

## 1. 研究課題

学校名

氏名

### 1. 背景と目的

筆者らの研究室ではこれまでプロバイオティック乳酸菌株である *Lactobacillus plantarum* No. 14 株が高脂肪食を摂取したマウスの内臓脂肪の蓄積を予防する効果や 2 型糖尿病モデルマウスの脂肪組織における炎症を抑制する効果があることを示してきた<sup>1,2)</sup>。しかしながら、このような抗肥満効果を発揮する乳酸菌株を多数の菌株から動物実験を用いて評価・選抜することは、膨大な労力と動物の数を必要とするため、より簡便かつ迅速な評価方法が求められている。Secq<sup>3)</sup>らは、腸管粘膜および腸臓  $\beta$  細胞で産生される C 型レクチンである Regenerating islet-derived protein 3  $\beta$  (Reg3  $\beta$ ) が肥満を亢進することを報告した。すなわち、この分子を過剰発現させたマウスでは体重の増加が見られ、一方でこれを欠損させたマウスでは体重の減少が見られた<sup>3)</sup>。また、筆者らの予備的な研究から、肥満を誘導した KK-Ay マウス(2 型糖尿病モデル)の腸管粘膜において Reg3  $\beta$  の発現量が顕著に上昇していることを観察した。これらの知見から筆者らは「腸管粘膜における Reg3  $\beta$  の高発現が肥満と関係しており、プロバイオティック乳酸菌株はこれを制御することによって肥満を抑制する」という仮説を立てた。この仮説を証明するために、筆者らは ① 腸管粘膜の Reg3  $\beta$  発現に影響を与えている因子の特定、② 抗肥満効果を発揮するプロバイオティック乳酸菌が腸管粘膜の Reg3  $\beta$  発現に及ぼす影響をそれぞれ検証した。①では様々な遺伝背景の肥満モデルマウスの腸管粘膜の Reg3  $\beta$  発現量を評価するとともに、食餌や腸内細菌の影響も評価した。②では抗肥満効果を発揮する乳酸菌株として知られている *L. rhamnosus* GG 株をマウスに経口投与し、腸管粘膜上皮および陰窩の Reg3  $\beta$  発現量をそれぞれ評価した。

さらに、これらと並行してプロバイオティック乳酸菌が腸管粘膜の Reg3  $\beta$  発現に及ぼす影響を *in vitro* で効率的に評価するために吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞の 4 種類の細胞が存在する腸管粘膜上皮を模した複合的な培養細胞系の構築を試みた。

### 2. 材料と方法

#### 2-1 遺伝性肥満マウスの腸管粘膜における Reg3 $\beta$ 遺伝子発現の定量

正常体重マウスとして C57BL/6J Ham Slc-+/+ (+/+) を、遺伝性肥満マウスとして C57BL/6J Ham Slc-ob/ob (ob/ob) および KK-Ay/Ta Jcl (KK-Ay) を供試した。マウスには非精製固形飼料および水道水を自由摂取させた。食餌の摂取が腸管粘膜の Reg3  $\beta$  遺伝子発現に及ぼす影響を検証するために、各マウスを絶食群および摂食群に分け、絶食群には解剖の 18 時間前に絶食を行った。セボフルラン吸入麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させた後に開腹し、回腸粘膜を採取した。回腸粘膜から RNA を抽出し、Reg3  $\beta$  遺伝子の発現量を定量した。

#### 2-2 腸内細菌が腸管粘膜における Reg3 $\beta$ 遺伝子発現に及ぼす影響

KK-Ay マウスに非精製固形飼料および水を自由摂取させ、1 週間の馴化期間を設けた。マウスを対照群およ

び抗生剤投与群の2群に分け、対照群には水道水を、抗生剤投与群にはネオマイシン(1.0 mg/mL)およびバンコマイシン(0.5 mg/mL)の混合水溶液をそれぞれ自由摂取させた。毎週1回、体重測定と培養法による腸内細菌数の推定を行った。飼育3週目にセボフルランの吸入により麻酔し、頸動脈から血液を採取し、血清を分離した。その後、頸椎脱臼により安楽死させ、回腸粘膜を採取した。回腸粘膜からRNAを抽出し、Reg3 $\beta$ 遺伝子の発現量を定量した。また、血清中のReg3 $\beta$ をウェスタンブロッティング法により検出した。

### 2-3 抗肥満効果を持つプロバイオティック乳酸菌が腸管粘膜におけるReg3 $\beta$ 遺伝子発現に及ぼす影響

C57BL/6Nマウスに毎日 $1.0 \times 10^9$  cfuの*Lactobacillus rhamnosus* GG株(LGG)を1週間経口投与した。投与後、マウスから小腸全域を摘出した。摘出した小腸全域からは陰窩領域および小腸上皮細胞の単離操作を行った。小腸上皮細胞の回収操作については先行研究に準拠して実施した<sup>1)</sup>。氷冷したPBSを用いて管腔内を洗浄後、縦に切開した。これを氷冷したPBS中で緩やかに濯いだ後、50 mL容遠沈管に調製した3.0 mM EDTAおよび50 mM ジチオスレートを含む20 mLのPBS中に浸し、氷上で60分間インキュベートした。この際、10分おきに遠沈管を縦に10回攪拌する操作をほさんだ。得られた上清はフィルター濾過した後、遠心処理(400 g, 5分間, 4°C)し、形成された細胞塊を再度氷冷したPBSを用いて再懸濁した(50 mL容遠沈管に残った腸管組織は陰窩領域単離操作のため回収した)。最後にパーコール不連続密度勾配遠心法により細胞懸濁液から上皮細胞のみを精製した。上皮細胞を回収後、残りの腸管組織より陰窩を単離した。回収した上皮細胞および陰窩からRNAを抽出し、Reg3 $\beta$ 遺伝子の発現量を定量した。

### 2-4 腸管粘膜上皮モデルの構築

腸管上皮は吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞から構成され、いずれも腸管陰窩に存在する腸管上皮幹細胞より分化したものであり、これらを含む複合的な培養系を構築するためには多量の腸管上皮幹細胞を得る必要がある。*in vitro*において、幹細胞性を維持するためには腸管上皮幹細胞のWnt- $\beta$ シグナル経路を活性化するシグナルタンパク質を幹細胞に供給しなくてはならない。そこで、筆者はMiyoshiらの方法に準拠して腸管上皮幹細胞のWnt- $\beta$ シグナル経路を活性化するシグナルタンパク質であるR-spondin 3、NogginおよびWnt-3aを産生する遺伝子改変細胞(L-WRN細胞)の構築を試みた<sup>3)</sup>。発現用プラスミドベクター(pVITRO2-hygro)にR-spondin 3遺伝子およびNoggin遺伝子断片を組み込み、L-wnt3a細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞を、抗生物質Hygromycinを含む培地で培養し、Hygromycin耐性を指標としたクローニングを行った。選抜したクローンを10 cmディッシュに播種し、24時間培養後、培養上清を回収した。回収した培養上清に等量の培地を新たに加え、50%馴化培地(50% CM)とした。馴化培地中のシグナルタンパク質の活性を評価するためにマウスの小腸陰窩を各クローンから得た50% CMで培養し、幹細胞の分化マーカーであるLeucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5(Lgr5)の遺伝子発現を評価した。次に、Moonらの方法に準拠して小腸陰窩の幹細胞のLgr5遺伝子発現を強く誘導したクローンの50% CMを用いて腸管粘膜上皮モデルの構築を試みた<sup>4)</sup>。マトリゲルで包埋したマウス小腸陰窩を50% CM中で培養し、幹細胞を含む腸管組織構造体である小腸スフェロイドを作製した。マトリゲル内の小腸スフェロイドを回収し、パスツールピペットを用いて小腸スフェロイドの3次元構造を壊

した。3次元構造を壊した小腸スフェロイドを50% CMで懸濁し、マトリゲルコートしたトランズウェル上に添加した。24時間の培養後、10% CMに置換し、さらに2日間培養を行った。培養後、細胞の形態を経時的に顕微鏡観察し、経上皮電気抵抗(TER)を測定した。

### 3. 結果および考察

#### 3-1 遺伝性肥満マウスの腸管粘膜における Reg3β 遺伝子発現量

正常体重マウス (+/+ ) および遺伝性肥満マウス (*ob/ob* および *KK-Ay*) の回腸粘膜における Reg3β の遺伝子発現量を図1に示した。回腸粘膜の Reg3β 遺伝子発現は、*ob/ob* および *KK-Ay* において絶食時と比較して摂食時で有意に高い値を示した。このことから肥満時には食餌由来の栄養素によって回腸粘膜の Reg3β 発現が顕著に上昇することが明らかとなった。また、絶食時の回腸粘膜における Reg3β 遺伝子発現は +/+ および *ob/ob* と比較して *KK-Ay* で統計的に有意な高値を示した。一方、摂食時では、+/+と比較して *ob/ob* および *KK-Ay* で統計的に有意な高値を示した。本結果から、正常体重マウスと比較して肥満マウスでは摂食時に回腸

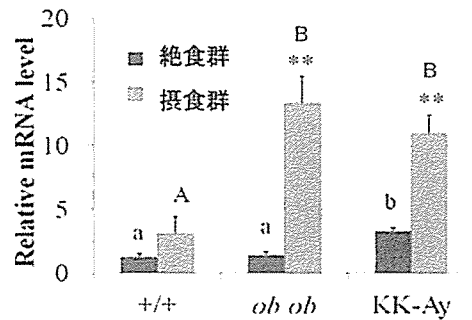


図1 通常体重マウス(+/+)および遺伝性肥満マウス(*ob/ob*, *KK-Ay*)の回腸粘膜のREG3β遺伝子発現。  
\*\*は絶食群と比較して有意差あり。  
異なる間で有意差あり(小文字:絶食群、大文字:摂食群の各マウス間と比較)

粘膜の Reg3β 発現が上昇することが明らかとなった。Reg3β 過剰発現マウスが肥満化することが報告されているが<sup>3)</sup>、どこの部位において Reg3β 発現が上昇し、肥満を誘導しているかは不明であった。本実験から回腸粘膜の Reg3β 発現が肥満と関係していることが強く示唆された。回腸粘膜における Reg3β 発現と肥満の関係性を詳細に検証すべく、現在、Reg3β に対する中和抗体を遺伝性肥満マウスに腹腔内投与した際に体重や脂肪蓄積にどのような影響を及ぼすかを検証している。

#### 3-2 腸内細菌が腸管粘膜における Reg3β 遺伝子発現に及ぼす影響

対照群(Control)および抗生剤投与群(ABX)の体重および腸内細菌数の経時変化、回腸粘膜の Reg3β 遺伝子発現および血清中の Reg3β 発現を図2-A-Dにそれぞれ示した。ABXの体重の平均値は、Controlと比較して飼育1週目から有意に低い値を示した(図2-A)。糞便中の腸内細菌数は、飼育1週目に統計的に有意な低値を示したが、2週目および3週目にグラム陰性桿菌が増殖しており測定不能であった(図2-B)。これは抗生剤耐性菌の出現によるものと考えられる。Reg3βの発現は、回腸粘膜(図2-C)および血中(図2-D)において抗生剤投与により有意に低い値を示した。3-1の結果において遺伝性肥満マウスで回腸粘膜の Reg3β 発現が上昇したことを考慮すると、抗生剤投与に伴う体重の減少が直接的に Reg3β 発現を減少させた可能性が考えられる。これに加えて、腸内細菌数および腸内細菌叢が回腸粘膜の Reg3β 発現と強く関わっていることが考えられる。3-1の結果において食餌の摂取が Reg3β の発現を上昇させたことから腸内細菌が食餌成分を資化することによ

て産生する有機酸などの代謝産物が回腸粘膜に作用することでReg3 $\beta$ の発現を調節しているのかもしれない。今後の実験において有機酸の注腸投与によって回腸粘膜のReg3 $\beta$ 発現がどのように変化するかを検証する。

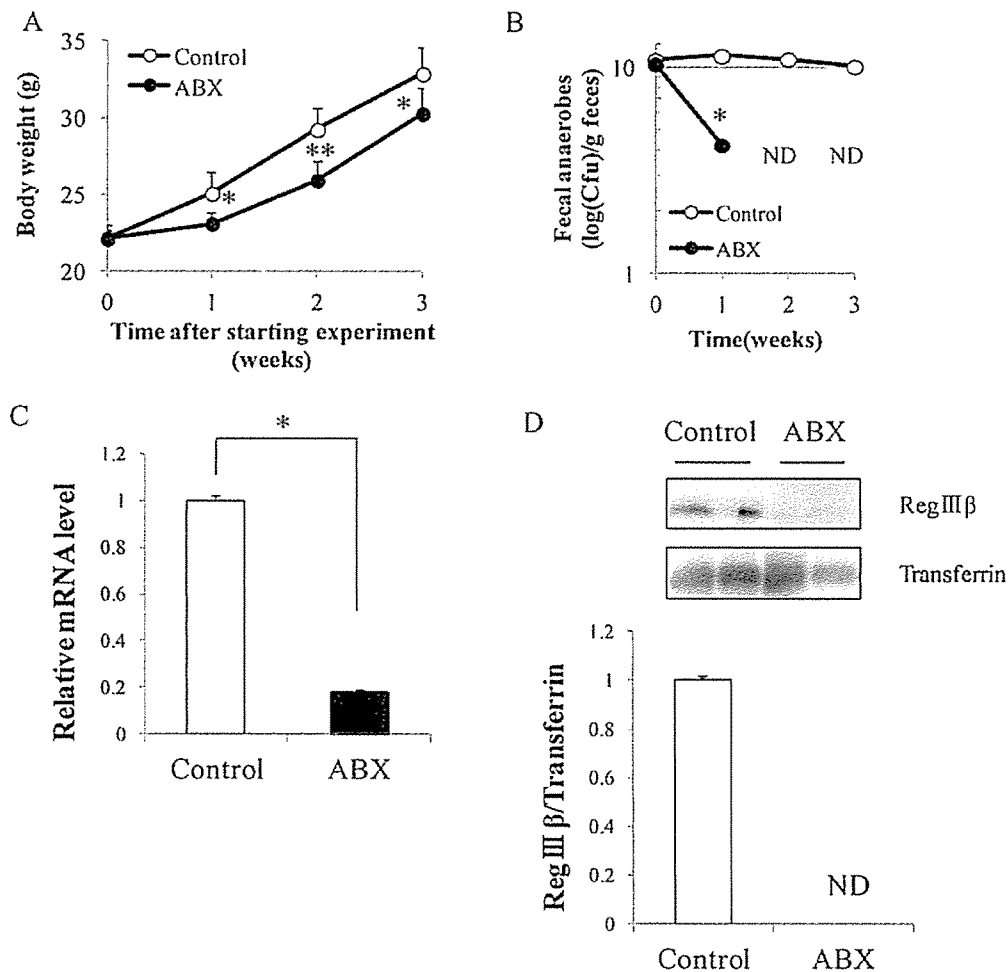


図2 抗生剤投与が(A)体重、(B)腸内細菌数、(C)回腸粘膜のREGIII $\beta$ 遺伝子発現 (D)血清中のREGIII $\beta$ 発現に及ぼす影響

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. Control. ND, Not detectable

### 3-3 抗肥満効果を持つプロバイオティック乳酸菌が腸管粘膜におけるReg3 $\beta$ 遺伝子発現に及ぼす影響

対照群(Control)およびLGG投与群(LGG)の回腸上皮細胞および陰窩におけるReg3 $\beta$ 遺伝子発現を図3に示した。LGGの投与によって回腸上皮細胞のReg3 $\beta$ 遺伝子発現は有意に低い値を示した。回腸陰窩においても有意差はなかったもののLGGの投与によって低下傾向を示した。本実験では殺菌したLGG株を投与していることから、腸内細菌叢構成や腸管内容物中の有機酸組成の変化によってReg3 $\beta$ の遺伝子発現が減少したとは考えにくく、おそらくLGGの菌体成分が腸管上皮に作用することでもたらされた現象であると考えられる。過去の報告から、LGGの投与によって食餌誘導性肥満が抑制され、体重の減少や脂肪細胞への脂肪蓄積が抑制されることが知られている<sup>7)</sup>。本実験結果からは腸管粘膜のReg3 $\beta$ 発現がLGGの抗肥満効果と直接関係しているかは明らかではないが、少なくとも抗肥満効果を発揮するプロバイオティック乳酸菌を摂取することで腸管

粘膜の Reg3β 発現を調節できることが示唆された。

### 3-4 腸管粘膜上皮モデルの構築

遺伝子改変細胞(L-WRN細胞)の各クローンから回収した馴化培地を用いて小腸陰窩より誘導したスフェロイドの Lgr5 遺伝子発現および形態観察結果を図4に示した。幹細胞の分化

マーカーである Lgr5 遺伝子の発現量はクローン No. 9 の馴化培地で培養したスフェロイドにおいて陽性対照(リコンビナント R-spondin 1 および Noggin を添加した培地で培養)のスフェロイドと比較して約4倍もの高発現を示

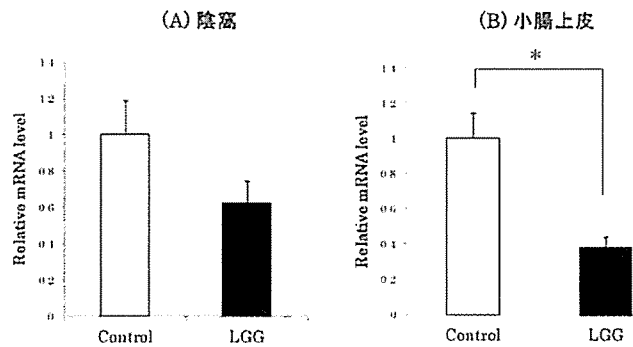
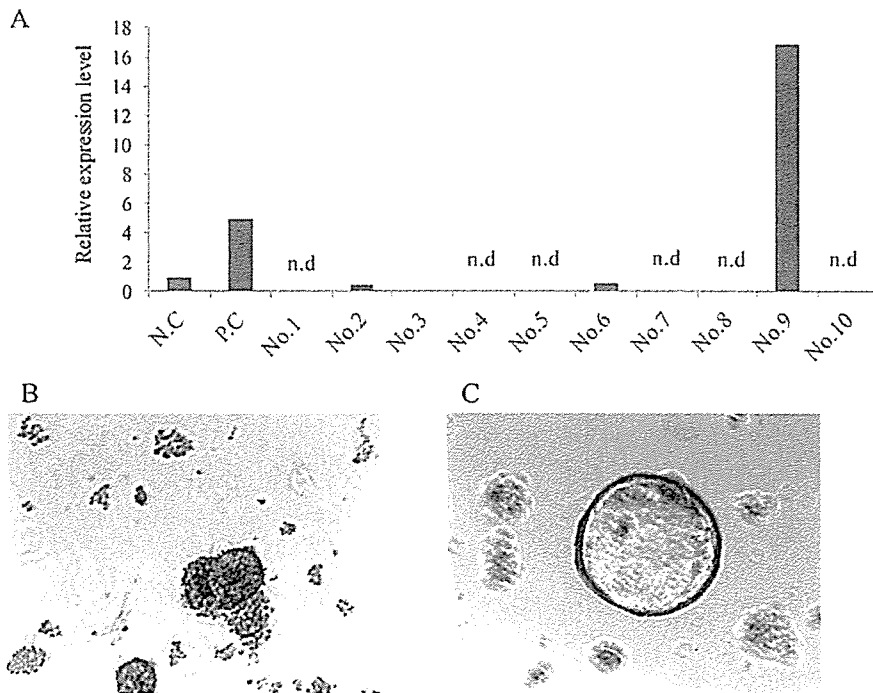


図3 LGG投与が(A)回腸陰窩および(B)回腸上皮細胞のReg3β遺伝子発現に及ぼす影響  
\* $p < 0.05$  vs. Control



### 図4 L-WRN細胞の活性評価。

(A)各L-WRN細胞クローンから回収した馴化培地で培養した小腸スフェロイドにおける Lgr5 遺伝子発現。N.C: Negative control, P.C: Positive control, n.d: not detectable  
(B) 遺伝子導入していない細胞(N.C)および(C) L-WRN細胞クローン9から回収した馴化培地で培養した小腸スフェロイド。

した(図4-A)。遺伝子導入していない細胞の馴化培地で培養した小腸陰窩(N.C)は構造体を形成できずに壊れたような形態を示したのに対して(図4-B)、クローン No. 9 の馴化培地で培養した小腸陰窩では幹細胞が分化・増殖して丸型のスフェロイドを形成した(図4-C)。クローン No. 9 の馴化培地で培養した小腸スフェロイドを用いてトランスウェル上で腸管粘膜上皮層の構築を試みた結果、経時的にTERが上昇し(Day 2 : 116  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , Day 5 : 211  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , Day 7 : 330  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )、単層構造を形成した(図5)。今後は単層構造を構成する細胞構成を免疫

染色で明らかにするとともに、この腸管粘膜上皮モデルを用いて腸管粘膜の REG3  $\beta$  発現を指標とした抗肥満効果の高いプロバイオティック乳酸菌のスクリーニング法を構築する。

#### 4. 総括

Reg3  $\beta$  の過剰発現マウスが肥満を発症することがこれまで確認されていたが、腸管粘膜での Reg3  $\beta$  発現と肥満の関係性に着目した研究はこれまでなかった。本研究から腸管粘膜の Reg3  $\beta$  発現が肥満と関係していることが明らかとなり、腸内細菌および食餌成分によってその発現が制御されていることが示唆された。さらに、抗肥満効果の高いプロバイオティクスを摂取することで腸管粘膜の Reg3  $\beta$  発現が抑制されたことから、抗肥満効果を持つプロバイオティクスの選抜指標として腸管粘膜の Reg3  $\beta$  発現の調節作用を利用できる可能性が考えられた。改善すべき点は残されているものの、本研究において腸管粘膜上皮モデルを構築することに成功した。今後は、この培養系を利用して腸管粘膜由来の REG3  $\beta$  が肥満と関係する機序を明らかにするとともに、腸管粘膜の Reg3  $\beta$  発現を指標とした抗肥満効果の高いプロバイオティクスの選抜法を構築する。

#### 5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご援助を賜りました一般財団法人 東洋水産財団 に厚く御礼申し上げます。

#### 引用文献

- 1) Takemura N, Okubo T, Sonoyama K. *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010; 235: 849-856.
- 2) 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.
- 3) Veronique S, Cecilia M, Meritzell G, Belen L, Daniel C, Stephane G, Laurence C, Giuseppe M, Nelson D, Juan L. PAP/HIP Protein Is an Obesogenic Factor. *J Cell Physiol* 2014; 229: 225-231.
- 4) Yamamoto S, Nakase H, Matsuura M, Honzawa Y, Matsumura K, Uza N, Yamaguchi Y, Mizoguchi E, Chiba T. Heparan sulfate on intestinal epithelial cells plays a critical role in intestinal crypt homeostasis via Wnt/  $\beta$ -catenin signaling. *Amer J Physiol* 2012; 305: 241-249.
- 5) Miyoshi H & Stappenbeck TS. *In vitro* expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture *Nature protocols* 2013; 8: 2471-2482.
- 6) Moon C, VanDussen KL, Miyoshi H, Stappenbeck TS. Development of a primary mouse intestinal epithelial cell monolayer culture system to evaluate factors that modulate IgA transcytosis *Mucosal Immunol* 2013; 7: 818-828.
- 7) Kim SW, Park KY, Kim B, Kim E, Hyun CK. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves insulin