杉原由佳、佐藤三佳子 日本抗加齢学会 東京国際フォーラム 2017年6月2日~4日
- ⑤ 食肉成分カルノシンによるエクソソームを介した脳腸相関  
杉原由佳、門岡桂史、片倉喜範 日本農芸化学会 京都女子大学 2017.3.17-20

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：イミダゾールジペプチドを含有するエクソソーム調節剤、およびエクソソームを含有する神経細胞活性化剤

発明者：松本貴之、佐藤三佳子、門岡桂史、片倉喜範、杉原由佳

権利者：松本貴之、佐藤三佳子、門岡桂史、片倉喜範、杉原由佳

種類：特許

番号：特願 2016-222530

出願年：2016年

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/crt/katakura/Site2/TOP.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：杉原由佳

ローマ字氏名：SUGIHARA, yuka

※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。