

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20565

研究課題名(和文)腸内細菌叢によるmiR-200の遺伝子発現抑制を介したIL-2産生制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of IL-2 production by gut microbiota through miR-200 gene silencing

研究代表者

逢坂 文那(Ohsaka, Fumina)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：90908485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究により、腸内細菌叢の存在がマウス大腸粘膜固有層白血球においてmiR-200ファミリーによる遺伝子サイレンシングを促進する結果、腸管粘膜免疫の恒常性を担うIL-2産生を調節することを示唆した。本研究では、マウスT細胞株であるEL-4細胞へ合成2本鎖miR-200ファミリーを遺伝子導入することにより、このことを証明した。一方で、miR-200ファミリーの遺伝子導入により、免疫システムプロセスの遺伝子オントロジーを有する数種類の遺伝子の発現低下を観察したことから、miR-200ファミリーによるIL-2産生調節以外の免疫調節機構の存在が予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌による腸管粘膜免疫の調節にmicroRNA(miRNA)による遺伝子サイレンシングが関与することはほとんど知られていない。本研究では、筆者らがこれまでに示唆した大腸粘膜固有層白血球におけるmiRNAの遺伝子サイレンシングを介した腸管粘膜免疫調節を、マウスT細胞株であるEL-4細胞を用いて直接的に明らかにした。このことは、腸内細菌が腸管粘膜免疫調節をはじめとする宿主の生理に影響をおよぼす際の、新たな細胞分子基盤の解明の一助となるものである。

研究成果の概要(英文)：Our recent study suggested that gut microbiota promotes miR-200 family-induced gene silencing in murine large intestinal lamina propria leukocytes, decreasing IL-2 production. The present study directly demonstrated the gene silencing by transfecting the synthesized miR-200 family mimic to murine T-cell line EL-4. Meanwhile, we observed reduced several genes with gene ontology of immune system processes by transfecting the miR-200 family mimic. The results suggest that the miR-200 family is involved in the regulation of other immune responses than IL-2 production.

研究分野：消化管生理学

キーワード：microRNA 腸内細菌叢 遺伝子サイレンシング 腸管免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は 20 塩基程度のノンコーディング RNA であり、標的 mRNA の 3' 非翻訳領域に配列相補的に結合して転写後の遺伝子発現を抑制することにより、さまざまな生命現象に関与する。しかしながら、腸内細菌叢が腸管粘膜免疫に影響をおよぼす際の miRNA の役割についてはほとんど知られていない。筆者らはこれまでに、腸内細菌叢を持たない無菌マウスと通常マウスの比較解析から、腸内細菌叢が大腸粘膜固有層白血球 (lamina propria leukocytes, LPL) の miR-200 ファミリーの発現を増加させ、その標的遺伝子である *Bcl11b*、*Ets1*、および *Zeb1* の mRNA 発現を減少させることを発見した。また、これらの遺伝子はインターロイキン 2 (interleukin-2, IL-2) の転写因子をコードする遺伝子であり、実際、腸内細菌叢の存在は IL-2 の産生も減少させた。これらの知見は、腸内細菌叢が大腸 LPL における miR-200 ファミリーによる遺伝子サイレンシングを介して IL-2 産生を調節することを示唆する (Ohsaka *et al.* 2021 *BBRC*)。本研究では、このことを培養細胞および実験動物への miR-200 ファミリーの遺伝子導入により直接的に証明する。

2. 研究の目的

本研究では、大腸 LPL において miR-200 ファミリーが遺伝子サイレンシングを介して IL-2 産生を制御することを直接的に証明することを目的とした。具体的な目的は以下の通りである。

- (1) miR-200 ファミリーによる標的遺伝子のサイレンシングおよび IL-2 産生の減少を、培養細胞において直接的に証明する。
- (2) miR-200 ファミリーによる標的遺伝子のサイレンシングおよび IL-2 産生の減少を、マウス個体において直接的に証明する。

3. 研究の方法

- (1) miR-200 ファミリーによる標的遺伝子のサイレンシングおよび IL-2 産生の減少を、培養細胞において直接的に証明する。

① miR-200 ファミリー-mimic の導入による標的遺伝子サイレンシングの証明

本研究では、大腸 LPL における miR-200 ファミリーの遺伝子サイレンシングを介した IL-2 の産生制御を直接的に証明するために、細胞への miR-200 ファミリーの導入が標的遺伝子 (*Bcl11b*、*Ets1*、*Zeb1*) の発現および IL-2 産生におよぼす影響を調べた。主要な IL-2 産生細胞として、T 細胞を想定し、マウス T 細胞株である EL-4 細胞を培養し、エレクトロポレーション法による miR-200a および miR-200b mimic (合成 2 本鎖 RNA) の導入を試みた。24 時間後に細胞を回収し、miRNeasy mini kit (QIAGEN) を用いてスモール RNA を含むトータル RNA を分離した。EL-4 細胞への miR-200 mimic の導入の確認および標的遺伝子の発現はリアルタイム定量 PCR 法 (qPCR)、標的遺伝子のタンパクレベルはウエスタンブロッティング法により解析した。さらに、培養細胞に 25 ng/mL PMA および 1 µg/mL イオノマイシンを添加し、24 時間培養後の培養上清中の IL-2 の産生レベルを ELISA 法により定量した。

② RNA 免疫沈降法による miR-200 ファミリーと標的遺伝子の相互作用の証明

培養した EL-4 細胞を回収し、RIP-Assay Kit for microRNA (MBL) に添付されている Lysis buffer を用いて溶解した。細胞溶解液とあらかじめ Protein G agarose beads (Pierce) を結合させた RNA 誘導遺伝子サイレンシング複合体を形成する Ago2 タンパク質に対する抗体 (anti-Mouse Ago2 antibody)、あるいはコントロール IgG₁ を一晩インキュベーションし、免疫沈降を行った。Ago2 抗体に対する免疫沈降の特異性はウエスタンブロッティングにより解析した。免疫沈降後の複合体からトータル RNA を分離し、微量分光光度計により RNA 濃度を定量した。さらに、①と同様に EL-4 細胞に miR-200 ファミリーを導入し、マイクロアレイ解析により miR-200 ファミリーと相互作用する新たな標的 mRNA の同定を目指した。

③ miR-200 ファミリーの標的遺伝子のノックダウンが IL-2 産生に与える影響

EL-4 細胞に miR-200 ファミリーの標的遺伝子である *Bcl11b*、*Ets1*、および *Zeb1* の siRNA をエレクトロポレーション法により導入した。24 時間後に細胞を回収し、①と同様にトータル RNA を分離した。標的遺伝子の発現低下は qPCR 法およびウエスタンブロッティング法により解析し、培養上清中の IL-2 の産生レベルは ELISA 法により定量した。

(2) miR-200 ファミリーによる標的遺伝子のサイレンシングおよび IL-2 産生の減少を、マウス個体において直接的に証明する。

無菌マウスへの miR-200a mimic の導入、および通常マウスへの miR-200a inhibitor の導入により、miR-200 ファミリーによる遺伝子サイレンシングおよび IL-2 産生の減少を個体レベルで証明する予定だったが、残念ながら本事業期間では実現には至らなかった。

4. 研究成果

(1) miR-200 ファミリーによる標的遺伝子のサイレンシングおよび IL-2 産生の減少を、培養細胞において直接的に証明する。

① miR-200 ファミリー-mimic の導入による標的遺伝子サイレンシングの証明

まずはじめに、EL-4 細胞への miR-200 ファミリーの導入を確認した。その結果、miR-200a mimic の導入により miR-200a-3p の発現レベルは高値を示したが、miR-200b-3p の発現レベルに変化は見られなかった。同様に、miR-200b mimic の導入により miR-200b-3p の発現レベルは高値を示したが、miR-200a-3p の発現レベルに変化は見られなかった (図 1)。このことは、miR-200a および miR-200b が配列特異的に EL-4 細胞に導入されたことを示唆している。また、miR-200a/-200b の導入による *Bcl11b*、*Ets1* および *Zeb1* の mRNA レベルの低下を確認した (図 2)。一方で、miR-200a/-200b mimic の導入による ZEB1 のタンパクレベルの低下を確認したが、BCL11B および ETS-1 の低下は確認できなかった (図 3)。さらに、PMA/イオノマイシン存在下で培養した EL4 細胞の培養上清中における IL-2 濃度を ELISA 法により定量した結果、miR-200a/-200b 導入による IL-2 濃度の低下を確認した (図 4)。

② RNA 免疫沈降法による miR-200 ファミリーと標的遺伝子の相互作用の証明

miR-200 ファミリーが直接相互作用する標的遺伝子を網羅的に探索するため、RNA 遺伝子サイレンシング複合体タンパク質である Ago2 の抗体を用いた免疫沈降により、miR-200 ファミリーと複合体を形成する標的遺伝子の同定を試みた。EL-4 細胞の溶解液における Ago2 抗体に対する免疫沈降の特異性をウエスタンブロッティングにより解析したところ、免疫沈降後のビーズに Ago2 が結合していることを確認した (図 5)。しかしながら、免疫沈降後の複合体から RNA を分離したところ、RNA の量・質ともにマイクロアレイ解析に供することのできる十分な RNA は得られなかった (データ未掲載)。そこで、EL-4 細胞に miR-200 ファミリーを導入することにより発現が減少する遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に解析した。ネガティブコントロールを導入した細胞と比較して、miR-200a-3p および miR-200b-3p を導入した細胞では、それぞれの標的である *Crtap*、*Cxcr4*、*Flt1*、*Nedda4*、*Rac1*、*Sec23a*、*St3gal3*、*Ubp21* および *Zeb1* のレベルが低下した (図 6)。*Crtap*、*Sec23a*、および *Ubp21* 以外の遺伝子は、免疫システムプロセスの遺伝子オントロジーを有することから、miR-200 ファミリーによる IL-2 産生調節以外の免疫調節機構の存在が予想された。

③ miR-200 ファミリーの標的遺伝子のノックダウンが IL-2 産生に与える影響

miR-200 ファミリーの標的遺伝子である *Bcl11b*、*Ets1* および *Zeb1* の発現低下を介して、IL-2 産生が抑制されるかどうかを確認した。qPCR 法により、siRNA 導入による *Bcl11b*、*Ets1*、および *Zeb1* の mRNA レベルの低下を確認したが (図 7)、ウエスタンブロッティングによるタンパク質レベルの低下は観察されなかった。さらに、ELISA 法により siRNA を導入した EL-4 細胞における培養上清中の IL-2 濃度を定量したが、変化は認められなかった。これらのことは、BCL11B、ETS1、および ZEB1 のタンパク発現および IL-2 産生の調節には、miR-200 ファミリーによる遺伝子サイレンシング以外の機構も関与することを示唆している。

以上のように miR-200 ファミリーによる遺伝子サイレンシングを介した IL-2 の産生制御を直接的に証明することができたが、一方で標的遺伝子である *Bcl11b*、*Ets1*、および *Zeb1* の発現低下を介さない別の IL-2 産生調節機構の存在が示唆された。

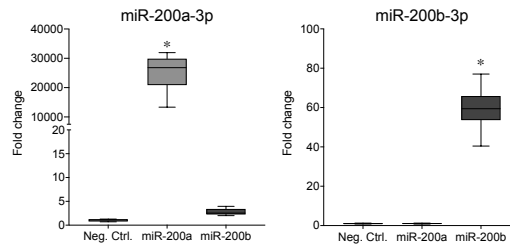


図1 マウスT細胞株 EL-4 細胞にネガティブコントロール (Neg. Ctrl.)
あるいは miR-200a/-200b mimic を導入した際の miR-200a-3p/-200b-3p
の発現レベル
* $p < 0.05$ vs. Neg. Ctrl

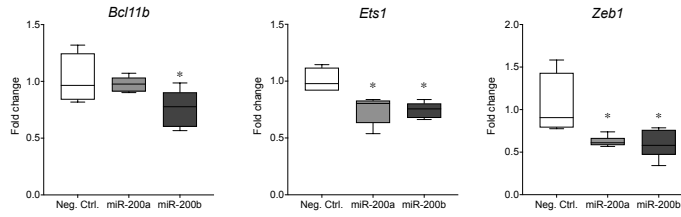


図2 マウスT細胞株 EL-4 細胞にネガティブコントロール (Neg. Ctrl.)
あるいは miR-200a/-200b mimic を導入した際の miR-200a-3p/-200b-3p
の標的遺伝子 *Bcl11b*, *Ets1* および *Zeb1* の mRNA レベル
* $p < 0.05$ vs. Neg. Ctrl

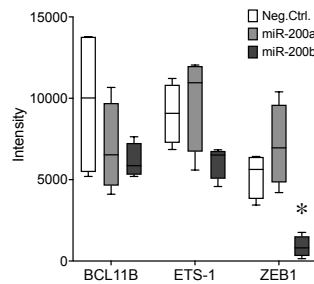


図3 マウスT細胞株 EL-4 細胞にネガティブコントロール (Neg. Ctrl.) あるいは
miR-200a/-200b mimic を導入した際の標的遺伝子のタンパクレベル
* $p < 0.05$ vs. Neg. Ctrl

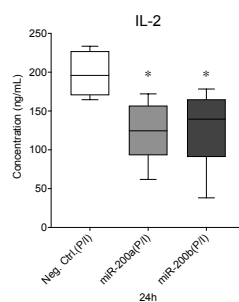


図4 マウスT細胞株 EL-4 細胞にネガティブコントロール (Neg. Ctrl.) あるいは
miR-200a/-200b mimic を導入し、さらに PMA/イオノマイシン (P/I) 存在下で
24 時間培養した細胞培養上清中の IL-2 レベル
* $p < 0.05$ vs. Neg. Ctrl

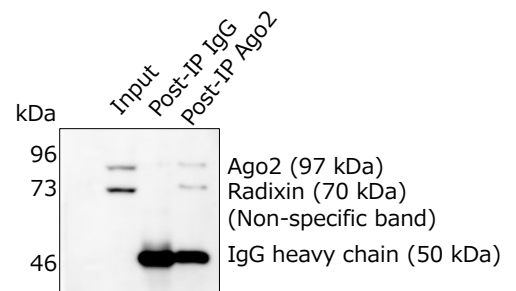


図5 マウスT細胞株 EL-4 細胞における Ago2 抗体を用いた免疫沈降

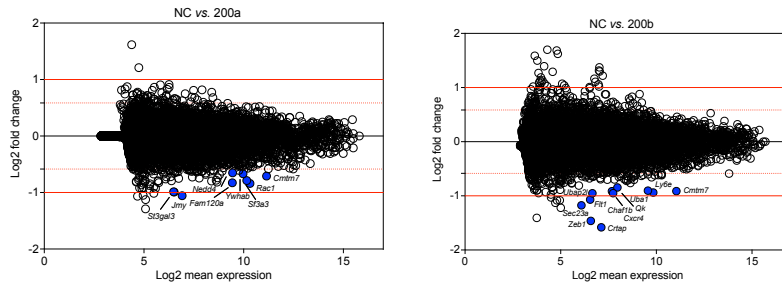


図 6 miR-200a (左) / -200b mimic (右) を導入した際のマウス T 細胞株 EL-4 細胞の発現プロファイル
 NC : Negative control

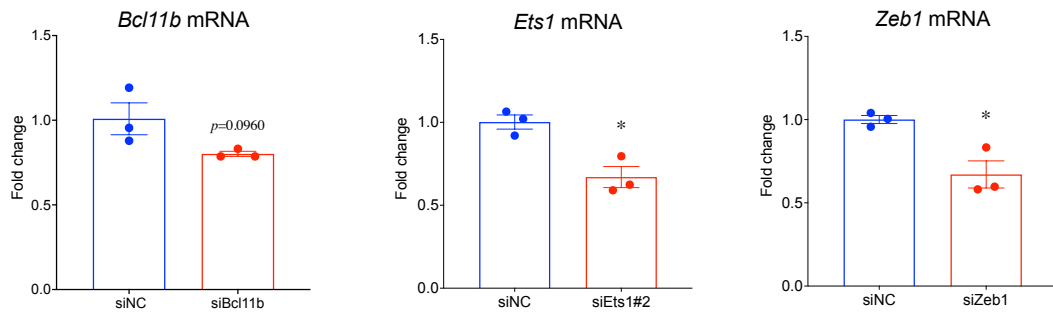


図 7 siRNA を導入した際のマウス T 細胞株 EL-4 細胞における標的遺伝子の mRNA レベル
 siNC : siRNA Negative control

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sonoyama K, Ohsaka F.	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of microRNAs in the crosstalk between gut microbiota and intestinal immune system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 TATSUOKA Misa, SHIMADA Riku, OHSAKA Fumina, SONOYAMA Kei	4. 巻 -
2. 論文標題 Administration of Bifidobacterium pseudolongum suppresses the increase of colonic serotonin and alleviates symptoms in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12938/bmfh.2022-073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 OHSAKA Fumina, HONMA Daiki, KADOTA Yoshihiro, TOCHIO Takumi, SONOYAMA Kei	4. 巻 69
2. 論文標題 Consumption of 1-Kestose Upregulates MicroRNA-200 and -192/215 Families in Lamina Propria Leukocytes of the Murine Large Intestine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 150 ~ 154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.69.150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 TATSUOKA Misa, SHIMADA Riku, OHSAKA Fumina, SONOYAMA Kei	4. 巻 -
2. 論文標題 Administration of Bifidobacterium pseudolongum suppresses the increase of colonic serotonin and alleviates symptoms in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12938/bmfh.2022-073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohsaka F, Honma D, Kadota Y, Tochio T, Sonoyama K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Consumption of 1-Kestose upregulates microRNA-200 and -192/215 families in lamina propria leukocytes of the murine large intestine.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Nutri Sci Vitaminol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sonoyama K, Ohsaka F.	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of microRNAs in the crosstalk between gut microbiota and intestinal immune system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 SEKI Manami, MIWA Akiho, OHSAKA Fumina, KARATSU Yugo, TSURUTA Takeshi, HINO Shingo, MORITA Tatsuya, SONOYAMA Kei	4. 巻 41
2. 論文標題 Local free fatty acids trigger the expression of lipopolysaccharide-binding protein in murine white adipose tissue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 54 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12938/bmfh.2021-061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tatsuoka Misa, Osaki Yosuke, Ohsaka Fumina, Tsuruta Takeshi, Kadota Yoshihiro, Tochio Takumi, Hino Shingo, Morita Tatsuya, Sonoyama Kei	4. 巻 127
2. 論文標題 Consumption of indigestible saccharides and administration of <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> reduce mucosal serotonin in murine colonic mucosa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 513 ~ 525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/s0007114521001306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 逢坂文那
2. 発表標題 食餌による腸管粘膜免疫調節に microRNA が果たす役割 好きな研究 を仕事にするまで
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度 北海道支部学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fumina Ohsaka;Daiki Honma;Yugo Karatsu;Yoshihiro Kadota;Takumi Tochio;Kei Sonoyama
2. 発表標題 Gut commensals regulate intestinal mucosal immunity through microRNA-200 gene silencing in lamina propria leukocytes of murine large intestine
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN INTERNATIONAL CONGRESS OF NUTRITION IN TOKYO（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水落圭紀, 逢坂文那, 田邊宏基, 武村直紀, 園山慶
2. 発表標題 24ウェルプレート培養腸内細菌に対する難消化性糖類添加の影響
3. 学会等名 日本食品免疫学会第18回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口万柚子, 逢坂文那, 加藤英介, 園山慶
2. 発表標題 マウス盲腸内容物由来microRNAが腸内細菌叢に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第52回日本栄養・食糧学会北海道支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嶋田陸, 水落圭紀, 岩瀬拓真, 逢坂文那, 内山孝司, 田邊宏基, 山本達朗, 園山慶
2. 発表標題 Anxa10遺伝子欠損がマウス小腸オルガノイドにおけるM細胞誘導に与える影響
3. 学会等名 第52回日本栄養・食糧学会北海道支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口万柚子, 加藤英介, 逢坂文那, 園山慶
2. 発表標題 24ウェル培養プレートを用いたマウス腸内細菌培養法の検討
3. 学会等名 公益社団法人日本農芸化学会 2022年度北海道・東北支部 合同支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 逢坂 文那, 園山 慶
2. 発表標題 マウスTリンパ腫細胞株EL-4におけるmiR-200ファミリーの標的遺伝子の網羅的探索
3. 学会等名 第76回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水落 圭紀, 岩瀬 拓真, 逢坂 文那, 内山 孝司, 田邊 宏基, 山本 達朗, 園山 慶
2. 発表標題 アネキシンA10遺伝子欠損マウスのパイエル板濾胞関連上皮及びリンパ濾胞における遺伝子発現解析
3. 学会等名 第76回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩瀬 拓真, 水落 圭紀, 逢坂 文那, 内山 孝司, 田邊 宏基, 山本 達朗, 園山 慶
2. 発表標題 アネキシンA10遺伝子欠損がマウスのアレルギー性鼻炎に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第76回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本間 大貴, 逢坂 文那, 園山 慶
2. 発表標題 高脂肪食摂取がマウスの大腸粘膜固有層における制御性T細胞分化に影響を及ぼす際のmiRNAの役割
3. 学会等名 第76回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 唐津勇吾, 逢坂文那, 園山慶
2. 発表標題 腸内細菌叢はマウスの循環血中エクソソームに内包されるmiRNAの変化を介して宿主生理に影響を及ぼす
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度(令和4年度)[京都]大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 逢坂文那
2. 発表標題 腸内細菌叢による腸管粘膜免疫調節に寄与するmicroRNA
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会 北海道支部 シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 唐津勇吾, 逢坂文那, 園山慶
2. 発表標題 腸内細菌叢により影響を受けるマウスの循環血中エクソソームのmiRNAの標的予測とhnRNPA2B1の関与
3. 学会等名 令和3年度 日本栄養・食糧学会東北支部(第55回大会)・北海道支部(第51回大会)合同支部大会およびシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 逢坂 文那, 園山 慶
2. 発表標題 マウスTリンパ腫細胞株EL-4におけるmiR-200ファミリーによる遺伝子サイレンシングを介したIL-2産生調節ー腸内細菌叢による腸管粘膜免疫調節の新機構ー
3. 学会等名 第75回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩瀬 拓真, 山本 達朗, 田邊 宏基, 逢坂 文那, 内山 孝司, 園山 慶
2. 発表標題 アネキシンA10遺伝子欠損が食物アレルギーにおよぼす影響の解析
3. 学会等名 第75回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 マイクロRNAの発現促進用組成物	発明者 門田吉弘、栃尾巧、 園山慶、逢坂文那	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-184606	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------