

腸内細菌の情報を生体内で伝達する細胞間コミュニケーション

園山 慶

北海道大学大学院農学研究院 准教授

緒言

腸内細菌叢は宿主の生理に影響をおよぼすとともに、さまざまな疾患の発症・進展に関与する。筆者らはこれまでに、腸内細菌叢の改変によってアレルギーや肥満などの疾患が予防できる可能性を動物実験によって示してきた。例えば、難消化性オリゴ糖を摂取したマウスでは、腸内細菌叢の構成が変化するとともに、アトピー性皮膚炎（I型アレルギー）や接触皮膚炎（IV型アレルギー）などの症状が抑制されることを観察した¹⁻⁶。また、乳酸菌株 *Lactobacillus plantarum* No. 14 を肥満マウスに投与することにより、脂肪組織の増大が抑制されると同時に脂肪組織の炎症およびインスリン感受性が改善されることを示した^{7,8}。これらの知見は、難消化性オリゴ糖はアレルギーを抑制するプレバイオティクスであり、No. 14 株はメタボリックシンドロームを抑制するプロバイオティクスであることを示唆している。しかしながら、これらの細胞・分子メカニズムはいまだ明らかになっていない。

ところで、エクソソームは、さまざまな細胞が細胞外へ分泌する直径50-100 nmの脂質二重膜で覆われた小胞で、その膜には接着分子やサイトカイン受容体などのタンパクが存在し、また内部にもさまざまなタンパクならびにmRNAおよびmiRNAなどの遺伝物質が含まれている。エクソソームは体液に含まれており、疾患や老化などの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っている。そこで本研究では、プレバイオティクスやプロバイオティクスが宿主の生理におよぼす影響をエクソソームが媒介するという仮説を立て、これを検証するために、1) プレバイオティクスを摂取したマウスの血清エクソソームがマクロファージの活性化に影響をおよぼすか否か、2) プロバイオティクスを摂取したマウスの血清エクソソームがマクロファージの活性化に影響をおよぼすか否か、3) 腸上皮細胞および脂肪細胞がエクソソームを放出するか否か、について検討した。

材料および方法

実験動物

C57BL/6マウス（雌性、5週齢）を精製飼料（AIN-93G）で馴化後、実験1では精製飼料にフラクトオリゴ糖を6%添加した飼料あるいは無添加試料を4週間自由

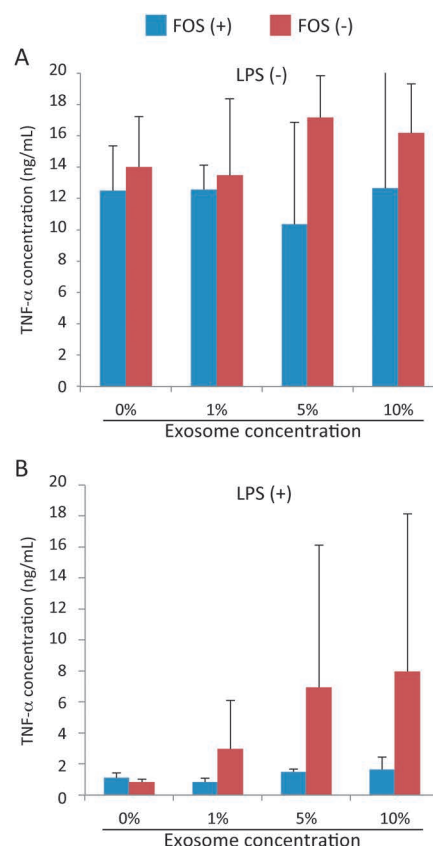


図1 フラクトオリゴ糖摂取マウスの血清エクソソームがマクロファージ活性化におよぼす影響

フラクトオリゴ糖添加飼料（FOS(+)）および無添加飼料（FOS(-)）を4週間摂取したマウスの血清エクソソームをマウスマクロファージ細胞株RAW264.7に添加し、6時間後にLPSを添加してさらに18時間培養した後の培養上清中TNF- α 濃度。AはLPSを添加しなかった場合で、BはLPSを添加した場合。血清を超速心分離した後の沈殿にもとの血清と等容量のリン酸緩衝生理食塩水を添加したものを100%エクソソームとした。

摂取させた。実験2では、精製飼料に *L. plantarum* 基準株、No. 14株、*L. rhamnosus* GG株のいずれかを添加した飼料（いずれも 10^8 cfu/日）あるいは無添加飼料を1週間自由摂取させた。実験3では、SPFあるいは無菌のC57BL/6マウス（雌性、5週齢）を納入後、ただちに後述する方法によりエクソソーム分離に供した。

エクソソームの分離および分析

マウスを一夜絶食後にエーテル麻酔下で頸動脈より全採血して血清を分離し、超遠心分離を用いてエクソソーム画分を得た⁹⁾。また別の実験で、OptiPrepを用いた不連続密度勾配遠心分離法によりさらに分離した¹⁰⁾。分離したエクソソームは透過型電子顕微鏡により観察した。また、ウェスタンブロットリングおよびELISAを用いて、エクソソーム画分中のアディポサイトカインを分析した。

細胞培養

マウス由来マクロファージ細胞株RAW264.7を培養し、16時間の血清飢餓の後、エクソソーム画分を添加して6時間培養し、さらにLPS (0.5 ng/mL) を添加して18時間培養した。この後、培養上清を回収して、ELISAによりサイトカイン濃度を測定した。

小腸クリプトオルガノイドの作成

C57BL/6マウス（雌性、5週齢）をエーテル麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させ、小腸を摘出してSato et al. (2009)¹¹⁾の方法によりクリプトを分離・培養することにより、オルガノイドを誘導した¹¹⁾。培養6日目の培養上清から、血清の場合と同様に超遠心分離法によりエクソソームを分離し、透過型電子顕微鏡により観察した。

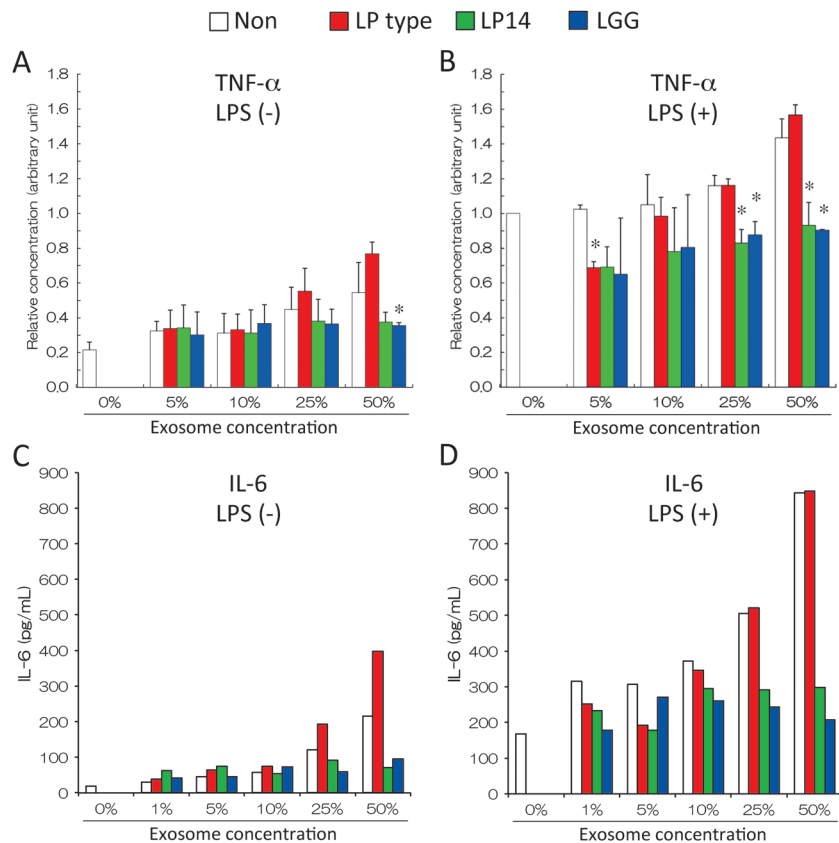


図2 乳酸菌株摂取マウスの血清エクソソームがマクロファージ活性化におよぼす影響

L. plantarum 基準株 (LP type)、No. 14株 (LP14)、*L. rhamnosus* GG株 (LGG) を添加した飼料および無添加飼料 (Non) を1週間摂取したマウスの血清エクソソームをマウスマクロファージ細胞株RAW264.7に添加し、6時間後にLPSを添加してさらに18時間培養した後の培養上清中TNF- α 濃度 (A, B) およびIL-6濃度 (C, D)。AおよびCはLPSを添加しなかった場合で、BおよびDはLPSを添加した場合。TNF- α 濃度は相対値で示し、アスタリスクはNonに比較して $p < 0.05$ で有意差あり。IL-6は代表的な一回の結果を示した。血清を超遠心分離した後の沈殿にもとの血清と等容量のリン酸緩衝生理食塩水を添加したものを100%エクソソームとした。

統計解析

結果は平均値±標準誤差で表し、Student's *t*-testあるいは一元配置分散分析の後の多重比較 (Dunnett's test) により平均値の比較を行った。*p*値が0.05未満の場合に統計的に有意と認めた。

結果および考察

実験1において、フラクトオリゴ糖添加飼料および無添加飼料を摂取させたマウスの血清エクソソームをRAW264.7細胞に添加したところ、LPS無添加条件下ではエクソソームの添加量依存的にTNF- α 濃度が上昇したが、無添加飼料群に比してフラクトオリゴ糖添加飼料群で低い傾向にあり、LPS添加条件でもほぼ同様であった (図1)。また実験2において、乳酸菌株添加飼料を摂取させたマウスの血清エクソソームをRAW264.7細胞に添加した結果、やはりエクソソームの添加量依存的にTNF- α 濃度およびIL-6濃度が上昇し、さらに乳酸菌株無添加飼料群および*L. plantarum*基準株添加飼料群に比してNo. 14株添加飼料群およびGG株添加飼料群において有意な低値を示した (図2)。これらの結果は、過去に筆者らが観察したフラクトオリゴ糖のアレルギー性炎症抑制作用およびNo. 14株の脂肪組織炎症抑制作用の少なくとも一部はエクソソームが媒介することを示唆する。

RAW264.7細胞における炎症性サイトカイン産生がエクソソームの添加量依存的に増加したことに関して、腸内細菌叢が関与するか否かを実験3において調べた。その結果、SPFマウスおよび無菌マウスの血清エクソソームは同様に添加量依存的にRAW264.7細胞のTNF- α 産生を増加させた (図3)。この結果は、血清エクソソームに含まれる宿主由来の因子がマクロファージを活性化することを示唆する。したがって、そのような因子が

レバリオティクスやプロバイオティクスの摂取によって減少するか、あるいはそのような因子のマクロファージ活性化作用を阻害するような別の因子がエクソソームに存在し、それがプレバイオティクスやプロバイオティク

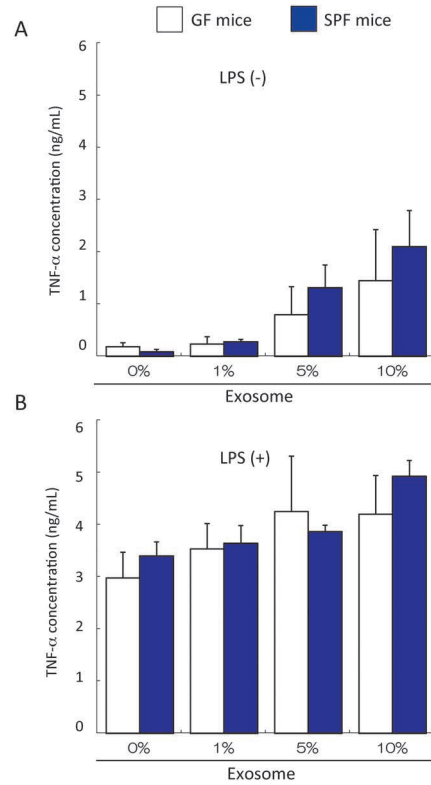


図3 SPFマウスおよび無菌マウスの血清エクソソームがマクロファージ活性化におよぼす影響

SPFマウス (SPF) および無菌マウス (GF) の血清エクソソームをマウスマクロファージ細胞株RAW264.7に添加し、6時間後にLPSを添加してさらに18時間培養した後の培養上清中TNF- α 濃度。AはLPSを添加しなかった場合で、BはLPSを添加した場合。血清を超速心分離した後の沈殿にもとの血清と等容量のリン酸緩衝生理食塩水を添加したものを100%エクソソームとした。

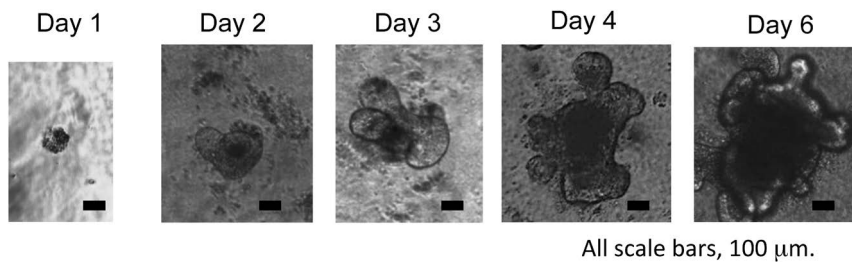


図4 マウスの小腸から誘導したクリプトオルガノイド

マウスの小腸からSato et al. (2009)¹¹⁾の方法にしたがってクリプトを分離・培養し、培養1、2、3、4、および6日目のオルガノイドを位相差顕微鏡下で撮影した。

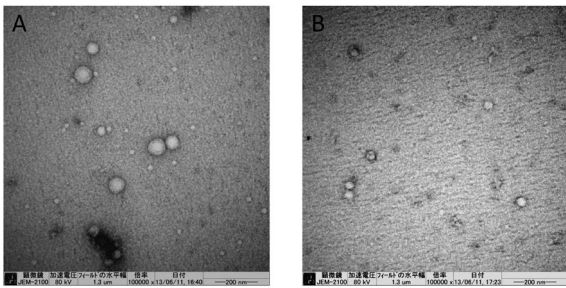


図5 マウスの血清およびクリプトオルガノイド培養上清中のエクソソーム

マウスの血清 (A) およびクリプトオルガノイドの培養上清 (B) から超遠心分離法によりエクソソーム画分を分離し、透過型電子顕微鏡下で撮影した。

表1 C57BL/6マウスの血清およびエクソソーム画分の総タンパクおよびアディポサイトカイン濃度

	血清	エクソソーム画分
総タンパク (mg/mL)	48.1±0.8	0.47±0.06
アディポネクチン (ng/mL)	3745±241	154±28
レプチン (ng/mL)	5.89±0.12	N.D.
レジスチン (ng/mL)	39.73±1.55	0.36±0.05

エクソソーム画分は、超遠心分離後の沈殿をもとの血清と等容量のリン酸緩衝生理食塩水に懸濁した。N.D. 検出されず。

スの摂取によって増加するという可能性が考えられる。

血清中に存在するエクソソームはさまざまな細胞が放出したものである。そこで、腸内細菌叢に直接曝露する腸上皮細胞がエクソソームを放出するか否かを確認するために、小腸クリプトオルガノイドを用いて調べた(図4)。小腸クリプトオルガノイドは、小腸粘膜から分離したクリプトを培養することによって誘導される腸上皮組織構造体であり、幹細胞および未分化増殖細胞に加えて分化・成熟した上皮細胞から成っている¹¹⁾。透過型電子顕微鏡によりオルガノイドの培養上清にエクソソームが認められ、それらは血清から分離したエクソソームに比較してサイズが均一であった(図5)。したがって、腸上皮細胞もエクソソームを放出することが確認され、また、クリプトオルガノイドは腸上皮細胞が放出するエクソソームを解析するための *in vitro* 実験系として利用できることが示された。

脂肪細胞に由来するエクソソームを調べるために、血清エクソソーム画分に含まれるアディポサイトカインを分析した。エクソソーム画分には、レプチンおよびレ

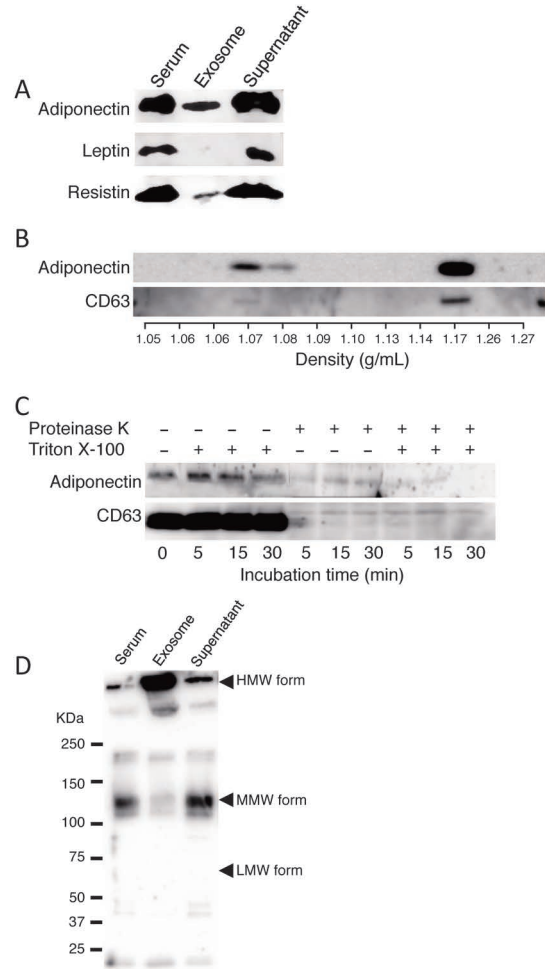


図6 マウスの血清から分離したエクソソームのウェスタンブロット分析

A. 等容量の血清、エクソソーム画分、および超遠心分離後の上清を還元条件下でSDS-PAGEにより分離し、抗アディポネクチン、レプチン、およびレジスチン抗体で検出した。B. マウスの血清を密度勾配遠心分離法により分画後、還元条件下でSDS-PAGEにより分離し、抗アディポネクチンおよびCD63(エクソソームのマーカータンパク)抗体で検出した。アディポネクチンおよびCD63のシグナルはエクソソームの密度と一致する画分に検出された。C. エクソソーム画分を、プロテイナーゼK、Triton X-100、および両者でインキュベートした後、ウェスタンブロッティングを行った。D. 血清、エクソソーム画分、および超遠心分離後の上清を非変性条件下でSDS-PAGEにより分離し、抗アディポネクチン抗体で検出した。アディポネクチン濃度が等しくなるように試料を調製した。

ジスチンはほとんど含まれなかったが、アディポネクチンの一部(約4%)が存在し、それはエクソソームの脂質二重膜に埋め込まれた形で存在することが示唆された(図6および表1)¹²⁾。非変性条件下のSDS-PAGEの後にウェスタンブロッティングを行ったところ、エクソソーム中のアディポネクチンは高分子量のものが主体であっ

た¹²⁾。アディポネクチンはインスリン感受性の亢進作用や抗炎症作用を有するが、生理的に活性なアディポネクチンは高分子量のものであるので、血清アディポネクチンの一部がエクソソームに存在するという事は、その生理機能発現と何らかの関係があるかもしれない。アディポネクチンは脂肪細胞により産生・分泌されるので、本研究はアディポネクチンが脂肪細胞に由来するエクソソームのマーカーとなりうる事、またエクソソームの機能と関連することを示唆している。

以上の結果は、プレバイオティクスおよびプロバイオティクスが腸内細菌叢を介して宿主に対する健康機能を発揮するときに、腸管から末梢組織への情報伝達にエクソソームが関与する可能性を示唆する。腸内細菌叢が宿主の生理に影響するときにエクソソームが関わる事については、これまでまったく報告されておらず、生体内における新規の細胞間コミュニケーションシステムである可能性があるため、今後さらに解析を進めていく。

要 約

プレバイオティクスおよびプロバイオティクスの生理機能をエクソソームが媒介するという仮説を検証するために、これらを摂取したマウスの血清エクソソームがマクロファージ細胞株における炎症性サイトカイン産生におよぼす影響を調べた。その結果、血清エクソソームにはマクロファージを活性化する宿主由来の因子が含まれ、そのような因子がプレバイオティクスやプロバイオティクスの摂取によって減少するか、あるいはそのよう

な因子のマクロファージ活性化作用を阻害するような別の因子がエクソソームに存在し、それがプレバイオティクスやプロバイオティクスの摂取によって増加するという可能性が考えられた。また、小腸クリプトオルガノイドは腸上皮細胞が放出するエクソソームを解析するための *in vitro* 実験系として利用できる事、アディポネクチンが脂肪細胞に由来するエクソソームのマーカーとなりうる事が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) J. Watanabe, et al.: *Br. J. Nutr.*, **100**, 339–346, 2008.
- 2) S. Pirapatdit, et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1901–1907, 2008.
- 3) K. Sonoyama, et al.: *Br. J. Nutr.*, **103**, 218–226, 2010.
- 4) R. Fujiwara, et al.: *Br. J. Nutr.*, **103**, 530–538, 2010.
- 5) N. Sasajima, et al.: *Br. J. Nutr.*, **103**, 539–548, 2010.
- 6) R. Fujiwara, et al.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **56**, 260–265, 2010.
- 7) N. Takemura, et al.: *Exp. Biol. Med.*, **235**, 849–856, 2010.
- 8) T. Okubo, et al.: *Biosci. Microb. Food Health*, **32**, 93–100, 2013.
- 9) C. Théry, et al.: *Curr. Protoc. Cell Biol.*, Chapter 3, Unit 3.22, 2006.
- 10) S. Mathivanan, et al.: *Mol. Cell. Proteomics*, **9**, 197–208, 2010.
- 11) T. Sato, et al.: *Nature*, **459**, 262–266, 2009.
- 12) W. Phoosawat, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press. doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.114.