

令和元年6月11日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06207

研究課題名(和文) 乳腺でのIgA産生を促す分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism that promotes IgA production in the mammary gland

研究代表者

野地 智法 (Nochi, Tomonori)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：10708001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：多大な経済損失を伴う乳房炎に対する予防・治療開発は難航しており、その主たる要因として、乳腺での免疫機構の多くが未だ謎であることが挙げられる。そこで、本研究では、乳腺での免疫発達機構を明らかにすることを目的とした。

乳腺にIgA産生細胞が集結する際には、IgA産生細胞が発現するCCR10を介して、乳腺から分泌されるCCL28を認識することが必要である。CCL28は大腸でも発現されており、それは腸内微生物からの刺激により誘導される。乳腺にも、多種の微生物が存在しているが、乳腺でのCCL28発現は微生物がもたらす刺激によって誘導されるのではなく、仔が乳を飲む際の刺激に依存していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、分娩後の母体が、生体内に存在するIgA産生細胞を乳腺に集結させる分子メカニズムが解明され、乳汁中の移行抗体が産生されるプロセスの大半が明らかにされた。一方で、この乳腺に存在するIgA産生細胞が、生体内のどこで活性化し乳腺に遊走しているのか、その由来の特定は今後の課題とされた。哺育の質の向上は、母子の健全育成を可能にする重要な課題である。従来の授乳生理に関わる学問に加え、免疫学および微生物学的視点を加えた新たなアプローチを駆使することで、哺乳動物特有の母子間の情報伝達機構が解明され、健康社会の実現に貢献可能な免疫・微生物戦略が確立されると期待される。

研究成果の概要(英文)：Breastfeeding is important for mammals, providing immunological and microbiological advantages to neonates from the mother. However, the mechanisms of this functional diversity in the mammary gland remain poorly characterized. Here, we show that the mammary gland develops immune and microbial environments consisting of IgA and the microflora, respectively, both of which are important for protecting neonates and the mother from infectious diseases. The IgA production and microflora development are coordinated in the gastrointestinal tract but seem to be independently regulated in the mammary gland. In particular, CCL28, a crucial molecule for the recruitment of IgA-producing cells into the mammary gland, was expressed normally in germ-free lactating mice but were almost undetectable in postweaning mothers, regardless of the microflora presence. Our findings offer insights into potentially improving the quality of breastfeeding, using both immunological and microbiological approaches.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：IgA 微生物 乳腺 CCL28 CCR10

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

乳房炎、肺炎、下痢は、泌乳器、呼吸器、消化器といった粘膜組織での微生物・ウイルス感染に起因する家畜の三大疾病である。中でも、黄色ブドウ球菌や大腸菌等を起因菌とする乳房炎の経済損失は甚大であり、その予防・治療法の確立を目的とした研究の進展は急務とされている。申請者は、これまでの粘膜免疫学に関する研究基盤を生かし、平成25年4月に東北大学大学院農学研究科に赴任後、「粘膜免疫学に立脚した乳房炎ワクチンの開発」を目指した研究に着手してきた。上述した通り、IgAは微生物・ウイルスの粘膜感染を阻止することが可能な免疫グロブリンであることから、乳房炎起因菌や病原因子に対する乳腺でのIgA産生を可能にする乳房炎ワクチンを開発することは、極めて合理的な免疫戦略と言える。しかしながら、乳腺でのIgA産生を促す分子メカニズムの多くは未だ謎であり、乳房炎ワクチン開発は難航している。本研究では、乳腺にIgA産生細胞が呼び寄せられるプロセスを解明することで、恒常的な乳腺の免疫機能強化を可能にする免疫戦略の確立を目指した研究を実施した。

2. 研究の目的

外分泌腺である乳腺は、授乳期という限られた時期にのみ機能する極めて稀な臓器であり、授乳期以外の機能は全く有していない。この乳腺の主たる機能(乳汁合成)は、授乳期にのみ発達する乳腺房の働きによるものであり、離乳とともにこの乳腺房は委縮し、また非授乳期の乳腺には、乳腺房の発達は全く認められない。生殖サイクルを通して、機能および形態が大きく変化する乳腺の授乳生理に関する研究はこれまで数多く実施されているが、乳腺での免疫機能を、生殖サイクルを通して時間軸に沿って解析した研究は多くはない。そこで本研究では、乳腺免疫の発達プロセスを明らかにするための研究を通して、乳腺でのIgA産生を促す分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

試験1

妊娠期(妊娠13日目)、分娩直後、分娩1週間後、分娩2週間後、離乳後(分娩6週間後)および未経産マウスより第4乳腺を採取し、組織学的解析(HE染色)を行うことで、乳汁合成の場である乳腺房の発達を形態学的に確認した。加えて、ラット抗マウスIgAモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色を実施することで、授乳期の乳腺房周囲に呼び寄せられるIgA産生細胞の数を、数量形態学的に評価した。さらには、各ステージのマウスの第4乳腺より細胞を単離し、FITC標識ラット抗マウスIgAモノクローナル抗体およびAPC標識ラット抗マウスB220モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー解析に供することで、乳腺房周囲に集結するIgA産生細胞の分化ステージを明らかにした。その際、乳腺の所属リンパ節である鼠経リンパ節由来の細胞もコントロールとして使用した。

試験2

授乳期の乳腺にIgA産生細胞が集結する際に、仔から母体への刺激が必要であるか否かを明らかにすべく、分娩後哺育中のマウスの仔を分娩1週間後に排除し、その後1週間、母マウスのみを継続飼育した(強制離乳試験)。分娩2週間後に、強制離乳区の第4乳腺を採取し、授乳を継続した通常哺育区の乳腺と比較することで、母体の乳腺でのIgA産生に与える仔の必要性を評価した。

試験3

乳腺房周囲にIgA産生細胞が集結する際に、ケモカインの一つであるCCL28が深く関わっていることが知られている(*J. Exp. Med.*, **200**: 805-809, 2004)。そこで、妊娠期(妊娠13日目)、分娩直後、分娩1週間後、分娩2週間後、離乳後(分娩6週間後)および未経産マウスの第4乳腺より抽出したmRNAを用い、CCL28の遺伝子発現をリアルタイムPCR法により解析することで、乳腺房周囲に集結するIgA産生細胞の数と正の相関関係にあることを評価した。

試験4

ヒトでは、CCL28の受容体として、CCL10もしくはCCR3が機能していることが知られている。そこで、CCR10ノックアウトマウス、CCR3ノックアウトマウスおよび、CCR10とCCR3をともに欠損させたダブルノックアウトマウスを用い、乳腺でのIgA産生を評価することで、乳腺でのIgA産生に欠かせ

ない受容体を特定した。

試験5

乳腺と同じく、CCL28 を発現する臓器として知られている大腸では、CCL28 発現が腸管内の微生物由来の刺激によって誘導されることが知られている。そこで、乳腺における常在微生物の存在を明らかにすべく、分娩直後および分娩2週間後の乳腺より抽出したゲノムDNAを用い、16s rRNA 遺伝子を指標としたメタゲノム解析を実施することで、乳腺組織内に存在する微生物の種を特定した。

試験6

乳腺で発現する CCL28 の遺伝子発現が微生物由来の刺激に依存したものであるのか、仔由来の刺激に依存したものであるのかを明らかにすべく、無菌マウスおよび上述した強制離乳マウスの乳腺組織を用いた解析を実施した。具体的には、各マウスより抽出した mRNA を用い、リアルタイム PCR 法を用いて、CCL28 の遺伝子発現を評価した。加えて、乳腺機能も評価すべく、 α カゼイン、 β カゼインおよび κ カゼインの遺伝子発現も解析した。

4. 研究成果

乳腺房周囲に集結する IgA 産生細胞

生殖サイクルを通して採取したマウスの乳腺組織を用いた組織学的解析から、乳腺房の発達は妊娠中に開始され、分娩後の哺育期間中にさらに発達することが明らかとなった。また、乳腺房周囲に集結する IgA 産生細胞の数は、分娩後徐々に増加し、分娩2週間後に非常に高い値となった(試験1)。一方で、分娩1週間後に仔を排除し、その後さらに1週間、母体のみを維持させた強制離乳マウスの分娩2週間後の乳腺は、乳腺房の萎縮が著しく、さらには IgA 産生細胞の数も極めて低値であった。これらの結果は、仔由来の刺激が、母体が有する IgA 産生細胞の乳腺への遊走に必要不可欠であることを示していた(試験2)(図1)。

乳腺の IgA 産生細胞の分化ステージ

生殖サイクルを通して採取した乳腺由来の単離細胞を用いてフローサイトメトリー解析を行った結果、分娩2週間後の乳腺房周囲に集結する IgA 産生細胞は、B220⁺IgA⁺の表現型を有する形質細胞であることが明らかとなった。一方で、形質細胞に分化前の形質芽細胞(B220⁺IgA⁺)および、さらにその前段階である成熟 B 細胞(B220⁺IgA⁻)は、乳腺には殆ど認められなかった。乳腺の所属リンパ節である鼠経リンパ節には、多数の成熟 B 細胞(B220⁺IgA⁻)の存在は確認されたが、生殖サイクルを通してその数に変化はなく、さらには、形質芽細胞(B220⁺IgA⁺)および形質細胞(B220⁺IgA⁺)への著しい分化も確認されなかった。これらの結果は、分娩2週間後の乳腺に認められる IgA 産生形質細胞は、鼠経リンパ節以外の生体内のどこかで分化した後、乳腺に遊走したものであることが強く示唆された(試験3)。

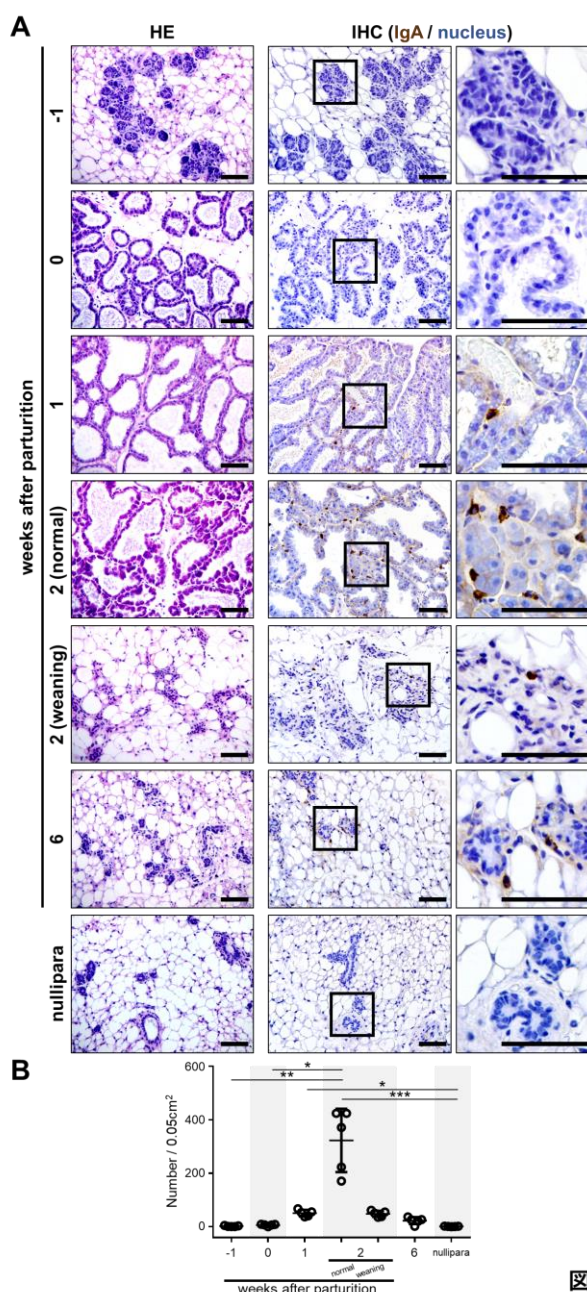


図1

2. Tsukamoto H, Takeuchi S, Kubota K, Kobayashi Y, Kozaki S, Ukai I, Shichiku A, Okubo M, Numasaki M, Kanemitsu Y, Matsumoto Y, **Nochi T**, Watanabe K, Aso H, Tomioka Y. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1–IKKε–IRF3 axis activation. *J. Bio. Chem.*, 293: 10186-10201, 2018, 査読有
3. Zhuang T, Urakawa M, Sato H, Sato Y, Taguchi T, Umino T, Katto S, Tanaka K, Yoshimura K, Takada N, Kobayashi H, Ito M, Rose MT, Kiku Y, Nagasawa Y, Kitazawa H, Watanabe K, **Nochi T**, Hayashi T, Aso H. Phenotypic and functional analysis of bovine peripheral blood dendritic cells before parturition by a novel purification method. *Anim. Sci. J.*, 89: 1011-1019, 2018, 査読有
4. Furukawa M, Yoneyama H, Hata E, Iwano H, Higuchi H, Ando T, Sato M, Hayashi T, Kiku Y, Naagsawa Y, Niimi K, Usami K, Ito K, Watanabe K, **Nochi T***, Aso H. Identification of a novel mechanism of action of bovine IgG antibodies specific for Staphylococcus aureus. *Vet. Res.*, 49: 22, 2018 *Corresponding author, 査読有
5. Niimi K, Usami K, Fujita Y, Abe M, Furukawa M, Suyama Y, Sakai Y, Kamioka M, Shibata N, Park EJ, Sato S, Kiyono H, Yoneyama H, Kitazawa H, Watanabe K, **Nochi T***, Aso H. Development of immune and microbial environments is independently regulated in the mammary gland. *Mucosal Immunol.*, 11: 643-653, 2018 *Corresponding author, 査読有
6. Yamamoto K, Iwagaki Y, Watanabe K, **Nochi T**, Aso H, Tsuduki T. Effects of a moderate-fat diet enriched with fish oil on intestinal lipid absorption in a senescence-accelerated prone mouse model. *Nutrition*, 50: 26-35, 2017, 査読有
7. Nakajima-Adachi H, Shibahara K, Fujimura Y, Takeyama J, Hiraide E, Kikuchi A, Murakami H, Hosono A, **Nochi T**, Wakatsuki Y, Shimojo N, Kaminogawa S, Sato R, Kiyono H, Hachimura S. Critical role of intestinal interleukin-4 modulating regulatory T cells for desensitization, tolerance, and inflammation of food allergy. *PLoS One*, 12: e0172795, 2017, 査読有
8. Albarracin L, Kobayashi H, Iida H, Sato N, **Nochi T**, Aso H, Salva S, Alvarez S, Kitazawa H, Villena J. Transcriptomic Analysis of the Innate Antiviral Immune Response in Porcine Intestinal Epithelial Cells: Influence of Immunobiotic Lactobacilli. *Front Immunol.*, 8:57, 2017, 査読有
9. Tsukida K, Takahashi T, Iida H, Kanmani P, Suda Y, **Nochi T**, Ohwada S, Aso H, Ohkawara S, Makino S, Kano H, Saito T, Villena J, Kitazawa H. Immunoregulatory effects triggered by immunobiotic Lactobacillus jensenii TL2937 strain involve efficient phagocytosis in porcine antigen presenting cells. *BMC Immunol.*, 17: 21, 2016, 査読有
10. Li Y, Fuchimoto D, Sudo M, Haruta H, Lin QF, Takeyama T, Morita S, **Nochi T**, Suzuki S, Sembon S, Nakai M, Kojima M, Iwamoto M, Hashimoto M, Yoda S, Kunitomo S, Hiro T, Matsumoto T, Mitsumata M, Sugitani M, Saito S, Hirayama A, Onishi A. Development of human-like advanced coronary plaques in low-density lipoprotein receptor knockout pigs and justification for statin treatment before formation of atherosclerotic plaques. *J. Am. Heart Assoc.*, 5: e002779, 2016, 査読有
11. Ishizuka T, Kanmani P, Kobayashi H, Miyazaki A, Soma J, Suda Y, Aso H, **Nochi T**, Iwabuchi N, Xiao JZ, Saito T, Villena J, Kitazawa H. Immunobiotic Bifidobacteria Strains Modulate Rotavirus Immune Response in Porcine Intestinal Epitheliocytes via Pattern Recognition Receptor Signaling. *PLoS One*. 11: e0152416, 2016, 査読有
12. Hondo T, Someya S, Nagasawa Y, Terada S, Watanabe H, Chen X, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Rose MT, **Nochi T**, Aso H. Cyclophilin A is a new M cell marker of bovine intestinal epithelium. *Cell Tissue Res.*, 364: 585-597, 2016, 査読有
13. Olesen R, Swanson MD, Kovarova M, **Nochi T**, Chateau M, Honeycutt JB, Long JM, Denton PW, Hudgens MG, Richardson A, Tolstrup M, Østergaard L, Wahl A, Garcia JV. ART influences HIV persistence in the female reproductive tract and cervicovaginal secretions. *J. Clin. Invest.*, 126: 892-904, 2016, 査読有

〔学会発表〕（計56件）以下、代表的発表

1. **Nochi T.**, Niimi K, Usami K, Furukawa M, Sasaki S, Kiyono H, Watanabe K, Aso H. CCL28-mediated chemotaxis for the recruitment of IgA-producing plasma cells into the mammary gland depends on the lactation-related but not bacterial stimulus、Mucosal Immunology Course & Symposium (MICS2018)、2018年7月17-20日、オックスフォード
2. Niimi K, Usami K, Furukawa M, Sasaki S, Watanabe K, Aso H, **Nochi T.** Intestinal microflora changes during lactation and has relevance to the specificity of milk IgA and diversity of microflora in the mammary gland、Mucosal Immunology Course & Symposium (MICS2018)、2018年7月17-20日、オックスフォード

〔図書〕（計17件）以下、代表的図書

1. **野地智法**：粘膜免疫学に立脚した乳房炎ワクチン開発に向けた基礎研究の最前線、臨床獣医 p29-32、緑書房、2018年11月

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：ウシ乳房炎に対する粘膜ワクチン組成物

発明者：林智人、長澤裕哉、秋吉一成、澤田晋一、麻生久、野地智法

権利者：農研機構、京都大学、東北大学

種類：特許

番号：特願 2018-14175

出願年：2018年

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/keitai/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：麻生 久、渡邊 康一、清野 宏、佐藤 慎太郎

ローマ字氏名：Hisashi Aso, Kouichi Watanabe, Hiroshi Kiyono, Shintaro Sato

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。