

令和3年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
研究課題名	腸組織の発生・再生における細菌叢-幹細胞コミュニケーションの意義	
研究者所属・氏名	研究代表者： 高度先端総合医療センター再生医療部 寺村岳士 共同研究者： 農学部応用生命化学科 倉田淳志	

1. 研究目的・内容

ヒトの腸管内には膨大な数の細菌が存在しており、腸内細菌叢と呼ばれる共生システムを形成している。近年、腸内細菌叢は宿主組織・臓器と連絡し、発生・再生・疾病と深く関わることが明らかになってきた。一方、細菌叢-宿主間コミュニケーションを媒介する物質やその機序については殆ど分かっていない。我々は腸内細菌が産生する膜小胞(Membrane Vesicle: MV)に着目した。MVはタンパク質や核酸を含有する情報のコンテナであり、宿主血中にも検出されることがわかっている。

本研究では、宿主側の受容器官(細胞)として、間葉系幹細胞(MSC)と腸管上皮細胞に着目した。MSCは腸管組織をはじめ全身に分布しており、欠損組織の再生だけでなくサイトカインやエクソソームの分泌を介し広く情報を拡散させる機能も有している。腸管上皮細胞は細菌叢と近接した細胞でありながら、技術的問題により研究が困難であったが、近年iPS細胞を用いた腸管再現系(オルガノイド)が開発され、新たな展開を迎えている。本研究では、MVを介した細菌叢-宿主間コミュニケーションに対し、申請者の専門領域である幹細胞の高解像解析法やヒトiPS細胞を用いた臓器オルガノイド作成技術を用いてアプローチする。これにより、腸管を始めとした組織発生・再生における腸内細菌叢-宿主間コミュニケーションの意義を解明する。

2. 研究経過及び成果

腸内細菌が細胞外に放出する膜小胞 (MV) は、腸管上皮細胞や腸管免疫細胞に作用する。しかし腸内細菌由来の MV はどのような細胞応答を惹起するのか不明であり、MV 中の細胞刺激因子は同定されていない。さらに MV による宿主細胞への作用機序も未解明である。本研究課題を遂行するには、腸内細菌由来の MV に関して、物理化学的な特徴の理解、宿主細胞の応答の解明、生化学的な構成成分の分析、細胞刺激因子の同定が必要である。

R3 年度には、発酵食品中の乳酸菌や乳幼児の腸管由来のビフィズス菌から MV を見だし、粒径や個数、表面電荷を分析した。本 MV によって、宿主細胞は各種サイトカインを産生した。メタボローム解析、プロテオーム解析、RNA-seq 解析で網羅的に MV を分析して、細胞応答を惹起するタンパク質を見いだした。本タンパク質は、Toll 様受容体を介して核内転写因子を活性化し、各種サイトカインの生産誘導能を示した。以上から、いわゆる善玉菌に由来する MV の構成成分を分析して、細胞刺激因子として機能するタンパク質を見いだした。MV を介した腸内細菌と宿主のクロストークの一端を、分子レベルで順調に明らかにしている (Takagi H et al., *Biosci Biotech Biochem* 2022)。

また、本研究の目的である MV を介した腸内細菌と間葉系幹細胞および腸管上皮細胞のクロストークを明らかにするため、R3 年度にはモデル細胞を用いた方法の確立を行った。MV の作用強度を検証するため、明瞭な機能が予想される加齢脂肪細胞から MV としてエクソソームを精製し、筋由来幹細胞に添加を行った。申請者らがこれまでに行った研究により、脂肪細胞由来エクソソーム内に存在する miRNA については明らかになっており、これを定量することで添加エクソソーム量と標的遺伝子の変化の量的相関性を検証することが可能である。本研究では、エクソソーム内に存在する miRNA が細胞増殖停止を招くほど強い遺伝子変化を誘導可能であることを証明し、原著論文として報告を行った (Itokazu et al., *JBC*, in press)。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

R3 年度には、乳酸菌やビフィズス菌から MV を発見して、宿主細胞応答を惹起する MV 中のタンパク質を解明できた。今後は、MV 中の特徴的なタンパク質を認識する抗体を作成して、抗体による MV の標識を試みる。標識した MV を用いて、宿主細胞や生体に対する MV の作用機序を解明する。腸内細菌による MV を介した生体への影響を解明することで、MV を活用した生体機能制御技術の基盤を構築する。

また、昨年度までに確立した哺乳動物細胞での MV の作用を検証する方法を用いて、iPS 細胞から誘導した腸オルガノイドへの乳酸菌代謝物、MV 添加を行い、遺伝子発現や細胞動態の変化を明らかにする研究を進めていく予定である。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Journal of Biological Chemistry	原著論文	in press
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	原著論文	2022.03.22