

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660216

研究課題名(和文)肥満制御と産肉性向上のダブル社会貢献を可能にするイムノバイオティクスの評価系構築

研究課題名(英文)Development of immunobiotic evaluation system for both regulation of obesity and improvement of meat production

研究代表者

北澤 春樹(Kitazawa, Haruki)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10204885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ブタ筋肉内脂肪前駆細胞を用いて、脂肪細胞分化誘導における自然免疫機能の解析を基礎として、脂肪蓄積制御に有効なイムノバイオティクスの新規選抜・評価系を構築することができた。本研究成果は、ヒトの肥満抑制と家畜の産肉性向上にダブル貢献できるイムノバイオティクスの発展的利用に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, a new immunobiotic assay system for regulation of fat accumulation in adipocytes was successfully developed by using porcine intramuscular preadipocyte (PIP) line based on the innate immune features. The utility of the assay system has been expected for the selection of certain immunobiotic candidate double exerting both anti-obesity in human and improvement of meat production in livestock.

研究分野：農学

キーワード：脂肪細胞 Toll様受容体 ブタ TNF サイトカイン ケモカイン 炎症免疫調節 食品・飼料

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの健康生活向上の観点から、肥満抑制は世界共通の主要な課題となっている。一方、家畜においては、脂肪率の調節による産肉性向上が求められている。両者には、脂肪蓄積制御が必要となるが、近年、炎症と脂肪蓄積との関連が指摘され、その調節が重要と考えられている。現在、脂肪制御に効果的な薬剤の開発は進んでいるが、薬のみに頼らない健全な解決策の検討は遅れている。

研究代表者はこれまでに、イムノバイオティクス（粘膜免疫機能性のプロバイオティクス）が、ヒトモデルとしても期待されるブタで、抗炎症機能を発揮することを見出した。また、共同研究者は、ブタ筋肉内脂肪前駆細胞を樹立し、その脂肪蓄積機能を解析している。これらの成果を基礎とすることで、ヒトの健康生活と家畜の生産性向上にダブル貢献できるものと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒトの肥満抑制と家畜の産肉性向上にダブル貢献できるイムノバイオティクスの発展的利用を目指し、ブタ筋肉内脂肪前駆細胞により、脂肪蓄積制御に有効なイムノバイオティクスの新規選抜・評価系を構築することを目的とした。

本研究成果は、薬のみに頼らないヒトの健康生活と家畜の健全育成の飛躍的向上に貢献する。

## 3. 研究の方法

### (1) ブタ腸管由来免疫担当細胞の乳酸菌刺激

#### ① 使用菌株

抗肥満に有効とされる乳酸菌あるはビフィズス菌の合計7菌株。

#### ② 成熟ブタ腸管パイエル板(PP)からの細胞調製と菌体刺激

成熟ブタ腸管からパイエル板を摘出し、コラーゲナーゼ/DNAase 処理後、細胞懸濁液を Lympholyte®-Mammal (CEDARLANE, HornBy, Ontario, Canada) を用い、比重法により単核球細胞を回収した。

免疫細胞を  $1 \times 10^6$  cells/well となるように 6 well プレートに播種し、菌体 ( $5 \times 10^8$  cells/well) を添加し、24 h 刺激した。刺激後、遠心上清を、ろ過滅菌し乳酸菌間接刺激サンプルとした。

### (2) PIP 細胞における炎症関連因子の遺伝子発現解析

#### ① PIP 細胞における自然免疫受容体の遺伝子発現解析

PIP 細胞の脂肪細胞分化前および分化後において、パターン認識受容体、TNF 受容体の

遺伝子発現について定量的リアルタイム RT-PCR 法により解析した。

#### ② PIP 細胞における TNF- $\alpha$ 刺激

PIP 細胞の脂肪細胞分化前および分化後において、TNF- $\alpha$  の各種濃度で刺激後、炎症関連サイトカインの遺伝子発現について定量的リアルタイム RT-PCR 法により解析した。

#### ③ 乳酸菌サンプル刺激による解析

PIP 細胞に、分化開始と同時に 1-2) で調製したサンプルを 100  $\mu$ l/well で添加し、48 h 前刺激した。刺激後 TNF- $\alpha$  で 3, 6, 12 h 刺激した。洗浄後、TRIzol Reagent を各 well に 500  $\mu$ l ずつ添加し、細胞溶解液を回収した。細胞溶解液より、Total RNA を調製後、cDNA の合成し定量的 Real-time RT-PCR 法により炎症関連因子 mRNA 発現について定量解析した。

### (3) PIP 細胞における脂肪酸蓄積量の測定

#### ① Oil red O 染色

PBS で洗浄後の PIP 細胞を、10 % ホルマリン溶液で固定した。洗浄後、Oil red O 染色液を添加し、37°C で 15 分間静置した。洗浄後、ヘマトキシリン・エオジンで染色した。

#### ② 画像解析

画像処理ソフト Image J を用いて画像解析を行った。RGB ごとに画像をグレースケールに分解し、赤で染色されている部分の面積を測定した(図 1)。その値と画像中の細胞数から細胞あたりの脂肪蓄積量を評価した。

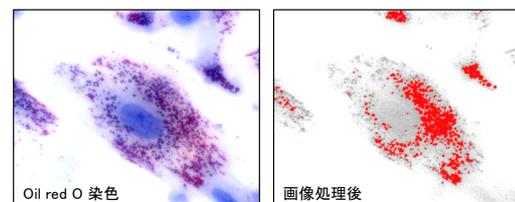


図 1 Image J による画像解析

#### ③ 乳酸菌サンプルによる刺激培養

ブタ筋肉内脂肪前駆(PIP)細胞に、分化開始と同時に、1-2) で調製したサンプルを 100  $\mu$ l/well で添加し、48 h 刺激した。刺激後、PBS で洗浄し、脂肪酸蓄積量を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) PIP 細胞における自然免疫受容体の発現解析

分化前後の脂肪細胞において、TLR1~9、Nod1 および Nod2 の発現が認められた。中でも、中でも、TLR2, 4, 6, および TNFR1, 2 において、分化により発現の有意な増強が認められた(図 2)。また、TLR3 および Nod1 において分化により発現の有意な減少が認められ

た。その他の受容体に関しては、分化による有意な発現量の変化は認められなかった。また、分化前後どちらの細胞でも TNFR1, 2 において特に強い発現が確認された。これは TNF- $\alpha$  が脂肪細胞の炎症に関わっているという知見と一致することから、抗肥満免疫バイオティクを評価する有力な免疫パラメータの一つとして位置づけることができる。今後、培養細胞である PIP 細胞において TNF- $\alpha$  刺激に対する応答を詳細に解析し評価していくことは大変有意義であると考えられる。

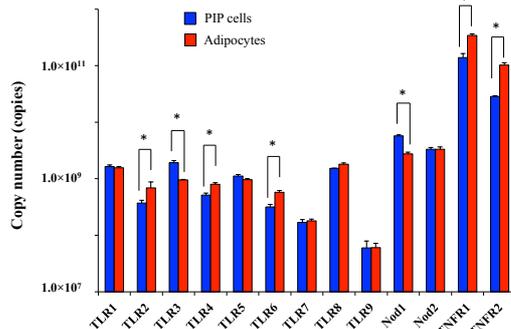


図2 自然免疫受容体の遺伝子発現

### (2) TNF- $\alpha$ 刺激による炎症関連因子の発現

脂肪細胞分化前後において TNF- $\alpha$  で刺激したところ、IL-6、CCL2 や IL-8 で、TNF- $\alpha$  濃度依存的な発現変化が認められた。中でも、CCL2 で極めて強い発現が認められたことから、評価系における免疫パラメータとして設定可能と期待された。さらに、免疫バイオティクスによる腸管免疫細胞を介する CCL2 の発現変動を解析することができた(図3)。

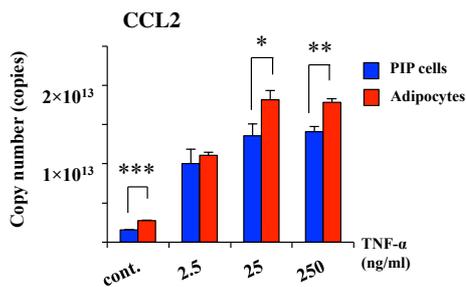


図3 PIP 細胞における CCL2 の発現

また、炎症性サイトカインである IL-8 と、その重要な分泌経路として知られる NF- $\kappa$ B 経路のネガティブレギュレーターである A20、BCL-3 では、分化による A20、BCL-3 の増強に伴い、IL-8 の減少が確認された。

以上のことから、発現量の変化が著しかったケモカイン、ネガティブレギュレーターを指標として、PIP 細胞を用いた抗肥満免疫バイオティク評価系を構築できるものと考えられた。

### (3) 乳酸菌サンプル刺激による脂肪蓄積制御ならびに CCL2 発現解析

脂肪細胞を TNF- $\alpha$  で単独刺激することにより脂肪蓄積が増加することが確認された。一方、ブタパイエル板免疫細胞を乳酸菌により刺激した培養上清で脂肪細胞を間接的に前刺激することにより、2 菌株で脂肪蓄積の有意な抑制が認められた(図4)。

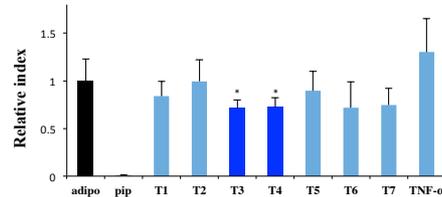


図4 乳酸菌間接刺激による脂肪蓄積抑制

また、免疫パラメータとして選抜した CCL2 の発現は、乳酸菌の直接刺激および間接刺激では経時的に発現の抑制傾向が強くなった。中でも間接刺激における 12 時間後では上記の 2 菌株において有意な減少が認められた。このことは脂肪蓄積量の解析結果と類似していることから、免疫バイオティクスの間接刺激により抗肥満免疫評価が行えることが期待された。

さらに、炎症シグナル調節に関わる細胞内ネガティブレギュレータに着目し、上記 2 菌株で脂肪細胞を間接刺激したところ、TNF- $\alpha$  刺激後 3~12 時間で、幾つかのネガティブレギュレーターの発現が認められた。すなわち、T3 菌株の間接刺激により、TNF- $\alpha$  刺激 6 時間後に A20 の有意な発現増強が認められた。さらに TNF- $\alpha$  刺激 3~6 時間後に MKP-1 (mitogen-activated protein (MKP) kinase phosphatase-1) の有意な発現増強が認められた。T4 菌株の間接刺激では、TNF- $\alpha$  刺激 3 時間後に A20 (tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3) の有意な発現抑制、12 時間後に有意な発現増強が認められた。また TNF- $\alpha$  刺激 12 時間後に BCL3 (B-cell leukemia/lymphoma 3) の有意な発現増強が認められた。

以上のことから、T3 菌株では A20 により NF- $\kappa$ B 経路が抑制され、MKP-1 により MAPK 経路が抑制されたと考えられる。さらに A20 では TNF- $\alpha$  刺激 6 時間後、MKP-1 では TNF- $\alpha$  刺激 3~6 時間後と、比較的早い時間でネガティブレギュレーターの発現が増強していたことで、MCP-1 の発現が抑制されていたと推測される。また、T4 菌株では A20 により NF- $\kappa$ B 経路が抑制され、BCL3 により転写が抑制されたと考えられる。しかし、T4 菌株では、MCP-1 の発現が抑制されたのは TNF- $\alpha$  刺激 12 時間後だけであった。これは A20、BCL3 の発現が増強するまでに TNF- $\alpha$  刺激後に 12 時間を要した

ことに起因すると考えられ、T4 菌株が効果を発揮するには時間がかかる可能性が示唆された。これらのことは、A20 が TLR シグナルに限らず、代表的な炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  の炎症応答においても作用するという報告を支持するものであり、TNF- $\alpha$  が NF- $\kappa$ B 経路でシグナル伝達し、細胞炎症を引き起こすという報告も支持する。また、この A20 の抑制に加えて、各菌株が特異的に MKP-1 や BCL3 の発現を増強し、MAPK 経路の抑制や MCP-1 の転写を抑制することで抗炎症作用を示すものと考えられた。このことは、A20 の発現増強や他のネガティブレギュレーター発現増強に着目することで、抗炎症から抗肥満作用を発揮するイムノバイオティクスの選抜が可能であることを示唆するものである。

炎症と肥満の関係に関する研究が切望される中で、PIP 細胞は、産業動物として有用なブタ由来で、なおかつブタ組織とヒト組織の高い相同性からヒトモデルとしても期待される。本研究成果により抗肥満作用を免疫学の観点から捉えた新たな評価系構築の道が開け、有用なイムノバイオティクスの選抜・評価が可能となるものと考えられる。選抜された有用なイムノバイオティクスを用いることで、ヒトでは抗肥満に効果的な機能性の食品開発、また、ブタでは脂肪蓄積制御による産肉性向上において、非常に有用であるものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Suzuki, M., A. Tada, P. Kanmani, H. Watanabe, H. Aso, Y. Suda, T. Nochi, K. Miyazawa, K. Yoda, F. He, M. Hosoda, T. Saito, J. Villena, H. Kitazawa. Advanced application of porcine intramuscular adipocytes for evaluating anti-adipogenic and anti-inflammatory activities of immunobiotics. *PLoS ONE*, 査読有, 10, 2015, e00119644, 10.1371/journal.pone.0119644

[学会発表] (計 2 件)

- ① A. K. B. Humayun Kober、多田明日翔、鈴木政彦、麻生 久、宮澤賢司、依田一豊、何方、齋藤忠夫、北澤春樹、Long term differentiation model of PIP cells for evaluating anti-adipogenic activities of immunobiotics、日本畜産学会第 121 回大会、東京、2016 年 3 月 27~30 日。
- ② 多田明日翔、鈴木政彦、Paulraj Kanmani、渡邊一史、麻生 久、宮澤賢司、依田一

豊、何方、細田正孝、齋藤忠夫、北澤春樹、ブタ脂肪前駆細胞によるイムノバイオティク評価に関する応用研究、平成 26 年度 酪農科学シンポジウム、東京、2014 年 9 月 12 日。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北澤 春樹 (KITAZAWA HARUKI)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：10204885

### (2) 研究分担者

麻生 久 (ASO HISASHI)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：50241625

### (3) 連携研究者

なし