

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450165

研究課題名(和文)食品による腸内環境改善を目指した腸内共生のエピゲノム基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of epigenetic mechanisms underlying the intestinal symbiosis for improvement of intestinal environments by foods

研究代表者

高橋 恭子 (TAKAHASHI, Kyoko)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：70366574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腸内共生の分子機構解明を目的とし、腸内細菌によるエピジェネティックな機構を介した腸管上皮機能の調節について解析を行った。その結果、腸内細菌により腸管上皮細胞において発現が誘導されるmiRNAを介して上皮透過性が調節されること、特定部位の腸管上皮細胞に豊富に発現するmiRNAを介して菌体シグナル抑制分子の発現が調節されることが明らかとなった。これらの成果は、腸内共生系を良好な状態に維持する食品成分の評価系構築に応用可能なものである。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanisms underlying the intestinal symbiosis, epigenetic regulation of intestinal epithelial function by gut microbiota was analyzed. It was shown that gut microbiota-dependent miRNA in intestinal epithelial cells regulates intestinal epithelial permeability. It was also shown that another miRNA abundantly expressed in intestinal epithelial cells of specific intestinal portions regulates expression of a negative signaling molecule to bacterial stimuli. These results are applicable to the evaluation system for food components which keep healthy symbiotic system in the intestine.

研究分野：農学

キーワード：食品機能 腸管上皮 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

食品を消化・吸収する腸管は、体内最多の免疫細胞を含む一方で莫大な数の腸内細菌の生息を許容するという独特の生態系を有する。腸管は生体で最大の免疫系を有し、この免疫系の働きにより外界から侵入する病原菌の感染から防御されている。一方、腸管の管腔には、成人では 100 兆個に及ぶと言われる莫大な数の腸内細菌が生息する。免疫による生体防御の基盤は、自己と非自己の識別と非自己抗原の攻撃・排除である。しかし、腸内細菌は免疫学的には非自己でありながら有益あるいは安全なものとして識別され、腸管免疫系により排除されてしまうことなく“共生”することができる。免疫による異物の排除応答は炎症反応を伴い、管腔に生息する大量の共生細菌は潜在的に強い炎症反応を誘導するものである。しかしながら、健康な腸管においては、幾重にも張り巡らされた特有の機構により、過剰な炎症反応は誘導されない。

近年、腸内細菌叢の構成やその乱れと、アレルギー、炎症性腸疾患、感染症、大腸がん、肥満、自閉症等との関連が次々と報告され (Nat. Med. 15:1016, 2009; Nat. Immunol. 13:947, 2012; Science 338:120, 2012; PLoS ONE 8:68322, 2013; Science 341:1069, 2013 など)、腸内細菌が宿主の免疫系をはじめとして、内分泌系、神経系にも作用してそれらの機能を調節するという認識のもと、急速に研究が展開されてきている。したがって、共生を基盤とした腸管の生態系は宿主の健康の維持・増進に鍵となる役割を果たすと言える。さらに、興味深いことに、腸内共生系の恒常性維持には、腸内細菌自らが関わる様々な機構を介して行われている。すなわち、腸内細菌自身が宿主に働きかけて共生を可能している側面があると言える。

腸管の管腔と体内とを隔てる広大な粘膜面は単層の上皮細胞で覆われており、これらの腸管上皮細胞 (IEC) は、常に最前線で腸内細菌からの刺激を受け取っている。我々は以前、IEC において微生物菌体成分を認識する Toll 様受容体 (TLR)4 遺伝子のメチル化が腸内細菌により誘導されることを見出した (J. Biol. Chem. 286:35755, 2011)。DNA のメチル化は、エピジェネティクスと呼ばれる塩基配列の変化を伴わないが遺伝性のあるゲノム DNA の修飾の 1 つであり、このような修飾によりクロマチンの構造変換を介して転写のオン、オフが制御される。DNA のメチル化の場合は、一般に CpG 配列のシトシンにメチル

基が付加されることにより、転写が抑制される。エピジェネティックな機構による遺伝子発現の制御は、DNA メチル化の他にヒストンの翻訳後修飾や非コード RNA により媒介され、発生や分化の過程で機能することが知られてきた。最近では食品や病原性微生物などの環境因子が遺伝子のエピジェネティックな変化をもたらすことが注目され、宿主はこれにより環境の変化に迅速かつ継続的に対応すると考えられるようになってきている。口から摂取して腸管に到達する食品は、腸内細菌による宿主遺伝子のエピジェネティックな変化の誘導を調節する作用を有することが期待される。そこで、腸内細菌が IEC における宿主遺伝子のエピジェネティックな変化を誘導し自身の共生を可能にする機構が存在すると考えた。

2. 研究の目的

腸内細菌によるエピジェネティックな機構を介した IEC 機能の制御システムは、共生を基盤とした腸管の生態系の恒常性維持、ひいては宿主の健康の維持・増進に重要な役割を果たすと考えられる。そして、腸管に到達して IEC に直接作用する食品は、その最も重要な調節因子となる。

そこで、本研究では、腸内細菌によるエピジェネティックな機構を介した腸管上皮機能の調節、共生の成立・維持の分子機構を明らかにし、食による健康の維持・増進のための新規ターゲットを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腸管上皮細胞における共生関連遺伝子の発現制御機構

まず、腸内の共生の成立に関わるモデル遺伝子として、菌体刺激によるシグナル伝達を抑制する Toll-interacting protein (Tollip)、および病原菌からの防御のみならず腸内細菌叢の維持に重要な役割を果たす抗菌ペプチド α -ディフェンシン 5 を取り上げ、IEC における発現制御機構の解析を行った。

Tollip 遺伝子の発現制御機構

通常マウスおよび無菌マウスの近位・中位・遠位小腸および大腸から IEC を調製し、Tollip のタンパク質および mRNA 発現をそれぞれウェスタンブロットティング、定量 RT-PCR により解析した。次に、Tollip 遺伝子の 3' 非翻訳領域中の翻訳抑制に関わる配列を IEC 株を用いたレポーターアッセイにより特定した。さらに、インヒビター導入実験により、特定

した配列に結合する miRNA を同定するとともに、同定した miRNA のマウス小腸および大腸 IEC における発現を定量 RT-PCR により測定した。

α -ディフェンシン 5 遺伝子の発現制御機構 IEC 株を用いたレポーターアッセイにより、 α -ディフェンシン 5 遺伝子の 5'領域中の転写調節配列を特定した。さらに、ゲルシフトアッセイおよびプルダウンアッセイによりこの配列へ結合する核タンパク質を同定した。また、マウス盲腸内容物中に α -ディフェンシン 5 遺伝子の発現を調節する腸内細菌由来代謝産物が存在するか、IEC 株を用いたレポーターアッセイの系にて解析した。

(2) 腸内細菌により誘導される miRNA の同定

通常および無菌マウスの小腸および大腸の IEC から総 RNA を調製し、マイクロアレイ解析により miRNA 発現の網羅的な解析を行った。通常マウスの IEC において無菌マウスよりも顕著に発現の高かった miRNA について、定量 RT-PCR にて発現の差を確認した。

(3) 腸内細菌により誘導される miRNA の機能解析

IEC 株へ同定した miRNA のインヒビターを導入し、上皮透過性および IL-8 産生に及ぼす影響をそれぞれ経上皮抵抗(TER)の測定および ELISA により解析した。また、プロテオーム解析を行い、インヒビターの導入により発現が顕著に増大したスポットにつき、MS 解析によりタンパク質を同定した。同定したタンパク質のマウス IEC における発現をウェスタンブロットングで解析するとともに、IEC 株を用いた siRNA 導入試験により機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 腸管上皮細胞における共生関連遺伝子の発現制御機構

Tollip 遺伝子の発現制御機構

Tollip タンパク質は、小腸 IEC ではほとんど検出されず大腸 IEC で顕著に高い発現を示した。mRNA 発現と相関が認められなかったことから、この腸管の部位に依存した発現制御は転写後レベルのものであると考えられた。さらに、Tollip 遺伝子 3'非翻訳領域中に、miR-31 の結合配列と相同性を有し翻訳抑制に関わる配列を特定した。miR-31 のインヒビターより Tollip 遺伝子の 3'非翻訳領域の翻訳抑制活性が低下すること、miR-31 の発現が大腸 IEC より小腸 IEC で顕著に高いことが示された。したがって、腸内細菌の数が小腸に比

べて圧倒的に多い大腸の IEC では、Tollip 遺伝子の翻訳を抑制する miR-31 の発現が低いいため、菌体刺激によるシグナル伝達を負に制御する Tollip タンパク質が高発現すると考えられた。

α -ディフェンシン 5 遺伝子の発現制御機構 α -ディフェンシン 5 遺伝子の 5'領域中に転写調節配列を同定し、この配列への結合因子として FBP1 を同定した。また、マウス盲腸内容物中に α -ディフェンシン 5 遺伝子の転写を活性化する、低分子量(3kDa 以下)の腸内細菌由来代謝産物が存在することを見出した。

(2) 腸内細菌により誘導される miRNA の同定

マイクロアレイによる網羅的解析の結果、腸内細菌により発現が変動する miRNA が存在することが示された。このうち、腸内細菌により誘導される miRNA として miR-21-5p を同定した。

(3) 腸内細菌により誘導される miRNA の機能解析

miR-21-5p のインヒビターを IEC 株に導入したところ、TER の増大が認められ、miR-21-5p が上皮透過性の調節に関わることが明らかになった。一方、miR-21-5p は IL-8 産生には影響を及ぼさないことが示された。また、miR-21-5p により発現が制御される分子として低分子量 GTPase である ARF4 を同定し、ARF4 は腸管上皮透過性を亢進させることが明らかになった。これらの結果より、腸内細菌により発現が誘導される miR-21-5p は、ARF4 依存的に上皮透過性を亢進することが示された。したがって、腸内細菌叢をコントロールすることで miR-21-5p の過剰な発現による上皮透過性の亢進を制御できる可能性が考えられる。以上、腸内細菌が IEC の miRNA 発現を誘導することにより腸管上皮機能を調節する新たな機構が明らかとなった。

(1) ~ (3) の結果より、腸内細菌により誘導される miRNA や腸管の部位特異的に発現する miRNA が、腸管上皮の透過性や菌体刺激に対する応答性といった IEC 機能を制御することが示された。これらの成果は、食品による腸管内生態系の制御のための新たなターゲットの確立に応用可能なものであり、腸管内生態系の恒常性の破綻に起因する様々な疾患の予防、治療につながる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Sugi Y, Takahashi K, Kurihara K, Nakano K, Kobayakawa T, Nakata K, Tsuda M, Hanazawa S, Hosono A, Kaminogawa S. α -Defensin 5 gene expression is regulated by gut microbial metabolites. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81: 242-248, 2016. 査読有
doi: 10.1080/09168451.2016.1246175.

Sugi Y, Takahashi K, Kurihara K, Nakata K, Narabayashi H, Hamamoto Y, Suzuki M, Tsuda M, Hanazawa S, Hosono A, Kaminogawa S. Post-transcriptional regulation of Toll-interacting protein in the intestinal epithelium. *PLoS One*. 11: e0164858, 2016. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0164858.

Miyazato S, Kishimoto Y, Takahashi K, Kaminogawa S, Hosono A. Continuous intake of resistant maltodextrin enhanced intestinal immune response through changes in the intestinal environment in mice. *Biosci Microbiota Food Health*. 35: 1-7, 2016. 査読有
doi: 10.12938/bmfh.2015-009.

Onodera T, Hosono A, Odagiri T, Tashiro M, Kaminogawa S, Okuno Y, Kurosaki T, Ato M, Kobayashi K, Takahashi Y. Whole-Virion Influenza Vaccine Recalls an Early Burst of High-Affinity Memory B Cell Response through TLR Signaling. *J. Immunol.* 196: 4172-4184, 2016. 査読有 doi: 10.4049/jimmunol.1600046.

Takahashi K. Influence of bacteria on epigenetic gene control. *Cell. Mol. Life Sci.* 71: 1045-1054, 2014. 査読有
doi: 10.1007/s00018-013-1487-x.

Kasakura K, Takahashi K, Itoh T, Hosono A, Nunomura S, Ra C, Momose Y, Itoh K, Nishiyama C, Kaminogawa S. C/EBP α controls mast cell function. *FEBS Lett.* 588: 4645-4653, 2014. 査読有
doi: 10.1016/j.febslet.2014.10.036.

Kasakura K, Takahashi K, Itoh T, Hosono A, Momose Y, Itoh K, Nishiyama C, Kaminogawa S. Commensal bacteria directly suppress in vitro degranulation of mast cells in a MyD88-independent manner. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78:1669-1676, 2014. 査読有
doi: 10.1080/09168451.2014.930327

Yamaguchi M, Takai S, Hosono A, Seki T. Bovine milk-derived α -lactalbumin inhibits colon inflammation and carcinogenesis in azoxymethane and dextran sodium sulfate-treated mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78:672-679, 2014. 査読有

doi: 10.1080/09168451.2014.890034.

〔学会発表〕(計 25 件)

中田 一彰、高橋 恭子、杉 由高、小早川 哲朗、榎林 ひかり、松尾 大介、牛島 直哉、津田 真人、細野 朗、上野川 修一、花澤 重正「低分子量 GTP アーゼを介した腸管上皮透過性の調節機構」日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学(京都府・京都市)

榎林 ひかり、高橋 恭子、坪井 瑞季、杉 由高、中田 一彰、倉岡 克弥、藤 佑志郎、松藤 寛、花澤 重正「腸内細菌叢による GABA 産生の解析」日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学(京都府・京都市)

岩月 美桜乃、高橋 恭子、芳賀 真矢、堀 大峰、笠倉 和巳、花澤 重正「マスト細胞の成熟過程における転写因子 C/EBP の発現制御」日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学(京都府・京都市)

石濱 史也、津田 真人、小熊 俊生、村木 悠平、於 鉄崢、八村 敏志、高橋 宜聖、高橋 恭子、上野川 修一、細野 朗「結腸リンパ節における T 細胞分化の特徴」日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学(京都府・京都市)

畑井 俊哉、上滝 隆太郎、津田 真人、高橋 恭子、細野 朗、八村 敏志「大腸リンパ節特徴的に存在する自然リンパ球の解析」日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学(京都府・京都市)

石井 涼太、石井 俊祐、津田 真人、高橋 恭子、八村 敏志、細野 朗、上野川 修一「小腸パイエル板細胞による IgA 産生応答における腸内細菌及びレチノイン酸による修飾作用」日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学(京都府・京都市)

NAKATA Kazuaki, TSUDA Masato, HOSONO Akira, TAKAHASHI Kyoko. "Intestinal microbiota-dependent miRNA affects epithelial permeability" 第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年 12 月 5 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

中田一彰、高橋恭子、津田真人、細野朗、上野川修一「腸管上皮細胞における miR-21-5p の機能解析」日本食品免疫学会 2016 年度大会、2016 年 11 月 9 日、東京大学伊藤謝恩ホール(東京都・文京区)

石濱 史也、津田 真人、八村 敏志、高橋 宜聖、高橋 恭子、上野川 修一、細野 朗「大腸リンパ組織における制御性 T 細胞の特性と

腸内細菌による影響」日本食品免疫学会 2016 年度大会、2016 年 11 月 9 日、東京大学伊藤謝恩ホール（東京都・文京区）

津田 真人、高橋 恭子、上野川 修一、細野 朗「フラクトオリゴ糖の摂取は食品アレルギーにおける腸管免疫系の T 細胞応答を抑制する」日本食品免疫学会 2016 年度大会、2016 年 11 月 9 日、東京大学伊藤謝恩ホール（東京都・文京区）

中田 一彰、高橋 恭子、杉 由高、小早川 哲朗、檜林 ひかり、花澤 重正、津田 真人、細野 朗、上野川 修一「腸内細菌により誘導される miR-21-5p は腸管上皮機能を調節する」日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

中野 利沙、櫻井 涉、大穂 満隆、舩廣 善和、高橋 恭子、花澤 重正「TIPE2 は Helicobacter pylori CagA 誘導性 TAK1-NF- κ B シグナルを抑制する」日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

上滝 隆太郎、糸賀 翔大、石井 俊祐、輪島 隼一、芝原 恭子、高橋 恭子、上野川 修一、細野 朗、八村 敏志「パイエル板樹状細胞は T 細胞の IL-21 遺伝子発現を誘導する」日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

村木 悠平、小熊 俊生、津田 真人、於 鉄嶺、沓掛 優香、八村 敏志、高橋 宜聖、高橋 恭子、上野川 修一、細野 朗「大腸リンパ組織における制御性 T 細胞フェノタイプ特性の解析」日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

畑井 俊哉、上滝 隆太郎、於 鉄嶺、高橋 恭子、八村 敏志、細野 朗「腸管免疫系細胞におけるインターロイキン-5 産生に与える腸内共生菌の影響」日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

TAKAHASHI Kyoko, HOSONO Akira. “Regulation of α -defensin 5 gene expression in intestinal epithelial cells” 第 44 回日本免疫学会 学術集会、2015 年 12 月 18 日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

中田 一彰、高橋 恭子、杉 由高、細野 朗、津田 真人、上野川 修一「腸内細菌により腸管上皮細胞において誘導される miRNA の同定」日本食品免疫学会 2015 年度大会、2015 年 10 月 15 日、東京大学伊藤謝恩ホール（東

京都・文京区）

沓掛 優香、中田 一彰、津田 真人、高橋 恭子、上野川 修一、細野 朗「腸内細菌とその代謝産物が腸管関連リンパ組織の IgA 産生応答を修飾する」日本食品免疫学会 2015 年度大会、2015 年 10 月 15 日、東京大学伊藤謝恩ホール（東京都・文京区）

上滝 隆太郎、於 鉄嶺、糸賀 翔大、畑井 俊哉、石井 俊祐、輪島 隼一、芝原 恭子、高橋 恭子、上野川 修一、細野 朗、八村 敏志「腸管関連リンパ組織における濾胞ヘルパー T 細胞についての解析」第 19 回腸内細菌学会、2015 年 6 月 18 日、北里大学薬学部コンベンションホール（東京都・港区）

中田 一彰、高橋 恭子、杉 由高、小早川 哲朗、細野 朗、上野川 修一「腸内細菌は、腸管上皮細胞における miRNA 発現を調節する」日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学津島キャンパス（岡山県・岡山市）

21 於 鉄嶺、鈴木 誠、沓掛 優香、八村 敏志、高橋 宜聖、高橋 恭子、上野川 修一、細野 朗「無菌マウスと通常マウスにおける大腸免疫系細胞フェノタイプの特徴」日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学津島キャンパス（岡山県・岡山市）

22 TAKAHASHI Kyoko, SUGI Yutaka, HOSONO Akira. “Regulation of intestinal epithelial cells by commensal bacteria through microRNA” 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 12 日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

23 小早川 哲朗、高橋 恭子、細野 朗、上野川 修一「 α -ディフェンシン 5 遺伝子の転写活性化因子の解析」日本食品免疫学会 2014 年度大会、2014 年 10 月 16 日、東京大学伊藤謝恩ホール（東京都・文京区）

24 宮里 祥子、岸本 由香、高橋 恭子、上野川 修一、細野 朗「経口摂取した難消化性デキストリンはマウス腸内環境の変化を介して腸管 IgA 産生を修飾する」日本食品免疫学会 2014 年度大会、2014 年 10 月 16 日、東京大学伊藤謝恩ホール（東京都・文京区）

25 於 鉄嶺、鈴木 誠、八村 敏志、高橋 宜聖、高橋 恭子、上野川 修一、細野 朗「マウス結腸リンパ節の組織形態と T 細胞フェノタイプの特徴」日本食品免疫学会 2014 年度大会、2014 年 10 月 16 日、東京大学伊藤謝恩ホール（東京都・文京区）

〔図書〕(計 1 件)

高橋 恭子、朝倉書店、乳の科学、224

(195-201) ページ、2015 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋 恭子 (TAKAHASHI, Kyoko)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号 : 70366574

(2)研究分担者

細野 朗 (HOSONO, Akira)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号 : 70328706