

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01888

研究課題名(和文)腸内細菌由来OMVの生理・病理的役割の解明

研究課題名(英文) Physiological and pathological roles of outer membrane vesicles released from enteric bacteria in inflammatory response

研究代表者

藤田 泰典 (Fujita, Yasunori)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：30515888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗LPS抗体を用いたサンドウィッチELISAにより、大腸菌由来OMVを検出することができた。さらなる改良・最適化により血液中OMVが測定可能になることが期待される。また、マウスの体内に投与した大腸菌由来OMVは肝臓のKupffer細胞に作用する可能性が示された。さらに、大腸菌由来OMVの表面に存在するLPSは、ミエロイド系細胞からの細胞外小胞の放出を促進し、血中の細胞外小胞を増加させることを明らかにした。生体内に侵入した大腸菌由来OMVは表面のLPSを介して、ミエロイド系細胞を刺激し、血液中の細胞外小胞を増加させることで炎症反応に関与する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内に存在するグラム陰性細菌が放出する膜小胞(OMV)の生理的・病理的な役割は未だ不明な点が多い。本研究で構築することができた大腸菌由来OMVの検出系は、今後さらなる改良・最適化を行うことで、OMV研究において有用なツールになる可能性がある。また、本研究により、生体内に投与された大腸菌由来OMVの標的細胞や血中細胞外小胞に対する効果が明らかになり、今後のOMV研究の進展に寄与するものと考えられる。将来的には、腸内細菌と慢性炎症・代謝性疾患・神経変性疾患との関連およびその分子機構の解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent reports indicate that outer membrane vesicles (OMV) released from enteric bacteria are involved in immunity and inflammation, but their physiological and pathological roles are still fully understood. In this study, we constructed a sandwich ELISA using an anti-LPS antibody for detection of OMV released from Escherichia coli. Further improvement and optimization will make it possible to measure OMV in blood by the detection system, which contribute to in vivo studies of OMV. We also demonstrated that OMV injected to mice may act on Kupffer cells in the liver. Moreover, we showed that an injection with LPS, which covers the surface of OMV released from Escherichia coli, resulted in the increase of extracellular vesicles expressing myeloid marker proteins in blood. These results imply that Escherichia coli-derived OMV may be involved in inflammatory response by increasing extracellular vesicles in blood through stimulation of myeloid cells.

研究分野：基礎老化

キーワード：膜小胞 大腸菌 OMV LPS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌が炎症性腸疾患、代謝性疾患、自己免疫疾患と関係することが知られている。また、うつ病や自閉症などの精神・神経疾患と腸内細菌との関連も報告されており、腸内細菌と脳の相互作用(腸脳相関)が中枢神経系疾患の発症・病態に関与している可能性がある。腸内細菌が脳に作用する機序としては、迷走神経を介する経路、血管を介する経路、免疫系を介する経路が考えられている(Cell Host Microbe.2015;17:565)。これまでに、高脂肪食摂取に伴う腸内細菌叢の変化により、腸管バリアの透過性が増大し、リポポリサッカライド(LPS)などの腸内細菌由来成分が生体内に侵入することが報告されている。生体内に侵入した腸内細菌由来成分は、腸管および全身性の慢性炎症を誘発し、代謝性疾患の発症・進行に関与するものと考えられている(Cell Metab.2016;23:413)。グラム陰性細菌は、およそ直径20-250 nmの膜小胞 Outer Membrane Vesicle (OMV)を分泌している。このOMVにはDNA、RNA、タンパク質、ペプチドグリカンなどが含まれており、その表面はLPSで覆われている。近年、腸内細菌由来のOMVが宿主免疫系の成熟に関与することや、病原細菌由来のOMVが感染や炎症を促進させることが明らかにされつつある(Nat Rev Microbiol.2016;14:20)。腸内細菌由来OMVが生理的・病理的な役割を有するものと考えられるが、腸管からの侵入経路や慢性炎症・代謝性疾患との関係については不明である。近年、高血圧や糖尿病などの生活習慣病がアルツハイマー病のリスク因子となることが示唆されている。さらに最近、腸内細菌叢がアルツハイマー病モデルマウスの神経炎症とアミロイドの沈着に関与することが報告された(Sci Rep.2016;6:30028)。このことから、加齢や食事などによる腸内細菌叢の変化が、アルツハイマー病の発症・進行に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、グラム陰性細菌が放出する膜小胞 Outer membrane vesicle (OMV)の生理的・病理的な役割の解明を目指し、大腸菌由来OMVの生体内への侵入経路、体内動態、標的組織を明らかにすることを目的としている。また、大腸菌由来OMVが高脂肪食摂取マウスや次世代型アルツハイマー病モデルマウスの病態の発症や進行に及ぼす影響を検討し、OMVの観点から、腸内細菌と慢性炎症・代謝性疾患・神経変性疾患との関連およびその分子機構について新知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌由来OMVの単離

大腸菌 DH5 株を培養した培養上清を回収し、2,000xgで10分間遠心した後、12,000xgで30分間遠心した。上清を0.22 μm フィルターでろ過し、得られたろ過液を100,000xgで70分間遠心し、その沈殿画分をOMVとした。ウエスタンブロット解析により、単離したOMVにリポポリサッカライド(LPS)や大腸菌外膜タンパク質 OmpA が検出されることを確認している。

(2) 大腸菌由来OMVの測定系構築

Carbonate-Bicarbonate バッファーで希釈した抗LPS抗体(Hycult社)または抗OmpA抗体(Antibody Research社)をMaxiSorp 96 ウェルマイクロプレートに添加した。プレートを4で一晩静置し、捕捉用抗体をプレートに固相化させた。1% BSA含有ブロッキングバッファーでブロッキングを行った後、スタンダードとサンプルを添加し、室温で1時間反応させた。HRP標識した抗LPS抗体を添加し、室温で1時間反応させた後、TMB基質溶液を加え、室温で30分間反応させた。反応停止液を加えた後、吸光度450 nmを測定した。

(3) アルツハイマー病モデルマウスの解析

APP遺伝子のアミロイド領域の配列がヒト化され、アルツハイマー病の原因変異(Swedish, Arctic, Beyreuther/Iberian)が導入されたノックインマウス(Nat Neurosci.2014)をアルツハイマー病モデルマウスとして使用した。8ヶ月齢のマウスを順化させた後、行動試験を実施した。オープンフィールド試験では、15分間マウスの行動を記録し、新奇場面での不安、活動性を評価した。モリス水迷路では、10~14日間の訓練により逃避台の位置を学習させた後、プローブテストを実施した。プローブテストでは、4分割領域の遊泳時間、逃避台位置の横断回数を測定し、空間記憶を評価した。恐怖条件付け試験では、ブザー音と電気ショックによる恐怖条件付けを行った後、1時間、24時間後に手がかりテストを行い、48時間後に文脈テストを実施した。行動試験が終了した後、マウスを解剖し、脳を摘出した。脳のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、免疫組織染色を行った。抗体は、抗ヒトアミロイドモノクローナル抗体(Wako)、抗Iba1抗体(Wako)を使用し、それぞれアミロイドの沈着、ミクログリアの活性化を評価した。

(4) 大腸菌由来OMVの体内動態の解析

3ヶ月齢の雄性C57BL/6Jマウスに大腸菌由来OMV(0.2 mg protein/kg)またはLPS(5 mg/kg)を腹腔内投与し、30分後に各種臓器を摘出した。臓器を10%中性緩衝ホルマリン液で2日間浸漬固定した後、スクロース置換し凍結包埋した。Vector M.O.M Kit ImmPRESS Peroxidase Polymer(Vector社)、ImmPACT DAB Peroxidase Substrate Kit(Vector社)により、薄切した凍結切片の免疫組織染色を行った。

(5) 血中細胞外小胞の解析

マウスから採取した血漿を 2,000xg で 10 分間遠心した後、12,000xg で 30 分間遠心した。上清を 0.22 μm フィルターでろ過し、アポトーシス小体などの膜小胞を除いた。得られたろ過液を 100,000xg で 70 分間遠心し、その沈殿画分を細胞外小胞とした。細胞外小胞サンプルを SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレンに転写した後、5%スキムミルクでブロッキングを行なった。標的タンパク質に対する抗体を用いた 1 次抗体反応、HRP 標識された抗体による 2 次抗体反応を行なった後、発光基質との反応により目的タンパク質の検出を行なった。

4. 研究成果

(1) 大腸菌由来 OMV の測定系構築

大腸菌由来 OMV の体内動態を解析することを目指し、血中の大腸菌由来 OMV を検出する実験系の開発に取り組んだ。大腸菌由来 OMV の表面はリポポリサッカライド (LPS) で覆われている。また、OMV の外膜には OmpA と呼ばれるタンパク質が存在している。そこで、抗 LPS 抗体または抗 OmpA 抗体を用いてサンドウィッチ ELISA の構築を試みた。大腸菌由来 OMV をプレートに固相化し、HRP 標識した抗 LPS 抗体と抗 OmpA 抗体の検出力を評価した。その結果、抗 LPS 抗体を使用した場合、OMV 濃度依存的なシグナルが観察され、抗 LPS 抗体が OMV の検出に有用であることが分かった (図 1)。一方、抗 OmpA 抗体を用いた場合、同様に OMV 濃度依存性は認められたが、シグナルが弱く、サンドウィッチ ELISA には適さないものと考えられた。

次に、抗 LPS 抗体を捕捉抗体と検出抗体に使用したサンドウィッチ ELISA を構築した後、血漿サンプルに添加した OMV を検出できるか検討した。その結果、血漿中の OMV 濃度が低い場合は血漿成分の非特異的反応が認められた (図 2)。一方、OMV 濃度が高い場合、OMV 特異的シグナルは観察されたものの、シグナルが著しく抑制されていた。以上のことから、OMV を検出するサンドウィッチ ELISA を構築することはできたが、血漿中の OMV を検出するにはさらなる改良が必要であることが分かった。

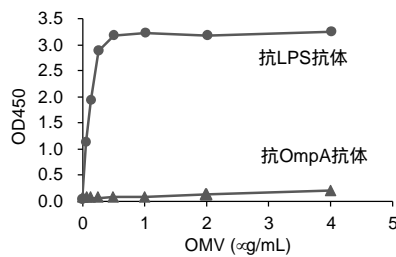


図1 大腸菌由来OMVに対する抗体の反応性評価

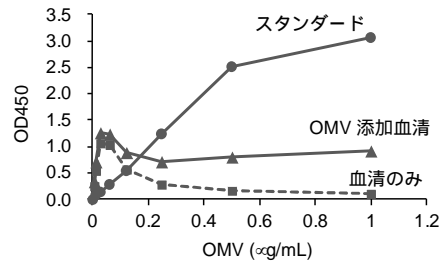


図2 OMV ELISAの添加回収試験

(2) アルツハイマー病モデルマウスの行動試験および病理学的評価

大腸菌由来 OMV がアルツハイマー病モデルマウスの発症や進行に及ぼす影響を検討するために、入手したアルツハイマー病モデルマウスの表現型を確認し、評価方法の選定を試みた。先行研究では、4 ヶ月齢において脳内アミロイド の沈着、6 ヶ月齢に認知機能の低下が観察されていた。そこで、8 ヶ月齢のマウスを対象に、認知機能を評価する行動試験を実施した後、免疫組織染色を行いアミロイド の沈着とミクログリアの活性化を評価した。モリス水迷路試験で空間記憶を評価した結果、コントロールマウスと有意な差は認められなかった。さらに、恐怖条件付け試験で連合記憶を評価した結果、こちらもコントロールマウスとの差は認められなかった。一方、アミロイド の沈着、ミクログリアの活性化は観察された (図 3)。したがって、病理学的所見は観察されたものの、予想に反して認知機能低下は認められず、本マウスを用いた行動試験は、大腸菌由来 OMV がその発症や進行に及ぼす影響を評価する手法として適さないという結論に至った。

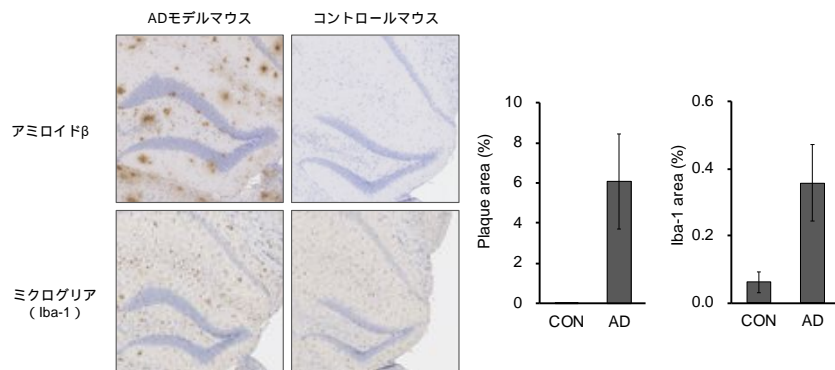


図3 アルツハイマー病モデルマウスの表現型

(3) 大腸菌由来 OMV の標的組織の同定

大腸菌由来 OMV の生理的・病理的役割を明らかにするには、生体内に侵入した大腸菌由来 OMV の標的組織を同定することが重要である。そこで、大腸菌由来 OMV を腹腔内投与したマウスから各種臓器を摘出し、抗 LPS 抗体による免疫組織染色を実施した。コントロールとして、LPS を投与したマウスについても同様に検討した。LPS を投与したマウスでは、主に肝臓、腎臓、脾臓において LPS が検出された。一方、大腸菌由来 OMV を投与したマウスでは肝臓において僅かながら LPS が検出され、LPS を有する大腸菌由来 OMV が肝臓に作用している可能性が示された。細胞特異的マーカーとの共染色を行ったところ、LPS を投与したマウスでは肝臓の F4/80 陽性細胞で LPS が検出されたことから、投与した LPS は肝臓の Kupffer 細胞に作用している可能性が示唆された。大腸菌由来 OMV を投与したマウスでは、シグナル弱く共局在の評価ができなかった。次に、大腸菌由来 OMV を静脈投与した結果、Kupffer 細胞に顕著な LPS 染色像が認められた。以上のことから、血中に流入した大腸菌由来 OMV は肝臓の Kupffer 細胞に作用する可能性が示唆された。

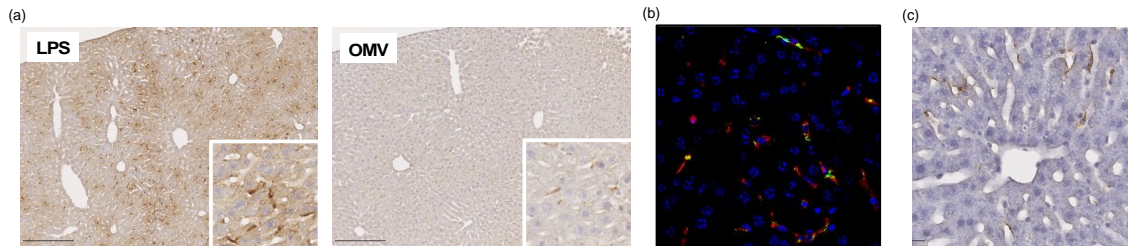


図4 投与した大腸菌由来OMVの肝臓における局在
(a) LPSまたは大腸菌由来OMVを投与したマウス肝臓におけるLPSの局在
(b) LPS投与したマウス肝臓におけるLPS (緑色)とF4/80 (赤色)の局在
(c) 大腸菌由来OMVを静脈投与したマウス肝臓におけるLPSの局在

(4)大腸菌由来 OMV の表面に存在する LPS を投与したマウスの血中細胞外小胞解析

近年、血液中に存在する細胞外小胞と慢性炎症との関連が注目されており、生体内に侵入した大腸菌由来 OMV や LPS により血液中の細胞外小胞のプロファイルが変化することが予想された。そこで、LPS を投与したマウスの血漿から細胞外小胞を単離し、タンパク質発現解析を実施した。その結果、興味深いことに細胞外小胞マーカーである CD9 が増加し、細胞外小胞の総量が増加しているものと考えられた(図5)。さらに、ミエロイドマーカータンパク質の発現が顕著に増加しており、ミエロイド系細胞由来の細胞外小胞が増加しているものと考えられた。したがって、大腸菌由来 OMV の表面に存在する LPS の投与により、LPS による刺激を受けたミエロイド系細胞が細胞外小胞を多数放出している可能性が示唆された。免疫細胞から放出される細胞外小胞が免疫系の制御に関与することが報告されていることから、LPS 刺激による細胞外小胞の増加が、炎症の増悪に関与しているかもしれない。今後、大腸菌由来 OMV を投与し、同様にミエロイド系細胞由来の細胞外小胞が増加するか検討する予定である。

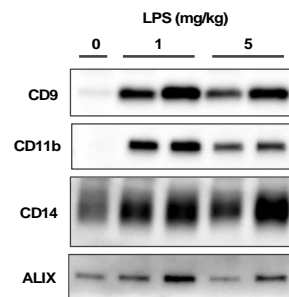


図5 LPS投与マウスの血中細胞外小胞のタンパク質発現解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤田泰典、川上恭司郎、伊藤雅史 |
| 2. 発表標題 敗血症モデルマウスにおける単球・マクロファージ由来エクソソームの解析 |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Fujita Y, Kawakami K, Ito M |
| 2. 発表標題 Small extracellular vesicles expressing CD11b increase in plasma of mice with sepsis. |
| 3. 学会等名 2019 Spring International Conference of the Korean Society for Gerontology (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤田泰典、川上恭司郎、伊藤雅史 |
| 2. 発表標題 敗血症モデルマウスの血液中で増加するCD11b陽性細胞外小胞の同定 |
| 3. 学会等名 敗血症モデルマウスの血液中で増加するCD11b陽性細胞外小胞の同定 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Fujita Y, Kawakami K, Ito M |
| 2. 発表標題 Detection of CD11b-expressing exosomes in plasma of mice with sepsis. |
| 3. 学会等名 International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) 2019 Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|