

プロバイオテック乳酸菌の健康機能が 生体内で伝達されるメカニズムの解明

岡山大学 環境生命科学研究科
鶴田 剛司

1. 研究の目的と背景

プロバイオテック乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* Lp14 株には脂肪細胞への脂肪蓄積の抑制効果やインスリン抵抗性の改善効果といったメタボリックシンドロームの予防効果が報告されている¹⁾。経口摂取することで腸管に作用する Lp14 株が脂肪組織や骨格筋といった腸管から遠く離れた組織にどのように作用し、メタボリックシンドローム予防に寄与しているかは不明であった。我々は、Lp14 株の健康機能を伝達する分子として 抗原貪食細胞が分泌する膜小胞 (Exosome) に着目した。過去の報告から細菌を貪食した細胞が分泌した Exosome 中には菌体成分が含まれており、免疫細胞を活性化することが知られている。しかし、プロバイオテック乳酸菌が同様のメカニズムでその健康機能を全身に伝達しているかは検討されたことがない。本研究の目的は、プロバイオテック乳酸菌 Lp14 株による脂肪細胞の脂肪蓄積抑制効果を Exosome が媒介していることを検証することである。

2. 研究の方法

(マクロファージの培養)

腸管貪食細胞としてプロバイオテック乳酸菌を積極的に貪食することが知られているマクロファージに着目した。マウス骨髄細胞由来のマクロファージ (BMDM) およびヒト単球細胞株 THP-1 より分化誘導したヒトマクロファージ様細胞をマクロファージとして供試した。7 週齢の C57BL/6J マウスの大腿骨から骨髄細胞を採取し、GM-CSF を添加した DMEM 培地で培養することによりマウスマクロファージへの分化を誘導した。ヒトマクロファージ様細胞は THP-1 細胞を Phorbol myristate acetate (PMA) で 24 時間刺激し、分化誘導した。

(Lp14 株とマクロファージの共培養)

Lp14 株は MRS 培地にて 24 時間培養し、吸光度 (OD600) と Colony forming unit (CFU) からあらかじめ作成した検量線より培養液中の細菌数を算出した。上記の方法で分化誘導したマウス BMDM およびヒトマクロファージ様細胞を 15 cm ディッシュに 80% コンフルエントになるまで培養し、Lp14 株を添加した 5×10^7 CFU/ディッシュ。この際、細胞の培養は Exosome を除去した Fetal calf serum (FCS) を添加した培地を使用した。

Lp14 株を添加後、72 時間培養し、培養上清を回収した。Lp14 株非添加のマクロファージも同様に培養し、培養上清を回収した。

(培養上清からの Exosome の回収)

Lp14 株非添加のマクロファージおよび Lp14 株を貪食したマクロファージが産生した Exosome (それぞれ Control Exosome および Lp14 Exosome) を超遠心分離法により回収した。培養上清を段階的に遠心分離 (200 g, 10 分 × 1 回, 500 g, 10 分 × 2 回, 2000 g, 15 分 × 1 回) した後に、上清を回収し、フィルター濾過 (0.2 μ m) した。濾過後、上清を超遠心分離した (100,000 g, 2 時間)。超遠心分離後、上清を除去し、5 mL の PBS で洗浄した。洗浄後、超遠心分離を行い (100,000 g, 2 時間)、上清を除去した。PBS で再懸濁後、フィルター濾過 (0.2 μ m) を行った。回収した Exosome 量を BCA 法により定量した。

(脂肪細胞株への Exosome 添加)

脂肪細胞株として 3T3L1 細胞 (マウス) および SGBS 細胞 (ヒト) を供試した。各細胞株を培養し、Control Exosome および Lp14 Exosome (1 または 10 μ g/mL) を添加した分化誘導培地を用いて成熟脂肪細胞への分化を誘導した。分化誘導後、10 日目に脂肪蓄積量を評価した。また、脂肪蓄積に関係する遺伝子の発現量に及ぼす影響を検証するために Exosome (10 μ g/mL) を添加した分化誘導培地を添加後 6 時間目に細胞を回収し、細胞から全 RNA を抽出・精製した。

(脂肪細胞株への Exosome の取り込み量の評価)

3T3L1 細胞への Exosome の取り込み量を評価するために、マウス BMDM より回収した Control Exosome および Lp14 Exosome をそれぞれ蛍光色素 PKH67 で染色し、3T3L1 細胞に添加した。添加後 2 時間で、細胞をメタノール固定し、細胞に取り込まれた PKH67 標識した Exosome の取り込み量を蛍光プレートリーダーで定量した。また、PKH67 標識した Exosome の取り込みを、顕微鏡下で観察し、撮影した。

(脂肪細胞株の脂肪蓄積量の定量)

各脂肪細胞株の分化誘導後 10 日目に培地を除去し、PBS で 2 回洗浄後、Adipored Reagent を 5 μ L 添加した。Adipored Reagent を添加した 10 分後に蛍光プレートリー

ダーを用いて脂質に結合した Adipored の蛍光量を測定した (励起波長: 485 nm, 蛍光波長: 572 nm).

(Exosome が脂肪細胞株の遺伝子発現に及ぼす影響)

回収した細胞の全 RNA から逆転写反応により cDNA を合成した. 合成した cDNA を鋳型として脂肪蓄積に関係する遺伝子の発現量を Real time PCR 法により定量した. 定量する遺伝子の選抜は Pathway 解析ツールである Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて行った. 定量した遺伝子およびプライマー配列を表 1 に示した.

(Lp14 Exosome の添加によって発現が抑制された遺伝子に作用する miRNA の選抜)

Exosome 中には mRNA, タンパク質および miRNA が含まれており, これらの分子のうち Exosome が細胞に作用する際に主要な働きをしている分子は miRNA と考えられている. miRNA は相補的な配列をもつ mRNA の 3' UTR 領域に結合することでその遺伝子の発現を抑制する. Lp14 Exosome によって発現が抑制された遺伝子を標的とする

miRNA を, IPA および TargetScan を用いて選抜した. 選抜方法は, 過去の miRNA に関する研究結果を蓄積した IPA データベースへの照合または当該 mRNA に相補的な配列をもつ miRNA を検索することによって選抜した.

3. 研究の実施経過

(脂肪細胞株の脂肪蓄積量)

3T3L1 細胞の脂肪蓄積量は Lp14 Exosome を添加した細胞において Control Exosome を添加した細胞よりも有意に減少していた (図 1, $P < 0.05$). また, Exosome 添加量依存的に細胞への脂肪蓄積は抑制された (図 1, $P < 0.05$). 3T3L1 細胞での結果と同様に, SGBS 細胞の脂肪蓄積量も Lp14 Exosome の添加によって有意に減少した (図 2, $P < 0.05$).

(3T3L1 細胞への Exosome 取り込みの定量および観察)

3T3L1 細胞への Exosome 取り込み量は Control Exosome と Lp14 Exosome との間に有意な差は見られなかったが,

表 1 Primer sequence

Gene name	Primer sequence (5'-3')
PPARg-F	ATGTCTCACAAATGCCATCAGGTT
PPARg-R	GCTCGCAGATCAGCAGACTCT
CEBPa-F	TGCGCAAGAGCCGAGATAA
CEBPa-R	CGGTCATTGTCCTGGTCAACT
CEBPb-F	CAAGCTGAGCGACGAGTACA
CEBPb-R	AGCTGCTCCACCTTCTTCTG
CEBPd-F	ATCGACTTCAGCGCTACAT
CEBPd-R	GCTTTGTGGTTGCTGTTGAA
KLF5-F	AGTTCGACAAACCAGACGGCAGTA
KLF5-R	TTGGGTTGTGAATCGCCAGTTTGG
NOC-F	ACCAGCCAGACATACTGTGC
NOC-R	CTTGGGGA AAAACGTGCCT
SEN2-F	CAATGCCCGCCTGGTCTTCTA
SEN2-R	GCACTCCAGCATTAGAGAAGCTAGC
ACC1-F	AAGTCCTTGGTCGGGAAGTATACA
ACC1-R	ACTCCCTCAAAGTCACAAACA
ACS-F	TGACCTCTCCATGCAGTCAG
ACS-R	GAGCCTATGCACTCAGCCAGT
FAS-F	TGGGTTCTAGCCAGCAGAGT
FAS-R	TACCACCAGAGACCGTTATGC
LPL-F	GCCAGCAACATTATCCAGT
LPL-R	GGTCAGACTTCCTGCTACGC
FABP4-F	CATCAGCGTAAATGGGGATT
FABP4-R	GTCGTCTGCGGTGATTTTCAT
AGPAT2-F	TCACCTCAGGAACAATCAAGG
AGPAT2-R	TCTGTGAGACCAATTGGTAGGG
PLIN1-F	AAGTTGAAGCTTGAGGAGCGAGG
PLIN1-R	GCTCGGATGGGAACGCTGA
HSL-F	AGACACCAGCCAACGGATAC
HSL-R	CATCACCTCGAAGAAGAGCA
GLUT4-F	TCATTGTCGGCATGGGTTT
GLUT4-R	CGCAAATAGAAGGAAGACGTA

Lp14 Exosome で高い傾向を示した (図 3, $P=0.10$). また, 蛍光顕微鏡で撮影した Control Exosome および Lp14 Exosome の 3T3L1 細胞への取り込みを 図 4 に示した.

(遺伝子発現解析)

遺伝子発現解析の結果を 図 5 に示した. Control Exosome を添加した細胞と比較して Lp14 Exosome を添加した細胞で発現が減少した遺伝子は C/EBP β , KLF5, AGPAT2, NOC, PLIN1, SENP2 であった ($P<0.05$). そ

の他の遺伝子では Control Exosome と Lp14 Exosome との間に有意な差は見られなかった.

(Lp14 Exosome の添加によって発現が抑制された遺伝子に作用する miRNA の選抜)

IPA 解析および TargetScan 解析の結果, C/EBP β および KLF5 を標的とする可能性のある miRNA として 表 2 に示す miRNA を選抜した.

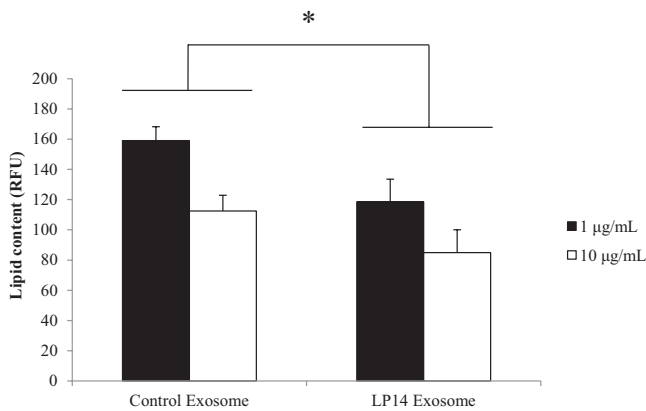


図 1 Control Exosome および Lp14 Exosome を添加した 3T3L1 細胞の脂肪蓄積量. ■ 1µg/mL, □ 10µg/mL の Exosome を添加.
* $P<0.05$. Two way ANOVA (Dose, Control Exosome vs Lp14 Exosome)

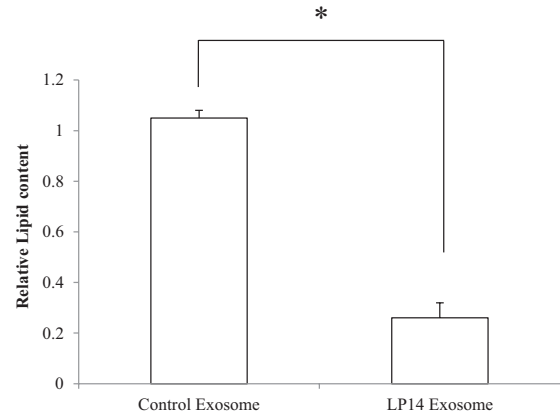


図 2 Control Exosome および Lp14 Exosome を添加した SGBS 細胞の脂肪蓄積量. 各 Exosome を 10 µg/mL 添加.
* $P<0.05$ (Student t-test).

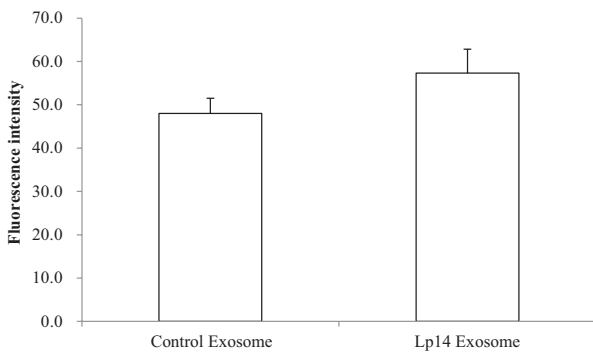


図 3 Control Exosome および Lp14 Exosome の 3T3L1 細胞への取り込み量. Student t-test により統計解析を行った.

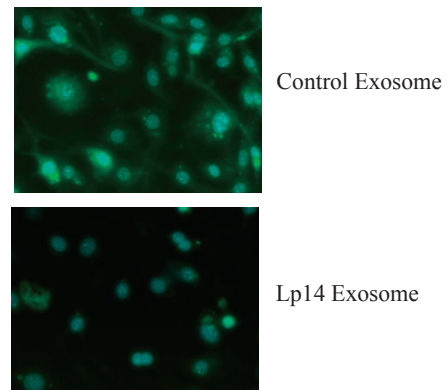


図 4 Control Exosome および Lp14 Exosome の 3T3L1 細胞への取り込み.
緑: PKH67 (Exosome) 青: DAPI (核染色).

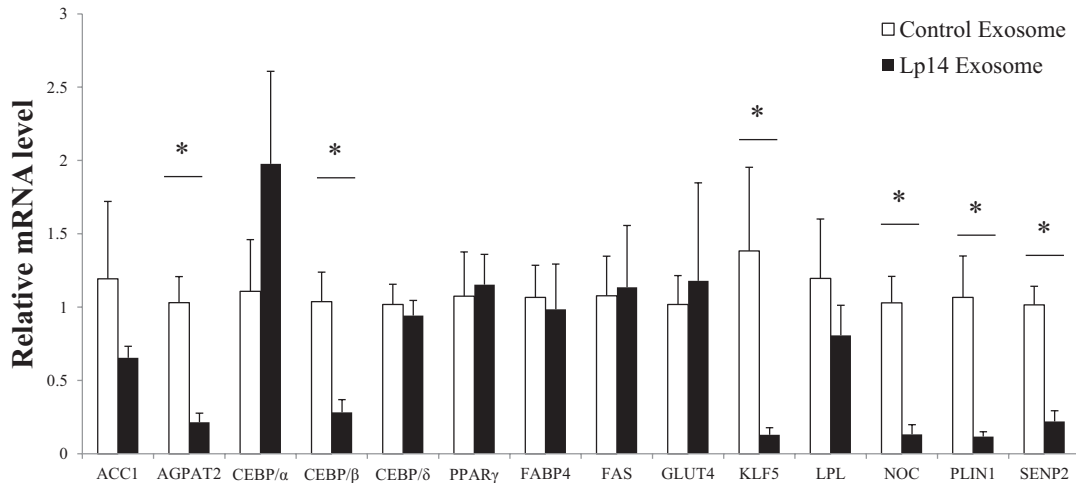


図5 Control Exosome および Lp14 Exosome を添加した 3T3L1 細胞の遺伝子発現解析。
*P<0.05 (Student t-test).

表2 IPA 解析および TargetScan により予測した KLF5 および C/EBPβ を標的とする miRNA

Gene	TargetScan Predicted miRNA (Conserved)	IPA Predicted miRNA (Experimentally observed)
KLF5	miR-9-5p	miR-145-5p
C/EBPβ	miR-191-5p	miR-150-5p miR-155-5p

4. 研究から得た結論・考察

Lp14 株を貪食したマクロファージが産生する Exosome をマウスおよびヒトの脂肪細胞株に添加し、その脂肪蓄積への影響を評価したところ Lp14 株を貪食していないマクロファージが産生した Exosome と比較して有意に脂肪蓄積が抑制された。この結果から、我々の研究結果からこれまで明らかとなっていた Lp14 株による食事誘導性肥満マウスの脂肪蓄積抑制効果の一端を Exosome が担っていることが示唆された。また、Lp14 Exosome が脂肪蓄積に関係する遺伝子発現に及ぼす影響を検証した結果、C/EBPβ, KLF5, AGPAT2, NOC, PLIN1, SENP2 の遺伝子発現は Lp14 Exosome を添加することによって抑制された。C/EBPβ は C/EBPα, C/EBPδ や PPARγ とともに脂肪細胞分化に関係する転写因子である。C/EBPβ および C/EBPδ は脂肪細胞分化の初期に発現量が増加し、協調的に働くことで脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPARγ の発現を誘導する。これにより AGPAT2 (1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase), PLIN1 (Perilipin 1), FABP4 (Fatty acid binding protein 4), GLUT4 (Glucose transporter 4) といった脂肪細胞に特異的な遺伝子群の発現を誘導することにより脂肪細胞の分化が誘導される。AGPAT2 は脂肪蓄積に重要な働きをしており²⁾、Perilipin 1 は脂肪滴に発現し、リパーゼの結合を阻害することで脂肪分解を阻害している³⁾。本実験では Lp14 Exosome により C/EBPβ, AGPAT2 および

Perilipin 1 の遺伝子発現が抑制されており、これによって脂肪蓄積の抑制や脂肪分解の促進が誘導された結果、3T3L1 細胞の脂肪蓄積量が減少した可能性が考えられる。

KLF5 は骨格筋細胞において脂肪酸燃焼および脱共役に関わる遺伝子群の発現を制御する転写因子であり、KLF5 のヘテロ欠損マウスでは高脂肪食負荷に対して耐性を示すことが知られている⁴⁾。本実験は脂肪細胞を用いた実験であり、Lp14 Exosome による KLF5 の発現抑制が脂肪細胞の脂肪酸燃焼および脱共役に寄与しているかは不明であるが、Lp14 Exosome による脂肪蓄積抑制に KLF5 の発現抑制が関わっている可能性は十分に考えられる。

SENP2 は SUMO (Small Ubiquitin-related modifier) 化した C/EBPβ から SUMO タンパク質を切り離す役割を果たすペプチダーゼであり、SENP2 の発現は C/EBPβ の安定化に影響を与えることが知られている⁵⁾。これを考慮すると、Lp14 Exosome による SENP2 の発現減少はユビキチンプロテアソームによる C/EBPβ の分解を誘導することが考えられ、これによって成熟脂肪細胞への分化が阻害されることで脂肪蓄積が抑制された可能性が考えられる。

脂肪細胞のマスターレギュレーターとして知られる C/EBPα および PPARγ の発現が Lp14 Exosome によって抑制されなかったにも関わらず、3T3L1 細胞の脂肪蓄積は抑制された。過去の報告から C/EBPβ および C/EBPδ 欠損マウスは脂肪細胞数の減少がみられるものの、分化した脂肪細胞の C/EBPα および PPARγ の発現は正常であることが報告されている*)。つまり、C/EBPα および

PPAR γ の発現に関係なく, C/EBP β の発現が抑制されることで脂肪細胞の分化が抑制されることが示唆されている. 本実験でも Lp14 Exosome による C/EBP α の発現抑制が C/EBP α および PPAR γ 非依存的な脂肪蓄積の抑制を誘導していると考えられる.

Lp14 Exosome による脂肪蓄積に関係する遺伝子群の発現抑制を誘導している因子として Exosome 中の miRNA に着目した. mRNA に作用する miRNA を, mRNA と miRNA の配列の相補性あるいは過去の報告から予測した. その結果, KLF5 に作用する可能性が高い成熟 miRNA として miR-9-5p および miR-145-5p を, C/EBP β に作用する可能性が高い成熟 miRNA として miR-191-5p, miR-150-5p および miR-155-5p をそれぞれ選抜した. 今後の研究においてこれらの miRNA の発現解析を Control Exosome および Lp14 Exosome から抽出した miRNA を用いて行っていく.

5. 残された問題, 今後の課題

本研究からプロバイオティック乳酸菌が腸管から離れた組織において健康機能を発揮する機序としてマクロファージがプロバイオティック乳酸菌を貪食した際に産生する Exosome が媒介している可能性を示すことができた. 今後は脂肪蓄積抑制作用に寄与している Exosome 内の活性分子として miRNA に着目し, その発現解析を実施する. また, 本実験でみられた現象が Lp14 以外のプロバイオティック乳酸菌株でも共通して起こる現象であるかを検証し, 腸管以外の組織で効果的に作用しうるプロバイオティック乳酸菌株のスクリーニング法の標的としてプロバイオティック乳酸菌を貪食したマクロファージが産生した Exosome が有効であるかを検証する.

参考文献

- 1) Takemura, N., Okubo, T. and Sonoyama, K. (2010). *Exp. Biol. Med.*, 235, 849-856.
- 2) Balaban, S. *et al.* (2015). *Biomed. Res. Int.*, 2015: 274585.
- 3) Tansey, J. T., Sztalryd, C. *et al.* (2004). *IUBMB Life*, 56, 379-385.
- 4) Oishi, Y., Manabe, I. *et al.* (2008). *Nat. Med.*, 14, 656-666.
- 5) Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T. *et al.* (1997). *EMBO J.*, 16, 7432-7443.