

9. プレ・プロバイオティクスの健康機能を媒介する膜小胞

園山 慶

北海道大学 大学院農学研究院 応用生命科学部門 食品科学分野 食品機能化学研究室

Key words : 腸内細菌叢, 肥満, 炎症, エキソソーム, miRNA

緒言

さまざまな疾患の予防・治療の標的として腸内細菌叢が想定されるようになった。具体的には、宿主に有益な作用をもたらす常在細菌の増殖および活性を選択的に促進すること、および、宿主に有益な作用をもたらす生きた微生物を投与することが考えられ、前者の作用をもつ食品成分をプレバイオティクス、後者のような微生物をプロバイオティクスと言う。筆者らは、代表的なプレバイオティクスである難消化性オリゴ糖の摂取がアレルギーの症状を抑制すること¹⁻³⁾、ならびに乳酸菌株 *Lactobacillus plantarum* No.14 の投与が肥満、脂肪組織炎症およびインシュリン抵抗性を抑制することを^{4,5)}、動物実験により示した。しかしながら一般に、プレバイオティクスやプロバイオティクスが宿主に健康機能を発揮するときの細胞・分子機構、とりわけ腸内細菌叢の情報が腸管からアレルギー炎症局所や脂肪組織にどのようにして伝達されるのかについて、情報はきわめて限定的である。

エキソソーム (exosome, Exo) は、さまざまな細胞が放出する直径 50–100 nm の膜小胞で、タンパク、脂質、mRNA、および miRNA 等をカーゴとして、さまざまな生命現象における細胞間コミュニケーションに役割を担うと考えられている。ところが、腸内細菌などの消化管腔内の情報が Exo によって生体内に伝達されるか否かについては知られていない。そこで本研究では、プレバイオティクスおよびプロバイオティクスが宿主に対して健康機能を発揮する際の、腸管から各種組織への情報伝達を Exo が担っているという仮説を立て、それを検証した。

方法

1. Exo の抗炎症作用および脂肪蓄積抑制作用の解析

雄性 C57BL/6 マウスを *Lactobacillus plantarum* No.14 株 (10^8 CFU/日) 添加飼料、*L. plantarum* 基準株 (10^8 CFU/日) 添加飼料あるいは無添加飼料で 7 日間飼育した後、安楽死させて腹腔渗出細胞 (peritoneal exudate cells, PEC) を採取し、リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 0.5 ng/mL) 添加培地あるいは無添加培地で 24 時間培養した後、培地中の tumor necrosis factor- α (TNF- α) 濃度を ELISA で測定した。次に、雄性 C57BL/6 マウスを *L. plantarum* No.14 株、*L. plantarum* 基準株、あるいは *L. rhamnosus* GG 株を添加した飼料 (10^8 CFU/日) あるいは無添加飼料で 7 日間飼育した後、安楽死させて血清から超遠心分離法により Exo を分離し、マウスマクロファージ (macrophages, M ϕ) 細胞株 RAW264.7 の培地に添加して 6 時間培養後、さらに LPS 添加あるいは無添加条件で 18 時間培養し、培地中の TNF- α の濃度を測定した。また、前述と同様に飼育したマウスの血清 Exo を、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 の成熟脂肪細胞への分化誘導処理開始と同時に培地に添加し、10 日間培養した後、細胞ライセート中の中性脂肪量をオイルレッド O 染色法により測定した。さらに、Exo が脂肪細胞に取り込まれるか否かを調べるために、マウスの血清 Exo を蛍光色素 (PKH67) により標識し、3T3-L1 細胞に添加して 2 時間培養した後、蛍光顕微鏡により観察した。

2. Exo の miRNA プロファイルの解析

前述と同様に乳酸菌株を投与したマウスの血清 Exo から抽出した miRNA をマイクロアレイ解析 (3D-Gene miRNA Oligo chip, 東レ) に供した。また、雄性 F344 ラットを 3 群に分け、無添加飼料および飲み水として水道水、難消化性オリゴ糖の一種であるフラクトオリゴ糖 (fructooligosaccharide, FOS) 添加飼料および水道水、あるいは無添加飼

料および抗生剤（ネオマイシン 1 mg/mL、バンコマイシン 0.5 mg/mL、アンピシリン 0.5 mg/mL）を添加した水道水をそれぞれ2週間摂取させた。その後、同様に血清 Exo の miRNA プロファイルを解析した。

3. 腸内細菌叢の解析

2. において飼育したラットの盲腸内容物から DNA を分離し、総細菌数、Firmicutes 門、および Bacteroidetes 門に属する細菌数を、16S rRNA 遺伝子の RT-qPCR により推定した。

結果および考察

筆者らは過去に *L. plantarum* No.14 株の投与が肥満マウスの白色脂肪組織における炎症性サイトカインの発現を抑制することを観察したので⁵⁾、異なる炎症モデルにおいてこのことを確かめるために、乳酸菌株を投与したマウスから採取した PEC を LPS 刺激した際の TNF- α 産生を比較したところ、No.14 株投与群で非投与群に比して低値を示した（図1）。PEC のほとんどは M ϕ であることが知られているので、本実験の結果は No.14 株の投与が腹腔 M ϕ の TNF- α 産生を *ex vivo* において抑制することを示唆する。このような No.14 株の作用に Exo が関与するか否かを調べるために、乳酸菌株を投与したマウスの血清 Exo をマウス M ϕ 株 RAW264.7 の培地に添加したところ、No.14 株および代表的なプロバイオティクスである *L. rhamnosus* GG 株を投与したマウスの血清 Exo は TNF- α 産生を抑制した（図2）。以上のことから、乳酸菌株の抗炎症作用の少なくとも一部は Exo によって媒介されると推察した。

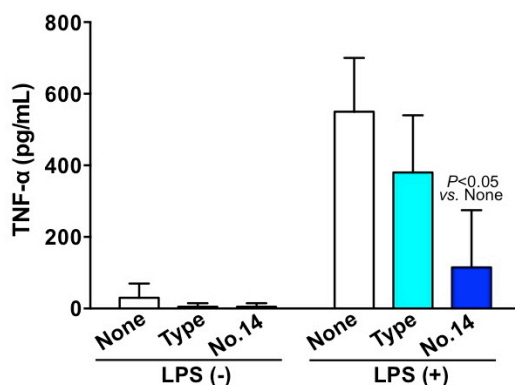


図1. 乳酸菌株の混餌投与によるマウス腹腔滲出細胞の TNF- α 産生抑制

乳酸菌株 (10^8 CFU/日) を7日間混餌投与したマウスから腹腔滲出細胞を採取し、LPS (0.5 ng/mL) 存在下 (LPS (+)) および非存在下 (LPS (-)) で24時間培養後、培地中の TNF- α 濃度を測定。None、乳酸菌株投与なし；Type、*L. plantarum* 基準株；No.14、*L. plantarum* No.14 株。データは平均値 \pm SEM。一元配置分散分析の後、Dunnnett 法で平均値を比較。

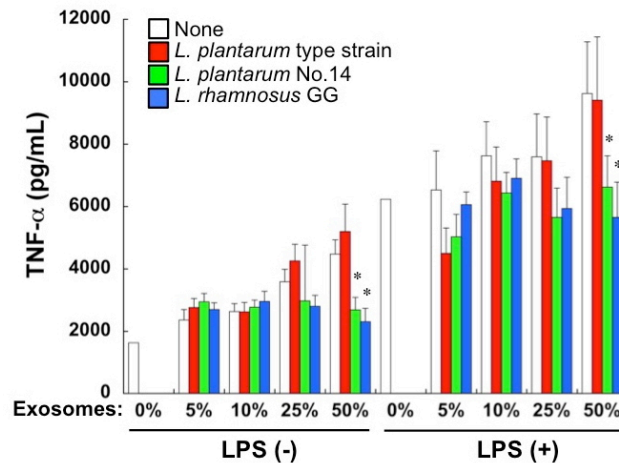


図2. 乳酸菌株を混餌投与したマウスの血清エキソソームによるマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 の TNF- α 産生抑制

乳酸菌株 (10^8 CFU/日) を 7 日間混餌投与したマウスの血清からエキソソームを分離し、RAW264.7 細胞の培地に異なる添加レベル (0–50%) で添加して 6 時間培養後、LPS (0.5 ng/mL) 存在下 (LPS (+)) および非存在下 (LPS (-)) で 18 時間培養し、培地中の TNF- α 濃度を測定。データは平均値 \pm SEM。一元配置分散分析の後、Dunnnett 法で平均値を比較。アスタリスクは 5% 有意水準で None (乳酸菌株投与なし) と差あり。

筆者らは No.14 株の投与が食餌誘導性肥満マウスの白色脂肪細胞のサイズ増加を抑制することを観察したので⁴⁾、このような No.14 株の作用に Exo が関与するか否かを調べるために、乳酸菌株を投与したマウスの血清 Exo を 3T3-L1 脂肪細胞株の培地に添加したところ、No.14 株および GG 株を投与したマウスの血清 Exo は細胞内の脂肪蓄積を抑制した (図3)。つまり、乳酸菌株の抗肥満作用の少なくとも一部は Exo によって媒介されると考えられる。一般に、Exo はレシピエント細胞内に取り込まれて作用すると考えられているが、本研究においても、マウスの血清から分離した Exo が 3T3-L1 細胞に取り込まれることが観察された (図4)。

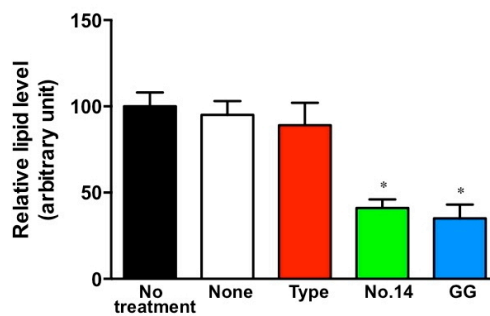


図3. 乳酸菌株を混餌投与したマウスの血清エキソソームによるマウス脂肪細胞株 3T3-L1 の脂肪蓄積抑制

乳酸菌株 (10^8 CFU/日) を 7 日間混餌投与したマウスの血清からエキソソームを分離し、3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化誘導開始時から培地に添加し、10 日後に細胞内脂質含量をオイルレッド O 染色により比較した。No treatment、エキソソーム無添加；None、乳酸菌株投与なし；Type、*L. plantarum* 基準株；No.14、*L. plantarum* No.14 株；GG、*L. rhamnosus* GG 株。データは平均値 \pm SEM。一元配置分散分析の後、Dunnnett 法で平均値を比較。アスタリスクは 5% 有意水準で No treatment と差あり。

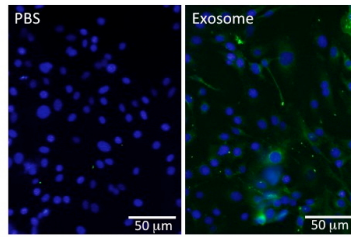


図4. マウス脂肪細胞株 3T3-L1 による血清エクソソームのとりこみ

マウスの血清から分離したエクソソームを PKH67 標識し（緑色蛍光）、3T3-L1 細胞の培地に添加して 2 時間培養後、蛍光顕微鏡により観察。青色は DAPI による核染色。PBS、PKH67 処理したリン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline）を添加；Exosome、PKH67 処理した血清エクソソームを添加。

Exo のカーゴである miRNA は、レシピエント細胞における遺伝子発現のエピジェネティック制御に関与する。そこで、マウスの血清 Exo に含まれる miRNA のマイクロアレイ解析を実施した結果、乳酸菌株の投与は miRNA のプロファイルを変化させることが明らかとなった（図5）。また、グローバルに腸内細菌叢を変化させる FOS および抗生剤もやはり血清 Exo の miRNA プロファイルを変化させた（図6）。

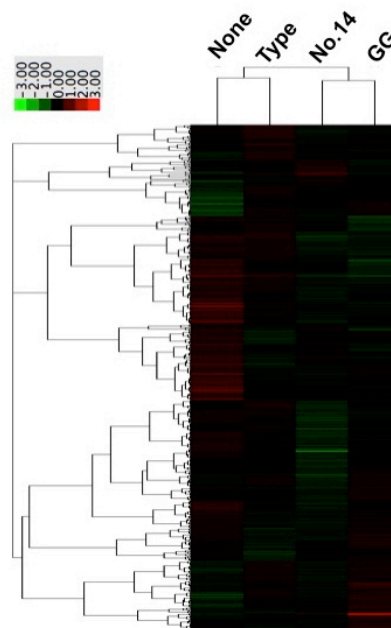


図5. 乳酸菌株を混餌投与したマウスの血清エクソソームにおける miRNA プロファイル

乳酸菌株（ 10^8 CFU/日）を 7 日間混餌投与したマウスの血清エクソソームから miRNA を分離し、マイクロアレイ解析に供した。図は、各群 6 匹の試料をプールして分析した結果のヒートマップ。None、乳酸菌株投与なし；Type、*L. plantarum* 基準株；No.14、*L. plantarum* No.14 株；GG、*L. rhamnosus* GG 株。

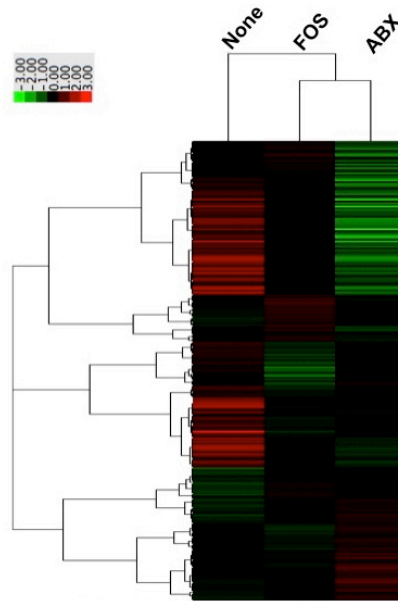


図6. 難消化性オリゴ糖および抗生剤の投与がラットの循環血中エクソソームにおける miRNA プロファイルにおよぼす影響

試験飼料および抗生剤を添加した飲み水で2週間飼育したラットの血清エクソソームから miRNA を分離し、マイクロアレイ解析に供した。図は、各群6匹の試料をプールして分析した結果のヒートマップ。None、無添加飼料および水道水；FOS、5%フラクトオリゴ糖添加飼料および水道水；ABX、無添加飼料および抗生剤添加水道水（ネオマイシン 1 mg/mL、バンコマイシン 0.5 mg/mL、アンピシリン 0.5 mg/mL）。

とりわけ、一群の miRNA が FOS および抗生剤によってともに減少した。それらの miRNA は、LPS を腹腔投与したマウス⁶⁾、実験的敗血症マウス⁷⁾、および高脂肪食摂取マウス⁸⁾ の血中において増加することが報告されており、これらの条件では Bacteroidetes 門の細菌が優勢となると考えられる。以上のことを考慮すると、FOS および抗生剤は腸内の Bacteroidetes 門を減少させ、そのことが一群の miRNA の減少につながると予想できる。そこで、腸内細菌叢を 16S rRNA 遺伝子に基づいて解析した結果、総細菌数は抗生剤によって減少し、Firmicutes 門および Bacteroidetes 門の細菌数はともに FOS および抗生剤によって減少することが明らかとなった（図7）。

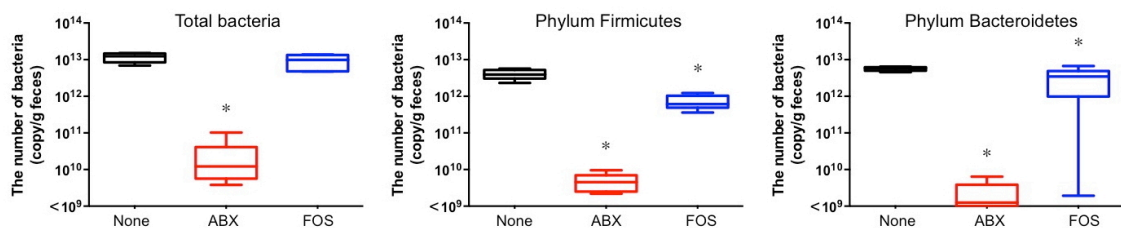


図7. 難消化性オリゴ糖および抗生剤の投与がラットの腸内細菌叢におよぼす影響

試験飼料および抗生剤を添加した飲み水で2週間飼育したラットの盲腸内容物から DNA を分離し、16S rRNA 遺伝子の RT-qPCR により細菌数を推定した。None、無添加飼料および水道水；FOS、5%フラクトオリゴ糖添加飼料および水道水；ABX、無添加飼料および抗生剤添加水道水（ネオマイシン 1 mg/mL、バンコマイシン 0.5 mg/mL、アンピシリン 0.5 mg/mL）。一元配置分散分析の後、Dunnnett 法で平均値を比較。アスタリスクは 5%有意水準で None と差あり。

以上のように、乳酸菌株の抗炎症作用および抗肥満作用の少なくとも一部は Exo が媒介することが示唆され、また、乳酸菌株の投与ならびに FOS および抗生剤による腸内細菌叢の変化は血清 Exo の miRNA プロファイルを変化させ

ることが示唆された。今後は、Exo の作用が miRNA のエピジェネティック制御によって発揮されることを直接的に証明する必要がある。

本研究に多大なご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Watanabe J, Sasajima N, Aramaki A, Sonoyama K. Consumption of fructo-oligosaccharide reduces 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice. *Br J Nutr.* 2008;100:339-46. doi: 10.1017/S0007114507901221.
- 2) Fujiwara R, Takemura N, Watanabe J, Sonoyama K. Maternal consumption of fructo-oligosaccharide diminishes the severity of skin inflammation in offspring of NC/Nga mice. *Br J Nutr.* 2010;103:530-8. doi: 10.1017/S000711450999198X.
- 3) Sasajima N, Ogasawara T, Takemura N, Fujiwara R, Watanabe J, Sonoyama K. Role of intestinal *Bifidobacterium pseudolongum* in dietary fructo-oligosaccharide inhibition of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice. *Br J Nutr.* 2010;103:539-48. doi: 10.1017/S0007114509992145.
- 4) Takemura N, Okubo T, Sonoyama K. *Lactobacillus plantarum* strain No.14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Exp Biol Med.* 2010;235:849-56. doi: 10.1258/ebm.2010.009377.
- 5) 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. *Biosci Microb Food Health.* 2013;32:93-100. doi: 10.12938/bmfh.32.93.
- 6) Hsieh CH, Rau CS, Jeng JC, Chen YC, Lu TH, Wu CJ, Wu YC, Tzeng SL, Yang JC. Whole blood-derived microRNA signatures in mice exposed to lipopolysaccharides. *J Biomed Sci.* 2012;19:69. doi: 10.1186/1423-0127-19-69.
- 7) Wu SC, Yang JC, Rau CS, Chen YC, Lu TH, Lin MW, Tzeng SL, Wu YC, Wu CJ, Hsieh CH. Profiling circulating microRNA expression in experimental sepsis using cecal ligation and puncture. *PLoS One.* 2013;8:e77936. doi: 10.1371/journal.pone.0077936.
- 8) Hsieh CH, Rau CS, Wu SC, Yang JC, Wu YC, Lu TH, Tzeng SL, Wu CJ, Lin CW. Weight-reduction through a low-fat diet causes differential expression of circulating microRNAs in obese C57BL/6 mice. *BMC Genomics.* 2015;16:699. doi: 10.1186/s12864-015-1896-3.