

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292161

研究課題名(和文) 鳥類卵管の抗菌ペプチドによる自然免疫機能の強化戦略

研究課題名(英文) Strategy to enhance the innate immune functions by antimicrobial peptides in the hen oviduct

研究代表者

吉村 幸則 (Yoshimura, Yukinori)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：10167017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、卵管の自然免疫機能の解明を目的とした。卵管には多様な細菌とウイルスの分子がパターン受容体に認識されて自然免疫応答が起動するものと考えられた。RNAウイルスである伝染性気管支炎ウイルス (IBV; 弱毒化ワクチン使用) は、抗菌ペプチド、サイトカイン、インターフェロン (IFN) の発現を誘導した。また、微生物パターン認識後の転写因子にはNF- κ Bが関わることも明らかになった。感染部位の炎症時に増加するプロスタグランジン (PG) E₂ も抗菌ペプチド発現を増加させた。これらの結果から、卵管の感染部位では、パターン受容体の刺激やPGの作用で抗菌ペプチドやIFNが産生されて微生物が排除されることが考えられた。

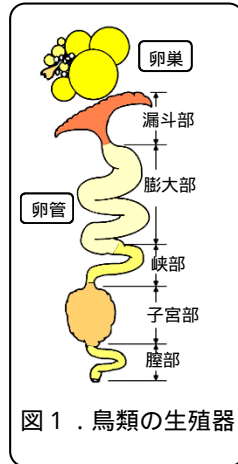
研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to determine the innate immune functions in the hen oviduct. Different microbe-associated molecular pattern receptors were identified in the oviduct. The expression of antimicrobial peptides, cytokines and interferons (IFNs) was upregulated by injection of the oviduct with attenuated infectious bronchitis virus (IBV) and other microbe patterns, and NF- κ B was one of the responsible transcription factors in that process. The current study showed IBV caused increase in the level of prostaglandin (PG) E₂, a responsible inflammation mediator, which in turn PGE₂ upregulated the expression of antimicrobial peptides in the oviduct. We suggest that, in the infected oviductal tissues, antimicrobial peptides, cytokines and IFNs are synthesized through activation of pattern recognition receptors and by the effects of PGs. These findings may be useful to consider the new strategy to enhance the disease resistance of chickens.

研究分野：家畜生体機構学

キーワード：ニワトリ 卵管 感染防御 抗菌ペプチド 炎症性サイトカイン Toll様受容体 転写因子 炎症

1. 研究開始当初の背景

鳥類の卵形成過程で、卵黄は卵巣で発達し、卵白と卵殻は卵管で形成される(図1)。卵管の微生物に対する感染防御機能は、個体の健康維持、正常な卵形成、卵とヒナの細菌汚染の防止などのために重要である。一方、卵管のサルモネラ菌等による感染リスクは加齢や強制換羽による休産時に高まると考えられている。卵管の感染防御機能を強化するためには、免疫機能を明らかにしなければならない。ワクチンは特定の病原微生物の感染を防御するのに有効であるが、野外の多様な微生物による感染を防ぐにはワクチンだけでは対応できない。抗菌スペクトルの広いトリディフェンシン(AvBD)やカテリシジン(CATH)等の抗菌ペプチドが働く自然免疫系も合わせて強化することが期待される。



私達は卵管の生体防御機能の強化を目的として、この組織の自然免疫機能の解明を目指した研究を行っている。自然免疫系では、Toll様受容体(TLR)やNod様受容体(NLR)等により微生物パターンを認識し、この刺激で炎症性サイトカインや抗菌ペプチドが産生されて、微生物の排除に働く。私達は、ニワトリ卵管組織にTLRが発現すること、TLR4のリガンドであるグラム陰性菌成分のリポ多糖(LPS)で刺激すると、炎症性サイトカインのインターロイキン1(IL1B)やIL6、抗菌ペプチドのAvBDが発現することを明らかにした。また、正常鶏では、卵管のAvBDが卵へ移行することも示した。

卵管ではTLRの1つであるTLR4がLPSを認識して、IL1B等の炎症性サイトカインとAvBDを産生すること、さらにIL1BがAvBD発現を誘導することを明らかにした。しかし、卵管にはTLR4以外の6種類のTLRが発現することも示されたので、LPS以外の微生物成分も認識される可能性がある。微生物成分はNLRによっても認識されるが、卵管でNLRが発現することは実証されていない。卵管組織がTLRやNLRを介して微生物を認識し、自然免疫関連因子を産生するまでの細胞内情報伝達分子も明らかでない。卵管の自然免疫系による感染防御機能を強化する方策を検討するには、自然免疫関連因子の産生に必要な細胞内情報伝達因子を明らかにすることも必要である。一方、微生物感染は組織の炎症を引き起こすが、炎症と自然免疫系の活性化との関係は明らかでない。

2. 研究の目的

本研究は、卵管の自然免疫機能の強化に寄

与することを目指して、卵管粘膜の微生物認識能、微生物パターンの認識からサイトカイン産生に関わる細胞内情報伝達機構、感染に伴って起こる炎症のメディエータがAvBD産生に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。このために、微生物パターン受容体の発現を検証し、微生物パターン認識がサイトカインや抗菌ペプチドの発現を誘導すること、この過程の細胞内機構を追究した。さらに、抗菌ペプチドの産生に及ぼす炎症メディエータのプロスタグランジン(PG)の影響も追究した。

3. 研究の方法

供試動物には白色レグホン産卵鶏を用いた。微生物パターン受容体を同定し、RNAウイルス(弱毒化伝染性気管支炎ウイルス(IBV): IBV ワクチンを使用)の感作が卵管の抗菌ペプチドとサイトカインの発現に及ぼす影響を解析した。さらに、微生物パターン分子が卵管のサイトカインとムチンを発現させる過程で働くTLR下流の転写因子を同定した。次いで、炎症応答とAvBD産生との関連を追究するために、卵管子宮部のIBV感作に伴うPG産生と、PGE2がAvBD発現へ及ぼす影響を解析した。遺伝子発現は半定量またはリアルタイムPCR法で解析し、PG産生酵素のCOXの局在は免疫組織化学、PGE2量の測定はELISA法で解析した。

4. 研究成果

(1) 微生物パターン受容体の同定

私達はこれまでに、ニワトリ卵管においてdsRNAウイルス、グラム陽性菌、同陰性菌、細菌の鞭毛フラジェリンssRNAウイルスを認識するTLR2、3、4、5と7、そして細菌の熱耐性物質を認識するTLR15、非メチル化CpG-オリゴDNAを認識するTLR21が発現することを示していた。NLRファミリーに属するNLRC5はLPSを認識すること、MDA(メラノーマ分化関連遺伝子)はRNAウイルスを認識すると考えられている。卵管でNLRC5とMDA5の発現を解析すると、これらのいずれも発現していることが明らかになった。膣部のNLRC5発現は産卵期と休産期で同等であったが、子宮部での発現は産卵期より休産期で高いことが明らかになった(図2)。また、IBVを卵管内へ投与すると、RNAウイルスを認識するTLR3と7だけでなく、MDA5の発現が高まったので、

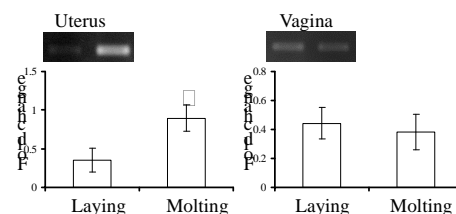


図2. 産卵鶏(laying)と休産鶏(molting)の子宮部と膣部におけるNLRC5発現

ウイルス感作がこれの発現を増強するものと考えられた(図3)。これらの結果から、卵管ではTLR、NLRC5、MDA5により、多様な細菌とウイルスのパターンが認識されて自然免疫応答が起動するものと考えられた。

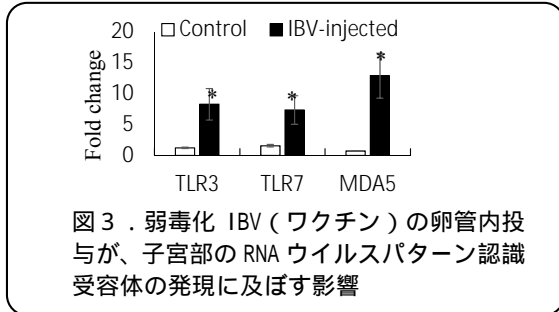


図3. 弱毒化 IBV (ワクチン) の卵管内投与が、子宮部の RNA ウイルスパターン認識受容体の発現に及ぼす影響

(2) RNA ウイルスが卵管の抗菌ペプチドとサイトカインの発現に及ぼす影響

私達はLPSを生体に投与すると卵管のAvBD発現が増加することを明らかにしていた。本研究では卵殻形成異常などの卵管の機能障害をもたらすIBVに反応して、抗菌ペプチドとインターフェロン(IFN)発現が高まるかを検証した。その結果、子宮部で検出された11のAvBDのうち、AvBD1、2、4、5、6、7の発現が対照区よりIBV処理区で高く、AvBD9の発現は低かった(図4)。

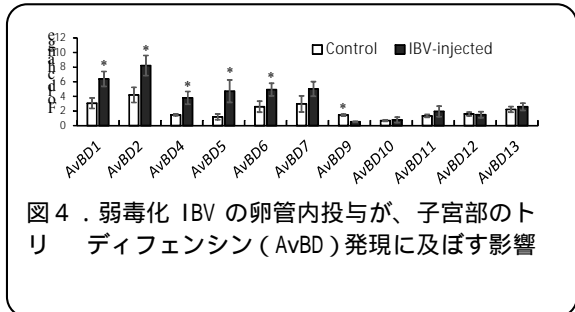


図4. 弱毒化 IBV の卵管内投与が、子宮部のトリディフェンシン(AvBD)発現に及ぼす影響

CATH1、2、3、B1のうち、子宮部ではCATH1、2、3の発現が検出された(図5)。

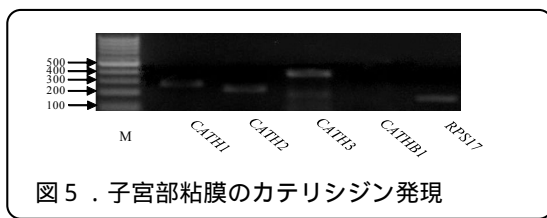


図5. 子宮部粘膜のカテリシジン発現

このうち、CATH1と2の発現は、IBVを感作させると対照区より高かった(図6)。抗ウイルス作用があるIFNの子宮部における発現を解析すると、IFN α 、 β 、 γ 、 λ の発現が認められ、これらのいずれの発現もIBVによる感作で高まった(図7)。これらのことから、卵管ではLPSだけでなくRNAウイルスにも応答してAvBDsとCATHsの発現が高まることから、これらの抗菌ペプチドとIFNは卵管の機能障害をもたらすIBVウイルスの除去に働く

ものと思われる。AvBDやCATH等の抗菌ペプチドはエンベロープを持つウイルスを死滅させることが知られている。

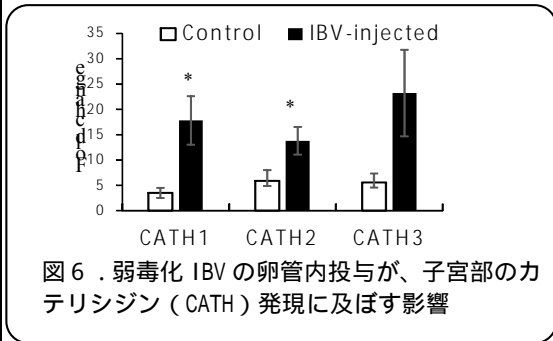


図6. 弱毒化 IBV の卵管内投与が、子宮部のカテリシジン(CATH)発現に及ぼす影響

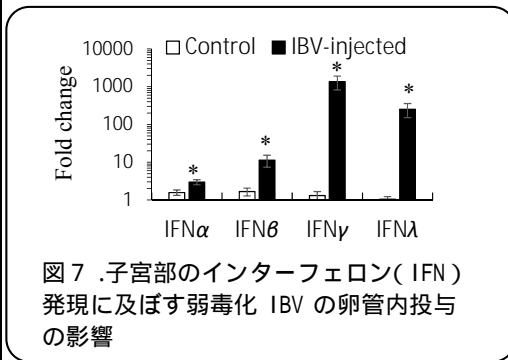


図7. 子宮部のインターフェロン(IFN)発現に及ぼす弱毒化 IBV の卵管内投与の影響

(3) 卵管の微生物パターンに伴うサイトカインとムチン発現に働く転写因子の同定

子宮部において、TLRアダプターのMyD88、転写因子のNF κ BとAP1(cFosとcJun)の発現を解析するといずれの分子の発現も認められた(図8)。卵管の発達とこれらの発現との関係を検討するために、産卵期と休産期、休産期にエストロジオール-ベンゾエイト(EB)を投与した供試鶏での発現を解析すると、NF κ B、cFos、cJunのいずれの発現も産卵期より休産期で低かった(図9)。休産期にはこれらの転写因子は減少する可能性が考えられる。EBを投与すると、NF κ B発現は休産期と同程度であったのでエストロゲン依存性は低い可能性があり、一方cFosとcJun発現は休産期より高まって、産卵期と同程度になったので、エストロゲン依存性であると思われる(図9)。

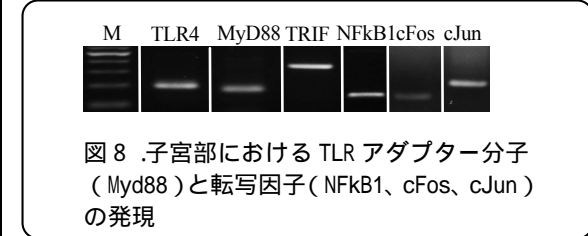


図8. 子宮部におけるTLRアダプター分子(MyD88)と転写因子(NFkB1、cFos、cJun)の発現

次に、子宮部粘膜において、TLRリガンドの刺激に伴う炎症性サイトカインの発現に関わる転写因子を解析した。粘膜細胞を単層培養して、Poly-I:C、LPS、フラジェリン、R848またはCpG-オリゴDNA(ODN)で刺激し、この各培養区に、NF κ B阻害剤のBAY11-7085

または AP-1 阻害剤の Tanshinone IIA を添加した。

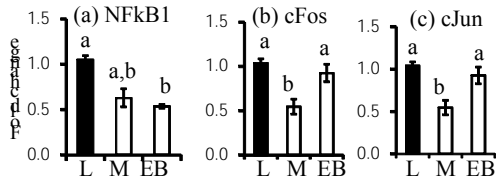


図 9 . 子宮部の TLR 下流転写因子の発現に及ぼす産卵期とエストロゲンの影響 (EB=エストロジオール-ベンゾエイト)

その結果、Poly-I:C、LPS と CpG-ODN による刺激で IL1B、IL6 と CXCLi2 (結果非掲載) の発現が増加し、フラジェリンと R848 による刺激で IL1B の発現が増加した。これらの TLR リガンドによるサイトカイン発現の上昇は、BAY11-7085 で抑制されたが (図 10)、Tanshinone IIA では抑制されなかった (結果非掲載)。このことから、今回解析した TLR 刺激に伴うサイトカイン発現の誘導過程では、AP-1 の役割は不明であるが、NFκB が転写因子として関わると考えられた。

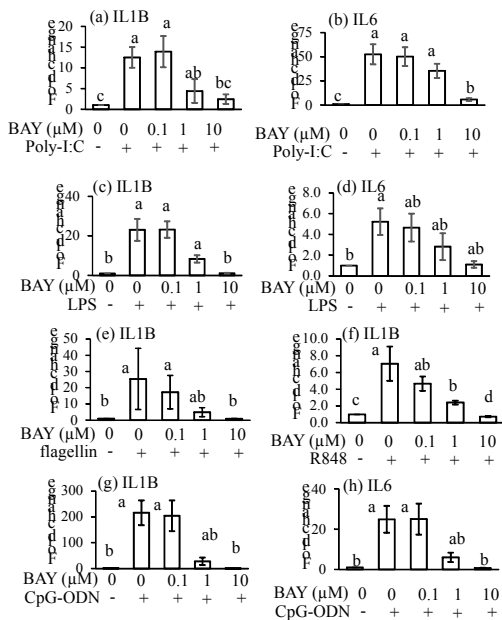


図 10 . 培養子宮部細胞の TLR リガンド刺激に伴うサイトカインの発現誘導とこれに及ぼす転写因子 (NFκB、AP-1) 阻害剤の影響

次に、粘膜バリアとして働くムチンの発現も LPS 刺激により増加するか、この過程でも NFκB と AP-1 が転写因子として関わるかを追究した。子宮部粘膜組織を培養して LPS で刺激すると、ムチンの発現が上昇することが確認された。この培養系に LPS とともに、BAY11-7085 または Tanshinone IIA を添加すると、ムチンの発現は抑制された (図 11)。このことから、サイトカインの発現とは異なる

り、ムチンの発現を誘導する TLR4 下流の転写因子には BAY11-7085 と AP-1 が関わるものと考えられた。

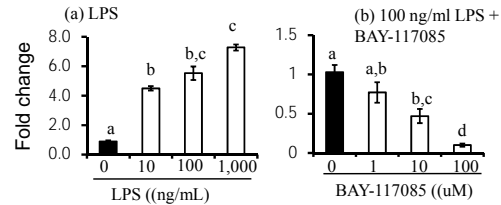


図 11 . 培養子宮部組織の LPS 刺激によるムチン発現の誘導とこれに及ぼす転写因子 (NFκB、AP-1) 阻害剤の影響

(4) 卵管子宮部の IBV 感作に伴うプロスタグランジン(PG)産生と AvBD 発現への影響

卵管の IBV 等による微生物感染は粘膜組織の炎症を引き起こすと思われる。PGE2 や PGF2α は正常鶏では子宮部を収縮させて放卵を誘導するが、感染により産生される PG は炎症メディエータとなる。また、PG が炎症とともに AvBD 産生を誘導すれば感染部位のウイルスの拡散を抑制すると期待される。IBV 感作が PG 産生酵素の発現と PGE2 産生に及ぼす影響と、PGE2 が AvBD 発現に及ぼす影響を解析した。卵管各部の COX-1 と -2 の局在を免疫染色により解析すると、表面上皮と子宮部環状腺、血管内被に局在が認められた (図 12)。RT-PCR 解析すると、COX-1 は漏斗部で、COX-2 は子宮部で高い発現を示した。



図 12 . 子宮部の COX2 免疫染色

IBV (ワクチン) を卵管内へ投与すると、子宮部の COX-1 発現には影響しなかったが、COX-2 発現は IBV 感作区で対照区より有意に高かった。また、組織内の PGE2 量を ELISA 法で解析すると、IBV 感作区が対照区より有意に多かった。このことから、IBV は、子宮部粘膜の COX-2 発現を増加させて、PGE2 産生を高めるものと考えられた (図 13)。

次に、単層培養した子宮部粘膜細胞をいろいろな濃度の PGE2 で刺激すると、500 ng/ml の PGE2 により、AvBD4、10、11、12、13 の発現が対照区より有意に高かった (図 14)。炎症は微生物の拡散を抑制するが、さらに炎症メディエータの PGE2 が子宮部の局所で増加すると、これらの AvBD 産生が促進され、微生物の排除に働くものと思われる。

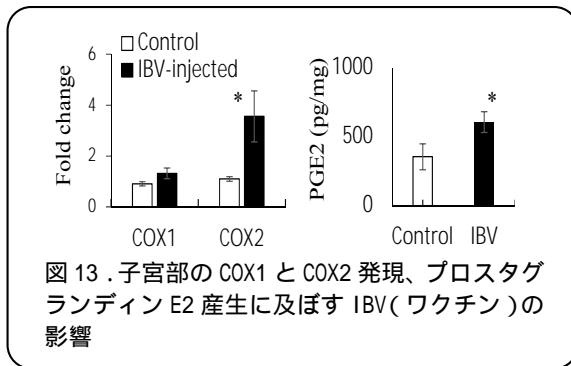


図 13 . 子宮部の COX1 と COX2 発現、プロスタグランジン E2 産生に及ぼす IBV (ワクチン) の影響

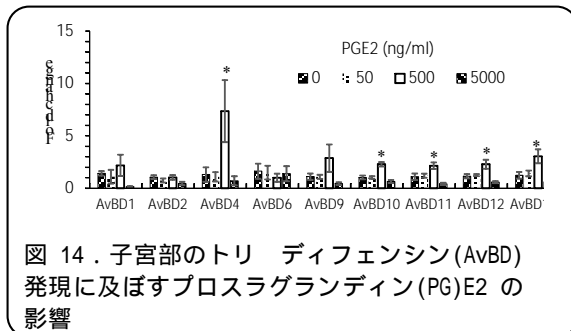


図 14 . 子宮部のトリ ディフェンシン (AvBD) 発現に及ぼすプロスタグランジン (PG)E2 の影響

(5) まとめ

本研究により、ニワトリ卵管には TLR だけでなく、NLRC5 や MAD5 を含めた微生物パターン受容体が発現し、またサイトカインの発現を誘導する過程では、NF κ B が TLR 下流の転写因子として働くことが示された。さらに、感染に伴って起こる炎症メディエータの 1 つである PGE2 も AvBD 産生を促進して微生物の排除に働くものと思われる。卵管に発現する微生物パターン受容体の多様性を保ち、転写因子が適正に機能しながら自然免疫応答を作動させることで卵管の感染防御機能を確保することが望まれる。また PGs が抗菌ペプチド産生を促すことは新しい知見であり、炎症と感染防御機能の相互作用に関する研究の発展が期待される。ワクチンは適応免疫系を強化する養鶏現場に欠かせない処置である。一方で、抗菌ペプチドの産生を強化することは抗病性を強化する新たな展開をもたらす可能性がある。今後自然免疫機能を強化する技術の発展が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Kamimura T, Isobe N, Yoshimura Y: Effects of inhibitors of transcription factors, nuclear factor- κ B and activator protein 1, on the expression of proinflammatory cytokines and chemokines induced by stimulation with Toll-like receptor ligands in hen vaginal cells. *Poultry Science* 96(3):723-730. 2016. doi: 10.3382/ps/pew366 査読有 .
2. Abdel-Mageed AM, Isobe N, Yoshimura Y. Effects of viral-associated molecular patterns on the expression of cathelicidins in the hen vagina.

Journal of Poultry Science 53(3): 240-247. 2016. DOI: 10.2141/jpsa.0150180 査読有 .

3. Yoshimura Y: Avian β -defensins expression for the innate immune system in hen reproductive organs. *Poultry Science* 94(4):804-809. 2015. doi: 10.3382/ps/peu021 査読有 .
4. Nii T, Isobe N, Yoshimura Y: The effect of estrogen on the early cytotoxic response to IBvirus infection in hen oviduct. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 164(1-2):56-66, 2015. doi:10.1016/j.vetimm.2014.12.011 査読有 .
5. Abdel-Mageed AM, Isobe N, Yoshimura Y: Effects of different TLR ligands on the expression of proinflammatory cytokines and avian β -defensins in the uterine and vaginal tissues of laying hens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 162 (3-4): 132-141. 2014. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.10.013 査読有 .
6. Nii T, Isobe N, Yoshimura Y: Effects of avian infectious bronchitis virus antigen on eggshell formation and immunoreaction in hen oviduct. *Theriogenology* 81(8): 1129-1138. 2014. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.02.002 査読有 .
7. Ariyadi B, Isobe N, Yoshimura Y: Toll-like receptor signaling for the induction of mucin expression by lipopolysaccharide in hen vagina. *Poultry Science* 93(3):673-679. 2014. doi: 10.3382/ps.2013-03667 査読有 .
8. Yoshimura Y, Abdel Mageed AM, Nii T, Ariyadi B, Isobe N: Innate immune functions in hen reproductive organs. *Avian Biology Research* 7(1): 39-47. 2014. <https://doi.org/10.3184/175815514X13902927945697> 査読有 .
9. Ariyadi B, Isobe N, Yoshimura Y: Induction of mucin expression by estrogen and lipopolysaccharide in the lower oviductal segments in hens. *Poultry Science* 92(12): 3205-3213. 2013. doi: 10.3382/ps.2013-03414 査読有 .

〔学会発表〕(計 18 件)

1. Elhamouly M, Isobe N, Yoshimura Y : Expression And Localization Of Cyclooxygenases In The Oviduct Of Laying Hens During The Ovulatory Cycle . The 17th AAAP Animal Science Congress (August 22-25, 2016, Fukuoka, Japan)
2. Abdel-Mageed AM, Isobe N, Yoshimura Y : The expression of Cathelicidins and their changes in the vaginal mucosal tissue in response to TLR ligands in the oviduct of laying hens . The 17th AAAP Animal Science Congress (August 22-25, 2016, Fukuoka, Japan)
3. Yoshimura Y, Ariyadi B, Isobe N : Antimicrobial peptides expression for defense system in chicken gastrointestinal and reproductive organs. The 6th International Seminar on Tropical Animal Production (ISTAP) (October 20-22, 2015, Yogyakarta, Indonesia) (招待講演)
4. Yoshimura Y: Innate immunodefense system in hen reproductive organs. *Poultry Science Meeting Symposium: Avian Reproduction: Foundational Advances and Practical Applications*. Poultry Science Association annual meeting (July 14-17, 2014, Corpus Christi, Texas, USA) (招待講演)
5. Kamimura T, Isobe N, Yoshimura Y: Identification of transcription factors in TLR4 signaling pathway

for the induction of proinflammatory cytokines by lipopolysaccharide in the uterus mucosa of hens. 10th Asia Pacific Poultry Conference. (October 19-23, 2014, International Convention Center Jeju, Jeju, Korea)

6. Yoshimura Y, Abdel-Mageed A, Kamimura T, IsobeN: Expression of avian β -defensins, a member of antimicrobial peptides, in hen oviduct. 10th Asia Pacific Poultry Conference. (October 19-23, 2014, International Convention Center Jeju, Jeju, Korea)

〔図書〕(計 1 件)

吉村 幸則：鳥類生殖器の抗菌ペプチドと感染防御システム「抗菌ペプチドの機能解明と技術利用」(長岡 功監修), pp74-80, シーエムシー出版, 東京, 2017.

〔その他〕

ホームページ等

広島大学大学院生物圏科学研究科

家畜生体機構学研究室

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/anat/>

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