

<平成27年度助成>

## 大腸菌の細胞外小胞によって起因する炎症と 乳酸菌の抗炎症作用機序の解明

岡 真優子

(京都府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻食環境安全生学)

### 背 景

腸管は、食物を消化・吸収する器官であると同時に、病原性細菌の最大の侵入門戸でもあり、免疫機関としての重要性が注目されている。腸管上皮パイエル板に存在するM細胞は、腸管内腔の異物を生体内に取り込み貪食細胞のマクロファージなどによる消化を促す。しかし、病原性細菌や毒素によるマクロファージの過剰な活性化は、局所の急性炎症、また全身性の慢性炎症を引き起こして生活習慣病の要因となると考えられている。したがって、細菌に対する腸管マクロファージの過剰な炎症反応を抑制することは健康維持に重要と考える。細菌は毒素やエフェクター因子を分泌して宿主に炎症反応を引き起こすが、近年、グラム陰性細菌の分泌する細胞外小胞のouter membrane vesicle (OMV) による炎症反応が知られるようになった<sup>1)</sup>。菌の外膜表面から放出される直径20から250 nmのOMVの存在は、40年以上前から確認されていたが、その役割について不明であった。近年、大腸菌*Escherichia coli*のOMVが、バクテリオファージの感染や抗菌ペプチドに対する防御の役割を持つこと<sup>2)</sup>や、また緑膿菌がクオラムセンシング機構によってOMV分泌を調節していること<sup>3)</sup>などが報告された。一方、グラム陽性菌の黄色ブドウ球菌*Staphylococcus aureus*もまた細胞外小胞を分泌しており、 $\alpha$ 毒素を含むOMVがアトピー性皮膚炎を悪化因子の1つとなっている<sup>4)</sup>。このように、種々の細菌が細胞外小胞を介して宿主に病原性を

もたらすことが知られるようになってきたが、大腸菌由来OMVが腸管マクロファージに作用して炎症を引き起こすかについての知見はほとんどない。

近年、乳酸菌のプロバイオティクス作用が注目されている。そこで腸管内に存在する細菌の大腸菌と乳酸菌に着目し、大腸菌のOMVがマクロファージを介して引き起こす炎症反応の機序解明と、その炎症反応に対する乳酸菌の役割の解明を目指した。

### 方 法

#### 1. 菌の培養

*E. coli* K12株は、Lysogeny Broth (LB) 培地で24時間培養後、 $1 \times 10^7$  cfuの菌をDulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) 培地で24時間、37℃、5% CO<sub>2</sub>存在下培養後の培養液 (Ec-CM) を回収した。乳酸菌 *Enterococcus faecalis* は、de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) 培地で24時間培養後、 $5 \times 10^5$  cfu/mLで24時間、37℃で静置培養した培養液 (Ef-CM) を回収した。

#### 2. OMVの調製

菌の培養液は、 $10,000 \times g$  で30分遠心後、0.22 mのフィルターでろ過した。フィルターろ過後のEc-CMおよびEf-CMを細胞に作用させた。次に、それぞれを $100,000 \times g$  で3時間超遠心後、上清をsupまたはペレットをOMVとした。

#### 3. 細胞培養

マウスマクロファージRAW264.7細胞は、D-MEM培地(10% fetal bovine albumin (FBS) 含有)で

継体し、刺激にはFBS不含のD-MEM培地を用いた。野生型(WT)、MyD88欠損、toll-like receptor (TLR) 2欠損、TLR4欠損、またはTLR9欠損の各マウスの大腿骨よりbone marrowを採取し、20% L929培養液を含むD-MEM培地(10% FBS)で7日間培養してbone marrow derived macrophage (BMDM)に分化させた。細胞への大腸菌感染またはEc-CMおよびEc-OMV添加はmultiplicity of infection (MOI)が1(マクロファージcells : 細菌cfu=1:1)、Ef-CMおよびEf-OMVはMOI=10(1:10)となるように添加した。

#### 4. Western blot 法

RIPA bufferを用いて全細胞液を調製した。SDS-PAGE法で電気泳動しPVDF膜に転写後、2% skim milkで30分間ブロッキングし、抗inducible nitric oxide synthase (iNOS) 抗体(1:2000)、抗cyclooxygenase-2 (COX-2) 抗体(1:5000)、または抗 $\beta$ -actin 抗体(1:5000)と4℃で一晩反応させた。二次抗体は、室温で1時間反応させ、Immobilon ECL kit (Millipore社製)を用いてImage Quant LAS4000 (GE healthcare社製)でバンドを検出した。

#### 5. quantitative real-time PCR 法

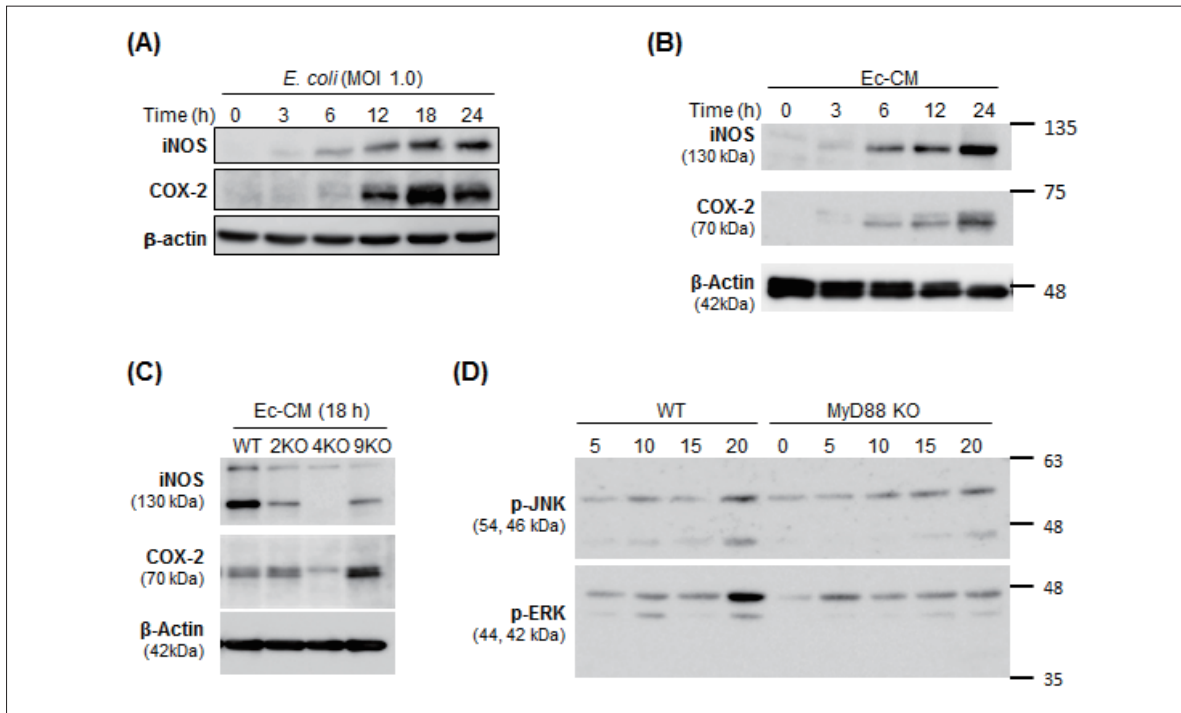
RNAは、Isogen (Nippon Geen社製)を用いて抽出した。ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix (Toyobo社製)およびFastStart Essential DNA Green Master (Roche社製)を用いてRT-PCR反応を行った。

#### 結果および考察

大腸菌K12株感染後のRAW264.7マクロファージに発現するiNOSおよびCOX-2の2つの炎症性因子の発現は、感染12時間後より増大し24時間後まで維持され、感染後経時的に増大した(Fig. 1A)。次に、*E. coli*の培養液(Ec-CM)をマクロファージに添加したところ、生菌を感染させた場合と同様にこれら炎症性因子の発現が増大

した(Fig. 1B)。よって、*E. coli*感染によって引き起こされる炎症には、生菌による直接的な反応と分泌因子による間接的な反応の両方が関与していると考えられた。これまでに、これらの炎症性因子の発現に対する*E. coli*の直接的作用には、TLR-MyD88を介したmitogen-activated protein (MAP) キナーゼ経路で誘導されることが知られている<sup>5)</sup>が、間接的な作用に対するこれらの関与については不明である。そこで、Ec-CMによるこれら炎症因子の誘導へのTLR-MyD88の関与をWTおよびTLR欠損マウスの骨髄由来マクロファージ(BMDM)を用いて検討した。WT-BMDMでは、Ec-CMによりiNOSおよびCOXの発現が増大したが(Fig. 1C)、一方TLR4欠損BMDMでは2つの炎症性因子は全く発現しなかった。また、TLR2およびTLR9欠損BMDMでのiNOS発現は、WTでの発現に比べて低下した。次に、TLR4の下流に存在するMyD88とMAP キナーゼのリン酸化シグナル経路について検討した。WT-BMDMでは、Ec-CM添加20分後にJNKおよびERKのリン酸化体が増加した(Fig. 1D)のに対して、MyD88-BMDMではこれらリン酸化体の発現は増大しなかった。以上の結果より、Ec-CMは、TLR4-MyD88を介してJNKおよびERKのリン酸化経路を活性化しiNOSおよびCOX-2を誘導し、またiNOSの発現にはTLR2とTLR9を介したシグナル経路の部分的な関与が示唆された。

大腸菌感染時の炎症反応における1つの要因となるEc-CM中の炎症因子を明らかにするため、Ec-CMを超遠心法によりEc-sup(上清)とEc-OMV(沈渣)の2つの画分に分離した。Ec-OMVの形体をNono Sightで調べた結果、Ec-OMVの直径は平均119 ± 3.1 nmの粒子であり、これまでに報告されている細胞外小胞の定義<sup>6)</sup>と一致していた(Fig. 2A)。このEc-OMVによる2つの炎症性因子のタンパク質発現は、Ec-supによる作用



**Fig. 1** Induction of inflammatory factors by *E. coli*

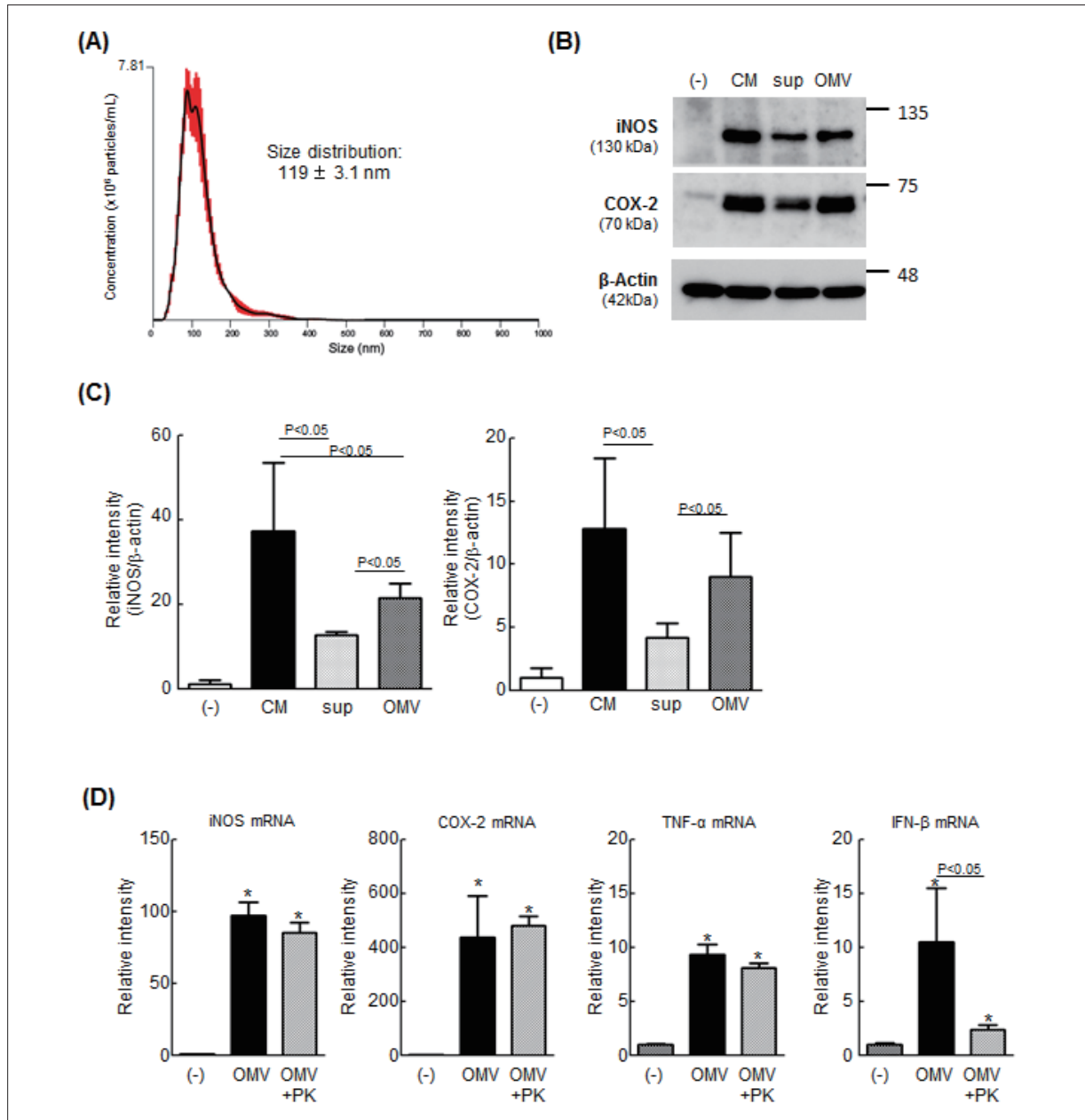
(A) After infected with *E. coli* (MOI=1) in RAW264.7 cells, the protein expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were increased in a time dependent manner. (B) The protein expressions of iNOS and COX-2 were increased by *E. coli*-derived culture media (Ec-CM) in RAW264.7 cells. (C) The protein expressions of iNOS and COX-2 were increased by *E. coli*-derived culture media (Ec-CM) in bone marrow derived macrophages (BMDMs) from wild-type (WT), Toll-like receptor 2 (TLR2) deficient, and TLR9 deficient mice, but not in BMDMs from TLR4 deficient mice. The expression of  $\beta$ -actin was presented as a loading control. (D) Ec-CM was treated in BMDMs from WT or MyD88 deficient mice (MyD88 KO). The phosphorylation of JNK and ERK were increased by Ec-CM in WT at 20 minute, completed with MyD88 KO.

よりも強く (Fig. 2B)、さらに iNOS および COX-2 mRNA の発現レベルも、Ec-sup に比べて Ec-OMV の方が高かった (Fig. 2C)。以上の結果から、Ec-CM による炎症性因子の誘導は、Ec-OMV が主な要因だと考えられた。

これまでに、Ec-OMV 中には毒素を含む多くのタンパク質の存在が報告されている<sup>7)</sup>。そこで、Ec-OMV による炎症性因子の発現増加に対する OMV 中のタンパク質の関与を明らかにするために、Ec-OMV を室温で30分間 Proteinase K (PK) で処理して Ec-OMV のタンパク質を分解した。PK 処理は、Ec-OMV による IFN- $\beta$  mRNA に対する誘導を減弱させたが、iNOS、COX-2、TNF- $\alpha$  の mRNA は PK 処理により変化しなかった。IFN- $\beta$  は TLR4-MyD88 非依存的に誘導されるが<sup>8)</sup>、iNOS は TLR4 を介した MyD88 依存的お

よび非依存的な2つの経路で誘導されることが報告されている<sup>9)</sup>。一方、TNF- $\alpha$  は、TLR4 と TLR2 を介した MyD88 依存的経路で誘導される。Fig. 1C で Ec-CM は、一部 TLR2 を介した経路により iNOS 発現を増大することが示唆されたことから、TLR4-MyD88 を介した炎症反応は、Ec-OMV のタンパク質によって活性化されるのに対し、TLR2-MyD88 を介した反応には Ec-OMV のタンパク質以外の因子が関与する可能性が示唆された。また、IFN- $\beta$  がオートクライン作用によって MyD88 依存的に iNOS を誘導することが報告されている<sup>9)</sup> ため、OMV による iNOS 誘導は2つの異なる経路によるのではないかと推察された。

Ec-OMV は、*E. coli* 感染時に引き起こされる間接的な炎症反応の要因であり、この炎症反応に対する乳酸菌 *E. faecalis* の作用について検討した。

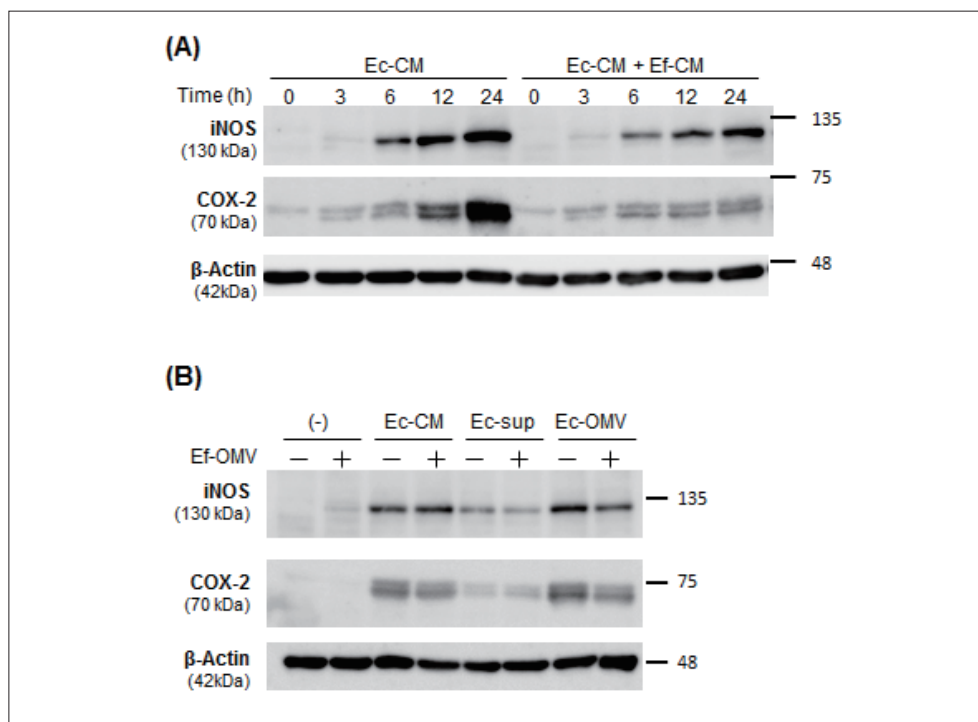


**Fig. 2** Induction of inflammatory factors by outer membrane vesicles from *E. coli*

(A) After ultracentrifuge (100,000  $\times$  g, 3 h), Ec-CM was separated pellet (outer membrane vesicles; OMV) and supernatant (sup). Ec-OMV were assessed the size homogeneity using NanoSight (Quantum Design Japan). (B) The protein expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were increased by each of fraction. The expression of  $\beta$ -actin was presented as a loading control. (C) The ratios of iNOS/ $\beta$ -actin and COX-2/ $\beta$ -actin expression were presented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Significant differences were determined by ANOVA and the Mann-Whitney U-test. (D) The mRNA expressions of iNOS, COX-2, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) were increased by Ec-OMV, which were pre-treated with or without proteinase K (PK). The ratios of mRNA/18S rRNA expression were presented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Significant differences were determined by ANOVA and the Mann-Whitney U-test. \* $P < 0.05$  were compared with (-)

細菌同士の直接作用を考慮するために、両細菌の相互作用は培養液を用いて評価した。Ec-CMは時間依存的に2つの炎症性因子の発現を増大させたが、Ef-CM存在下ではすべての時間においてこれら発現は抑制されていた (Fig. 3A)。さらに

Ec-OMVによる炎症性因子の増加は、Ef-OMVにより抑制された (Fig. 3B)。以上の結果より、Ec-OMVは炎症反応を惹起し、一方Ef-OMVは抗炎症作用を持つことが示唆された。腸内細菌として知られている大腸菌と乳酸菌は、炎症と抗炎症の



**Fig. 3** Suppression of inflammatory factors by outer membrane vesicles from *E. faecalis*

(A) The protein expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), which were increased by *E. coli*-derived culture media (Ec-CM), were downregulated in the presence of *E. faecalis*-derived CM (Ef-CM). (B) After ultracentrifuge (100,000 x g, 3 h), Ec-CM and Ef-CM were separated pellet (outer membrane vesicles; OMV) and supernatant (sup). The protein expressions iNOS and COX-2, which were increased by each of fraction, were attenuated by Ef-OMV. The expression of  $\beta$ -actin was presented as a loading control.

互いに拮抗した作用を示すため、前者が悪玉菌、後者が善玉菌と一般に呼ばれている。本研究では、両細菌の分泌する細胞外小胞のマクロファージに対する影響を解析し、これらが互いに拮抗する作用を持つことを明らかにした。

#### 謝 辞

本研究は、同志社大学大学院生命医科学研究科医生命システム専攻博士前期課程の矢倉大介さんと京都府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻博士前期課程の木村 唯さんと行った。また、本研究は(公財)浦上食品・食文化振興財団の助成を受けて実施した。

#### 文 献

- 1) Kulp, A., and Kuehn, M. J. (2012) Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annu Rev Microbiol.* 10.1146/annurev.micro.091208.073413. Biological
- 2) Manning, A. J., and Kuehn, M. J. (2011) Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* 11, 258
- 3) Tashiro, Y., Ichikawa, S., Nakajima-Kambe, T., Uchiyama, H., and Nomura, N. (2010) Pseudomonas quinolone signal affects membrane vesicle production in not only gram-negative but also gram-positive bacteria. *Microbes Environ.* 25, 120-125
- 4) Hong, S. W., Choi, E. B., Min, T. K., Kim, J. H., Kim, M. H., Jeon, S. G., Lee, B. J., Gho, Y. S., Jee, Y. K., Pyun, B. Y., and Kim, Y. K. (2014) An important role of hemolysin in extracellular vesicles on the development of atopic dermatitis induced by *Staphylococcus aureus*. *PLoS One.* 9, 1-10
- 5) Tsai, T.-H., Chen, S.-F., Huang, T.-Y., Tzeng, C.-F., Chiang, A.-S., Kou, Y. R., Lee, T.-S., and Shyue, S.-K. (2011) Impaired Cd14 and Cd36 expression, bacterial clearance, and Toll-like receptor 4-Myd88 signaling in caveolin-1-deleted macrophages and mice. *Shock.* 35, 92-9
- 6) Tashiro, Y., Uchiyama, H., and Nomura, N. (2012) Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 14, 1349-1362
- 7) Kesty, N. C., Mason, K. M., Reedy, M., Miller, S. E., and Kuehn, M. J. (2004) Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J.* 23, 4538-4549
- 8) Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey,

- 
- D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M., and Golenbock, D. T. (2003) LPS-TLR4 Signaling to IRF-3/7 and NF- $\kappa$ B Involves the Toll Adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med.* **198**, 1043-1055
- 9) Zughayer, S. M., Zimmer, S. M., Datta, A., Carlson, R. W., and Stephens, D. S. (2005) Differential Induction of the Toll-Like Receptor 4-MyD88-Dependent and -Independent Signaling Pathways by Endotoxins. *Infect. Immun.* **73**, 2940-2950

## ***Enterococcus faecalis* play a role of anti-inflammatory in the inflammatory pathway by *Escherichia coli*-derived outer membrane vesicles**

**Mayuko Osada-Oka**

*Food Hygiene and Environmental Health, Division of Applied Life Science  
Graduate School of Life and Environmental Sciences  
Kyoto Prefecture University*

Many Gram-negative bacteria release outer membrane vesicles (OMVs) in the external milieu. Although OMVs contain multiple virulence factors and deliver them to the host, it is unclear about the interaction with each of OMVs derived from *Escherichia coli* and lactic acid bacteria. Here, we examined about the role of OMVs from *E. coli* and *Enterococcus faecalis* for inflammatory pathway in mouse macrophages. The OMV derived from *E. coli* (Ec-OMV) up-regulated the protein and mRNA levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in RAW264.7 cells. Moreover, Ec-OMV treated with proteinase K also increased the mRNA levels of inflammatory molecules, resulting in the role of inflammatory mediator excluding proteins. JNK (p54/p46) and ERK (p44/p42), such as the mitogen-activated protein, were phosphorylated by Ec-OMV in bone marrow derived macrophages (BMDM) from wild-type mice. In contrast, the phosphorylation was not increased in BMDM from toll-like receptor 4 knockout (TLR4 KO) mice or MyD88 KO mice, suggesting that Ec-OMV increase the mRNA levels of inflammatory factors via TLR4-MyD88. In addition, the increases in inflammatory factor mRNA levels by Ec-OMV partially decreased in BMDM from TLR2 or TLR9 KO. The increase in the mRNA levels of inflammatory factors by Ec-OMV attenuated by OMV derived from *E. faecalis*. In conclusion, *E. coli*-derived OMV have a role of inflammatory mediator, and in contrast, *E. faecalis*-derived OMV have a role of anti-inflammatory factor, suggesting that bacterial balance is important in intestinal environment.