

乳酸菌オリゴ DNA の経口摂取による抗肥満作用の解明

信州大学 農学部
下里 剛士

1. 研究の目的と背景

肥満者は世界的に増えており、社会的な問題となっている¹。肥満は環境要因や遺伝的要因の複雑な相互作用により誘導されることが知られ、糖尿病や生活習慣病の原因となり得る。近年、肥満と免疫系の関連が明らかとなっており、脂肪組織の炎症は全身のインスリン抵抗性を惹起することが報告されている^{2,3}。最近の報告で、微生物由来の DNA を認識する Toll like receptor (TLR) 9 を欠損させたマウスは、高脂肪飼料給餌による肥満が悪化することが示された⁴。この報告を受け、我々は TLR9 と肥満の関係に着目し、TLR9 を刺激することにより肥満を抑制できるのではないかと考えた。本研究で TLR9 アゴニストとして着目したのが乳酸菌オリゴ DNA (ODN) である。ODN は、微生物のゲノム配列に由来する短い DNA 断片である。配列中に CpG モチーフを含む ODN は CpG オリゴ DNA (CpG-ODN) と呼ばれ、多彩な免疫調節作用が報告されている⁵。我々は、乳業用乳酸菌のゲノム配列より、強力な免疫調節作用を有する CpG-ODN を見出しており、MsST と命名した⁶。また、ODN は経口投与されると胃酸により分解されてしまうが、我々はカルシウム性ナノカプセルに ODN を包摂することで胃酸耐性を付加する“DNanocap”を開発しており、ODN の経口摂取を可能としている⁷。そこで本研究では、MsST をカプセル化した MsSTcap の経口摂取による肥満抑制効果について検証した。

2. 研究の方法

実験群として、10 kcal% Fat (control 食) を給餌する NT 群、60 kcal% Fat (高脂肪食) を給餌し、ODN を含まないカプセル (cap) を経口投与する cap 群および高脂肪食を給餌し、MsSTcap を経口投与する MsSTcap 群の 3 群を設定した。C57BL/6J 雄マウスを 4 週齢で購入し、標準飼料および滅菌 RO 水を自由摂取させ飼育した。1 週間の予備飼育後、週 5 回の DNanocap の経口投与を開始した。経口投与は、1 回当たり 1 mg/匹を 200 μ L のリン酸緩衝生理食塩水に懸濁させ、経口ゾンデおよび 1 mL シリンジを用いて行った。6 週齢時に、飼料を control 食または高脂肪食に置換し、経口投与および飼育を続けた。15 週齢時にマウスを糖負荷試験に供した。具体的には、マウスを 16 時間絶食させ、尾静脈からの採血により血糖値を測定後、2 g/kg のグルコース溶液を経口

投与し、経時的な血糖値の変化を測定した。血糖値の測定には ACCU-CHEK Aviva nano を用いた。糖負荷試験後、経口投与を再開し、16 週齢時に解剖を行った。精巣上体脂肪および肝臓を摘出し、組織重量を測定した。組織から RNeasy Lipid Tissue Mini Kit により Total RNA を抽出した。得られた Total RNA から逆転写反応により cDNA を合成し、組織の遺伝子発現を Real-time 定量 PCR にて解析した。また、週に 1 回、マウスの体重測定を行った。

3. 研究の実施経過

毎週の体重測定の結果、NT 群と比較し cap 群および MsSTcap 群では有意に体重が増加した。一方、cap 群と比較し、MsSTcap 群において有意に体重が低くなった (Fig. 1)。また、精巣上体脂肪組織の重量は NT 群と比較し、cap 群および MsSTcap 群において有意な増加が見られた (Fig. 2)。肝臓重量は群間で有意な差は見られなかった (Fig. 3)。糖負荷試験の結果、NT 群では血糖値はグルコースの経口投与後、15 分でピークを迎え、その後血糖値は減少していった。一方、cap 群では経口投与後、血糖値は 30 分でピークを迎え、その後緩やかな減少傾向を示した。この傾向は MsSTcap 群でも同様に見られ、どのタイムポイントにおいても cap 群および MsSTcap 群間で統計学的有意差は見られなかった (Fig. 4)。

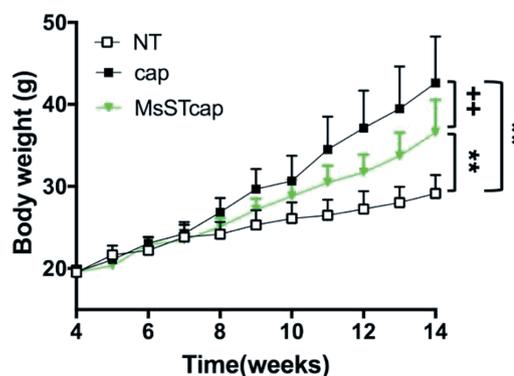


Fig. 1 マウスの体重変化

週 1 回、マウスの体重を測定した。
** $P < 0.01$ vs NT, †† $P < 0.01$ vs cap

遺伝子発現解析の結果、脂肪組織において、*Leptin* の発現が cap 群と比較して MsSTcap 群において有意に増加した (Fig. 5). *Tnfa* の発現は、NT 群と比較し、cap 群において有意に増加した。一方、*Tnfa* 発現量は cap 群と比較し、MsSTcap 群において有意に減少した (Fig. 6).

肝臓に関して、*Pparg* 発現量を解析した。その結果、NT 群と比較し、cap 群において有意な発現増加が確認された。一方、cap 群と MsSTcap 群間での有意な差は確認されなかった (Fig. 7).

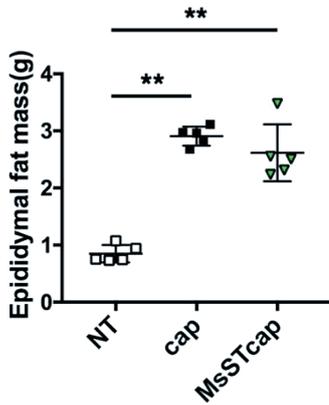


Fig. 2 精巣上体脂肪組織の重量
** $P < 0.01$ vs NT

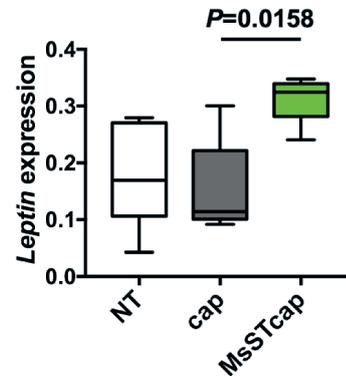


Fig. 5 脂肪組織における *Leptin* 発現量の比較

マウスの精巣上体脂肪より Total RNA を抽出し、定量的 PCR 法により *Leptin* 発現量を測定した。

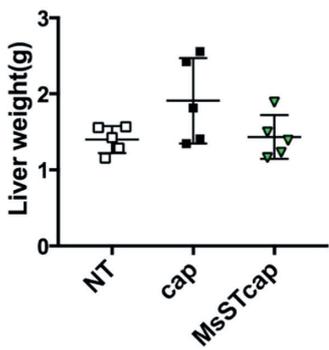


Fig. 3 肝臓重量の比較

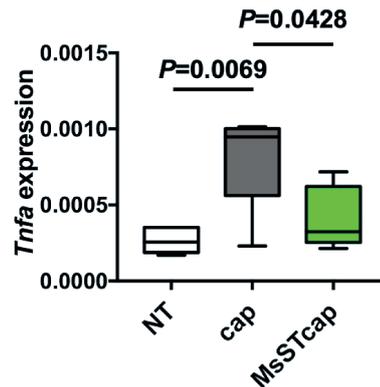


Fig. 6 脂肪組織における *Tnfa* 発現量の比較

マウスの精巣上体脂肪より Total RNA を抽出し、定量的 PCR 法により *Tnfa* 発現量を測定した。

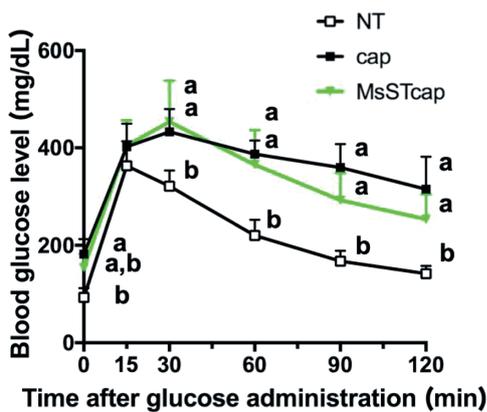


Fig. 4 糖負荷試験における血糖値の変化

マウスを 16 時間絶食後、グルコースを経口投与し、各タイムポイントで血糖値を測定した。異符号間に有意差あり ($P < 0.05$).

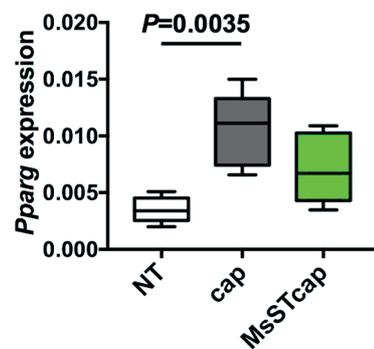


Fig. 7 脂肪組織における *Pparg* 発現量の比較

マウスの精巣上体脂肪より Total RNA を抽出し、定量的 PCR 法により *Pparg* 発現量を測定した。

4. 研究から得た結論・考察

本研究では、TLR9 を介して免疫調節作用を発揮する乳酸菌由来 CpG-ODN である MsST を経口摂取させ、肥満の抑制効果を調査した。NT 群と比較し、cap 群において体重が有意に増加したことから、肥満モデルマウスの構築に成功した。また、cap 群と比較し、MsSTcap 群では体重が有意に低下した。このことから、MsSTcap による肥満の抑制効果が示唆された。精巢上体脂肪組織および肝臓重量に関しては、cap 群と MsSTcap 群間で有意な差は見られなかった。糖負荷試験に関して、cap 群と MsSTcap 群間に有意な差は得られなかったが、後半の血糖値の減少に関して、若干の耐糖能改善傾向が見られる。

組織の遺伝子発現解析に関して、脂肪組織における *Leptin* 発現が cap 群と比較し MsSTcap 群で有意に増加した。レプチンは摂食抑制やエネルギー消費の増加に関与していることが報告されており、*Leptin* 発現の増加は肥満に対し抑制的に働くことが示唆される⁸。また、*Tnfa* 発現に関しては、NT 群と比較し cap 群で有意に増加した。さらに、cap 群と比較し MsSTcap 群で有意に減少した。肥満状態の脂肪組織では慢性的な炎症症状を呈しており、炎症性サイトカインの過剰産生やアディポカインの産生低下の結果、全身のインスリン抵抗性を惹起することが知られている^{2,3}。Tumor necrosis factor (TNF)- α は代表的な炎症性サイトカインの 1 つである。TNF ファミリーサイトカインは TNF 受容体に認識され、Nuclear factor-kappa(NF- κ)B 経路を活性化し、炎症応答を誘導することが知られている⁹。また、炎症シグナルである NF- κ B 経路を阻害することにより、高脂肪飼料給餌による肥満が改善することが報告されている¹⁰。したがって、高脂肪飼料の給餌により誘導された脂肪組織の炎症が MsSTcap 群では抑制され、肥満を抑制した可能性が考えられる。肝臓の遺伝子発現に関して、Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ の発現解析を行った。PPAR- γ は脂肪細胞の分化に関わり、肝臓での過剰発現は脂肪肝の脂肪形成に繋がることが報告されている¹¹。NT 群と比較し、cap 群での発現増加が確認され、高脂肪食給餌による脂肪肝の形成が示唆される。しかし、cap 群と比較し MsSTcap 群では遺伝子発現に有意な差は見られなかった。

5. 残された問題、今後の課題

本研究では、乳酸菌オリゴ DNA を肥満モデルマウスに経口投与することで、マウスの体重が有意に低下することが見出された。そして、脂肪組織におけるいくつかの遺伝子発現の変動が確認された。しかし、体重が低下する具体的な作用機序は未だ明らかとなっていない。MsSTcap による抗肥満効果の作用機序の一端として、本研究で測定した脂肪組織の遺伝子発現の変動の関与が考えられる。そのため、今後は DNA マイクロアレイを用いた脂肪組織の

網羅的な遺伝子発現の解析や、変動した遺伝子に関するタンパク質レベルでの検証が求められる。本研究では、精巢上体脂肪組織を摘出し、重量測定および遺伝子発現解析を行った。脂肪組織は他にも、腸間膜脂肪や皮下脂肪など様々な部位に存在している。したがって、他の脂肪組織についても同様の解析を行うことが必要である。また、動物実験で得られた結果に関して、脂肪細胞や腸管上皮細胞などを用いた *in vitro* 試験を行い、MsST の具体的な作用を詳細に解析する必要がある。

DNanocap の投与方法に関して、本研究では経口ゾンデを用いた強制経口投与を行っている。DNanocap の経口摂取が可能という利点から、ODN を機能性食品・飼料開発の新たなターゲットとして実証研究を進めていくには、強制的な投与ではなく自由摂取による試験が求められる。実際に我々の研究グループでも DNanocap をマウス用飼料に混ぜ込むことで自由摂取させる実験系の構築に取り組んでいる。したがって、高脂肪飼料に MsSTcap を混ぜ込んだ特別飼料を調製し、自由摂取試験を行うことも今後取り組むべき課題である。自由摂取は経口投与と異なり、投与量・タイミングのコントロールが困難なことから、飼料への MsSTcap の混合量を詳細に検討する必要がある。そのため、まずは経口投与における最適な MsSTcap の投与量を検討することが必要である。今後の課題として、MsST による肥満抑制メカニズムの詳細な解明と、MsSTcap の自由摂取試験を行うことが望まれる。

6. 参考文献

- 1 G. B. D. O. Collaborators *et al.*, Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years., *N. Eng. J. Med.*, **377**, 13-27 (2017)
- 2 Suganami, T. & Ogawa, Y., Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling., *J. Leukoc. Biol.*, **88**, 33-39 (2010)
- 3 Sun, K., Kusminski, C. M. & Scherer, P. E., Adipose tissue remodeling and obesity., *J. Clin. Invest.*, **121**, 2094-2101 (2011)
- 4 Hong, C. P. *et al.*, TLR9 regulates adipose tissue inflammation and obesity-related metabolic disorders., *Obesity.*, **23**, 2199-2206 (2015)
- 5 Hanagata, N., CpG oligodeoxynucleotide nanomedicines for the prophylaxis or treatment of cancers, infectious diseases, and allergies., *Int. J. Nanomedicine.*, **12**, 515-531 (2017)
- 6 Shimosato, T. *et al.*, Identification of a potent immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Streptococcus thermophilus lacZ.*, *Anim. Sci. J.*, **80**, 597-604 (2009)
- 7 Wang, Y. *et al.*, Inhibitory/suppressive oligodeoxynucleotide nanocapsules as simple oral delivery devices for preventing atopic dermatitis

- in mice., *Mol Ther.*, **23**, 297-309 (2015)
- 8 Boguszewski, C. L., Paz-Filho, G. & Velloso, L. A., Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain., *Endokrynol Pol.*, **61**, 194-206 (2010)
- 9 Hayden, M. S. & Ghosh, S., Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines., *Semin Immunol.*, **26**, 253-266 (2014)
- 10 Helsley, R. N. *et al.*, Targeting I κ B kinase β in Adipocyte Lineage Cells for Treatment of Obesity and Metabolic Dysfunctions., *Stem cells.*, **34**, 1883-1895 (2016)
- 11 Yu, S. *et al.*, Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPAR- γ 1) overexpression., *J. Biol. Chem.*, **278**, 498-505 (2003)

Oral delivery of oligodeoxynucleotide from lactic acid bacteria ameliorates obesity

Takeshi Shimosato

We have identified immunomodulatory DNA sequences from immunoregulatory probiotics and confirmed that several synthetic oligodeoxynucleotides (ODN) derived from these sequences retain these immunomodulatory properties. Bacterial DNA contains CpG motifs that stimulate Toll-like receptor 9 (TLR9) -expressing cells, facilitating a protective innate immune response. Previously, we reported the use of acid-resistant ODN nanoparticles consisting of ODNs packaged in calcium-based nanocapsules (“DNanocaps”) ; the resulting carbonate apatite particles were introduced into cells using a cell transfection method. In recent years, it has been reported that knock-out of the *TLR9* leads to the enhanced development of obesity in a mouse model of diet-induced obesity. In the present work, we examined the effect in a mouse obesity model of oral administration of DNanocaps (MsSTcaps) containing CpG-ODN (MsST) derived from a lactic acid bacteria. We found that the weight of the MsSTcap group was decreased significantly compared to that of the control group. In addition, we found that expression of the leptin-encoding gene increased in the epididymal adipose tissue in the MsSTcap group (compared to the control group). Together, these results suggest that orally administered MsSTcaps have potential as a therapeutic agent for the treatment of obesity.

Key words: CpG-ODN, DNanocap, oral delivery, leptin, obesity