



Title	乳中の既知および新規成分の解析とプロバイオティクスを使った人工乳の改良に関する研究
Author(s)	和泉, 裕久
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第6991号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6991
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61885
Type	doctoral thesis
File Information	Hirohisa_Izumi.pdf



乳中の既知および新規成分の解析とプロバイオティクスを
使った人工乳の改良に関する研究

和泉 裕久

目次

	頁
第1章 序論	1
1-1. 乳の役割	1
1-2. 乳中に含まれる生理活性因子	1
1-3. 母乳栄養児と人工栄養児	5
1-4. 本研究の目的	5
図表	7
第2章 乳中既知成分の新規生理作用の探索	8
2-1. 乳たんぱく質によるグルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) 分泌刺激作用	8
2-1-1. 緒言	8
2-1-2. 材料と方法	8
2-1-3. 結果	12
2-1-4. 考察	14
2-1-5. 小括	17
図表	18
2-2. α -LA による腸炎抑制作用	31
2-2-1. 緒言	31
2-2-2. 材料と方法	31
2-2-3. 結果	33
2-2-4. 考察	33
2-2-5. 小括	35
図表	36
第3章 乳中新規成分の解析	43
3-1. 牛乳中 miRNA と mRNA	43
3-1-1. 緒言	43
3-1-2. 材料と方法	43
3-1-3. 結果	45
3-1-4. 考察	47
3-1-5. 小括	49
図表	51

3-2. ラット乳中 miRNA と mRNA の網羅的解析	63
3-2-1. 緒言	63
3-2-2. 材料と方法	63
3-2-3. 結果	65
3-2-4. 考察	68
3-2-5. 小括	71
図表	72
3-3. ウシ生乳中 miRNA, mRNA の存在形態	85
3-3-1. 緒言	85
3-3-2. 材料と方法	85
3-3-3. 結果	87
3-3-4. 考察	88
3-3-5. 小括	90
図表	92
3-4. 牛乳由来エクソソームによるヒト細胞への作用	112
3-4-1. 緒言	112
3-4-2. 材料と方法	112
3-4-3. 結果	114
3-4-4. 考察	114
3-4-5. 小括	116
図表	117
第4章 <i>Bifidobacterium breve</i> M-16V が新生児消化管および免疫能に与える作用	122
4-1. 緒言	122
4-2. 材料と方法	122
4-3. 結果	126
4-4. 考察	127
4-5. 小括	129
図表	130
第5章 総括	146
5-1. 諸言	146
5-2. 乳中既知成分の新規生理作用の探索	146
5-3. 乳中新規成分の解析	147

5-4. <i>Bifidobacterium breve</i> M-16V が新生児消化管および免疫能に与える作用	148
5-5. 結語	149
謝辞	150
引用文献	151

第1章 序論

1-1. 乳の役割

「乳」は、哺乳類に特有の器官である乳腺で作られるが、「成長の速い種の乳にはたんぱく質量が多い」「水棲動物など体温維持に多くのカロリーを必要とする種の乳には脂質量が多い」など、組成は種によって大きく異なる[Figure (Fig.) 1] (1, 2)。また、明確な定義はないものの、一般に出産後 5 日目までの乳は「初乳」、6~10 日頃の乳は「移行乳」、10 日目以降の乳は「成熟乳」と呼ばれ、産後経時的に組成が変化する (3-5)。以上のことから、「乳」には、生後の発達時期に合わせた、その種の児 (仔) にとって最適な栄養成分が含まれると考えられている。さらに、乳にはたんぱく質などの五大栄養素だけでなく、ラクトフェリン・免疫グロブリンなどの感染防御因子や、ホルモン・成長因子・サイトカインなどの生理活性因子も含まれており (1-7)、乳児 (仔) を感染から防御するとともに、消化管の発達促進などに寄与していると考えられている。

1-2. 乳中に含まれる生理活性因子

1-2-1. たんぱく質 (8, 9)

α -ラクトアルブミン (α -LA)

乳中に含まれるたんぱく質はカゼインと乳清たんぱく質に大別でき、その比はヒトでは 4:6、ウシでは 8:2 である (2, 4, 5)。 α -LA は乳清たんぱく質に分類される。泌乳時期にもよるが、ヒト母乳中では最も多く含まれるたんぱく質であり、全たんぱく質のおよそ 30 % を占める。ウシでは全たんぱく質の約 4 % を占める。カルシウムや亜鉛と結合してその吸収を促進する作用 (10, 11) や、胃粘膜保護作用 (12, 13) が知られている。また、セロトニンの前駆体であるトリプトファンが多く含まれることから、脳機能や精神活動に及ぼす影響も研究されており、認知・記憶低下の予防作用 (14, 15) に関しても報告されている。さらに、トリプシンとキモトリプシンによる分解により生成する 3 種のペプチドにグラム陽性菌に対する抗菌活性があること (16)、モルテングロビュール状態の α -LA とオレイン酸の複合体ががん細胞特異的にアポトーシスを誘導することが報告されている (17, 18)。

ラクトフェリン (LF)

LF は乳清たんぱく質に分類される鉄結合性の糖たんぱく質であり、ヒトでは成熟乳中に 1~3 mg/ml、初乳中に 5~7 mg/ml と、多く含まれる。抗微生物活性、免疫調節作用など多彩な機能が知られている (19, 20)。臨床的には、極低出生体重児の遅発型敗血症の発症頻度を低下させること (21)、ロタウイルス感染症状を軽減させること (22) などが知られている。LF が胃内でペプシンにより分解されると、ラクトフェリシンという LF の数十~数百倍の抗菌活性をもったペプチドが生成される (23)。また、LF には乳児に多いビフィズス菌である *Bifidobacterium breve* (*B. breve*)、*B. longum subsp. infantis* (*B. infantis*) の増殖を促進

する配列が含まれることも知られている (24, 25)。

リゾチーム

リゾチームは母乳中に 30~3,000 $\mu\text{g/ml}$ 含まれている。細菌の細胞壁に損傷を与えることによりグラム陽性菌を殺菌する。単独ではグラム陰性菌に対して抗菌活性は示さないが、LF との相乗作用により殺菌効果を示すとされる (26)。牛乳中濃度は母乳の数千分の一であり、そのためか牛乳を主原料とする人工乳で哺育された児の糞便中リゾチーム活性は、母乳児の 1/400 程度と低い。

オステオポンチン (OPN)

OPN は別名分泌型リン酸化たんぱく質 (secreted phospho protein) と呼ばれ、高度にリン酸化された糖たんぱく質である。報告により差はあるものの、母乳中にはおよそ 20~4,000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で含まれている。創傷治癒、炎症、骨の発達・維持に関与するとされている。近年のアカゲザルを用いた検討によると、OPN 添加人工乳で飼育した群の空腸遺伝子発現パターンが、OPN 無添加の人工乳飼育群と比較して母乳群に近づいたことが報告されている (27)。

免疫グロブリン (Ig)

母乳中に含まれる免疫グロブリンの内、大半は IgA であり、分泌成分 (secretory component) と J 鎖を介した 2 量体の sIgA の形で存在する。成熟乳中には 0.5~1 mg/ml 、初乳中には 2 mg/ml と、LF と同じく初乳中に多く存在する。sIgA は単量体の IgA よりもプロテアーゼに対して耐性があり、乳児消化管をコーティングすることで感染から防御している。母乳中に IgA が豊富に存在するのは、授乳期間中に乳腺に強く発現するケモカイン CCL28 により IgA 陽性の形質細胞が乳腺に遊走されるからであり、この CCL28 にも抗菌活性があることが知られている (28)。

ホルモン・サイトカイン

アディポネクチン

アディポネクチンは脂肪組織から分泌されるアディポカインの一つで、インスリン感受性の促進、糖・脂質代謝調節、抗炎症など多彩な作用を示す。ヒト母乳中には 4~88 ng/ml で存在し、平均はおよそ 19 ng/mL とされる。動物実験レベルでは、乳仔マウスに胃内投与したアディポネクチンが投与 2 時間後に血中で検出されることが確認されている (29)。母乳中アディポネクチンレベルと乳児の肥満度に逆相関が認められることが報告されている (30)。

レプチン

レプチンもアディポネクチン同様脂肪組織から分泌されるアディポカインの一つであり、摂食抑制、エネルギー恒常性維持、免疫系発達など様々な作用を示す。ヒト母乳中には 1~3 ng/ml で存在し、初乳と成熟乳の間に差は認められない。動物実験レベルでは、経口的に摂取した母乳を介し、血中に検出されることが知られている (31)。母親の BMI と母乳中レプチンには正の相関があり、Andreas らは、レプチン濃度が高い母乳を摂取した児は将来的にレプチン抵抗性を示す可能性があることを示唆している (30)。

インスリン

インスリンはヒト母乳中に 0.2~7 ng/ml で存在し平均はおよそ 1.8 ng/ml と、健常人の空腹時濃度よりも高い。報告により異なるが、初乳の方が成熟乳に比して多く含まれているとされる。新生仔ミニブタを用いた検討から、経口的に摂取したインスリンが消化管面積と二糖類分解酵素を増加させ、消化管成熟に寄与することが示されている (32)。

上皮増殖因子 (EGF)

ヒト成熟母乳中に 30~50 ng/ml、初乳中に 200 ng/ml 程度存在する。消化管上皮細胞に受容体が発現しており、消化管発達促進や消化管粘膜損傷の修復に寄与していると考えられている。ラット壊死性腸炎 (NEC) モデルを用いた検討では、EGF 投与により NEC 発症率が有意に低下したことが報告されている (33)。

形質転換増殖因子-β (TGF-β)

哺乳類では TGF-β_{1~3} の 3 つのアイソフォームが存在する。ヒト母乳中の量は報告により大きな差があり、また、個体差も非常に大きい。健康な母親 49 人の母乳を用いた Hawkes らによる検討では、TGF-β₁ は 43~7,108 pg/ml、TGF-β₂ は 208~57,935 pg/ml と報告されている (34)。血中には TGF-β₁ が多いが、母乳中には TGF-β₂ が多い。両者共に初乳中濃度の方が成熟乳よりも高いとされる。TGF-β は細胞の増殖・分化の調節など多彩な機能を示すが、母乳中 TGF-β は、IgA クラススイッチの誘導や制御性 T 細胞分化に重要と考えられている。従って、疫学的には母乳中 TGF-β 濃度と児のアレルギー発症の関係に関心が集まっている。母乳中 TGF-β 量と乳幼児のアレルギー発症には全く関係がない、あるいは母乳中 TGF-β 量が多いほどアレルギーの罹患率が高いとする報告もあるが (35, 36)、メタアナリシスの結果からは、母乳中 TGF-β 量が多いほど、それを摂取した乳幼児のアレルギー疾患発症率が減少する傾向があることが示されている (37)。動物実験でも、経口的に摂取した TGF-β が実際に乳仔消化管で作用しうること (38)、経母乳的に仔に移行する抗原と共に免疫寛容誘導に働いていること (39) などが示されており、メタアナリシスの結果を支持する報告が多い。

糖質

乳中に含まれる糖質のほとんどはラクトースであり、母乳中にはおよそ7%、牛乳中には4.5%含まれる(40)。ヒト母乳のラクトース含量は哺乳類の中で最も高いが、ヒトは乳児期に急激に脳が発達するため、脳発達に必要なガラクトースを得るためと考えられている。ラクトース以外の糖質としては、ラクトースを基本骨格とする中性オリゴ糖や、シアル酸を含む酸性オリゴ糖など、基本骨格から13のグループに分類される100種類を超えるオリゴ糖の存在が報告されている。ヒトミルクオリゴ糖(HMO)は、成熟乳中にはおよそ5~15 mg/ml、初乳中には20 mg/ml含まれており、主要なオリゴ糖は2'-フコシルラクトース、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-フコペンタオースである(40, 41)。HMOの大きな役割の一つはビフィズス菌の定着・増殖促進であるが、乳児から検出されるビフィズス菌の内、上記3種のHMOを利用できるのは*B. infantis*、*B. bifidum*だけであり、*B. breve*、*B. longum*はラクト-N-テトラオースは利用できるものの、他2種のHMOを直接は利用できない。しかし、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-フコペンタオースに含まれる糖鎖構造であるラクト-N-ビオース(LNB)は上記4菌種全て炭素源として利用することができ、このLNBこそがビフィズスフローラ形成の本体と考えられ、近年注目されている(42)。

脂質

乳中脂質の98%はトリグリセリドであり、トリアシルグリセロールに結合したラウリン酸(C12:0)やリノール酸(C18:2)はリパーゼによる分解を受けた後に抗微生物活性を示すことが知られている(43)。複合脂質の一つであるリン脂質は150~350 µg/ml含まれており、その組成はスフィンゴミエリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトールの順に多い(44)。これらは脳神経系の発達に重要な役割を果たしていると考えられている。複合脂質としては、糖脂質も母乳中には存在する。ガラクトシルセラミドなどの中性スフィンゴ糖脂質や、ガングリオシドなどの酸性スフィンゴ糖脂質がある。中性スフィンゴ糖脂質の役割は必ずしも明らかでないが、ガングリオシドについては比較的報告があり、感染防御、および認知機能発達に役割を担っていると考えられている(45)。

ヌクレオチド

ヌクレオチドは体内で合成されるため、成人にとっては必須ではないが、新生児は急速に成長するため、生体内の合成だけでは十分ではないと考えられており、実際、母乳中には核酸が0.1~0.7 mg/ml含まれている(46)。ヌクレオチドには、消化管上皮細胞の成熟促進作用(47)、マルターゼ活性促進作用(48)、感染防御作用(49)、免疫賦活作用(50)、腸内細菌叢の改善作用(51)などが知られている。

細胞

母乳中には細胞が $1 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^7/\text{ml}$ 含まれており、およそ 90% は生細胞である (52)。初乳中には白血球が多いが、血液と異なり、マクロファージと顆粒球が大半で、リンパ球は少ない。また、リンパ球の大半は T 細胞である。成熟乳では白血球は大幅に減少し、乳腺上皮細胞が増加する (52)。動物実験では、経口的に摂取された乳中免疫細胞は消化管から取り込まれ、血液を介して腸間膜リンパ節、肝臓、脾臓に移行することが示されており、感染防御に働いていると考えられている (53)。また、近年、母乳中には幹細胞が含まれていることが明らかになり、神経細胞に分化したことが報告されている (54)。母乳中の幹細胞の割合や数、役割など不明な点が多いが、今後の展開が期待される。

1-3. 母乳栄養児と人工栄養児

本章 1-1 で示したように、乳の組成は種によって異なり、ヒトの乳児にはヒト母乳が最も適した栄養と考えられるが、何らかの理由により母乳を与えることができない場合、乳児用調製乳が使用される。現在の乳児用調製乳は、栄養成分的には母乳とほぼ同等レベルに達しているが、人工栄養児の方が母乳栄養児よりも血中インスリン様成長因子-I (IGF-I) 濃度が高く過栄養気味である (55) という栄養学的な差に関する報告や、人工栄養児の方が胸腺サイズが小さい (56)、血液リンパ球中 T 細胞割合・CD4 陽性 T 細胞割合が高く、CD8 陽性 T 細胞割合・ナチュラルキラー (NK) 細胞割合が低い (57)、母乳哺育期間が長い (6 ヶ月以上) 児の方が短い (4-6 ヶ月) 児よりも肺炎罹患リスクが低い (58) など免疫学的な差に関する報告、また、人工栄養児糞便の方がビフィズス菌が少ない (59、60) など腸内細菌叢に関する差などが報告されている。

1-4. 本研究の目的

哺乳類の新生児 (仔) は、生後の一定期間、母親が分泌する「乳」のみを栄養とし発育するが、「乳」には本章 1-2 で示したように、栄養だけでなく、乳児 (仔) を感染から防御する因子や、消化管を発達させる因子なども含まれている。この「乳」の機能性に焦点を当て、「免疫賦活作用」(61, 62)「感染防御作用」(63)「血圧降下作用」(64, 65)「オピオイド作用」(66) などについて、様々な研究が行なわれてきた。その研究成果の一部は製品の形で、乳児だけでなく成人や高齢者まで広く利用されているが、LF のように、当初抗菌因子として発見された因子が、「免疫調節作用」(19, 20) や「ビフィズス菌増殖作用」(24, 25) を示すなど、乳中に存在が知られている因子の役割が全て解明されているわけではない。また、母乳とは異なる組成である牛乳を主原料とする「乳児用調製乳」は、様々な改良が重ねられた結果 (67)、少なくとも栄養学的な面では母乳と遜色のないレベルに達しているものの、本章 1-3 で示したように、母乳哺育と人工哺育では免疫能や腸内細菌叢など、未だ差がある面も存在する。これは主に母乳と調製乳の間に存在する生理活性因子の種類や量に起因すると考えられる。「腸内細菌叢」改善に対しては、主にプレバイオティクスを「乳

児用調製乳」に配合することで対応がなされているものの、必ずしも十分ではない。これは、本章 1-2 で示したように、母乳には 100 種類を超えるオリゴ糖が寄与していると考えられるが、母乳中にビフィズス菌などの菌が存在し、それらが母乳栄養児の菌叢確立に寄与しているという報告もあり (68)、海外ではプロバイオティクスを配合した乳児用調製乳も販売されている。

本研究では、「乳中に存在が知られている因子の、新規な生理作用を見出す」こと、「乳中に存在する未知の生理活性因子を見出す」ことにより、「乳児用調製乳」をより「母乳」に近づけるための基盤となる知見を得ること、プロバイオティクスの一つである *Bifidobacterium breve* M-16V を「調製乳」に利用することを念頭に、同菌株が腸内細菌叢および身体発達に与える影響を調べることを目的とした。

具体的な研究内容として、第 2 章では、食餌刺激により分泌され、消化管成熟作用が知られているホルモンの一つであるグルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) の分泌を指標に、乳由来素材の分泌刺激作用を調べ、効果が高かった素材の消化管発達に及ぼす影響を調べることを目的として、検討を行ない (69)、さらに、抗体投与により内因性 GLP-2 が成長期消化管におよぼす影響を調べた (70)。また、GLP-2 分泌能が高かった α -LA が腸炎に対して保護的に働くかどうかを検討した (71)。第 3 章では、我々がヒト母乳中に発見した (72) マイクロ RNA (miRNA) の牛乳中での存在有無を調べ、乳児消化管を想定した条件下での安定性、および工業的製造工程を経た市販製品中に含まれている量を検討した (73)。本検討から、牛乳中にも miRNA が含まれていることが明らかとなったことから、乳中 miRNA の存在は種を超えた事実であると考えられたため、今後の生体での作用を検討することを考慮し、実験動物としてよく使用されるラット乳中の miRNA 発現を調べた。また、牛乳での検討により、乳中には miRNA だけでなく mRNA も含まれていることが示されたことから、miRNA と共に mRNA の網羅的解析を行なった。乳中成分は出産後経時的に変化するが、実験動物の場合、搾乳時期も厳密に規定できるため、出産後経時的変化も合わせて検討した (74)。牛乳での検討から、乳中の RNA はエクソソームのような膜小胞に含まれると考えられたが、体液中の RNA は膜小胞以外での存在も知られている。そのため、第 3 章では、牛乳乳清から超遠心によりエクソソームを調製し、超遠心後の上清と比較することで、エクソソームまたはその他の形態で存在する miRNA・mRNA を調べた (75, 76)。さらに、今後の工業的利用を考慮すると、エクソソームとしての利用が現実的と考えられたため、牛乳から調製したエクソソームのヒト細胞への作用についても検討を行なった。第 4 章では、長年新生児集中治療室で使用され、安全性が高いプロバイオティクスの一つである *Bifidobacterium breve* M-16V (M16V) の調製乳への利用を念頭に、同菌株が菌叢や発達に及ぼす影響を検討した (77)。第 5 章では、本研究によって得られた知見を総括した。

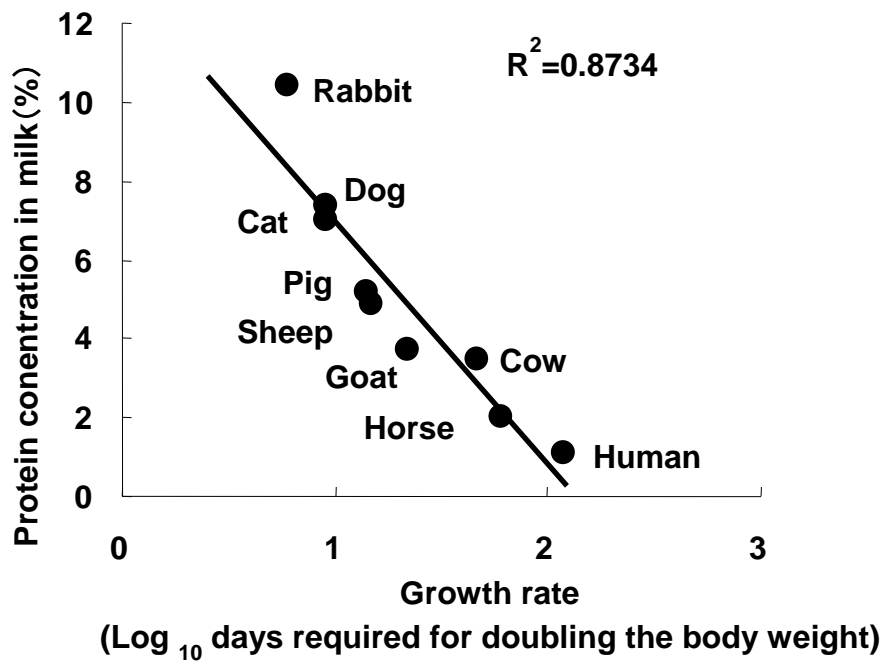


Figure 1 : Correlation between protein concentration in milk and growth rate
 (This figure was made from reference 1 and 2)

第2章 乳中既知成分の新規生理作用の探索

2-1. 乳たんぱく質による GLP-2 分泌刺激作用

2-1-1. 緒言

新生児（仔）は出生に伴い、無菌の子宮内環境から様々な細菌や抗原に暴露され、また、栄養が経口摂取へと切り替わるため、速やかな消化管の発達が求められる。上述の通り、乳中には成長因子やホルモンが含まれており、これら因子は乳児（仔）の消化管においても活性を保ったまま存在し、乳児（仔）消化管には乳中に含まれる生理活性因子に対する特異的レセプターが発現していることが知られている（6）。従って、乳中生理活性因子は乳児（仔）消化管に直接作用すると考えられるが、一方でニューロテンシン、ペプチド YY、ガストリン、コレシストキニンなど、乳児（仔）が栄養素に反応して自ら分泌し、自己に対して機能を発揮する内因性因子の存在も知られている（6）。これら内因性因子の一つに GLP-2 がある。GLP-2 は 33 残基のアミノ酸からなるペプチドホルモンであり、グリセンチン、オキシントモジュリン、グルカゴン、GLP-1 を含むプレプログルカゴンとして生成後プロセッシングを受け、摂食刺激、主に糖質・脂質の摂取により、回腸末端に多く存在する L 細胞から分泌される（78, 79）。その生理作用はクリプト細胞の増殖促進、小腸上皮細胞のアポトーシス抑制、小腸刷子縁酵素活性促進などであり、これらを通して消化管に対して機能的に働く（80, 81）。これらの作用は消化管神経細胞や消化管内分泌細胞に発現する特異的レセプターを介しての作用と考えられている（82）。新生仔動物を用いた研究では、新生仔の GLP-2 レセプター発現量および血中 GLP-2 濃度が成熟動物よりも高いこと（83）、投与した GLP-2 に対する反応性が新生仔で高いこと（84）が示されており、従って GLP-2 は新生児（仔）期の消化管発達に重要なホルモンと考えられている（85, 86）。本章では、この GLP-2 に着目し、その分泌刺激能を指標に牛乳中成分の探索を行なうとともに、新生児（仔）期、離乳期における GLP-2 の役割について検討を行なった。

2-1-2. 材料と方法

2-1-2-1. 動物

GLP-2 分泌刺激能測定試験（実験 1）、人工飼育試験（実験 2）については、総理府告示第 6 号（1980 年 3 月 27 日告示）「実験動物の飼養および保管等に関する基準」に則って行ない、離乳期ラットへの抗 GLP-2 抗体投与試験（実験 3）については、北海道大学動物実験委員会承認のもと、同大学のガイドラインに則って行なった。実験 1 については、雄性 Sprague-Dawley ラット（7 日齢）を代理母獣ラットと共に日本チャールズリバー（東京）から購入し、馴化後 14 日齢で試験に供した。実験 2 については、妊娠（初産、9 週齢）ラットを同社より購入し、出生後 7 日齢の時点で試験に供した。実験 3 については、離乳直後の雄性 Sprague-Dawley ラット（3 週齢）を日本 SLC（浜松）から購入し、試験に供した。実験 1 では代理母ラットに 10 匹の仔ラットを 1 セットとして 1 ケージ内で、実験 2 では妊娠ラットを個飼いで飼育した。飼育にはプラスチックケージを用い、 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、12 時間明暗

サイクルの SPF 環境下で飼育した。飼料 (F-2、日本農産、横浜)・水道水は自由摂取とした。実験 3 ではプラスチックケージを用いた個飼いと、 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、12 時間明暗サイクルの環境下で飼育した。飼料 (CE-2、日本クレア、東京)・水道水は自由摂取とした。

2-1-2-2. 材料

実験 1、2 で用いた乳たんぱく質濃縮物 (たんぱく質 80% <)、クリーム溶液 (g 当たり 455 mg の乳脂肪、26 mg の乳糖、16 mg の乳たんぱく質、3 mg のミネラルを含む)、カゼイン (CN) (たんぱく質 84% <)、乳清たんぱく質 (WPI) (たんぱく質 90% <) は森永乳業製のものを用いた。乳糖はナカライテスク (京都) から、オボアルブミン (OVA)、 α -CN、 β -CN、 β -ラクトグロブリン (β -LG)、ウシ血清アルブミン (BSA) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から、大豆たんぱく質 (SPI) (フジプロ CLE、たんぱく質 90% <) は不二精油株式会社 (東京) から購入した。 α -La は Sigma-Aldrich または Davisco Foods International (Prairie, MN, USA) から購入した。全ての被験物質は蒸留水に溶解、もしくは懸濁して使用した。CN 溶液作製時のみ 1 N NaOH を用いて pH を 7.0 に調整した。実験 3 で用いた抗ラット GLP-2 抗血清 (Y322) は矢内原研究所 (富士宮) より購入した。

2-1-2-3. GLP-2 分泌刺激能測定試験

乳由来三大栄養素間の比較

雄性仔ラット (14 日齢) を代理母獣ラットから離すことで 16 時間絶食させ、150 mg の乳たんぱく質濃縮物水溶液、乳糖水溶液、またはクリーム溶液 (森永乳業、東京) を、ゾンデを用いて経口投与した。投与した各試料の熱量は全て約 2.5 kJ となる。14 日齢ラットは 1 日で約 8 ml の乳を摂取するとされており (87)、ラット母乳の組成はたんぱく質 10.5%、糖質 3.7%、脂質 10.9% と報告されている (88)。従って 14 日齢での摂取熱量は 51.6 kJ と推定され、本試験で投与した各試料の熱量 2.5 kJ は、1 日摂取熱量のおよそ 1/20 にあたる。投与 15、30、60、120 分後にエーテル麻酔下で頸椎脱臼を行ない、下大静脈より採血した。得られた血液を 2,000 g、 4°C で 10 分間遠心し、血清を得た。血清は分析まで -35°C で保存した。血清中 GLP-1、GLP-2 量はエンザイムイムノアッセイキット (GLP-1: YK 160、GLP-2: YK 140 共に矢内原研究所) により測定した。

食品たんぱく質間の比較

各種たんぱく質の比較は、150 mg の CN、WPI、OVA、SPI を投与し、120 分後に乳由来三大栄養素間の比較と同様の操作を行なうことで血液を得た。対照には蒸留水を投与した。

乳たんぱく質間の比較

乳たんぱく質間の比較は、150 mg の α -CN、 β -CN、 β -LG、 α -LA (Sigma-Aldrich)、BSA を投与し、120 分後に乳由来三大栄養素間の比較と同様の操作を行なうことで血液を得た。

以下に示す α -LA 分解物間の比較についても同様に行なった。対照には蒸留水を投与した。

α -LA 分解物の作製

α -LA (Davisco Foods International) を 10% (w/v) となるように蒸留水に溶解し、1 N NaOH を用い、*Aspergillus oryzae* 由来の酵素である Protease A (アマノエンザイム、名古屋) での分解には pH 7.0 に、ブタ膵臓由来の酵素である Pancreatin F (アマノエンザイム) または、*Streptomyces griseus* 由来の酵素である Pronase (科研製薬、東京) での分解には pH 8.0 に調整した。各酵素は 10% (w/v) となるように蒸留水に溶解した。 α -LA 溶液、酵素溶液は 14,000 g、10°C で 20 分間遠心を行ない、不溶物を除いた後、0.80 μ m、0.22 μ m のフィルター濾過を行なうことで滅菌した。基質に対し 3% (w/w) となるように酵素溶液を添加し、50°C で 18 時間反応させた。反応終了は 90°C で 15 分間加熱することで行なった。得られた分解物溶液を凍結乾燥することで粉末を得た。Protease A 分解物を LAHPA、Pronase 分解物を LAHP、Pancreatin F 分解物を LAHPF とした。

α -LA 分解物の遊離アミノ酸量測定

α -LA および α -LA 分解物を 1.5 mg/l となるように蒸留水で溶解し、3 mM スルホサリチル酸で除たんぱく後、超音波処理を 5 分間行ない、0.2 μ m フィルター濾過を行なった。同サンプルをアミノ酸分析機 L-8500 (日立、東京) を用いて分析し、得られたクロマトグラムを EZChrome Elite software ver. 3. 1.7 (GL サイエンス、東京) を用いて解析した。

α -LA 分解物の分子量分布

α -LA および α -LA 分解物を 1 mg/l となるように 50 mM ギ酸、20 mM NaCl 溶液に溶解した。調製したサンプルを poly-hydroxyethyl-aspartamide ゲルを充填したカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (島津、京都) で分析した。分子量算出のための参照として、IgG (分子量 160,000、Sigma-Aldrich)、ラクトパーオキシダーゼ (LPO) (分子量 93,000、Sigma-Aldrich)、OVA (分子量 43,000、Sigma-Aldrich)、キモトリプシノーゲン (分子量 25,000、Pharmacia、Uppsala、Sweden)、リボヌクレアーゼ A (RNase A) (分子量 13,700、Pharmacia)、インスリン (分子量 5,740、和光純薬、大阪)、バシトラシン (分子量 1427、Sigma-Aldrich)、オキシトシン (分子量 1,007、Bachem Americas、CA、USA)、エンケファリナミド (分子量 588、Bachem Americas)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (分子量 362、BioProducts、Nelson、New Zealand)、L-メチオニン (分子量 149、協和発酵バイオ、東京)、L-グルタミン (分子量 146、協和発酵バイオ、東京) を用いた。得られたクロマトグラムを GPC software (島津) で分析し、分子量 200 未満、200-500、501-1000、1001-1200、1201-2000、2001-3500、3501-5000、5001-10,000、10,001-20,000、20,001 以上の 10 範囲に含まれる分解物の割合を解析した。

2-1-2-4. 人工飼育試験

人工乳の作製

人工飼育に用いる人工乳の作製は Kanno らの報告 (87) と Keen らの報告 (88) を参考に、一部改変して行なった。たんぱく質の組成をカゼイン:乳清=1:20 とし、 α -LA または LAHPA を乳清たんぱく質として用いた。作製した人工乳の組成を Fig. 2-1-1 に示す。

人工飼育

Hall らの方法 (89) を一部改変して行なった。すなわち、氷上で体温を低下させた 7 日齢の仔ラットに、内径 0.3 mm のシリコンチューブで覆ったピアノ線を口から胃まで通し、ピアノ線が胃壁に到達したことを確認後、シリコンチューブと共にピアノ線を胃壁・腹壁を貫通させた。外部に露出させたシリコンチューブの胃内側は外径を少し大きくしてあり、胃壁に空いた穴を塞ぐと共に、胃内にとどまるようにした (胃瘻)。術後の仔ラットは 39°C に設定した恒温水槽に敷き藁を入れたスチロールカップ内で飼育を開始した。胃瘻チューブは医療用ポリスチレンチューブ (PE-50、Beckton Dickinson、CA、USA) と接続し、PE-50 チューブは人工乳を入れたシリンジと接続した。シリンジに入れた人工乳は、細菌の繁殖を防ぐために 4°C に保ち、プログラム可能なシリンジポンプ (PHD 2000、Harvard Apparatus、MA、USA) を用いて 2 時間に一度、25 分かけて目的量を胃内に投与した。人工乳の投与量は日齢に 0.5 ml を乗じた量 (すなわち 7 日齢であれば 3.5 ml) とした。人工飼育は 7 日齢から 14 日齢まで行ない、その間人工乳の交換、排尿・排便を促すための綿棒を用いた刺激を 1 日 2 回行なった。14 日齢の解剖より 1 時間前に、生理食塩水に溶解した 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)、5-fluoro-2'-deoxyuridine (FrdU) (共に Sigma-Aldrich) (FrdU は BrdU 取り込み促進のため使用) をそれぞれ 15 mg/kg b.w.、1.5 mg/kg b.w. となるよう皮下投与した (90)。人工乳投与終了の 2 時間後にエーテル麻酔下で頸椎脱臼を行ない、安楽死させた。下大静脈より採血を行ない、小腸長・大腸長を測定後、回盲弁より上部 1 cm を離れた回腸 2 cm を採取し、10%ホルマリン中性緩衝液で固定化し、組織評価に供した。残った小腸から、カバーガラスを用いて優しく粘膜を剥がし、10 ml の冷 PBS (pH 7.4) に懸濁させ、分析まで -35°C で保存した。

二糖類分解酵素活性測定

マルターゼ、ラクターゼ活性の測定は、Dahlqvist の方法 (91) に一部改変を加えて行なった。すなわち、小腸粘膜ホモジネートをマルトースまたはラクトースと共に 37°C で 30 分間インキュベートし、遊離したグルコースの量をグルコーステストワコー (和光純薬) により測定した。小腸粘膜ホモジネート中のたんぱく質量を DC Protein Assay kit (Bio Rad、CA、USA) を用いて測定した。遊離のグルコース量とホモジネート中のたんぱく質量から酵素活性を求めた。

免疫組織評価

固定化後の凍結組織切片を用い、免疫組織学的評価を Ishizuka らの方法 (90) に従って行なった。すなわち、マウス抗 BrdU 抗体 (NA-20、Calbiochem、Darmstadt、Germany)、ビオチン化ウサギ抗マウス IgG+A+M (H+L) (Zymed Laboratories、CA、USA) をそれぞれ 1 次抗体、2 次抗体とし、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合のストレプトアビジン (Zymed Laboratories) に浸漬し、シグナルを増強し、3,3'-diaminobenzidine で固定化した。顕微鏡下で複数の位置に存在する各 50 クリプトの、底部から上部に向かって 20 細胞を観察してスコア化した (92)。クリプト細胞数、BrdU 取り込み細胞数を計測し、取り込み細胞の割合を求めた。

2-1-2-5. 離乳期ラットに対する内因性 GLP-2 阻害試験

抗 GLP-2 血清投与

抗ラット GLP-2 血清 Y322 (以下 α GLP-2) は硫酸アンモニウム沈殿による精製を行なった後 PBS に再溶解したものを使用した。2 日に一回 1 mg/kg b.w.となるように試験群には α GLP-2 を、対照群にはウサギ血清 (NRS) を投与し、最初の投与から 13 日後 (5 週齢時点) に解剖を行なった。解剖 1 時間前に生理食塩水に溶解した BrdU、FrdU をそれぞれ 15 mg/kg b.w.、1.5 mg/kg b.w.となるよう皮下投与した。エーテル麻酔下で頸椎脱臼を行ない安楽死させ、小腸・盲腸・直腸結腸の評価を行なった。小腸は均等に 4 等分し、上部より十二指腸・空腸・近位回腸・遠位回腸とし、「2-1-2-4. 人工飼育試験 免疫組織評価」と同様の方法で BrdU 取り込み細胞の割合を求めた。

2-1-2-6. 統計解析

乳由来三大栄養素間の経時変化では、スタート時 (0 時間) に対する差を Dunnett's test を用い、各時間の三大栄養素間の比較は Tukey-Kramer honestly significant difference (HSD) test を用いて統計解析を行なった。その他の試験では、多群間の比較には Tukey-Kramer HSD test を、2 群間の比較には Student's *t*-test を用いた。有意水準は $P < 0.05$ とし、JMP software ver. 5.1 (SAS Institute、NC、USA) により行なった。

2-1-3. 結果

2-1-3-1. GLP-2 分泌刺激能測定試験

乳由来三大栄養素間の比較

乳仔期ラットに対する乳由来三大栄養素投与による GLP-1, 2 分泌刺激作用を経時的に調べたところ、GLP-1 については、乳糖投与群でのみ投与 15、60 分後に増加は小さいものの有意な GLP-1 上昇が認められたが、乳たんぱく質、クリーム投与群ではいずれの時間においても上昇は認められなかった (Fig. 2-1-1A)。一方で、GLP-2 については、乳糖投与群で投与 15、30、60 分後に、乳たんぱく質、クリーム投与群では 15-120 分後のいずれの時間に

においても GLP-2 濃度上昇が認められた。各時間における乳由来三大栄養素間比較を行なった結果、投与 60、120 分後において、乳たんぱく質投与群が他の 2 群と比較し、有意に高い GLP-2 分泌を示した (Fig. 2-1-1B)。乳たんぱく質投与では 120 分後に血中 GLP-2 のピークが認められたことから、これ以降のたんぱく質間の比較実験は、投与 120 分後に採血することとした。また、データは示していないが、投与 240 分後では血中 GLP-2 が 120 分後と比較して低下することを確認している。

食品たんぱく質間の比較

乳由来三大栄養素間の比較では、乳たんぱく質に最も GLP-2 分泌刺激作用が認められたため、各種食品たんぱく質の GLP-2 分泌刺激作用を比較した。乳たんぱく質はカゼインと乳清たんぱく質に大別できるため、各々の GLP-2 分泌刺激作用を比較した。その結果、OVA、SPI には GLP-2 分泌刺激作用は認められず、CN、WPI に GLP-2 分泌刺激作用が認められた (Fig. 2-1-2)。

乳たんぱく質間の比較

カゼイン、乳清たんぱく質はさらにいくつかのたんぱく質に分けることができる。そのため、カゼインに含まれる α -CN、 β -CN、乳清たんぱく質に含まれる β -LG、 α -LA、BSA を投与し、比較を行なった。その結果、BSA 以外のたんぱく質に GLP-2 分泌刺激作用が認められ、中でも α -CN、 β -LG、 α -LA に高い効果があると考えられた (Fig. 2-1-3)。

α -LA 分解物間の比較

GLP-2 分泌刺激作用の高かった 3 種の乳たんぱく質の中で、 α -LA はヒト母乳中に最も豊富に含まれているたんぱく質である。この α -LA を選択し、GLP-2 分泌にはインタクトな状態が必要なのか、分解してもその作用は残っているのかを調べるため、各種酵素分解物を作製し、各々の GLP-2 分泌刺激作用を調べた。その結果、分解しても GLP-2 分泌刺激作用は失われず、また、インタクトな α -LA よりもその効果が強いものが認められた (LAHPA) (Fig. 2-1-4)。

α -LA 分解物の特徴

α -LA および α -LA 分解物の GLP-2 分泌刺激作用の差は遊離のアミノ酸量や分子量分布に起因している可能性を考え、各々の遊離アミノ酸および分子量分布を測定したが、分解物間では遊離アミノ酸量、分子量分布共に大きな差は認められなかった (Table 2-1-2、Table 2-1-3)。

LAHPA 投与後の血中 GLP-1, 2 経時変化

α -LA や他の α -LA 分解物よりも GLP-2 分泌刺激作用の高かった LAHPA であるが、分解

したことにより、投与後の血中 GLP-2 濃度ピークがたんぱく質投与後とは異なっている可能性があるため、投与後経時変化を調べた。その結果、投与 30-120 分後で GLP-2 分泌上昇が認められ、120 分後に最も高いという、乳たんぱく質投与時と同様の結果であった。GLP-1 については、乳たんぱく質投与時同様分泌刺激作用は認められなかった (Fig. 2-1-5)。

2-1-3-2. 人工飼育試験

GLP-2 分泌刺激作用の差が実際に消化管発達に及ぼす影響を調べるため、アミノ酸組成が基本的に同じであり、GLP-2 分泌刺激作用が異なる α -LA と LAHPA を主なたんぱく質源とした人工乳で飼育したラットの消化管を比較した (Table 2-1-4)。その結果、LAHPA 乳投与群 (LAHPA 群) では α -LA 乳投与群 (α -LA 群) と比較し、有意な小腸長の増加、ラクターゼ活性の低下、クリプトの細胞数増加、血中 GLP-2 濃度の増加が認められた。マルターゼ活性は増加する傾向 ($P = 0.078$) が認められ、結果、小腸成熟の指標となるマルターゼ/ラクターゼ比 (93, 94) が有意に高かった。大腸長には有意な差は認められなかった。BrdU 陽性細胞割合の解析の結果、LAHPA 群小腸では、 α -LA 群と比較し、細胞分裂が盛んに起こっている傾向が認められたものの、有意な差は無かった (Fig. 2-1-6)。しかし、大腸ではクリプト基底部分を cell position 1 とした場合、position 7-9 で有意な BrdU 取り込み増加が認められた (Fig. 2-1-7)。

2-1-3-3. 離乳期ラットに対する内因性 GLP-2 阻害試験

離乳期の内因性 GLP-2 の役割を調べるため、離乳直後のラットに抗 GLP-2 血清を 2 日に 1 回 2 週間投与し、消化管に対する影響を調べた。その結果、抗 GLP-2 血清投与群では小腸長が短くなり (Table 2-1-5)、遠位回腸の BrdU 取り込み細胞割合が低下していることが示された (Fig. 2-1-8)。体重、消化管重量および直腸長に有意な差は認められなかった。

2-1-4. 考察

GLP-2 は消化管上皮細胞の増殖促進作用などを示すホルモンの一つであり、経口摂取した栄養素により消化管内分泌細胞の一つである L 細胞より分泌されることが知られている (80, 81)。さらに、外的に投与された GLP-2 が消化管成熟を促進すること (95) や、新生児 (仔) の GLP-2R 発現・循環 GLP-2 量が増強されていること (83)、生後一時的に GLP-2 に対する反応性が増強されていること (84) が報告されている。従って、乳児 (仔) にとって唯一の栄養源である乳中には、本ホルモンの分泌を促進する因子があったとしても不思議ではないと考え、本項では乳仔期ラットを用い、乳中因子の GLP-2 分泌刺激作用を評価した。ちなみに乳中に GLP-2 の存在は確認されておらず、データは示していないものの、予備検討を行なった結果、乳中 GLP-2 は検出限界以下であったことを確認しており、測定した血中 GLP-2 は乳由来ではない。

GLP-2 分泌刺激は、消化管内分泌細胞や神経細胞に対する間接的な刺激や、食物による L

細胞への直接的な刺激が考えられている (79) が、栄養素摂取が GLP-2 分泌に与える影響に関する研究はあまり無い。ただし、ヒト成人を対象とした研究において、炭水化物と脂質に GLP-2 分泌刺激作用があり、たんぱく質には無いとする報告 (78) や、成獣ラットを用い、短鎖脂肪酸にその作用があるとする報告 (96)、ストレプトゾトシン誘導性の糖尿病モデルラットでは食物繊維により GLP-2 分泌が促進されたという報告がある (97) もの、たんぱく質に GLP-2 分泌刺激作用があるとする報告は無く、本章で示した我々の知見は初めてのものである。

GLP-2 とは対照的に、GLP-1 については栄養素摂取による分泌について多くの報告がある。胎仔ラットの消化管細胞、成獣ラットを用いた検討では、オレイン酸に GLP-1 分泌刺激作用があるとする報告があり (98, 99)、健康なヒトを対象とした研究では、オレイン酸 (100) に、2 型糖尿病患者を対象とした研究では、オリーブ油とバター（共にオレイン酸が比較的多い）(101) に GLP-1 とグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド分泌刺激作用が報告されている。これら食餌と GLP-1 分泌に関する研究から、L 細胞や K 細胞の刺激メカニズムはヒトとラットで共通している可能性が高いことが示唆されるが、乳脂肪にはオレイン酸が比較的多く含まれている (102) にも関わらず、乳仔期ラットに対する乳由来三大栄養素の GLP-1 分泌刺激試験では、ラクトースにわずかに分泌刺激作用が認められただけであり、クリーム、乳たんぱく質には認められなかった。また、乳脂肪には短鎖脂肪酸も比較的多く含まれており (102)、上述のヒト成人を対象とした Xiao ら (78) の報告でも、クリームに GLP-2 分泌刺激作用があり、乳清たんぱく質にはないとされているが、乳清たんぱく質には、GLP-1 分泌を刺激するという報告 (100) がある。乳仔期ラットに対する乳由来三大栄養素の GLP-2 分泌刺激試験では、各々にそれぞれ分泌刺激作用が認められたものの、その作用は乳たんぱく質が最も高かった。これらのことを考慮すると、GLP-1 と GLP-2 は一つのプログルカゴンから作られるものの、その分泌は必ずしもパラレルではなく、食餌による各々の分泌はライフステージに依存しているのかもしれない。

乳仔期ラットに対する乳由来三大栄養素による GLP-2 分泌刺激試験の結果、乳たんぱく質に最も効果が高かったことから、最も GLP-2 分泌を刺激するたんぱく質の探索を行なった。乳以外の食品たんぱく質（鶏卵由来 OVA、大豆由来 SPI）には GLP-2 分泌刺激作用は無く、乳たんぱく質間の比較では、乳中に微量にしか存在しない BSA 以外の、豊富に含まれる各乳たんぱく質に GLP-2 分泌刺激作用が強かった。以上の結果は、新生児（仔）期における乳たんぱく質の重要性を示唆する。

次に、新生児（期）における乳たんぱく質による GLP-2 分泌刺激に関し、乳たんぱく質のインタクトな状態が重要かを調べるため、 α -LA を選択し、各種酵素を用いて分解物を 3 種作製し、GLP-2 分泌刺激作用に与える影響を調べた。その結果、分解による GLP-2 分泌刺激作用低下は認められず、むしろその効果が増強されるものがあつた。Stoll ら (103) は、ブタを用いた検討で、遊離アミノ酸・グルコース・脂質で構成されるエレメンタリーフォーミュラは、たんぱく質・乳糖・脂質で構成される牛乳ベースフォーミュラよりも GLP-2

量を増加させると報告している。このことが示唆するのは、遊離アミノ酸や高度分解ペプチドが、未消化たんぱく質よりも GLP-2 分泌を増強する可能性であるが、作製した 3 種ペプチドの遊離アミノ酸量・分子量分布に大きな違いは認められなかった。また、最も効果の高かった LAHPA の GLP-2 分泌刺激作用は、未分解 α -LA のおよそ 2 倍であったが、投与後血中 GLP-2 経時変化は、乳たんぱく質投与時と同様のパターンを示した。これらのことが示唆するのは、LAHPA 中に生成された特定のペプチド配列が、GLP-2 分泌を刺激する可能性や、GLP-2 を不活性化する酵素であるジペプチジルペプチダーゼ-IV (DPP-IV) を阻害する可能性、あるいは両者が起こっている可能性である。実際、Gunnarsson ら (104) は乳清たんぱく質が小腸上部で DPP-IV 活性を阻害していることを報告しており、乳清たんぱく質の一つである α -LA に DPP-IV 阻害配列があり、ペプチド調製の過程で半減期の長い DPP-IV 阻害ペプチドが生成されたとしても不思議ではない。さらに、GLP-2 には粘膜バリアの促進や、粘膜透過性の抑制作用が知られている (105) が、Arvola らは、新生仔ラットを用いた研究で、乳清たんぱく質分解物は消化管透過性を母乳栄養群と同程度まで低下させると報告している (106)。この乳清たんぱく質分解物による消化管透過性抑制の一部は、DPP-IV 阻害や GLP-2 分泌が寄与しているのかもしれない。

新生児 (仔) 期に乳たんぱく質が GLP-2 分泌を刺激することを示したが、GLP-2 分泌刺激作用の差が実際に消化管の発達に寄与するか否かは明らかでない。そこで、基本的にアミノ酸組成が同じであり、GLP-2 分泌刺激作用に差がある α -LA と LAHPA を主要たんぱく質源とした人工乳を作製し、乳仔期ラットを人工飼育することで、GLP-2 分泌刺激作用の差が消化管発達に及ぼす影響を調べた。その結果、GLP-2 分泌刺激作用が強い LAHPA を主なたんぱく質源とした人工乳で飼育された群 (LAHPA 群) では、 α -LA を主なたんぱく質源とした人工乳 (α -LA 群) と比較し、回腸クリプトの細胞数、小腸長が増加し、小腸粘膜成熟の指標となるマルターゼ/ラクターゼ比 (93, 94) の増加が認められた。離乳期に抗 GLP-2 血清を投与した検討では、特に遠位回腸の BrdU 取り込みに抗 GLP-2 血清の影響が認められた。また、小腸長の減少も認められたが、これは、抗 GLP-2 血清投与により内因性 GLP-2 の作用が抑制され、細胞分裂が不活発になった結果を反映したと考えられる。実際、遠位回腸には GLP-2 を分泌する L 細胞が多く存在する。通常、GLP-2 は DPP-IV で不活性化されるが、血中 GLP-2 の半減期はおよそ 7 分以内と、極めて短く見積もられている (107)。また、L 細胞は大腸にも存在し、実際 GLP-2 が大腸炎に対して有効であったという報告もある (108) ことから、GLP-2 は遠位回腸～大腸付近で主にその作用を発揮するのかもしれない。乳仔期ラットを用いた人工飼育試験では、長さに差のあった小腸において、LAHPA 群で BrdU 取り込み割合が高い傾向を認めたものの、有意な差は認められず、長さには差の無かった大腸で有意な差が認められた。各種臓器や場所により GLP-2 の作用が現れるのに時間差がある可能性も考えられる。

2-1-5. 小括

本章では、消化管成熟作用を示すホルモンの一つである GLP-2 の分泌刺激作用を指標とし、乳由来成分のスクリーニングを行ない、GLP-2 分泌刺激作用が強い成分が、乳仔期消化管発達に及ぼす影響を検討した。

まず始めに、乳仔期ラットを用い、乳由来三大栄養素の GLP-2 分泌刺激作用を調べたところ、ヒト成人や成熟動物で知られている結果とは異なり、たんぱく質が最も高い効果を示すことを見出した。他の食品たんぱく質と比較したところ、鶏卵由来 OVA、大豆由来 SPI には GLP-2 分泌刺激作用はなく、乳たんぱく質の CN と WPI には共に分泌刺激作用が認められた。カゼイン、乳清たんぱく質はさらにいくつかのたんぱく質に分類可能なことから、乳中に含まれるたんぱく質 5 種について調べたところ、乳中には微量しか含まれない BSA 以外の 4 種に GLP-2 分泌刺激作用が認められた。次に、GLP-2 分泌には乳たんぱく質のインタクトな状態が必要なのか、分解してもその作用は残っているのかを調べるため、 α -LA の各種酵素分解物を作製し、GLP-2 分泌刺激作用を調べたが、分解しても GLP-2 分泌刺激作用は失われず、未分解の α -LA よりも効果が高いものがあることを見出した。未分解 α -LA と GLP-2 分泌刺激作用の強い α -LA 分解物 (LAHPA) は基本的に同じアミノ酸組成であり、それぞれをたんぱく質源として含む人工乳で一定期間飼育し、GLP-2 分泌刺激作用の差が消化管発達に及ぼす影響を評価した。その結果、LAHPA 乳群で小腸長、クリプト細胞数の増加がみられるなど、GLP-2 分泌刺激作用の差を反映した結果であることが示された。最後に、離乳期ラットに対し抗 GLP-2 抗体を投与することで、成長期における内因性 GLP-2 の作用を調べ、GLP-2 は特に遠位回腸に作用していることを明らかとした。

以上のように、これまで知られていなかった、乳たんぱく質による乳児（仔）期 GLP-2 分泌刺激作用を明らかにすると共に、GLP-2 分泌刺激効果の高い素材が消化管発達に寄与しうること、GLP-2 の作用は遠位回腸を中心としていることを示すことができたと考える。

Table 2-1-1 : Composition of the milk formulae for rearing of rat pups

	<i>g/L</i>
Protein	84
α -LA or LAHPA	80
Casein	4
Fat ¹	103
Lactose	30
Mineral mixture ²	10
Vitamin mixture ²	5
Energy content ³ (<i>kJ/L</i>)	5750

¹ Fat contains 30% palm oil, 25% coconut oil, 20% soybean oil, 15% medium chain triglycerides oil, 10% corn oil, and 0.33% cholesterol.

² AIN-93G (109)

³ The energy values for each formula were calculated from the macronutrient composition using 17 kJ/g for protein, 17 kJ/g for carbohydrate, and 37 kJ/g for fat.

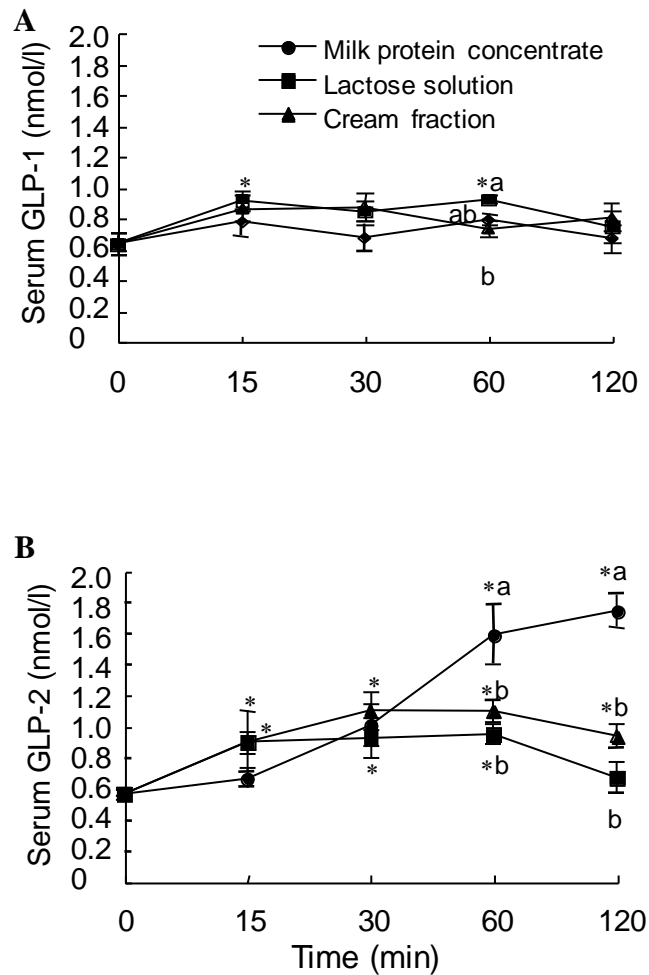


Figure 2-1-1 : Changes in serum GLP-1 (A) and GLP-2 (B) levels in neonatal rats in response to gastric infusion of milk protein concentrate (circles), lactose solution (squares), or cream fraction (triangles). Values are shown as the mean \pm SEM. *, †, ‡ show significant differences from time zero for each treatment ($n = 4$, $P < 0.05$, Dunnett's test.). Values not sharing the same letter are significantly different at each time point ($n = 4$, $P < 0.05$, the Tukey–Kramer HSD test.).

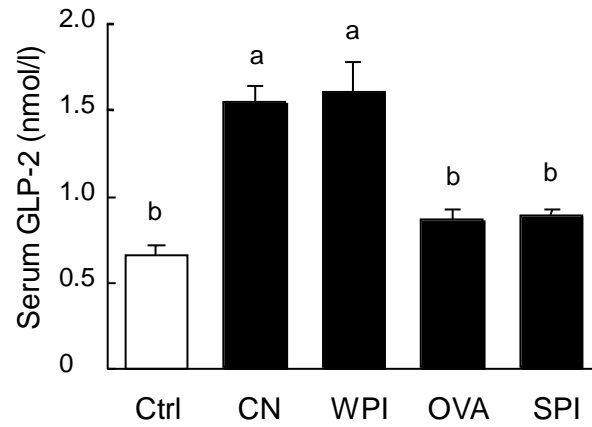


Figure 2-1-2 : Serum GLP-2 concentration at 120 min after intra-gastric administration of various food proteins in neonatal rats. Values are shown as the mean \pm SEM. Values not sharing the same letter are significantly different ($n = 5$, $P < 0.05$, the Tukey–Kramer HSD test.).

Ctrl, Control; CN, casein; WPI, whey protein isolate; OVA, ovalbumin; SPI, soy protein isolate

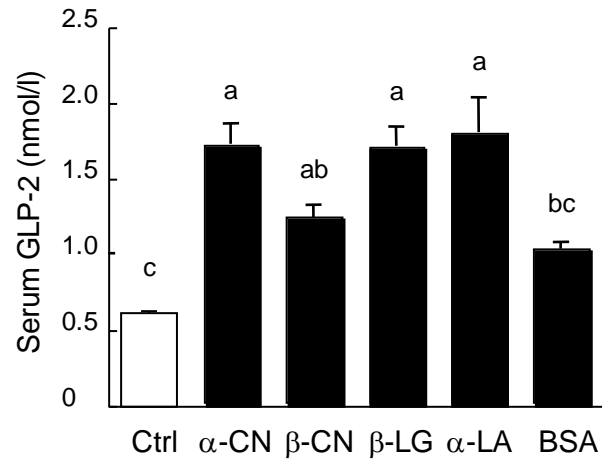


Figure 2-1-3 : Serum GLP-2 concentration at 120 min after intra-gastric administration of milk proteins in neonatal rats. Values are shown as the mean \pm SEM. Values not sharing the same letter are significantly different ($n = 5$, $P < 0.05$, the Tukey–Kramer HSD test.).

Ctrl, control; α -CN, α -casein; β -CN, β -casein; β -LG, β -lactoglobulin; α -LA, α -lactalbumin; BSA, bovine serum albumin

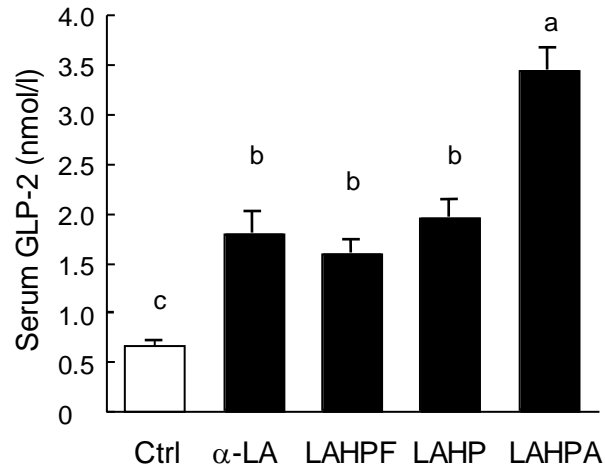


Figure 2-1-4 : Serum GLP-2 concentration at 120 min after intra-gastric administration of α -La hydrolysates in neonatal rats. Values are shown as the mean \pm SEM. Values not sharing the same letter are significantly different ($n = 5$, $P < 0.05$, the Tukey–Kramer HSD test.).

Ctrl, Control; α -LA, α -lactalbumin; LAHPF, α -lactalbumin hydrolysate digested by Pancreatin F; LAHP, α -lactalbumin hydrolysate digested by Pronase; LAHPA, α -lactalbumin hydrolysate digested by Protease A

Table 2-1-2 : Free amino acid concentrations in α -LA and its hydrolysates

Amino acid	α -LA	LAHPF	LAHP	LAHPA
			<i>mg/g</i>	
Asp	n.d. ¹	5.4	4.5	5.6
Thr	n.d.	15.3	12.5	13.5
Ser	n.d.	2.7	5.0	2.4
Asn	n.d.	2.2	4.9	13.9
Glu	n.d.	11.3	11.7	8.3
Gln	n.d.	10.9	15.1	3.9
Pro	n.d.	3.0	6.2	8.6
Gly	n.d.	2.2	1.8	2.1
Ala	n.d.	4.5	6.1	7.0
Val	n.d.	17.3	14.4	17.5
Cys	n.d.	7.1	2.9	5.4
Met	n.d.	5.2	9.5	7.2
Ile	n.d.	24.1	25.6	31.4
Leu	n.d.	43.7	78.2	66.7
Tyr	n.d.	36.6	20.5	10.7
Phe	n.d.	36.1	33.6	34.8
Trp	n.d.	26.0	23.3	23.7
Lys	n.d.	85.2	16.3	36.6
His	n.d.	9.4	5.3	13.7
Arg	n.d.	12.0	3.0	6.9
Total	0.0	360.2	300.4	319.9

¹ n.d., not detected.

Table 2-1-3 : Molecular size distributions of α -LA and its hydrolysates

	α -LA	LAHPF	LAHP	LAHPA
Molecular wt			%	
<200	0.00	37.02	34.45	35.39
201-500	0.00	37.25	36.65	35.75
501-1000	0.00	19.89	14.59	14.50
1001-1200	0.00	2.01	3.39	2.75
1201-2000	0.00	2.93	7.27	6.59
2001-3500	0.00	0.89	3.16	4.36
3501-5000	0.00	0.00	0.39	0.60
5001-10000	1.72	0.00	0.10	0.07
10001-20000	80.44	0.00	0.00	0.00
>20000	17.85	0.00	0.00	0.00
Mn ¹	14233	239	254	255
Mw ²	17199	396	525	545

¹ Mn, number-average molecular weight.

² Mw, shows the weight-average molecular weight.

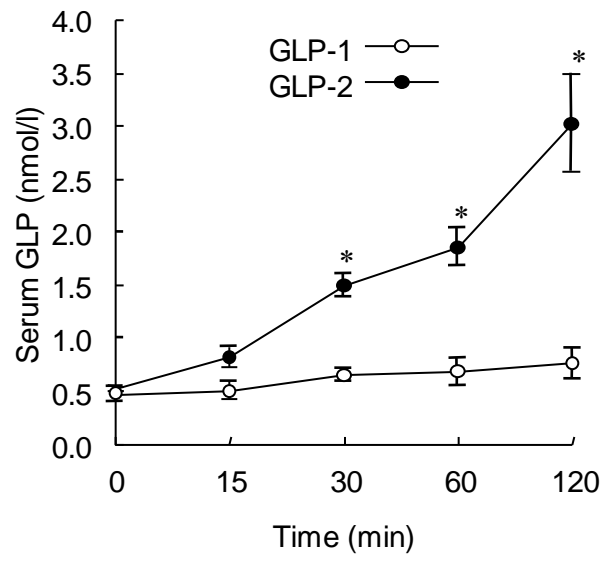


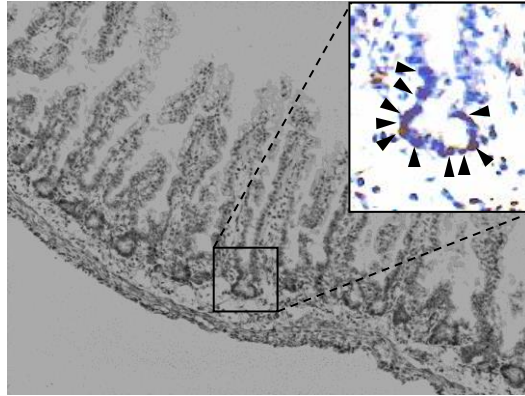
Figure 2-1-5 : Changes in serum GLP-1 (open circles) and GLP-2 (closed circles) levels in neonatal rats in response to gastric infusion of LAHPA. Values are shown as the mean \pm SEM. * Significant difference from time zero (n = 4 – 5, $P < 0.05$, Dunnett's test.).

Table 2-1-4 : Final body weight, intestinal length, maltase/lactase activity ratio, serum GLP-2 concentration, and small bowel crypt epithelial cell number in rats administered milk formula containing α -LA or LAHPA for 7 d ¹

	α -LA	LAHPA
Final body weight, g	20.3 \pm 1.4	20.0 \pm 0.4
Small intestinal length, cm	36.6 \pm 2.7	45.0 \pm 1.7*
Colon length, cm	3.9 \pm 0.3	4.3 \pm 0.3
Maltase activity, μ mol/(g protein•min)	210.1 \pm 43.7	381.1 \pm 64.8
Lactase activity, μ mol/(g protein•min)	54.9 \pm 5.9	30.8 \pm 4.2*
Maltase/lactase activity ratio	3.7 \pm 0.5	13.3 \pm 2.4*
Serum GLP-2, nmol/l	0.59 \pm 0.14	1.16 \pm 0.09*
Epithelial cells, n/half crypt section	13.4 \pm 0.7	17.5 \pm 1.1*

¹ Values are expressed as the mean \pm SEM, n = 4–5. *Different from α -LA, $P < 0.05$. Student's t -test.

A



B

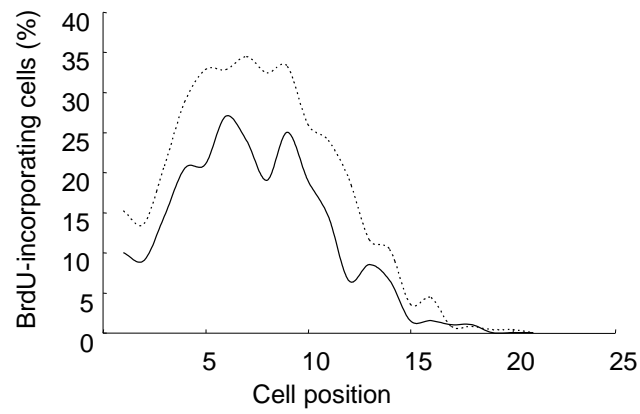


Figure 2-1-6 : (A) Immunohistochemistry showing BrdU incorporation in the small intestine of formula-fed rats. (B) Distribution of the BrdU-incorporating epithelial cells in the crypts of rats administered formula containing α -LA (solid line) or LAHPA (dotted line) for seven days.

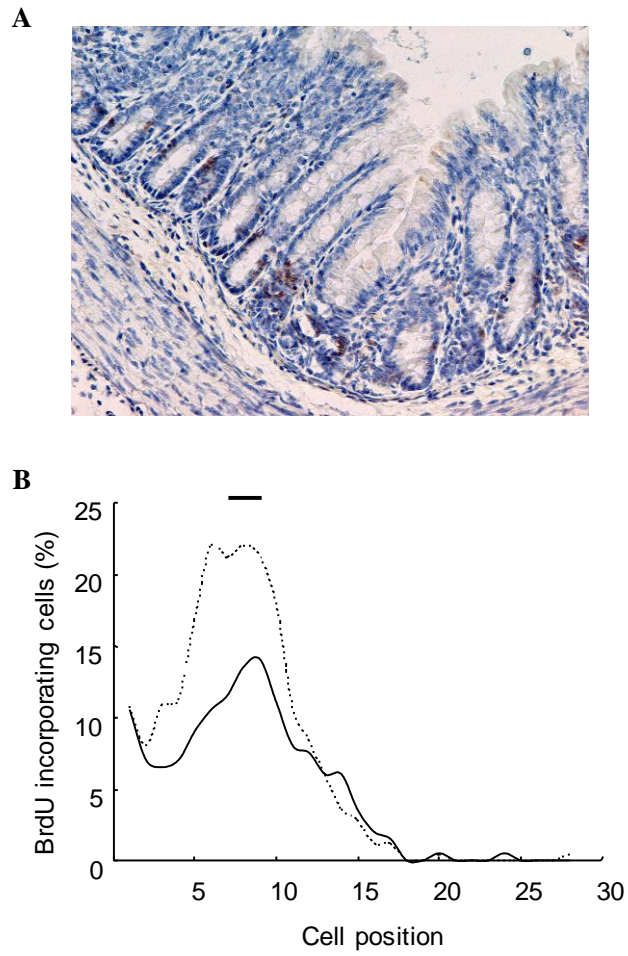


Figure 2-1-7 : (A) Immunohistochemistry showing BrdU incorporation in the large intestine of formula-fed rats. (B) Distribution of the BrdU-incorporating epithelial cells in the crypts of rats administered formula containing α -LA (solid line) or LAHPA (dotted line) for seven days.

Table 2-1-5 : Effects of α GLP-2 or NRS on intestinal growth in weanling rats ¹

	NRS	α GLP-2
Body weight gain (g)	117.7 \pm 3.5	109.9 \pm 7.4
Organ weight (g)		
Small intestine	6.87 \pm 0.23	6.37 \pm 0.40
Cecum	1.00 \pm 0.03	0.92 \pm 0.07
Colon	1.36 \pm 0.06	1.14 \pm 0.11
Organ length (cm)		
Small intestine	97.1 \pm 1.9	91.2 \pm 1.7*
Colon	16.4 \pm 0.5	15.5 \pm 0.5

¹ Values are expressed as the mean \pm SEM (n = 6).

² Asterisk shows a significant difference from the normal serum-treated group ($P < 0.05$, Student's *t*-test.).

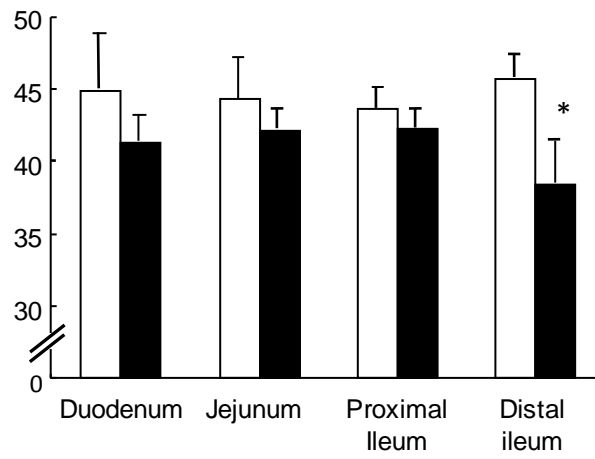


Figure 2-8 : BrdU incorporation by epithelial cells in the small intestine of weanling rats administered either α GLP-2 (solid bars) or NRS (open bars) for 13 days. Values are the mean \pm SEM.
 * Significant difference between the groups (n = 6, $P < 0.05$, Student's *t*-test.).

2-2. α -LA による腸炎抑制作用

2-2-1. 緒言

炎症性腸疾患 (IBD) は、狭義には潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) に分けられる。動物モデルなどを用いた精力的な研究により多くのことが分かっているが、その発症原因については未だ明らかでない部分が多い (110)。欧米に比べると患者数は少ないものの、わが国においても増加し、患者数は 10 万人に達している。IBD を発症した患者の約 20% 程度は学童期・青年期に発症しており、若年における IBD はその後の成長障害を引き起こすため、小児 IBD においては栄養療法が重要であると考えられている (111)。しかし、各種動物モデルを用いた検討の多くは成獣動物を用いたものであり、若齢動物を用いた検討は少ない。

動物モデルを用いた食品成分の検討では、IBD 患者の腸内細菌叢が悪化していること、無菌動物では腸炎を発症しないことなどから、プロバイオティクスやプレバイオティクスを用い、腸内細菌叢改善を目的とした検討が多くを占めるが (112)、グルタチオンやポリフェノールのような抗酸化物質 (113)、LF (114)、LPO (115)、グリコマクロペプチド (GMP) (116) といった乳たんぱく質を用いた検討も存在する。我々は、牛乳中に比較的多く存在し、ヒト母乳中では最も含量が多く、胃粘膜保護作用 (13) やロタウイルス感染による下痢発症の抑制作用 (117) が知られており、2-1 で示した通り消化管成熟ホルモン GLP-2 分泌刺激作用を示す α -LA に腸炎抑制作用があるのではないかと考え、UC モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導大腸炎モデルを、離乳直後のラットに用いて α -LA の腸炎抑制作用を検討した。

2-2-2. 材料と方法

2-2-2-1. 動物

動物実験は、総理府告示第 6 号 (1980 年 3 月 27 日告示) 「実験動物の飼養および保管等に関する基準」に則って行なった。20 日齢で離乳させた雄性 F344/N ラットを日本 SLC (浜松) から 21 日齢で購入し、4 日間予備飼育を行なった後、実験に供した。飼育にはプラスチックケージを用い、 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、12 時間明暗サイクルの SPF 環境下で飼育した。飼料 (F-2) ・水道水は自由摂取とした。

2-2-2-2. 材料

α -LA (純度 97%) は Davisco Foods International から購入し、DSS (分子量 36,000~50,000) は MP Biomedicals (Santa Ana, CA, USA) から購入した。

2-2-2-3. 方法

DSS 投与 3 日前にあたる 25 日齢より試験終了前日まで、精製水、または精製水に溶解した α -LA を 300 mg/kg b.w. となるように毎日 (16 時~18 時の間) ゾンデで投与した。28 日齢

から滅菌水または滅菌水に 2%濃度で溶解した DSS 水溶液を自由摂取させた。つまり群構成は 4 群とし、1. 滅菌水自由摂取-精製水投与群 (Ctrl 群, n = 8)、2. 滅菌水自由摂取- α -LA 投与群 (α -LA 群, n = 8)、3. 2% DSS 自由摂取-精製水投与群 (DSS 群, n = 12)、4. 2% DSS 自由摂取- α -LA 投与群 (DSS + α -LA 群, n = 12) とした。滅菌水および DSS 水溶液は 2 日に一度交換を行なった。DSS 投与開始日を 0 日目とし、DSS 投与 7 日目にあたる日齢 35 に解剖を行ない、臓器サンプル、血液サンプルを得た。また、この間、便による炎症評価を毎日行なった。

便による炎症評価

炎症活動指数 (DAI)は、Fitzpatrick らの報告 (118) に従い、Table 2-2-1 に基づいて判定を行なった。便の潜血判定は、便潜血キット (塩野義, 大阪) を用いた。

血漿中サイトカインおよびホルモン濃度測定

血漿中 IL-6、IGF-I、レプチン濃度は、市販のサンドウィッチ ELISA 測定キット (IL-6, IGF-I: R&D Systems, レプチン: 森永生科研) を用いて測定した。

制御性 T 細胞解析

末梢血および脾臓より調製した白血球における制御性 T 細胞の割合をフローサイトメーターにより解析した。以下の抗体、試薬、機器を用いた。FITC-CD4 (Clone: OX-35)、PE-CD25 (Clone: OX-39) (共に BD Biosciences, CA, USA)、APC-Foxp3 (Clone: FJK-16s)、Foxp3 staining buffer set (共に e-Bioscience, CA, USA)、BD FACS Canto (BD Biosciences)。

定量 PCR 解析

大腸組織より TRIzol (Invitrogen) を用いて総 RNA を抽出し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて精製した。得られた RNA は、NanoDrop (Thermo), Experion (Bio Rad)で濃度・品質を確認し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 以下 ABI) を用いて逆転写を行なった。得られた cDNA 溶液を用い、各 mRNA に対する TaqMan Probe (ABI)を用い、7500 Fast Real Time PCR System (ABI)により RT-PCR を行なった。 β -アクチン発現量で標準化を行ない、Ctrl 群の発現量を 1 とし、相対量で評価した。

2-2-2-4. 統計解析

本試験デザインの場合、2 way-ANOVA を用いた解析が考えられるが、探索的検討であることから、統計的有意差の検定には、Kruskal-Wallis 検定を用いた。有意水準は $P < 0.05$ とし、JMP software ver. 5.1 により行なった。

2-2-3. 結果

2-2-3-1. α -LA による腸炎抑制効果

DAI による炎症度の評価の結果、炎症誘導 2 日目から 7 日目まで α -LA 投与により、有意に炎症スコアが抑制された (Fig. 2-2-1)。また、DSS 群は Ctrl 群に比べて、体重増加量の減少、脾臓の委縮、大腸の肥厚化が認められたが、 α -LA 投与によりいずれも有意に改善した (Fig. 2-2-2)。総摂餌量に差は見られなかった (データは示していない)。さらに、DSS 群は炎症の指標となる血中 IL-6 が増加したが、 α -LA 投与により抑制され、栄養状態の指標となる血中 IGF-I、レプチンは腸炎誘導により減少したが、 α -LA 投与により減少が抑制された (Fig. 2-2-3)。

2-2-3-2. 腸炎が血液系に及ぼす影響

腸炎の誘導による消化管出血により、DSS 群は赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリットが減少したが、 α -LA 投与により有意に改善した (Fig. 2-2-4)。

腸炎の発症抑制には制御性 T 細胞 (Treg) の関与が考えられており (119)、乳たんぱく質による腸炎の抑制効果に関し、Treg を増加させることによる防御効果を示唆する報告 (115, 120) があるため、血中および脾臓中 Treg 割合を調べた。DSS 群は血中 CD4⁺細胞における CD25⁺Foxp3⁺Treg の割合が減少したが、脾臓では同様の事象は認められなかった。しかし、非炎症群間 (Ctrl 群 vs. α -LA 群) の比較において、脾臓 CD4⁺細胞における CD25⁺Foxp3⁺Treg 割合の増加が見られた (Fig. 2-2-5)。

2-2-3-3. 腸炎が大腸ムチン発現量に及ぼす影響

消化管は厚い粘膜層に覆われており、管腔内に存在する細菌などから防御されているが、IBD 患者ではこの粘膜層に傷害が見られることが報告されている。粘膜層を成す主要たんぱく質はムチンであり、大腸で発現し、腸炎により変化が知られているムチン 2, 3, 4 (Muc 2, 3, 4) (121) の発現量を調べた。いずれの Muc 発現量も DSS 群では減少したが、Muc 3 のみ α -LA 投与により有意に減少が抑制された。Muc 3 は非炎症群間の比較においても、 α -LA 投与により発現量の増加が見られた (Fig. 2-2-6)。

2-2-4. 考察

離乳期ラットを用いた腸炎モデルにおいて、 α -LA 経口投与により炎症度の抑制、成長障害の抑制が見られ (Fig. 2-2-1)、組織評価、血中サイトカイン・ホルモン濃度や血液パラメーターの結果も炎症の抑制を支持していた (Fig. 2-2-2~Fig. 2-2-4)。ただ、非炎症群間の比較では α -LA 投与による成長や造血機能の促進は見られなかったことから、 α -LA による腸炎抑制効果は身体発達の促進によるものではないと考えられた。そこで、 α -LA 投与による腸炎抑制効果メカニズムの検討を行なった。

2-1 で示した通り、 α -LA には GLP-2 分泌刺激作用があり、GLP-2 と腸炎の関係について、

GLP-2 投与 (108) や GLP-2 不活化酵素である DPP-IV 阻害により (122) マウス DSS 大腸炎が抑制されることが知られている。従って、 α -LA による GLP-2 分泌を介した腸炎抑制メカニズムが考えられたため、試験終了時の血漿を用いて GLP-2 濃度を測定したが、非炎症群・炎症群両群において α -LA による GLP-2 濃度増加は認められなかった(データ未記載)。 α -LA による GLP-2 分泌刺激作用については、投与対象の日齢・投与後採血までの時間等により影響を受けるため、GLP-2 分泌刺激作用を介した腸炎抑制作用も否定できないが、その他の作用機序検討を行なった。

腸炎の抑制には Treg が重要であることが示唆されており、ヒト活動期 UC 患者では健康人や非活動期 UC 患者と比較し、血中 Treg が減少していることが報告されている(119, 123)。従って、本項では、血中の Treg を評価した。また、乳たんぱく質の一つである GMP には腸炎抑制作用が報告されているが(116)、その作用機序として脾臓での Treg 増加作用が示唆されている(120)ことから、脾臓中 Treg についても評価した。非炎症群間の比較から、 α -LA は脾臓 CD4⁺細胞中における CD25⁺Foxp3⁺Treg の割合を増加させることが示された(Fig. 2-2-5)。非炎症群と炎症群の比較 (Ctrl 群 vs. DSS 群) では差が見られなかったが、末梢血の同割合は炎症群 (DSS 群) で有意に減少していることから、炎症により全身の CD4⁺T 細胞に占める Treg プールが減少すると考えられる。炎症部位における Treg の評価は行っていないため明確ではないが、非炎症群間の比較で Treg 割合が増加していることから、 α -LA が Treg プールを増加させることで炎症を抑制する可能性が示唆された。Shin ら (115) は LPO による腸炎予防において、LPO が末梢血 CD4⁺細胞における Treg の割合を増加させることが LPO による腸炎抑制の作用機序の一部であることを報告しており、Requena ら (120) は GMP をラット脾細胞培養液に添加すると Foxp3 発現量が増加し、GMP 経口投与により胸腺では変化がないものの、脾臓では Foxp3 発現量が増加することを報告している。乳たんぱく質である LPO、GMP、 α -LA が Treg あるいは Treg 関連分子を増加させるという共通の作用を示すことは、乳たんぱく質で知られる抗炎症作用機序の一部である可能性があり、興味深い。また、大腸粘膜組織において粘液の構成成分である Muc 発現量を調べたところ、Muc 2, Muc 3, Muc4 発現量は DSS 群で低下していた。このことは、炎症によりムチン産生細胞の機能が低下し、分泌型・膜結合型ムチン両者の産生が低下したことを示唆する。一方で、Muc 2, Muc 4 では炎症群、非炎症群の両群において α -LA 投与による差は見られなかったものの、Muc 3 は両群共 α -LA 投与群で増加していた (Fig. 2-2-6)。このことは、炎症誘導前に α -LA により誘導された、膜結合型ムチンである Muc 3 が、炎症に対して保護的に働いた可能性を示す。 α -LA には胃粘膜保護作用が知られており、そのメカニズムとして胃におけるムチン産生増加が示唆されている(13)。 α -LA には特定のムチン産生を増加させる作用があるのかもしれない。

ただし、そのメカニズムについての一端は示せたものの、依然不明な点も多く、発症を遅らせた結果か症状を緩和した結果かも明らかには出来ていない。炎症誘導後に α -La を投与するなど、今後更なる研究が必要である。上述の通り、 α -La には胃粘膜保護作用 (13)

やロタウイルス感染による下痢発症の抑制作用（117）が知られており、2-1 項で示したように、腸管成熟ホルモンである GLP-2 分泌刺激作用（69）がある。その他、シクロオキシゲナーゼ阻害作用（124）、抗菌作用（16）、抗がん作用（17, 18）などが知られている。これらの報告も踏まえ、今後 α -LA の作用、特に若齢期における役割・機序について検証を進めていく必要がある。

2-2-5. 小括

本章では、「消化管成熟作用を示す α -LA が、離乳期に誘導した大腸炎に対して有用な作用を示すか否か」を検討する目的で、大腸炎（特に UC）モデルとしてよく使用される DSS 腸炎を離乳期ラットに誘導し、 α -LA の効果を検討した。

その結果、 α -LA により炎症が抑制され、炎症により誘導される成長障害も抑制されることが示され、非炎症群間の比較から、 α -LA により Muc 3 および CD4⁺T 細胞における CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞プールが増加することが、作用機序の一端である可能性を示すことができた。上述した通り、IBD を発症した患者の比較的多数が若年期に発症し、特に小児 IBD においては栄養療法が重要と考えられているにも関わらず、若齢動物を用いた食品成分の検討は少ない。その点において、若齢動物を用いた今回の研究で、 α -LA が腸炎抑制作用、特に成長障害の抑制効果を示し、さらには IGF-I やレプチンなど栄養指標についても改善の兆候をもたらしていたことは、調製粉乳に α -LA を強化することの意義づけを行なう上でも重要な結果が得られたものと考えられる。

Table 2-2-1 : DAI calculated by totaling the score for stool consistency and occult blood/gross bleeding and dividing two.

Score	Stool consistency	Occult blood/gross bleeding
0	Normal	Negative
1	Loose stool	Negative
2	Loose stool	Positive
3	Diarrhea	Positive
4	Diarrhea	Gross bleeding

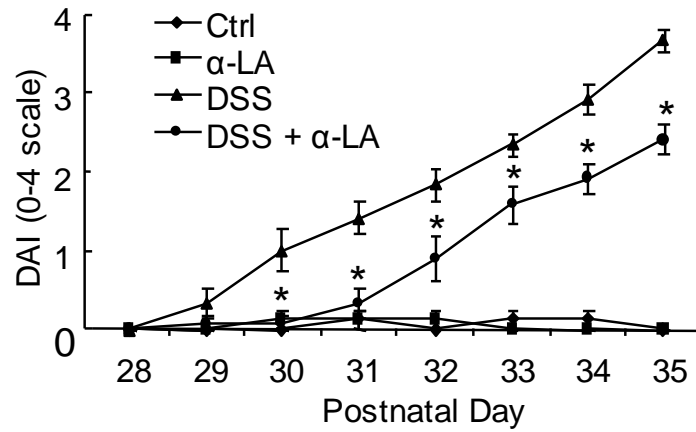


Figure 2-2-1 : Effects of α -LA on DAI change.

Values are shown as the mean \pm SEM. (n = 8-12). Rats were administered with water or α -LA by gavage from postnatal day 25 to 35. Ctrl group and α -LA group were allowed free access to sterilized water from postnatal day 28 to 35. DSS group and DSS + α -LA group were freely access to 2% DSS solution from postnatal day 28 to 35. * shows significant difference from DSS group ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis test).

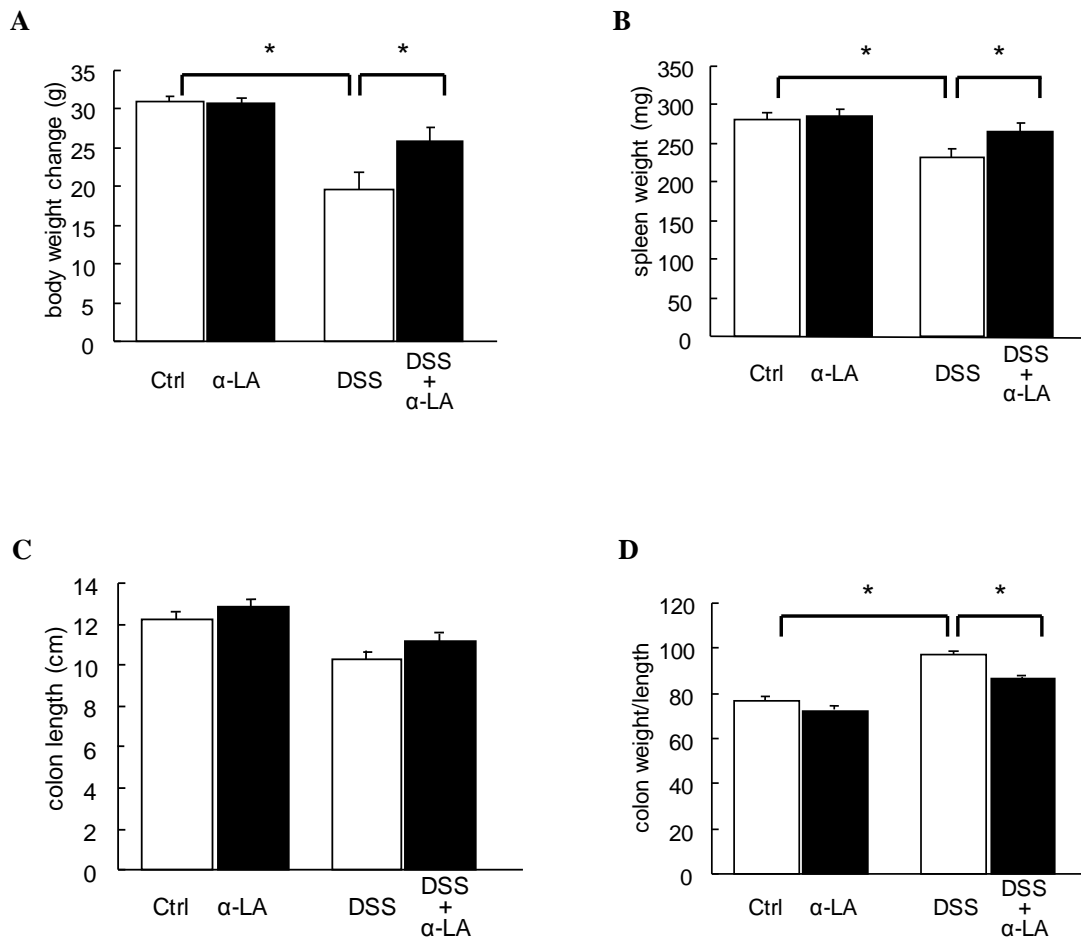


Figure 2-2-2 : Effect of α -La on inflammation characteristics 7 days after DSS treatment. (A) body weight change, (B) spleen weight, (C) colon length, (D) colon weight/length. Values are shown as the mean \pm SEM. (n = 8-12). * shows significant difference ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis test).

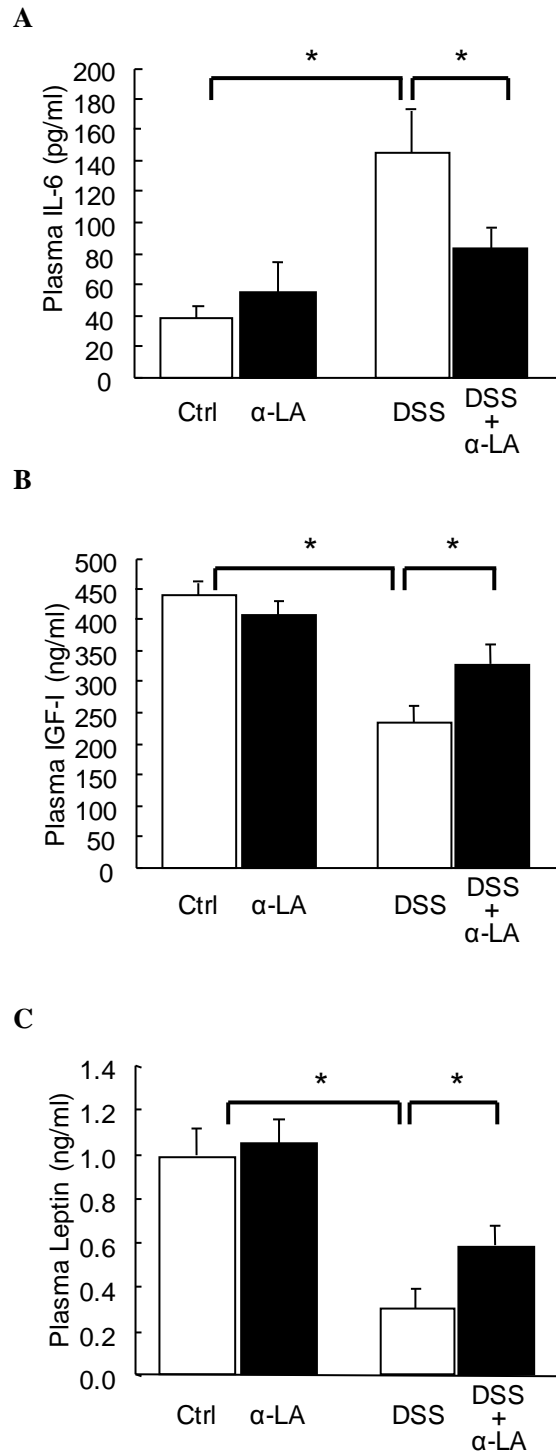


Figure 2-2-3 : Effect of α -LA on plasma cytokine and hormone concentration 7 days after DSS treatment.

(A) plasma IL-6 concentration, (B) plasma IGF-I concentration, (C) plasma leptin concentration. Values are shown as the mean \pm SEM. (n = 8-12). * shows significant difference ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis test).

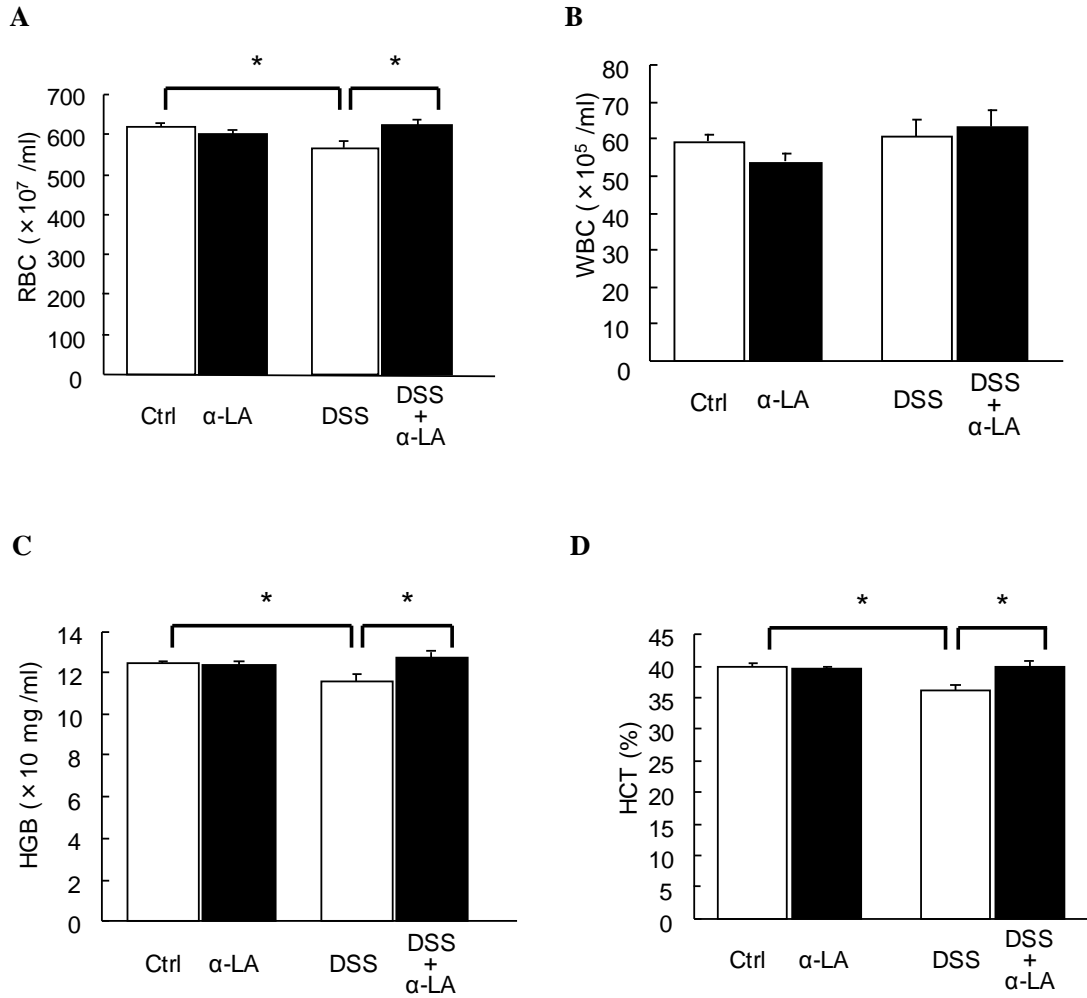


Figure 2-2-4 : Effect of α -LA on hematological characteristics 7 days after DSS treatment. (A) red blood cell (RBC), (B) white blood cell (WBC), (C) hemoglobin (HGB), (D) hematocrit (HCT). Hematological characteristics were measured by KX-21NV (Sysmex). Values are shown as the mean \pm SEM. (n = 8-12). * shows significant difference ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis test).

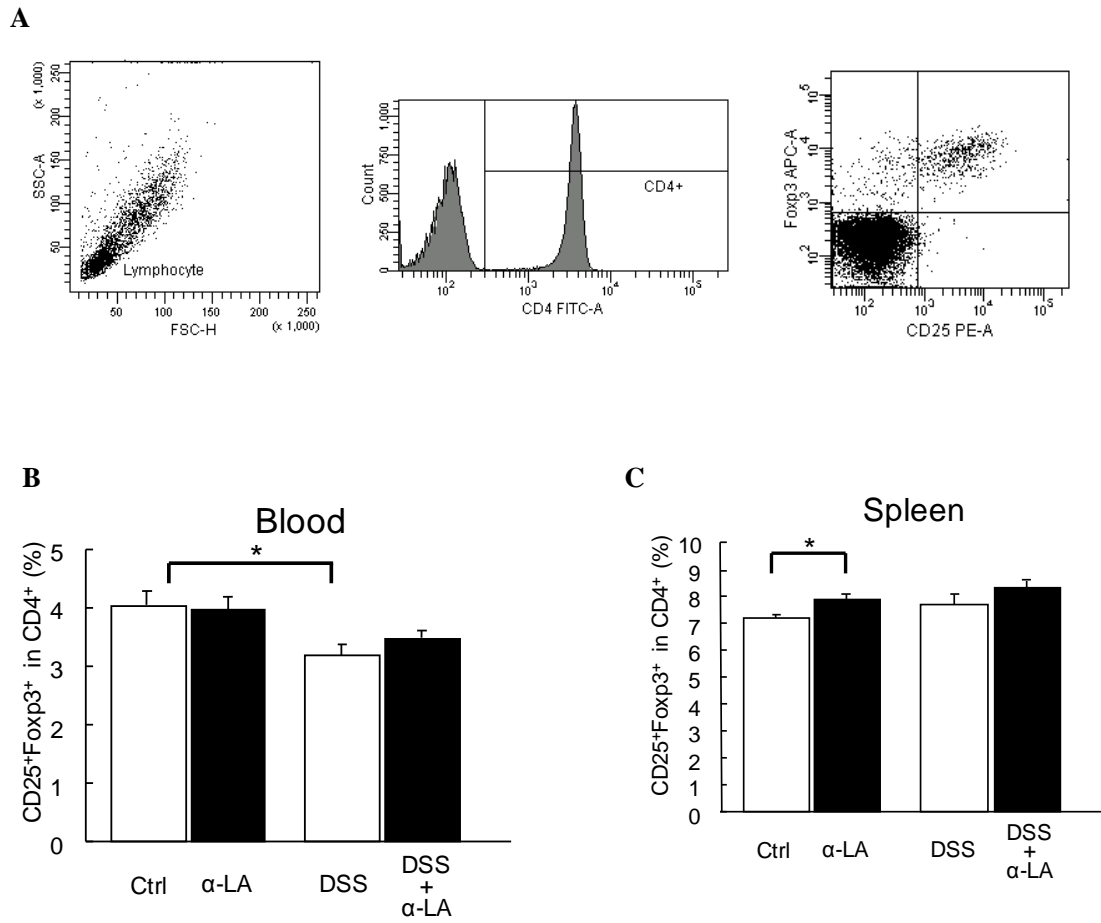


Figure 2-2-5: Effect of α -LA on regulatory T cells in peripheral blood and spleen lymphocytes 7 days after DSS treatment.

(A) regulatory T cells analyzed by flow cytometry, (B) CD25⁺Foxp3⁺ Treg in CD4⁺ cells of peripheral blood lymphocytes, (C) CD25⁺Foxp3⁺ in CD4⁺ cells of spleen lymphocytes. Values are shown as the mean \pm SEM. (n = 8-12). * shows significant difference ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis test).

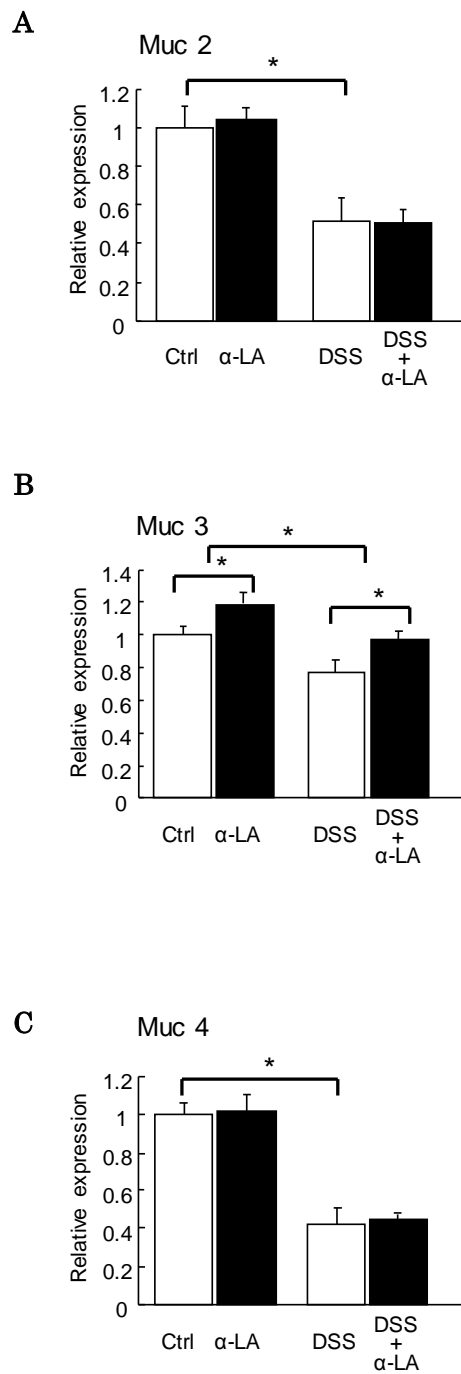


Figure 2-2-6 : Effect of α -LA on the mRNA expression of mucin in colon 7 days after DSS treatment. A) Muc 2, B) Muc 3, and C) Muc 4 mRNA levels were analyzed by RT-PCR. β -Actin was used for normalization. Values are shown as the mean \pm SEM. (n = 8-12). * shows significant difference ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis test).

第3章 乳中新規成分の解析

3-1. 牛乳中 miRNA と mRNA

3-1-1. 緒言

第2章では乳中たんぱく質に GLP-2 分泌刺激作用があるという、乳たんぱく質の新たな機能を示したが、第1章で示したように、乳中には様々な生理活性因子が含まれており、その中には未知の因子も存在する。我々はヒト母乳中に miRNA と呼ばれる小分子 RNA (small RNA) が存在することを明らかにした (72)。母乳中 miRNA の役割は明らかではないが、調製粉乳での利用を考えた場合、牛乳由来の原料が現実的である。しかし、第1章で示した通り、ヒト母乳と牛乳ではその組成が大きく異なることから、牛乳中には存在していない可能性や、存在したとしても、濃度が大きく異なる可能性がある。本項では、牛乳中の miRNA 存在有無、初乳と成熟乳の差、乳児消化管を想定した人工消化耐性、工業的利用可能性を検討した。

3-1-2. 材料と方法

3-1-2-1. 材料

本実験で使用した牛乳は、森永乳業動物実験委員会の規定に則った上で10匹の健康なホルスタイン種のウシから搾乳した。出産後3日以内の初乳を5頭のウシから、出産後8日以降の成熟乳を5頭のウシから得た。得られた乳汁サンプルは、搾乳後直ちに-20℃で保存し、森永乳業・栄養科学研究所に到着後は使用まで-80℃で保存した。乳汁サンプルの情報を Table 3-1-1 に示す。

3-1-2-2. 方法

乳清調製

乳汁サンプルを 1,200 g、4℃で10分間遠心を行ない、脂質層、細胞層、不溶物を除去した。同操作は2回行なった。得られた脱脂乳を 21,500 g、4℃で30分間遠心し、残った脂質とカゼインを除去した。続いて 21,500 g、4℃で1時間遠心し、さらにカゼインを除去した。得られた透明な液層（乳清）を、0.65、0.45、0.22 μm のフィルター濾過を行なうことで、細胞残渣等を除去した。

総 RNA の抽出・精製

上記で得られた乳清サンプルに5倍量の QIAzol (QIAGEN) を添加し、ボルテックスで良く攪拌し、5分間室温で静置した（変性サンプル）。通常 mRNA であれば、発現量の変化がないとされる β-アクチンなどで標準化を行なうが、乳や血液のような体液中 miRNA では、補正法が確立していない。そこで、補正のための miRNA を添加することとした。*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) の miRNA の一つである cel-miR-39 (miRNA Mimic、QIAGEN、2 μl 中に 10 fmol を含む) を上記変性サンプル 1.2 ml に対して 2 μl 添加した。次

に使用した乳清と等量のクロロホルムを添加し、ボルテックスで良く攪拌後、3分間室温で静置し、12,000 g、4°Cで15分間遠心した。水層部分を注意深く採取し、得られた水層量の1.5倍量の100%エタノール(分子生物学実験グレード)を加えて良く攪拌し、miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製した。得られた総 RNA を RNA 6000 Pico Kit を用い 2100 Bioanalyzer を用いて測定した(共に Agilent Technologies、CA、USA)。

マイクロアレイ解析

総 RNA 20 ng を 37°C で 30 分間仔ウシアルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸処理し、16°C で 2 時間 T4 RNA リガーゼを用いて cyanine 3-cytidine biphosphate でラベル化処理を行なった。ラベル化された RNA を 55°C で 20 時間 Bovine miRNA Microarray Rel. 13.0 (miRBase Rel. 13.0 に基づきデザインされたマイクロアレイ、333 種類のウシ miRNA を検出できる) にハイブリダイゼーションした。本操作における試薬は miRNA Complete Labeling Reagent and Hyb Kit (Agilent Technologies) を用いた。ハイブリダイゼーション後洗浄操作を行ない、DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies) を用いて測定を行なった。測定イメージを Feature Extraction Software ver. 9.5.3.1 を用いて解析し、シグナル値を得た。得られたシグナルは GeneSpring GX ver. 11.5.1 (Agilent Technologies) を用いて解析した。

定量 PCR による miRNA 定量

miRNA 定量のための cDNA 合成には、miScript Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用い、50 ng の総 RNA から cDNA を合成した。得られた cDNA 溶液は Nuclease free water (Ambion、TX、USA) で 10 倍希釈し、各 miRNA に対するプライマー (miScript Primer Assay、QIAGEN) (Table 3-1-2) と miScript SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) を用い、定量 PCR を行なうことで発現量を求めた。リアルタイム PCR プロトコルは 7500 Fast Real-Time PCR System を用いて実施した。HotStarTaq DNA polymerase の活性化を 95°C で 15 分間行ない、変性・アニーリング・伸長反応をそれぞれ 94°C で 15 秒間、55°C で 30 秒間、70°C で 34 秒間 40-50 サイクル繰り返した。各サイクルの最終ステップで蛍光を検出した。その後、得られた産物が単一であるかを確認するため、60°C から 95°C まで 0.2°C/秒の速度で温度を上昇させ、Melting curve を作成した。

得られたデータは 7500 Software ver. 2.0.4 (ABI) を用いて解析を行なった。レポーター色素蛍光値からベースライン蛍光値を引いた $\Delta R_n = 0.02$ を閾値とし、閾値に達したサイクル数 (Ct) を求めた。cel-miR-39 によるノーマライズを行なう際は、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いた。

定量 PCR による mRNA 定量

mRNA の定量のための cDNA 合成には、High Capacity RNA-to-cDNA Kit を用い、50 ng の総 RNA から cDNA を合成した。得られた cDNA 溶液は Nuclease free water (Ambion) で 10 倍希釈し、各 mRNA に対するプライマー (TaqMan Probe) (Table 3-1-3) と TaqMan Fast

Advanced Master Mix (ABI) を用い、定量 PCR を行なうことで発現量を求めた。リアルタイム PCR プロトコルは 7500 Fast Real-Time PCR System を用いて実施した。Uracil-N-glycosylase 処理を 50°C で 2 分間行ない、Polymerase の活性化を 95°C で 20 秒間行なった後、変性・アニーリング&伸長反応を各 95°C で 3 秒間、60°C で 30 秒間 40-50 サイクル繰り返した。

得られたデータは 7500 Software ver. 2.0.4 を用いて解析を行なった。レポーター色素蛍光値からベースライン蛍光値を引いた $\Delta Rn = 0.2$ を閾値とし、Ct 値を求めた。

消化耐性

上記「乳清調製」で得られた乳清に対し、RNase 処理、酸性処理、界面活性剤処理を行なった。RNase 処理は、乳清に RNase A 10 U/ml、RNase T 400 U/ml となるように添加し、37°C で 1 時間反応させた。酸性処理は塩酸を添加し、pH 2 に調整されたことを pH 試験紙で確認し、37°C で 1 時間静置した。界面活性剤処理は 1% (v/v) となるように Triton X-100 を添加し、37°C で 1 時間静置した。各処理では、対照の miRNA として cel-miR-54 を乳清 200 μ l に対し 2 μ l (10 fmol) (QIAGEN) 添加した。反応後の乳清から上述の方法と同じように総 RNA を抽出・精製し、定量 PCR により miRNA、mRNA 量を求めた。

調製粉乳からの乳清調製

市販されている通常の調製粉乳「はぐくみ」(森永乳業製) (9 ヶ月頃までの乳児に使用される)、フォローアップミルク「チルミル」(森永乳業製) (9 ヶ月頃から 3 歳頃までの幼児に使用される)、ミルクアレルギー用ミルク「MA-mi」(森永乳業製) (高度分解乳、ミルクアレルギーの乳幼児に使用される) を用い、標準調乳濃度 (13-14%) で調乳後 1,200 g、4°C で 10 分間遠心し、脂質層を除いた。続いて 21,500 g、4°C で 30 分間の遠心を 2 回、21,500 g、4°C で 1 時間遠心を行ない、カゼインを除去した。得られた乳清を 0.65、0.45、0.22 μ m でフィルター濾過した。得られた乳清サンプルから上述の方法に従い総 RNA を抽出・精製し、定量 PCR により miRNA、mRNA 量を求めた。

3-1-2-3. 統計解析

2 群間の比較には Mann-Whitney U-test を用い、消化耐性の比較では未処置群を対照とした Dunnett test を、調製粉乳間の多重比較では Tukey-Kramer HSD test を用いた。有意水準は $P < 0.05$ とし、JMP software ver. 5.1 により行なった。

3-1-3. 結果

3-1-3-1. 牛乳中 miRNA

Fig. 3-1-1 に示すように、牛乳乳清から精製した RNA の Bioanalyzer による電気泳動の結果、ヒト母乳乳清と同じく、18S、28S rRNA に由来するピークは全く認められず、およそ

300 nt 以下の small RNA 領域にピークが認められた。初乳と成熟乳の乳清中 RNA 濃度を比較したところ、初乳中濃度の方が有意に高かった (Fig. 3-1-2)。

miRNA マイクロアレイ結果

初乳・成熟乳乳清から精製した総 RNA を用い miRNA マイクロアレイに供した結果、miR Base Rel. 13.0 に登録されていたウシ miRNA 333 種類の内、102 種類が検出された (Fig. 3-1-3)。その内、初乳で 100 種類、成熟乳で 53 種類が検出され、初乳と成熟乳で共通して発現しているのは 51 種類、初乳のみ、成熟乳のみで検出されたのはそれぞれ 49 種類と 2 種類であった (Fig. 3-1-3)

等量の RNA における各 miRNA 量の定量 PCR による比較

初乳・成熟乳乳清から精製した RNA を等量ずつ用い、各 miRNA (27 種) 量を定量 PCR により比較したところ、miR-15b、miR-34a、miR-106b、miR-130a、miR-155、miR-223 は初乳中で有意に発現量が高く、miR-27b は高い傾向 ($P = 0.09$) が認められた。miR-29b は成熟乳で高い傾向 ($P = 0.06$) が認められたものの、多くは発現量に差がなかった (Fig. 3-1-4)。

等量の乳清における各 miRNA 量の定量 PCR による比較

上記 (Fig. 3-1-4) で有意な差、あるいは差がある傾向が認められた 8 種類 (miR-15b、miR-27b、miR-29b、miR-34a、miR-106b、miR-130a、miR-155、miR-223) の初乳および成熟乳乳清中 miRNA 発現量を、乳清一定量当たり添加した cel-miR-39 による標準化を行なうことで、等量乳清中の存在量を比較した。その結果、miR-29b を除く 7 種の miRNA 量は、初乳中でおおよそ 10 倍~100 倍有意に多く発現していた。miR-29b については、初乳・成熟乳乳清間で有意な差は認められなかった (Fig. 3-1-5)。

乳中 miRNA の消化耐性

初乳および成熟乳乳清中に高 (miR-494)・中 (miR-320)・低 (miR-155) 量で存在する miRNA を指標に、乳中 miRNA の RNase、酸、界面活性剤に対する耐性を調べたところ、添加した miRNA である cel-miR-54 が酸性条件下以外で分解したものの、乳中に存在する miRNA はいずれも界面活性剤以外の条件では分解されなかった (Fig. 3-1-6)。

3-1-3-2. 牛乳中 mRNA

定量 PCR による乳中 mRNA 量解析

初乳・成熟乳乳清から精製した RNA を等量ずつ用い、乳たんぱく質関連、および乳由来エクソソーム関連 mRNA 量を定量 PCR により確認したところ、いずれの mRNA も存在することが分かった。初乳・成熟乳乳清間の比較では、 β -CN が成熟乳中で有意に多く、 α -LA、 β -LG が成熟乳中で多い傾向が認められた (Fig. 3-1-7)。

乳中 mRNA の消化耐性

乳中に存在することが確認された mRNA を 3 種類選択し、RNase、酸、界面活性剤に対する耐性を調べたところ、miRNA 同様界面活性剤以外の条件では分解されなかった (Fig. 3-1-8)。

3-1-3-3. 市販調製粉乳中 miRNA、mRNA

市販されている乳児および幼児用調製粉乳中の RNA を調べたところ、いずれの調製粉乳乳清中にも RNA は存在しており、miRNA が存在していることも分かった。ただし、mRNA についてはアレルギー用ミルクで存在が認められず、miRNA についてもアレルギー用ミルク中の存在量は、通常調製粉乳およびフォローアップフォーミュラと比較し、有意に少なかった (Fig. 3-1-9)。

3-1-4. 考察

miRNA はノンコーディング small RNA の一種であり、標的となる mRNA の分解や翻訳の抑制などを行なうことで、発達や分化に重要な役割を果たしている。以前に我々はヒト母乳中にこの miRNA が存在することを明らかとしたが、本章では、牛乳中の miRNA 存在有無、初乳と成熟乳の差、乳児消化管を想定した人工消化耐性、工業的利用可能性を検討した。

初乳および成熟乳から総 RNA を抽出・精製し、Bioanalyzer による電気泳動を行なったところ、18S、28S rRNA に由来するピークは全く、あるいはほとんど認められなかったが、300ヌクレオチド以下の small RNA 領域にピークを認めた。このことは、牛乳中に存在する RNA が、混在する細胞に由来するものでないことを示唆する。また、初乳と成熟乳の RNA 濃度を比較したところ、初乳で有意に高かった。第 1 章で示した通り、乳児にとって重要な、LF などの感染防御因子は一般に初乳に多い。乳中 RNA 濃度が初乳中で高いことは、乳中 RNA が何らかの役割を示す可能性を示唆する。

マイクロアレイ解析の結果、miR Base Rel. 13.0 に登録されていたウシ miRNA 333 種類の内 102 種類が検出された。初乳で 100 種類、成熟乳で 53 種類が検出され、51 種類が初乳と成熟乳で共通して発現していた。我々同様、Chen ら (125) も牛乳中に miRNA が存在することを示しているが、彼らは高速シーケンサーを用い、245 種類の miRNA を検出している。これは、我々が数 ml の牛乳を用いて RNA を抽出したのに対し、彼らは 100 ml の牛乳を用いて抽出したこと、我々が RNA 精製キットを用いて精製したのに対し、彼らは電気泳動によって small RNA を精製したことが影響していると考えられる。

乳中に存在する miRNA の役割を調べるためには、個々の miRNA の役割から、仮説を立てる必要があるが、数多くの miRNA が見つかったものの、実験的に役割が同定された miRNA はそれほど多くない。従って、乳は乳児 (仔) の免疫や身体発達促進を促進するこ

とから、マイクロアレイで発現が確認された中から免疫（126-136）と発達（127, 137-144）に関連することがわかっている 27 種類の miRNA を選択し、定量 PCR で確認を行なった。選択した miRNA は全て定量 PCR でも発現が確認されたが、Chen ら（125）の結果と比較すると、我々は検出できた miR-133b を Chen らは非検出としていること、ヒト母乳で比較的高発現しており（72）、今回の我々の結果から牛乳中でも比較的高発現していた miR-494 が、Chen らの結果ではあまり発現していないなど、既報とはいくつかの差異が認められた。用いた牛乳の背景や、精製方法が影響している可能性が考えられる。

初乳と成熟乳間の比較では、当量の RNA を用いた場合、選択した 27 種類の miRNA の多くは発現量に差が無かったが、miR-15b、miR-34a、miR-106b、miR-130a、miR-155、miR-223 については初乳で有意に発現量が多く、miR-27b は初乳で多い傾向が認められた。成熟乳の方が有意に発現量が多いものは無く、miR-29b のみ多い傾向が認められた。これら当量 RNA 中の量が初乳・成熟乳間で差が認められた 8 種類の miRNA について、内部標準である spiked-in した cel-miR-39 で標準化を行なうことで、当量の乳清中発現量を測定したところ、miR-15b、miR-27b、miR-34a、miR-106b、miR-130a、miR-155、miR-223

は初乳で 10 倍から 200 倍程度高発現していた。miR-29b については、初乳・成熟乳間に統計的有意差は認められなかった。これら miRNA は上述の通り免疫または発達への関与が示されている miRNA であり、例えば miR-155 は T 細胞・B 細胞分化、Th1/Th2 バランス制御、制御性 T 細胞分化に関与しており、miR-223 は好中球増殖・活性化を抑制する。ウシ初乳には抗炎症作用が報告されているが（145）、上記のように抗炎症作用を示しうる miRNA が初乳中で高発現していることは、初乳の抗炎症作用の一部を担う可能性を示唆し、大変興味深い。

RNA は一般的に不安定な分子であるとされており、RNase により速やかに分解される。また、乳中には RNase が含まれていることが知られているが（146）、これまで示したように牛乳中に miRNA を検出することができたため、何らかの保護作用があると考えられた。そこで、牛乳乳清中 miRNA は乳児（仔）の消化管でも働きうるかを調べるため、乳清中に高・中・低発現していた miRNA（高：miR494、中：miR-320、低：miR-155）を指標に、消化耐性を調べた。その結果、乳清に添加した対照 miRNA である cel-miR-54 は 37°C、RNase、界面活性剤処理により速やかに分解したのに対し、乳清中 miRNA は界面活性剤処理を除き、いずれの処理に対しても安定であった。体液中 miRNA はマイクロベシクル、エクソソーム、アポトーシス小体など脂質膜小胞に内包されて存在することが知られている。RNase や酸に対し安定であり、界面活性剤処理により分解されたことは、牛乳乳清中 miRNA も上記膜小胞に存在することを示唆する。Admyre ら（147）によりヒト母乳中にエクソソームが存在すること、ヒト末梢血単核球にヒト母乳由来エクソソームを加えると、用量依存的に CD4⁺ 細胞における Foxp3⁺ Treg が増加することが示されているが、上述の初乳中で miR-155 発現量が多いことを考えると、Treg 増加に乳中 miR-155 が関与している可能性も考えられる。

上記エクソソームであるが、2007 年 Valadi ら（148）により mRNA も含むことが示され

た。牛乳乳清中 miRNA がエクソソーム内に存在するとすると、mRNA も含まれている可能性があるため、乳たんぱく質関連および乳由来エクソソーム中に存在することが確認されているたんぱく質をコードする mRNA を定量 PCR により測定した。その結果、乳たんぱく質および乳由来エクソソーム関連たんぱく質をコードする mRNA が乳清中に含まれており、特に乳たんぱく質関連 mRNA の発現量が比較的多いことがわかった。初乳・成熟乳から抽出・精製した RNA を等量用いて比較したところ、多くは発現量に差がなかったが、 β -CN が成熟乳中で有意に多く、 α -LA、 β -LG が成熟乳中で多い傾向が認められた。miRNA 同様 mRNA についても消化耐性を調べたが、miRNA 同様、界面活性剤以外の条件 (37°C、RNase、酸性) では安定であったことから、乳清中 mRNA もエクソソームのような膜小胞に存在することが示唆された。乳中に mRNA が存在し、泌乳時期によって存在量に変化するものがあることについて、その意義は未だ明らかではない。しかし、乳中にのみ存在すると考えられていたたんぱく質であるカゼインの mRNA が、単球、単球系細胞株、T 細胞、細胞傷害性 T 細胞系細胞株に発現し、役割は不明なもの、免疫系調節に何らかの役割を果たす可能性が報告されていることから (149, 150)、乳中 mRNA も対象の細胞や臓器に取り込まれたとすると、何らかの作用を示す可能性が考えられる。

ここまで示した通り、牛乳乳清中 miRNA、mRNA は酸や RNase など RNA にとって厳しい条件に対して安定であることから、工業的プロセスを経た乳製品中にも存在する可能性がある。従って、市販の乳児用調製粉乳、フォローアップミルク、ミルクアレルギー用高度分解ミルクから RNA を抽出・精製し、濃度測定、定量 PCR により miRNA、mRNA の発現量を調べた。その結果、生乳乳清と比較し、量は少ないものの、電気泳動により small RNA ピークを確認することができ、乳児用調製粉乳、フォローアップミルクでは miRNA、mRNA の発現も確認することができた。乳児用調製粉乳、フォローアップミルクと比較し、高度分解乳では miRNA 量は有意に少なく、mRNA は検出されなかった。一般にミルクアレルギー用高度分解乳は、プロテアーゼによりたんぱく質を分解し、分子量サイズの大きなペプチド断片を除去するため、膜ろ過が行なわれる。その際用いられる膜は通常 10 kDa 以下である。プロテアーゼによる分解の際に RNA も分解した可能性は否定できないものの、エクソソームの大きさが 10-100 nm 程度とされていることを考慮すると、高度分解乳で miRNA が微量しか検出されなかったこと、mRNA が検出されなかったことは、乳中 miRNA、mRNA の大部分がエクソソームのような膜小胞に含まれているという仮説を支持するかもしれない。

3-1-5. 小括

本項では、牛乳乳清中に miRNA、mRNA が存在すること、それら発現量が初乳と成熟乳で異なること、乳児消化管を想定した条件下で安定であること、工業的プロセスを経た乳製品中にも存在することを示すことができた。

miRNA は発達や分化に重要な役割を果たし、ここ数年間の研究により、血液 (151, 152)、

尿 (152, 153)、唾液 (152, 154)、羊水 (152) など様々な体液中に存在することが明らかにされている。しかし、これら体液中 miRNA の研究は、診断バイオマーカーとしての研究が目的であり、生物学的な解析はあまりなされていない。様々な体液の中で、乳と羊水は自身でなく、児 (仔) に提供されるものであり、一定期間乳児 (仔) にとって唯一の栄養源である「乳」中に miRNA、mRNA が含まれることを示した意義は大きいと考える。

Table 3-1-1 : Information of colostrum and mature milk

Type	No.	Times of delivery	Sample collection (day or month after delivery)	Collected milk volume (ml)	Used milk volume to purify RNA (ml)
Colostrum	1	6	1 d	20	4
	2	1	1 d	20	4.5
	3	1	1 d	30	2.5
	4	1	2 d	20	5.5
	5	1	3 d	30	2.5
Mature milk	6	4	8 d	12	4
	7	2	3.5 mo	12	6.5
	8	3	6 mo	12	3.5
	9	3	7 mo	12	4
	10	8	8 mo	10	4

Table 3-1-2 : miScript primers used for miRNA assay

	miRNA	Product No.
1	let-7a	MS00005460
2	let-7b	MS00000007
3	let-7c	MS00005467
4	let-7f	MS00005481
5	miR-15b	MS00013097
6	miR-20a	MS00000098
7	miR-24	MS00005537
8	miR-26a	MS00000133
9	miR-27b	MS00000154
10	miR-29b	MS00005544
11	miR-29c	MS00000175
12	miR-34a	MS00000224
13	miR-92a	MS00006594
14	miR-103	MS00005586
15	miR-106b	MS00000301
16	miR-125b	MS00005600
17	miR-130a	MS00000343
18	miR-133a	MS00007252
19	miR-133b	MS00007259
20	miR-141	MS00000413
21	miR-148a	MS00003556
22	miR-155	MS00003605
23	miR-181d	MS00013139
24	miR-200c	MS00003752
25	miR-223	MS00003871
26	miR-320	MS00013433
27	miR-494	MS00004340

Table 3-1-3 : TaqMan probes used for mRNA assay

	mRNA	Product No.
1	α_{s1} -casein	Bt03217569_m1
2	α_{s2} -casein	Bt03214949_m1
3	β -casein	Bt03217427_m1
4	κ -casein	Bt03213724_m1
5	α -lactalbumin	Bt03213962_m1
6	β -lactoglobulin	Bt03230916_m1
7	lactoferrin	Bt03217384_m1
8	lactoperoxidase	Bt03211919_m1
9	milk fat globule-EGF 8	Bt03216859_m1
10	polymeric immunoglobulin receptor	Bt03212948_m1
11	xanthine oxidase	Bt03212108_m1
12	CD36	Bt03212338_m1
13	CD63	Bt03217862_m1
14	major histocompatibility complex class II	Bt03286221_g1
15	fatty acid synthase	Bt03210485_m1
16	enolase 1 α	Bt03230941_m1

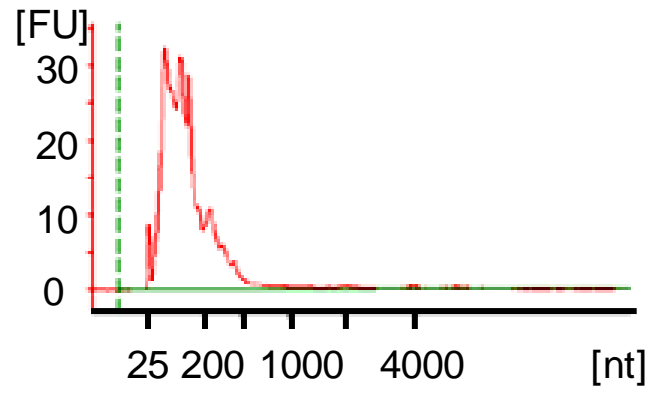


Figure 3-1-1 : Total RNA from bovine milk was analyzed using a Bioanalyzer.

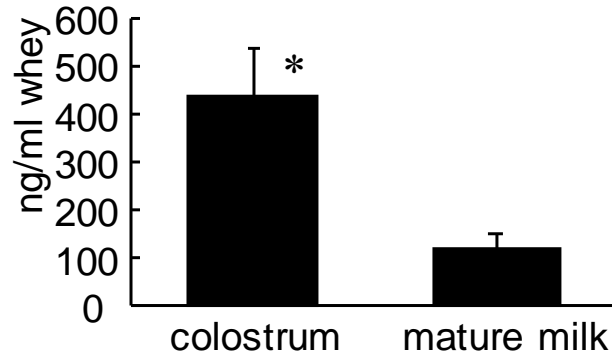
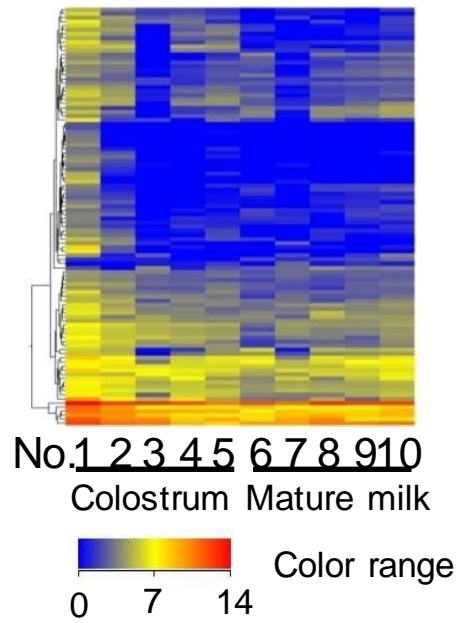


Figure 3-1-2 : The RNA concentrations in bovine colostrum and mature milk (n = 5). The values are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with mature milk.

A



B

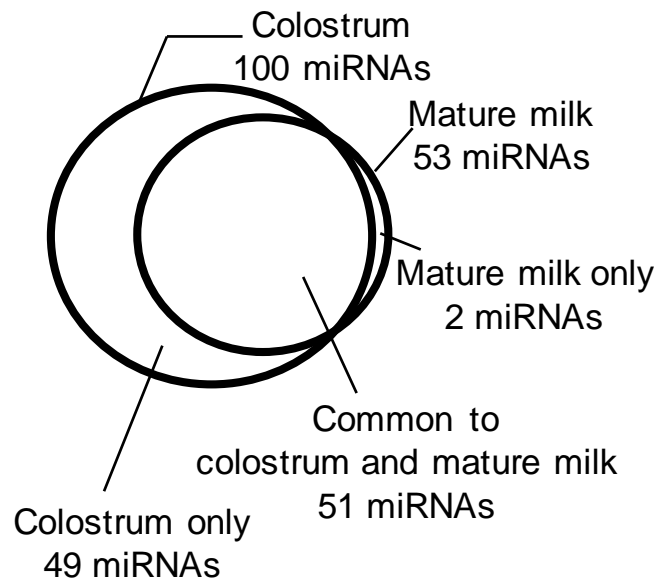


Figure 3-1-3 : Analysis of the miRNAs in bovine milk. (A) miRNA expression gene tree for bovine colostrum and mature milk. (B) Venn diagram showing the numbers of miRNAs expressed in bovine colostrum and mature milk.

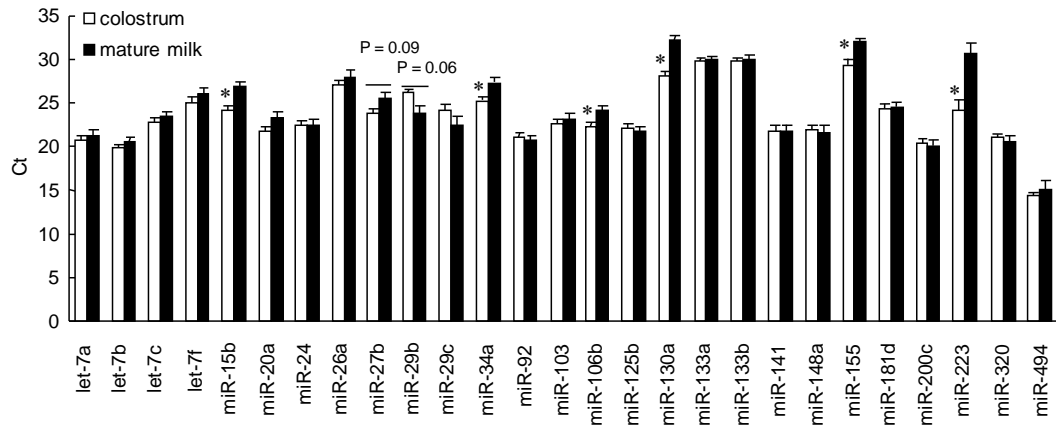


Figure 3-1-4 : Quantitative PCR analysis of select miRNAs in equal volumes of RNA from bovine colostrum and mature milk. An aliquot of total RNA (0.5 ng) was used for each miRNA. The values are the mean \pm SEM (n = 5). * $P < 0.05$ compared with mature milk. High Ct means low expression and low Ct means high expression.

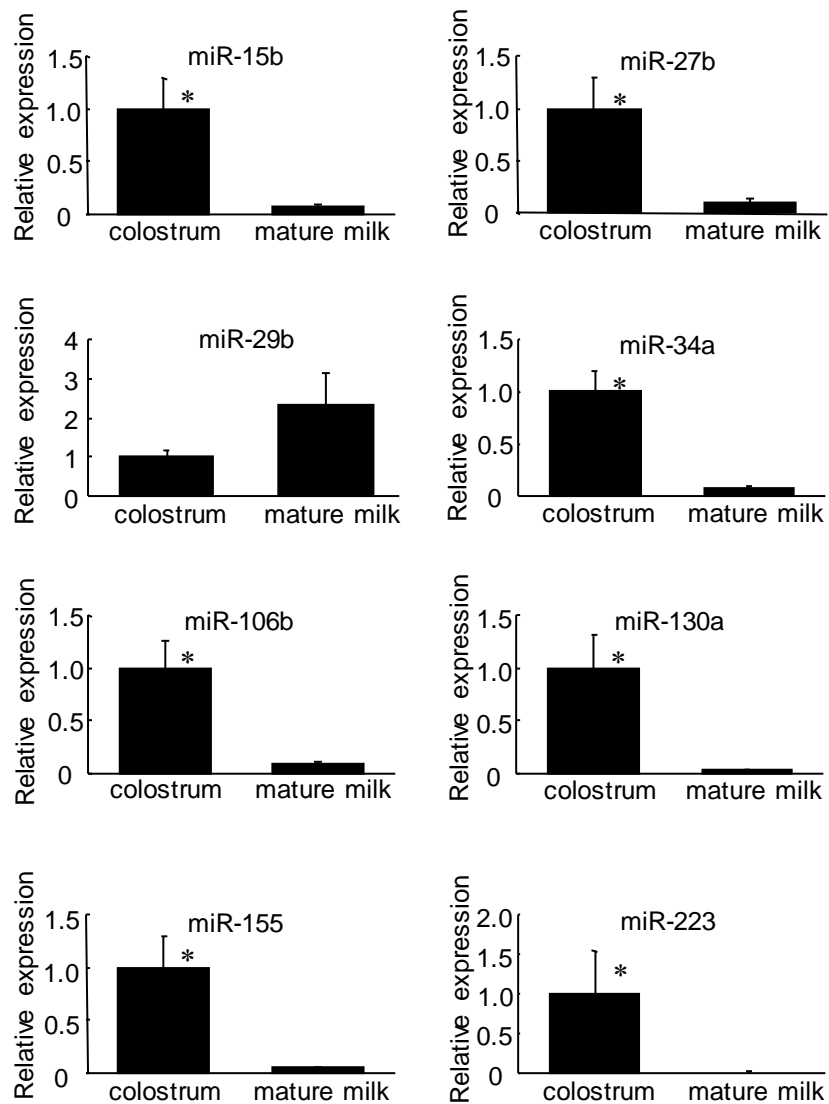


Figure 3-1-5: Quantitative PCR analysis of select miRNAs with normalization. To measure the levels of expression of miRNAs in equal volumes of whey fraction from colostrum and mature milk, the quantitative PCR data obtained were normalized to spiked-in synthetic cel-miR-39. The values are the mean \pm SEM (n = 5). * P < 0.05 compared with mature milk.

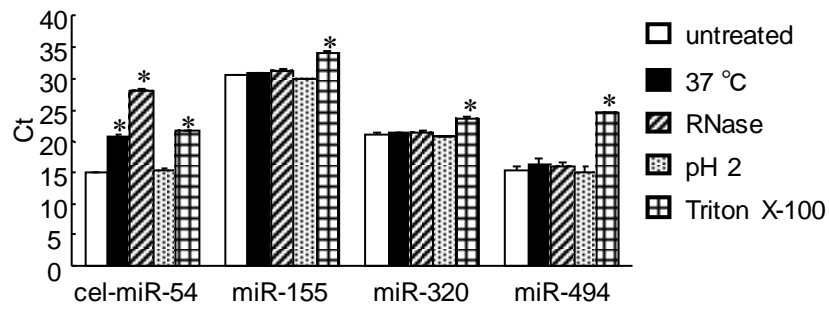


Figure 3-1-6 : Stability of the miRNAs in raw bovine milk. Raw milk derive whey (400 μ l) was left untreated (white column), incubated at 37°C for 1 h without treatment (black), incubated at 37°C for 1 h with RNase (10 U/ml RNase A and 400 U/ml RNase H) (oblique lines), exposed to a low pH (pH 2) (dots), or treated with detergent (1% Triton X-100) (grid). The values are the mean \pm SEM (n = 3). * $P < 0.05$ compared with untreated. High Ct means low expression and low Ct means high expression.

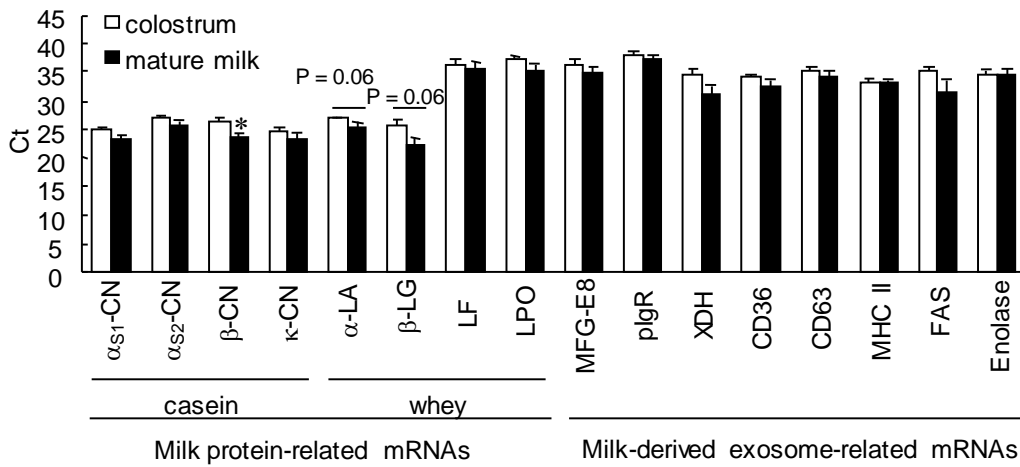


Figure 3-1-7 : Quantitative PCR analysis of the mRNAs in bovine colostrum and mature milk. An aliquot of total RNA (0.5 ng) was used for each mRNA. The values are the mean \pm SEM (n = 5). * P < 0.05 compared with colostrum. High Ct means low expression and low Ct means high expression. CN, casein; LA, lactalbumin; LG, lactoglobulin; LF, lactoferrin; LPO, lactoperoxidase; MFG-E8, milk fat globule-EGF factor 8; pIgR, polymeric immunoglobulin receptor; XDH, xanthine dehydrogenase; MHC II, major histocompatibility complex class II; FAS, fatty acid synthase

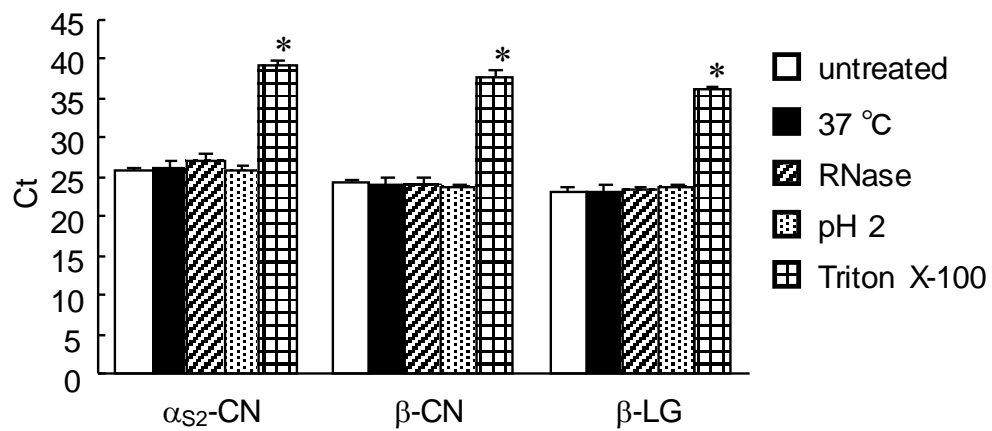


Figure 3-1-8 : Stability of the mRNAs in raw bovine milk. Raw milk derive whey (400 μ l) was left untreated (white column), incubated at 37°C for 1 h without treatment (black), incubated at 37°C for 1 h with RNase (10 U/ml RNase A and 400 U/ml RNase H) (oblique lines), exposed to a low pH (pH 2) (dots), or treated with detergent (1% Triton X-100) (grid). The values are the mean \pm SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$ compared with untreated. High Ct means low expression and low Ct means high expression.

CN, casein; LG, lactoglobulin

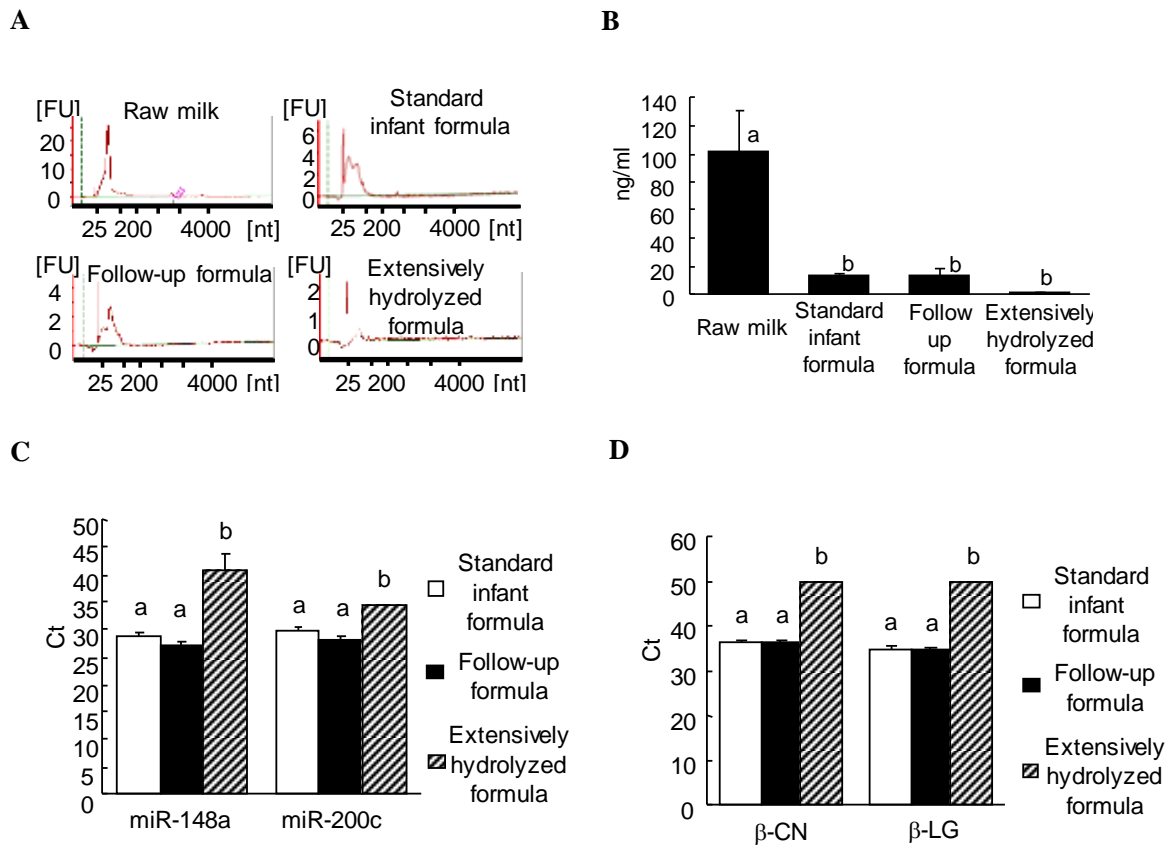


Figure 3-1-9 : Analysis of infant formula-derived RNA. (A) Total RNA from raw bovine milk and infant formulae was analyzed using a bioanalyzer. (B) The RNA concentrations in bovine raw milk and infant formulae. (C) miRNA expression in infant formulae. An aliquot of RNA from 1.25 ml of formula was used. (D) mRNA expression in infant formulae. An aliquot of RNA from 1.25 ml formula was used. mRNAs was not detected in extensively hydrolyzed formula; therefore, the formula was assigned a Ct value of 50. The values are the mean \pm SEM ($n = 3$). Means without common letter significantly differ ($P < 0.05$). High Ct means low expression and low Ct means high expression.

3-2. ラット乳中 miRNA と mRNA の網羅的解析

3-2-1. 緒言

本章 3-1 では、牛乳中にも miRNA が含まれていること、miRNA だけでなく mRNA も含まれていることを示した。また、その発現量は泌乳期により変化することも示した。さらに、乳中の機能性 RNA は酸や RNase に対して抵抗性があり、乳児（仔）消化管で機能する可能性があることも示した。しかしながら、乳中 RNA の役割に関しては未だ不明であり、今後その役割を探る上ではげっ歯類等を用いた *in vivo* の実験が必要になると考えられるが、ラットなどのげっ歯類乳中に miRNA、mRNA が存在しているかは明らかでない。そこで本章では、ラット乳中の miRNA、mRNA を解析することを目的とし、検討を行なった。

3-2-2. 材料と方法

3-2-2-1. 動物

動物実験は、森永乳業株式会社動物実験委員会承認の下、「動物の愛護及び管理に関する法律」（法律第 105 号 1973 年 10 月 1 日施行、法律第 68 号 2005 年 6 月 22 日一部改正）および「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（環境省告示第 88 号 2006 年 4 月 28 日施行）に則って行なった。妊娠 14 日目の F344/N ラット（14 週齢）を日本 SLC から購入した。飼育にはプラスチックケージを用い、 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、12 時間明暗サイクルの SPF 環境下で飼育した。飼料（MRSTOCK、日本農産）・水道水は自由摂取とした。搾乳は出産後 2、9、16 日目に行ない、離乳期にあたる出産後 21 日目にセボフルラン（Mylan Inc.、PA、USA）を用いた安楽死後、下大静脈より採血を行なった。

3-2-2-2. 搾乳

搾乳は Keen ら（88）の方法を若干改変して行なった。すなわち、搾乳 3-4 時間前に仔ラットを母ラットから離し、オキシトシン（Sigma-Aldrich）1 I.U. を腹腔内に投与 15 分後にセボフルランによる軽い麻酔下で搾乳した。搾乳は 30 分間とし、13 時から 15 時の間で行なった。

3-2-2-3. 方法

乳清・血清調製

搾乳された乳サンプルは直ちに 4°C に移し、続いて 1,200 g、 4°C で 10 分間遠心を行なうことで、脂質層、細胞層、不溶物を除去した。得られた脱脂乳を 21,500 g、 4°C で 30 分間遠心し、残った脂質とカゼインを除去した。同操作は 2 回行なった。続いて 21,500 g、 4°C で 1 時間遠心し、さらにカゼインを除去した。血液サンプルは、1,200 g、 25°C 、10 分間遠心を行ない、血清を得た。得られた透明な液層（乳清）、血清を、0.65、0.45、0.22 μm のフィルター濾過を行なうことで、細胞残渣等を除去した。フィルター濾過後の乳清、血清サンプルは解析まで -80°C で保存した。

総 RNA の抽出・精製

上記で得られた乳清・血清サンプルからの総 RNA 抽出・精製は、本章 3-1-2 に記載の方法で行なった。得られた総 RNA を RNA 6000 Pico Kit および Small RNA Kit を用い 2100 Bioanalyzer を用いて測定した。

マイクロアレイ解析

miRNA マイクロアレイについては 70 ng の、mRNA マイクロアレイについては 100 ng の総 RNA を用い、3-1-2 に記載の方法に従って行なった。血清中の mRNA マイクロアレイ解析では、RNA 量が不足していたため、3 個体からの RNA を混合し、100 ng とした。RNA のラベル化とハイブリダイゼーション処理は、miRNA マイクロアレイは miRNA Complete Labeling Reagent and Hyb Kit を用い、Rat miRNA Microarray Rel. 14.0 (miRBase Rel. 14.0 に基づき、388 種類のラット miRNA を検出可) にハイブリダイゼーションさせた。mRNA マイクロアレイは Low RNA Input Linear Amplification Kit と Gene Expression Hybridization Kit を用い、Whole Rat Genome Oligo Microarrays (4×44K) (品質管理のためのコントロールプローブを除くと 41,090 プローブが含まれる) (共に Agilent Technologies) にハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション後洗浄操作を行ない、DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies) を用いて測定を行なった。測定イメージを Feature Extraction Software ver. 9.5.3.1 を用いて解析し、シグナル値を得た。

マイクロアレイデータ解析

得られたマイクロアレイシグナル値は、GeneSpring GX ver. 11.5.1 を用いて解析を行なった。mRNA データについては、GeneSpring で「発現」と判定され、かつ raw signal の値が 20 以上のものを「発現」とした。miRNA のターゲット mRNA は GeneSpring 付属の TargetScan により予測を行なった。miRNA のターゲットと予測された mRNA、マイクロアレイにより検出された mRNA は、共に Web ベースの Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, CA, USA) を用い、役割の推定を行なった。役割の推定後、IPA 内プログラムである right-tailed Fisher's Exact Test により順位付けを行ない、Benjamini-Hochberg Multiple Testing Correction により修正を行なった。Table 中 B-H *P*-value は Benjamini-Hochberg Multiple Testing Correction を行なった後の Category 内への統計的一致度を示す *P* 値である。マイクロアレイデータは National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Gene Expression Omnibus (GEO) に登録・公開した。付与されたデータセット番号は GSE44114 である。

定量 PCR による miRNA 定量

miRNA 定量のための cDNA 合成には、miScript Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用い、5 μ l の乳清または血清から抽出・精製した総 RNA から cDNA を合成した。得られた cDNA

溶液は Nuclease free water で 10 倍希釈し、各 miRNA に対するプライマー (miScript Primer Assay) (Table 3-2-1) と miScript SYBR Green PCR Kit を用い、定量 PCR を行なうことで発現量を求めた。リアルタイム PCR、melting curve analysis のプロトコルは 7500 Fast Real-Time PCR System を用い、本章 3-1-2 に記載の条件で行なった。

定量 PCR による mRNA 定量

mRNA 定量のための cDNA 合成には、High Capacity RNA-to-cDNA Kit を用い、5 μ l の乳清または血清から抽出・精製した総 RNA から cDNA を合成した。得られた cDNA 溶液は Nuclease free water で 10 倍希釈し、各 mRNA に対するプライマー (TaqMan Probe) (Table 3-2-2) と TaqMan Fast Advanced Master Mix を用い、定量 PCR を行なうことで発現量を求めた。リアルタイム PCR プロトコルは 7500 Fast Real-Time PCR System を用い、本章 3-1-2 に記載の条件で行なった。

乳清・血清中サイトカインおよびホルモン濃度測定

乳清および血清中の VEGF- α 、CCL5、CXCL1 は Milliplex Rat Cytokine/Chemokine Panel (RCYTO-80K)、インスリンは Milliplex Rat Bone Panel 1 (RBN1-31K) (共に Millipore) を使用し、Bio-Plex Protein Array System を用いて測定を行なった。得られたデータは Bio-Plex Manager 6.0 software を用いて解析を行なった (共に Bio-Rad Laboratories)。IGF-I、アディポネクチン濃度は ELISA キット (IGF-I: MG100、R&D Systems、アディポネクチン: KRP0041、Invitrogen) を用いて測定した。乳清・血清中の TGF- β は潜在型 (latent form) として存在しているため、検出のため酸で活性化する必要がある。血清サンプルはキット記載のプロトコルに従い、1/4 容量の 1 N HCl を添加し、室温で 30 分間活性化を行ない、血清の 1/5 容量の 0.5 M HEPES/1.2 N NaOH で中和した。乳清サンプルは Böttcher ら (155) の報告に従い、乳清の 1/10 容量の 1.2 N HCl を添加し、室温で 30 分間活性化を行ない、乳清の 1/4 容量の 0.5 M HEPES/0.72 N NaOH で中和した。TGF- β_1 、TGF- β_2 濃度は ELISA キット (TGF- β_1 : MB100、TGF- β_2 : DB250 共に R&D Systems) を用いて測定した。

3-2-2-4. 統計解析

Tukey-Kramer HSD test を用い、多重比較を行なった。有意水準は $P < 0.05$ とし、JMP software ver. 5.1 により行なった。

3-2-3. 結果

3-2-3-1. ラット乳清中 miRNA

RNA 濃度

Fig. 3-2-1 に RNA6000 Pico Kit、Small RNA Kit を用いて分析したラット乳清・血清 RNA の Bioanalyzer による電気泳動結果を示した。乳清・血清共に、他の種 (ヒト・ウシ) 同様、

18S、28S rRNA に由来するピークは全く、あるいはほとんど認められなかった。Small RNA 領域にはピークが認められ、Small RNA Kit による解析から、0-270 nt までの範囲にピークが認められた。Fig. 3-2-2 にラット乳清中 RNA 濃度・miRNA/small RNA 比の出産後経時変化、血清 RNA 濃度・miRNA/small RNA 比を示した。RNA 濃度は初乳乳清（出産後 2 日目）が成熟乳乳清（出産後 9、16 日目）・血清よりも格段に高く、miRNA/small RNA 比は血清が乳清よりも有意に高かった。乳清間の比較では、初乳乳清が成熟乳乳清よりも有意に高かった。

miRNA マイクロアレイ結果

Fig. 3-2-3 にラット乳清および血清 miRNA マイクロアレイ結果を示す。miRBase Rel. 14.0 に登録されているラット miRNA 388 種類の内、乳清では 161 種類、血清では 168 種類が検出された。その内 141 種類は乳清・血清両者に存在した。乳清間の比較では、出産後 2 日目、9 日目、16 日目の乳清にそれぞれ 128 種類、144 種類、143 種類が検出され、いずれの時期においても共通して検出された miRNA は 113 種類であった。miRNA 発現パターンは乳清と血清で大きく異なり、また、乳清間では初乳と成熟乳間に差が認められた。

ラット乳清中 miRNA の機能予測

マイクロアレイで乳清中に検出された miRNA 161 種類について、GeneSpring GX 搭載の TargetScan によりターゲット mRNA を予測したところ、11,634 種類の mRNA が影響を受けると考えられた。この 11,634 種類の mRNA の役割について、Web ベースのパスウェイ解析ソフト IPA で機能解析を行なった結果、「Cellular Development」、「Cell Cycle」や「Tissue Development」など成長に関与する機能に影響を及ぼすと考えられた。IPA により解析された Top 10 の役割を Table 3-2-3 に示す。

役割が報告されている miRNA の発現量

上記「ラット乳清中 miRNA の機能予測」で示した通り、miRNA のターゲットを予測するツールは進化してきているものの、実際に役割が判明している miRNA は多くない。しかしながら、「乳」は特に「免疫」と「発達」に重要な役割を果たしているため、両者について既に役割が報告されている miRNA について、マイクロアレイデータの抽出と定量 PCR による発現量確認を行なった。マイクロアレイデータから、「免疫」と「発達」に関連した miRNA を抽出し、ヒートマップとして表わしたものを Fig. 3-2-4 に、定量 PCR による確認を Fig. 3-2-5 に示した。これら miRNA から一部を選び、定量 PCR により乳清中の出産後経時変化を調べたところ、let-7c、miR-29a、miR-29c、miR-192、miR-21、miR-146a、miR-150、miR-223、miR-320 は出産後時期に関わらず一定であり、let-7i、miR-143、miR-148b-3p、miR-15b、miR-17-5p、miR-24、miR-27b、miR-92a、miR-106b、miR-125b-5p、miR-181a、miR-181c、miR-181d、miR-200c、miR-375、miR-107、miR-141、miR-370 は初乳乳清中の量が多かった。

また、血清との比較では、miR-192、miR-150、組織特異的に発現しているとされる miRNA である miR-451（血液に特異的とされる）、miR-122（肝臓に特異的とされる）が血清の方が乳清よりも多く、miR-223 は初乳乳清中とは差が無いものの、成熟乳乳清との比較では、血清中の方が多かった。これら以外の miRNA については、定量 PCR で比較した全ての miRNA で、乳清中で量が多かった。

3-2-3-2. ラット乳清中 mRNA

mRNA マイクロアレイ結果

Fig. 3-2-6 にラット乳清および血清 mRNA マイクロアレイ結果を示す。今回用いたマイクロアレイは 41,090 の mRNA transcript を検出することができるが、乳清では 10,948 種類、血清では 2,361 種類が検出された。その内 2,200 種類は乳清・血清両者に存在した。乳清間の比較では、出産後 2 日目、9 日目、16 日目の乳清にそれぞれ 8,110 種類、10,503 種類、8,966 種類が検出され、いずれの時期においても共通して検出された mRNA は 7,644 種類であった。mRNA 発現パターンは乳清と血清で大きく異なり、また、乳清間では初乳と成熟乳間に差が認められた。

ラット乳清中 mRNA の機能予測

マイクロアレイで乳清中に検出された mRNA 10,948 種類の役割について、IPA で機能解析を行なった結果、「RNA Post-Transcriptional Modification」、「Protein Synthesis」や「Infectious Disease」など、RNA 転写後調節、成長・感染に関与する機能に影響を及ぼすと考えられた。IPA により解析された Top 10 の役割を Table 3-2-4 に示す。

役割が報告されている mRNA の発現量

1 万を超える非常に多種類の mRNA が検出されたため、「免疫」「発達」「エクソソーム」関連 mRNA すなわち「乳たんぱく質」「乳エクソソーム関連」「ホルモン・成長因子」「ケモカイン」「サイトカイン」「IgA 誘導関連」「パターン認識レセプター関連」「miRNA プロセッシング関連」 mRNA を選択し、マイクロアレイデータ抽出、定量 PCR による存在量確認を行なった。マイクロアレイデータから抽出し、ヒートマップとして表わしたものを Fig. 3-2-7 に、定量 PCR による確認を Fig. 3-2-8 に示す。

Fig. 3-2-7 から、「乳たんぱく質」「乳由来エクソソーム」関連 mRNA が強く発現していることがわかった。「ホルモン・成長因子」「ケモカイン」「サイトカイン」「IgA 誘導関連」「パターン認識レセプター関連」「miRNA プロセッシング関連」については、一部を除き、必ずしも強く発現しているわけではなかった。これら mRNA から一部を選び、定量 PCR により乳清中の出産後経時変化を調べたところ、*Csn1s1*、*Csn2*、*Wap*、*Lpo*、*Cd63*、*Mif*、*Pigr*、*Sdcbp*、*Tgfb1*、*Tgfb2*、*Vegfa*、*Ccl5*、*Cxcl1*、*Il33*、*Tnfsf13* は出産後時期に関わらず一定であり、*Csn1s2a*、*Csn3*、*Lalba*、*Tf*、*Mfge8*、*Muc1*、*Cd81*、*Fasn*、*Lpl*、*Tgfb3* は初乳中乳清で存在量が多かつ

た。Tfについては、d 2 から d 9 にかけて減少し、d 16 で増加した。*Csn1s2b* のみ d 16 の方が有意に d 2 よりも存在量が多かった。また、血清との比較では、*Muc1* について d 16 乳清と、*Cd63* について d 9 乳清と血清が同等の存在量であった以外は、全て乳清の方が存在量が多かった。

3-2-3-3. 乳清・血清中サイトカインおよびホルモン濃度

乳清・血清中サイトカインおよびホルモン濃度測定結果を Fig. 3-2-9 に示す。乳清中の出産後経時変化を調べたところ、TGF- β_2 のみ初乳中で有意に多く、VEGF- α については、d 2 初乳乳清で d 9 よりも有意に多いものの、d 16 成熟乳とは差が無かった。血清との比較では、TGF- β_1 、IGF-I、アディポネクチン、CCL5 について血清中濃度の方が有意に高く、TGF- β_2 、VEGF- α は乳清中濃度の方が高かった。インスリン、CXCL1 については乳清・血清間に差はなかった。

3-2-4. 考察

本章 3-2 では、動物実験によく用いられるげっ歯類であるラットの乳清中 miRNA、mRNA 存在有無、出産後経時変化を検討した。

初乳乳清 (d 2)、成熟乳乳清 (d 9, 16) および血清から総 RNA を抽出・精製し、Bioanalyzer による電気泳動を行なったところ、これまでのヒト (72) およびウシ (73) での結果同様 18S、28S rRNA に由来するピークは全く、あるいはほとんど認められず、300 ヌクレオチド以下の small RNA 領域にピークを認めた。RNA 濃度は数千~数万 ng/ml であり、ウシ同様初乳乳清中で有意に多く、成熟乳乳清・血清の数倍以上であった。乳中の RNA 濃度に関する報告は少ないが、我々が調べたところ、ヒト乳清中 RNA 濃度は数 ng/ml~数百 ng/ml (72)、ウシ乳清中 RNA 濃度は数百 ng/ml (73) であったことから、ラット乳清にはヒト・ウシの数十から数百倍含まれていることになる。哺乳類の新生児 (仔) にとって唯一の栄養源である「乳」の組成は、種によって大きく異なり、各哺乳類の乳はその種 (仔) にとって最適な組成であると考えられている。一般的に成長の速い種の乳は栄養分が濃い。ヒトやウシよりも成長の速いラットの乳清中 RNA 濃度が高かったこと、ラクトフェリンや IgA などの感染防御因子と同様に初乳中濃度が高かったことは、乳中 RNA が免疫発達や感染防御など、何らかの機能を果たしている可能性を示唆する。また、small RNA kit を用いた電気泳動では、300 ヌクレオチド程度の small RNA のサイズを調べることができるが、small RNA 領域における miRNA の比を意味する miRNA/small RNA 比は血清が最も高く、次いで初乳、成熟乳であった。small RNA 領域には piwi interacting RNA (piRNA) や miRNA の前駆体である pre-miRNA などが存在すると考えられるため、血清・初乳・成熟乳中に含まれるこれら RNA の構成が異なる可能性も示唆される。

等量の RNA 量を用いた miRNA マイクロアレイの scatter plot 解析では、miRNA 発現パターンについて、乳清と血清では大きな差があること、初乳と成熟乳乳清間にも差があり、

成熟乳間にはあまり差がないことが示された。乳清では miR Base Rel. 14.0 に登録されていたラット miRNA 388 種類の内 161 種類が検出され、初乳 (d 2) 乳清で 128 種類、d 9 成熟乳乳清で 144 種類、d 16 成熟乳乳清で 143 種類が検出された。血清では 168 種類検出され、乳清で検出された 161 種類と 141 種類が共通して発現していたが、上述の scatter plot、また、gene tree から、その発現パターンは大きく異なっていた。

本章 3-1 にも示した通り、数多くの miRNA が見つかったものの、実験的に役割が同定された miRNA はそれほど多くない。従って、3-1 項同様「免疫」と「発達」に関して役割が報告されている miRNA について、マイクロアレイデータから抽出し、ヒートマップを作成した。また、ヒートマップに選択された中でも、役割について、より研究されている miRNA を選択し、定量 PCR によって等量の乳清中・血清中発現量の確認を行なった。Fig. 3-2-4 から、「免疫」「発達」両者あるいはどちらか片方に関連する miRNA が数多く発現していることがわかった。ただし、「免疫」「発達」に関与する miRNA が全て発現しているわけではないこと、これまでのヒト (72, 156)、ウシ (73, 125)、ブタ (157) の結果同様、血液・筋肉・脾臓・肝臓・脳および神経などの臓器特異的に発現しているとされる miRNA は全く、あるいはほとんど発現していなかった。等量の乳清・血清中 miRNA の定量 PCR による比較では、miR-192、miR-150 が血清で多く、miR-223 が初乳を除く成熟乳乳清よりも血清で多かった。以前のヒトの結果でも miR-150、miR-223 は乳清よりも血清で多いことが確認されていることから、両 miRNA が乳清よりも血清で多いことは種を超えて一致する結果と考えられる。乳清中の発現量経時変化を調べた結果では、let-7c、miR-29a、miR-29c、miR-192、miR-21、miR-146a、miR-150、miR-223、miR-320 は出産後時期に関わらず一定であり、let-7i、miR-143、miR-148b-3p、miR-15b、miR-17-5p、miR-24、miR-27b、miR-92a、miR-106b、miR-125b-5p、miR-181a、miR-181c、miR-181d、miR-200c、miR-375、miR-107、miR-141、miR-370 は初乳中乳清で発現量が多かったが、miR-15b、miR-27b、miR-106b についてはウシの結果 (73) と一致するものの、ウシでは等量の初乳・成熟乳両乳清間で差がなかった miR-29b が、ラットでは初乳で高発現しており、ウシでは初乳で発現量が多かった miR-223 が、ラットでは出産後の時期に関わらず一定レベルであるなど、ウシとは異なる結果であった。このことは、乳中に含まれる miRNA の一部の種類の役割は、種によって異なることが示唆される。

初乳乳清中に高発現している miRNA の内、let-7i、miR-148b-3p、miR-27b、miR-125b-3p は抗原提示細胞機能に、miR-15b、miR-24、miR-92a、miR-181a、miR-181c、miR-181d は T 細胞発達と機能に影響を与えることが知られている (133, 136, 158)。また、let-7i には TLRs 発現の低下、miR-125b には TNF- α 産生抑制が報告されており (136, 158)、ヒト (147) およびウシ (145) 初乳には抗炎症作用があることを考慮すると、乳中 miRNA が抗炎症作用のメカニズムの一端を担っている可能性がある。また、「発達」の観点で見ても、消化管機能制御機能が示唆されている miR-143、miR-148b-3p、miR-141 (159, 160)、炭水化物、脂質代謝を調節する miR-107、miR-370 (161, 162) が初乳中に高発現していることは興味深い。

mRNA については、10,948 種類と、非常に多種類が乳清中に検出された。乳は児（仔）の発達に必要な栄養を提供するだけでなく、免疫賦活や抗菌因子としても働くと考えられ、本章 3-1 で示した牛乳の検討からエクソソームに関連する mRNA が含まれると考えられたため、「発達」「免疫」「エクソソーム」関連 mRNA すなわち「乳たんぱく質」「乳エクソソーム関連」「ホルモン・成長因子」「ケモカイン」「サイトカイン」「IgA 誘導関連」「パターン認識レセプター関連」「miRNA プロセッシング関連」 mRNA を選択し、マイクロアレイデータ抽出、定量 PCR による発現量確認を行なった。「乳たんぱく質」「乳由来エクソソーム」関連 mRNA が強く発現していることがわかったが、これら以外のカテゴリーでは、*Sdcbp*、*B2m* が比較的強く発現していた。*Sdcbp*、*B2m* と「乳たんぱく質」 mRNA の翻訳産物であるたんぱく質は、プロテオーム解析から乳由来エクソソーム中に見出されており (147)、「乳エクソソーム関連」と分類することも可能である。以上のことから、乳清中に強く発現する mRNA は、乳由来エクソソームたんぱく質の結果を反映しており、このことは、mRNA がエクソソーム内に含まれることを示唆する。定量 PCR により乳清中の出産後経時変化を調べたところ、*Csn1s1*、*Csn2*、*Wap*、*Lpo*、*Cd63*、*Mif*、*Pigr*、*Sdcbp*、*Tgfb1*、*Tgfb2*、*Vegfa*、*Ccl5*、*Cxcl1*、*Il33*、*Tnfsf13* は出産後時期に関わらず一定であり、*Csn1s2a*、*Csn3*、*Lalba*、*Tf*、*Mfge8*、*Muc1*、*Cd81*、*Fasn*、*Lpl*、*Tgfb3* は初乳中乳清で発現量が多かった。*Tf* (トランスフェリン) については、d 2 から d 9 にかけて減少し、d 16 で増加した。この結果は、ラット乳中のトランスフェリンたんぱく質とラット乳腺中 mRNA を調べた以前の報告 (163) と一致する。*Csn1s2b* のみ d 16 の方が有意に d 2 よりも発現量が多かったが、*Csn1s1*、*Csn1s2a*、*Csn1s2b*、*Csn2*、*Csn3* と各種カゼインをコードする mRNA 発現量が出産後経時的に変化することは興味深い。3-1-4 に記載した通り、単球、単球系細胞株、T 細胞、細胞傷害性 T 細胞系細胞株にカゼインの mRNA が発現することが以前に報告されており、カゼインの免疫系への関与が考えられている (149, 150) が、出産後各種カゼイン mRNA が変化することは、児（仔）の発達に各カゼインが果たす役割が異なることを示唆するのかもしれない。

我々は 10,948 種類の mRNA を検出したが、Maningat ら (164) はヒト乳脂肪球中に 14,070 種類の mRNA を検出している。彼らはヒト乳脂肪球中に最も高発現している mRNA をリストアップしているが、その中で *CSN1S1*、*CSN2*、*CSN3*、*LALBA*、*XDH*、*MFGE8*、*MUC1* は「乳たんぱく質」に分類でき、*FASN*、*CD81*、*CD36* は「乳由来エクソソーム関連」と分類できる。これらの結果は、我々のラット乳清中に高発現している mRNA の結果と一致する。一方で、彼らは *TPT1*、*SPPI*、*CEL*、*GNB2L1*、*TMSB4X* などリストに挙げているが、これらはラット乳清中には全く、あるいはほとんど発現していない。Wickramasinghe ら (165) は牛乳中に含まれる体細胞を高速シーケンサーを用いて解析し、19,094 種類の mRNA を検出している。彼らは「乳たんぱく質」に分類できるものとしては、*CSN1S1*、*CSN1S2*、*CSN2*、*CSN3*、*LALBA*、*LGB* を、その他 *GLYCAM1*、*SPPI* など高発現している mRNA のリストとして挙げているが、乳由来エクソソーム関連としては *APOE* しか高発現 mRNA のリストとして挙げていない。以上のことから、乳中に含まれる mRNA の役割の一部は、乳清・乳

脂肪球・乳中細胞で共通している可能性と、画分や種による差が存在する可能性が示唆される。

乳中には多くの成長因子・ホルモン・ケモカインなどが存在する。その中から一部について、乳清中出産後経時変化・血清濃度を調べた。乳清と血清の比較では、TGF- β_1 、IGF-I、アディポネクチン、CCL5について血清中濃度の方が有意に高く、TGF- β_2 、VEGF- α は乳清中濃度の方が高かった。また、乳清間の比較では、TGF- β_2 のみ初乳中で有意に多く、VEGF- α については、d 2 初乳乳清で d 9 よりも有意に多いものの、d 16 成熟乳とは差が無かった。これらの結果が示唆するのは、乳中に含まれる生理活性因子が乳児（仔）の成長などに何らかの役割を果たしていることと、発達時期によって必要量が異なる可能性を示している。また、興味深いことに、アディポネクチンとインスリンの mRNA はマイクロアレイ・定量 PCR 両者で検出されず、IGF-I はマイクロアレイによる解析では低発現だったが、アディポネクチンたんぱく質は $\mu\text{g/ml}$ 、インスリン・IGF-I たんぱく質は ng/ml で乳清および血清に存在するなど、mRNA レベルでは全く、あるいはほとんど検出されなかった因子が、たんぱく質レベルでは比較的豊富に存在するなど、たんぱく質量と mRNA 量は必ずしも一致していなかった。このことは、乳中 mRNA が翻訳後のただの残渣でないことを示唆する。乳腺細胞内の mRNA 量を反映しているのではなく、mRNA として何らかの役割を果たしているのかもしれない。

3-2-5. 小括

本項では、ヒト、ウシ、ブタなどと同様、ラット乳清中にも miRNA が存在し、mRNA も存在することを示すこと、また、初乳乳清中 RNA 濃度は成熟乳乳清と比較し非常に高いこと、miRNA・mRNA 発現の出産後経時変化、ある種の乳中生理活性因子たんぱく質濃度と mRNA が必ずしも一致しないことを示すことができた。乳清中 RNA の *in vivo* における役割は未だ示すことができていないため、今後の研究が必要なことは間違いないが、乳中 RNA の役割に関して調べる前に、どのような miRNA や mRNA が含まれているのかを知ることが重要である。本項ではラット乳清中 mRNA の網羅的解析を行なったが、乳清中 mRNA の網羅的解析は他の種を含め、初めての報告であり、基礎的な情報取得の点で意義があると考えられる。

Table 3-2-1 : Primers used for miRNA assay.

	miRNA	Product no.
1	let-7a	MS00005460
2	let-7c	MS00005467
3	let-7e	MS00012922
4	let-7i	MS00000028
5	miR-29a	MS00000168
6	miR-29b	MS00005544
7	miR-29c	MS00000175
8	miR-143	MS00000420
9	miR-148b-3p	MS00000448
10	miR-192	MS00000539
11	miR-15b	MS00013097
12	miR-17-5p	MS00013118
13	miR-21	MS00013216
14	miR-24	MS00005537
15	miR-27b	MS00000154
16	miR-31	MS00000203
17	miR-92a	MS00005579
18	miR-106b	MS00000301
19	miR-125b-5p	MS00005600
20	miR-146a	MS00000441
21	miR-146b	MS00013062
22	miR-150	MS00000455
23	miR-181a	MS00013125
24	miR-181b	MS00005677
25	miR-181c	MS00013132
26	miR-181d	MS00013139
27	miR-200c	MS00000595
28	miR-223	MS00033320
29	miR-375	MS00033516
30	miR-103	MS00005586
31	miR-107	MS00033173
32	miR-141	MS00000413

Table 3-2-2 : TaqMan probes used for the mRNA assay.

	mRNA	Product no.
1	Csn (casein)1s1	Rn01524597_m1
2	Csn1s2a	Rn01524579_m1
3	Csn1s2b	Rn00597435_m1
4	Csn2	Rn01524626_m1
5	Csn3	Rn00580733_m1
6	Lalba (α -lactalbumin)	Rn01532920_m1
7	Wap (whey acidic protein)	Rn01461679_m1
8	Lpo (lactoperoxidase)	Rn01751775_m1
9	Tf (transferrin)	Rn01445482_m1
10	Mfge8 (milk fat globule-EGF 8)	Rn00563082_m1
11	Xdh (xanthine oxidase)	Rn00567654_m1
12	Muc1 (mucin 1)	Rn01462585_m1
13	Cd63	Rn00567481_m1
14	Cd81	Rn00565272_m1
15	Fasn (fatty acid synthase)	Rn00569117_m1
16	Lpl (lipoprotein lipase)	Rn00561482_m1
17	Mif (macrophage migration inhibitory factor)	Rn00821234_g1
18	Pigr (polymeric immunoglobulin receptor)	Rn00562362_m1
19	Sdcbp (syndecan binding protein)	Rn01220868_m1
20	Tgfb1	Rn00572010_m1
21	Tgfb2	Rn00676060_m1
22	Tgfb3	Rn00565937_m1
23	Vegfa (vascular endothelial growth factor)	Rn00582935_m1
24	Ccl5	Rn00579590_m1
25	Ccl28	Rn00586715_m1
26	Cxcl1	Rn00578225_m1
27	Il33	Rn01759837_m1
28	Tnfsf13	Rn01467490_g1
29	Acadc (adiponectin)	Rn00595250_m1
30	Insulin 1	Rn02121433_g1
31	Tnfrsf11b	Rn00563499_m1

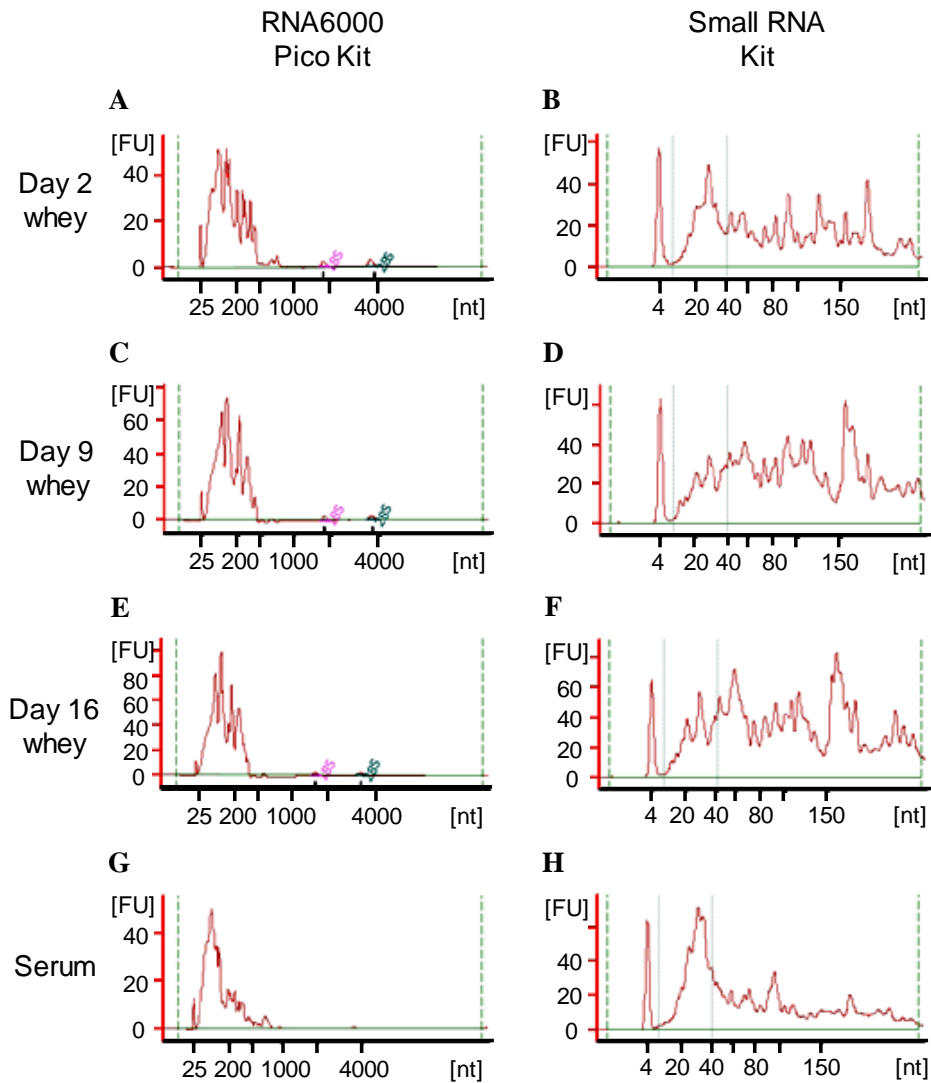


Figure 3-2-1 : Bioanalyzer analysis of RNAs in rat whey and serum. (A, B) Day 2 whey; (C, D) Day 9 whey; (E, F) Day 16 whey; (G, H) Serum; (A, C, E, G) Analysis using the RNA 6000 Pico Kit; (B, D, F, H) Analysis using the Small RNA Kit. Whey RNA concentrations were very high (especially in day 2 whey), so diluted RNA results are shown in this figure. FU = fluorescence units.

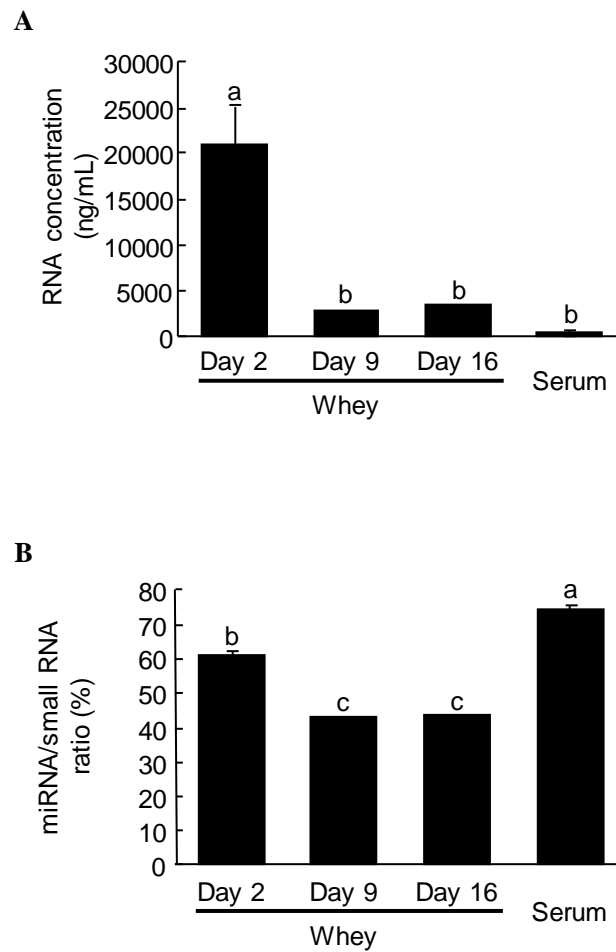


Figure 3-2-2 : RNA concentration and miRNA/small RNA ratio of RNA samples purified from rat whey and serum. (A) RNA concentrations in rat milk whey and serum. (B) miRNA/small RNA ratio; Values are the mean \pm SEM (n = 3). Means without letters in common differ ($P < 0.05$, Tukey-Kramer HSD test).

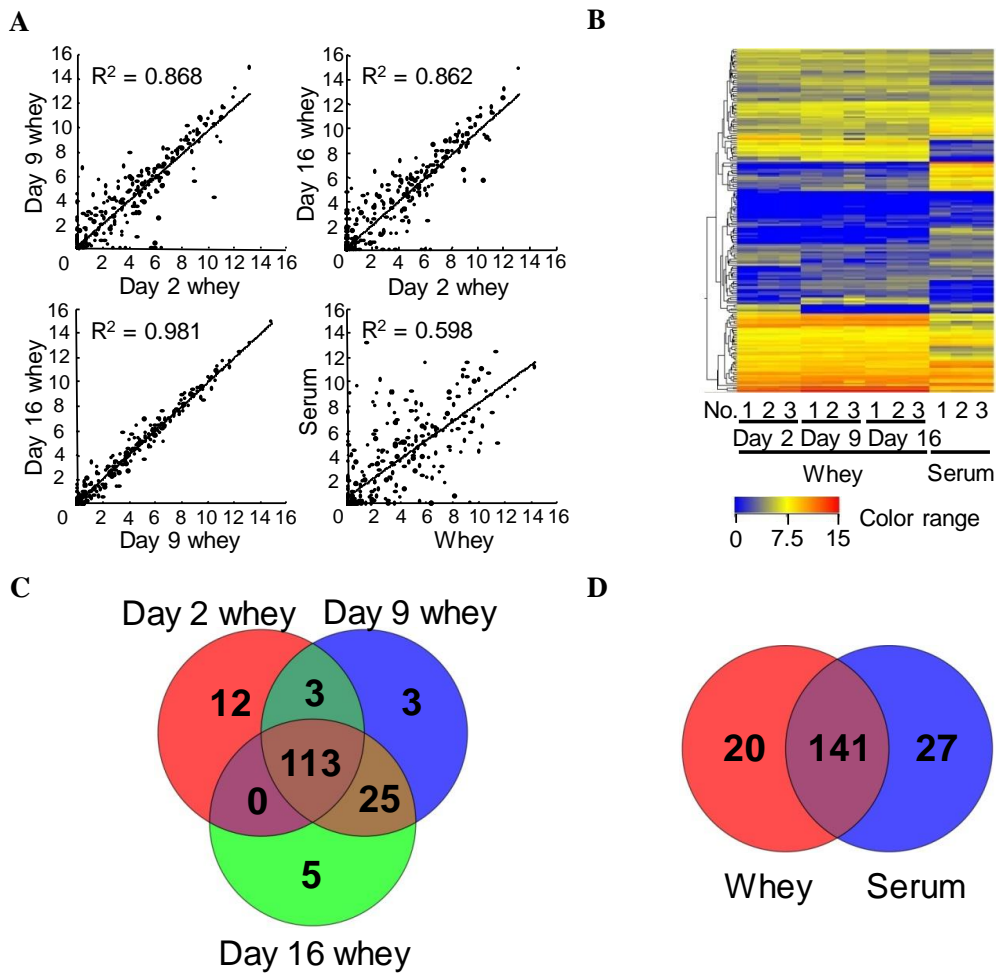


Figure 3-2-3 : miRNA microarray profiles of rat whey and serum. (A) Scatter plots of averaged whey and serum array data. (B) Heat map of the normalized array data for miRNAs detected in whey or serum samples. (C) Venn diagram of numbers of miRNAs detected in each type of whey. (D) Venn diagram of numbers of miRNAs detected in whey and serum.

Table 3-2-3 : Functions of predicted targets of whey miRNAs

Rank	Category	B-H <i>P</i> -value
1	Cellular Development	1.61E-62 - 4.57E-13
2	Cancer	1.12E-61 - 9.18E-13
3	Cell Cycle	1.28E-59 - 8.79E-13
4	Cellular Growth and Proliferation	1.26E-58 - 4.52E-13
5	Cell Death	1.34E-56 - 6.17E-13
6	Cellular Movement	1.45E-55 - 5.59E-13
7	Gene Expression	2.32E-49 - 6.23E-13
8	Tissue Development	7.7E-49 - 7.19E-13
9	Gastrointestinal Disease	3.24E-45 - 2.6E-13
10	Organismal Development	5.38E-45 - 7.19E-13

The predicted targets (from TargetScan) were examined by Ingenuity Pathway Analysis. Ranks were determined by right-tailed Fisher's Exact Test and were corrected by Benjamini-Hochberg Multiple Testing Correction. B-H *P*-value = Benjamini-Hochberg *P*-value

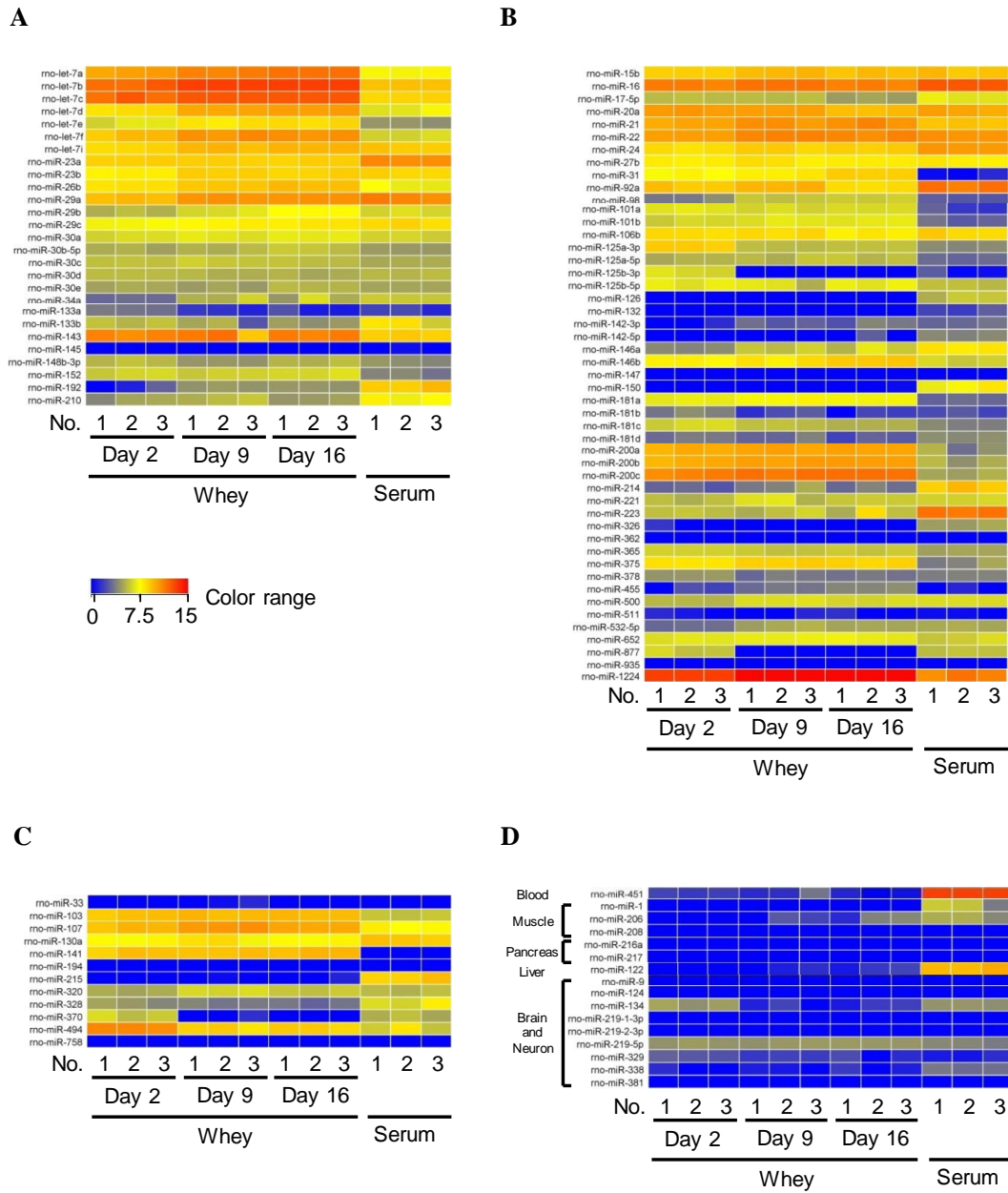


Figure 3-2-4 : Heat maps of selected miRNAs from microarray data (detected or not). (A) Immune- and development-related miRNAs. (B) Immune-related miRNAs. (C) Development-related miRNAs. (D) Tissue-specific miRNAs.

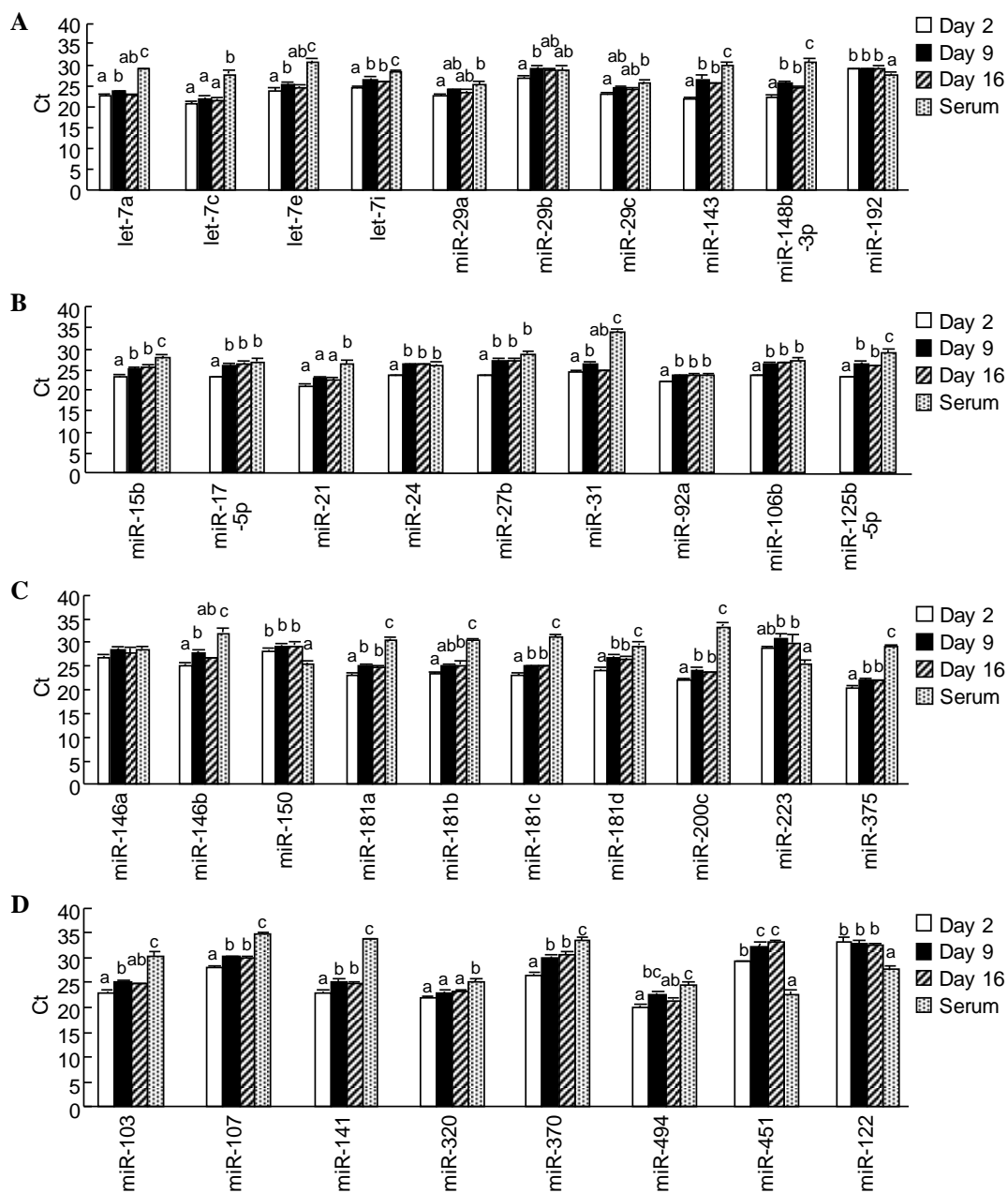


Figure 3-2-5 : Quantitative PCR analysis of selected miRNAs in equal volumes of whey and serum. An aliquot of total RNA from 0.5- μ L was used for each miRNA. Values are the mean \pm SEM (n = 3). Means without letters in common differ ($P < 0.05$, Tukey-Kramer HSD test). High Ct means low expression and low Ct means high expression.

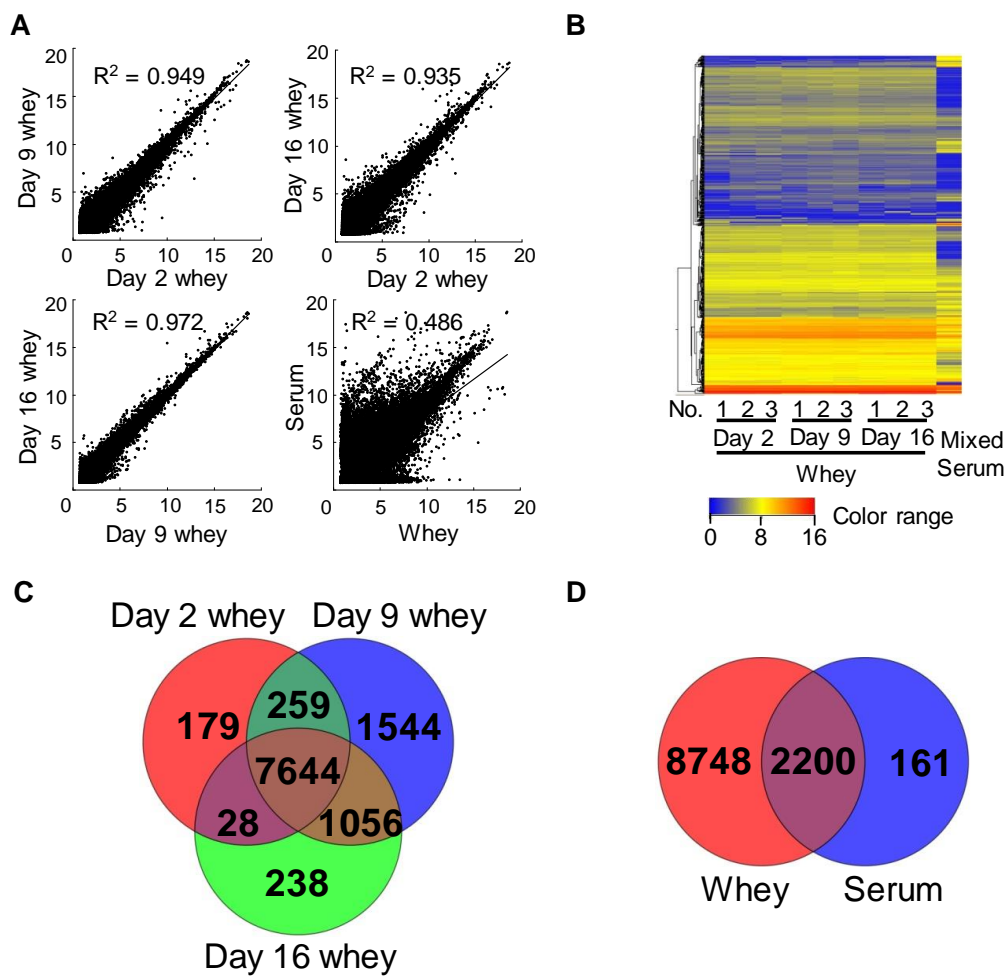


Figure 3-2-6: mRNA microarray profiles of rat whey and serum. (A) Scatter plots of averaged whey array data and mixed serum array data. (B) Heat map of the normalized array data for mRNAs detected in whey or mixed serum samples. (C) Venn diagram of numbers of transcripts detected in each type of whey. (D) Venn diagram of numbers of transcripts detected in whey and serum.

Table 3-2-4 : Functions of transcripts detected in whey.

Rank	Category	B-H <i>P</i> -value
1	RNA Post-Transcriptional Modification	1.3E-31 - 3.49E-01
2	Protein Synthesis	8.01E-22 - 3.47E-01
3	Infectious Disease	8.01E-22 - 3.47E-01
4	Cell Death	7.85E-18 - 3.49E-01
5	Molecular Transport	4.79E-17 - 2.97E-01
6	Protein Trafficking	4.79E-17 - 2.97E-01
7	Cell Cycle	3.43E-16 - 3.49E-01
8	DNA Replication, Recombination, and Repair	2.18E-15 - 3.49E-01
9	Post- Translational Modification	4.38E-14 - 3.49E-01
10	Organismal Injury and Abnormalities	2.02E-13 - 3.14E-01

Transcripts detected by microarray analysis were examined by Ingenuity Pathway Analysis. Ranks were determined by the right-tailed Fisher's Exact Test and were corrected by Benjamini-Hochberg Multiple Testing Correction. B-H *P*-value = Benjamini-Hochberg *P*-value.

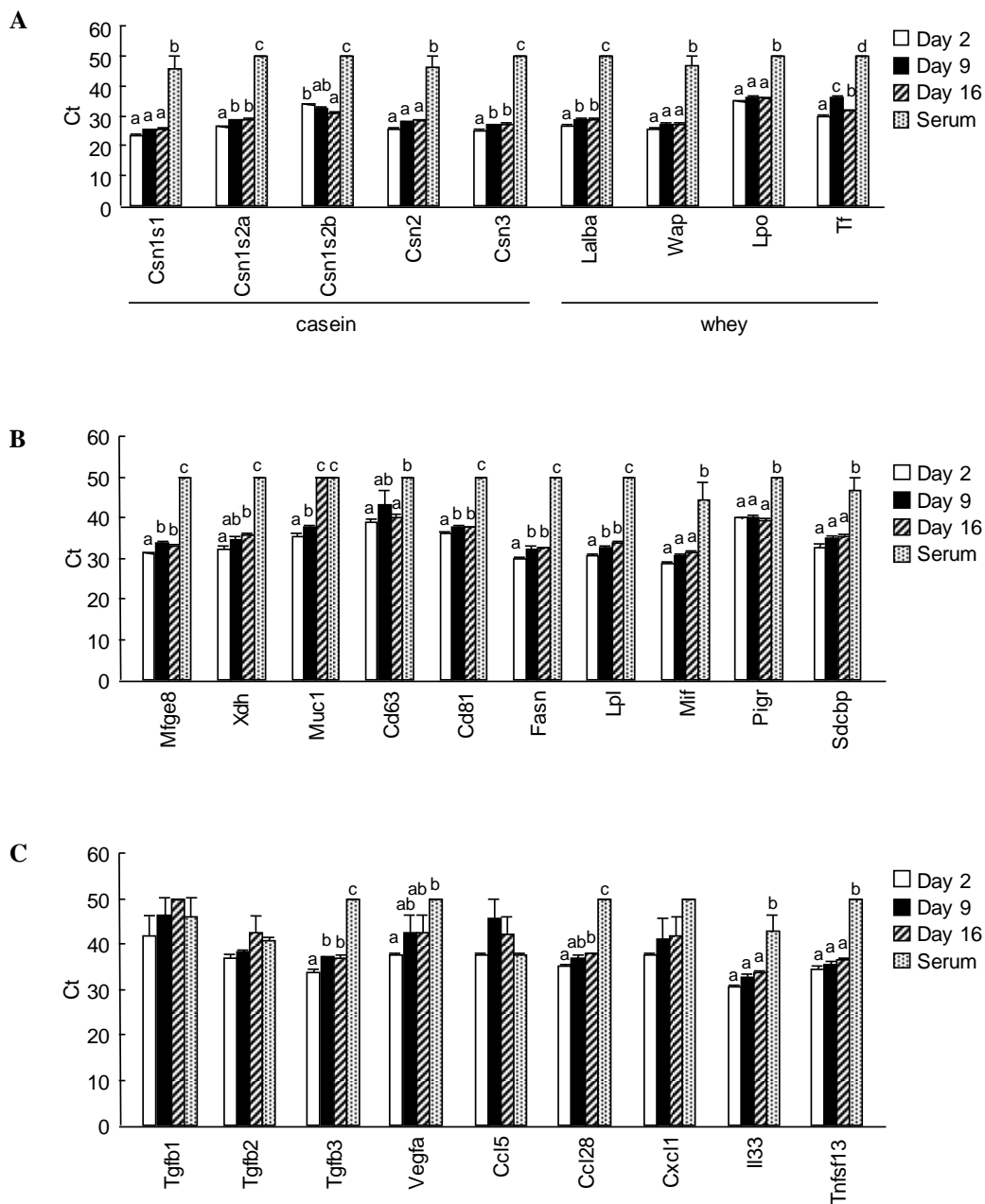


Figure 3-2-8 : Quantitative PCR analysis of selected mRNAs in equal volumes of whey and serum. An aliquot of total RNA from 0.5- μ L was used for each mRNA. Non-detected mRNAs were assigned a Ct value of 50. Values are the mean \pm SEM (n = 3). Means without letters in common differ ($P < 0.05$, Tukey-Kramer HSD test). High Ct means low expression and low Ct means high expression.

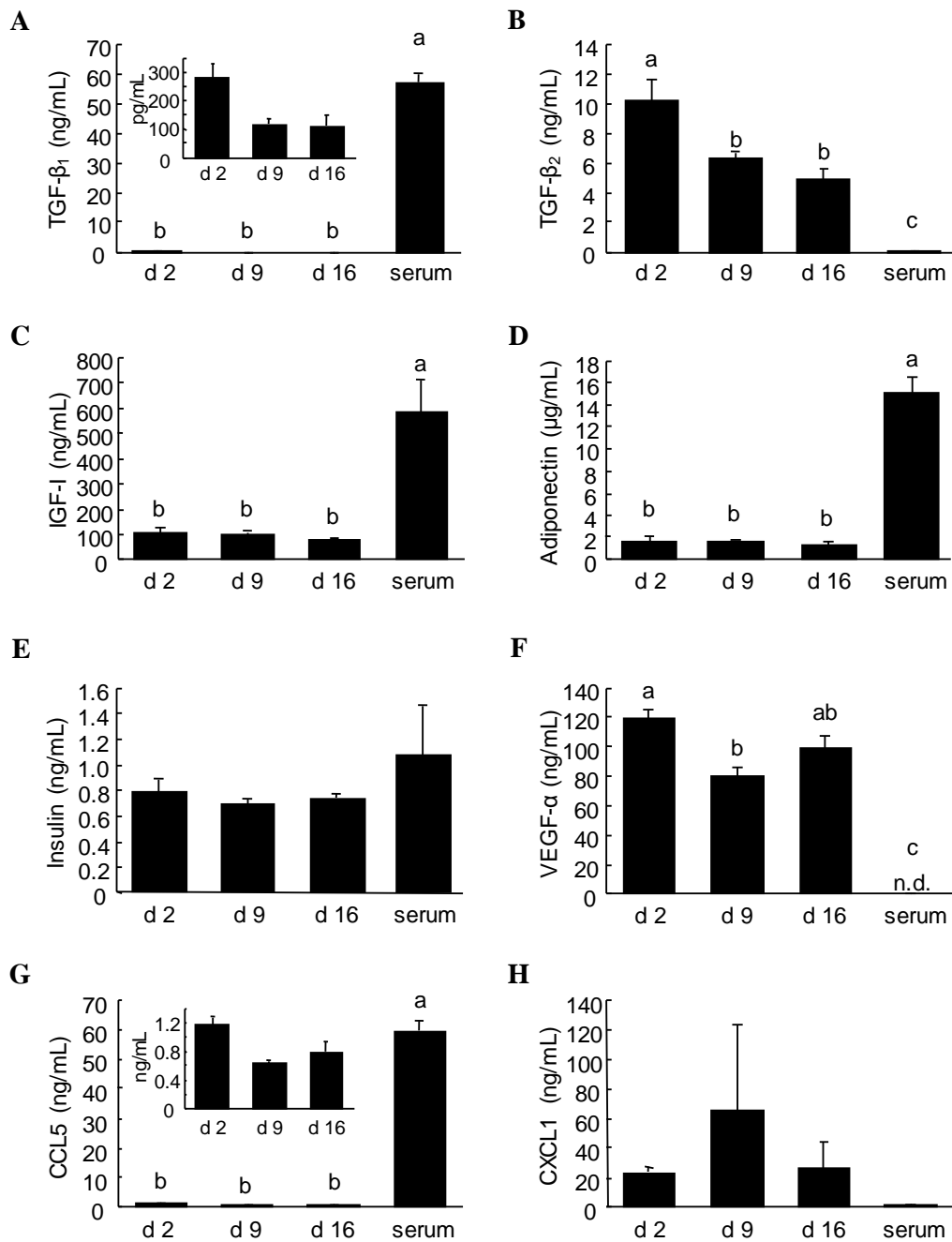


Figure 3-2-9 : Growth factor, hormone and chemokine concentrations in whey and serum. (A) Transforming growth factor (TGF)- β_1 . (B) TGF- β_2 . (C) IGF-I. (D) Adiponectin. (E) Insulin. (F) VEGF- α . (G) CCL5. (H) CXCL1. (A-D) Measured using ELISA kits. (E-H) Measured using Milliplex panels. Values are the mean \pm SEM (n = 3). Means without letters in common differ ($P < 0.05$, Tukey-Kramer HSD test).

3-3. ウシ生乳中 miRNA, mRNA の存在形態

3-3-1. 緒言

3-2 項でラット乳中にも miRNA、mRNA が存在することを示した。ヒト母乳の結果、3-1 項で示した牛乳の結果、さらに初乳に多いという種を超えた事象などから、乳中の RNA は何らかの機能を示すことが示唆される。また、3-1 項で示した通り、乳中の機能性 RNA は酸や RNase に対して抵抗性があり、界面活性剤処理によって分解されることから、エクソソームのような脂質膜中に存在することが示唆される。ところで、血中の miRNA は高密度リポたんぱく質 (HDL) や Argonaute 2 とのたんぱく質複合体など、エクソソーム以外の形態での存在も知られており、実際、調製粉乳中の RNA 濃度は、製造過程を経ているとはいえ、原料である牛乳中濃度よりも大幅に少なく、乳中 RNA にもエクソソーム以外の形態で存在するものがあることが示唆される。そこで本章では、ウシ生乳を用い、エクソソームとエクソソーム以外に存在する miRNA、mRNA を明らかにすることを目的とし、検討を行なった。また、乳を含め体液中 RNA は濃度が薄いため、精製キットによる回収率の差異も検討した。

3-3-2. 材料と方法

3-3-2-1. 材料

本実験で使用した牛乳は、森永乳業株式会社研究所で試作等に使用される生乳を用いた。森永乳業・栄養科学研究所に到着後は使用まで -80°C で保存した。

3-3-2-2. 方法

乳清調製

3-1-2-2 項に記載の方法に準じて行なった。すなわち、牛乳サンプルを 1,200 g、 4°C で 10 分間遠心を行ない、脂質層、細胞層、不溶物を除去した。同操作を 2 回行ない、得られた脱脂乳を 21,500 g、 4°C で 30 分間遠心し、残った脂質とカゼインを除去した。続いて 21,500 g、 4°C で 1 時間遠心し、さらにカゼインを除去した。得られた透明な液層 (乳清) を、0.65、0.45、0.22 μm のフィルター濾過を行なうことで、細胞残渣等を除去した。

キットによる総 RNA 抽出・精製効率差の検討

本章 3-1-2-2 に記載の方法に従い、上記で得られた乳清サンプルに 5 倍量の QIAzol を添加し、ボルテックスで良く攪拌し、5 分間室温で静置した (変性サンプル)。cel-miR-39 を 3.5 μl (0.267 nM、 1.6×10^8 copies/ μl) 上記変性サンプル 1.2 ml に添加した。次に使用した乳清と等量のクロロホルムを添加し、ボルテックスで良く攪拌後、3 分間室温で静置し、12,000 g、 4°C で 15 分間遠心した。水層部分を注意深く採取し、得られた水層量の 1.5 倍量の 100% エタノールを加えて良く攪拌し、miRNeasy Mini Kit または miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN) を用いて精製した。得られた総 RNA を RNA 6000 Pico Kit および Small RNA Kit

を用い、2100 Bioanalyzer を用いて測定した。

エクソソームおよび超遠心後上清の調製

Lässer ら (166) の方法に従い、上記で得られた乳清サンプルを SRP70AT ローター (日立工機、東京) を用い、100,000 g、4°C で 90 分間超遠心を行なった。ペレット状になったエクソソームを混入させないように、注意深く上清を得た。ペレット状エクソソームは PBS で再懸濁し、再度上記の条件で超遠心することで洗浄した。洗浄操作を計 2 回行ない、洗浄後のエクソソームは PBS で再懸濁し、Micro Bradford protein assay (Bio-Rad) を用いてたんぱく質量の測定を行なった。

エクソソームおよび超遠心後上清からの総 RNA 抽出・精製

上述した精製キットによる差を検討した結果を踏まえ、精製は miRNeasy Serum/Plasma Kit を用いた。

miRNA マイクロアレイ解析

3 Lot.の生乳から調製したエクソソーム、および超遠心後上清の総 RNA を等量混合し、40 ng の総 RNA を 3-1-2-2 記載の方法に準じ、Bovine miRNA Microarray Rel. 17.0 (miRBase Rel. 17.0 に基づきデザインされたマイクロアレイ、670 種類のウシ miRNA を検出できる) にハイブリダイゼーションした。本操作に必要な試薬は miRNA Complete Labeling Reagent and Hyb Kit を用いて行なった。ハイブリダイゼーション後洗浄操作を行ない、DNA Microarray Scanner を用いて測定を行なった。測定イメージを Feature Extraction Software ver. 10.7.3.1 を用いて解析し、シグナル値を得た。

mRNA マイクロアレイ解析

3 Lot.の生乳から調製したエクソソーム、および超遠心後上清の総 RNA を等量混合し、100 ng の総 RNA を 3-1-2-2 記載の方法に準じ、Bovine Oligo DNA Microarray ver. 2.0 (4×44K) (品質管理のためのコントロールプローブを除くと 43,713 プローブが含まれる) にハイブリダイゼーションした。本操作に必要な試薬は Low Input Quick Amp Labelling Kit を用いて行なった。ハイブリダイゼーション後洗浄操作を行ない、DNA Microarray Scanner を用いて測定を行なった。測定イメージを Feature Extraction Software ver. 10.7.3.1 を用いて解析し、シグナル値を得た。

マイクロアレイデータ解析

得られたマイクロアレイシグナル値は、GeneSpring GX ver. 11.5.1 を用いて解析を行なった。mRNA データについては、GeneSpring で「発現」と判定され、かつ raw signal の値が 20 以上のものを「発現」とした。マイクロアレイデータは NCBI の GEO に登録・公開した。

付与されたデータセット番号は GSE61978 である。

定量 PCR によるエクソソームおよび超遠心上清中 miRNA、mRNA 定量

miRNA、mRNA 共に 3.2 ml の生乳に由来するエクソソームおよび超遠心上清から抽出・精製した RNA を用い、3-1-2-2 に記載の方法に従って行なった。miRNA 定量に用いたプライマーを Table 3-3-1 に、mRNA 定量に用いたプライマーを Table 3-3-2 に示す。

3-3-2-3. 統計解析

2 群間の比較には Student's *t*-test を用い、多重比較では Tukey-Kramer HSD test を用いた。有意水準は $P < 0.05$ とし、JMP software ver. 5.1 により行なった。

3-3-3. 結果

3-3-3-1. キットによる総 RNA 抽出・精製効率差の検討

Fig. 3-3-1 に RNA 抽出・精製後の Bioanalyzer 電気泳動結果を、Fig. 3-3-2 に RNA 濃度、miRNA/small RNA 比の結果を示す。Exosome を調製後、抽出・精製することで RNA 量は減少し、miRNA/small RNA 比も減少した。キットによる比較では、両キット共に安定して RNA を精製・回収することができたが、miRNeasy Serum/Plasma Kit を用いた方が回収量はわずかに良かった。添加した cel-miR-39 回収率の結果 (Fig. 3-3-3)、複数の miRNA (Fig. 3-3-4)、mRNA (Fig. 3-3-5) の結果も同様であった。

3-3-3-2. エクソソームおよび超遠心上清中 miRNA

RNA 濃度

超遠心により調製したエクソソーム、および超遠心上清から抽出・精製した RNA の Bioanalyzer 電気泳動結果を Fig. 3-3-6 に示す。エクソソームと超遠心上清の RNA 濃度は、エクソソームで有意に多く、3 Lot. の生乳の結果から、エクソソームとそれ以外の形態で存在する RNA はおよそ 7:3 であった。miRNA/small RNA 比は超遠心上清で有意に高かった。(Fig. 3-3-7)

miRNA マイクロアレイ結果

miRNA マイクロアレイ解析の結果を Table 3-3-8 に示す。エクソソームには 79 種類、超遠心上清には 91 種類の miRNA が検出され、両者に共通して検出された miRNA は 39 種類であったが、シグナル強度は異なっていた。エクソソーム、超遠心上清に検出された miRNA の内、発現量の多い Top 50 とそれらのノーマライズ後シグナル値を Table 3-3-3 に示す。

miRNA 定量 PCR 結果

Table 3-3-3 に示した Top 50 のリストから 20 種類の miRNA を選択し、定量 PCR により等

量の乳清中に存在する miRNA 量を調べた (Fig. 3-3-9)。miR-133b、miR-1281 を除くほぼ全ての miRNA について、超遠心上清よりもエクソソームに有意に多く存在した。

3-3-3. エクソソームおよび超遠心上清中 mRNA

mRNA マイクロアレイ結果

mRNA マイクロアレイ解析の結果を Fig. 3-3-10 に示す。エクソソームには 19,320 種類、超遠心上清には 2,634 種類の mRNA が検出され、両者に共通して検出された mRNA は 2,538 種類であったが、miRNA 同様シグナル強度は異なっていた。エクソソーム、超遠心上清に検出された mRNA の内、発現量の多い Top 50 とそれらのノーマライズ後シグナル値を Table 3-3-4 と Table 3-3-5 に示す。

mRNA 定量 PCR 結果

Table 3-3-4 と Table 3-3-5 に示した Top 50 のリストから 23 種類の mRNA を選択し、定量 PCR により等量の乳清中に存在する mRNA 量を調べた (Fig. 3-3-11)。定量 PCR で調べた全ての mRNA は、超遠心上清よりもエクソソームに有意に多く存在した。

3-3-4. 考察

体液中に存在する miRNA などは濃度が薄いため、回収の方法として様々なキットが各社より販売されている。また、本章 3-1、3-2 では牛乳乳清、ラット乳清中に miRNA や mRNA が存在することを示したが、血中 miRNA など細胞外 RNA はエクソソームやマイクロベシクル以外の形態での存在も知られている (166-170)。そのため、本章では、ウシ生乳を用い、精製キットによる回収率の際を検討するとともに、エクソソームとエクソソーム以外に存在する miRNA、mRNA を明らかにすることを目的とし、検討を行なった。

キットの比較は、3-1、3-2 で用いた miRNeasy Mini Kit と、miRNeasy Serum/Plasma Kit を比較した。その結果、両キット共に良好な回収率を示したものの miRNeasy Serum/Plasma Kitの方が回収量の点でわずかに良いと考えられたため、以降の検討では miRNeasy Serum/Plasma Kit を用いることとした。また、キット比較の際、超遠心により調製したエクソソームの RNA を調べたところ、総 RNA 量は乳清から直接抽出・精製するのと比較して減少し、miRNA/small RNA 比が増加した。RNA 量の減少はエクソソーム調製の際のロスによるもの以上と考えられ、乳清中に存在する RNA にはエクソソーム以外の形態で存在するものがあることが示唆された。

そこでウシ生乳乳清を用い、超遠心により調製したエクソソームと、超遠心後上清から RNA を抽出・精製し、比較を行なった。その結果、RNA 濃度はエクソソームで有意に高いものの、超遠心後の上清中にも RNA は存在し、その比率はおおよそ 7:3 であった。

miRNA マイクロアレイ解析の結果、エクソソームには 79 種類の miRNA が、超遠心後上清には 91 種類の miRNA が検出され、39 種類が両者に共通して発現していた。エクソソ-

ムのみに検出されたのは 40 種類、超遠心後上清にのみ検出されたのは 52 種類であり、ヒートマップの結果からも、エクソソームと超遠心後上清の miRNA 発現パターンは異なることが示された。

Table 3-3-3 にエクソソーム、または超遠心後上清に検出された Top 50 を示した。一般に種特異的 miRNA は進化上新しく、高度に保存された miRNA と比較して低い発現レベルに抑えられているが、各々の Top 50 の内エクソソーム中に検出された 14 種類の miRNA (miR-2478、miR-2412、miR-2305、miR-2881、miR-2328*、miR-2888、miR-2304、miR-2391、miR-2892、miR-2887、miR-2316、miR-2374、miR-2291、miR-22841)、超遠心後上清中に検出された 28 種類の miRNA (miR-2305、miR-2412、miR-2888、miR-2316、miR-2328*、miR-2478、miR-2893、miR-2881、miR-2374、miR-2391、miR-2348、miR-2892、miR-2885、miR-2428、miR-2882、miR-2486、miR-2455、miR-2898、miR-2407、miR-2436-5p、miR-2389、miR-2309、miR-2340、miR-2902、miR-2454、miR-2373*、miR-2899、miR-2300a-5p) はウシ特異的な miRNA であった。これら miRNA の役割は未だ不明であるが、いくつかの miRNA (miR-2478、miR-2412、miR-2305、miR-2881、miR-2328*、miR-2888、miR-2391、miR-2374、miR-2882、miR-2455、miR-2898) については糖質または脂質代謝を制御すると予測されている (171)。Zhou ら (156) と Gu ら (157) はそれぞれヒト、ブタ乳エクソソームに多く含まれる Top 10 の miRNA を報告している。本項で示した牛乳エクソソーム中 miRNA Top 50 の内、14 種類がウシ特異的であるにも関わらず、ヒト母乳エクソソーム中 Top 10 の miRNA の内、7 種類の miRNA (miR-148a、miR-30b-5p、let-7f、miR-29a、let-7a、miR-141、miR-200)、ブタ乳エクソソーム中 Top 10 の miRNA の内 5 種類の miRNA (miR-148a、miR-30a-5p、miR-30d、miR-200c、let-7a) が牛乳エクソソーム Top 50 のリストに含まれていた。これらのことが示すのは、乳中エクソソームに含まれる miRNA の役割は、一部種間で共通しており、一部は種特異的かもしれないということである。

Top 50 のリストから役割が比較的良く同定されている 20 種類の miRNA を選択し、等量の乳清から調製したエクソソームと超遠心後上清中の発現量を定量 PCR により測定した。その結果、miR-133b と miR-1281 を除く全ての miRNA がエクソソーム中で有意に高発現していた。miR-133b と miR-1281 は、超遠心後上清の Top 50 に含まれており、エクソソーム中の Top 50 リストには含まれていない。マイクロアレイは等量の RNA を使用しての比較であるため、定量 PCR の結果はマイクロアレイの結果とは矛盾しない。

上記 Zhou らと Gu らの報告から、ヒト母乳とブタ乳エクソソームに発現する Top 10 miRNA の内、両種に共通していたのは miR-148a と let-7a の 2 種類である。これら 2 種類の miRNA は牛乳エクソソームにも高発現していた。miR-148a は自然免疫と樹状細胞の抗原提示能を負に調節すること (131)、消化管細胞分化に伴い高発現すること (159)、DNA methyltransferase 3b を標的とすること (172) が報告されており、let-7a は IL-6 分泌を抑制することで Th17 分化を抑制すること (173)、消化管細胞分化に伴い高発現すること (160) が報告されている。複数の種の乳由来エクソソームに高発現する miRNA が、免疫機能制御

や消化管発達制御に関与する miRNA であることは興味深い。

mRNA マイクロアレイ解析の結果からは、超遠心上清中に 2,634 種類の mRNA が検出されたものの、超遠心上清中にのみ検出されたのはわずか 96 種類であり、2,538 種類はエクソソームにも検出された。一方でエクソソームには 19,320 種類という非常に多くの mRNA が検出されたことから、乳清中に含まれる mRNA の多くはエクソソームに存在すると考えられた。

mRNA についてエクソソーム、超遠心後上清に高発現している Top 50 リストを Table 3-3-4 と Table 3-3-5 にそれぞれ示した。エクソソームに高発現している mRNA の多くは「乳たんぱく質」「リボソームたんぱく質」関連の mRNA であった。本結果は、3-2 で示したラット乳清での結果と一致している。乳中 mRNA に関する報告はほとんどないが、Maningat ら (164) と Lemay ら (174) がヒト乳脂肪球中 mRNA に関する報告を行なっている。両報告共に「乳たんぱく質」と「リボソームたんぱく質」に関連する mRNA が乳脂肪層に高発現していることを報告している一方で、Wickramasinghe ら (165) は牛乳体細胞中に高発現していた Top 7 の mRNA の中に「乳たんぱく質」関連 mRNA は含まれていたものの、「リボソームたんぱく質」関連 mRNA は無かったと報告している。これらの結果は、乳中に含まれる mRNA の役割の一部は、乳清・乳由来エクソソーム・乳脂肪球・乳中細胞で共通している可能性と、画分や種による差が存在する可能性を示唆しており、本章 3-2-4 での考察を支持する。

本項では 19,320 種類という非常に多くの mRNA がエクソソーム中に検出された。この中から 3-2 項同様「乳たんぱく質」「乳由来エクソソーム」関連 mRNA と、他の報告結果との比較を行なうため、「乳脂肪層」関連 mRNA を選択し、等量の乳清から調製したエクソソームと超遠心後上清に含まれる量を定量 PCR により測定した。選択した全ての mRNA はエクソソーム中で有意に高発現していた。このことは、乳清中に含まれる mRNA の多くはエクソソームに存在するという上記考察を支持すると考えられる。

残念なことに、本項では超遠心後上清における RNA の存在形態について詳細に調べているわけではなく、エクソソームの大きさの分布についても調べているわけではない。本章ではエクソソーム調製に最も良く採用されている方法である超遠心を用いたが、エクソソームの大きさには幅がある。故に、大きさが極微小、密度が小さいエクソソームが超遠心上清中に混入していた可能性は否定できない。また、エクソソームの大きさや密度により含まれている mRNA の種類が異なることも否定はできないため、超遠心後上清に少ない数の mRNA が検出された理由はそのためかもしれない。

3-3-5. 小括

本項では、ウシ生乳を用い、超遠心によりエクソソームと超遠心後上清を調製し、各々の画分に含まれる RNA を解析することで、牛乳乳清中に含まれる機能性 RNA の内、mRNA についてはほとんどがエクソソームに含まれること、miRNA についてはエクソソームとそ

れ以外の形態で存在するものがあることを示すことができた。乳清中 RNA に関する報告は少なく、特に mRNA に関する報告は少ない。様々な食品原料に使用される牛乳について、エクソソームと超遠心後上清に分け、各々に含まれる miRNA、mRNA を明らかにできたことは意義があると考ええる。

Table 3-3-1 : Primers used for miRNA assay

	miRNA	Product No.
1	let-7a	MS00005460
2	let-7b	MS00000007
3	let-7c	MS00005467
4	let-7d	MS00012915
5	let-7f	MS00005481
6	let-7g	MS00008337
7	miR-20a	MS00000098
8	miR-26a	MS00000133
9	miR-29c	MS00000175
10	miR-30b-5p	MS00000182
11	miR-103	MS00005586
12	miR-125b	MS00005600
13	miR-133b	MS00007259
14	miR-141	MS00000413
15	miR-148a	MS00003556
16	miR-200c	MS00003752
17	miR-320	MS00013433
18	miR-365-3p	MS00000973
19	miR-671	MS00044933
20	miR-1281	MS00014455

Table 3-3-2 : Primers used for mRNA assay

	mRNA	Product No.
1	α_{S1} -casein	Bt03217569_m1
2	α_{S2} -casein	Bt03214940_m1
3	β -casein	Bt03217427_m1
4	κ -casein	Bt03213724_m1
5	α -lactalbumin	Bt03213962_m1
6	β -lactoglobulin	Bt03230916_m1
7	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha	Bt03223795_g1
8	glycosylation-dependent cell adhesion molecule	Bt03216430_m1
9	tumor protein, translationally-controlled 1	Bt03218290_g1
10	lactoferrin	Bt03217384_m1
11	lactoperoxidase	Bt03211919_m1
12	milk fat globule-EGF 8	Bt03216859_m1
13	xanthine oxidase	Bt03212108_m1
14	fatty acid synthase	Bt03210485_m1
15	mucin 1	Bt03223132_m1
16	polymeric immunoglobulin receptor	Bt03212948_m1
17	CD36	Bt03212338_m1
18	CD63	Bt03217862_m1
19	ApoE	Bt03212245_m1
20	CD74	Bt03221578_m1
21	secreted phosphoprotein 1	Bt03213107_m1
22	β -actin	Bt03279174_g1
23	ferritin, heavy polypeptide 1	Bt03244349_g1

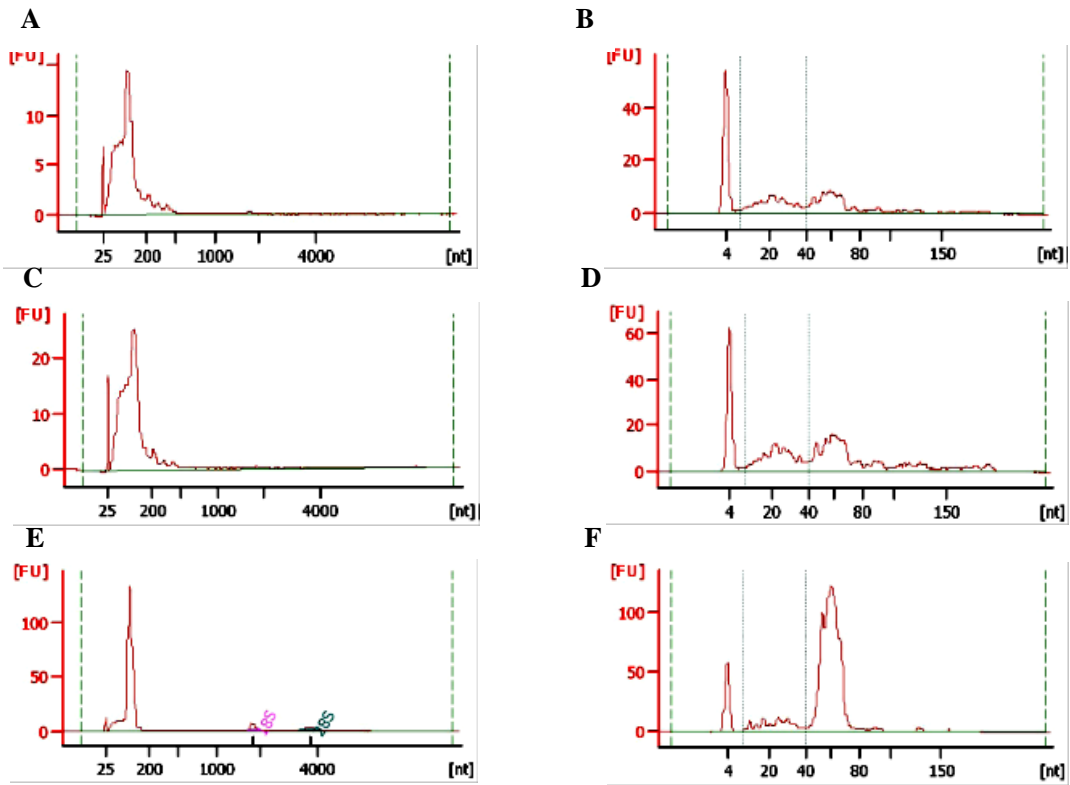


Figure 3-3-1 : Bioanalyzer analysis of RNAs in bovine raw milk. (A, C, E) Analysis using the RNA6000 Pico Kit. (B, D, F) Analysis using the Small RNA Kit. (A, B) Total RNA purified from the raw milk whey fraction using the miRNeasy Mini Kit. (C, D) Total RNA purified from the raw milk whey fraction using the miRNeasy Serum/Plasma Kit. (E, F) Total RNA purified from raw milk whey-derived exosome using the miRNeasy Mini Kit.

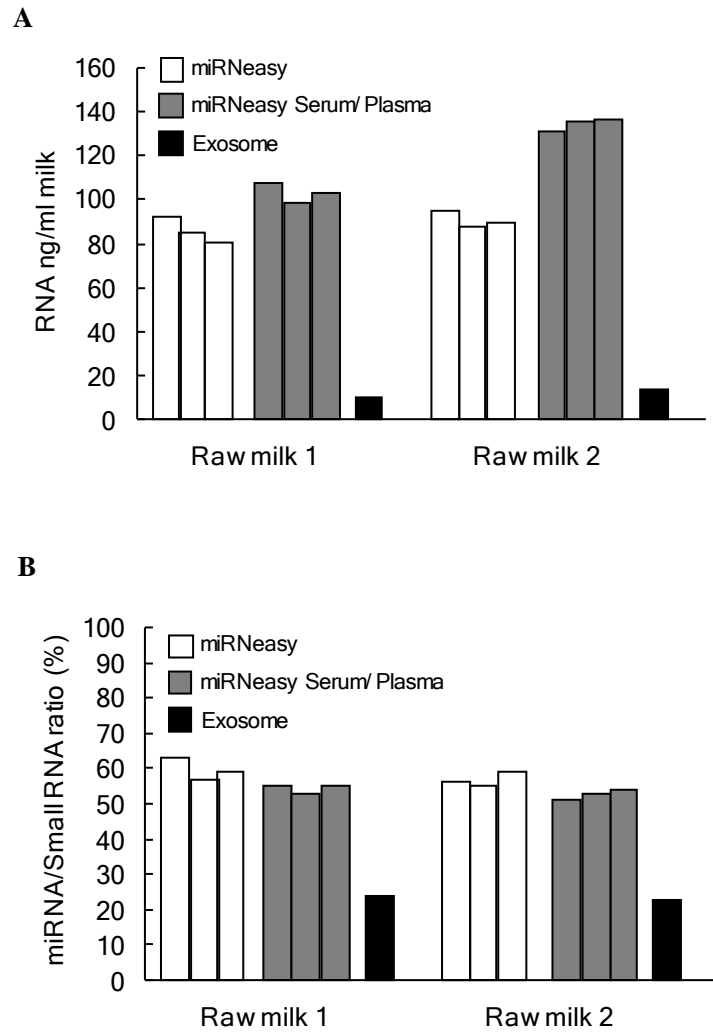


Figure 3-3-2 : RNA concentrations and miRNA/small RNA ratios of RNA samples purified from bovine raw milk. (A) RNA concentrations. (B) miRNA/small RNA ratios.

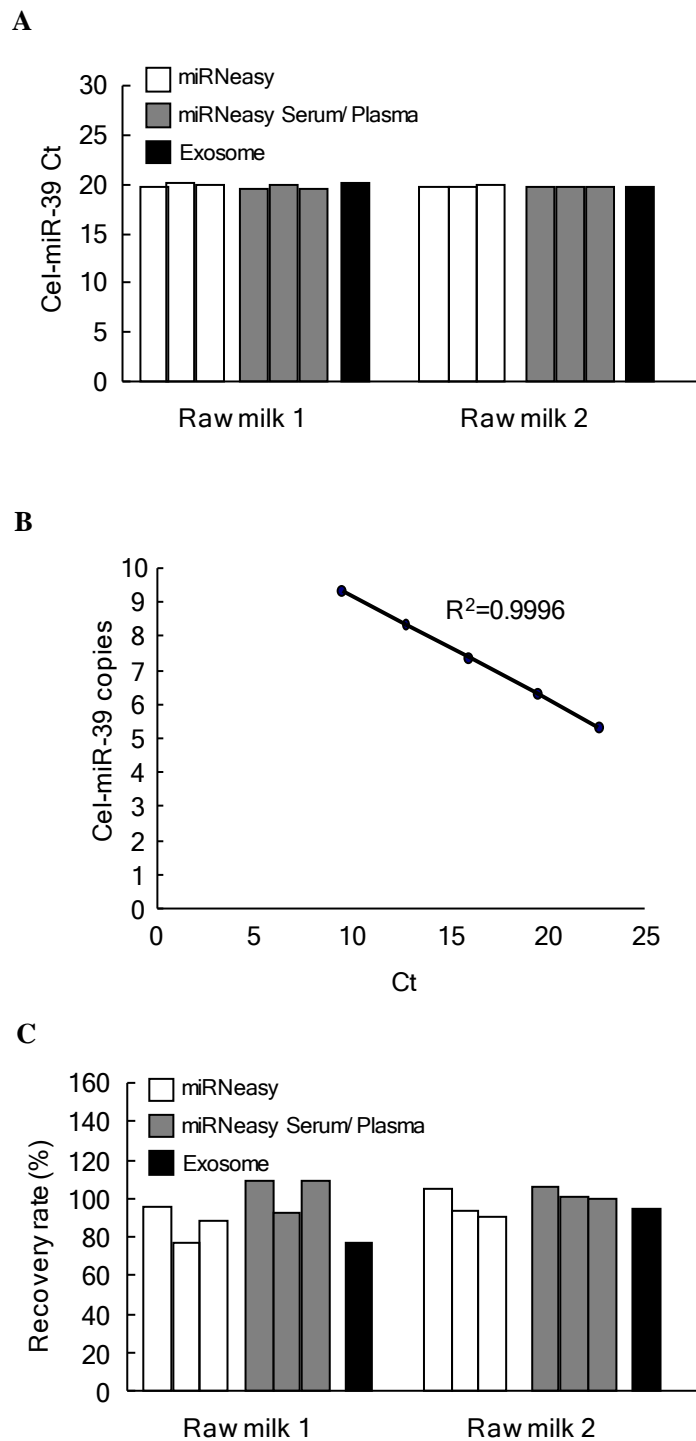


Figure 3-3-3 : Quantitative PCR analysis of the spiked-in control cel-miR-39. (A) cel-miR-39 Ct. (B) Standard curve for cel-miR-39. (C) Recovery rates calculated from the standard curve. High Ct means low expression and low Ct means high expression.

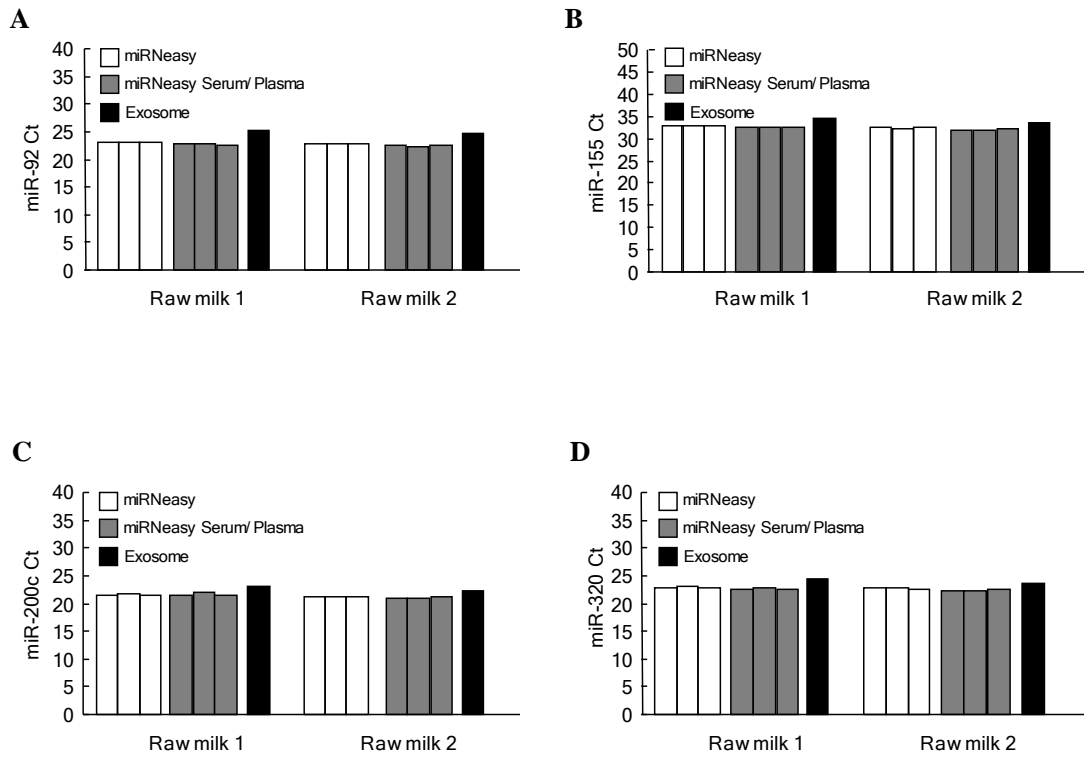


Figure 3-3-4 : Quantitative PCR analysis of miRNAs. (a) miR-92. (b) miR-155. (c) miR-200c. (d) miR-320. High Ct means low expression and low Ct means high expression.

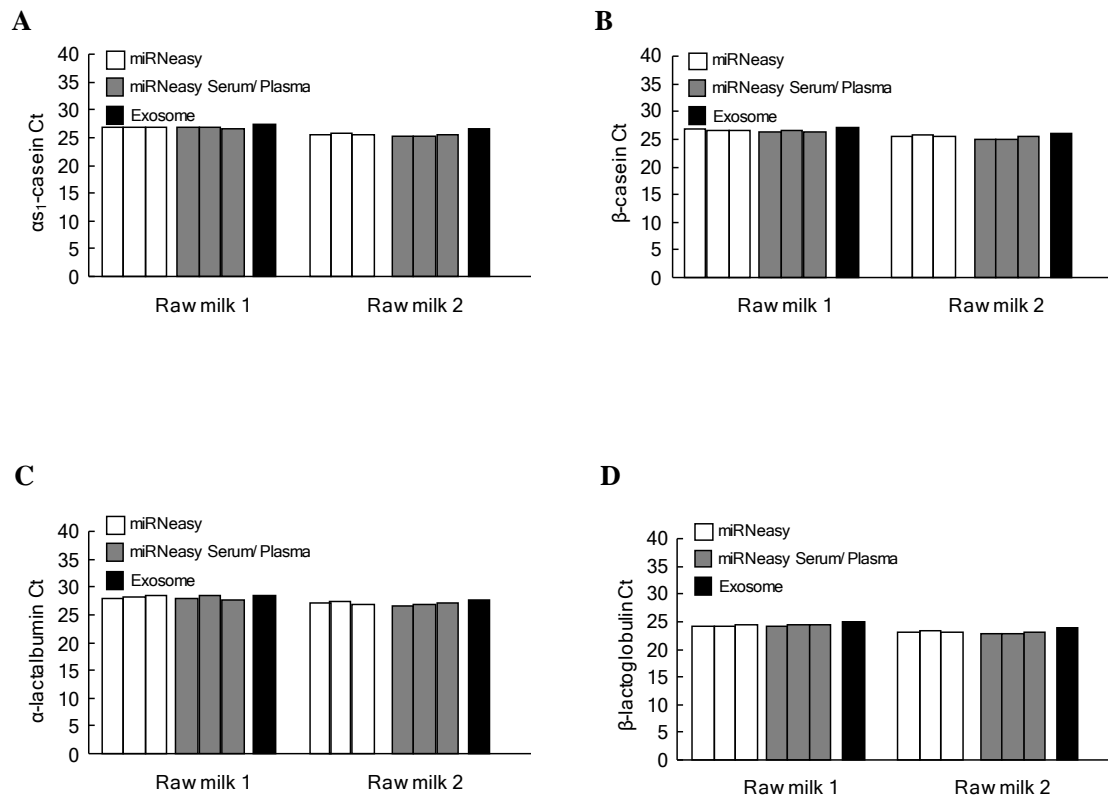


Figure 3-3-5: Quantitative PCR analysis of mRNAs. (A) α_{S1} -casein. (B) β -casein. (C) α -lactalbumin. (D) β -lactoglobulin. High Ct means low expression and low Ct means high expression.

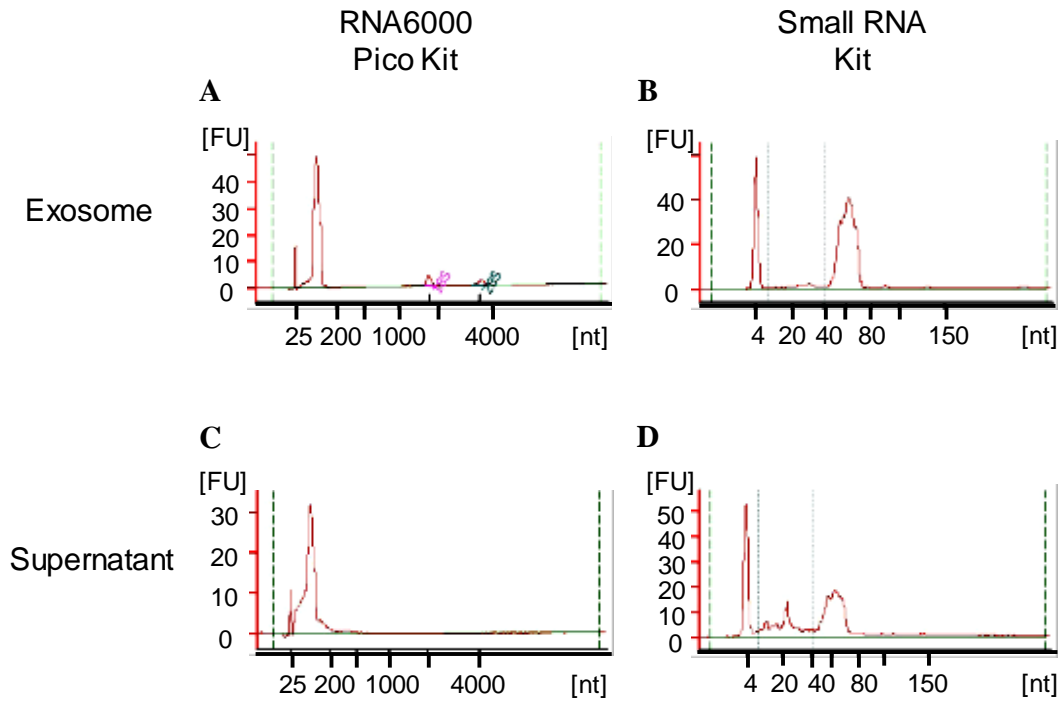


Figure 3-3-6 : Analysis of RNAs purified from bovine raw milk whey-derived exosome and ultracentrifuged supernatant using Bioanalyzer. (A, B) Bovine raw milk whey-derived exosome. (C, D) Ultracentrifuged supernatant from bovine raw milk whey. (A, C) Analysis using an RNA 6000 Pico Kit. (B, D) Analysis using a Small RNA Kit. FU = fluorescence unit.

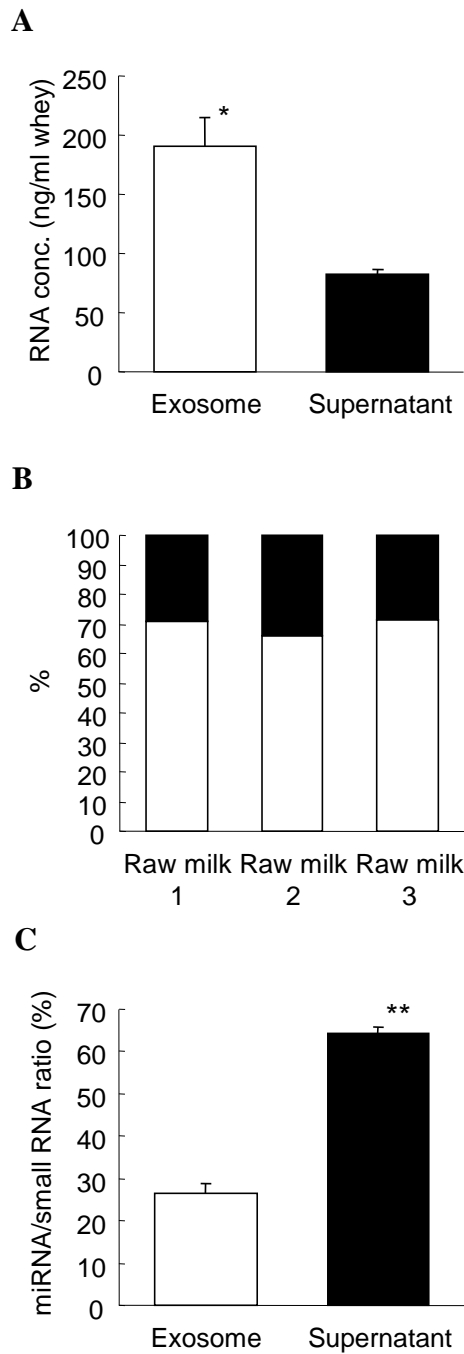


Figure 3-3-7 : RNA concentrations, RNA concentrate ratio, and microRNA (miRNA)/small RNA ratio in bovine raw milk whey. (A) RNA concentrations in bovine raw milk whey-derived exosome and ultracentrifuged supernatant. (B) Ratios of the RNA concentrations in exosome to those in supernatant from three raw milk whey samples. (C) miRNA/small RNA ratio. The values are the mean \pm SEM (n = 3). * P < 0.05 compared with supernatant. ** P < 0.01 compared with exosome.

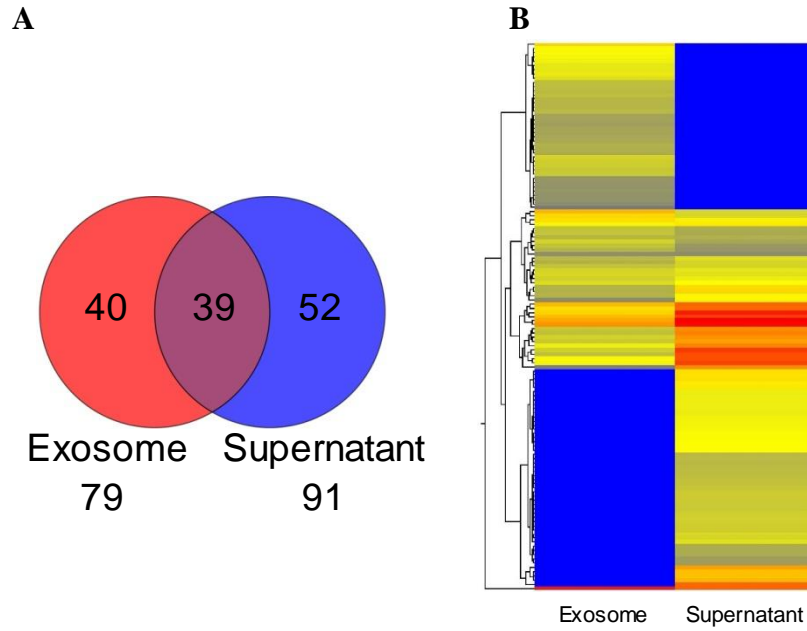


Figure 3-3-8 : miRNA microarray results of bovine raw milk whey-derived exosome and ultracentrifuged supernatant. (A) Venn diagram showing the numbers of miRNA expressed in exosome and supernatant. (B) A heat map of the normalized array data for miRNAs detected in exosome or supernatant.

Table 3-3-3 : Top 50 most highly expressed miRNAs in bovine whey exosome or supernatant

Exosome			Supernatant		
Rank	Name	Signal Intensity	Rank	Name	Signal Intensity
1	miR-2478	19.16	1	miR-1777a	20.02
2	miR-1777b	14.11	2	miR-1777b	19.74
3	miR-1777a	13.44	3	miR-2305	18.93
4	let-7b	12.78	4	miR-1343	17.76
5	miR-1224	12.60	5	miR-2412	17.48
6	miR-2412	12.54	6	miR-2888	17.42
7	miR-2305	11.70	7	miR-2316	16.97
8	let-7a	11.67	8	miR-2328*	16.86
9	miR-200c	11.51	9	miR-1224	16.04
10	miR-141	11.32	10	miR-2478	16.02
11	miR-2881	11.29	11	miR-2893	15.92
12	miR-2328*	9.92	12	miR-2881	15.89
13	let-7c	9.89	13	miR-2374	14.91
14	miR-148a	9.87	14	miR-1584	14.84
15	miR-320	9.81	15	miR-1249	14.47
16	miR-2888	9.74	16	miR-671	14.45
17	let-7f	9.73	17	miR-2391	14.22
18	miR-200b	9.55	18	miR-2348	13.75
19	miR-1584	9.51	19	miR-2892	13.64
20	miR-26a	9.30	20	miR-2885	12.76
21	miR-20a	9.18	21	miR-2428	12.41
22	miR-103	9.15	22	miR-2882	12.39
23	miR-29c	8.83	23	miR-2486	11.57
24	miR-30d	8.80	24	miR-2455	11.36
25	miR-92	8.63	25	miR-2898	11.31
26	miR-2304	8.41	26	miR-1225-3p	11.13
27	miR-375	8.41	27	miR-2407	11.12
28	miR-2391	8.40	28	miR-2436-5p	10.89
29	let-7g	8.39	29	miR-2389	10.85
30	miR-30a-5p	8.24	30	miR-320	10.82
31	miR-1343	8.19	31	miR-141	10.58

32	miR-125b	8.17	32	miR-2476	10.38
33	miR-30b-5p	8.16	33	miR-489	10.24
34	miR-26b	7.99	34	miR-345-3p	10.16
35	miR-2892	7.96	35	miR-2392	10.11
36	miR-24-3p	7.94	36	miR-30d	10.01
37	miR-1249	7.88	37	miR-365-3p	9.99
38	miR-423-5p	7.85	38	miR-2309	9.95
39	miR-664	7.75	39	miR-2340	9.91
40	miR-2887	7.75	40	miR-2902	9.74
41	miR-2284d	7.68	41	miR-2454	9.64
42	miR-2316	7.63	42	miR-2373*	9.61
43	miR-2374	7.61	43	miR-1835	9.56
44	miR-29a	7.61	44	miR-2899	9.45
45	let-7d	7.53	45	miR-30a-5p	9.42
46	miR-200a	7.51	46	miR-425-3p	9.40
47	miR-151*	7.46	47	miR-2300a-5p	9.39
48	miR-30f	7.38	48	miR-133a	9.39
49	miR-2291	7.32	49	miR-1281	9.38
50	miR-2284l	7.24	50	miR-133b	9.31

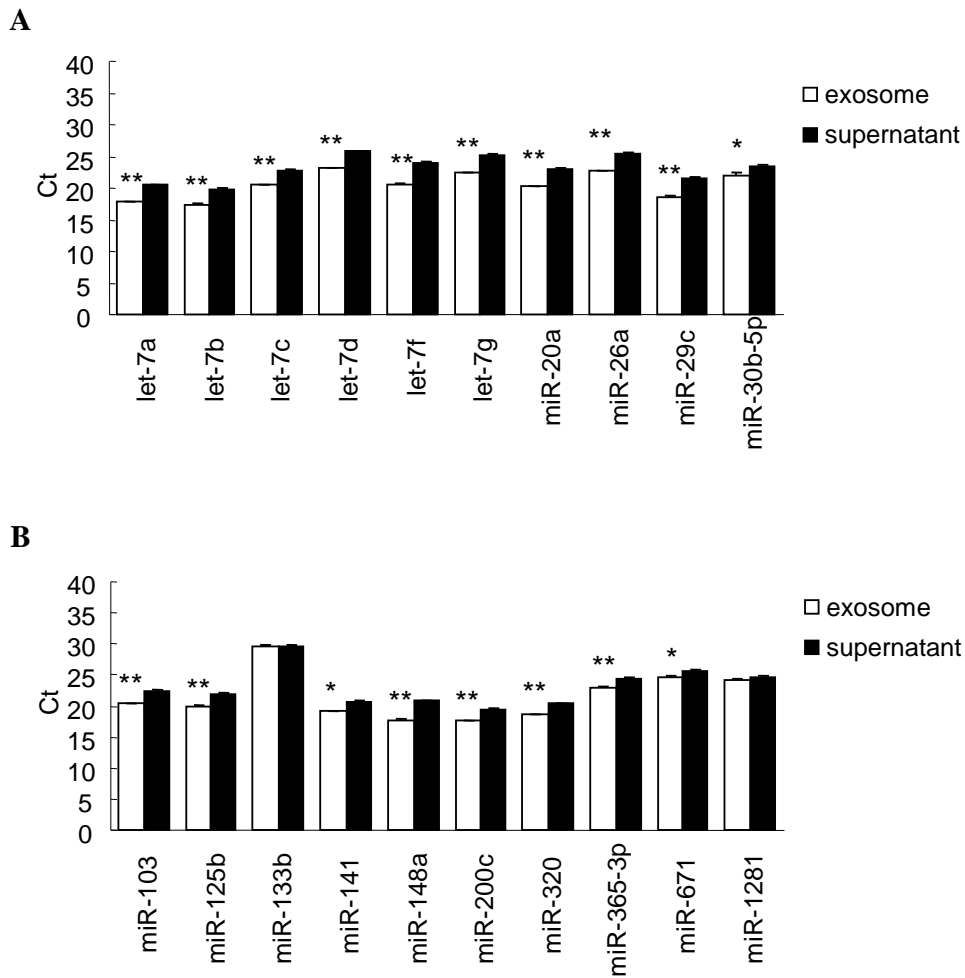


Figure 3-3-9: Quantitative PCR analysis (cycle threshold, Ct, values) of select microRNA (miRNA) in exosome and supernatant isolated from equal volumes of bovine raw milk whey. Total RNA from exosome and supernatant isolated from 3.2-mL raw milk whey was used. The values are the mean \pm SEM (n = 3); * P < 0.05 compared with supernatant. ** P < 0.01 compared with supernatant. High Ct means low expression and low Ct means high expression.

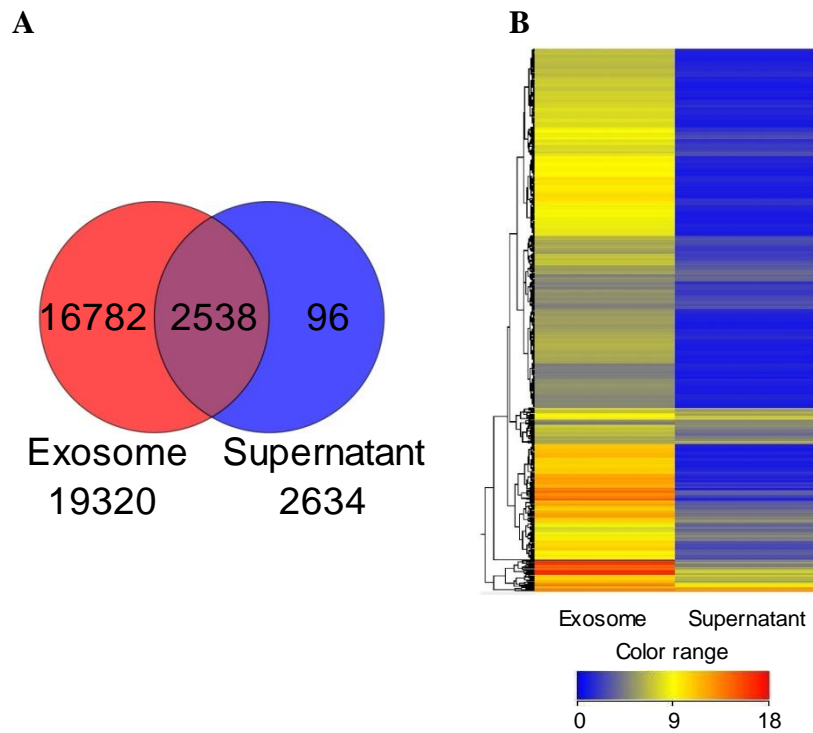


Figure 3-3-10 : mRNA microarray results of bovine raw milk whey-derived exosome and ultracentrifuged supernatant. (A) Venn diagram showing the numbers of mRNA probes expressed in exosome and the supernatant. (B) A heat map of the normalized array data for mRNAs detected in exosome or supernatant.

Table 3-3-4 : Top 50 most highly expressed mRNA probes in bovine whey exosome

Rank	Probe Name	Gene Symbol	Gene Name	Signal Intensity
1	A_73_P100256	ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	18.27
2	A_73_113728	LALBA	lactalbumin, alpha-	18.26
3	A_73_P459006	PAEP	progestagen-associated endometrial protein (also known as beta-lactoglobulin)	18.14
4	A_73_P311621	CSN2	casein beta	18.04
5	A_73_116854	CSN2	casein beta	18.03
6	A_73_P393463	CSN1S1	casein alpha s1	17.95
7	A_73_P084401	RPS28	ribosomal protein S28	17.95
8	A_73_P100346	ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	17.94
9	A_73_P504783	ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	17.92
10	A_73_111101	CSN3	casein kappa	17.91
11	A_73_P287836	CSN1S2	casein alpha-s2	17.90
12	A_73_P050936	CSN1S1	casein alpha s1	17.88
13	A_73_P468825	CSN1S1	casein alpha s1	17.88
14	A_73_115729	PAEP	progestagen-associated endometrial protein (also known as beta-lactoglobulin)	17.84
15	A_73_P232452	CSN2	casein beta	17.79
16	A_73_111985	RPS3	ribosomal protein S3	17.77
17	A_73_112949	RPLP0	ribosomal protein, large, P0	17.77
18	A_73_P411496	PAEP	progestagen-associated endometrial protein (also known as beta-lactoglobulin)	17.76
19	A_73_P038871	LALBA	lactalbumin, alpha-	17.76
20	A_73_P107731	CSN3	casein kappa	17.76
21	A_73_P097536	RPL23	ribosomal protein L23	17.74
22	A_73_120857	RPL21	ribosomal protein L21	17.73
23	A_73_107578	H1FX	H1 histone family, member X	17.70
24	A_73_P045606	CSN2	casein beta	17.68
25	A_73_114056	RPS2	ribosomal protein S2	17.63
26	A_73_P093916	RPS16	ribosomal protein S16	17.63
27	A_73_115443	RPL18	ribosomal protein L18	17.63
28	A_73_106136	RPS8	ribosomal protein S8	17.62
29	A_73_P462036	RPLP1	ribosomal protein, large, P1	17.59

30	A_73_111582	FABP3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary-derived growth inhibitor)	17.58
31	A_73_109246	RPS10	ribosomal protein S10	17.58
32	A_73_120860	RPL31	ribosomal protein L31	17.58
33	A_73_P073166	RPL23A	ribosomal protein L23a	17.56
34	A_73_P103236	RPS28	ribosomal protein S28	17.55
35	A_73_100438	CSN1S1	casein alpha s1	17.54
36	A_73_P291436	RPS18	ribosomal protein S18	17.54
37	A_73_P041941	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	17.53
38	A_73_P068826	RPS3A	ribosomal protein S3A	17.52
39	A_73_P056536	RPLP2	ribosomal protein, large, P2	17.51
40	A_73_P040046	UBA52	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	17.50
41	A_73_P057311	RPL31	ribosomal protein L31	17.49
42	A_73_P044606	PLIN2	perilipin 2	17.49
43	A_73_P035681	RPS27A	ribosomal protein S27a	17.48
44	A_73_P046936	RPS16	ribosomal protein S16	17.46
45	A_73_115118	RPL10	ribosomal protein L10	17.44
46	A_73_P097551	RPS8	ribosomal protein S8	17.43
47	A_73_114339	GLYCAM1	glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1	17.43
48	A_73_P041201	TPT1	tumor protein, translationally-controlled 1	17.43
49	A_73_P097526	RPL10	ribosomal protein L10	17.42
50	A_73_P266861	CSN1S2	casein alpha-s2	17.41

Table 3-3-5 : Top 50 most highly expressed mRNA probes in bovine whey supernatant

Rank	Probe Name	Gene Symbol	Gene Name	Signal Intensity
1	A_73_P504783	ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	17.40
2	A_73_P153516	POLR2K	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide K, 7.0kDa	17.36
3	A_73_P455626	TSPYL4	TSPY-like 4	16.52
4	A_73_P361931	FBXO16	F-box protein 16	16.06
5	A_73_P491198	TMEM173	transmembrane protein 173	15.65
6	A_73_P215177	TLR2	toll-like receptor 2	15.46
7	A_73_P093286	C3H1orf87	uncharacterized protein C1orf87-like	15.36
8	A_73_117796	IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	15.30
9	A_73_P420956	PFDN5	prefoldin subunit 5	15.29
10	A_73_P190192	AGTR1	angiotensin II receptor, type 1	15.28
11	A_73_P213062	ANKRD39	ankyrin repeat domain 39	14.90
12	A_73_P180692	ACOT11	acyl-CoA thioesterase 11	14.83
13	A_73_P486468	TNS4	tensin 4	14.80
14	A_73_P224702	ANKRD39	ankyrin repeat domain 39	14.70
15	A_73_121245	LOC511936	cytochrome P450, family 2, subfamily J similar to Myeloid-associated	14.70
16	A_73_P051356	MGC152278	differentiation marker	14.66
17	A_73_P048836	ZNF674	zinc finger protein 674	14.64
18	A_73_P405601	AGTR1	angiotensin II receptor, type 1	14.61
19	A_73_P240340	HRASLS	HRAS-like suppressor	14.59
20	A_73_P459006	PAEP	progesterone-associated endometrial protein (also known as beta-lactoglobulin)	14.58
21	A_73_P191827	AGTR1	angiotensin II receptor, type 1	14.54
22	A_73_103111	GTF2H5	general transcription factor IIIH, polypeptide 5	14.48
23	A_73_107578	H1FX	H1 histone family, member X	14.46
24	A_73_P192282	CHRNA1	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1 (muscle)	14.46
25	A_73_P476773	SLC5A12	solute carrier family 5 (sodium/glucose	14.41

			cotransporter), member 12	
26	A_73_P033441	H2B	histone H2B	14.40
27	A_73_P242615	CHMP1B	chromatin modifying protein 1B	14.40
			hect (homologous to the E6-AP (UBE3A)	
28	A_73_P461676	HERC1	carboxyl terminus) domain and RCC1 (CHC1)-like domain (RLD) 1	14.38
29	A_73_P246691	C3H1orf109	hypothetical LOC508021	14.34
30	A_73_P374271	SECTM1	secreted and transmembrane 1	14.31
31	A_73_P195057	NIPSNAP1	nipsnap homolog 1 (C. elegans)	14.28
32	A_73_P134616	ACPP	acid phosphatase, prostate	14.26
33	A_73_P132081	ACPP	acid phosphatase, prostate	14.18
34	A_73_P100256	ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	14.06
35	A_73_P187832	ACPP	acid phosphatase, prostate	14.05
36	A_73_P200172	POLH	polymerase (DNA directed), eta	14.04
37	A_73_P218867	IFT80	intraflagellar transport 80 homolog (Chlamydomonas)	14.02
38	A_73_P171747	LOC100139208	hypothetical protein LOC100139208	14.02
39	A_73_P149206	FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	13.96
40	A_73_P288576	CWC25	CWC25 spliceosome-associated protein homolog (S. cerevisiae)	13.91
41	A_73_P211172	MBL2	mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble	13.85
42	A_73_P504858	NEPN	nephrocan	13.83
43	A_73_P211497	C12H13orf18	Uncharacterized protein C13orf18 homolog	13.83
44	A_73_P465708	ACPP	acid phosphatase, prostate	13.75
45	A_73_P134026	ACOT11	acyl-CoA thioesterase 11	13.74
46	A_73_P465498	ACPP	acid phosphatase, prostate	13.72
47	A_73_113343	LOC517043	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6-like	13.71
48	A_73_P187927	ACOT11	acyl-CoA thioesterase 11	13.69
49	A_73_P465423	PIGM	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class M	13.63
50	A_73_100232	LOC508118	zinc finger and BTB domain containing 3	13.63

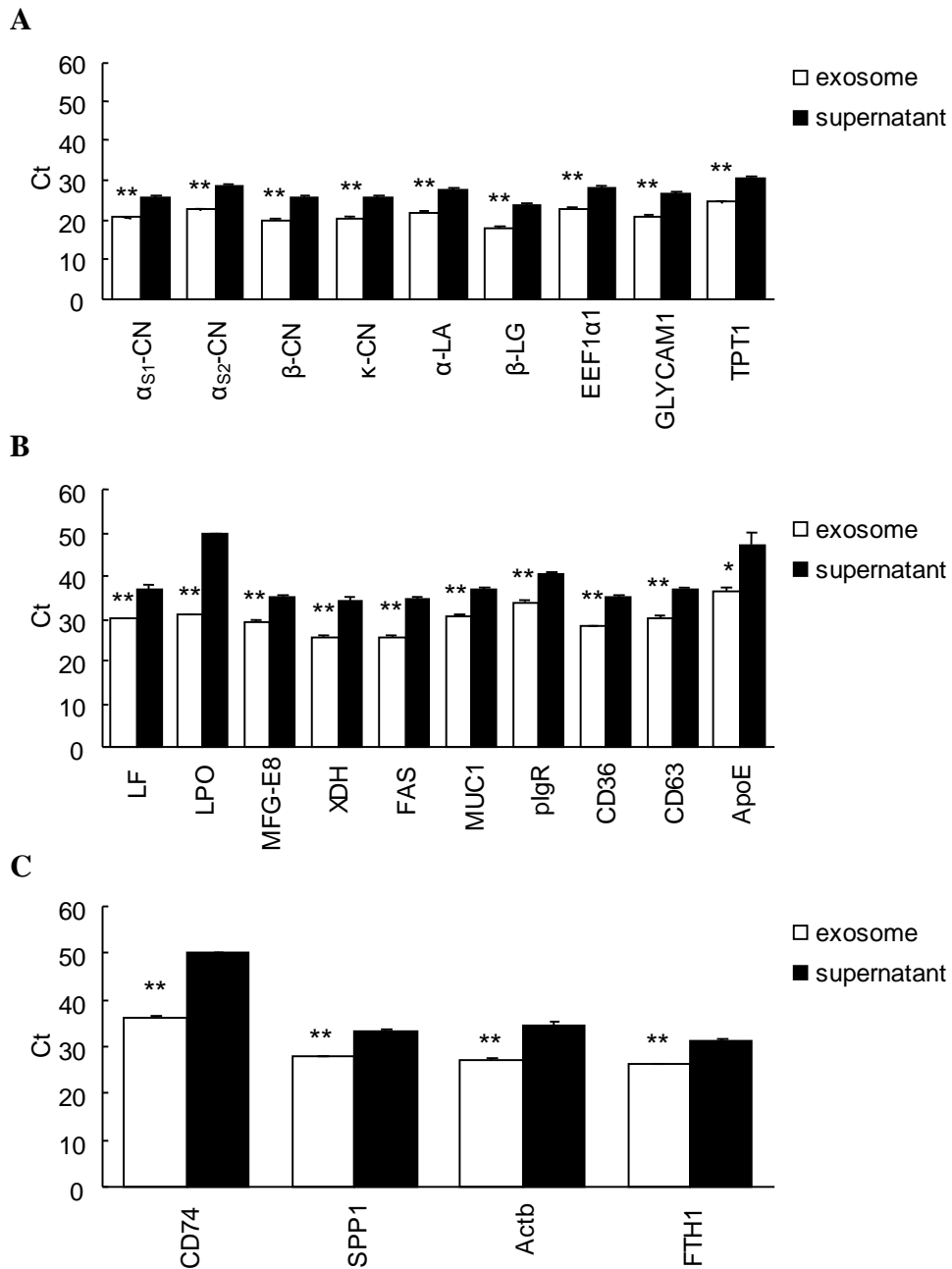


Figure 3-3-11 : Quantitative PCR analysis (cycle threshold, Ct, values) of select mRNAs in exosome and supernatant isolated from equal volumes of bovine raw milk whey. Total RNA from exosome and supernatant from 3.2-mL raw milk whey was used. (A) Selected transcripts from the 50 species expressed at the highest level in exosome. (B) Milk-derived exosome-related transcripts. (C) Selected transcripts identified in previous studies of milk somatic cells and the milk fat layer. The values are the mean \pm SEM (n = 3). * $P < 0.05$ compared with supernatant. ** $P < 0.01$ compared with supernatant. High Ct means low expression and low Ct means high expression.

Actb = β -actin; EEF1 α 1 = eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1; FAS = fatty acid synthase; FTH1 = ferritin, heavy polypeptide 1; GLYCAM1 = glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1; LF = lactoferrin; LPO = lactoperoxidase; MFG-E8 = milk fat globule-EGF factor 8; MUC1 = mucin 1; pIgR = poly Ig receptor; SPP1 = secreted phosphoprotein 1; TPT1 = tumor protein, translationally-controlled 1; XDH = xanthine dehydrogenase.

3-4. 牛乳由来エクソソームによるヒト細胞への作用

3-4-1. 緒言

本章 3-3 項では、牛乳中に存在する機能性 RNA の一部、特に miRNA の一部はエクソソーム以外の形態で存在する可能性があるものの、mRNA はほとんどがエクソソームに含まれており、RNA 濃度から、機能性 RNA の多くはエクソソーム中に存在すると考えられることを示した。従って、今後牛乳中機能性 RNA を工業的に利用する際には、その安定性からもエクソソームの形態での利用が現実的であると考えられる。しかし、牛乳に由来するエクソソームが、異種であるヒトに対して作用するかどうかは明らかでない。従って、本章では、少なくとも同種の乳に由来するエクソソームを取り込むことが知られているマクロファージを用い、ヒトマクロファージ様細胞が牛乳由来エクソソームを取り込みうるかどうかを検討した。また、3-3 項で示した通り、牛乳中エクソソームに含まれる mRNA は非常に多く、その機能を推測することは困難であるが、miRNA については免疫機能に影響を与えることが示されている miR-1224 (175) が多く含まれていることがわかっている (Table 3-3-3)。miR-1224 は TNF- α 産生を抑制することから、ヒトマクロファージのサイトカイン産生能に与える影響についても検討を行なった。

3-4-2. 材料と方法

3-4-2-1. 材料

細胞培養に用いた RPMI 1640、penicillin-streptomycin-glutamine mix、非必須アミノ酸混合液、 β -mercaptoethanol は Invitrogen より購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は HyClone (UT、USA) より購入し、56°C で 30 分間処理することで非働化した。細胞の維持・継代には非働化 FBS をそのまま使用し、エクソソーム取り込みやサイトカイン産生を調べる実験では、非働化 FBS を 100,000 g、4°C で 90 分間超遠心し、含まれるエクソソームを除去後 0.22 μ m のフィルター濾過を行なった FBS (Exo depleted FBS) を用いた。THP-1 細胞は東北大学より分与後、当社で保存されていたものを用いた。

3-4-2-2. 方法

牛乳由来エクソソーム調製

本章 3-3-2 に記載の方法に従い、森永乳業研究所で試作等に使用される生乳からエクソソームを調製した。

細胞培養

THP-1 細胞は完全培地[10%非働化 FBS)、1% Penicillin-streptomycin-glutamin、1% 非必須アミノ酸、0.1% β -mercaptoethanol を含む RPMI 1640]で 37°C、5% CO₂ 存在下で培養、継代した。

エクソソーム染色

エクソソームの PKH67 による染色は、Lässer ら (166) の報告を若干改良し、PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich) を用いて行なった。具体的には、8 μ l の PKH67 色素を 1 ml の Diluent C に加えた混合溶液を、エクソソームサンプルまたは PBS (対照) に加え、4 分間穏やかに混合した。混合後、2% Exo depleted FBS を含む Cell Wash (BD Biosciences) を加え、100 kDa のスピンドフィルターを通すことで洗浄した。2% Exo depleted FBS Cell Wash による洗浄は 3 回行ない、新しい 100 kDa のスピンドフィルターに移した後、Exo depleted FBS を用いた完全培地で 2 回洗浄した。

THP-1 細胞によるエクソソーム取り込みの確認

THP-1 細胞をフローサイトメーターによる解析用に 12 ウェルプレートに、蛍光顕微鏡による解析用に 8 ウェルチャンバースライドで培養し、50 nM phorbolmyristate acetate (PMA) (Sigma-Aldrich) を添加して 60 時間培養し、マクロファージ様に分化させた。PMA 非添加の未分化 THP-1 細胞も用意した。完全培地 (使用 FBS は Exo depleted FBS) で 3 回洗浄後、10 μ g の PKH67 ラベル化エクソソーム、または等量の PKH67 処理 PBS を 1×10^5 の分化後または未分化 THP-1 細胞に添加し、37°C または 4°C で 2 時間培養し、FACSCanto および蛍光顕微鏡 BX53 (Olympus、東京) によりエクソソーム取り込みを評価した。フローサイトメーターによる解析には、THP-1 細胞を PBS で 2 回洗浄後、0.05% Trypsin-0.02% EDTA-4Na (Gibco) で処理し、2% Exo depleted FBS を含む Cell Wash で洗浄し、同溶液に再懸濁し、評価した。得られたデータは FlowJo software (Tree Star, OR, USA) で解析した。蛍光顕微鏡による評価には、THP-1 細胞を PBS で 2 回洗浄後、CellFIX (BD Biosciences) で 15 分間固定化し、PBS で 3 回洗浄した。洗浄後 THP-1 細胞に、200 μ l PBS に 5 μ l 7-AAD (BD Biosciences) を加えた溶液を添加し、15 分間処理することで核を染色した。染色後 Vectashield (Vector Laboratories, CA, USA) にマウントし、観察した。蛍光顕微鏡で得られたデータは、cellSens (Olympus) で解析を行なった。

サイトカイン産生

THP-1 細胞を 96 ウェルプレートで培養し、50 nM PMA を添加して 72 時間培養し、マクロファージ様に分化させた。PBS で 2 回洗浄後、 1×10^5 の分化後 THP-1 細胞に 10 μ g エクソソームを添加した。添加 6 時間後、あるいは 24 時間後 PBS で 2 回洗浄し、*E. coli* O26:B6 由来 lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich) 0、10、100、1000 ng/ml を添加した。エクソソーム用量依存性確認では、エクソソームを 3-30 μ g 添加し、添加 6 時間後に上記と同様の洗浄を行ない、LPS による活性化を行なった。培養 16 時間後の上清を回収し、TNF- α を Milliplex Human Cytokine/Chemokine Panel 1 (HCYTOMAG-60K) (Millipore) を使用し、Bio-Plex Protein Array System を用いて測定を行なった。得られたデータは Bio-Plex Manager 6.0 software を用いて解析を行なった (共に Bio-Rad Laboratories)。

3-4-2-3. 統計解析

2 群間の比較には Student's *t*-test を用い、多重比較では Tukey-Kramer HSD test を用いた。牛乳由来エクソソームが TNF- α 産生におよぼす影響を調べた用量依存性試験では Dunnett test を用いた。有意水準は $P < 0.05$ とし、JMP software ver. 5.1 により行なった。

3-4-3. 結果

3-4-3-1. THP-1 細胞による牛乳由来エクソソーム取り込みの確認

蛍光顕微鏡による観察の結果、ウシ生乳由来エクソソームはマクロファージ様に分化後の THP-1 細胞に取り込まれていることが示された (Fig. 3-4-1)。取り込まれた量の比較はフローサイトメーターを用いて行なったが、未分化 THP-1 細胞はウシ生乳由来エクソソームを取り込まず、マクロファージ様に分化後の THP-1 細胞は 4°C および 37°C の両条件で取り込んでいた (Fig. 3-4-2)。ただし、37°C 条件の方が 4°C 条件と比較し、有意に取り込み量は多かった。

3-4-3-2. 牛乳由来エクソソームが分化後 THP-1 細胞サイトカイン産生に与える影響

マクロファージに分化後の THP-1 細胞にエクソソームを添加し、6 時間後に LPS による活性化を行ない、16 時間培養後の上清 TNF- α 量を調べたところ、LPS 10 ng/ml の活性化時は、エクソソーム添加により TNF- α 産生抑制傾向が、LPS 100 ng/ml 活性化時は有意な TNF- α 産生抑制が認められた (Fig. 3-4-3)。LPS 1000 ng/ml 活性化時にはエクソソーム添加による TNF- α 産生への影響は認められなかった。また、マクロファージにエクソソームを添加した後の時間を、24 時間に変更した結果、LPS 100 ng/ml 活性化時は TNF- α 産生抑制傾向が認められた (Fig. 3-4-4)。エクソソーム添加時間を 6 時間、LPS 濃度 100 ng/ml がエクソソームの影響を調べるのに最適な条件と考えられたため、同条件でエクソソーム用量依存性を調べたところ、エクソソーム 10 μ g 以上で TNF- α 産生抑制作用が認められ、対照の 10 μ g BSA 添加では認められなかった (Fig. 3-4-5)。

3-4-4. 考察

本項では、ヒト由来マクロファージ様細胞である分化後 THP-1 が、異種である牛乳由来のエクソソームを取り込みうるかどうかを検討し、同細胞のサイトカイン産生に与える影響についても検討を行なった。

蛍光顕微鏡とフローサイトメーターを用いた解析から、マクロファージ様に分化したヒト由来細胞である THP-1 は、ウシ生乳に由来するエクソソームを取り込みうることを示された。Lässer ら (166) はヒト母乳に由来するエクソソームをヒトマクロファージが、Sun ら (176) は牛乳に由来するエクソソームをげっ歯類マクロファージが取り込みうることを報告している。Sun らの結果は、げっ歯類マクロファージが異種である牛乳由来エクソソーム

ムを取り込むことを示しているが、我々の結果はヒトマクロファージも異種である牛乳由来エクソソームを取り込みうることを示している。

ヒトマクロファージ様 THP-1 細胞が牛乳由来エクソソームを取り込んだことから、機能に与える影響についても検討を行なった。その結果、分化後 THP-1 細胞を活性化する LPS 濃度が 1,000 ng/ml という高濃度の条件では差がなかったものの、100 ng/ml 条件では TNF- α 産生を抑制した。Sun らは、牛乳、特に初乳由来エクソソームがげっ歯類マクロファージの炎症性サイトカイン産生を促進すると報告しているが、これはマクロファージの由来する種や牛乳の質的な差を示しているのかもしれない。ただし、彼らも LPS 濃度が高濃度の時には牛乳由来エクソソームの影響が無くなることを報告しており、生理的条件下で作用するという結果は一致する。また、エクソソーム添加後の時間検討では、エクソソーム添加 24 時間後に LPS で活性化を開始しても、添加 6 時間後の時同様、TNF- α 産生抑制傾向が認められた。さらに、牛乳由来エクソソームによる TNF- α 産生抑制は、エクソソーム量依存的であった。

ここ数年の研究により、食物に由来する miRNA が取り込まれ、in vivo で機能を果たしうる可能性が示唆されている。Zhang ら (177) は米に由来する osa-MIR-168a がヒトおよびマウスの血清中に検出され、同 miRNA のターゲットと予測される low density lipoprotein receptor adapter protein 1 の肝臓中 mRNA を減少させたと報告している。また、Ju ら (178) はブドウに由来するエクソソーム様小胞が、消化管の幹細胞を誘導し、組織のリモデリングを調節することで DSS 誘導性腸炎から消化管組織を保護することを報告している。さらに、Lukasik と Zielenkiewicz (179) は、高速シーケンサーを使用して解析され公開されているデータから、バイオインフォマティクスを利用し、ヒトおよびブタの乳中エクソソームに *Arabidopsis thaliana*, *Picea abies*, *Populus trichocarpa*, *Brachypodium distachyon*, *Zea mays* に由来する miRNA が含まれていたことを報告している。ただし、Zhang らの米由来 miRNA に対しては、Dickinson ら (180) が否定的な結果を提示しており、Snow ら (181) も、少なくとも植物由来の miRNA については血中や組織に移行しないという報告をしている。

乳由来 miRNA については、2014 年 Baier ら (182) が 250 ml~1 L という現実的な量の牛乳を摂取したヒト成人血中に、複数の研究 (73, 125) で牛乳中に存在が示されている miR-29b が用量依存的に増加すること、同様の事象はブロッコリースプラウト摂取では起こらなかったこと、乳由来エクソソーム除去餌をマウスに 4 週間給餌させると、非除去餌群と比較し、血中 miR-29b が減少することを示した。さらに、牛乳由来マイクロベシクルの経口投与により、実験的関節炎を誘導したマウスの症状が改善したという報告もある (183)。一方で、乳由来 miRNA・エクソソームの in vivo での取り込みについても否定的な報告が存在し、Laubier ら (184) は miR-30b を過剰発現させたトランスジェニックマウスの乳を摂取させた乳仔マウスの、胃を除く各臓器および血中で miR-30b の増加は見られなかったとし、Title ら (185) は miR-375 ノックアウト、miR-200c/141 ノックアウトマウスを用い、野生型マウスの乳をノックアウトマウスの乳仔に摂取させるなどして検討し、消化管・血中の

miR-375、miR-200c レベルがノックアウトマウス乳摂取群と変わらなかったことを報告している。ただし彼らは、乳仔マウスの消化管内容物を調べた結果、合成 miRNA と比較し、乳に由来する miRNA は分解抵抗性があったことも示している。このように、乳由来エクソソーム・miRNA・mRNA が *in vivo* で作用しうるかは未だ明確な結論は出ていないため、今後の研究が必要であり、我々が本項で示した結果も、異物に対する貪食能を持つマクロファージでの結果である。しかし、ウシ生乳に由来するエクソソームが、異種であるヒトの、ある種の細胞に取り込まれること、機能に影響を与えることは示せており、少なくとも乳由来 miRNA は消化管の特定の細胞に機能しうる可能性を示唆している。

3-4-5. 小括

本項では、ウシ生乳から超遠心により調製したエクソソームが、ヒト由来マクロファージ様細胞に取り込まれること、取り込まれた牛乳由来エクソソームは細胞機能に影響を及ぼすことを示すことができた。様々な食品の原料に使用される牛乳に由来するエクソソームが、異種であるヒトの細胞に影響しうる可能性を示すことができたことは意義があると考えられる。

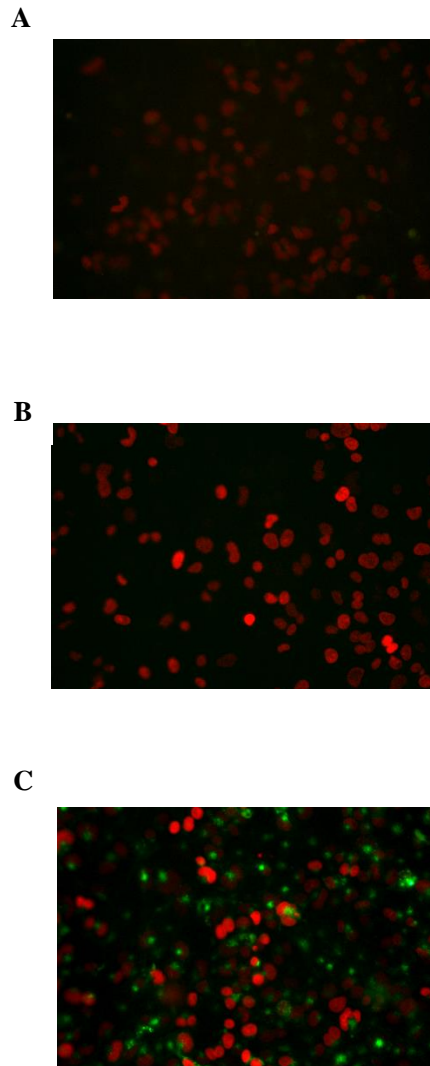


Figure 3-4-1 : Uptake of bovine raw milk whey-derived exosomes by macrophages. (A-C) Fluorescence microscopy images; 7-AAD was used to label the nuclei of THP-1 cells (red), and PKH67 was used to label the exosomes (green). (A) PBS-PKH67 was added to differentiated THP-1 cells, followed by incubation at 37°C. (B) PKH67-labeled exosomes were added to differentiated THP-1 cells, followed by incubation at 4°C. (C) PKH67-labeled exosomes were added to differentiated THP-1 cells, followed by incubation at 37°C.

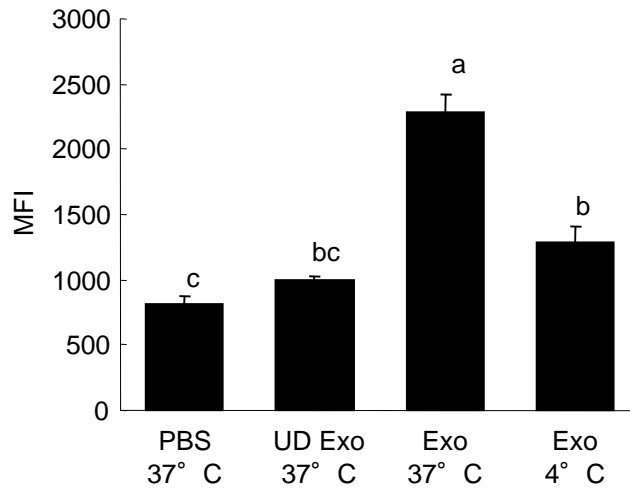


Figure 3-4-2 : Uptake of bovine raw milk whey-derived exosomes by macrophages. The uptake of fluorescence-labeled exosomes into THP-1 cells at various conditions was evaluated using a flow cytometer. PBS 37°C: PBS-PKH67 was added to differentiated THP-1 cells and cells were incubated at 37°C. UD Exo 37°C: PKH67-labeled exosomes were added to undifferentiated THP-1 cells, followed by incubation at 37°C. Exo 37°C: PKH67-labeled exosomes were added to differentiated THP-1 cells, followed by incubation at 37°C. Exo 4°C: PKH67-labeled exosomes were added to differentiated THP-1 cells, followed by incubation at 4°C. The values are the mean \pm SEM (n = 3). Means without common letter differ significantly ($P < 0.05$). Exo = exosome; MFI = mean fluorescence intensity; UD = undifferentiated.

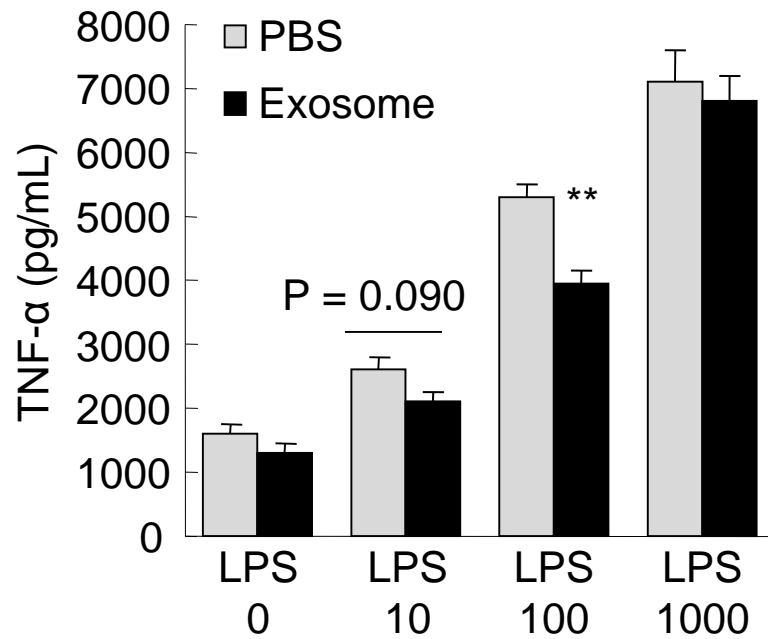


Figure 3-4-3 : TNF- α production by macrophages differentiated from THP-1 cells pretreated 6 hr with bovine milk whey-derived exosomes. Differentiated THP-1 cells (1×10^5) were pretreated with 10 μ g exosome or same volume of PBS for 6 hr. Exosome pretreated cells were activated with LPS for 16 hr. The values are the mean \pm SEM (n = 3). ** $P < 0.01$ compared with PBS.

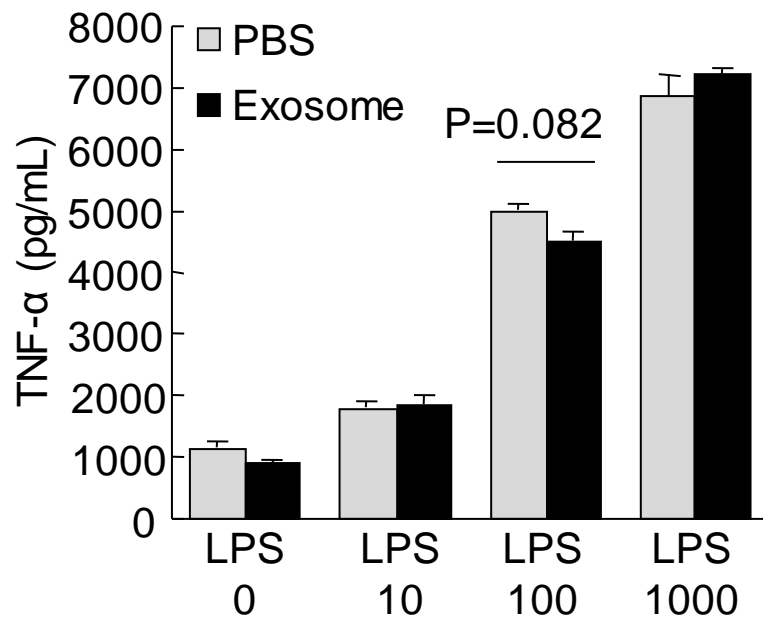


Figure 3-4-4 : TNF- α production by macrophages differentiated from THP-1 cells pretreated 24 hr with bovine milk whey-derived exosomes. Differentiated THP-1 cells (1×10^5) were pretreated with 10 μ g exosome or same volume of PBS for 24 hr. Exosome pretreated cells were activated with LPS for 16 hr. The values are the mean \pm SEM (n = 3).

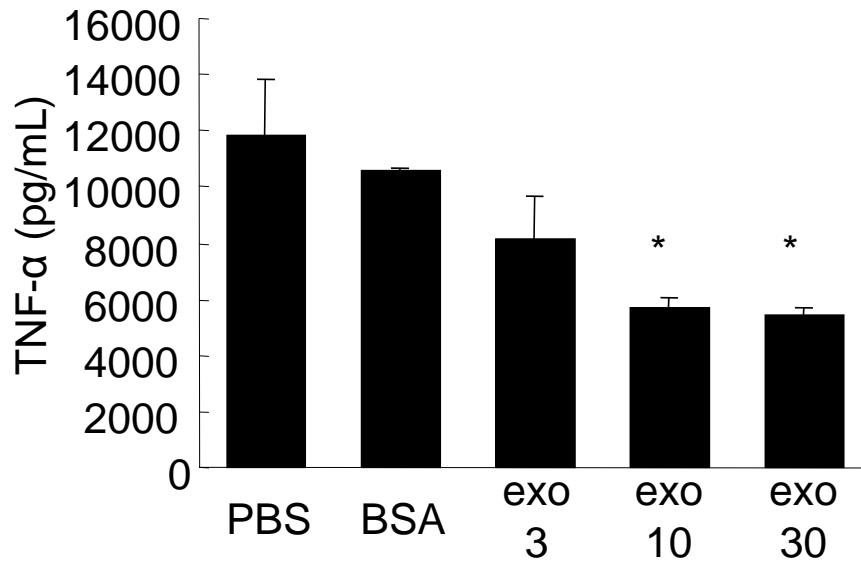


Figure 3-4-5 : Dose-dependent effect of bovine whey derived exosome on TNF- α production by macrophages differentiated from THP-1 cells. THP-1 cells were pretreated 6 hr with bovine milk whey-derived exosomes. Differentiated THP-1 cells (1×10^5) were pretreated with 3-30 μ g exosome, BSA (10 μ g) or same volume of PBS for 6 hr. Exosome pretreated cells were activated with LPS for 16 hr. The values are the mean \pm SEM (n = 3). * $P < 0.05$ compared with PBS.

第4章 *Bifidobacterium breve* M-16V が新生児消化管および免疫能に与える作用

4-1. 緒言

第2章では乳由来成分の消化管発達促進作用と抗炎症作用、第3章では乳中新規生理活性因子の発見と抗炎症作用など、人工乳で哺育される乳児の消化管発達や感染防御を促進すると考えられる機能や成分の発見を行なった。これら因子により、人工乳をより母乳に近づけることが可能になると考えられるが、序章で示したように、母乳栄養児と人工栄養児には免疫能以外に腸内細菌叢にも差があることが知られている。腸内細菌叢は乳幼児の免疫発達に重要であると考えられており、乳酸菌やビフィズス菌などの有益菌が少ないことはアレルギーリスクを高めることなどが知られている(186)。従って、乳児の免疫発達に対するプロバイオティクスの影響に関し、多くの試験が行なわれている(187)。一般に乳酸菌とビフィズス菌がプロバイオティクスとして使用されるが、ヒト乳児消化管では乳酸菌よりもビフィズス菌の方が圧倒的に優勢であり(60)、プロバイオティクスによって人工栄養児の腸内細菌叢を母乳栄養児のそれに近づけるには、ビフィズス菌が適していると考えられる。ところで、プロバイオティクスの調製乳への利用についてであるが、日本では、乳児用調製粉乳を70°Cで調乳することが一般的であるため、プロバイオティクス配合調製乳としての利用にはフォローアップミルクが第一選択として考えられる。フォローアップミルクは離乳期に使用されるが、同時期は菌叢が劇的に変化する時期でもあり、マイクロアレイを用いた以前の我々の検討(188)から、プロバイオティクス投与は新生児期よりも離乳期の方が遺伝子発現に与える影響は大きいと考えられた。以上の理由から、本章では、一般に乳児に多いとされる *Bifidobacterium breve* (*B. breve*) (60) の1株である *B. breve* M-16V (M16V) を用い、離乳期の免疫発達に与える影響を調べることで、M16V を調製乳に利用することの利点を検討した。また、第2章 2-2 で離乳期の大腸炎が免疫能発達に影響を及ぼしうることは示せたものの、全身性の免疫能に関して詳細に調べることができなかったことから、大腸炎が離乳期免疫系発達に及ぼす影響と、M16V が大腸炎に対して及ぼす影響を併せて検討した。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 動物

動物実験は、森永乳業株式会社動物実験委員会承認の下、「動物の愛護及び管理に関する法律」(法律第105号1973年10月1日施行、法律第68号2005年6月22日一部改正)および「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省告示第88号2006年4月28日施行)に則って行なった。妊娠13~16日目のF344/Nラット(交配時12週齢)を日本SLCから購入した。出産から出産後20日目(出生日を0日目とし、20日齢)まで母獣と仔ラットは同一ケージ内で飼育し、21日齢時に強制離乳を行ない、以降仔ラットは個飼とし、実験に供した。飼育にはプラスチックケージを用い、23±2°C、12時間明暗サイクルのSPF環境下で飼育した。飼料(MRSTOCK)・水道水は自由摂取とした。

4-2-2. 材料

B. breve M-16V (M16V) は森永乳業株式会社製を使用した。同菌株は Belgian Co-Ordinated Collection of Micro-organisms に寄託しており、寄託番号は LMG23729 である (189)。DSS (分子量 36,000~50,000) は MP Biomedicals から購入した。

4-2-3. 方法

群構成は4群とし、第1群と第2群には28日齢から35日齢まで滅菌水を自由摂取させ、第3群と第4群には28日齢から35日齢まで滅菌水に2%濃度で溶解したDSS水溶液を自由摂取させた。第2群と第4群には21日齢から試験終了前日(34日齢)まで、スターチに媒散させたM16Vを、 2.5×10^9 colony forming unit となるようPBSに懸濁して毎日ゾンデで投与し、第1群と第3群にはPBSで懸濁した等量のスターチを投与した。即ち、1. 滅菌水自由摂取-スターチ投与群 (Ctrl群, n = 10)、2. 滅菌水自由摂取-M16V投与群 (M16V群, n = 10)、3. 2% DSS自由摂取-スターチ投与群 (DSS群, n = 12)、4. 2% DSS自由摂取-M16V投与群 (DSS + M16V群, n = 12) とした。滅菌水およびDSS水溶液は2日に一度交換を行なった。DSS投与開始日を0日目とし、DSS投与7日目にあたる日齢35にセボフルランを用いた安楽死後、解剖を行なった。

DSS投与開始日から解剖日まで毎日便による炎症評価を行なった。

血液サンプルは、下大静脈より EDTA コート処理したシリンジを用いて採取し、白血球数・赤血球数・ヘモグロビン濃度を血球計測器 (KX-21NV、Sysmex、神戸) を用いて計測し、白血球調製のために一部を採取後、残りを $1,200 \times g$ 、 $25^\circ C$ で10分間遠心を行ない、血漿を得た。脾臓は無菌的に採取し、氷冷した無菌の Hanks' balanced salt solution (Invitrogen) 中に次の操作まで保存した。大腸サンプルは、摘出後延ばさないよう注意して長さを測定し、縦に開いて内容物を採取した。続いて氷冷した無菌 PBS で洗浄し、肛門から 2.5 cm 上部の 2 cm をサイトカイン、ケモカイン、マクロファージマーカー測定のため、速やかに凍結保存した。肛門から 2 cm を組織評価または mRNA 解析のために採取した。組織評価用サンプルは 10%ホルマリン中性緩衝液で固定化し、RNA 分析用サンプルは RNAlater に浸漬した。

便による炎症評価

第2章 2-2-2-3 と同様に、DAI は、Fitzpatrick らの報告 (118) に従い、第2章 Table 2-2-1 に基づいて判定を行なった。

大腸組織炎症評価

組織の炎症評価は、Fitzpatrick らの報告 (118) に従い、Table 4-1 に基づいて判定を行なった。組織切片の 6 領域を評価し、各サンプルの平均スコアを求めた。同評価はサンプルの群情報を知らされていない評価者により、組織科学研究所 (東京) で行なわれた。

大腸組織ホモジネート

サイトカイン、ケモカイン、マクロファージマーカー測定のために採取し、凍結保存した上述の組織サンプルを、解凍後、氷冷した PBS 中で polytron homogenizer (PT 10-35 GT、Kinematica、Switzerland) を用いて 30 秒間、2 回ホモジナイズし、10,000 g、4°C で 10 分間遠心し、上清を得た。ホモジネート上清サンプルは、分析まで -80°C にて保存した。

白血球調製

血液からの白血球調製は、血液に Pharm Lyse (BD Biosciences) を添加し、ボルテックス後 5 分間静置することで赤血球を除き、調製した。

採取した脾臓からは、脾臓を Hanks' balanced salt solution 中で細かく破碎し、70 μm メッシュの cell strainer (BD Biosciences) を通すことで single cell suspension とし、血液同様 Pharm Lyse 処理をして赤血球を除き、調製した。

フローサイトメトリー解析

末梢血および脾臓より調製した白血球における各細胞割合をフローサイトメーターにより解析した。Fc receptor による非特異的結合を防ぐため、Fc block (Clone: D34-485) (BD Biosciences) を添加し、4°C で 10 分間静置した。細胞表面マーカーの染色には以下の抗体を用い、4°C で 30 分間反応させることで行なった。APC-CD3 (Clone: 1F4)、FITC-CD4 (Clone: OX-35)、PerCP-CD8 (Clone: OX-8)、PE-CD161 (Clone: 10/78)、PE-CD25 (Clone: OX-39) (全て BD Biosciences)。染色後 2% FBS を含む Cell Wash で 2 回洗浄し、CellFIX (BD Biosciences) に再懸濁することで固定化した。

細胞内染色には、Foxp3 staining buffer set (e-Bioscience) を用いて固定化/透過処理後、APC-Foxp3 (Clone: FJK-16s) (e-Bioscience) を用いて染色した。

染色・固定化後白血球サンプルは、BD FACS Canto を用いて分析し、データ解析は FlowJo software を用いて行なった。細胞集団の同定には過去の報告 (190, 191) を参照した。細胞集団同定の詳細図を Fig. 4-1 と Fig. 4-2 に示す。

細胞培養

脾臓白血球を 96-well 平底プレートを用い、triplicate で培養した。1 well 当たり 200 μl で培養し、細胞濃度は 1×10^6 cells/ml とした。培地には 10% FBS、2 mM L-glutamine、100 U/ml penicillin、0.1 mg/ml streptomycin を含む RPMI 1640 (全て Invitrogen) を用いたが、TGF- β 測定を考慮し、Nakao らの報告 (192) に従った無血清培地 (2 mM L-glutamine、100 U/ml penicillin、0.1 mg/ml streptomycin を含む AIM-V (全て Invitrogen)) も使用した。両培地を使用した培養は 37°C、5% CO₂ 条件下で行ない、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Concanavalin A (Sigma-Aldrich) で活性化を行なった。RPMI 1640 での培養は 48 時間、AIM-V での培養は 72 時間行ない、培養上清回収後、分析まで -80°C にて保存した。

ELISA、Milliplex およびたんぱく質量測定

血漿中のアルブミン濃度は Rat Albumin ELISA kit (AKRAL-120、シバヤギ、群馬) を用いて測定した。大腸組織ホモジネートおよび脾細胞培養上清の TGF- β を除くサイトカイン・ケモカイン測定は Milliplex Rat Cytokine/Chemokine Panel を使用し、Bio-Plex Protein Array System を用いて測定を行なった。得られたデータは Bio-Plex Manager 6.0 software を用いて解析を行なった。大腸組織ホモジネートおよび脾細胞培養上清の TGF- β_1 , β_2 は ELISA kit (TGF- β_1 : MB100、TGF- β_2 : DB250) を用いて測定した。大腸組織ホモジネートの CD11b (integrin α M と呼ばれる) は ELISA kit (SEB685Ra、Cloud-Cline、Houston、TX、USA) を用いて測定した。大腸組織ホモジネートのたんぱく質量は、Quick Start Protein Assay (Bio Rad) を用いて測定した。

大腸内容物からの DNA 抽出

大腸内容物からの DNA 抽出は Odamaki らの報告 (193) に従って行なった。すなわち、20 mg の大腸内容物を 1 ml PBS で 3 回洗浄し、13,000 rpm で 5 分間遠心した。ペレット状の大腸内容物サンプルを 450 μ l の抽出 buffer (100 mM Tris-HCl、40 mM EDTA、pH 9.0) と 50 μ l の 10% ドデシル硫酸ナトリウムに再懸濁した。直径 0.1 mm のガラスビーズ 300 mg と 500 μ l の飽和フェノールを加え、FastPrep FP 100A (フナコシ、東京) を用いて 30 秒間破碎した。13,000 rpm で 5 分間遠心後、フェノール-クロロホルムにより上清 400 μ l を採取し、250 μ l を用いてイソプロパノールにより沈殿させた。精製には High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche、Basel、Switzerland) を用い、精製された DNA は 200 μ l の Tris-EDTA buffer (pH 8.0) に溶解した。

定量 PCR による腸内細菌叢解析

各菌属・菌種測定のためのプライマーは、過去の報告に従った (*Bifidobacteria*: Ref 194、*Bifidobacterium breve*: Ref 195、*Lactobacillus*: Ref 196、*Enterobacteriaceae*: Ref 197)。プライマー配列等に関する情報を Table 4-2 に記載した。定量 PCR は SYBR Premix Ex Taq (タカラ、滋賀) を用い、7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて実施した。*Bifidobacteria*、*B. breve*、*Enterobacteriaceae*:測定には 95°C で 20 秒間の後、95°C で 3 秒間、55°C または 60°C で 30 秒間、72°C で 30 秒間 40 サイクル繰り返した。*Lactobacillus* 測定には 95°C で 30 秒間の後、95°C で 3 秒間、60°C で 30 秒間 40 サイクル繰り返した。PCR 反応後、得られた産物が単一であるかを確認するため、60°C から 95°C まで 0.2°C/秒の速度で温度を上昇させ、Melting curve を作成した。

各属・種の細菌数を求めるため、以下の菌株から DNA を抽出し、標準曲線を作成した。

Bifidobacteria: Japan Collection of Microorganisms (JCM) 1217 (*B. longum* type strain)

B. breve: JCM 1192 (*B. breve* type strain)

Lactobacillus: JCM 1131 (*Lactobacillus gasserii* type strain)

Enterobacteriaceae: JCM 1649 (*Escherichia coli* type strain)

得られたデータは 7500 Software ver. 2.0.4 (Applied Biosystems) を用いて解析を行なった。

4-2-4. 統計解析

DAI と大腸組織炎症評価以外の統計的有意差の検定には、Student's *t*-test を用いた。DAI と大腸組織炎症評価の統計的有意差の検定には Wilcoxon/Kruskal-Wallis test を用いた。有意水準は $P < 0.05$ とし、JMP software ver. 5.1 により行なった。本章での検討の第一の目的は、離乳期に大腸炎により影響を受けるパラメーターを見つけることにあり、第二の目的が、大腸炎により影響を受けたパラメーターに対し、非炎症・炎症条件下で M16V が与える影響を調べることにある。従って多重性を考慮し、Ctrl 群と DSS 群に統計的有意差があった場合のみ、Ctrl 群と M16V 群、DSS 群と DSS+M16V 群の比較を行なった。

4-3. 結果

4-3-1. 大腸炎により変化した項目と M16V が同項目に与えた影響

大腸炎炎症度と栄養状態

DAI による炎症度の評価の結果、炎症誘導 3 日目から 7 日目まで DSS 群 DAI スコアは Ctrl 群と比較し、有意に高く、同期間、5 日目を除く全ての日で M16V 投与により DAI スコアは有意に抑制された (Fig. 4-3)。大腸炎により体重増加が減少し、大腸長の短縮化が起こった。M16V は体重増加減少を抑制することはできなかったが、大腸長の短縮化を抑えた (Fig. 4-4)。大腸炎はさらに血中アルブミン値を低下させたが、M16V 投与によりアルブミン値低下が抑えられた (Fig. 4-5)。大腸組織評価の結果、M16V は炎症度、炎症範囲を有意に抑制し、クリプトに対するダメージを抑制する傾向を示した (Table 4-3)。各群のスコア平均値に近い代表的な組織評価写真を Fig. 4-6 に示す。

血液パラメーターと脾臓白血球

大腸炎により血液中赤血球数、ヘモグロビン濃度が減少したが、白血球数は変わらなかった (Fig. 4-7)。M16V は血液中赤血球数減少を抑制する傾向 ($P = 0.058$) を示し、ヘモグロビン濃度減少を有意に抑制した。一方、大腸炎により血液白血球中単球・脾臓白血球中顆粒球の割合が増加し、脾臓白血球中リンパ球割合が減少したが、M16V は血液白血球中単球増加を有意に抑制した (Fig. 4-8)。

大腸炎症性因子

大腸炎により大腸組織において炎症性サイトカイン (IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α)、ケモカイン (フラクタルカイン、単球遊走たんぱく質-1[monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1])、単球/マクロファージマーカーである CD11b、抗炎症性サイトカイン (IL-10、TGF- β ₂) が誘導された (Fig. 4-9)。大腸炎により誘導されたこれら因子のうち、IL-1 β 、フラクタルカイン、

CD11b は M16V により有意に抑制されたが、その他の因子 (IL-1 α 、IL-10、TNF- α 、MCP-1) は抑制されなかった。

血液・脾臓リンパ球ポピュレーションおよび T 細胞サブセット

大腸炎により血液リンパ球中のナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) 割合・脾臓リンパ球中の T 細胞割合が増加し、脾臓リンパ球中の NK 細胞・NKT 細胞割合が減少した (Fig. 4-10)。また、大腸炎は脾臓 T 細胞中ヘルパー T 細胞 (Th; CD3⁺CD4⁺) 割合を増加させ、細胞傷害性 T 細胞 (Tc; CD3⁺CD8⁺) 割合を減少させ、結果として Th/Tc 比を有意に変化させた (Ctrl: 1.44 \pm 0.02、M16V: 1.40 \pm 0.02、DSS: 1.74 \pm 0.05^{**}、DSS: 1.66 \pm 0.10; ^{**} $P < 0.0001$ vs. Ctrl) (Fig. 4-11)。

大腸炎により変化した血液・脾臓リンパ球ポピュレーションに対し、M16V は影響を及ぼさなかった。非炎症群間の比較では、血液リンパ球中 NK 細胞割合が M16V で有意に増加した (Fig. 4-10)。

全身性免疫機能

脾細胞培養の結果、大腸炎により T 細胞が産生するサイトカインの多く (IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10、IL-17A、TNF- α) が有意に減少し、一部 (IL-6) が低下する傾向 ($P = 0.058$) が認められた (Fig. 4-12)。TGF- β_1 の産生には影響がなかった。TGF- β_2 は全群で産生が認められなかったため、結果は示さなかった。大腸炎により産生が減少したサイトカインに対し、M16V は IFN- γ 産生低下を有意に抑制し、IL-2 産生低下を抑制する傾向 ($P = 0.071$) を示したが、その他のサイトカイン (IL-4、IL-10、IL-17A、TNF- α) 産生低下には影響を及ぼさなかった。非炎症群間の比較 (Ctrl vs. M16V) では、M16V は IL-10 と IL-17A の産生を抑制したが、その他のサイトカイン (IFN- γ 、IL-2、IL-4、TNF- α) 産生には影響しなかった。

大腸内容物細菌叢

大腸炎により *Bifidobacteria* と *Enterobacteriaceae* が有意に増加し、*B. breve* と *Lactobacillus* が有意に減少した (Fig. 4-13)。M16V は *B. breve* の減少と *Enterobacteriaceae* の増加を有意に抑制した。非炎症群間の比較では、M16V は *B. breve* を有意に増加させたが、その他の菌には影響を及ぼさなかった。

4-4. 考察

新生児の免疫機能は、出生後 Th2 優勢の状態から Th1 および Treg を誘導しながら発達していく (198)。従って、もし正常な免疫発達が起こらない場合、アレルギーや自己免疫疾患などに罹患する (198)。一方、「炎症」は様々な「代謝」および「免疫」疾患を引き起こすことが知られている (199) が、離乳期における炎症に関する研究は限定的である (118, 200)。本章では、炎症が離乳期に及ぼす影響と、M16V が離乳期の炎症と発達に及ぼす影響について

て検討を行なった。

大腸における炎症は、体重増加の抑制や大腸長の短縮化など、成長を阻害し、血中アルブミン低下などの低栄養状態、貧血、末梢免疫細胞ポピュレーションの変化、全身性免疫機能の低下などを引き起こした。大腸炎は血液白血球中の単球割合を増加させたが、これと一致し、大腸で単球/マクロファージマーカーである CD11b、単球/マクロファージ刺激性のケモカインであるフラクタルカイン (201)、単球誘導性ケモカインである MCP-1 が増加した。これらの結果は、単球/マクロファージが血中や炎症組織に誘導されていることを示唆する。白血球中サブセットだけでなく、大腸炎は、血中 NK 細胞割合増加、脾臓中 NK 細胞・NKT 細胞割合減少、脾臓中 T 細胞割合増加など、リンパ球中細胞ポピュレーションも変化させた。NK 細胞・NKT 細胞の結果については、NK 細胞・NKT 細胞プールから同細胞が血液や炎症組織に誘導された可能性を示す。実際、炎症により誘導された IL-15 によって炎症状態の大腸粘膜固有層に NK 細胞と NKT 細胞が増加することが報告されている (202)。脾臓 T 細胞については、リンパ球中の割合だけでなく、Th と Tc の割合も変化させた。Th 割合を増加させ、Tc 割合を減少させることで、大腸炎により Th/Tc 割合が有意に増加した。しかしながら、Th 割合が増加したにも関わらず、脾細胞培養の結果、Th 細胞が産生すると考えられるサイトカイン産生は減少した。この結果が示すのは、「炎症」が T 細胞機能を変化させた、もしくは、T 細胞機能発達を阻害したということである。DSS 誘導性大腸炎により、胸腺の委縮が起こり、胸腺機能が変化することが報告されている (203)。胸腺の発達は Growth hormone に依存しており、Growth hormone はたんぱく質栄養状態に依存している。実際、本検討でも血中アルブミン値は低下しており、さらに、Lee と Woodward は、低たんぱく質餌が離乳期マウスの脾臓における CD4⁺/CD8⁺比 (つまり Th/Tc 比) を増加させること、同比率は低栄養状態を反映していることを報告している (204) が、本実験においても脾臓中 Th/Tc 比は増加していた。以上のことから、大腸炎により誘導された低たんぱく質栄養状態が、胸腺機能不全を引き起こし、結果として脾臓 T 細胞機能を変化させたと考えられる。

M16V の大腸炎への影響、また、大腸炎により変化するパラメーターについて、非炎症状態時に与える影響の検討を行なった。M16V は非炎症条件において、離乳期ラット脾細胞の IL-10 産生を抑制した。IL-10 は抗炎症性サイトカインの一つであるが、IL-10 同様に炎症性サイトカインの一つである IL-17A 産生も抑制した。これらのことが示すのは、M16V が離乳期の全身性 T 細胞免疫能を変化させるということである。大腸炎に対しては、DAI 増加、大腸長の短縮化、血中アルブミン・ヘモグロビン濃度低下など、大腸炎によって変化するパラメーターの一部を有意に改善した。組織切片を用いた大腸組織評価でも炎症を抑制しており、炎症性サイトカインの一つ IL-1 β 、単球/マクロファージ関連分子のフラクタルカイン・CD11b も有意に抑制した。Tomosada ら (205) は M16V が TLR2 と相互作用し、ユビキチン化編集酵素の一つである A20 の発現を増加させることで、続く TLR4 の活性化を制御すると消化管上皮細胞を用いた検討により報告しているが、本章での結果も同様の機序で

炎症性サイトカインが低下したのかもしれない。

大腸炎により脾臓 T 細胞サイトカイン産生が減少したが、M16V により IFN- γ 産生減少は有意に抑制され、IL-2 産生減少は抑制される傾向を示した (Fig. 4-12)。興味深いことに、M16V は非炎症状態で IL-10・IL-17A の産生を抑制したにも関わらず、大腸炎による T 細胞サイトカイン産生減少を悪化させることはなかった。このことは、M16V が離乳期免疫能を変化させるが、大腸炎など局所の炎症を悪化させないことを示しており、作用機序は未知なもの、乳幼児に使用することを考慮すると、重要な知見であると考えられる。

大腸炎により、*Bifidobacteria*・*Enterobacteriaceae* が増加し、*B. breve*・*Lactobacillus* が減少するなど、大腸内容物の細菌叢も変化した。一般に腸内細菌叢は大腸炎に関連すると考えられており、*Enterobacteriaceae* の増加と *Lactobacillus* の減少がヒト IBD 患者および大腸炎動物モデルで報告されており (206、207)、本章での結果と一致する。今回、有益な菌属の一つと考えられている *Bifidobacteria* が大腸炎で増加したが、潰瘍性大腸炎活動期の患者由来粘膜生検で *Bifidobacteria* が増加することも報告されており (208)、*Bifidobacteria* を構成する種が、大腸炎によって変化したことが示唆される。実際、*B. breve* は大腸炎で減少していた。M16V は大腸炎により減少した *B. breve* を有意に増加させ、増加した *Enterobacteriaceae* を有意に減少させた。M16V は非炎症状態では *B. breve* 以外の菌に影響を及ぼさなかったが、このことは離乳期ラットに M16V を投与した過去の報告 (188) と一致する。

近年の研究により、いくつかのプロバイオティクスが炎症を改善することが報告されており (206、209)、その作用機序として Treg の誘導が報告されている (209)。従って、本章でも血液および脾臓 Treg、Treg に関連したサイトカインである TGF- β について検討を行なった。大腸炎は大腸での TGF- β_2 産生を増加させたものの、血液・脾臓リンパ球中の Treg 割合、大腸・脾臓 TGF- β_1 産生には影響を及ぼさなかった。Zakostelska ら (209) は、*Lactobacillus casei* DN-114 001 投与により脾臓・パイエル板で変化はないものの、腸間膜リンパ節で Treg 割合が増加することを報告しており、Liu ら (210) も *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 投与による Treg の増加は小腸と腸間膜リンパ節で認められたと報告している。これらの報告が示すのは、プロバイオティクスによる Treg の誘導は腸間膜リンパ節や粘膜固有層で起こっているかもしれないということである。M16V による大腸炎の抑制が Treg によるものだったとすると、今後腸間膜リンパ節や粘膜固有層を調べる必要がある。

8-5. 小括

本章では、離乳期の大腸炎が低栄養状態を引き起こし、身体・免疫系発達を阻害することを示した上で、*B. breve* M-16V が大腸炎を抑制することを示すことができた。同株は日本を含む複数の国の新生児集中治療室で使用されているが、新生児に対してだけでなく、幼児に対する使用面でも安全で有益な菌株であることが示唆された。しかし、M16V が非炎症時に脾臓 T 細胞 IL-10、IL-17 産生を抑制する点や、M16V の腸間膜リンパ節・粘膜固有層 Treg・Th17 に対する影響など、いくつかの解決すべき課題が残った。

Table 4-1 : Severity scale to estimate histological damage

Feature scored	Score	Description
Inflammation severity	0	None
	1	Mild
	2	Moderate
	3	Severe
Inflammation extent	0	None
	1	Mucosa
	2	Mucosa and submucosa
	3	Transmural
Crypt damage	0	None
	1	One third of crypt damaged
	2	Two thirds of crypt damaged
	3	Crypts lost, surface epithelium present
	4	Crypts and surface epithelium lost
Percent involvement	0	0
	1	1-25
	2	26-50
	3	51-75
	4	76-100

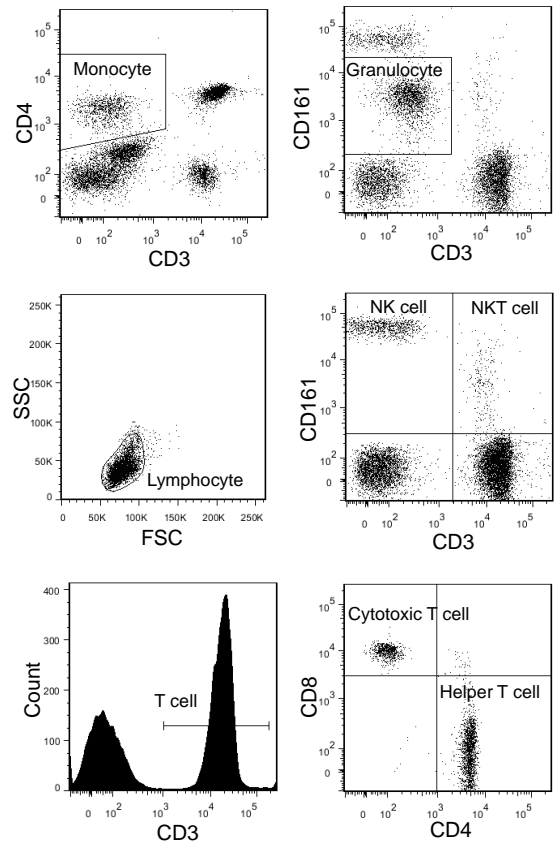


Figure 4-1 : Flowchart of leukocyte and lymphocyte subsets among blood and spleen leukocytes using flow cytometry.

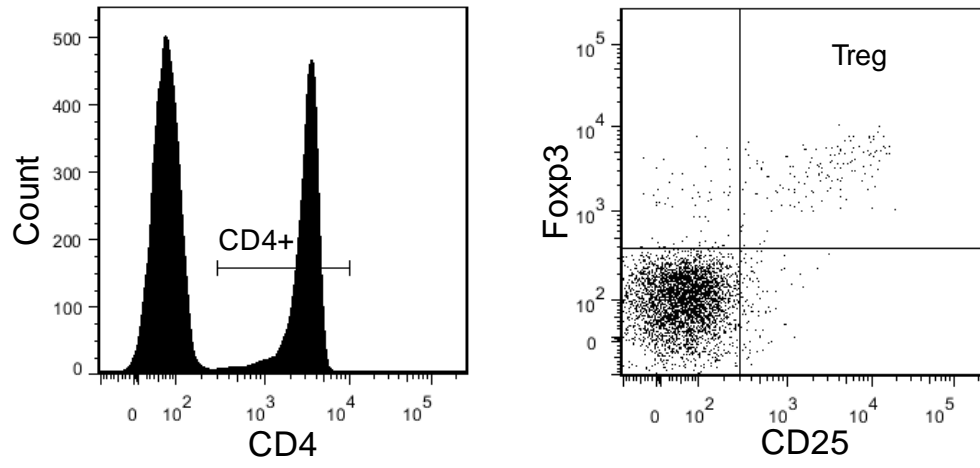


Figure 4-2 : Flow cytometric analysis of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells.

Table 4-2 : PCR primers for the detection of *Bifidobacterium*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus* and *Enterobacteriaceae*.

Target bacteria	Probe	Sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp (°C)	Strain for standard curve	References
<i>Bifidobacterium</i>	g-Bifid-F	CTCCTGGAAACGGGTGG	552	55	JCM 1217	Matsuki <i>et al.</i> (194)
	g-Bifid-R	GGTGTTCCTCCCGATATCTACA				
<i>B. breve</i>	BiBRE-1	CCGGATGCTCCATCACAC	288	55	JCM 1192	Matsuki <i>et al.</i> (195)
	BiBRE-2	ACAAAGTGCCTTGCTCCCT				
<i>Lactobacillus</i>	F-Lacto	GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC	126	60	JCM 1131	Delroisse <i>et al.</i> (196)
	R-Lacto	GGCCAGTTACTACCTCTATCCTTCTTC				
<i>Enterobacteriaceae</i>	En-lsu3F	TGCCGTA ACTTCGGGAGAAGGCA	428	60	JCM 1649	Matsuda <i>et al.</i> (197)
	En-lsu3R	TCAAGGCTCAATGTTTCAGTGTC				

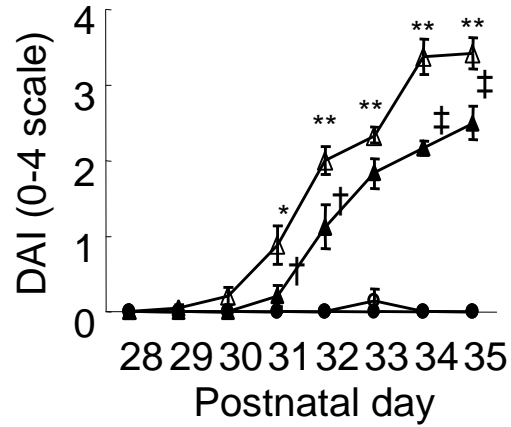


Figure 4-3 : The effects of colitis and *B. breve* M-16V administration on the disease activity index (DAI) (Ctrl, open circle; M16V, filled circle; open triangle, DSS; filled triangle, DSS+M16V) in weanling F344 rats. Data are presented as the mean \pm SEM; n = 10, Ctrl group and M16V group; n = 12, DSS group and DSS+M16V group; * P < 0.01, ** P < 0.0001 vs. Ctrl group. † P < 0.05, ‡ P < 0.01 vs. DSS group.

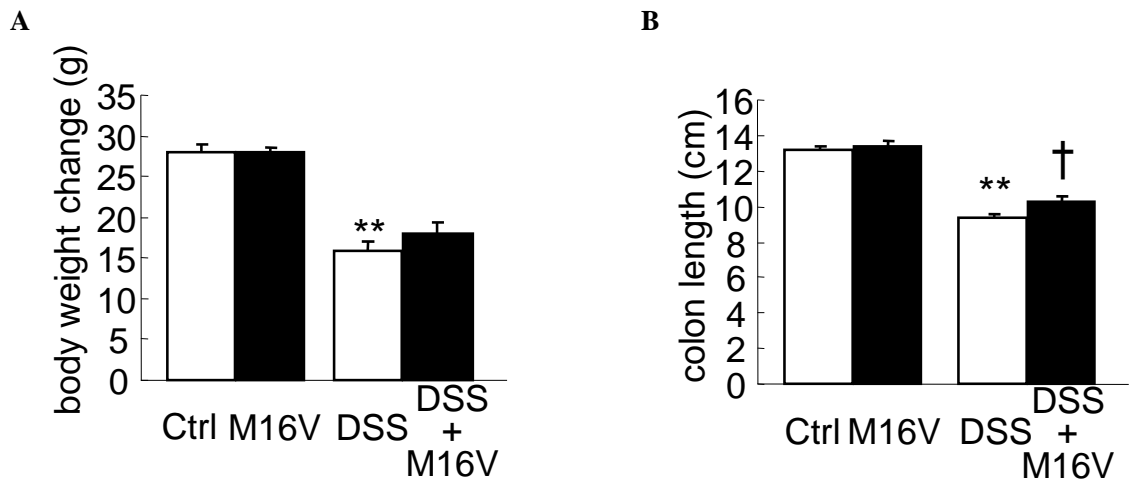


Figure 4-4 : The effects of colitis and *B. breve* M-16V administration on (A) body weight change, (B) colon length in weanling F344 rats. Data are presented as the mean \pm SEM; n = 10, Ctrl group and M16V group; n = 12, DSS group and DSS+M16V group; * $P < 0.01$, ** $P < 0.0001$ vs. Ctrl group. † $P < 0.05$ vs. DSS group.

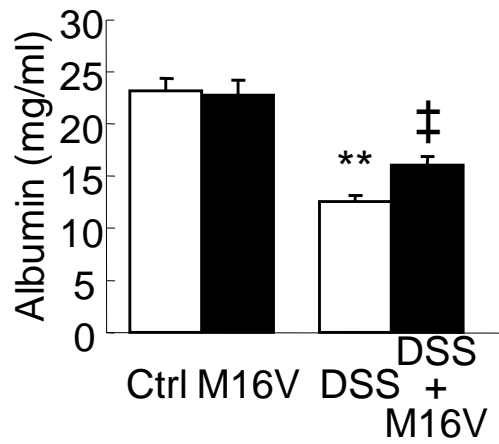


Figure 4-5 : The effects of colitis and *B. breve* M-16V administration on the plasma albumin in weanling F344 rats. Data are presented as the mean \pm SEM; n = 10, Ctrl group and M16V group; n = 12, DSS group and DSS+M16V group; ** $P < 0.0001$ vs. Ctrl group. ‡ $P < 0.01$ vs. DSS group.

Table 4-3 : Histological scores of colon tissues in weanling rats.

Group	Inflammation severity (0-12)	Inflammation extent (0-12)	Crypt damage (0-16)	Total Score (0-40)
Ctrl	0	0	0	0
M16V	0	0	0	0
DSS	11.92 ± 0.08 ^{**}	11.92 ± 0.08 ^{**}	14.50 ± 0.47 [*]	38.33 ± 0.59 [*]
DSS + M16V	10.17 ± 1.15 [†]	10.58 ± 0.75 [†]	11.75 ± 1.60	32.50 ± 3.46

Data are expressed as mean ± SEM (Ctrl, M16V, n =4; DSS, DSS + M16V, n = 6). ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01 vs. Ctrl, [†]*P* < 0.05 vs. DSS group.

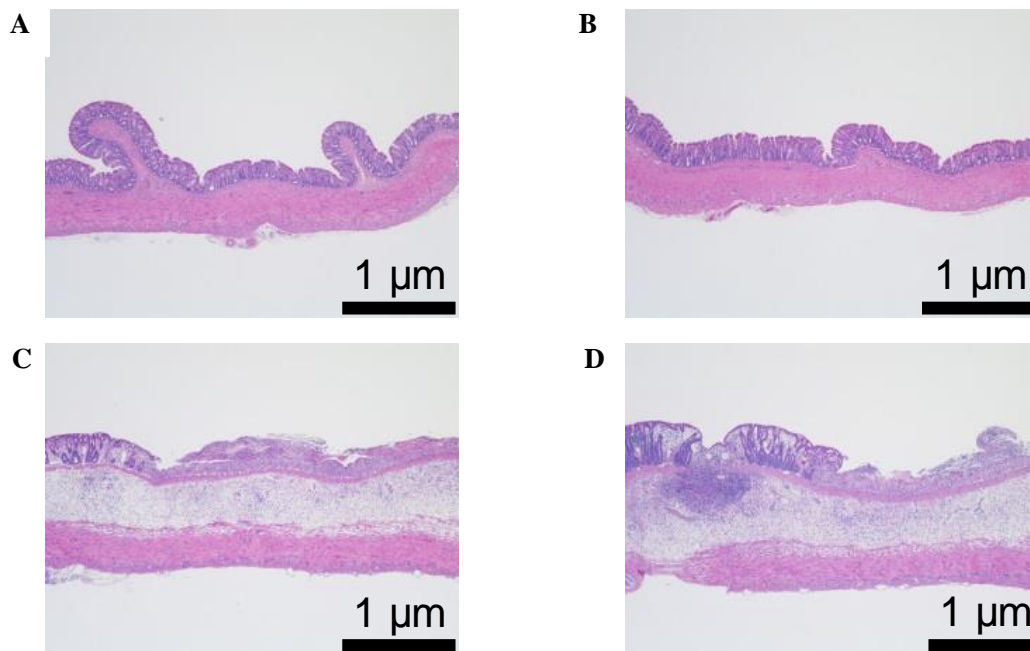


Figure 4-6 : Representative (shows the near average scores of each group) histological photographs of the distal colon of weanling rats (magnification $\times 4$). (A) Ctrl group (total score = 0), (B) M16V group (total score = 0), (C) DSS group (inflammation severity score = 12.0, inflammation extent score = 12.0, crypt damage score = 14.7, total score = 38.7), (D) DSS+M16V group (inflammation severity score = 10.5, inflammation extent score = 10.5, crypt damage score = 11.5, total score = 32.5).

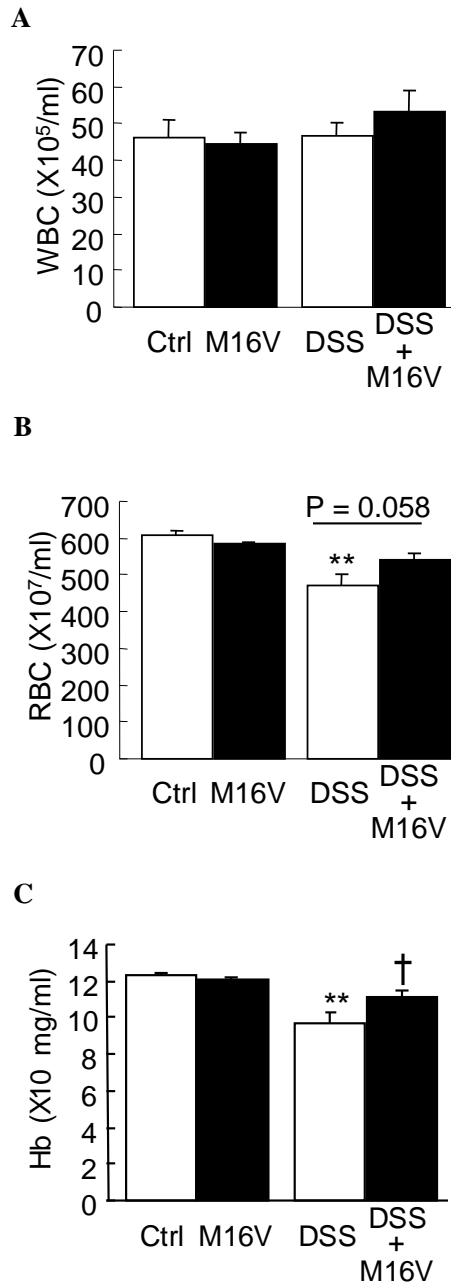


Figure 4-7 : The effects of colitis and *B. breve* M-16V administration on blood parameters. (A) White blood cells (WBC), (B) Red blood cells (RBC), (C) Blood Hb. Data are presented as the mean \pm SEM; n = 10, Ctrl group and M16V group; n = 12, DSS group and DSS+M16V group; ** *P* < 0.001 vs. Ctrl group. † *P* < 0.05 vs. DSS group.

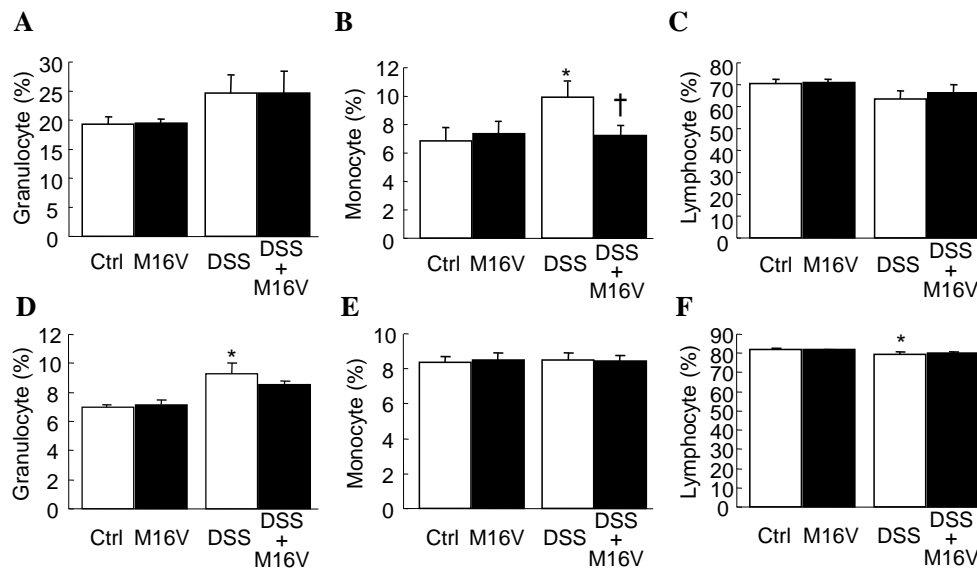


Figure 4-8 : The effects of colitis and *B. breve* M-16V administration on leukocyte proportions in blood and spleen of weanling F344 rats. (A) Granulocytes in blood WBC, (B) Monocytes in blood WBC, (C) Lymphocytes in blood WBC, (D) Granulocytes in spleen WBC, (E) Monocytes in spleen WBC and (F) Lymphocytes in spleen WBC. Data are presented as the mean \pm SEM; n = 10, Ctrl group and M16V group; n = 12, DSS group and DSS+M16V group; * P < 0.05 vs. Ctrl group. † P < 0.05 vs. DSS group.

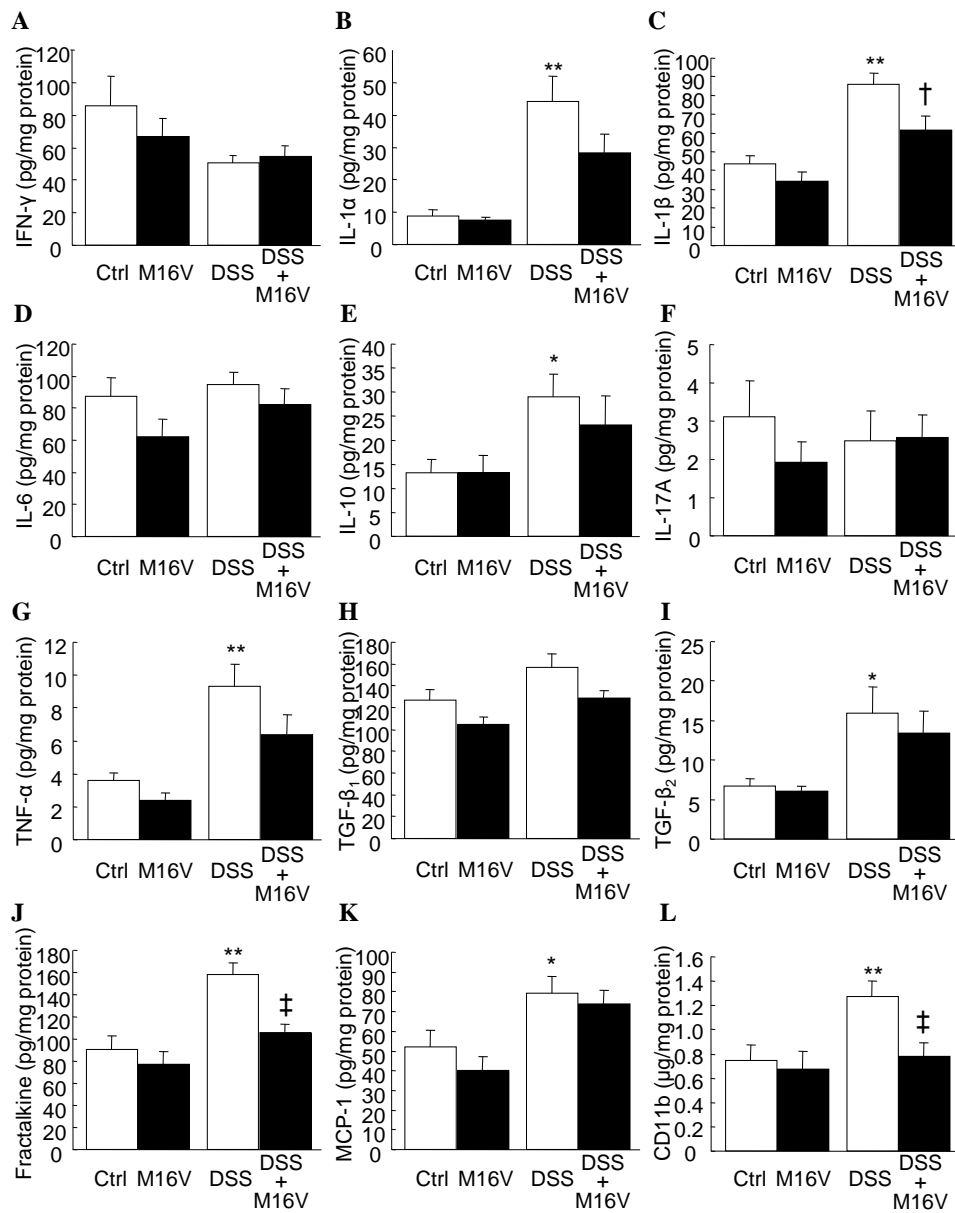


Figure 4-9 : The effects of colitis and *B. breve* M-16V administration on colon cytokines, chemokines, and monocyte/macrophage marker in weanling F344 rats. (A) IFN- γ , (B) IL-1 α , (C) IL-1 β , (D) IL-6, (E) IL-10, (F) IL-17A, (G) TNF- α , (H) TGF- β_1 , (I) TGF- β_2 , (J) Fractalkine, (K) Monocyte chemoattractant protein (MCP) -1, (L) CD11b (also known as integrin α M). Data are presented as the mean \pm SEM; n = 10, Ctrl group and M16V group; n = 12, DSS group and DSS+M16V group; * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. Ctrl group. † P < 0.05, ‡ P < 0.01 vs. DSS group.

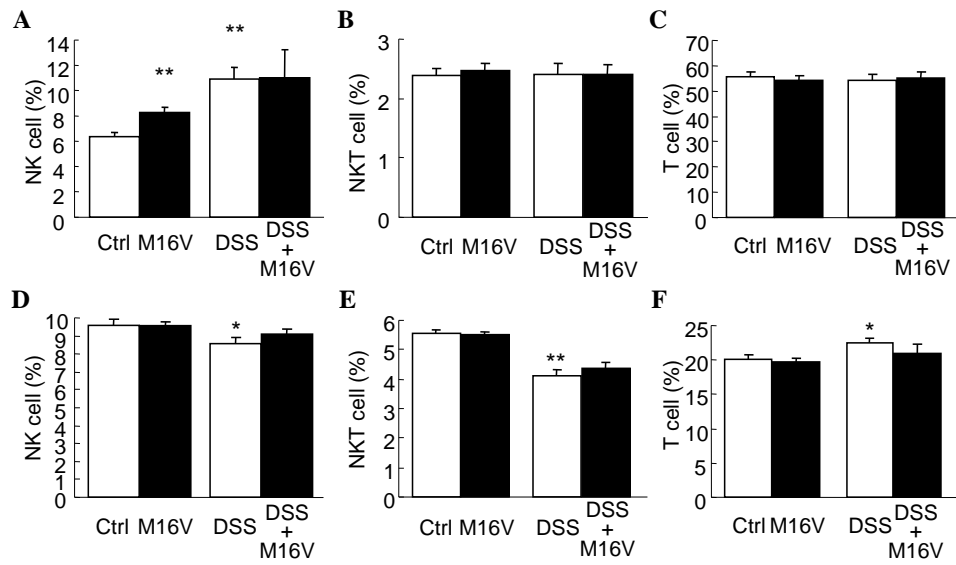


Figure 4-10 : The effects of colitis and *B. breve* M-16V administration on subset proportions among blood and spleen lymphocytes of weanling F344 rats. (A-C) blood, (D-F) spleen, (A, D) natural killer (NK; CD3⁻CD161^{high}) cells, (B, E) NKT (CD3⁺CD161⁺) cells, (C, F) T cells (CD3⁺CD161⁻). Data are presented as the mean \pm SEM; n = 10, Ctrl group and M16V group; n = 12, DSS group and DSS+M16V group; * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. Ctrl group.

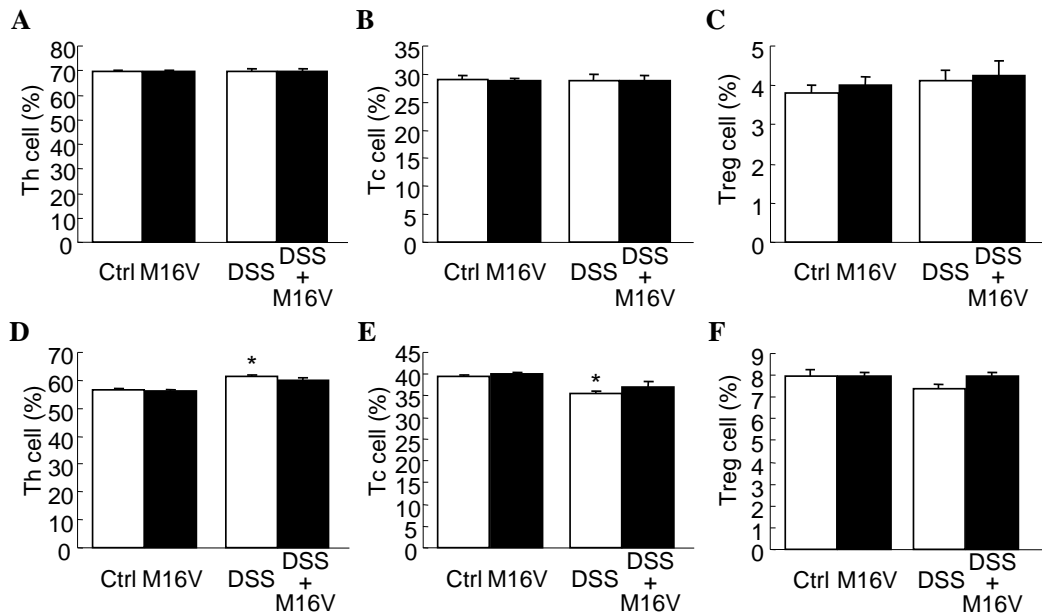


Figure 4-11 : The effects of colitis and *B. breve* M-16V administration on T cell subsets among blood and spleen T cells of weanling F344 rats. (A-C) blood, (D-F) spleen, (A, D) helper T (Th; CD3⁺CD4⁺) cells, (B, E) cytotoxic T (Tc; CD3⁺CD8⁺) cells, (C, F) regulatory T (Treg; CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) cells. Data are presented as the mean \pm SEM; n = 10, Ctrl group and M16V group; n = 12, DSS group and DSS+M16V group; * P < 0.0001 vs. Ctrl group.

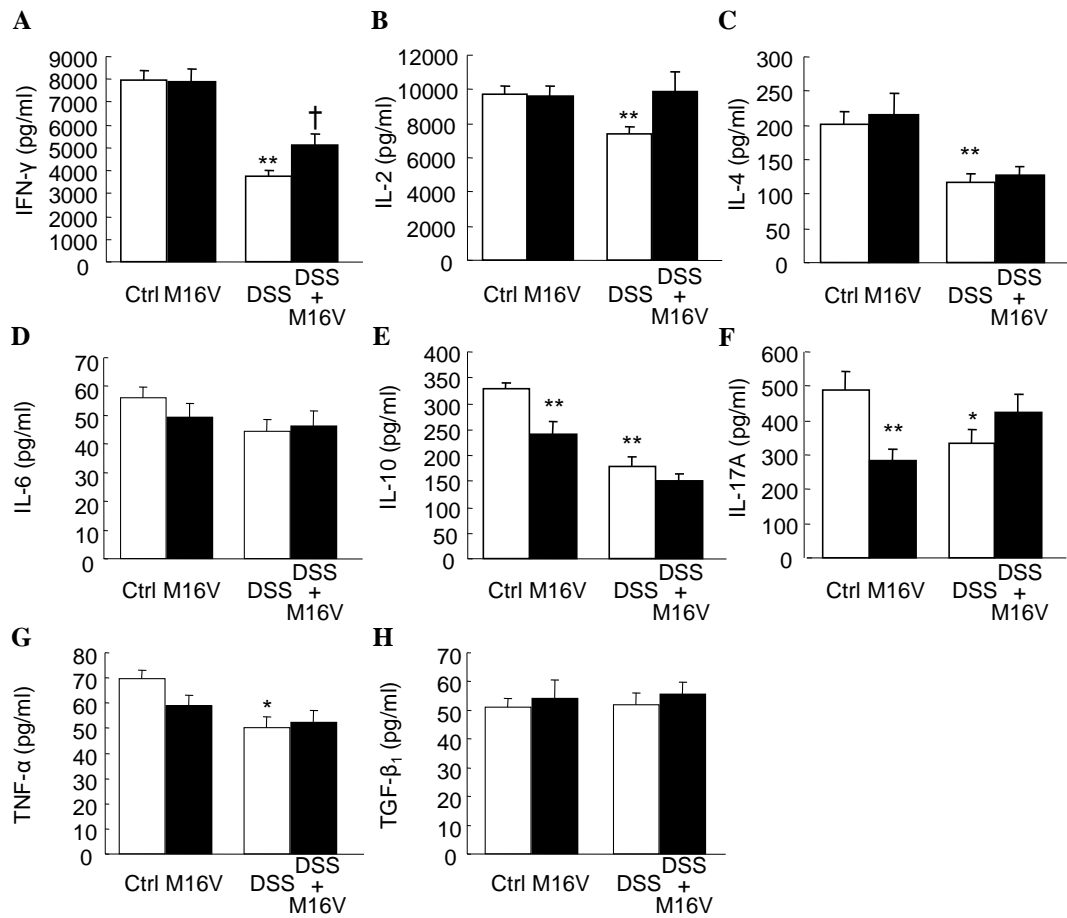


Figure 4-12 : The effects of colitis and *B. breve* M-16V administration on spleen T cell cytokines in weanling F344 rats. (A) IFN- γ , (B) IL-2, (C) IL-4, (D) IL-6, (E) IL-10, (F) IL-17A, (G) TNF- α , (H) TGF- β_1 . Data are presented as the mean \pm SEM; n = 10, Ctrl group and M16V group; n = 12, DSS group and DSS+M16V group; * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. Ctrl group. † P < 0.05 vs. DSS group.

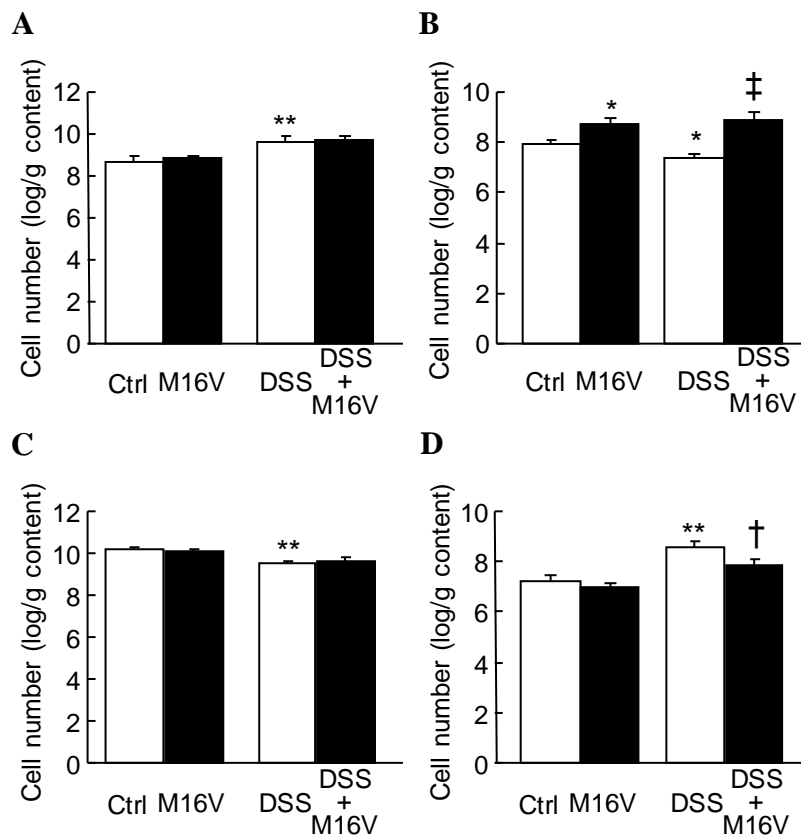


Figure 4-13 : The effects of colitis and *B. breve* M-16V administration on microbiota in the colon content of weanling F344 rats. (A) *Bifidobacterium*, (B) *Bifidobacterium breve*, (C) *Lactobacillus*, (D) *Enterobacteriaceae*. Data are presented as the mean \pm SEM; n = 10, Ctrl group and M16V group; n = 12, DSS group and DSS+M16V group; * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. Ctrl group. † P < 0.05, ‡ P < 0.01 vs. DSS group.

第5章 総括

5-1. 諸言

乳中には栄養素だけでなく、感染防御因子やホルモン、サイトカインなど様々な生理活性因子が含まれており、ある「種」の乳はその「種」の児（仔）にとって最適な栄養源と考えられている。従って、ヒト乳児にとって最適な栄養源は母乳であるが、何らかの理由により母乳を十分に与えることができない場合、「乳児用調製乳」が利用される。この「乳児用調製乳」であるが、様々な改良が加えられ、その栄養組成は母乳に近似しているにも関わらず、母乳栄養と人工栄養には未だ差があることが知られている。本研究では、この差が、乳中既知成分の未知の作用、あるいは、存在が知られていない未知の成分によるものであるとの仮説を立て、乳中既知成分の新規生理作用、および乳中新規成分を明らかにすることを目的として、検討を行なった。さらに、母乳栄養と人工栄養で差があるとされる「腸内細菌叢」に着目し、長年新生児集中治療室で使用され、安全性が確認されている *Bifidobacterium breve* M-16V 株 (M16V) を「乳児用調製乳」に利用することを念頭に、検討を行なった。

本論文では、第2章で乳中既知成分の新規生理作用について、第3章で乳中新規成分について、第4章で M16V が新生児消化管および免疫能に与える影響について論述した。以下に本研究によって得られた結果を要約し、総括する。

5-2. 乳中既知成分の新規生理作用の探索

乳中には乳児（仔）の消化管発達を促す生理活性因子が含まれているが、乳児（仔）自身の内因性因子の分泌を刺激する作用をもつ成分もあるのではないかと考え、第2章では、消化管成熟作用を持ち、食餌刺激によって分泌することが知られている GLP-2 の分泌刺激作用を指標に、牛乳中成分の探索と、成長期における GLP-2 の役割に関する検討を行ない、以下の結果を得た。

- ① 乳仔期ラットを用い、乳中三大栄養素の GLP-2 分泌刺激作用を比較したところ、成人や成熟動物で知られている結果と異なり、「たんぱく質」にその効果が最も高かった。
- ② GLP-2 は GLP-1 と共に合成されるが、乳たんぱく質に GLP-1 の分泌刺激作用はなかった。
- ③ 乳たんぱく質と他の食品たんぱく質を比較したところ、卵、大豆に由来するたんぱく質には GLP-2 分泌刺激作用はなかった。
- ④ 乳たんぱく質はいくつかのたんぱく質の混合であるが、構成たんぱく質の全てに GLP-2 分泌刺激作用があるわけではなかった。
- ⑤ GLP-2 分泌刺激作用が認められたたんぱく質の一つである α -LA 酵素分解物の結果から、GLP-2 分泌刺激にはたんぱく質のインタクトな状態は必ずしも必要でなく、酵素分解することにより、その作用が増加するものもあった。
- ⑥ アミノ酸組成が同じで GLP-2 分泌刺激作用に差がある調製乳で人工飼育を行なった結

果、GLP-2 分泌刺激作用の強い調製乳では主に小腸の発達促進が認められた。

- ⑦ 成長期ラットへの抗 GLP-2 抗体投与の検討から、GLP-2 は主に回腸末端に作用することがわかり、乳仔期ラットを用いた人工飼育の結果を支持した。

次に、GLP-2 分泌刺激作用が比較的強かった α -LA について、離乳期ラットを用い腸炎抑制作用についても検討を行ない、以下の結果を得た。

- ⑧ 腸炎により誘導される体重増加抑制、脾臓重量減少、大腸肥厚、血中赤血球・ヘモグロビン・ヘマトクリット低下を α -LA は抑制した。
- ⑨ 腸炎により増加する血中 IL-6 を α -LA は抑制し、腸炎により減少するレプチンを α -LA は増加させた。
- ⑩ α -LA は非炎症状態ではこれらパラメーターに影響を及ぼさなかった。
- ⑪ α -LA は非炎症状態で脾臓 CD4⁺T 細胞中の CD25⁺Foxp3⁺T 細胞の割合を増加させた。
- ⑫ 腸炎により減少する大腸 Muc 3 の発現量低下を α -LA は抑制した。 α -LA は非炎症状態においても Muc 3 を増加させた。

以上の結果より、乳たんぱく質には乳児（仔）期の GLP-2 分泌を刺激するという新規な生理作用を見出すことができ、GLP-2 分泌刺激作用の差は消化管成熟に影響を及ぼすことを示すことができた。また、従来 α -La に知られていなかった腸炎抑制作用を示すことができた。

5-3. 乳中新規成分の解析

我々は以前にヒト母乳中に新規成分である miRNA が含まれることを報告した。その役割は未だ明らかでないが、産業上の利用を考慮すると、牛乳を原料とするのが現実的である。また、今後の生体での作用を考慮すると、実験動物の乳中に含まれているか否かも問題となる。従って第3章前半では、牛乳およびラット乳中の RNA について解析を行ない、以下の結果を得た。

- ① RNA 濃度は初乳乳清の方が成熟乳乳清よりも高い。
- ② ヒトやウシよりも成長速度の速いラットの乳清中 RNA 濃度はヒト・ウシの数十～数百倍である。
- ③ 乳中に含まれている miRNA は、免疫や発達に関連する miRNA が多く、組織特異的に発現するとされる miRNA はほとんど含まれていない。
- ④ 乳中には miRNA だけでなく、mRNA も存在する。
- ⑤ 乳と同じく体液である血液と比較し、乳中に存在する mRNA の種類は多い。
- ⑥ miRNA、mRNA は濃度だけでなく、発現パターンについても初乳と成熟乳では異なる。
- ⑦ 乳中 miRNA、mRNA は、酸や RNase に対して抵抗性があるが、界面活性剤処理を行なうと速やかに分解されたことから、エクソソームのような脂質二重膜中に存在すると考

えられた。

乳中の miRNA、mRNA はエクソソーム中に存在する可能性が高いことがわかったが、体液中 RNA にはエクソソーム以外の形態で存在するものも知られているため、第3章後半では、牛乳乳清から超遠心によりエクソソームを調製し、超遠心上清との比較を行なった。また、異種に作用するかどうかを調べるため、牛乳由来エクソソームのヒトマクロファージに対する作用も検討し、以下の結果を得た。

- ⑧ 牛乳乳清中に存在する RNA について、エクソソームとそれ以外の形態での存在比率はおよそ 7:3 であった。
- ⑨ miRNA についてはエクソソーム以外での形態で存在する種類が比較的多く、mRNA はほとんどがエクソソームに存在すると考えられた。
- ⑩ 牛乳由来エクソソームはヒトマクロファージに取り込まれうることが確認できた。
- ⑪ 牛乳由来エクソソームはヒトマクロファージが産生する TNF- α 産生を抑制した。
- ⑫ 牛乳由来エクソソームによる TNF- α 産生抑制は用量依存的であった。

以上の結果より、これまで乳中に存在が知られていなかった機能性 RNA に関し、ウシやラットなどヒト以外の種の乳にも miRNA が存在すること、miRNA だけでなく、mRNA も存在すること、初乳中濃度が有意に高いこと、乳中 RNA の多くはエクソソームに存在し、乳児消化管で機能する可能性があり、それは種の異なる乳に由来するエクソソームであっても可能であることを示すことができた。

5-4. *Bifidobacterium breve* M-16V が新生児消化管および免疫能に与える作用

母乳栄養児と人工栄養児には腸内細菌叢に差があることが知られている。腸内細菌叢は乳幼児の免疫発達に重要であると考えられており、乳酸菌やビフィズス菌などの有益菌が少ないことはアレルギーリスクを高めることなどが知られている。乳酸菌やビフィズス菌などの有益菌はプロバイオティクスとして利用されているが、ヒト乳児消化管では乳酸菌よりもビフィズス菌の方が圧倒的に優勢であるため、プロバイオティクス投与により人工栄養児の腸内細菌叢を母乳栄養児のそれに近づけるにはビフィズス菌が適していると考えられる。日本では、乳児用調製粉乳を 70°C で調乳することが一般的であるため、プロバイオティクス配合調製乳としての利用にはフォローアップミルクが第一選択として考えられる。フォローアップミルクを使用する時期である離乳期は、菌叢が劇的に変化する時期でもあり、マイクロアレイを用いた以前の我々の検討から、プロバイオティクス投与は新生児期よりも離乳期の方が遺伝子発現に与える影響は大きいと考えられたため、第4章では、一般に乳児に多いとされる *Bifidobacterium breve* (*B. breve*) の1株である *B. breve* M-16V (M16V) を用い、離乳期の免疫発達に与える影響を調べた。また、第2章後半で離乳期の大腸炎が免疫能発達に影響を及ぼしうることは示せたものの、全身性の免疫能に関して詳

細に調べることができなかつたことから、大腸炎が離乳期免疫系発達に及ぼす影響と、M16Vが大腸炎に対して及ぼす影響を併せて検討し、以下の結果を得た。

- ① 離乳期の大腸炎は、体重増加抑制、大腸の短縮、低たんぱく質栄養状態、貧血を引き起こした。
- ② 大腸炎により全身性のT細胞機能低下が起こり、これは低たんぱく質栄養状態が誘導されたことによるものと考えられた。
- ③ 大腸炎は大腸での炎症性サイトカインを増加させ、大腸内容物中の *Bifidobacteria*、*Enterobacteriaceae* を増加させたが、*B. breve*、*Lactobacillus* を減少させた。
- ④ M16Vは大腸炎により誘導される変化の全てを抑制できたわけではないが、大腸短縮、血中アルブミン値の低下、血中ヘモグロビンの低下、T細胞機能低下の一部、大腸炎症性サイトカイン増加の一部（特にマクロファージ浸潤関連因子）、*Enterobacteriaceae* の増加、*B. breve* の減少を抑制することができた。
- ⑤ 非炎症群間の比較では、M16V投与により、血液リンパ球中のNK細胞割合増加、脾臓T細胞のIL-10、IL-17A産生低下が起こった。特に有害な事象は認められなかったが、本結果については、免疫を抑制している可能性もあるため、引き続き検討が必要と考えられた。

以上の結果より、M16Vは炎症を抑制し、今後の検討の必要性が多少残るものの、新生児期だけでなく、離乳期においても安全に使用可能なプロバイオティクスであろうことを示すことができた。

5-5. 結語

本研究では、既知成分である乳たんぱく質の一部に、GLP-2分泌刺激作用を見出すことができ、乳中の新規生理活性因子であるmiRNA、mRNAの全容解明、プロバイオティクス *B. breve* M-16Vの炎症抑制作用と、「乳児用調製乳」をより「母乳」に近似させるための基礎的検討を行なうことができたと考える。しかし、特に乳中新規生理活性因子であるmiRNA・mRNAについては、その存在の大部分がエクソソームという脂質二重膜中にあり、牛乳由来のエクソソームがヒト細胞に作用しうることは示せたものの、生体での役割は明らかにできていない。今後は、新規生理活性因子である乳中miRNA・mRNAの生体での役割を明らかにするとともに、既知成分・新規成分を工業的に利用可能とできるよう、詳細に検討を進めていきたい。また、*B. breve* M-16Vについては、全身性免疫を抑制する可能性に関する検討や、腸間膜リンパ節・粘膜固有層のTreg・Th17細胞に対する検討が必要である。同株の作用機序をより詳細に検討するなどし、調製乳に利用していきたい。

本研究が乳の機能性に関する研究の発展に貢献するだけでなく、「乳児用調製乳」をより「母乳」に近づける研究の基礎的な知見となれば望外の喜びである。

謝辞

北海道大学農学研究院 応用生命科学部門 食品科学分野 食品栄養学研究室 原博教授には、本論文作成の機会を与えて頂くとともに、纏めから審査にわたり終始懇切なるご指導とご校閲を賜りました。深く感謝申し上げます。

北海道大学農学研究院 応用生物科学専攻の玖村朗人教授、園山慶准教授には、ご多忙にも関わらず、本論文の審査をお引き受け頂き、大変有益なご助言、ご校閲を賜りました。謹んで感謝の意を表します。

北海道大学農学研究院 応用生命科学部門 食品科学分野 食品栄養学研究室の石塚敏准教授、比良徹講師には、乳たんぱく質の新規生理作用探索の研究において、動物実験手技や結果の解釈、論文作成について多大なご指導とご助言を賜りました。心よりお礼申し上げます。

国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野の落谷孝広主任分野長、小坂展慶博士には、乳中 microRNA、乳由来エクソソームの研究において、実験手技から結果の解釈、論文作成に至るまで多大なご指導とご助言を賜りました。心よりお礼申し上げます。

本研究を行なうにあたり、深いご理解とご支援を与えて下さいました森永乳業株式会社大野晃名誉会長、宮原道夫代表取締役社長、高瀬光徳顧問、大川禎一郎常務取締役、武田安弘栄養科学研究所長に謹んで感謝の意を表します。

さらに、同栄養科学研究所 清水隆司栄養食品開発部長、岩本洋栄養機能研究部長、小澤和裕博士（元小児栄養研究室主任研究員）、関根一則博士（元栄養機能研究部部長）、難波和美様（前栄養機能研究部部長）には専門的な知識・手技の習得から論文作成など業務全般にわたり、熱心にご指導頂きました。お陰様で研究者としての礎を形成することができました。ここに深甚なる謝意を表します。

本論文を構成する研究は、ここにお名前を記すことの出来なかった多くの方々のご支援、ご協力のもとに実施されたものであり、本論文はその研究成果を代表して纏めたものであり、改めて関係者の方々に謹んで感謝の意を表します。

最後に、これまでの研究生活を陰ながら支えてくれた家族に心から感謝致します。

2016年3月 和泉 裕久

引用文献

- (1) 穴釜雄三, 乳学, Pages 1-12 光琳書院, 東京 (1975)
- (2) Oftedal O. V. and Iverson S. J., Comparative analysis of nonhuman milks, In “Handbook of milk composition”, edited by Jensen R. G., Academic Press, San Diego, Pages 749-89 (1995)
- (3) 日本栄養・食糧学会編, 栄養・食糧学用語辞典, 第2版, 建帛社, 東京 Page 333 (2015)
- (4) 上野川修一, 清水誠, 鈴木英毅, 高瀬光徳, 堂迫俊一, 元島英雄編, 乳の成分, ミルクの辞典, 朝倉書店, 東京, Pages 2-53 (2009)
- (5) 清澤功, タンパク質, 母乳の栄養学, 金原出版, 東京, Pages 3-24 (1998)
- (6) Burrin D. G. and Stoll B., Key nutrients and growth factors for the neonatal gastrointestinal tract. *Clin. Perinatol.*, 29:65-96 (2002)
- (7) Godman A. S., The immune system in human milk and the developing infant. *Breastfeed. Med.*, 2:195-204 (2007)
- (8) Liu B. and Newburg D. S., Human milk glycoproteins protect infants against human pathogens. *Breastfeed. Med.*, 8:354-62 (2013)
- (9) 和泉裕久, 周産期医学, Pages 409-12. 東京医学社, 東京 (2015)
- (10) Chandra N., Brew K. and Acharya K. R., Structural evidence for the presence of a secondary calcium binding site in human alpha-lactalbumin. *Biochemistry*, 37:4767-72 (1998)
- (11) Lönnerdal B. and Lien E. L., Nutritional and physiologic significance of alpha-lactalbumin in infants. *Nutr. Rev.*, 61:295-305 (2003)
- (12) Ushida Y., Shimokawa Y., Matsumoto H., Toida T. and Hayasawa H., Effects of bovine alpha-lactalbumin on gastric defense mechanisms in naïve rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67:577-83 (2003)
- (13) Ushida Y., Shimokawa Y., Toida T., Matsui H. and Takase M., Bovine alpha-lactalbumin stimulates mucus metabolism in gastric mucosa. *J. Dairy Sci.*, 90:541-6 (2007)
- (14) Markus C. R., Jonkman L. M., Lammers J. H., Deutz N. E., Messer M. H. and Rigtering N., Evening intake of alpha-lactalbumin increases plasma tryptophan availability and improves morning alertness and brain measures of attention. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81:1026-33 (2005)
- (15) Booij L., Merens W., Markus C. R. and Van der Does A. J., Diet rich in alpha-lactalbumin improves memory in unmedicated recovered depressed patients and matched controls. *J. Psychopharmacol.*, 20:526-35 (2006)
- (16) Pellegrini A., Thomas U., Bramaz N., Hunziker P. and von Fellenberg R., Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. *Biochim. Biophys. Acta*, 1426:439-48 (1999)
- (17) Håkansson A., Zhivotovsky B., Orrenius S., Sabharwal H. and Svanborg C., Apoptosis induced by a human milk protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:8064-8 (1995)
- (18) Tolin S., De Franceschi G., Spolaore B. Frare E., Canton M., Polverino de Laureto P. and

Fontana A., The oleic acid complexes of proteolytic fragments of alpha-lactalbumin display apoptotic activity. *FEBS J.*, 277:163-73 (2010)

(19) Brock J. H., Lactoferrin--50 years on. *Biochem. Cell Biol.*, 90:245-51 (2012)

(20) Yamauchi K., Wakabayashi H., Shin K. and Takase M., Bovine lactoferrin: benefits and mechanism of action against infection. *Biochem. Cell Biol.*, 84:291-6 (2006)

(21) Manzoni P., Rinaldi R., Cattani S., Pungni L., Romeo M. G., Messner H., Stolfi I., Decembrino L., Laforgia N., Vagnarelli F., Memo L., Bordignon L., Saia O. S., Maule M., Gallo E., Mostert M., Magnani C., Quercia M., Bollani L., Pedicino R., Renzullo L., Betta P., Mosca F., Ferrari F., Magaldi R., Stronati M. and Farina D; Italian Task Force for the Study and Prevention of Neonatal Fungal Infections, Italian Society of Neonatology., Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial. *JAMA*, 302:1421-8 (2009)

(22) Zavaleta N., Figueroa D., Rivera J., Sánchez J., Alfaro S. and Lönerdal B., Efficacy of rice-based oral rehydration solution containing recombinant human lactoferrin and lysozyme in Peruvian children with acute diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 44:258-64 (2007)

(23) Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K. and Tomita M., Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1121:130-6 (1992)

(24) Liepke C., Adermann K., Raida M., Mägert H. J., Forssmann W. G. and Zucht H. D., Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. *Eur. J. Biochem.*, 269:712-8 (2002)

(25) Oda H., Wakabayashi H., Yamauchi K., Sato T., Xiao J. Z., Abe F. and Iwatsuki K., Isolation of a bifidogenic peptide from the pepsin hydrolysate of bovine lactoferrin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79:1843-9 (2013)

(26) Ellison R. T. and Giehi T. J., Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.*, 88:1080-91 (1991)

(27) Donovan S. M., Monaco M. H., Drnevich J., Kvistgaard A. S., Hemell O. and Lönerdal B., Bovine osteopontin modifies the intestinal transcriptome of formula-fed infant rhesus monkeys to be more similar to those that were breastfed. *J. Nutr.*, 144:1910-9 (2014)

(28) Wilson E. and Butcher E. C., CCL28 controls immunoglobulin (Ig)A plasma cell accumulation in the lactating mammary gland and IgA antibody transfer to the neonate. *J. Exp. Med.*, 200:805-9 (2004)

(29) Newburg D. S., Woo J. G. and Morrow A. L., Characteristics and potential functions of human milk adiponectin. *J. Pediatr.*, 156:S41-6 (2010)

(30) Andreas N. J., Hyde M. J., Gale C., Parkinson J. R. C., Jeffries S., Holmes E. and Modi N., Effect of maternal body mass index on hormones in breast milk: a systematic review. *PLoS ONE*, 9:e115043 (2014)

(31) Shulman R. J., Oral insulin increases small intestinal mass and disaccharidase activity in the

- newborn miniature pig. *Pediatr. Res.*, 28:171-5 (1990)
- (32) Houle V. M., Schroeder E. A., Odle J. and Donovan S. M., Small intestinal disaccharidase activity and ileal villus height are increased in piglets consuming formula containing recombinant human insulin-like growth factor-I. *Pediatr. Res.*, 42:78-86 (1997)
- (33) Dvorak B., Halpern M. D., Holubec C., Williams C. S., McWilliam D. L., Dominguez J. A., Stepankova R., Payne C. M. and McCuskey R. S., Epidermal growth factor reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 282:G156-64 (2002)
- (34) Hawkes J. S., Bryan D. L., James M. J. and Gibson R. A., Cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1, and TGF-beta2) and prostaglandin E2 in human milk during the first three months. *Pediatr. Res.*, 46:194-9 (1999)
- (35) Prokesová L., Londinová-Zádníková R., Zizka J., Kocourková I., Novotná O., Petrásková P. and Sterzl I., Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 17:175-83 (2006)
- (36) Böttcher M. F., Abrahamsson T. R., Fredriksson M., Jakobsson T. and Björkstén B., Low breast milk TGF-beta2 is induced by *Lactobacillus reuteri* supplementation and associates with reduced risk of sensitization during infancy. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 19:497-504 (2008)
- (37) Oddy W. H. and Rosales F., A systematic review of the importance of milk TGF-beta on immunological outcomes in the infant and young child. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 21:47-59 (2010)
- (38) Ando T., Hatsushika K., Wako M., Ohba T., Koyama K., Ohnuma Y., Katoh R., Ogawa H., Okumura K., Luo J., Wyss-Coray T. and Nakao A., Orally administered TGF-beta is biologically active in the intestinal mucosa and enhances oral tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 120:916-23 (2007)
- (39) Verhasselt V., Milcent V., Cazareth J., Kanda A., Fleury S., Dombrowicz D., Glaichenhaus N. and Julia V., Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. *Nat. Med.*, 14:170-5 (2008)
- (40) 齋藤忠夫, 牛乳・乳製品の新しい機能 (糖質) . 乳業技術, 50:38-57 (2000)
- (41) 浦島匡, 朝隈貞樹, 福田健二, ヒトミルクオリゴ糖の生理作用. ミルクサイエンス, 56:155-76 (2008)
- (42) 片山高嶺, 母乳栄養児の腸管におけるビフィズスフローラ形成の謎. 化学と生物, 50:2-5 (2012)
- (43) 松田幹, 牛乳・乳成分の新しい機能 (脂質) . 乳業技術, 50:58-73 (2000)
- (44) Shoji H., Shimizu T., Kaneko N., Shinohara K., Shiga S., Saito M., Oshida K., Shimizu T., Takase M. and Yamashiro Y., Comparison of the phospholipid classes in human milk in Japanese mothers of term and preterm infants. *Acta Paediatr.*, 95:996-1000 (2006)
- (45) 上野宏, 乳由来糖脂質の組成および栄養機能. 応用糖質科学, 4:302-7 (2014)

- (46) Thorell L., Sjöberg L. B. and Hernell O., Nucleotides in human milk: sources and metabolism by the newborn infant. *Pediatr. Res.*, 40:845-52 (1996)
- (47) Ortega M. A., Gil A. and Sanchez-Pozo A. Maturation status of small intestine epithelium in rats deprived of dietary nucleotides. *Life Sci.*, 56:1623-30 (1995)
- (48) Uauy R., Quan R. and Gil A., Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition. *J. Nutr.*, 124:1436S-41S (1994)
- (49) Kulkarni A. D., Fanslow W. C., Rudolph F. B. and Van Buren C. T., Effect of dietary nucleotides on response to bacterial infections. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.*, 10:169-71 (1986)
- (50) Kulkarni S. S., Bhateley D. C., Zander A. R., Van Buren C. T., Rudolph F. B., Dicke K. A. and Kulkarni A. D., Functional impairment of T-lymphocytes in mouse radiation chimeras by a nucleotide-free diet. *Exp. Hematol.*, 12:694-9 (1984)
- (51) Singhal A., Macfarlane G., Macfarlane S., Lanigan J., Kennedy K., Elias-Jones A., Stephenson T., Dudek P. and Lucas A., Dietary nucleotides and fecal microbiota in formula-fed infants: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 87:1785-92 (2008)
- (52) Hassiotou F., Geddes D. T. and Hartmann P. E., Cells in human milk: state of the science. *J. Hum. Lact.*, 29:171-82 (2013)
- (53) Weiler I. J., Hickler W. and Sprenger R., Demonstration that milk cells invade the suckling neonatal mice. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 4:95-8 (1983)
- (54) Hosseini S. M., Talaei-Khozani T., Sani M. and Owrangi B., Differentiation of human breast-milk stem cells to neural stem cells and neurons. *Neurol. Res. Int.*, 2014:807896 (2014)
- (55) Savino F., Fissore M. F., Grassino E. C., Nanni G. E., Oggero R. and Silvestro L., Ghrelin, leptin and IGF-I levels in breast-fed and formula-fed infants in the first years of life. *Acta Paediatr.*, 94:531-7 (2005)
- (56) Hasselbalch H., Jeppesen D. L., Engelmann M. D., Michaelsen K. F. and Nielsen M. B., Decreased thymus size in formula-fed infants compared with breastfed infants. *Acta Paediatr.*, 85:1029-32 (1996)
- (57) Hawkes J. S. and Gibson R. A., Lymphocyte subpopulations in breast-fed and formula-fed infants at six months of age. "Bioactive Components of Human Milk" edited by Newburg, Pages 497-504. Kluwer Academic / Plenum Publishers (2001)
- (58) Section on Breast feeding, Breast feeding and the use of human milk. *Pediatrics*, 129:e827-41 (2012)
- (59) Stark P. L. and Lee A., The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J. Med. Microbiol.*, 15:189-203 (1982)
- (60) Tannock G. W., Lawley B., Munro K., Gowri Pathmanathan S., Zhou S. J., Makrides M. and Gibson R. A., Comparison of the compositions of the stool microbiotas of infants fed goat milk formula, cow milk-based formula, or breast milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79:3040-8 (2013)

- (61) Cross M. L. and Gill H. S., Immunomodulatory properties of milk. *Br. J. Nutr.*, 84:S81-9 (2000)
- (62) Gill H. S., Doull F., Rutherford K. J. and Cross M. L., Immunoregulatory peptides of bovine milk. *Br. J. Nutr.*, 84:S111-7 (2000)
- (63) van Hooijdonk A. C. M., Kussendrager K. D. and Steijns J. M., In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defense. *Br. J. Nutr.*, 84:S127-34 (2000)
- (64) FitzGerald R. J. and Meisel H., Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Br. J. Nutr.*, 84:S33-7 (2000)
- (65) Groziak S. M. and Miller G. D., Natural bioactive substances in milk and colostrum: effects on the arterial blood pressure system. *Br. J. Nutr.*, 84:S119-25 (2000)
- (66) Meisel H. and FitzGerald R. J., Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *Br. J. Nutr.*, 84:S27-31 (2000)
- (67) 和泉裕久, 育児用調製乳の過去・現在・未来. *ミルクサイエンス*, 58:169-75 (2009)
- (68) Martín R., Jiménez E., Heilig H., Fernández L., Marín M. L., Zoetendal E. G. and Rodríguez J. M., Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75:965-9 (2009)
- (69) Izumi H., Ishizuka S., Inafune A., Hira T., Ozawa K., Shimizu T., Takase M. and Hara H., alpha-Lactalbumin hydrolysate stimulates glucagon-like peptide-2 secretion and small intestinal growth in suckling rats. *J. Nutr.*, 139:1322-1327 (2009)
- (70) Ishizuka S., Inafune A., Hira T., Izumi H., Ozawa K., Takase M. and Hara H., Administration of anti-glucagon-like peptide-2 serum suppresses epithelial cell proliferation of the distal small intestine in weanling rats. *Biomed. Res.*, 30:259-61 (2009)
- (71) 和泉裕久, 峯岸真梨緒, 清水隆司, 関根一則, 高瀬光徳., デキストラン硫酸ナトリウム誘導大腸炎に対する α -ラクトアルブミン経口投与の影響. *ミルクサイエンス*, 60:17-23 (2011)
- (72) Kosaka N., Izumi H., Sekine K. and Ochiya T., microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 1:7 (2010)
- (73) Izumi H., Kosaka N., Shimizu T., Sekine K., Ochiya T. and Takase M., Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *J. Dairy Sci.*, 95:4831-41 (2012)
- (74) Izumi H., Kosaka N., Shimizu T., Sekine K., Ochiya T. and Takase M., Time-dependent expression profiles of microRNAs and mRNAs in rat milk whey. *PLoS ONE*, 9:e88843 (2014)
- (75) Izumi H., Kosaka N., Shimizu T., Sekine K., Ochiya T. and Takase M., Purification of RNA from milk whey. *Methods Mol. Biol.* 1024:191-201 (2013)
- (76) Izumi H., Tsuda M., Sato Y., Kosaka N., Ochiya T., Iwamoto H., Namba K. and Takeda Y.,

- Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages. *J. Dairy Sci.*, 98:2920-33 (2015)
- (77) Izumi H., Minegishi M., Sato Y., Shimizu T., Sekine K. and Takase M., *Bifidobacterium breve* alters immune function and ameliorates DSS-induced inflammation in weanling rats. *Pediatr. Res.*, 78:407-416 (2015)
- (78) Xiao Q., Boushey R. P., Drucker D. J. and Brubaker P. L., Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide 2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterology*, 117:99-105 (1999)
- (79) Burrin D. G., Petersen Y., Stoll B. and Sangild P., Glucagon-like peptide 2: a nutrient-responsive gut growth factor. *J. Nutr.*, 131: 709-12 (2001)
- (80) Drucker D. J., Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. *Gastroenterology*, 122:531-44 (2002)
- (81) Dubé P. E. and Brubaker P. L., Frontiers in glucagon-like peptide-2: multiple actions, multiple mediators. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 293:E460-5 (2007)
- (82) Yusta B., Huang L., Munroe D., Wolff G., Fantaske R., Sharma S., Demchyshyn L., Asa S. L. and Drucker D. J., Enteroendocrine localization of GLP-2 receptor expression in humans and rodents. *Gastroenterology*, 119: 744-55 (2000)
- (83) Lovsin J., Yusta B., Ilipoulos I., Migirdicyan A., Dableh L., Brubaker P. L. and Drucker D. J., Ontogeny of the glucagon-like peptide-2 receptor axis in the developing rat intestine. *Endocrinology*, 141:4194-201 (2000)
- (84) Petersen Y. M., Burrin D. G. and Sangild P. T., GLP-2 has differential effects on small intestine growth and function in fetal and neonatal pigs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 281:R1986-93 (2001)
- (85) Petersen Y. M., Hartmann B., Holst J. J., Le Huerou-Luron I., Bjørnvad C. R. and Sangild P. T., Introduction of enteral food increases plasma GLP-2 and decrease GLP-2 receptor mRNA abundance during pig development., *J. Nutr.*, 133:1781-6 (2003)
- (86) Burrin D., Guan X., Stoll B., Petersen Y. M. and Sangild P. T., Glucagon-like peptide 2: a key link between nutrition and intestinal adaptation in neonates? *J. Nutr.*, 133:3712-6 (2003)
- (87) Kanno T., Koyanagi N., Katoku Y., Yonekubo A., Yajima T., Kuwata T., Kitagawa H. and Harada E., Simplified preparation of a refined milk formula comparable to rat's milk: Influence of the formula on development of the gut and brain in artificially reared rat pups. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 24:242-52 (1997)
- (88) Keen C. L., Lönnerdal B., Clegg M. and Hurley L. S., Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat. *J. Nutr.*, 111:226-30 (1981)
- (89) Hall W. G., Weaning and growth of artificially reared rats. *Science*, 190:1313-5 (1975)
- (90) Ishizuka S., Ito S., Kasai T. and Hara H., Dietary sugar beet fiber ameliorates diarrhea as an

- acute gamma-radiation injury in rats. *Radiat. Res.*, 154:261-7 (2000)
- (91) Dahlqvist A., Assay of intestinal disaccharidases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 44:169-72 (1984)
- (92) Ijiri K. and Potten C. S., Response of intestinal cells of differing topographical and hierarchical status to ten cytotoxic drugs and five sources of radiation. *Br. J. Cancer*, 47:175-85 (1983)
- (93) Uauy R., Stringel G., Thomas R. and Quan R., Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 10:497-503 (1990)
- (94) Motohashi Y., Fukushima A., Kondo T. and Sakuma K., Lactase decline in weaning rats is regulated at the transcriptional level and not caused by termination of milk ingestion. *J. Nutr.*, 127:1737-43 (1997)
- (95) Burrin D. G., Stoll B., Guan X., Cui L., Chang X. and Holst J. J., Glucagon-like peptide 2 dose-dependently activates intestinal cell survival and proliferation in neonatal piglets. *Endocrinology*, 146:22-32 (2005)
- (96) Tappenden K. A. and McBurney M. I., Systemic short-chain fatty acids rapidly alter gastrointestinal structure, function, and expression of early response genes. *Dig. Dis. Sci.*, 43:1526-36 (1998)
- (97) Thulesen J., Hartmann B., Nielsen C., Holst J. J. and Poulsen S. S., Diabetic intestinal growth adaptation and glucagon-like peptide 2 in the rat: effects of dietary fibre. *Gut*, 45:672-8 (1999)
- (98) Rocca A. S. and Brubaker P. L., Stereospecific effects of fatty acids on proglucagon-derived peptide secretion in fetal rat intestinal cultures. *Endocrinology*, 136:5593-9 (1995)
- (99) Rocca A. S., LaGreca J., Kalitsky J. and Brubaker P. L., Monounsaturated fatty acid diets improve glycemic tolerance through increased secretion of glucagon-like peptide-1. *Endocrinology*, 142:1148-55 (2001)
- (100) Carr R. D., Larsen M. O., Winzell M. S., Jelic K., Lindgren O., Deacon C. F. and Ahren B., Incretin and islet hormonal responses to fat and protein ingestion in healthy man. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 295:779-84 (2008)
- (101) Thomsen C., Storm H., Holst J. J. and Hermansen K., Differential effects of saturated and monounsaturated fats on postprandial lipemia and glucagon-like peptide 1 responses in patients with type 2 diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 77:605-11 (2003)
- (102) Jensen R. G., Ferris A. M. and Lammi-Keefe C. J., The composition of milk fat. *J. Dairy Sci.*, 74:3228-43 (1991)
- (103) Stoll B., Price P. T., Reeds P. J., Chang X., Henry J. F., van Goudoever J. B., Holst J. J. and Burrin D. G., Feeding an elemental diet vs a milk-based formula does not decrease intestinal mucosal growth in infant pigs. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.*, 30:32-9 (2006)
- (104) Gunnarsson P. T., Winzell M. S., Deacon C. F., Larsen M. O., Jelic K., Carr R. D. and Ahrén B., Glucose-induced incretin hormone release and inactivation are differently modulated by oral fat and protein in mice. *Endocrinology*, 147:3173-80 (2006)

- (105) Benjamin M. A., McKay D. M., Yang P. C., Cameron H. and Perdue M. H., Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse. *Gut*, 47:112-9 (2000)
- (106) Arvola T., Rantala I., Marttinen A. and Isolauri E., Early dietary antigens delay the development of gut mucosal barrier in preweaning rats. *Pediatr. Res.*, 32:301-5 (1992)
- (107) Drucker D. J., Shi Q., Crivici A., Sumner-Smith M., Tavares W., Hill M., DeForest L., Cooper S. and Brubaker P. L., Regulation of the biological activity of glucagon-like peptide 2 in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Nat. Biotechnol.*, 15:673-7 (1997)
- (108) Drucker D. J., Yusta B., Boushey R. P., DeForest L. and Brubaker P. L., Human [Gly2]GLP-2 reduces the severity of colonic injury in a murine model of experimental colitis. *Am. J. Physiol.*, 276:G79-91 (1999)
- (109) Reeves P. G., Nielsen F. H. and Fahey J. C. Jr., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, 123:1939-51 (1993)
- (110) Xavier R. J. and Podolsky D. K., Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448:427-34 (2007)
- (111) Dubinsky M., Special issues in pediatric inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, 14:413-20 (2008)
- (112) Haller D., Antonie J. M., Bengmark S., Enck P., Rijkers G. T. and Lenoir-Wijnkoop I., Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: probiotics in chronic inflammatory bowel disease and the functional disorder irritable bowel syndrome. *J. Nutr.*, 140:690S-7S (2010)
- (113) Oz H. S., Chen T. S., McClain C. J. and de Villiers W. J., Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *J. Nutr. Biochem.*, 16:297-304 (2005)
- (114) Togawa J., Nagase H., Tanaka K., Inamori M., Nakajima A., Ueno N., Saito T. and Sekihara H., Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 17:1291-8 (2002)
- (115) Shin K., Horigome A., Yamauchi K., Yaeshima T. and Iwatsuki K., Orally administered lactoperoxidase ameliorates dextran sulfate sodium induced colitis in mice by up-regulating colonic interleukin-10 and maintaining peripheral regulatory T cells. *Int. Immunopharmacol.*, 9:1387-93 (2009)
- (116) López-Posadas R., Requena P., González, R., Suárez M. D., Zarzuelo A., Sánchez de Medina F. and Martínez-Augustin O., Bovine glycomacropeptide has intestinal anti-inflammatory effects in rats with dextran sulfate-induced colitis. *J. Nutr.*, 140:2014-9 (2010)
- (117) 稲垣瑞穂, 金丸義敬., ロタウイルス下痢症に対する牛乳タンパク質の利用性. *ミルクサイエンス*, 60:25-38 (2011)

- (118) Fitzpatrick L. R., Hertzog K. L., Quatse A. L., Koltum W. A., Small J. S. and Vrana K., Effects of the probiotic formulation VSL#3 on colitis in weanling rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 44:561-570 (2007)
- (119) Maul J., Loddenkemper C., Mundt P., Berg E., Giese T., Stallmach A., Zeitz M. and Duchmann R., Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺CD25^{high} T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 128:1868-1878 (2005)
- (120) Requena P., González M. D., Zarzuelo A., Sánchez de Medina F. and Martínez-Augustin O., The intestinal anti-inflammatory agent glycomacropeptide has immunomodulatory actions on rat splenocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 79:1797-804 (2010)
- (121) Faure M., Moënnos D., Montigon F., Mettraux C., Mercier S., Schiffrin E. J., Obled C., Breuillé D. and Boza J., Mucin production and composition is altered in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dig. Dis. Sci.*, 48:1366-73 (2003)
- (122) Yazbeck R., Howarth G. S., Geier M. S., Demuth H. U. and Abbott C. A., Inhibiting dipeptidyl peptidase activity partially ameliorates colitis in mice. *Front. Biosci.*, 13:6850-8 (2008)
- (123) Takahashi M., Nakamura K., Honda K., Kitamura Y., Mizutani T., Araki Y., Kabemura T., Chijiwa Y., Harada N. and Nawata H., An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.*, 51:677-86 (2006)
- (124) Yamaguchi M., Yoshida K. and Uchida M., Novel functions of bovine milk-derived α -lactalbumin: anti-nociceptive and anti-inflammatory activity caused by inhibiting cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. *Biol. Pharm. Bull.*, 32:366-71 (2009)
- (125) Chen X., Gao C., Li H., Huang L., Sun Q., Dong Y., Tian C., Gao S., Dong H., Guan D., Hu X., Shujian Z., Li L., Zhu L., Yan Q., Zhang J., Zen K. and Zhang C. Y., Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Res.*, 20:1128-37 (2010)
- (126) Hurteau G. J., Carlson A. J., Spivack S. D. and Brock G. J., Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. *Cancer Res.*, 67:7972-6 (2007)
- (127) Fazi F. and Nervi C., MicroRNA: Basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. *Cardiovasc. Res.*, 79:553-61 (2008)
- (128) Lindsay M. A., MicroRNAs and the immune response. *Trends Immunol.*, 29:343-51 (2008)
- (129) Sonkoly E., Ståhle M. and Pivarcsi A., MicroRNAs and immunity: Novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin. Cancer Biol.*, 18:131-40 (2008)
- (130) Visone R., Petrocca F. and Croce C. M., Micro-RNAs in gastrointestinal and liver disease. *Gastroenterology*, 135:1866-9 (2008)
- (131) Liu X., Zhan Z., Xu L., Ma F., Li D., Guo Z., Li N. and Cao X. MicroRNA-148/152 impair innate response and antigen presentation of TLR-triggered dendritic cells by targeting CaMKII α . *J.*

Immunol., 185:7244-51 (2010)

(132) Malumbres R. and Lossos I. S., Expression of miRNAs in lymphocytes: A review. *Methods Mol. Biol.*, 667:129-43 (2010)

(133) O'Connell R. M., Rao D. S., Chaudhuri A. A. and Baltimore D., Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 10:111-22 (2010)

(134) Wittwer K. W., Sisk J. M., Gama L. and Clements J. E., MicroRNA regulation of IFN-beta protein expression: Rapid and sensitive modulation of the innate immune response. *J. Immunol.*, 184:2369-76 (2010)

(135) Haas J. D., Nistala K., Petermann F., Saran N., Chennupati V., Schmitz S., Korn T., Wedderburn L. R., Förster R., Krueger A. and Prinz I., Expression of miRNAs miR-133b and miR-206 in the *Il17a/f* locus is co-regulated with IL-17 production in $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells. *PLoS ONE*, 6:e20171 (2011)

(136) O'Neill L. A., Sheedy F. J. and McCoy C. E., MicroRNAs: The fine-tuners of toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.*, 11:163-75 (2011)

(137) Itoh T., Nozawa Y. and Akao Y., MicroRNA-141 and -200a are involved in bone morphogenetic protein-2-induced mouse preosteoblast differentiation by targeting distal-less homeobox 5. *J. Biol. Chem.*, 284:19272-9 (2009)

(138) Lynn F. C., Meta-regulation: MicroRNA regulation of glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.*, 20:452-9 (2009)

(139) Wang S. and Olson E. N., AngiomiRs – Key regulators of angiogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 19:205-11 (2009)

(140) Wang X. H., Qian R. Z., Zhang W., Chen S. F., Jin H. M. and Hu R. M., MicroRNA-320 expression in myocardial microvascular endothelial cells and its relationship with insulin-like growth factor-1 in type 2 diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 36:181-8 (2009)

(141) Aranha M. M., Santos D. M., Xavier J. M., Low W. C., Steer C. J., Solá S. and Rodrigues C. M. P., Apoptosis-associated microRNAs are modulated in mouse, rat and human neural differentiation. *BMC Genomics*, 11:514 (2010)

(142) Hennessy E., Clynes M., Jeppesen P. B. and O'Driscoll L., Identification of microRNAs with a role in glucose-stimulated insulin secretion by expression profiling of MIN6 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 396:457-62 (2010)

(143) Liao Y. and Lönnardal B., Global microRNA characterization reveals that miR-103 is involved in IGF-I stimulated mouse intestinal cell proliferation. *PLoS ONE*, 5:e12976 (2010)

(144) Wang X., Zhang X., Ren X. P., Chen J., Liu H., Yang J., Medvedovic M., Hu Z. and Fan G. C., MicroRNA-494 targeting both proapoptotic and antiapoptotic proteins protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *Circulation*, 122:1308-18 (2010)

(145) An M. J., Cheon J. H., Kim S. W., Park J. J., Moon C. M., Han S. Y., Kim E. S., Kim T. I. and

- Kim W. H., Bovine colostrum inhibits nuclear factor kappaB-mediated proinflammatory cytokine expression in intestinal epithelial cells. *Nutr. Res.*, 29:275-80 (2009)
- (146) Ye X. Y. and Ng T. B., First demonstration of lactoribonuclease, a ribonuclease from bovine milk with similarity to bovine pancreatic ribonuclease. *Lif Sci.*, 67:2025-32 (2000)
- (147) Admyre C., Johansson S. M., Qazi K. R., Filén J. J., Laehsmaa R., Norman M., Neve E. P., Scheynius A. and Gabrielsson S., Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J. Immunol.*, 179:1969-78 (2007)
- (148) Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J. J. and Lötvall J. O., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.*, 9:654-9 (2007)
- (149) Grusby M. J., Mitchell S. C., Nabavi N., Glimcher L. H., Casein expression in cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6897-901 (1990)
- (150) Vordenbäumen S., Braukmann A., Petermann K., Scharf A., Bleck E., von Mikecz A., Jose J. and Schneider M., Casein α 1 is expressed by human monocytes and upregulates the production of GM-CSF via p38 MAPK. *J. Immunol.*, 186:592-601 (2011)
- (151) Mitchell P. S., Parkin R. K., Kroh E. M., Fritz B. R., Wyman S. K., Pogosova-Agadjanyan E. L., Peterson A., Noteboom J., O'Briant K. C., Allen A., Lin D. W., Urban N., Drescher C. W., Knudsen B. S., Stirewalt D. L., Gentleman R., Vessella R. L., Nelson P. S., Martin D. B. and Tewari M., Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:10513-8 (2008)
- (152) Weber J. A., Baxter D. H., Zhang S., Huang D. Y., Huang K. H., Lee M. J., Galas D. J. and Wang K., The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.*, 56:1733-41 (2010)
- (153) Hanke M., Hoefig K., Merz H., Feller A. C., Kausch I., Jocham D., Warnecke J. M. and Sczakiel G., A robust methodology to study urine microRNA as a tumor marker: MicroRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol. Oncol.*, 28:655-61 (2010)
- (154) Michael A., Bajracharya S. D., Yuen P. S., Zhou H., Star R. A., Illei G. G. and Alevizos I., Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis.*, 16:34-8 (2010)
- (155) Böttcher M. F., Jenmalm M. C. and Björkstén B., Cytokine, chemokine and secretory IgA levels in human milk in relation to atopic disease and IgA production in infants. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 14:35-41 (2003)
- (156) Zhou Q., Li M., Wang X., Li Q., Wang T., Zhu Q., Zhou X., Wang X., Gao X. and Li X., Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *Int. J. Biol. Sci.*, 8:118-23 (2012)
- (157) Gu Y., Li M., Wang T., Liang Y., Zhong Z., Wang X., Zhou Q., Chen L., Lang Q., He Z., Chen X., Gong J., Gao X., Li X. and Lv X., Lactation-related microRNA expression profiles of porcine breast milk exosomes. *PLoS ONE*, 7:e43691 (2012)

- (158) Turner M. L., Schnorfeil F. M. and Brocker T., MicroRNAs regulate dendritic cell differentiation and function. *J. Immunol.*, 187:3911-7 (2011)
- (159) Hino K., Tsuchiya K., Fukao T., Kiga K., Okamoto R., Kanai T. and Watanabe M., Inducible expression of microRNA-194 is regulated by HNF-1alpha during intestinal cell differentiation. *RNA*, 14:1433-42 (2008)
- (160) Papetti M. and Auquenlicht L. H., Mybl2, downregulated during colon epithelial cell maturation, is suppressed by miR-365. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 301:G508-18 (2011)
- (161) Moore K. J., Rayner K. J., Suárez Y. and Fernández-Hernado C., microRNAs and cholesterol metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.*, 21:699-706 (2010)
- (162) Trajkovski L., Hausser J., Soutschek J., Bhat B., Akin A., Zavolan M., Heim M. H. and Stoffel M., MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature*, 474:649-53 (2011)
- (163) Grigor M. R., McDonald F. J., Latta N., Richardson C. L. and Tate W. P., Transferrin-gene expression in the rat mammary gland. Independence of maternal iron status. *Biochem. J.*, 267:815-9 (1990)
- (164) Maningat P. D., Sen P., Rijnkels M., Sunehag A. L., Hadsell D. L., Bray M. and Haymond M. W., Gene expression in the human mammary epithelium during lactation: The milk fat globule transcriptome. *Physiol. Genomics*, 37:12-22 (2009)
- (165) Wickramasinghe S., Rincon G., Islas-Trejo A. and Medrano J. F., Transcriptional profiling of bovine milk using RNA sequencing. *BMC Genomics*, 13:45 (2012)
- (166) Lässer C., Alikhani V. S., Ekström K., Eldh M., Paredes P. T., Bossios A., Sjöstrand M., Gabrielsson S., Lötvall J. and Valadi H., Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: Uptake by macrophages. *J. Transl. Med.*, 9:9 (2011)
- (167) Simpson R. J., Lim J. W., Moritz R. L. and Mathivanan S., Exosomes: Proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev. Proteomics*, 6:267-83 (2009)
- (168) Kosaka N., Iguchi H. and Ochiya T., Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.*, 101:2087-92 (2010)
- (169) Arroyo J. D., Chevillet J. R., Kroh E. M., Ruf I. K., Pritchard C. C., Gibson D. F., Mitchell P. S., Bennett C. F., Pogosova-Agadjanyan E. L., Stirewalt D. L., Tait J. F. and Tewari M., Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:5003-8 (2011)
- (170) Vickers K. C., Palmisano B. T., Shoucri B. M., Shamburek R. D. and Remaley A. T., MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.*, 13:423-33 (2011)
- (171) Romao J. M., Jin W., He M., McAllister T. and Guan le L., MicroRNAs in bovine adipogenesis: Genomic context, expression and function. *BMC Genomics*, 15:137 (2014)
- (172) Sato F., Tsuchiya S., Meltzer S. J. and Shimizu K., MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.*,

278:1598-1609 (2011)

(173) Zhang Y., Wang X., Zhong M., Zhang M., Suo Q. and Lv K., MicroRNA let-7a ameliorates con A-induced hepatitis by inhibiting IL-6-dependent Th17 cell differentiation. *J. Clin. Immunol.*, 33:630-9 (2013)

(174) Lemay D. G., Ballard O. A., Hughes M. A., Morrow A. L., Horseman N. D. and Nommsen-Rivers L. A., RNA sequencing of the human milk fat layer transcriptome reveals distinct gene expression profiles at three stages of lactation. *PLoS ONE*, 8:e67531 (2013)

(175) Niu Y., Mo D., Qin L., Wang C., Li A., Zhao X., Wang X., Xiao S., Wang Q., Xie Y., He Z., Cong P. and Chen Y., Lipopolysaccharide-induced miR-1224 negatively regulates tumor necrosis factor- α gene expression by modulating Sp1. *Immunology*, 133:8-20 (2011)

(176) Sun Q., Chen X., Yu J., Zen K., Zhang C. Y. and Li L., Immune modulatory function of abundant immune-related microRNAs in microvesicles from bovine colostrum. *Protein Cell*, 4:197-210 (2013)

(177) Zhang L., Hou D., Chen X., Li D., Zhu L., Zhang Y., Li J., Bian Z., Liang X., Cai X., Yin Y., Wang C., Zhang T., Zhu D., Zhang D., Xu J., Chen Q., Ba Y., Liu J., Wang Q., Chen J., Wang J., Wang M., Zhang Q., Zhang J., Zen K. and Zhang C. Y., Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLAP1: Evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res.*, 22:107-26 (2012)

(178) Ju S., Mu J., Dokland T., Zhuang X., Wang Q., Jiang H., Xiang X., Deng Z. B., Wang B., Zhang L., Roth M., Welti R., Mobley J., Jun Y., Miller D. and Zhang H. G., Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis. *Mol. Ther.*, 21:1345-57 (2013)

(179) Lukasik A. and Zielenkiewicz P., In silico identification of plant miRNAs in mammalian breast milk exosomes – A small step forward? *PLoS ONE*, 9:e99963 (2014)

(180) Dickinson B., Zhang Y., Petrick J. S., Heck G., Ivashuta S. and Marshall W. S., Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice. *Nat. Biotechnol.*, 31:965-7 (2013)

(181) Snow J. W., Hale A. E., Isaacs S. K., Baggish A. L. and Chan S. Y., Ineffective delivery of diet-derived microRNAs to recipient animal organisms. *RNA Biol.*, 10:1107-16 (2013)

(182) Baier S. R., Nguyen C., Xie F., Wood J. R. and Zemleni J., MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. *J. Nutr.*, 144:1495-500 (2014)

(183) Arntz O. J., Pieters B. C. H., Oliveira M. C., Broeren M. G. A., Bennink M. B., de Vries M., van Lent P. L. E. M., Koenders M. I., van den Berg W. B., van der Kraan P. M. and van de Loo F. A. J., Oral administration of bovine milk derived extracellular vesicles attenuates arthritis in two mouse

- models. *Mol. Nutr. Food Res.*, 59:1701-12 (2015)
- (184) Laubier J., Castille J., Le Guillou S. and Le Provost F., No effect of an elevated miR-30b level in mouse milk on its level in pup tissues. *RNA Biol.*, 12:26-9 (2015)
- (185) Title A. C., Denzler R. and Stoffel M., Uptake and function studies of maternal milk-derived microRNAs. *J. Biol. Chem.*, 290:23680-91 (2015)
- (186) Bisgaard H., Li N., Bonnelykke K., Chawes B. L., Skov T., Paludan-Müller G., Stokholm J., Smith B. and Krogfelt K. A., Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 128:646-52 (2011)
- (187) Braegger C., Chmielewska A., Decsi T., Kolacek S., Mihatsch W., Moreno L., Pieścik M., Puntis J., Shamir R., Szajewska H., Turck D., van Goudoever J.; ESPGHAN Committee on Nutrition., Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 52:238-50 (2011)
- (188) Ohtsuka Y., Ikegami T., Izumi H., Namura M., Ikeda T., Ikuse T., Baba Y., Kudo T., Suzuki R. and Shimizu T., Effects of *Bifidobacterium breve* on inflammatory gene expression in neonatal and weaning rat intestine. *Pediatr. Res.*, 71:46-53 (2012)
- (189) Abe F., Muto M., Yaeshima T., Iwatsuki K., Aihara H., Ohashi Y. and Fujisawa T., Safety evaluation of probiotic bifidobacteria by analysis of mucin degradation activity and translocation ability. *Anaerobe*, 16:131-6 (2010)
- (190) BD Pharmingen., Rat Immunology. From Genes to Proteins to Cells. (http://www.bdbiosciences.com/documents/BD_Research_Rat_Immunology_Brochure.pdf).
- (191) Zhao Z. and Ross A. C., Retinoic acid repletion restores the number of leukocytes and their subsets and stimulates natural cytotoxicity in vitamin A-deficient rat. *J. Nutr.*, 125:2064-73 (1995)
- (192) Nakao A., Kasai M., Kumano K., Nakajima H., Kurasawa K. and Iwamoto I., High-dose oral tolerance prevents antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways. *Int. Immunol.*, 10:387-94 (1998)
- (193) Odamaki T., Xiao J. Z., Iwabuchi N., Sakamoto M., Takahashi N., Kondo S., Iwatsuki K., Kokubo S., Togashi H., Enomoto T. and Benno Y., Fluctuation of fecal microbiota in individuals with Japanese cedar pollinosis during the pollen season and influence of probiotic intake. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 17:92-100 (2007)
- (194) Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Takada T. and Tanaka R., Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:7220-8 (2004)
- (195) Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Kado Y., Takada T., Matsumoto K. and Tanaka R., Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human

- intestinal bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:167-73 (2004)
- (196) Delroisse J. M., Boulvin A. L., Parmentier I., Dauphin R. D., Vandebol M. and Portetelle D., Quantification of *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* in rat fecal samples by real-time PCR. *Microbiol. Res.*, 163:663-70 (2008)
- (197) Matsuda K., Tsuji H., Asahara T., Kado Y. and Nomoto K., Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:32-9 (2007)
- (198) Calder P. C., Krauss-Etschmann S., de Jong E. C., Dupont C., Frick J. S., Frokiaer H., Heinrich J., Garn H., Koletzko S., Lack G., Mattelio G., Renz H., Sangild P. T., Schrezenmeir J., Stulnig T. M., Thymann T., Wold A. E. and Koletzko B., Early nutrition and immunity – progress and perspectives. *Br. J. Nutr.*, 96:774-90 2006
- (199) Hotamisligil G. S., Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444:860-7 (2006)
- (200) Vicario M., Crespí M., Franch A., Amat C., Pelegrí C. and Moretó M., Induction of colitis in young rats by dextran sulfate sodium. *Dig. Dis. Sci.*, 50:143-50 (2005)
- (201) Kostadinova F. I., Baba T., Ishida Y., Kondo Y., Popivanova B. K. and Mukaida N., Crucial involvement of the CX3CR1-CX3CL1 axis in dextran sulfate sodium-mediated acute colitis in mice. *J. Leukoc. Biol.*, 88:133-43 (2010)
- (202) Yoshihara K., Yajima T., Kubo C. and Yoshikai Y., Role of interleukin 15 in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. *Gut*, 55:334-41 (2006)
- (203) Fritsch Fredin M., Elgbratt K., Svensson D., Jansson L., Melgar S. and Hultgren Hörnquist E., Dextran sulfate sodium-induced colitis generates a transient thymic involution – impact on lymphocyte subsets. *Scand. J. Immunol.*, 65:421-9 (2007)
- (204) Lee W. H. and Woodward B. D., The CD4/CD8 ratio in the blood does not reflect the response of this index in secondary lymphoid organs of weanling mice in models of protein-energy malnutrition known to depress thymus-dependent immunity. *J. Nutr.*, 126:849-59 (1996)
- (205) Tomosada Y., Villena J., Murata K., Chiba E., Shimazu T., Aso H., Iwabuchi N., Xiao J. Z., Saito T. and Kitazawa H., Immunoregulatory effect of bifidobacteria strains in porcine intestinal epithelial cells through modulation of ubiquitin-editing enzyme A20 expression. *PLoS ONE*, 8:e59259 (2013)
- (206) Sartor R. B., Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 134:577-94 (2008)
- (207) Kataoka K., Ogasa S., Kuwahara T., Bando Y., Hagiwara M., Arimochi H., Nakanishi S., Iwasaki T. and Ohnisi Y. Inhibitory effects of fermented brown rice on induction of acute colitis by dextran sulfate sodium in rats. *Dig. Dis. Sci.*, 53:1601-8 (2008)
- (208) Wang W., Chen L., Zhou R., Wang X., Song L., Huang S., Wang G. and Xia B., Increased proportions of *Bifidobacterium* and the *Lactobacillus* group and loss of butyrate-producing bacteria

in inflammatory bowel disease. *J. Clin. Microbiol.*, 52:398-406 (2014)

(209) Zakostelska Z., Kverka M., Klimesova K., Rossmann P., Mrazek J., Kopečný J., Hornova M., Srutkova D., Hudcovic T., Ridl J. and Tlaskalova-Hogenova H., Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PLoS ONE*, 6:e27961 (2011)

(210) Liu Y., Fatheree N. Y., Dingle B. M., Tran D. Q. and Rhoads J. M., *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 changes the frequency of Foxp3⁺ regulatory T cells in the intestine and mesenteric lymph node in experimental necrotizing enterocolitis. *PLoS ONE*, 8:e56547 (2013)