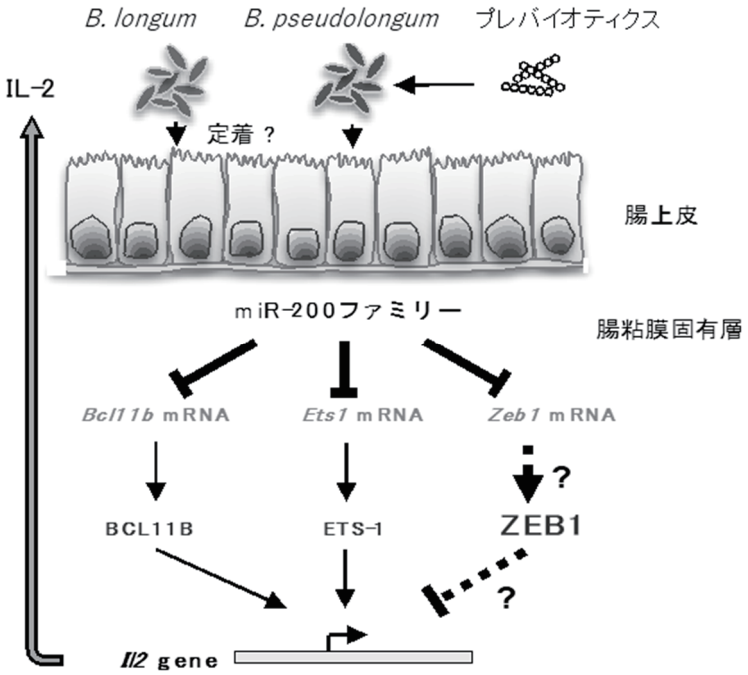
98　腸内細菌の定着に寄与するmicroRNA	逢坂　文那

【目的】ビフィズス菌は腸内細菌叢を構成する細菌の一つであり、宿主に対してさまざまな健康機能を発揮する。また、ビフィズス菌はプロバイオティクスとして利用されるが、摂取したプロバイオティクスが腸管内に定着することは困難である。我々の最近の研究により、腸内細菌の定着に宿主のマイクロ RNA（miRNA）が関与することを示唆する知見を得た。そこで、本研究では、腸管に常在しているビフィズス菌が宿主の miRNA の発現を調節することにより自らの定着を有利にしているという仮説を立て、miRNA の遺伝子サイレンシングを介してプロバオティクスが腸管へ定着するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】マウスに常在する主要なビフィズス菌である *Bifidobacterium pseudolongum* を 2 日間、7 日間、あるいは 14 日間マウスに胃内投与し、大腸粘膜固有層白血球における miR-200 ファミリーの発現におよぼす影響をリアルタイム定量 PCR（qPCR）法によって解析した。さらに、*B. pseudolongum* が大腸粘膜固有層白血球の miR-200 ファミリーの発現に直接影響しているかどうかを確かめるため、*B. pseudolongum* を含む数種類のビフィズス菌の死菌体をマウスから分離した大腸粘膜固有層白血球に添加し、qPCR により解析した。

【結果】*B. pseudolongum* をマウスに 7 日間投与すると、大腸粘膜固有層白血球における miR-200 ファミリーの発現が増加した。しかしながら、2 日間あるいは 14 日間投与による miR-200 ファミリーの発現変化は観察されなかった。このことは、ビフィズス菌の定着には大腸粘膜固有層白血球における miR-200 ファミリーの一時的な発現増加が寄与する可能性を示唆する。また、マウスから分離した大腸粘膜固有層白血球にビフィズス菌の死菌体を添加した結果、miR-200 ファミリーの発現増加は観察されなかった。今後は、miR-200 ファミリーの発現を変化させる因子を同定するため、ビフィズス菌の代謝産物などの別の腸内細菌因子の添加を検討するとともに、*B. pseudolongum* 投与による miRNA の遺伝子サイレンシングを介して実際にプロバイオティクスが定着するかどうかを検討する予定である。

想定している腸内細菌の定着メカニズム



98. 腸内細菌の定着に寄与する microRNA

逢坂　文那

北海道大学 大学院農学研究院 基盤研究部門 生物機能化学分野 食品機能化学研究室

Key words：腸内細菌叢，プレバイオティクス，プロバイオティクス，microRNA，大腸粘膜固有層

緒　言

ビフィズス菌は腸内細菌叢を構成する細菌の一つであり、宿主に対してさまざまな健康機能を発揮する。またビフィズス菌はプロバイオティクスとして利用されるが、摂取したプロバイオティクスが腸管内に定着することは困難である。我々はこれまでに、腸内細菌の定着に宿主のマイクロ RNA（microRNA：miRNA）が関与することを示唆する知見を得た［1］。

miRNA は 20 塩基程度の非翻訳 RNA であり、標的 mRNA の 3'非翻訳領域に配列相補的に結合して、転写後の遺伝子発現を抑制することにより、さまざまな生命現象や疾患に関与する。我々はこれまでに、腸内細菌叢を持たない無菌マウスと通常マウスの比較解析により、腸内細菌叢の存在が大腸粘膜固有層白血球（lamina propria leukocyte：LPL）の miR-200 ファミリー（miR-141-3p/ -200a-3p、miR-200b-3p/ -200c-3p/ -429-3p）による遺伝子サイレンシングを介して、腸管の防御免疫に中心的な役割を果たすインターロイキン 2（interleukine-2：IL-2）の産生を減少させることを明らかにした［1］。さらには、腸内のビフィズス菌を増加させることが知られているフラクトオリゴ糖の摂取、およびマウスの主要な常在ビフィズス菌の一つである *Bifidobacterium pseudolongum* の投与が、マウスの大腸 LPL における miR-200 ファミリーの発現を増加させるという予備的な知見を得た。IL-2 は主に活性化された CD4 陽性 T 細胞から産生され、Th1 細胞および Th2 細胞を誘導することにより、腸粘膜に侵入する病原体に対する防御免疫に寄与している。これらのことから、ビフィズス菌が miR-200 ファミリーによる遺伝子サイレンシングを介して IL-2 の産生を減少させて腸管の防御免疫を抑制することにより、自らの定着を可能にしている可能性がある。しかしながら、腸内細菌叢と miRNA の関係性についてはほとんど研究されておらず、腸内細菌叢の宿主への定着に miRNA による遺伝子サイレンシングが寄与しているという知見はこれまでに報告されていない。そこで、本研究では、腸管に常在しているビフィズス菌が、宿主の miRNA の発現を調節することにより自らの定着を有利にしているという仮説を立て、これを検証した。

マウスに *B. pseudolongum* を 7 日間投与した結果、大腸 LPL における miR-200 ファミリーの発現が増加することを確認したが［2］、2 日間および 14 日間の投与による miR-200 ファミリーの発現増加は観察されなかった。このことは、ビフィズス菌の定着には大腸 LPL における miR-200 ファミリーの一時的な発現増加が寄与する可能性を示唆する。さらに、マウスから分離した大腸 LPL にビフィズス菌の死菌体を添加したところ、miR-200 ファミリーの発現増加は観察されなかったことから、*B. pseudolongum* が大腸 LPL に直接作用せずに、miR-200 ファミリーの発現調節に寄与している可能性が示唆された。今後、大腸 LPL の miR-200 ファミリーの発現増加に寄与する因子を同定するとともに、*B. pseudolongum* 投与による miRNA の遺伝子サイレンシングを介して実際にプロバイオティクスが定着するかどうかを検討する予定である。

方　法

1. *B. pseudolongum* を投与したマウス大腸 LPL における miR-200 ファミリーの発現解析

雄性 C57BL/6J JmsSlc マウスに AIN-93G Growing Rodent Diet（D10012G）および水道水を自由摂取させ、1 週間馴化したのち、PBS（－）あるいは *B. pseudolongum*（10^9 CFU/day）を 2 日間、7 日間、あるいは 14 日間胃内投与した。飼育最終日に、セボフルラン麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させ、盲腸および結腸を摘出し、定法により LPL を分離した。得られた LPL から総 RNA を分離し、リアルタイム定量 PCR（qPCR）法により miR-200 ファミリーの発現レベルを解析した。また、盲腸内容物から DNA を分離し、総ビフィズス菌数および *B. pseudolongum* 数を qPCR 法により定量した。

2. 各種ビフィズス菌の死菌体を添加した培養マウス大腸 LPL における miR-200 ファミリーの発現解析

前述と同様にマウスを飼育し、大腸 LPL を分離した。5×10^6 cells/ml の大腸 LPL に対して、121℃、20 分間オートクレーブ処理した *B. pseudolongum*、代表的なプロバイオティクスである *B. bifidum* 1254 あるいは *B. bifidum* 1255 の死菌体をそれぞれ 5×10^6 CFU 添加し、25 ng/mL PMA、1 μg/mL イオノマイシン存在下で 24 時間および 48 時間培養した。培養した大腸 LPL から総 RNA を分離し、qPCR 法により miR-200 ファミリーの発現レベルを解析した。

3. TSLP および TGF-β を添加した培養マウス T 細胞株 EL-4 細胞における miR-200 ファミリーの発現解析

マウス T リンパ球細胞株である EL-4 細胞（2×10^6 cells/mL）を抗 CD3/抗 CD28 抗体存在下で培養し、上皮細胞から産生されるサイトカインの一つである Thymic stromal lymphopoietin（TSLP）（40 ng/mL）あるいは TGF-β（3 ng/mL）を添加した。24 時間あるいは 48 時間培養後、細胞を回収、総 RNA を分離し、qPCR 法により miR-200 ファミリーの発現レベルを解析した。

結果および考察

1. *B. pseudolongum* を投与したマウス大腸 LPL における miR-200 ファミリーの発現解析

先行研究において、ビフィズス菌の投与期間の違いが miRNA の発現を変化させた結果、標的遺伝子発現を変化させることが報告されていることから［3］、本研究においてもそのことを確かめた。盲腸内容物中の総ビフィズス菌数および *B. pseudolongum* 数は、投与期間の違いにかかわらず、PBS（－）投与群と比較して、*B. pseudolongum* 投与群で高値を示した（図 1）。*B. pseudolongum* の 7 日間投与により、miR-200 ファミリーを含む miR-182-5p、miR-192-5p、miR-194-5p、miR-200a-3p、miR-200b-3p/ -429-3p および miR-215-5p の発現は高値を示したものの（図 2）、2 日間、あるいは 14 日間の投与による miR-200 ファミリーの発現増加は観察されなかった。このことは、ビフィズス菌の投与期間が miRNA の発現を動的に変化させることを示しており、ビフィズス菌の定着には大腸 LPL における miR-200 ファミリーの一時的な発現増加が寄与する可能性を示唆する。

2. 各種ビフィズス菌の死菌体を添加した培養マウス大腸 LPL における miR-200 ファミリーの発現解析

1. において、*B. pseudolongum* 投与により大腸 LPL の miR-200 ファミリーの発現が増加することを観察したので、大腸 LPL における miR-200 ファミリーの発現増加に寄与する因子の同定を試みた。マウスから分離した大腸 LPL に対して、オートクレーブ処理した *B. pseudolongum*、*B. bifidum* 1254 あるいは *B. bifidum* 1255 の死菌体を添加したところ、miR-200 ファミリーの発現増加は認められなかった。このことは、*B. pseudolongum* が大腸 LPL に直接作用せずに、miR-200 ファミリーの発現調節に寄与している可能性が示唆された。しかしながら、大腸 LPL は、T 細胞、B 細胞、樹状細胞およびマクロファージなどさまざまな細胞種から構成されている

ため、大腸 LPL において観察された miR-200 ファミリーの発現レベルは複数の細胞種の平均値であることを考慮する必要がある。

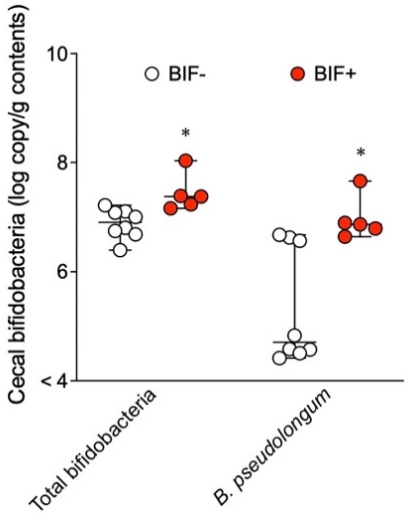


図 1. 盲腸内容物中の総ビフィズス菌数および *B. pseudolongum* 数
マウスに *B. pseudolongum*（10^9 CFU/日）を 7 日間投与した際の、盲腸内容物中の総ビフィズス菌数（Total bifidobacteria）および *B. pseudolongum* 数を qPCR 法により絶対定量。
BIF－：PBS（ - ）投与群、BIF＋：*B. pseudolongum* 投与群。
ウェルチの t 検定、アスタリスク（*）は 5%有意水準で BIF-と差あり。

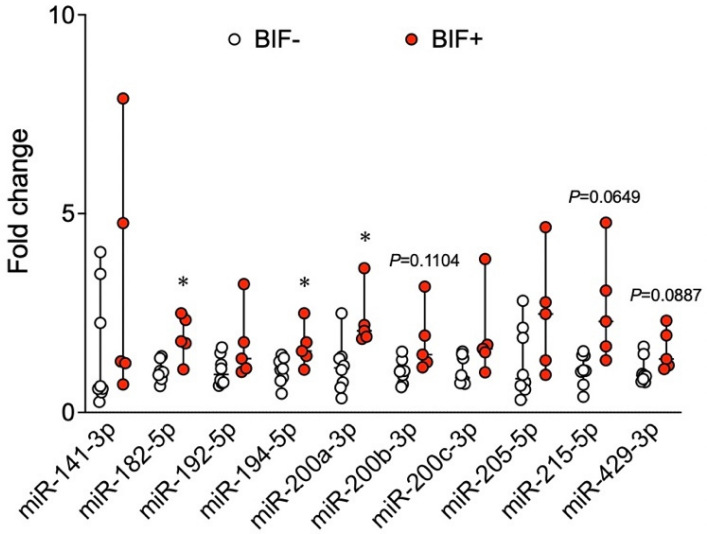


図 2. *B. pseudolongum* の投与が大腸粘膜固有層白血球の miRNA 発現におよぼす影響
マウスに *B. pseudolongum*（10^9 CFU/日）を 7 日間投与した際の大腸 LPL における miRNA の発現レベルを qPCR 法により比較した。
BIF－：PBS（－）投与群、BIF＋：*B. pseudolongum* 投与群。
ウェルチの t 検定、アスタリスク（*）は 5%有意水準で BIF-と差あり。

3. TSLP および TGF-β を添加した培養マウス T リンパ細胞株 EL-4 細胞における miR-200 ファミリーの発現解析

2 において、大腸 LPL における miR-200 ファミリーの発現増加に *B. pseudolongum* が直接関与していない可能性が示唆されたことから、腸上皮細胞から産生されるサイトカインが大腸 LPL における miR-200 ファミリーの発現増加に関与している可能性を想定した。マウス T リンパ細胞株のモデルである EL-4 細胞に対して、腸上皮細胞から産生されるサイトカインの一つである TSLP および TGF-β を添加したところ、miR-200 ファミリーの発現増加は認められなかった。これらのことは、大腸 LPL における miR-200 ファミリーの発現増加にはビフィズス菌の菌体成分および腸上皮細胞由来の TSLP および TGF-β は関与しないことを示している。そこで、ビフィズス菌の代謝産物あるいは粘膜固有層に存在する樹状細胞が産生するサイトカインが関与する可能性が考えられたが、我々は過去に、培養した大腸 LPL への短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸の混合液）添加が miR-200 ファミリーの発現を増加させないことを確認している［1］。今後は、大腸 LPL への樹状細胞由来のサイトカイン（IL-6、IL-1β、IL-10 など）の添加を検討する予定である。ただし、3 で用いた EL-4 細胞は、大腸 LPL 由来の T 細胞とは異なるフェノタイプを有すると考えられるため、腸上皮細胞由来サイトカインの添加についても再度実施する必要があると考えている。

1～3 の実験により、*B. pseudolongum* が大腸 LPL における miR-200 ファミリーの発現を変化させることが明らかになったが、miR-200 ファミリーの発現を変化させる因子の同定には至らなかった。*B. pseudolongum* の投与期間の違いにより miRNA の発現レベルは異なったことから、ビフィズス菌の定着には大腸 LPL における miR-200 ファミリーの一時的な発現増加が寄与する可能性が示唆された。今後は、大腸 LPL から分離した CD4 陽性 T 細胞に対して、腸内細菌の代謝産物や菌体成分、あるいは腸上皮細胞や樹状細胞由来のサイトカインを添加することにより、miR-200 ファミリーの発現を変化させる因子を探索するとともに、*B. pseudolongum* が miRNA による遺伝子サイレンシングを介してプロバイオティクスの定着を促進するかどうかを検討する予定である。

共同研究者・謝辞

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） Ohsaka F, Karatsu Y, Kadota Y, Tochio T, Takemura N, Sonoyama K. Gut commensals suppress interleukin-2 production through microRNA-200/BCL11B and microRNA-200/ETS-1 axes in lamina propria leukocytes of murine large intestine. Biochem Biophys Res Commun. 2021 Jan 1;534:808-814. Epub 2020 Nov 6. PMID: 33162030 DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.10.103.

2） Ohsaka F, Honma D, Kadota Y, Tochio T, and Sonoyama K. Consumption of 1-kestose upregulates microRNA-200 and -192/215 families in lamina propria leukocytes of the murine large intestine. J Nutr Sci Vitaminol. 2023;69(2):150-154 PMID: 37121725 DOI: 10.3177/jnsv.69.150

3） Taibi A, Singh N, Chen J, Arioli S, Guglielmetti S, Comelli EM. Time- and strain-specific downregulation of intestinal EPAS1 via miR-148a by Bifidobacterium bifidum. Mol Nutr Food Res. 2017 May; 61(5). Epub 2017 Feb 3. PMID: 27883285. DOI: 10.1002/mnfr.201600596