

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15358

研究課題名(和文)細菌由来分子に着目したルーメン上皮バリアの発達機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of developmental mechanism of bovine ruminal epithelial barrier

研究代表者

鈴木 裕 (Suzuki, Yutaka)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：10793846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ウシのルーメン上皮バリアの機能改善を念頭に、子牛の時期のルーメン上皮バリアの成立機序の解明を目指した。はじめに組織発達前後のルーメンにおいてRNA-seqを行った結果、菌体成分が上皮の免疫・防御反応を促進する可能性が示唆された。同時に、組織発達時に細胞供給源の探索を行った結果、ルーメン上皮基底層において未分化および細胞増殖マーカーを発現する細胞群の存在が示唆された。さらに、ルーメン上皮細胞の培養系を改良し、上皮シートを体外で培養することが可能になった。今後は、確立したルーメン細胞培養系を利用して、上皮バリアと免疫機構を誘導する分子的機序を詳細に検討する必要性が提示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、濃厚飼料の過給によるルーメンアシドーシスや肝膿瘍が発生し、大きな問題となっている。これらはウシのルーメン上皮バリアの破綻に起因すると考えられている。本研究はルーメン上皮バリアを分子的に解明することを目指し、ルーメン発達過程において菌体成分が上皮の免疫・防御反応を促進する可能性を新たに示唆した。また、ルーメン上皮の基底層における増殖細胞の存在を明らかにし、これを利用することで上皮シートを体外培養することが可能になった。作出した細胞培養系は今後、上皮バリアを保護する機能分子のスクリーニングなどに利用できる。本研究により肉牛や乳牛に多発するルーメン関連疾患の予防・治療法に新規知見を提供した。

研究成果の概要(英文)：The developmental mechanism of ruminal epithelial barrier remains unclear. The present study aimed to investigate the biological pathways involved in the development of ruminal barrier, and also to specify cellular source for tissue development. RNA-seq indicated the activation of innate immunity in developing rumen tissue. The DEG analysis detected the expressional changes of genes related to cell proliferation and cell stemness. We then aimed to identify proliferating cells in rumen. The result showed that marker genes of tissue stem cell and cell proliferation expressed in rumen tissue. These genes were mainly located in basale layer. Next, we aimed to establish a novel culturing model of ruminal epithelial cells by adapting tissue stem cell culturing method. This method succeeded in producing rumen epithelial sheet in vitro. Overall, these results might provide insights into cellular mechanism of ruminal barrier development, and the future application to prevent epithelial damage.

研究分野：動物生理学

キーワード：ウシ ルーメン 上皮バリア 菌体分子 細胞増殖

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

濃厚飼料の利用をベースとする集約的な肉牛・乳牛の飼養システムにより現代の牛肉と牛乳の生産は質・量ともに高いレベルとなっている。しかし同時に、スターチを多く含む濃厚飼料の過給に起因するウシのルーメン（反芻胃）の上皮バリア破綻が顕在化している。具体的にはルーメンアシドーシスやパラケラトシス、肝膿瘍が発生し、生産上の大きな問題となっている。アシドーシスによるルーメン内の pH 低下が、成牛におけるルーメン上皮構造や細胞間タイトジャンクションを損なうという病理機序は解明されている。しかし、離乳前後に発達すると考えられているルーメン上皮バリア機構のメカニズムを検討した研究は積極的に行われていない。ルーメン上皮の構造的な発達機序や、バリア機能の成立メカニズムを解明することは、アシドーシスを始めとするルーメン上皮に起こるトラブルを解決する重要な基礎情報になると考えられる。

申請者らは以前に *in silico* 解析や網羅的解析を行い、子牛のルーメンの発達過程において脂肪酸やケトン体の代謝酵素、タンパク質翻訳因子など、主に代謝機能に関連する多くの遺伝子の発現が変化することを確認した。また、抗菌ペプチド、タイトジャンクション、サイトカイン、免疫細胞などの上皮バリア機能に関わる多くの遺伝子の発現がダイナミックに制御されることを明らかにした。さらに、上流制御因子として、これまでに報告がなかった菌体由来成分（LPS, フラジェリン, ペプチドグリカン）が候補物質であることを見出した。

### 2. 研究の目的

上記の先行研究はルーメン発達過程における遺伝子発現変動の結果は組織発達に關与する代謝経路などを示唆するものであったが、実際の組織内のどの細胞の代謝や増殖が変化するのは以前不明であった。ウシはマウスのように遺伝子操作や生体内の細胞標識が困難である。近年、オルガノイド培養法の開発のように組織幹細胞培養法が改良されており、長期間にわたり継代培養が可能であることや生体環境を精度良く模倣できることから、組織発達の研究において画期的なツールとなっている。本研究においても、離乳期の仔牛からルーメン上皮細胞を単離培養し、組織の発達モデルとして利用可能であると考えられる。また、このような組織幹細胞は増殖活性をもち、組織発達時の細胞供給源となると考えられている。

そこで本研究では、ルーメンにおいて組織発達に關与すると考えられる増殖細胞の同定を行い、生体内条件を模倣してこの細胞群の体外培養系を確立し、上皮バリアの発達メカニズムを検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ルーメン上皮バリアの発達機序や要因を明らかにすべく、以前に実施した NGS のデータ再解析を中心とした検討を行った。以前の研究において、離乳前後の黒毛和種オス子牛より採取したルーメン上皮組織より精製した total RNA を使用し、Bioanalyzer により分解度を確認した。TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 によりライブラリ調製し、HiSeq2500 によるトランスクリプトーム解析を行った。今回、上記の得られたデータについて CLC workbench により DEG, パスウェイ、Upstream regulator などの再解析を実施した。

(2) NGS 再解析により存在が示唆された増殖細胞についてバリデーションを行った。2-8 週齢のホルスタイン種オス子牛からルーメン上皮組織を採取した。組織ホモジネートから total RNA とタンパク質を抽出し、RT-PCR およびウエスタンブロットにより、NGS 解析で見出された細胞増殖マーカーおよび未分化細胞マーカーの遺伝子発現を検討した。また、上記のルーメン組織から凍結切片を作成し、免疫染色法によりルーメン組織内におけるマーカー発現細胞の局在を検討した。

(3) ルーメン上皮組織におけるバリア機構の発達機序を検討するために、ルーメン上皮細胞の単離培養法の確立を目指した。免疫染色により同定した増殖細胞を含む細胞画分をトリプシン処理により単離した。ルーメン組織からトリプシン処理により単離した上皮細胞を、既報に基づいて調製した組織幹細胞培地においてフィーダー培養、または細胞外マトリックス (ECM) コーティングによるフィーダーフリー培養法に供した。ECM および成長因子等の培地成分の種類・濃度を比較検討し、安定的な細胞増殖が可能な培養条件への最適化を目指した。

### 4. 研究成果

(1) パスウェイ解析により、組織発達に伴って補体系やファゴサイトーシスが活性化される結果を得た。また上流因子解析からは、すでに見出していた菌体成分に加え、炎症性サイトカインが組織発達に關与することが考えられた。したがって菌体成分 - サイトカイン - 自然免疫応答の一連の反応が、ルーメン発達時に誘導される可能性が示唆された。また、ヒトやマウスの食道組織の未分化細胞マーカー (SOX2 など) や細胞増殖マーカー (KI67)、幹細胞ニッチ遺伝子 (WNT シグナルなど) の発現も見られたため培養系に応用可能な増殖細胞の存在が示唆さ

れた。

(2) RT-PCR およびウェスタンブロットにより、ルーメン組織内における増殖マーカー(KI67) および未分化細胞マーカー(TP63、AXIN2、ITGA6、ITGB4、SOX2)の発現を確認した。さらに組織免疫染色により、これらのマーカー遺伝子の発現細胞の局在を検討したところ、4層に分かれるルーメン上皮の重層扁平上皮構造において、基底層においてのみ MKI67 の陽性細胞が多数みられた。未分化細胞マーカーについては、一部は基底層における局在が見られたが、遺伝子ごとに局在が異なったため今後のさらなる解析が必要である。

(3) 前述の実験からルーメン上皮組織における増殖活性を持つ細胞の存在が見られたため、次の実験ではその単離と体外培養法の確立を試みた。結果として、細胞播種 24 時間後、両条件においてウェル底面に付着した生細胞が確認され、120 時間後では両条件ともにルーメン上皮細胞はコロニーを形成し、活発な細胞増殖が見られた。免疫染色により培養細胞の性状を検討したところ、SOX2、Ki67、ITGA6 を発現していることが確認された。

本研究から、まずルーメン発達過程において菌体成分が上皮組織の免疫・防御反応を促進する可能性が新たに示唆された。また、ルーメン上皮組織の基底層において未分化性を維持しつつ、増殖を繰り返して組織に細胞を供給する未分化細胞群が存在することが示唆された。さらに、ルーメン上皮細胞の培養系を改良し、上皮シートを体外で培養することが可能になった。一方で、未分化マーカーの再探索に時間を要し、菌体成分の作用機序の検討についてはまとまったデータが得られなかった。今後は、確立したルーメン細胞培養系を利用して、上皮バリアと免疫機構を誘導する分子的機序を詳細に検討する必要性が提示された。本研究により、肉牛や乳牛に多発するパラケラトシスや肝膿瘍といったルーメンに関連する疾患の予防・治療法において新規の基礎的知見を得ることができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nishihara K, Kato D, Suzuki Y, Kim D, Nakano M, Yajima Y, Haga S, Nakano M, Ishizaki H, Kawahara-Miki R, Kono T, Katoh K, Roh S. Comparative transcriptome analysis of rumen papillae in suckling and weaned Japanese Black calves using RNA sequencing. (2018) J Anim Sci. Jun 4;96(6):2226-2237. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

Suzuki Y, Kubota K, Miura H, Haga S, Roh S, Koike S, Kobayashi Y. The effect of chemerin as a host-derived factor on intestinal microbial activity in calves. 2018 ASAS-CSAS Annual Meeting & Trade Show (Vancouver), 2018.7.9

Nishihara K, Suzuki Y, Haga S, Kim D, Roh S. Rumen epithelial cells as a source of inflammatory cytokines. The 11th Joint Symposium of Korea-Japan-China on Rumen Metabolism and Physiology (Nagoya), 2017.10.26

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

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：

ローマ字氏名：

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。