

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617005

研究課題名(和文) エキソソーム構成成分の網羅的解析によるスフィンゴ脂質の新たな栄養機能の実証

研究課題名(英文) Novel nutritional function of sphingolipids via secreted exosomes

研究代表者

三浦 豊 (MIURA, Yutaka)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10219595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ脂質の新たな栄養機能を明らかにすることを目的として研究を実施した。その結果、培地に添加されたスフィンゴミエリンが、ヒト肝癌細胞から分泌されるエキソソームのmRNA量、miRNA含量を変化させ、その変化を介してオートクラインに肝癌細胞の増殖を調節している可能性を見出した。さらにスフィンゴミエリンを8日間経口投与したラット血中より調製したエキソソームが骨格筋におけるグルコース取り込みを促進することを見出した。以上の結果はスフィンゴミエリンが細胞に取り込まれ、その細胞が分泌するエキソソームを質的に変化させることで、生理作用を発揮するという新たな栄養機能の一端を見出したものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The possible new nutritional functions of sphingolipids are proposed in this study, by analyzing the composition of exosomes prepared from sphingomyelin (SPM)-treated hepatoma cells or SPM-intubated rat sera. The treatment with SPM of human hepatoma cells resulted in the decrease of proliferation. The conditioned media of SPM-treated hepatoma showed an anti-proliferative effect on hepatoma cells. SPM treatment caused the change in miRNA composition of secreted exosome, thus suppressed the proliferation of surrounding cells. The exosomes prepared from SPM-intubated rat sera significantly promoted the glucose uptake of cultured muscle cells. This result suggests the possibility that orally-intubated SPM affects the composition of serum exosomes and shows some physiological effects in vivo.

These results clearly show the possibility that sphingolipids can affect the composition of exosomes secreted from cells or into sera, thus suggesting novel nutritional functions of sphingolipids.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：スフィンゴミエリン エキソソーム miRNA 脂質栄養学 肝癌細胞

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質とはセラミドに糖鎖やホスホコリンなどが結合した脂質のことであり、生体膜の構成成分として存在している。生体膜に存在しているため、通常の食品中にも含有されており、我々はスフィンゴ脂質を常時摂取している。スフィンゴ脂質の栄養機能については、セラミドの摂取により皮膚機能が改善するとの報告があり、サプリメントとして利用されているが、それ以外には脂質代謝や糖代謝に影響するとの報告はあるものの詳細は明らかではない。またスフィンゴ脂質は腸管から吸収されにくいと、どのような機構により生体に影響しているかについても明らかになっていない点が多数残されている。我々も食事から摂取したミルク由来スフィンゴ脂質がアレルギー抑制作用を示すことを明らかにしていたが、その機構については未知の点が多く残されていた。

一方、近年各種細胞が分泌する新たな細胞間情報伝達分子としてエクソソーム(膜小胞)が注目されている。エクソソームは直径40 nm から 100 nm の小胞であり、膜脂質としてスフィンゴ脂質を多く含むなど特徴的な組成を有するだけでなく、内容物として複数種の RNA や miRNA を含有している。かつては細胞内の老廃物を細胞外に廃棄する役割を有していると考えられていたが、分泌されたエクソソームが他の細胞に取り込まれ、含有する miRNA を介して生理作用を発揮することが明らかになり、細胞間の情報伝達経路の一つとして注目を集めるようになっていた。さらにエクソソームはほとんどすべての細胞で合成・分泌され、血液などの体液にも含まれていることが知られている。血液中のエクソソームは安定であり、単独では血液中で安定的に存在できない RNA 分子や miRNA の運び手として作用していることが推測されている。例えば、母乳中には多くのエクソソームが含有されており、その中には腸管免疫系の成熟に作用する RNA, miRNA が多数含まれていることから、母乳を介した新生児の免疫系の成熟に関与していると推測されている。

本研究はこのような背景を元にスフィンゴ脂質が細胞のエクソソーム構成を変化させることで、その栄養機能を発揮している可能性を検証することを目的として開始した。

2. 研究の目的

上記のように細胞が分泌するエクソソームの膜には細胞膜と比べて多くのスフィンゴ脂質が含有されている。したがって、スフィンゴ脂質が外因性に細胞に添加されることで、細胞内のスフィンゴ脂質組成が変化し、その結果エクソソーム合成・分泌経路が変化する可能性が考えられる。そこで、本研究ではスフィンゴミエリンの生理作用にエクソソームが関与しているというアイデアを証明するため、スフィンゴ脂質の添加により各

種細胞が分泌するエクソソームがどのように変化するかを明らかにし、その変化がスフィンゴ脂質の生理作用に關与している可能性を明らかにすることを目的とした。具体的にはスフィンゴ脂質を添加した培養細胞の培地、またはスフィンゴ脂質を摂取させた動物の血液からエクソソームを調製し、その内容を網羅的に解析することで、スフィンゴ脂質が与える影響を明らかにし、スフィンゴ脂質の新たな栄養機能を実証することとした。

3. 研究の方法

本研究では培養細胞としてヒト肝癌細胞 HepG2 細胞を、実験動物としてラットを用いた。動物実験に関しては所属機関の動物実験委員会に申請を行い、実験実施許可を取得した上で研究を実施した。

肝癌細胞に関しては以下のように実験を行った。培地にミルク由来および卵黄由来スフィンゴミエリンを懸濁し、超音波処理によりミセルを形成させた後に、細胞に添加した。48 時間培養することで、細胞にスフィンゴミエリンが取り込まれることは、スフィンゴミエリンに特異的に結合するライセニンと抗ライセニン抗体を用い、フローサイトメーターによる分析で確認した(図1)。

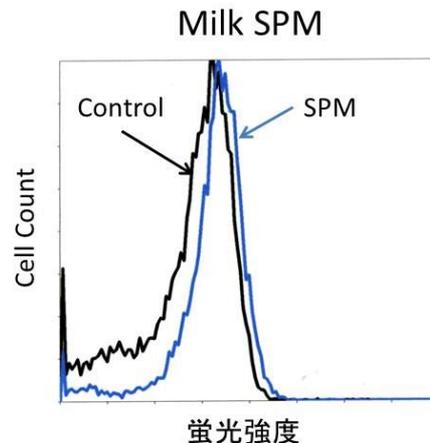


図1 ミルクスフィンゴミエリンの肝癌細胞への取り込み確認

肝癌細胞の増殖はWST-8法により測定した。培地中に分泌されたエクソソームの調製は市販のエクソソーム回収試薬を用いて行った。回収したエクソソームよりタンパク質、RNA を常法により調製し、分析に供した。

エクソソームマーカーの検出は抗HSP70抗体によるwestern blot分析により行った。エクソソーム中のmiRNAの分析はmiRNA用マイクロアレイを用い、含有されるRNA種の分析は次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析により実施した。

食事性スフィンゴミエリンの血中エクソソームに対する影響の解析のため、体重1 kgあたり100 µgのミルク由来スフィンゴミエ

リンを8日間ラットに経口投与した後、血清を調製した。対照群にはスフィンゴミエリンを懸濁した緩衝液のみを経口投与した。血清よりエキソソームを調製し、調製したエキソソームをラット筋管細胞に添加し、グルコース取り込みに対する影響を検討した。

4. 研究成果

ヒト肝癌細胞にスフィンゴミエリンを取り込ませた後、細胞を洗浄後、24時間通常の培地で培養したところ、対照群と比べて有意に増殖能が低下することが明らかになった(図2)。

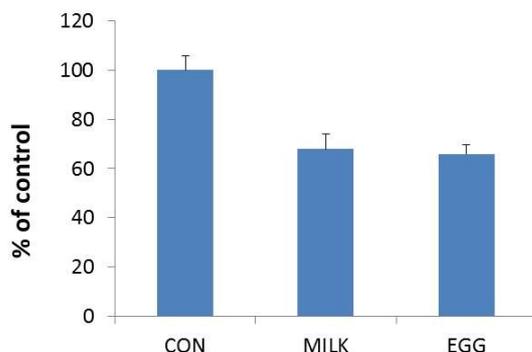


図2 スフィンゴミエリンを取り込ませた肝癌細胞の増殖

この増殖抑制作用は肝癌細胞の馴らし培地を調製し、別の肝癌細胞に添加した際にも観察されたことから、培地中に分泌された何らかの分子が増殖抑制作用を有している可能性が考えられた。

そこで、馴らし培地よりエキソソームを調製し、その構成成分を分析することとした。まず調製したエキソソームを界面活性剤により可溶化し、エキソソームマーカーの確認を行った。その結果、エキソソームマーカーであるHSP70が検出され、さらにその量にはスフィンゴミエリン添加による影響は見られないことが明らかになった(図3)。

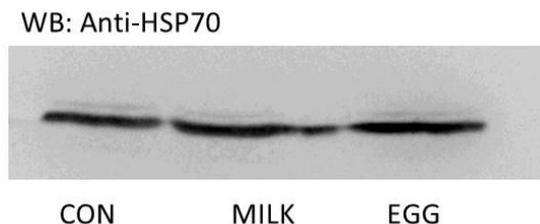


図3 調製したエキソソームの確認

この結果から、スフィンゴミエリンはエキソソームの量には影響せず、中身に影響している可能性が高いと考えられたため、調製したエキソソームよりAGPC法を用いてRNAを調製し、PAGEによりその比較を行った(図4)。

その結果、肝癌細胞が分泌するエキソソーム中には多くのRNA分子が存在していること

が明らかになり、また明確に量的な変動を示すバンドも複数種見られることが明らかとなった。なお、結果は示さないが、エキソソーム中のRNA内にいくつかのtRNAやU1RNAが存在していることもノザンプロットにより確認された。

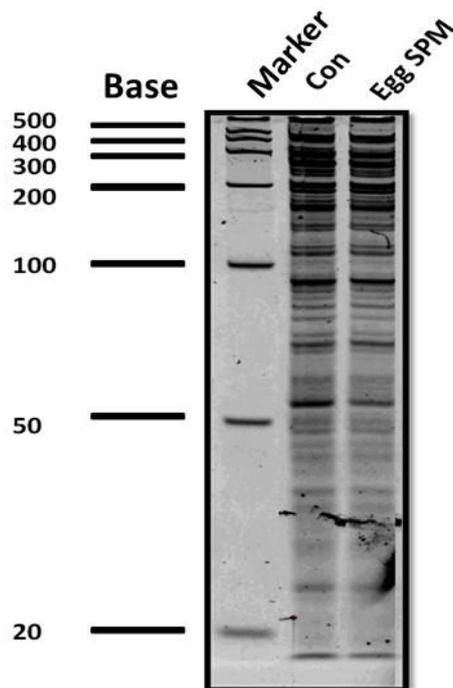


図4 エキソソーム中のRNAの泳動図

エキソソーム中には20塩基程度の長さであるmiRNAも含有されていることが明らかになっている。個々のmiRNAをPAGEにより検出することは困難であるため、miRNA用のマイクロアレイシステムを用いて、対照群、スフィンゴミエリン群のエキソソームより調製したRNA中のmiRNAを比較した。その結果、表1のように2倍以上の変動を示すものがいくつか検出された。

表1 変動したmiRNAのまとめ

miRNA name	CON	EGG	CON/EGG
hsa-miR-4708-3p	52136.48	83610.29	0.62
hsa-miR-4787-5p	52137.93	83397.82	0.63
hsa-miR-3960	52050.13	79759.16	0.65
hsa-miR-371b-5p	52165.61	79686.82	0.65
hsa-miR-193b-3p	468.39	311.82	1.50
hsa-miR-4635	56.35	37.25	1.51

これらのうち、比較的存在量が多く、変動幅が大きかったmiR-4708-3pとmiR-4787-5pに関しては、両者ともに細胞増殖に抑制的に作用する可能性が考えられているものであることから、本研究の目的の一つであるスフィンゴ脂質の添加によりエキソソーム中のmiRNAに質的な変動が生じ、その結果、エキソソームの生理作用が変化するという現象が観察された可能性が考えられた。

次にエクソソーム中のRNA分子の変動をさらに詳細に解析するため、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を行った。解析には genome analyzer Iix を用いた。その結果、変動が大きかった遺伝子として、ミトコンドリアの NADH dehydrogenase や cytochrome c oxidase、SET binding factor2 などの転写因子などが抽出されたが、細胞増殖抑制という生理作用に直接的に関与する因子は見られなかった。得られた解析結果の詳細に関しては今後さらに検討する予定である。

最後にスフィンゴミエリンを経口投与したラットの血清より調製したエクソソームの生理作用の検討を行った。方法欄に記載したようにスフィンゴミエリンを投与した後、ラットより全血を採取し、血清を調製した。調製した血清よりエクソソームを調製後、いくつかの細胞にエクソソームを添加し、生理作用の違いに関して検討を加えた。その結果、ラット骨格筋細胞である L6 細胞にエクソソームを添加した際に興味深い結果が得られた。すなわち、図5に示すようにエクソソームを添加しても細胞増殖能には変化が見られないが、図6に示すように筋管細胞によるグルコース取り込みがスフィンゴミエリン投与ラットの血中エクソソームにより有意に促進されることが明らかになった。

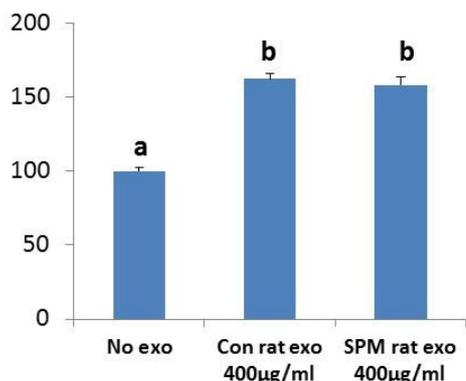


図5 血中エクソソームのL6筋管細胞の細胞増殖への影響

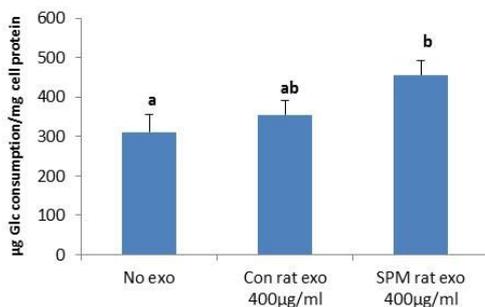


図6 血中エクソソームのL6筋管細胞のグルコース取り込みへの影響

スフィンゴミエリンを食餌として摂取させると糖代謝や脂質代謝が変動することが

これまでに報告されているが、この結果はスフィンゴミエリンを経口投与した際に血中のエクソソームが変化し、エクソソームを介して筋肉細胞のグルコース取り込み能が変化することを示しており、スフィンゴミエリンの生理作用にエクソソームが関与していることを強く示唆するものである。血中のエクソソームがどの組織から分泌されたものであるか、内容物にどのような変化があるかに関しては本研究の期間内に明らかにすることはできなかったが、一つの可能性として摂取したスフィンゴミエリンが腸管上皮細胞に作用し、分泌されるエクソソームの内容物に影響した可能性を想定している。なぜならばスフィンゴミエリンはほとんど腸管から吸収されないことが明らかにされているからである。今後、腸管上皮細胞を用いた検討、スフィンゴミエリン投与後の門脈血の採取とそこから調製したエクソソームの作用比較および成分分析などを行うことにより、この点が明らかになることが期待される。いずれにせよ、スフィンゴミエリンが生体内のエクソソームの構成に影響し、その生理作用の一部を発揮している可能性が示されたのは初めてのことであり、本研究の当初の目的の一部を達成できたものと考えている。

以上、本研究によりスフィンゴミエリンの栄養機能の新たな作用機序の一端を本研究により明らかにすることができた。今後、更に研究を進めることで、エクソソームという新たな信号伝達分子とスフィンゴ脂質の関連が明らかになり、栄養学に新分野が開かれることが期待される。

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8件)

Takeshima K, Mori Y, Sakai F, Haruta-Ono Y, Kadooka Y, Yagasaki K, Miura Y, Ameliorative effect of dietary milk-derived sphingomyelin concentrates on atopic-like dermatitis in NC/Nga mice. *J. Funct. Food*, **8C**, 53-62, 2014, DOI: 10.1016/j.jff.2014.03.001, 査読有

Cheong SH, Furuhashi K, Ito K, Nagaoka M, Yonezawa T, Miura Y, Yagasaki K, Daidzein promotes glucose uptake through glucose transporter 4 translocation to plasma membrane in L6 myocytes and improves glucose homeostasis in type 2 diabetic model mice. *J. Nutr. Biochem.*, **25**, 136-143, 2014, DOI: 10.1016/j.jnutbio.2013.09.012, 査読有

Son MJ, Minakawa M, Miura Y, Yagasaki K, Aspalathin improves hyperglycemia and glucose intolerance in obese diabetic ob/ob mice. *Eur. J. Nutr.*, **52**, 1607-1619, 2013, DOI: 10.1007/s00394-012-0466-6, 査

読有

Cheong SH, Furuhashi K, Ito K, Nagaoka M, Yonezawa T, Miura Y, Yagasaki K, Antihyperglycemic effect of equol, a daidzein derivative, in cultured L6 myocytes and ob/ob mice. *Mol.Nutr.Food Res.*, **58**, 267-277, 2013, DOI: 10.1002/mnfr.201300272, 査読有

Miura Y, Fujita H, Sakai F, Tachikawa H, Yagasaki K, Fujimoto D, Natural IgG antibody with anti- β -galactosyl specificity suppressed hepatoma cell invasion in culture. *Cytotechnology*, **65**, 909-913, 2013, DOI:10.1007/s10616-012-9523-5. 査読有

Kita Y, Miura Y, Yagasaki K, Anti-proliferative and anti-invasive effect of piceatannol, a polyphenol present in grapes and wine, against hepatoma AH109A cells. *J.Biomedicine & Biotechnology*, Article ID: 672416, 2012, DOI: 10.1155/2012/672416, 査読有

Yoshida S, Hirakawa N, Ito K, Miura Y, Yagasaki K, Anti-invasive activity of α -tocopherol against hepatoma cells in culture via protein kinase C inhibition. *J.Clin.Biochem,Nutr.*, **48**, 251-257, 2011, DOI: 10.3164/jcbrn.10-117. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

三浦 豊、竹島一憲、副島理人、森 悠美、春田裕子、酒井史彦、門岡幸男、矢ヶ崎一三、「ミルク由来スフィンゴ脂質の抗炎症作用」、日本農芸化学会 2014 年度大会(招待講演) 2014 年 3 月 30 日、明治大学

譚 哲立、矢ヶ崎一三、三浦 豊、「ヒト肝癌細胞が分泌する exosome に対する食品由来スフィンゴ脂質の影響」、日本動物細胞工学会 2013 年度大会、2013 年 7 月 18 日、ホテルフジタ福井

譚 哲立、矢ヶ崎一三、三浦 豊、「食品由来スフィンゴ脂質の肝癌由来細胞のエキソソーム構成成分に対する影響」、第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013 年 5 月 25 日、名古屋大学

副島理人、竹島一憲、酒井史彦、門岡幸男、矢ヶ崎一三、三浦 豊、Anti-inflammatory effect of dietary sphingomyelin concentrate from bovine milk in vitro and in vivo. JAACT 2012 NAGOYA, 2012 年 11 月 29 日、名古屋国際会議場

及川洋祐、矢ヶ崎一三、三浦 豊、Regulation of mouse melanoma invasion by membrane GM3. 日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学

佐藤直也、三村真吾、矢ヶ崎一三、三浦 豊、「低酸素条件下におけるマウスメラノーマ細胞悪性化の機構解析」日本動物細胞工学会 2011 年度大会、2011 年 7 月 22 日、東京大学山上会館

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 豊 (MIURA Yutaka)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 10219595

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし