

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380069

研究課題名(和文) 体脂肪蓄積を制御するシンバイオティクス開発の基盤解析

研究課題名(英文) Studies on the development of anti-obesity synbiotics

研究代表者

園山 慶 (Sonoyama, Kei)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90241364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：我々はいくつかの論文で、マウスを用いて乳酸菌株 *Lactobacillus plantarum* No.14 の抗肥満効果を報告したが、腸内細菌が宿主の脂肪組織に影響をおよぼす細胞分子機序は不明である。本研究では、No.14 株が2型糖尿病モデルマウスの肥満、脂肪組織炎症、およびインスリン抵抗性を抑制することを示すと同時に、動物実験と培養細胞を用いて腸管から脂肪組織への情報伝達について解析し、細胞外小胞であるエクソソームが細胞間コミュニケーションを担う可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We previously showed that *Lactobacillus plantarum* No.14 reduces obesity in mice, whereas the cellular and molecular mechanisms remain unknown. The present study demonstrated that *L. plantarum* No.14 reduces obesity, adipose tissue inflammation, and insulin resistance in type 2 diabetic mice. In addition, we showed that exosomes isolated from the serum of mice fed *L. plantarum* No.14 reduce the production of inflammatory cytokines in peritoneal exudate cells and murine macrophage cell line RAW264.7. The results suggest that exosomes play a role in cell-to-cell communication in terms of anti-inflammatory action of *L. plantarum* No.14.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：肥満 プロバイオティクス プレバイオティクス 腸内細菌 炎症 エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢は宿主のエネルギー・脂質代謝に影響をおよぼし、肥満やメタボリックシンドロームの発症に関与する。言い換えれば、これらの疾患は腸内細菌叢の構成を変化させることによって制御できる可能性がある。しかしながら、腸内細菌がどのようにして宿主の脂肪組織に影響をおよぼしているのか、その細胞分子機序は明らかではない。

筆者らはこれまでに、植物性発酵食品製造時に用いられる乳酸菌株のひとつである *Lactobacillus plantarum* No.14 株を、高脂肪食によって誘導される肥満マウスに経口投与すると、白色脂肪細胞のサイズ増加が抑えられることを見いだした (Takemura *et al.* 2010 *Exp Biol Med*)。同様にして過去に肥満抑制作用が示されている他の乳酸菌株については、腸管における食餌脂質の吸収抑制や共役リノール酸の産生を介する体脂肪蓄積の抑制が作用機序として提案されているが、No.14 株による脂肪細胞増大抑制はそのような機序を介さない。したがって、No.14 株のようなプロバイオティクスが発揮する肥満抑制作用には、未知の細胞分子機序が関わると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、No.14 株は腸粘膜に存在するいずれかの細胞によって認識され、何らかの情報伝達系を介して脂肪細胞における脂肪蓄積を抑制するという仮説を立て、それを動物実験および培養細胞実験により証明することを目的とした。また、脂肪蓄積の抑制に加え、No.14 株が脂肪組織における炎症を抑制することを示し、その細胞分子機序を解明することを目的とした。とりわけ、腸管から脂肪組織への情報伝達系に関しては、細胞間コミュニケーションツールのひとつとして注目されている細胞外膜小胞であるエクソソームに着目して解析した。さらに、細菌株 (プロバイオティクス) と難消化性食品成分 (プレバイオティクス) をくみあわせて効率的に体脂肪蓄積を制御する抗肥満シンバイオティクスの開発基盤を確立することを目指した。

具体的な目的は以下の通りである。

- (1) No.14 株が脂肪組織炎症の制御を介してメタボリックシンドロームを抑制することを動物実験で示すこと。
- (2) No.14 株に曝露することによって腸上皮細胞あるいは腸粘膜免疫細胞が産生・放出し、脂肪細胞の脂肪蓄積および脂肪組織炎症を制御するシグナルを探索するための細胞培養系を構築すること。
- (3) (2)の培養系を用いてシグナルを探索・同定すること。とりわけ、このシグナル候補としてエクソソームに着目し、その可能性を追究すること。
- (4) 代表的なプレバイオティクスである難消化性オリゴ糖を摂取したときの(3)のシ

グナルの動態を明らかにすること。

## 3. 研究の方法

- (1) 2型糖尿病モデルマウスを用いた No.14 株のメタボリックシンドローム抑制作用の解析： KK/Ta マウスを 2 型糖尿病モデルとして用い、精製飼料 (AIN-93G) を自由摂取させた。No.14 株 ( $1 \times 10^8$  CFU) あるいは生理食塩水を毎日胃内投与し、10 週間飼育した。9 週目には 18 時間の絶食後に腹腔内耐糖能試験を実施した。飼育最終日には 16 時間の絶食後に安楽死させ、血液と脂肪組織を採取し、血液から血清を分離して各種生化学指標を測定するとともに、脂肪組織から total RNA を分離して RT-qPCR により炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルを比較した。
- (2) 腸上皮細胞、腸粘膜免疫細胞、脂肪細胞、および炎症細胞を用いた共培養系の構築とシグナル探索： ヒト脂肪細胞株 SGBS あるいはヒト初代培養内臓脂肪細胞およびヒトマクロファージ細胞株 THP-1 を混合培養して脂肪組織炎症を模倣する *in vitro* モデルとして用い、これに半透膜を隔ててヒト腸上皮細胞株 Caco-2 を共培養した。このときの脂肪細胞における中性脂肪量を酵素法により測定するとともに、培地中の炎症性サイトカインを ELISA により定量した。同様に、マウス脂肪細胞株 3T3-L1 およびマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を混合培養し、これに半透膜を隔ててマウス小腸パイエル板細胞を共培養した。さらに、Sato *et al.* (2009 *Nature*) の方法にしたがってマウスの腸上皮細胞のモデルとしてクリプトオルガノイドを作成し、Toll 様受容体 (TLR) およびサイトカインの遺伝子発現を調べることにより、腸上皮の自然免疫組織のモデルとしての可能性を追究した。
- (3) 腸管から脂肪組織への情報伝達系の候補としてのエクソソームの解析： C57BL/6 マウスの血清から超遠心分離法を用いてエクソソームを分離し、マウス腹腔滲出細胞 (PEC) あるいは RAW264.7 細胞の培地に添加して培養した後、培養上清中の炎症性サイトカインを ELISA により定量した。また、エクソソームに含まれるアディポサイトカインを ELISA およびウェスタンブロッティングによって分析した。

## 4. 研究成果

- (1) No.14 株のインスリン抵抗性改善効果： 2 型糖尿病モデルである KK/Ta マウスにおいて、No.14 株の投与は白色脂肪組織の重量増加を抑制した。また、No.14 株投与による耐糖能の改善は見られなかったが、血清インスリンおよびレプチン

濃度の低下ならびにインスリン抵抗性指標である HOMA-1R の低下が認められた。さらに、No.14 株投与により白色脂肪組織における MCP-1 および TNF- $\alpha$  の mRNA レベルの低下がみられ、IL-6 mRNA レベルも低下傾向を示した(図1)。以上のことから、No.14 株は2型糖尿病モデルにおいて肥満を抑制して脂肪組織炎症を制御することによりインスリン抵抗性を緩和するものと推察された(Okubo *et al.* 2013 *Biosci Microb Food Health*)

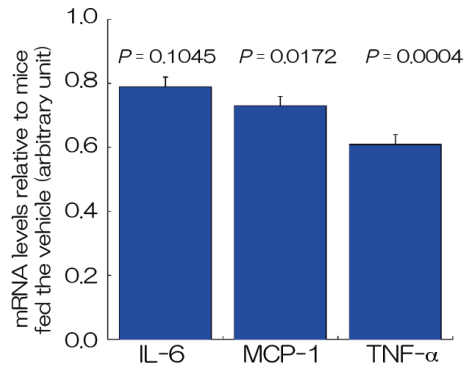


図1 KK/Ta マウスの白色脂肪組織における炎症性サイトカインの遺伝子発現レベル(生理食塩水投与マウスに対する No.14 株投与マウスの比で表示)

- (2) 腸上皮細胞、腸粘膜免疫細胞、脂肪細胞、および炎症細胞を用いた共培養系における No.14 株の脂肪蓄積抑制および炎症抑制効果: Caco-2 細胞とヒト内臓脂肪細胞の共培養系、およびマウス小腸パイエル板細胞と 3T3-L1 脂肪細胞の共培養系において、No.14 株の添加が脂肪細胞の中性脂肪蓄積を抑制することを見いだした。すなわち、これらの共培養系を用いて、腸上皮細胞に由来して脂肪細胞の脂肪蓄積を抑制するシグナルを探索することが可能となった。また、3T3-L1 細胞と RAW264.7 細胞の共培養による脂肪組織炎症モデルにおいて、No.14 株の培養上清が IL-6、MCP-1、および TNF- $\alpha$  産生を抑制することを観察した。これらの結果は、No.14 株の菌体外分泌物が生体内に取り込まれ、肥満に伴う脂肪組織炎症の抑制を介してインスリン抵抗性の進展を抑制することを示唆する。さらに、マウスの腸粘膜からクリプトオルガノイドを作成・培養し、解析したところ、TLR およびサイトカインの遺伝子発現パターンならびに TLR リガンドに対するこれらの応答が *in vivo* の腸粘膜と同様であることを明らかにした(図2)。したがって、クリプトオルガノイドは腸上皮の自然免疫組織のモデルとして有用である。

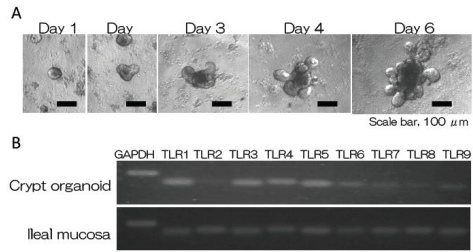


図2 マウスの小腸粘膜から構築したクリプトオルガノイド A) 培養6日目までのオルガノイドの成長(位相差顕微鏡写真) B) クリプトオルガノイドとマウス回腸粘膜における TLR 遺伝子発現(RT-PCR産物のゲル電気泳動)

- (3) No.14 株を投与したマウスの血清エキソソームの炎症抑制効果: No.14 株 ( $1 \times 10^8$  CFU/頭・日) を1週間混餌投与したマウスの血清から分離したエキソソームを別の無処置マウスから分離した PEC あるいは RAW264.7 細胞の培地に添加して6時間培養し、さらにリポ多糖(LPS)を

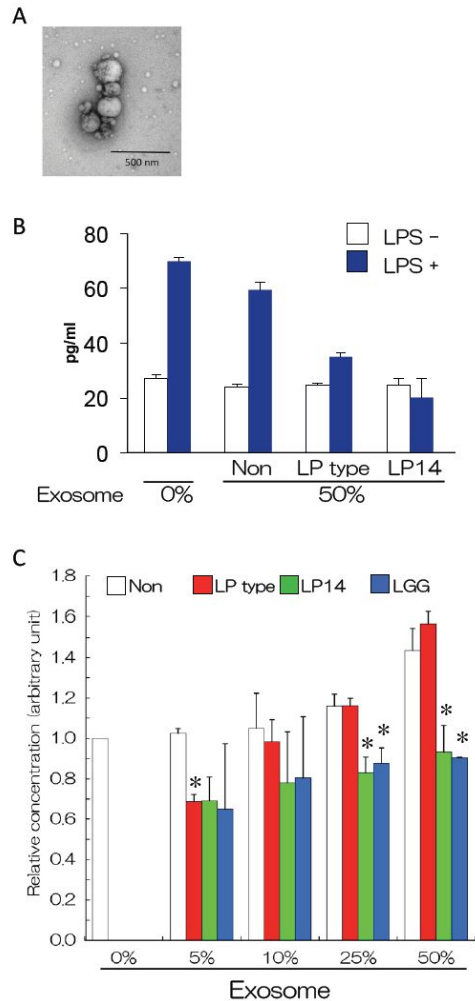


図3 血清エキソソームがマクロファージの TNF- $\alpha$  産生に及ぼす影響 A) マウスの血清から超遠心分離により得たエキソソームの電子顕微鏡写真 B) *L. plantarum* 基準株(LP type)あるいはNo.14株(LP14)を投与したマウスから分離したエキソソームがPECのTNF- $\alpha$ 産生に及ぼす影響 C) 同様にRAW264.7細胞のTNF- $\alpha$ 産生に及ぼす影響

添加して 18 時間培養したところ、乳酸菌非投与マウスおよび *L. plantarum* 基準株投与マウスから分離したエクソソームを添加した場合に比較して、TNF- $\alpha$  産生が抑制された(図 3)。これらの結果から、(1)において記した No.14 株の脂肪組織炎症抑制作用の少なくとも一部はエクソソームが媒介することが示唆された。

- (4) 難消化性オリゴ糖を摂取したマウスの血清エクソソームの炎症抑制効果： フラクトオリゴ糖 (FOS) 添加飼料を 4 週間摂取させたマウスの血清から分離したエクソソームを RAW264.7 細胞の培地に添加し、(3)と同様に培養したところ、FOS 添加飼料摂取マウスのエクソソーム添加において非添加飼料摂取マウスのエクソソーム添加に比較して、TNF- $\alpha$  産生が抑制された。筆者らはこれまでに FOS の摂取がアレルギー性炎症を抑制することを動物実験で示してきているので、今回の結果は FOS の炎症抑制作用の少なくとも一部はエクソソームが媒介することを示唆する。
- (5) マウスの血清エクソソームに含まれるアディポネクチン： (3)および(4)で述べた血清エクソソームの炎症抑制作用を解析する過程で、アディポサイトカインの一種で炎症抑制作用を示すアディポネクチンがエクソソームの構成要素のひとつであることを見いだした (Phoonsawat *et al.* 2014 *Biochem Biophys Res Commun*)。マウスの血清から分離したエクソソームについてウェスタンブロットングおよび ELISA を実施した結果、血清中のアディポネクチンの 2-10%がエクソソームの脂質二重膜に埋め込まれた形で存在すること、エクソソームに含まれるアディポネクチンは活性型の高分子量アディポネクチンが主体であることが示された(図 4)。アディポネクチンは脂肪細胞により産生・分泌されるので、本研究はアディポネクチンが脂肪細胞に由来するエクソソームのマーカーとなりうること、またエクソソームの機能と関連することを示唆している。

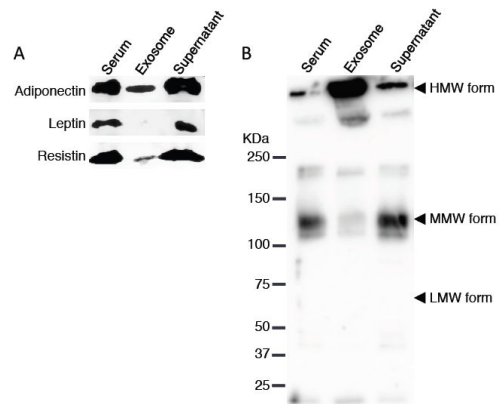


図 4 マウスの血清から分離したエクソソームのウェスタンブロット分析 A) 血清、エクソソーム画分、および超遠心分離上清を還元条件で SDS-PAGE により分離し、抗アディポネクチン、レプチン、およびレジスチン抗体で検出した。B) 同様に、非還元条件で SDS-PAGE により分離し、抗アディポネクチン抗体で検出した。A では等容量の血清を、B では等量のアディポネクチンを各ウェルにアブライした。

以上のように、本研究では、No.14 株および FOS が発揮する炎症抑制作用の少なくとも一部をエクソソームが媒介する可能性が示唆された。このことは、プロバイオティクスおよびプレバイオティクスが腸内細菌叢を介して宿主に対する健康機能を発揮するときに、腸管から末梢組織への情報伝達にエクソソームが関与することを意味する。腸内細菌叢が宿主の生理に影響するときにエクソソームが関わることについては、これまでまったく報告されておらず、生体内における新規の細胞間コミュニケーションシステムである可能性があるため、今後さらに解析を進めていく。

## 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 6 件)

- (1) Phoonsawat W, Aoki-Yoshida A, Tsuruta T, Sonoyama K. Adiponectin is partially associated with exosomes in mouse serum. *Biochemical and Biophysical Research Communications* in press. (査読有)  
doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.114.
- (2) 園山 慶, 肥満克服のターゲットとしての腸内細菌叢、「肥満克服のサイエンス-代謝の変容と脂肪細胞の制御から、最新治療まで」*実験医学* 2014; 32: 392-398. (査読無)
- (3) Okubo T, Takemura N, Yoshida A, Sonoyama K. KK/Ta mice administered with *Lactobacillus plantarum* strain No.14 have lower adiposity and higher insulin sensitivity. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 2013; 32:

- 93-100. (査読有)  
doi.org/10.12938/bmfh.32.93
- (4) Ozawa K, Fujiwara R, Watanabe K, Sonoyama K. Persistence of orally administered *Lactobacillus* strains in the gut of infant mice. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 2012; 31: 85-91. (査読有)  
doi.org/10.12938/bmfh.31.85
- (5) 園山慶、肥満、「腸管と免疫・栄養-腸内細菌から疾患を理解する」臨床栄養(臨時増刊)2012; 120: 730-735. (査読無)
- (6) 園山慶、肥満の環境要因としての腸内細菌叢 - 肥満を予防・改善できるプロバイオティクスはあるか? *化学と生物* 2011; 49: 664-665. (査読無)

〔学会発表〕(計 10 件)

- (1) 三輪明穂: 肥満マウスにおける腸内細菌叢と腸粘膜固有層 T 細胞サブセット、日本栄養・食糧学会 第 43 回 北海道支部会、2013 年 10 月 26 日、北海道大学(札幌)
- (2) Worrawalan Phoonsawat: Serum exosomes contain adiponectin in mice、日本栄養・食糧学会 第 43 回 北海道支部会、2013 年 10 月 26 日、北海道大学(札幌)
- (3) 石原利乃: 腸上皮 脂肪組織共培養系における脂肪組織炎症の解析、第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013 年 5 月 25 日、名古屋大学(名古屋)
- (4) 園山慶: 腸内細菌叢とメタボリックシンドローム、日本細菌学会第 86 回総会シンポジウム、2013 年 3 月 20 日、幕張メッセ(千葉)
- (5) 渡部夏林: フラクトオリゴ糖摂取により変化するマウスの T 細胞サブセットと腸内細菌叢の関係、日本食物繊維学会第 17 回学術集会、2012 年 11 月 23 日、中村学園大学(福岡)
- (6) 渡部夏林: フラクトオリゴ糖摂取がマウス由来 T 細胞サブセットと腸内細菌叢の変動に与える影響、日本食品免疫学会 第 8 回学術集会、2012 年 10 月 16 日、ヤクルトホール(東京)
- (7) 渡部夏林: フラクトオリゴ糖摂取マウスにおける T 細胞サブセットと腸内細菌叢の関係、第 66 回日本栄養・食糧学会大会、2012 年 5 月 19 日、東北大学(仙台)
- (8) 園山慶: 高脂肪食がプロバイオティクスに与える消化管内ストレスとプレバイオティクスによるストレス対処、日本食物繊維学会第 16 回学術集会シンポジウム、2011 年 11 月 26 日、(独)国立健康・栄養研究所(東京)
- (9) 横山恭子: *Lactobacillus plantarum* No.14 株の胃内投与がラットの体温におよぼす影響、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011 年 5 月 14 日、お茶の水女子大学(東京)

- (10) 小澤恵輔: 新生仔マウスにおける腸内細菌叢の確立に関する研究、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011 年 5 月 14 日、お茶の水女子大学(東京)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/fbc/sonoyama/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

園山 慶 (SONOYAMA KEI)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号: 90241364

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし