

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月6日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21380174

研究課題名（和文） 鳥類卵管の抗菌ペプチド発現機構の解明による自然免疫機能の強化戦略

研究課題名（英文） Studies on the mechanism of antimicrobial peptide synthesis for a strategy to enhance the innate immunity in hen oviduct

研究代表者

吉村 幸則（YOSHIMURA YUKINORI）

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号：10167017

研究成果の概要（和文）：

本研究はニワトリ卵管の自然免疫系による感染防御機能を明らかにすることを目的とした。卵管粘膜では、ムチン層やタイト結合による粘膜バリア、サイトカインによる免疫応答の発動、トリβディフェンシン(AvBD)の産生により第一線の感染防御システムが構築されていることが示された。休産鶏では粘膜バリア機能が低下したので、これが感染リスクを高める要因の1つとして考えられた。Toll様受容体を刺激すると炎症性サイトカインが産生されるが、IL1βはAvBD産生を誘導するという新規な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to determine the host defense functions by innate immune system in the hen oviduct. The results showed the first defense system was formed by mucosal barrier with mucin layer and epithelial cell tight junctions, induction of immunoresponse by cytokines, and synthesis of avian β-defensins (AvBDs). Decline of mucosal barrier system in molting birds was likely to be one of the reasons why infectious risk increases in them. The current study suggested a new mechanism by which AvBDs are induced, namely IL1β upregulates the expression of some AvBDs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	11,300,000	3,390,000	14,690,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：鳥類、卵管、自然免疫、抗菌ペプチド、粘膜バリア

1. 研究開始当初の背景

鳥類の雌性生殖器の感染防御機能は、個体の健康を守って、正常な卵形成を行い、卵とヒナの細菌汚染を防ぐために重要である。鶏卵のサルモネラ菌等による微生物汚染の防止は食品の安全のためにも重要である。卵管

は卵の卵白と卵殻が形成される場であり、性成熟時に性ホルモンの作用で発達する。微生物感染は組織表面のバリア構造と免疫機能により防御される。免疫系は適応免疫系と自然免疫系に大別される。自然免疫では白血球のほかに、液性の抗菌因子が重要な役割を果

たす。自然免疫系の応答は微生物の成分のパターンを認識する受容体によって開始されるが、Toll 様受容体 (TLR) はその主要な受容体である。ニワトリでは現在までに 10 種の TLR が同定されており、このうち TLR4 はグラム陰性菌外膜成分であるリポ多糖を認識し、TLR21 は微生物特異核酸の CpG-ODN を認識する。トリ β ディフェンシン (AvBD) は抗菌ペプチドで、ニワトリでは 14 分子種の塩基配列が同定されている。TLR 刺激はインターロイキン (IL)18 や IL6 等の炎症性サイトカインの発現を誘導し、これは免疫担当細胞の活性化等をひき起こす。

これまでに私達はニワトリ卵管で TLR や AvBD が発現することを明らかにしてきた。しかし、微生物を認識してから AvBD の発現が誘導されるまでの機構は確立されていない。微生物感染によって炎症性サイトカインの発現も増加するので、これが AvBD 発現に関わる可能性も推定されるが、両者の関係は不明である。

卵管の微細物による感染リスクは休産期に高いので、免疫機能は卵管の発達と退縮に影響されることも考えられる。しかし、休産に伴うサイトカイン産生や粘膜バリアの機能の変化は不明である。卵管の感染防御機能を明らかにするためには、粘膜バリア機能、微生物感染に伴う AvBD 産生機能、炎症性サイトカイン産生機能を明らかにし、また休産期におけるこれらの機能の変化を明らかにする必要がある。

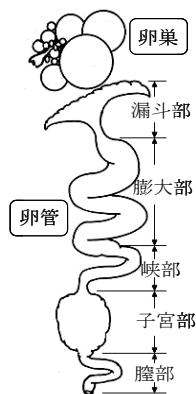


図 1. ニワトリ雌生殖器

2. 研究の目的

本研究はニワトリ卵管の自然免疫系による感染防御機能を明らかにすることを目的とした。このために、卵管粘膜バリア機能、AvBD 産生機能、炎症性サイトカインとケモカイン産生機能を解析した。さらに、炎症性サイトカインが AvBD 産生に関わることを検証した。休産期の感染防御機能の低下とこれらの機能との関連を検討するために、産卵鶏と休産鶏における粘膜バリア形成能やサイトカイン産生能を比較した。

3. 研究の方法

本研究には全てを通じて白色レグホン鶏の卵管組織を用いた。粘膜バリア関連分子、AvBD、サイトカインの遺伝子発現は RT-PCR 法またはリアルタイム PCR で解析し、蛋白質発現はこれまでに作成した AvBD

抗体または市販の抗体を用いて免疫組織化学およびウエスタンブロット解析した。

実験 1 では、卵管の粘膜バリア形成機能を追究した。このために、産卵鶏と休産鶏におけるムチン産生能とこれに及ぼすエストロゲンとリポ多糖刺激の影響を解析した。次いで、粘膜上皮のタイト結合を形成するクロロゲン発現能を解析し、この発現の産卵鶏と休産鶏との差を比較した。

実験 2 では卵管粘膜の AvBD 産生と微生物成分による刺激との関連を追究した。また、産卵周期と卵管 AvBD 産生との関連を解析し、そしてこの AvBD が卵へ移行する可能性も検討した。

実験 3 では、産卵鶏と休産鶏における炎症性サイトカインとケモカイン産生機能の差を解析し、また卵管粘膜における T 細胞サブセットの微生物成分に対する応答性も解析した。

実験 4 では、TLR 刺激から AvBD が産生されるまでの経路を明らかにするため、LPS と CpG-ODN 刺激とでの AvBD 産生の相違、炎症性サイトカインが AvBD 産生に関わる可能性を検証した。

4. 研究成果

(1) 卵管の粘膜バリア形成機能

粘膜バリアは粘液が粘膜表面を被うことや上皮間のタイト結合により形成され、微生物の組織への侵入を防ぐ。休産鶏は産卵鶏より感染リスクが高いとされている。この理由が粘液の産生機能やタイト結合分子の発現能の差による可能性を検討した。

卵管に感染する微生物はクロアカから上向すると考えられるので、膣部と子宮部のムチンの発現を中心に解析した。その結果、ムチン遺伝子発現は産卵期より休産期で有意に減少した。一方、これが内分泌的な影響の結果である可能性を検証するために、休産鶏にエストロジェンを投与するとムチン遺伝子発現は有意に増加した (図 2)。糖タンパクであるムチンは、ムチン 5AC 抗体を用いた免疫染色と、WGA と Jacalin を用いた糖鎖のレクチン染色により、粘膜上皮細胞に局在することが示され、また遺伝子発現の変化と同様にムチン 5AC 蛋白も休産期に減少することが示された。

次に、ムチン産生を誘導する要因を検討した。ここでは培養下で粘膜組織の LPS 刺激がムチン遺伝子発現に及ぼす影響を解析した。図 3 は子宮部における結果を示す。PBS を添加した対照区では発現の変化は見られなかったが、LPS を添加すると、濃度および時間依存的にムチン遺伝子発現が高まった。これと同様の結果が膣部でも認められた。また、休産鶏の子宮部と膣部でも LPS 刺激は

ムチン遺伝子発現を高めた。これらのことから、ムチン産生は微生物の侵入により高まるものと考えられた。

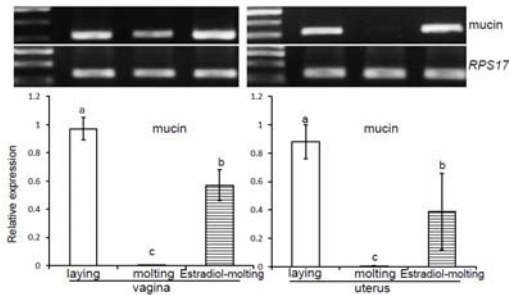


図 2. 産卵鶏 (laying)、休産鶏 (molting)、エストロゲン投与休産鶏の卵管腔部と子宮部におけるムチン遺伝子発現。

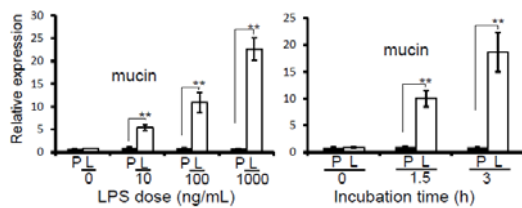


図 3. 産卵鶏子宮部のムチン遺伝子発現に及ぼす PBS (P : 対照区) または LPS (L) の影響。

粘膜バリアは、粘膜上皮細胞間のタイト結合によっても形成される。タイト結合により物質の上皮間の移動が制御されるほかに、微生物の組織内侵入が阻止されると考えられる。クローディン分子はオクルジンとともにタイト結合に寄与する分子である。腔部、子宮部および峡部のクローディン発現の産卵期と休産期の差、これの発現制御に対するエストロジェンの役割を追究した。その結果、ニワトリで同定されているクローディン 1, 3, 5 の発現は、いずれも産卵期より休産期で減少した (図 4)。また、エストラジオールベンゾエイトを投与するとこれらの発現は高まった (図 5)。

また、TNF α 用サイトカインの転写因子である LITAF と IFN γ の遺伝子発現を解析したところ、これらの発現は産卵期より休産期で高いことが示された。タイト結合の脆弱化をもたらす要因の 1 つにこれらのサイトカインによる細胞傷害が考えられた。

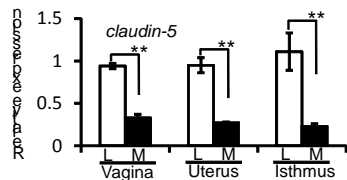


図 4. 産卵鶏 (L) と休産鶏 (M) の卵管におけるクローディン 5 遺伝子発現の差。クローディン 1 と 3 も同様の差を示した

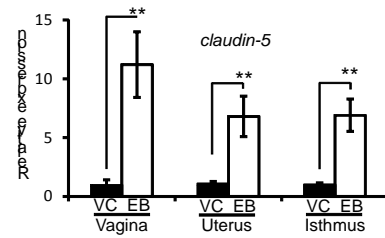


図 5. Estradiol-benzoate (EB) またはゴマ油 (VC : 対照区) 投与した休産鶏の卵管におけるクローディン 5 遺伝子発現の差。

次に、物質の上皮間透過性からタイト結合の機能を評価するために、子宮部に FITC 標識デキストランを注入して、上皮内への浸透性を観察した。FITC デキストランの上皮細胞間への浸透を示す蛍光は、産卵期では認められなかったが、休産期では認められ、休産期の上皮間透過性が高まっていることが示唆された (図 6)。

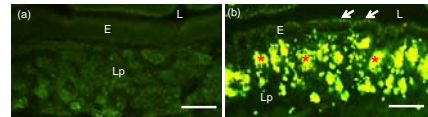


図 6. 産卵鶏 (a) と休産鶏 (b) の子宮部上皮における FITC デキストランの透過性の差。

これらのことから、卵管粘膜ではムチンやタイト結合による粘膜バリアが形成されるが、このバリア機能は産卵期より休産期で低下すること、この低下には休産期でのエストロジェンの減少が関わるものと考えられた。

(2) 卵管の AvBD 産生に及ぼす微生物成分刺激ならびに産卵周期の影響

抗菌ペプチドの AvBD は微生物を死滅させて感染防御に働く。私達は卵管で AvBD 遺伝子が発現することを認めていたが、AvBD 蛋白の発現を解析した情報は少ない。ここでは、卵管の AvBD 蛋白の産生を刺激する要因を明らかにするために、卵管 AvBD3 と 11 両の LPS 刺激に伴う変化、ならびに産卵周期中における変化を免疫組織化学的に解析した。子宮部では、LPS 投与前と 12 時間後のいずれでも、AvBD3 と 11 は粘膜上皮に認められた (図 7)。

図 8 は LPS 投与後の子宮部粘膜上皮における AvBD3 と 11 の分布密度の変化を示したものである。AvBD3 の分布密度は投与 6 時間後に対照区 (PBS 投与) より高く、AvBD11 は投与 12 時間後に対照区より高かった。これらのことから LPS に応答して AvBD3 と 11 は粘膜上皮で増加するものと考えられた。

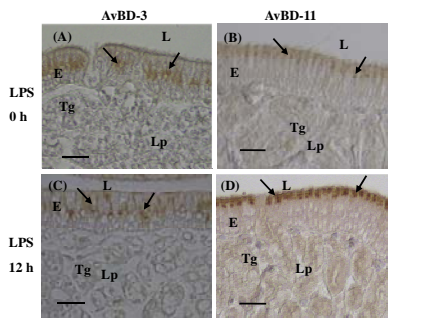


図 7. LPS 投与前と 12 時間後の子宮部における AvBD3 と 11 蛋白の免疫染色像。

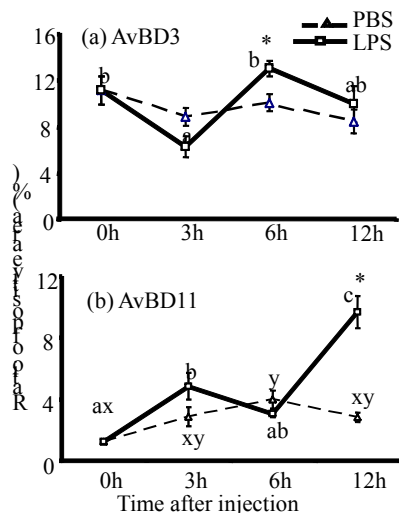


図 8. LPS または PBS (対照区) 投与に伴う産卵鶏子宮部における AvBD3 (a) と 11 (b) 蛋白の密度の変化。(免疫染色後に顕微鏡画像解析)。

次に、産卵周期中の AvBD 密度の変化を解析したところ、卵管を下降する卵が、子宮部に入る前(放卵後 0 時間)に比べて、卵が子宮に入る時間(放卵 6 時間後)、その後 4 時間(放卵 10 時間後)で AvBD3 と 11 の密度は減少した(図 9)。

また、産卵された卵の卵殻膜と卵殻において、AvBD を免疫組織化学染色とウエスタンブロットで検出した。卵殻膜では外卵殻膜の繊維成分の表面に AvBD3 が認められた(図 10)。卵殻から抽出した可用性成分の中で、AvBD3 と 11 が認められた(図 11)。

卵管では卵は卵殻膜に被われた状態で子宮部に入り、その後卵殻が形成されて完成卵として放卵される。上述の AvBD の動態から、子宮部の AvBD は卵が子宮部に入ると分泌され、卵殻膜表面に付着したり、卵殻の形成中に卵殻質に取り込まれたりするものと考えられた。

これらのことから、卵管子宮部では、微生物成分や産卵周期中の卵管内因子によって、AvBD が産生・分泌され、組織の感染防御に働き、また卵の抗菌機能の付与にも寄与するものと考えられた。

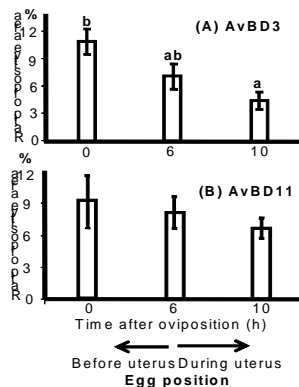


図 9. 産卵周期中の子宮部 AvBD3 および 11 蛋白の密度(免疫染色後に顕微鏡画像解析)。

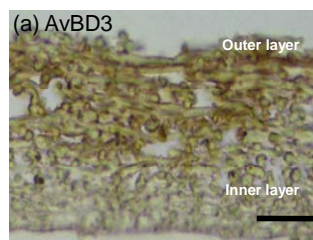


図 10. 卵殻膜の AvBD3 (免疫染色)。

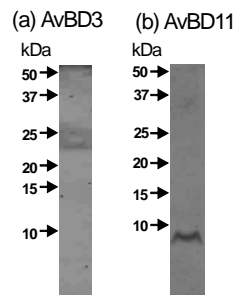


図 11. 卵殻中の AvBD3 および 11 蛋白。

(3) 産卵鶏と休産鶏における炎症性サイトカインとケモカイン産生機能

サイトカインは自然免疫と適応免疫のいずれにおいても応答の発動や強度に影響する。また、T 細胞による免疫応答は B 細胞やマクロファージに影響して免疫系の基盤的な役割を担う。産卵期より休産期で感染リスクが高いことには、これらによる防御機能に差があることが推定される。ここでは、卵管粘膜において、LPS 刺激に伴う炎症性サイトカインの IL1 β と IL6 の発現性、ケモカインの CXCLi2 発現性、T 細胞サブセットの誘導性の差を産卵期と休産期で比較した。

その結果、産卵鶏と休産鶏のいずれでも、膣部と子宮部における IL1 β と CXCLi2 の発

現は、PBS 投与区と比べて LPS 投与 3 時間または 6 時間後に増加する傾向を示した。IL6 の発現も産卵鶏と休産鶏の一部で LPS により増加する傾向を示した(図 12)。

一方、LPS 投与により、産卵鶏と休産鶏の子宮部と膣部で CD4+T 細胞は増加した(データ非掲載)。しかし、休産鶏の子宮部において CD8+ T 細胞は対照区より LPS 投与区で少なかった。産卵鶏の子宮部と膣部や、休産鶏の膣部では LPS の CD8+ T 細胞への影響は認められなかった(図 13)。

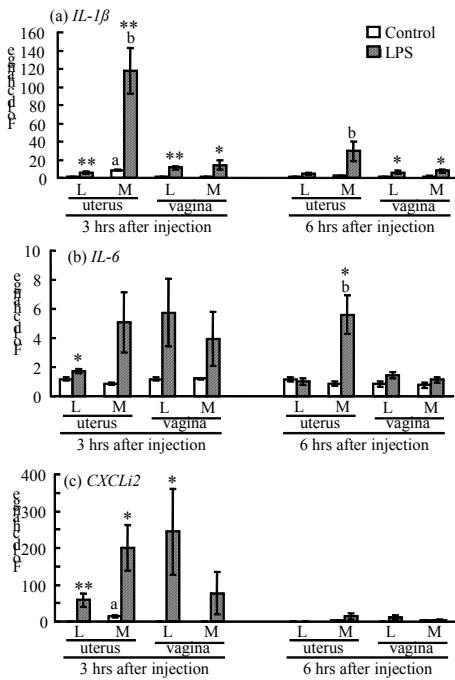


図 12. 産卵鶏(L)と休産鶏(M)における LPS 刺激に伴う卵管サイトカイン遺伝子発現変化。

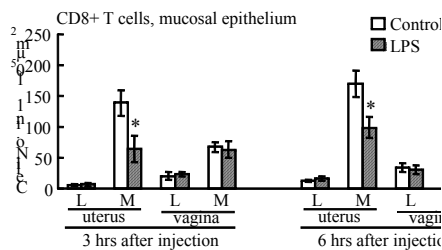


図 13. LPS 刺激した卵管における CD8+T 細胞分布の産卵鶏(L)と休産鶏(M)の差。

これらの結果から、産卵鶏と休産鶏のいずれでも LPS に応答して IL1 β 、IL6 や CXCL12 は産生されるが、休産鶏では CD8+ T 細胞の誘導性が劣り、このことが感染防御機能を低下させる原因の 1 つと推定された。

(4) 卵管の AvBD 産生への炎症性サイトカインの関与

産卵鶏に LPS 投与すると炎症性サイトカインや AvBD の遺伝子発現が高まり、また上述のように AvBD 蛋白の増加も認められた。CpG-ODN は微生物特異核酸であるが、これが卵管でサイトカインや AvBD 発現に及ぼす影響は明らかでない。ここでは LPS を陽性対照物質として、CpG-ODN が培養膣部細胞の AvBD 産生に及ぼす影響を追究した。培養細胞した膣部粘膜細胞群には上皮細胞、繊維芽細胞用細胞、CD45+ 白血球が含まれること、またこれらは TLR4 と TLR21、AvBD1、3、5、10、12 を発現することを確認した。この膣部細胞を LPS で刺激すると、IL1 β と IL6、AvBD10 と 12 の遺伝子発現が増加した(データ非掲載)。一方、CpG-ODN 刺激は IL1 β と IL6 の発現を増加させたが(図 14)、AvBD の発現には影響しなかった。

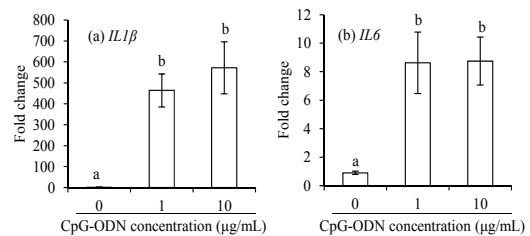


図 14. 培養膣部細胞の CpG-ODN 刺激に伴うサイトカイン遺伝子発現の変化。

次に、炎症性サイトカインの IL1 β と IL6 が膣部細胞の AvBD 発現に影響する可能性を検討した。培養細胞における IL1 β と IL6 の受容体発現を解析したところ、いずれの受容体も発現していることが確認された。次いで、細胞を IL1 β または IL6 で刺激したところ、IL1 β により 5 種の AvBD のうち AvBD1 と 3 の発現が増加した。IL6 はいずれの AvBD の発現にも影響しなかった(図 15)。

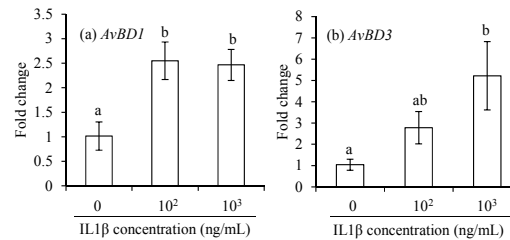


図 15. 培養膣部細胞の IL1 β 刺激に伴う AvBD 遺伝子発現の変化。

上述の結果から、LPS と CpG-ODN はそれぞれ TLR4 と TLR21 を刺激して、炎症性サイトカインの発現を誘起すること、LPS 刺激は AvBD 産生も誘起するが、CpG-ODN は AvBD 発現には有意な影響を示さないと考えられた。しかし、これらの過程で産生される

IL18はAvBD1と3の発現を増加させるので、結果的にCpG-ODNも刺激の下流でAvBD発現を誘導するものと考えられた。また、LPSはAvBD10と12の発現を増加させ、L1βはAvBD1と3を増加させたので、刺激因子によって発現するAvBDの種類が異なるものと考えられた。

(5) まとめ

卵管粘膜では、ムチン層やタイト結合による粘膜バリア、サイトカインによる免疫応答の発動、AvBDの産生により第一線の感染防御システムが構築されていることが示された。休産鶏で感染リスクが高いことには粘膜バリア機能が低下することが要因の1つとして考えられる。TLRリガンドが直接的またはIL1βを介してAvBD産生を刺激することが明らかになったが(図16)、休産期でもIL18産生は認められるので、休産期にAvBD発現能の低下をもたらす機構をさらに追究する必要がある。

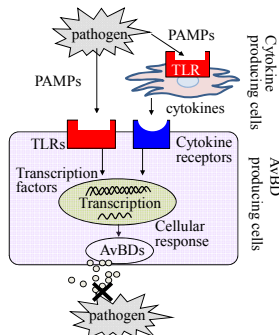


図16. 病原体成分(PAMPs)刺激を認識した卵管組織におけるサイトカインとAvBD発現誘導の過程。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. Sonoda Y, Abdel Mageed AM, Isobe N, Yoshimura Y: Induction of avian β-defensins by CpG oligodeoxynucleotides and proinflammatory cytokines in hen vaginal cells in vitro. *Reproduction* 145(6): 621-631. 2013. (査読有り)
2. Ariyadi B, Isobe N, Yoshimura Y: Expression of tight junction molecule "claudins" in the lower oviductal segments and their changes with egg-laying phase and gonadal steroid stimulation in hens. *Theriogenology* 79(2): 211-218. 2013. (査読有り)
3. Nii T, Isobe N, Yoshimura Y: Effects of repeated lipopolysaccharide stimulation on the development of antigen-

presenting cells and T cells pool in hen vagina. *J Poultry Sci* 50, 83-89. 2012. (査読有り)

4. Ariyadi B, Isobe N, Yoshimura Y: Differences in the mucosal surface barrier formed by mucin in the lower oviductal segments between laying and molting hens. *Poult Sci* 91(5): 1173-1178. 2012. (査読有り)
5. Nii T, Sonoda Y, Isobe N, Yoshimura Y: Effects of lipopolysaccharide on the expression of proinflammatory cytokines and chemokines and the subsequent recruitment of immunocompetent cells in the oviduct of laying and molting hens. *Poult Sci* 90(10):2332-2341. 2011. (査読有り)
6. Abdel Mageed AM, Isobe N and Yoshimura Y: Changes in the density of immunoreactive avian beta-defensin-3 and -11 in the hen uterus in response to lipopolysaccharide inoculation. *J Poultry Sci* 48(2): 73-77. 2011. (査読有り)
7. Abdel Mageed AM, Isobe N and Yoshimura Y: Immunolocalization of avian beta-defensins in the hen oviduct and their changes in the uterus during eggshell formation, *Reproduction* 138(6): 971-978. 2009. (査読有り)

[学会発表] (計1件)

1. Yoshimura Y, Abdel-Mageed A., Sonoda Y., Nii T., Ariyadi B., and Isobe N.: Regulation of β-defensins expression by microbial components and proinflammatory cytokines in hen oviduct. 10th Int Symposium on Avian Endocrinol (2012年6月5日-9日, 長良川コンベンションセンター, 岐阜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 幸則 (YOSHIMURA YUKINORI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号: 10167017

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

磯部 直樹 (ISOBE NAOKI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号: 80284230