

原著論文

## ウシ乳腺上皮細胞における 炎症性サイトカイン遺伝子発現に及ぼすトレハロース添加の影響

芳賀 聡<sup>1)</sup>\* 中野美和<sup>1)</sup> 小林洋介<sup>2)</sup> 石崎 宏<sup>1)</sup>

- 1) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
畜産草地研究所那須研究拠点 草地管理研究領域  
〒 329-2793 栃木県那須塩原市千本松 768
- 2) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
畜産草地研究所 家畜生理栄養研究領域  
〒 305-0901 茨城県つくば市池の台 2

連絡担当者：芳賀聡

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
畜産草地研究所 草地管理研究領域  
Tel : 0287-37-7239 Fax : 0286-37-7239  
E-mail : hagatiku@affrc.go.jp

### [要 約]

大腸菌性乳房炎の対策として、エンドトキシン (ET) 誘導による炎症性サイトカイン産生亢進を防ぐことが重要である。トレハロース (TRE) には抗炎症作用があるが、ウシ細胞に対する影響は不明である。本研究では、大腸菌の乳房内感染時、最前線で炎症を起こすウシ乳腺上皮細胞 (BMEC) に着目し、リポ多糖 (LPS) 刺激実験により、炎症性サイトカイン発現亢進に対する TRE の抑制作用および機序について解析を試みた。その結果、LPS 刺激により誘導される IL-1 $\beta$  および TNF $\alpha$  mRNA の発現亢進に対する TRE の抑制作用は認められなかったが、TRE 100 mM 添加において IL-6 mRNA 発現亢進が有意に抑制された ( $p < 0.05$ )。LPS 無刺激下においても TRE 100 mM 添加により IL-6 mRNA の基礎発現レベルが有意に低下した ( $p < 0.05$ )。一方、TRE 100 mM 添加は受容体群 TLR4 および MD-2 mRNA 発現を有意に増加 ( $p < 0.05$ ) させたが、シグナル伝達経路分子 NF- $\kappa$ B および MAPK ERK1/2 の活性化に影響はなかった。また、ウシ乳腺組織および BMEC における TRE 受容体 (T1R3) mRNA 発現が確認された。以上より、BMEC において TRE の IL-6 発現抑制作用が新規に見出され、その機序は NF- $\kappa$ B および MAPK ERK1/2 を介した LPS-TLR4 シグナル伝達経路以外にあり、T1R3 を介する可能性が示唆された。

**キーワード：**ウシ乳腺上皮、エンドトキシン、抗炎症、大腸菌性乳房炎、トレハロース

---

受付：2015年2月9日  
受理：2015年6月3日

## [緒論]

乳房炎による酪農経営の損失は甚大である。大腸菌性乳房炎はへい死や廃用を招く重篤な甚急性乳房炎を引き起こしやすい。大腸菌性乳房炎の臨床症状は、菌自体ではなく、菌体由来のエンドトキシン (endotoxin; ET) 刺激を受けた免疫担当細胞等から過剰産生される炎症性サイトカインに起因する。炎症性サイトカイン産生が亢進することで、全身に至る過剰な炎症 (ET ショック) が誘導される [18]。大腸菌性乳房炎治療法に関しては、菌や ET の排出を促す頻回搾乳や乳房内洗浄よりも抗生剤投与 (全身および乳房局所) が全国的に主流となっている [16]。しかし、セファム系をはじめとする抗生剤は大腸菌に対し強力な殺菌作用を有する一方、殺菌の副作用として ET が放出される [15, 17]。萩原ら [7] は、北海道内の診療所調査により、フルオロキノロン系抗生物質の全身投与やセファゾリン乳房注入剤の使用量が多いほど、大腸菌性乳房炎の治療割合が低下することを報告しており、抗生剤誘導性 ET ショックが起こっている可能性が指摘されている。つまり、大腸菌の感染排除を目的として行われる抗生剤治療だけでなく、ET 排出を促進する頻回搾乳などを活用しつつ、ウシ細胞側の ET 誘導性炎症性サイトカイン過剰産生を抑制することが、大腸菌性乳房炎の対策として重要である。乳房局所では、外界と境する乳腺上皮が細菌感染の最前線として機能する。ウシ乳腺上皮細胞 (Bovine Mammary Epithelial Cells; BMEC) には菌体成分認識受容体である Toll 様受容体 (Toll-like receptors; TLRs) が発現しており、ET 成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) 刺激により、BMEC における感染シグナル伝達経路が活性化し、炎症性サイトカインの発現が亢進することが確認されている [9, 21]。このことは大腸菌感染時および抗生剤乳房注入治療時に遊離した ET が、感染最前線に存在する BMEC に受容、認識され、炎症性サイトカイン産生亢進が誘導されて ET ショックのトリガーの一つになり得ることを示唆しており、BMEC が抗炎症の重要なターゲットの一つであると推察される。

トレハロース (trehalose; TRE) は、グル

コース二分子が結合した単純二糖類であるが、高い抗酸化性や保水性を有し、また安価なため主に食品加工分野で、澱粉硬化抑制、冷凍変性抑制および油変敗臭抑制などの食品品質保持を目的として添加物利用されている機能性糖質である。TRE 自体は経口摂取後、消化管内でトレハララーゼにより分解され、体内移行はしない。しかし、Aoki ら [1, 2] は乳牛へ飼料添加することでルーメン内環境に作用し、採食促進や乳量増加、血中および乳中の抗酸化能向上に間接的に寄与すると報告しており、今後の畜産現場における応用も期待される。一方で、外科手術時において、組織への TRE 液噴霧が組織癒着防止効果を示す [11] など、TRE の生体組織への直接的な有効性に関する研究が近年進められており、その中で、TRE には炎症性サイトカイン産生抑制作用があることが以下のように報告されている。Minutoli ら [13, 14] は、LPS 投与ラットにおいて、TRE 腹腔内投与が炎症性サイトカインである Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ )、Interleukin (IL)-1 および IL-6 の産生亢進を抑制することを明らかにしている。また Taya ら [20] も TRE がマウス由来マクロファージ (macrophage; M $\Phi$ ) における LPS 刺激誘導による TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の産生を抑制することを報告している。さらに TRE 特異的な味覚受容体である Taste receptor type 1 member 3 (T1R3) の遺伝子発現を M $\Phi$  に見出ししており、T1R3 を介して炎症性サイトカインの産生を抑制した可能性を示唆している。以上、TRE の炎症性サイトカイン産生抑制作用を有効に応用できれば、TRE が安全かつ安価な新しい乳房炎用の抗炎症剤の基材となり得ると期待される。しかし、ウシ細胞に対する TRE の炎症性サイトカイン産生抑制作用を検討した研究報告はこれまでにない。そこで本研究は、新たな抗炎症剤開発に向けた基礎的検討として、機能性糖質 TRE が、大腸菌の乳房内感染の最前線である BMEC に対して、炎症性サイトカイン産生亢進の抑制作用を発揮するかどうかを明らかにすることを目的として実施した。

## 【材料と方法】

本研究は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所（畜草研）動物実験委員会の承認を得て「畜草研動物実験等実施要領」に従って実施された。

### 1. 細胞培養

トリプシン-EDTA、ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM)、HEPES、ペニシリン-ストレプトマイシンおよび LPS (*E. Coli* O111 : B4 由来) は SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA) 製を用いた。ウシ胎子血清 (fetal bovine serum; FBS) は HyClone Laboratories (Logan, UT, USA) 製を使用した。TRE (ET free) は林原 (岡山) より研究用譲渡を受けて用いた。

泌乳前期のホルスタイン乳牛の乳腺組織実質より細胞を単離し、限界希釈法によりクローニングした BMEC (継代数 14-15) を用いた。本細胞について、催乳性ホルモン (デキサメタゾン、インスリンおよびプロラクチン : DIP) を用いた分化刺激により、乳腺分化マーカーである kappa-casein mRNA を強く発現する性質を有することを確認した (Fig.1)。BMEC を培養プレートに  $1 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup> で播き、増殖用 DMEM 培地 (以下添加 : 20mM HEPES、100 U/ml ペニシリン、100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシンおよび 10% FBS) で、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下でコンフルエントまで培養し、各実験に用いた。LPS および TRE 添加実験において、FBS 成分の影響を最小限にするため、FBS 低含有の刺激用 DMEM 培地 (以下添加 : 20mM HEPES、100U/ml ペニシリン、100 $\mu$ g/ml スト

レプトマイシンおよび 2% FBS) に置換し、6 時間の前培養を行った。さらに TRE (終濃度 0, 1, 10 および 100mM) を培地に添加し、3 時間反応させた。その後、LPS (終濃度 5 $\mu$ g/ml) 刺激を 10 分間 (タンパク発現解析用) または 6 時間 (mRNA 発現解析用) 行い、それぞれ細胞を回収した。各処理は  $n = 3$  で行い、独立した実験を 2 回 (タンパク発現解析用) または 3 回 (mRNA 発現解析用) 繰り返して実施した。

### 2. RNA 抽出および定量 RT-PCR

BMEC から AGPC 法 (TRIzol Reagent, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) により、全 RNA を抽出し、RNA 純度および濃度を分光光度計 (Nano Drop ND-1000, Life Technologies) により確認した。逆転写酵素および DNase (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser, タカラバイオ, 滋賀) を用いて、定法に従いゲノム DNA を除去し、全 RNA 500 ng を逆転写して cDNA を得た。続いて、PCR 酵素 (THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix, 東洋紡, 大阪) および StepOnePlus Real Time PCR System (Life Technologies) を用いて定量 RT-PCR を行った。PCR 反応条件は、95 $^{\circ}$ C 1 分間の熱処理後、95 $^{\circ}$ C 15 秒・60 $^{\circ}$ C 1 分間の変性・伸長・検出サイクルを 50 サイクル行った。増幅産物が単一であることを融解曲線解析により、増幅産物の目的長をアガロースゲル電気泳動により、それぞれ確認した。各遺伝子の発現定量は PCR 効率の妥当性 (85-110% 以内) を確認した上で、beta-actin (ACTB) を内部標準として  $\Delta\Delta$  Ct 法を用いて解析した。なお、各遺伝子のプライマー配列、PCR 産物目的長および Accession No. は Table 1 に示した。

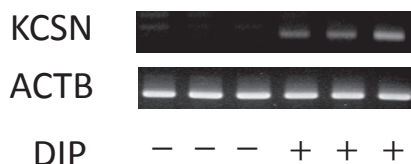


Fig. 1

Messenger RNA expression of kappa-casein (KCSN) in bovine mammary epithelial cells (BMEC). Expression of KCSN mRNA in BMEC upregulated by differential stimulus (dexamethasone, insulin and prolactin mixture: DIP, each 10  $\mu$ g/ml) for three days ( $n = 3$ , RT-PCR). Beta-actin (ACTB) mRNA expressions are shown as an internal control.

### 3. タンパク抽出、SDS-PAGE

#### および Western blotting

LPS 刺激を 10 分間行った後、直ちに BMEC を洗浄し、タンパク分解およびリン酸化インヒビター (Thermo Halt Protease and Phosphatase Inhibitor, Life Technologies) を添加し、氷上で細胞を回収した。抽出試薬 (NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Life Technologies) を用いて、定法に従い細胞質タンパク画分と核タンパク画分を分離抽出した。タンパク濃度はウシ血清アルブミンを標準物質として測定した (プロテインアッセイ CBB 液, ナカライテスク, 京都)。サンプルは SDS サンプルバッファー (和光純薬, 大阪) を加え、沸騰した熱水中で SDS 化した。サンプルは加熱後速やかに氷上で冷却し、分析に使用するまで -80°C で保管した。

騰した熱水中で SDS 化した。サンプルは加熱後速やかに氷上で冷却し、分析に使用するまで -80°C で保管した。

10% アクリルアミドゲルを用い、タンパク 10µg 当量のサンプルを SDS-PAGE した。SDS-PAGE 後、タンパクを PVDF 膜 (Hybond-P, GE ヘルスケアジャパン, 東京) に転写した。転写後、ブロッキングを行い (ブロックエース, DS ファーマバイオメディカル, 大阪)、免疫反応促進剤 (Can Get Signal, 東洋紡) で希釈した 1 次抗体液により、4°C で一晩反応させた。用いた 1 次抗体および希釈率は、抗 nuclear factor κB (NF-κB) p65 (1 : 2000) および抗 p44/42 Mitogen-activated Protein Kinase

Table 1 Primers and product sizes used for RT-PCR and Q-RT-PCR to analyze mRNA expressions

Gene	Sequence (5' to 3')	Size (bp)	Accession No.
<b>RT-PCR</b>			
KCSN	F: AGCAAGAGCTGACGGTCACAA R: TGGCAGGCACAGTATTTGACA	350	NM_174294.1
T1R3	F: GGCTATGACCTTTTCGACACA R: ATACCTTGGGTGAGAGCCTGT	604	XM_588865.7
ACTB	F: AACTCCATCATGAAGTGTGACG R: GATCCACATCTGCTGGAAGG	214	NM_173979.3
GAPDH	F: TCAACGGGAAGCTCACTGG R: CCCCAGCATCGAAGGTAGA	225	U85042
<b>Q-RT-PCR</b>			
IL-1β	F: CAAGGAGAGGAAAGAGACA R: TGAGAAGTGCTGATGTACCA	236	M37211
TNFα	F: CCAGCCAGGAGAGAGACAAG R: TTGTGGCAGGGTATGTGAGA	112	NM_173966.3
IL-6	F: TCCAGAACGAGTATGAGG R: CATCCGAATAGCTCTCAG	236	X57317
TLR4	F: TAAACCACCTCTCCACCTTGAT R: TGAGCCACATTAAGCTCTTTCA	175	NM_174198.6
MD-2	F: CGTTGGGTCTGCAACTCCTC R: TATTCCACGGCTTCCCTTCA	117	DQ319076.1
MyD88	F: ACTATCGGCTGAAGTTGTGC R: TCCTTGCTTTGCAGGTATTC	138	NM_001014382
ACTB	F: CATCGCGGACAGGATGCAGAAA R: CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCT	158	NM_173979.3

Q-RT-PCR, quantitative RT-PCR; KCSN, kappa-casein; T1R3, taste receptor type 1 member 3; ACTB, beta actin; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IL-1β, interleukin-1 beta; TNFα, tumour necrosis factor alpha; IL-6, interleukin-6; TLR4, toll-like receptor 4; MyD88, myeloid differentiation primary response 88; F, forward primer; R, reverse primer

(MAPK ERK1/2) ウサギモノクローナル抗体 (1 : 1000) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) であった。続いて、Can Get Signal で 1 : 20000 に希釈した 2 次抗体液に 1 時間室温で反応させた。2 次抗体には抗ウサギ HRP コンジュゲート (GE ヘルスケアジャパン) を用いた。次に、検出試薬 (ECL Plus Western Blotting Detection System, GE ヘルスケアジャパン) を用いて、5 分間 PVDF 膜を化学発光反応させ、Chemi Stage CC-16 (クラボウ, 東京) を用いてバンド強度の検出を行った。検出に必要な露光時間は 1-5 分であった。検出後の PVDF 膜をクマシーブリリアントブルー (CBB R-250, 和光純薬) 染色し、各サンプルのタンパクを可視化してローディング量が等しいことを確認した (Fig. 3C)。

#### 4. 組織採材および RT-PCR

T1R3 mRNA 発現における陽性対照を得る目的で、畜草研内で飼養された 1 カ月齢の黒毛和種哺乳雄仔ウシ 3 頭を用い、麻酔薬 (ソムノペンチル, 共立製薬, 東京) を頸静脈に 0.25 ml/kg 体重量で急速投与し、過麻酔下で頸動脈放血による安楽殺を施し、速やかに味覚受容体が局在する舌根有郭乳頭組織を採材した。また、乳腺組織における T1R3 mRNA 発現を調べるため、同所内で飼養された分娩後約 2 カ月のホルスタイン泌乳牛 3 頭を同様に過麻酔下で、塩化カリウム飽和液の頸静脈急速注入により安楽殺し、速やかに乳腺組織を採材した。組織は血液除去後、液体窒素で急速凍結して -80°C で保管した。

凍結組織片を破砕機 (マルチビーズショッカー, Yasui Kikai, 東京) を用いて粉碎後、AGPC 法により全 RNA を抽出した。上記と同様にゲノム DNA を除去し、1 $\mu$ g を逆転写して cDNA を得た。T1R3 mRNA 発現について、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA 発現を内部標準として、PCR 酵素 (KOD-Plus-Neo, 東洋紡) を用いて RT-PCR により調べた。RT-PCR 反応条件は、94°C 2 分間の初期熱変性後、98°C 10 秒変性・68°C 伸長を 45 サイクル (T1R3) および 35 サイクル (GAPDH) 行った。PCR 産物を 3% アガロースゲルにて電気泳動後、エチジウムプロ

マイド染色して目的 PCR 産物の発現有無を確認した。

#### 5. 統計解析

各実験結果は、代表的な単実験データの値を平均値  $\pm$  標準誤差 (standard error of the mean; SEM) で示した。統計処理には SAS (Version ADD-In 6.1 for Microsoft Office, SAS Institute Japan, 東京) を用いた。LPS 刺激による炎症性サイトカインの mRNA 発現量変化について Student's TTEST を用いて検定した。炎症性サイトカインの mRNA 発現量に対する TRE 添加濃度域の影響の検討では、一元配置分散分析および Tukey の多重検定を用いて検定した。IL-6 および TLR4 シグナル伝達関連遺伝子の発現量について GLM プロシジャにより分散分析を行い、LPS 刺激効果、TRE 100 mM 添加効果および LPS と TRE の相互作用の有意性を検定した。また、相互作用が有意であった場合には Tukey の多重検定を実施して、処理区間の差を検定した。いずれにおいても  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

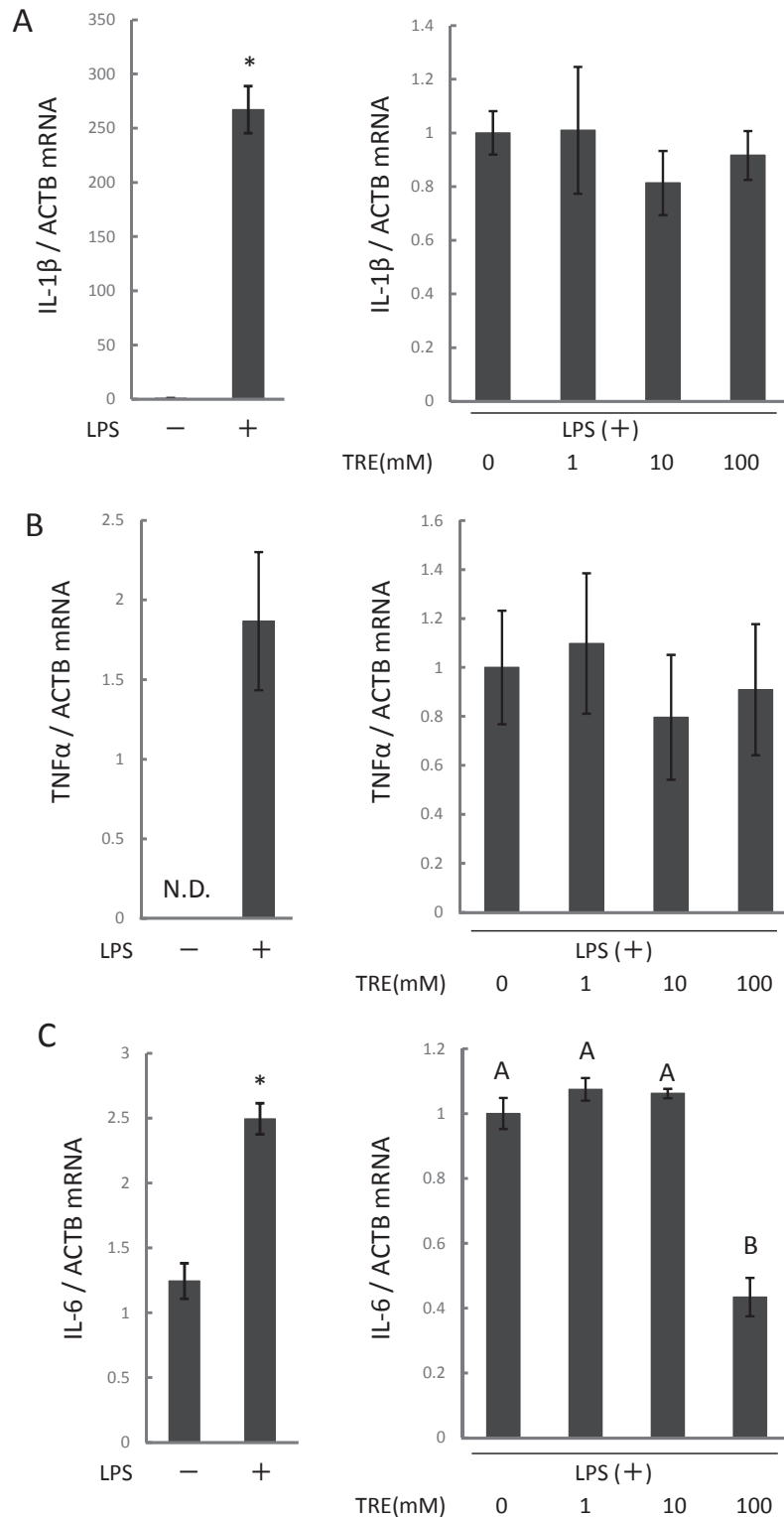
#### [結果]

##### 1. 炎症性サイトカイン mRNA 発現に及ぼす LPS および TRE の影響

BMEC における炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  および IL-6) mRNA 発現量は LPS 無刺激区と比べ、LPS 刺激区において著しく高かった ( $p < 0.05$ , Fig. 2)。LPS 刺激により誘導される IL-1 $\beta$  および TNF $\alpha$  mRNA の発現亢進に対する TRE 添加による抑制効果は濃度に関わらず認められなかった (Fig. 2A および B)。一方、LPS 刺激により誘導される IL-6 mRNA 発現亢進が、TRE 100 mM 添加時に有意に抑制された ( $p < 0.05$ , Fig. 2C)。また、LPS 無刺激区においても、TRE 100 mM 添加により IL-6 mRNA の基礎発現レベルが有意に抑制された ( $p < 0.05$ , Table 2)。

##### 2. TLR4 シグナル伝達経路分子 mRNA 発現に及ぼす LPS および TRE の影響

IL-6 mRNA 発現亢進の抑制効果が確認された TRE 100 mM 添加条件に着目し、TLR4, MD-2 およびその下流の細胞内シグナル伝達経路分



**Fig. 2**

Dose-dependent effects of trehalose (TRE) on the gene expression of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BMEC. The mRNA expressions of pro-inflammatory cytokines in BMEC were significantly upregulated by LPS (5 $\mu$ g/ml) stimulus for 6 h (\* $P$ <0.05, Student's *t*-test). The cells were incubated with the indicated concentrations of TRE for 3 h and then incubated in the presence of LPS (5  $\mu$ g/ml) for 6 h. The cells were collected and analyzed using quantitative real time PCR (Q-RT-PCR) for the A) Interleukin (IL)-1 $\beta$ , B) Tumour Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ) and C) IL-6 mRNA levels. The mRNA expression levels of all genes were normalized to beta-actin (ACTB) mRNA levels. Data are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean of triplicates. Data shown are representative of triplicate separate experiments. Values without associated common letters are significantly different ( $P$ <0.05, Tukey's multiple range test). N.D. means not detected from amplification by Q-RT-PCR.

子の myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) の mRNA 発現量の変化について調べた (Table 2)。いずれも LPS 刺激の影響はなかったが、TRE 100 mM 添加により、TLR4 および MD-2 mRNA 発現量が有意に高くなった ( $p < 0.05$ )。特に TLR4 mRNA 発現は LPS 刺激の有無に関わらず、TRE 100 mM 添加区では TRE 無添加区と比較して約 2.5-2.7 倍高かった。

### 3. 細胞内シグナル伝達の活性化レベルに及ぼす LPS および TRE の影響

転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を示す NF- $\kappa$ B の核内移行を調べた (Fig. 3A)。10 分間の LPS 刺激において、NF- $\kappa$ B の核内移行は確認できず、TRE 100 mM 添加による影響も認められなかった。次に、MAPK ファミリーである ERK1/2 の活性化を調べるために、ERK1/2 の核内移行を調べた (Fig. 3B)。LPS 刺激において、細胞質内 ERK1/2 タンパク量が減少し、核内 ERK1/2 タンパク量が増加しており、LPS 刺激による ERK1/2 の活性化が確認された。一方、LPS 無刺激条件において、TRE 100 mM 添加により、ERK1/2 の核内移行がわずかに亢進される傾向が確認されたが、LPS 刺激条件では、ERK1/2 の核内移行に及ぼす TRE 100 mM 添加の影響は確認できなかった。

### 4. ウシ乳腺における TLR3 mRNA 発現

ウシ乳腺組織および BMEC における TLR3 mRNA 発現を RT-PCR により確認した (Fig. 4)。

#### [考察]

IL-6 は肝臓に作用し、炎症の指標となる急性期タンパク質の産生を亢進させるなど、代表的な炎症性サイトカインである。大腸菌性の急性乳房炎および甚急性乳房炎発症牛群において、健康牛群よりも血清および乳清中濃度が有意に高値を示し、また全身症状や乳房局所の炎症状態と関連する [6, 8]。本研究では、BMEC への TRE 100 mM 添加が、LPS 刺激による IL-6 mRNA 発現亢進を有意に抑制することを確認した。一方、LPS 刺激を受容する TLR4 を介した BMEC の細胞内シグナル伝達経路 [21] に関して、TRE 100 mM 添加により、TLR4 および MD-2 mRNA 発現が有意に増加するという IL-6 発現亢進抑制作用とは矛盾する結果となった。本研究では、LPS 刺激による NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路の活性化は確認されなかったため、用いた BMEC における LPS 刺激の TLR4 シグナル伝達経路は NF- $\kappa$ B 経路ではなく、MAPK 経路である可能性が示唆された。そこで MAPK ファミリーについて調べた結果、ERK1/2 の活性化が LPS 刺激により観察された。しかし、この時に起こる ERK1/2

Table 2 Effects of TRE on the gene expression of IL-6 and the molecules of TLR4 signalling pathway in LPS-stimulated BMEC

	LPS(-)		LPS(+)		SEM	P-value		
	TRE	TRE	TRE	TRE		L	T	L×T
	0 mM	100 mM	0 mM	100 mM				
IL-6	1.26 <sup>b</sup>	0.42 <sup>c</sup>	2.49 <sup>a</sup>	1.08 <sup>b</sup>	0.23	< 0.01	< 0.01	< 0.05
TLR4	1.24	3.13	1.09	2.98	0.34	0.36	< 0.01	0.99
MD-2	0.87	1.15	0.86	1.18	0.06	0.97	< 0.01	0.80
MyD88	0.90	0.82	0.74	0.70	0.04	0.10	0.41	0.77

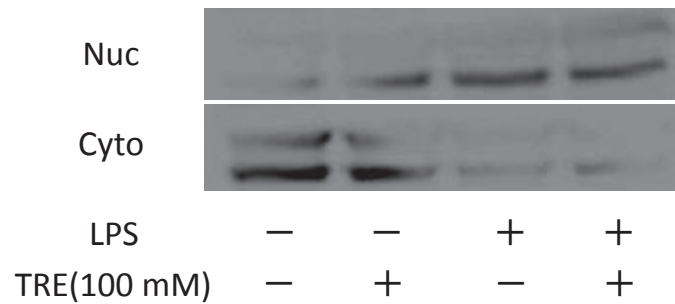
TRE, trehalose; LPS, lipopolysaccharide; BMEC, bovine mammary epithelial cells; IL-6, interleukin-6; TLR4, toll-like receptor 4; MyD88, myeloid differentiation primary response 88; L, LPS treatment; T, TRE 100 mM treatment; L×T, interaction between LPS and TRE treatment

<sup>a-c</sup>Denote significant differences ( $P < 0.05$ ) among the values in four groups.

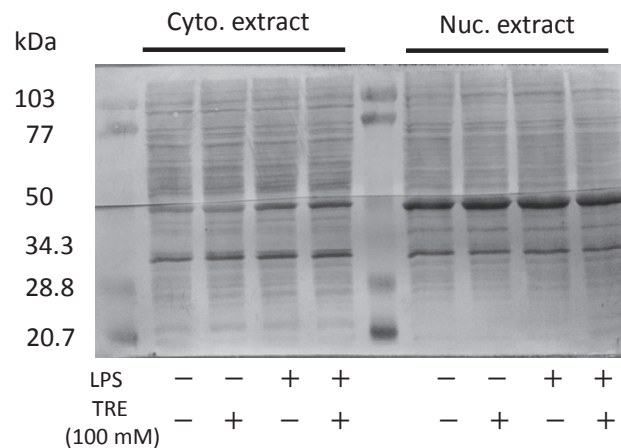
### A NF- $\kappa$ B



### B ERK1/2



### C



**Fig. 3**

Effects of TRE on the activation of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and p44/42 Mitogen-activated Protein Kinase (ERK1/2) in LPS-stimulated BMEC. BMEC were incubated with TRE (100 mM) for 3h. The cells were then incubated in the presence or absence of LPS (5  $\mu$ g/ml) for 10 min. Cell lysates were separated cytoplasmic (Cyto) and nuclear (Nuc) protein fractions, and two fractions were used for Western blot analysis using specific antibody for A) total NF- $\kappa$ B or B) total ERK1/2, respectively. Levels of respective proteins were used as an indication of equal loading (10  $\mu$ g/lane). Blots are representative of duplicate separate experiments. C) After detection, the PVDF membrane was stained with Coomassie brilliant blue as protein loading control. This membrane was cut in half crosswise to detect total NF- $\kappa$ B (upper: 65 kDa) and total ERK1/2 (lower: 42 and 44 kDa).



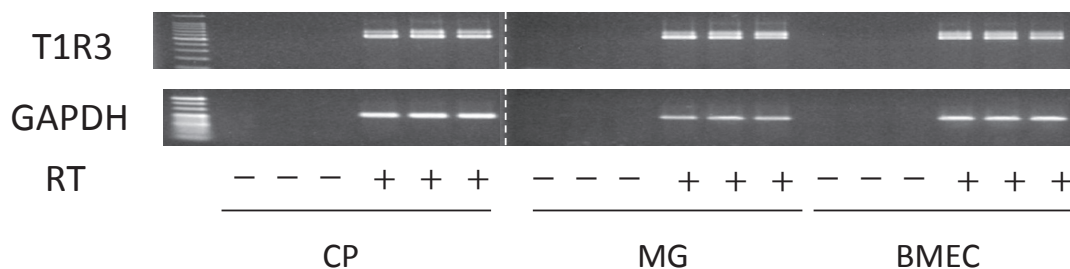


Fig. 4

Expression of TRE receptor (taste receptor type 1 member 3: T1R3) mRNA in mammary gland tissue (MG) of lactating Holstein cows (peak lactation) and BMEC. T1R3 mRNA was examined using RT-PCR. The PCR products were electrophoresed on a 3% agarose gel and visualized by EtBr staining ( $n=3$ ). Expression of the desired product was confirmed by the presence of a visible band at the predicted size. To exclude amplification from genomic DNA contamination, the RNA was either treated with DNase before the RT reaction (RT+) or run without RT (negative control, RT-). Bovine tongue circumvallate papillae (CP) were used as a positive control. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as internal control. Dashed line shows the border between two gels.

の活性化に及ぼす TRE 100 mM 添加の影響は見られなかった。以上の結果より、TRE が LPS-TLR4 シグナル伝達経路ではなく、例えば IL-6 mRNA のプロモーター領域および転写後の RNA 安定性に関与して、IL-6 特異的な発現抑制作用を示した可能性が示唆された。IL-6 は炎症性サイトカインである一方で、B 細胞や形質細胞の増殖と抗体産生を促進する作用がある。乳腺上皮に遊走、局在する IgA 産生細胞は、乳汁中に IgA を分泌することで恒常的な乳腺免疫を担っており [22]、BMEC の IL-6 分泌がこの働きを制御している可能性がある。本研究において、LPS 無刺激条件下において TRE 100 mM 添加が IL-6 mRNA 発現の基礎レベルを有意に低下させた。この結果から、非感染乳房内への TRE 投与が、IL-6 を介した乳汁中 IgA 産生による乳腺免疫を抑制する可能性があることが推察された。

著者らが調査した結果、ヒトや実験動物を含めて、乳腺上皮細胞に対する TRE 添加の作用を検討している報告は現在までなく、本研究における TRE 添加濃度 (1, 10 および 100 mM) の設定は、MΦ 等に着目した既報 [4, 13, 20] を参考に実施した。Taya ら [20] はマウス MΦ において、LPS 刺激誘導による TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の mRNA 発現亢進および分泌亢進に対する TRE の抑制作用は 10 mM 以下で確認できたと報告している。我々も仔ウシ由来全血を用いた予備的な *ex vivo* 実験において、LPS 刺激誘導による白血球からの IL-1 $\beta$  分泌亢

進が TRE 添加濃度依存的 (0-100 mM) に抑制されることを確認した。しかし BMEC を用いた本実験では、同濃度域および 100 mM において TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$  mRNA 発現亢進に対する抑制効果は認められなかった。以上より、BMEC の TRE 感受性は、血中等の免疫細胞とは異なることが示唆された。一方、Tanaka ら [19] は単離したヒト好中球を用いた *in vitro* 実験において、TRE には LPS 誘導による TNF $\alpha$  産生亢進の抑制作用はなかったことを報告している。これらのことから、TRE 感受性には細胞種差が存在し、特に単球系が TRE に対する感受性が高い可能性が推察された。また本研究における BMEC への LPS 感作が他の BMEC-LPS 感作実験の既報 [12] と比較して軽度かつ単処理であったため、今後、刺激濃度や刺激条件を拡充した上で、TRE 作用について更に検討することが必要である。

近年、甘味受容体ファミリーの中で T1R3 が TRE を認識し応答することが報告された [3]。味刺激は 30-70 個の細胞が集合した味蕾の中に含まれる味細胞によって受容される。この味蕾は舌の乳頭部に多く存在し、T1R3 は特に有郭乳頭部において発現が強い [10]。一方、Taya ら [20] はマウス MΦ において T1R3 mRNA の発現を見出している。T1R3 は G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) の一つである [3]。GPCR ファミリーの共通基本的機能は細胞外情報を受容し、細胞内へシグナルを伝達することであり、現在、臨

床で使用されている医薬品の約半数が GPCR を標的にしており [5]、抗炎症作用にも密接に関与していることから、炎症性サイトカイン産生亢進を抑制する TRE 作用は、T1R3 を介する可能性があると考えられる。本研究により、我々はウシ乳腺組織および BMEC における T1R3 mRNA の発現を新規に見出した。味覚受容と関連性が低いと考えられるウシ乳腺上皮において T1R3 が発現していることは非常に興味深く、TRE 受容シグナルが乳腺においてどのような生理的役割を持つのか不明であるが、今回得られた TRE の IL-6 発現亢進抑制作用の機序に T1R3 が関与している可能性が示唆された。今後は T1R3 のタンパク発現や局在、閾値を検討する機能解析が必要である。

本研究結果により、BMEC において TRE の IL-6 発現抑制作用が新規に見出され、その機序は NF- $\kappa$ B および MAPK ERK1/2 を介した LPS-TLR4 シグナル伝達経路以外にあり、T1R3 を介する可能性が示唆された。

#### [謝辞]

本研究を遂行するにあたり、試薬トレハロース (Et free) を提供頂いた株式会社林原に謝意を表します。畜産草地研究所研究支援センター業務 3 科諸氏には家畜管理および組織採材に多大な支援を頂きました。本研究の一部は、農林水産研究情報総合センターの科学技術計算システムを利用致しました。本研究は、一般財団法人旗影会 2013 年度一般研究助成を受けて実施致しました。ここに記して、感謝致します。

#### [引用文献]

1. Aoki, N., Fukukawa, S., Sato, K., Kurokawa, Y., Kanda, S., Takahashi, Y., Mitsuzumi, H. and Itabashi, H. 2010. Supplementation of the diet of dairy cows with trehalose results in milk with low lipid peroxide and high antioxidant content. *J. Dairy Sci.* 93:4189-4195.
2. Aoki, N., Sato, K., Kanda, S., Mukai, K., Obara, Y. and Itabashi, H. 2013. Time course of change in antioxidant activity of milk from dairy cows fed a trehalose-supplemented diet. *Anim. Sci. J.* 84:42-47.
3. Ariyasu, T., Matsumoto, S., Kyono, F., Hanaya, T., Arai, S., Ikeda, M. and Kurimoto, M. 2003. Taste receptor T1R3 is an essential molecule for the cellular recognition of the disaccharide trehalose. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Animal* 39:80-88.
4. Echigo, R., Shimohata, N., Karatsu, K., Yano, F., Kayasuga-Kariya, Y., Fujisawa, A., Ohto, T., Kita, Y., Nakamura, M., Suzuki, S., Mochizuki, M., Shimizu, T., Chung, U. and Sasaki, N. 2012. Trehalose treatment suppresses inflammation, oxidative stress, and vasospasm induced by experimental subarachnoid hemorrhage. *J. Transl. Med.* 10:80.
5. Foord, S. M., Bonner, T. I., Neubig R. R., Rosser E.M., Pin, J. P., Davenport, A. P., Spedding, M. and Harmar, A. J. 2005. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol. Rev.* 57:279-88.
6. Hagiwara, K., Yamanaka, H., Hisaeda, K., Taharaguchi, S., Kirisawa, R. and Iwai, H. 2001. Concentrations of IL-6 in serum and whey from healthy and mastitic cows. *Vet. Res. Commun.* 25:99-108.
7. 萩原精一, 岡田洋之. 2004. 北海道の農業共済組合直営診療所における乳牛臨床型大腸菌性乳房炎の抗菌性物質療法と治癒した牛の割合の関連. *日獣会誌*. 57:170-174.
8. 久枝啓一, 有馬春樹, 園部隆久, 那須正信, 萩原克郎, 桐沢力雄, 岩井滋, 永幡肇. 2008. Escherichia coli による乳牛の甚急性乳房炎における血清中および乳清中サイトカインの動態と臨床症状. *日獣会誌* 61:443-448.
9. Ibeagha-Awemu, E. M., Lee, J. W., Ibeagha, A. E., Bannerman, D. D., Paape, M. J. and Zhao, X. 2008. Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. *Vet. Res.* 39:11.
10. Kitagawa, M., Kusakabe, Y., Miura, H., Minomiya, Y. and Hino, A. 2001. Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283:236-242.
11. Lee, S., Miwa, Y., Nishimura R., Chung, U., Suzuki, S. and Sasaki N. 2009. Effects of trehalose and sodium carboxymethyl cellulose on prevention of organ adhesion after laparotomy: A preliminary study. *Japanese Journal of Veterinary Anesthesia & Surgery* 40: 19-26.
12. Liu, M., Song, S., Li, H., Jiang, X., Yin, P., Wan, C., Liu, X., Liu, F. and Xu, J. 2014. The protective

- effect of caffeic acid against inflammation injury of primary bovine mammary epithelial cells induced by lipopolysaccharide. *J. Dairy Sci.* 97: 2856–2865.
13. Minutoli, L., Altavilla, D., Bitto, A., Polito, F., Bellocco, E., Laganà, G., Giuliani, D., Fiumara, T., Magazù, S., Ruggeri, P., Guarini, S. and Squadrito, F. 2007. The disaccharide trehalose inhibits proinflammatory phenotype activation in macrophages and prevents mortality in experimental septic shock. *Shock.* 27:91–96.
  14. Minutoli, L., Altavilla, D., Bitto, A., Polito, F., Bellocco, E., Laganà, G., Fiumara, T., Magazù, S., Migliardo, F., Venuti, F. S. and Squadrito, F. 2008. Trehalose: a biophysics approach to modulate the inflammatory response during endotoxic shock. *Eur. J. Pharmacol.* 589:272–280.
  15. Mock, C. N., Jurkovich, G. J., Dries, D. J. and Maier, R. V. 1995. Clinical significance of antibiotic endotoxin-releasing properties in trauma patients. *Arch. Surg.* 130:1234–1241.
  16. 日本家畜臨床感染症研究会事務局（文責：菊佳男）. 2010. 調査報告：乳牛における乳房炎の診断、治療、予防に関する全国アンケート. *日本家畜臨床感染症研究会誌* 5:63–74.
  17. Prins, J. M., van Agtmael, M. A., Kuijper, E. J., van Deventer, S. J. and Speelman, P. 1995. Antibiotic-induced endotoxin release in patients with gram-negative urosepsis: a double-blind study comparing imipenem and ceftazidime. *J. Infect. Dis.* 172:886–891.
  18. Sordillo, L. M. and Peel, J. E. 1992. Effect of Interferon- $\gamma$  on the production of Tumor Necrosis Factor during acute *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Sci.* 75:2119–2125.
  19. Tanaka, K., Kawamura, M., Otake, K., Toyama, Y., Okugawa, Y., Inoue, Y., Uchida, K., Araki, T., Mohri, Y. and Kusunoki, M. 2014. Trehalose does not affect the functions human neutrophils in vitro. *Surgery Today* 44:332–339.
  20. Taya, K., Hirose, K. and Hamada, S. 2009. Trehalose inhibits inflammatory cytokine production by protecting I $\kappa$ B- $\alpha$  reduction in mouse peritoneal macrophages. *Arch. Oral Biol.* 54:749–756.
  21. 山口高弘. 2010. ウシの免疫機能と乳腺免疫. *日本家畜臨床感染症研究会誌* 5:109–113.
  22. Zhao, S., Zhang, C., Wang, J., Bu, D., Liu, G. and Zhou, L. 2010. Association of production factors with milk IgA and IgM concentrations in normal lactating cows. *J. Dairy Res.* 77:481–486.

## Effects of trehalose for the cytokine gene expressions in bovine mammary epithelial cells

Satoshi Haga<sup>1)</sup> \*, Miwa Nakano<sup>1)</sup> , Yosuke Kobayashi<sup>2)</sup> , Hiroshi Ishizaki<sup>1)</sup>

1) Grassland Management Research Division, NARO, Institute of Livestock and Grassland Science  
768 Senbonmatsu, Nasushiobara, Tochigi, Japan

2) Animal Physiology and Nutrition Research Division, NARO, Institute of Livestock and Grassland Science  
2 Ikenodai, Tsukuba, Ibaraki, Japan

Correspondence: Satoshi Haga

Grassland Management Division, NARO, Institute of Livestock and Grassland Science

768 Senbonmatsu, Nasushiobara, Tochigi 329-2793, Japan

TEL & FAX: +81 287 37 7239

E-mail: hagatiku@affrc.go.jp

### [Abstract]

In dairy cattle, infection of the udder by *Escherichia coli* often induces the hyper- production of pro-inflammatory cytokines and elicits acute inflammation. This study was conducted to examine whether trehalose (TRE) , a disaccharide, can inhibit lipopolysaccharide (LPS) -stimulated gene expression of inflammatory response in bovine mammary epithelial cells (BMEC) in vitro. The BMEC was treated with TRE and was stimulated by LPS (5  $\mu$  g/ml) . The mRNA expressions of pro-inflammatory cytokines and the molecules of toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway in BMEC were measured using quantitative RT-PCR. The activations of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and p44/42 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK ERK1/2) were assessed using western blotting. The mRNA expressions of TRE receptor (T1R3) in bovine mammary gland tissues and BMEC were assessed using RT-PCR. Treatment with TRE (100 mM, 3 h) down-regulated the mRNA expression of interleukin-6 (IL-6) in the presence or absence of LPS stimulus. However, the mRNA expressions of TLR4 and MD-2 were up-regulated by TRE treatment (100 mM) . The activations of NF- $\kappa$ B and MAPK ERK1/2 were unaffected by TRE treatment (100 mM) . Additionally, we observed the expression of T1R3 in both bovine mammary gland tissues and BMEC. These results suggest that TRE can inhibit the expression of IL-6 in BMEC via TRE receptor T1R3, irrespective of NF- $\kappa$ B and MAPK ERK1/2 pathways.

**Key words:** anti-inflammation, bovine mammary epithelial cell, coliform mastitis, endotoxin, trehalose