

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03909

研究課題名(和文) プタ初乳中免疫細胞とエキソソームの移行免疫における役割 健全離乳実現への基盤研究

研究課題名(英文) Investigation of the porcine colostrum exosomes and lymphocytes.

研究代表者

井上 亮 (Inoue, Ryo)

京都府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：70443926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではブタ初乳中エキソソームと免疫細胞について、その成分や子豚への移行、さらに役割を検討した。本研究により、初乳中エキソソーム濃度には産歴に関わらず個体差があること、エキソソーム濃度とエキソソームの質には関連が無い可能性が高いこと、エキソソームには子豚の免疫細胞を分化させる役割があること(in vitro)を明らかにした。免疫細胞については、蛍光を発する初乳細胞を摂取した野生型の子豚の回腸や脾臓に蛍光を発する細胞がいることを確認し、初乳中の免疫細胞が子豚に移行する直接的な証拠を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ブタ初乳の成分であるエキソソームと細胞に関する知見が蓄積された。ブタ初乳中エキソソームに関しては成分や機能はほとんど未知であったが、本研究により母豚による個体差があることやエキソソームの量と質が関係しないこと、子豚の免疫系に作用することが明らかになり、ブタにおける移行免疫の新たな一面がわかった。初乳中免疫細胞についても子豚に移行することを直接的に証明した世界的にみても数少ない成果を得ることができた。さらに、初乳の新たな機能として小腸組織構造の発達促進という機能も見出した。本研究の成果は、健全な養豚体系を構築するうえで現場にも大いに役立つものであり、養豚界に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated porcine colostrum exosome and immune cells. In view of colostrum exosome, this study revealed, a) concentration of colostrum exosome varies individually regardless of sow's reproduction history, b) concentration of colostrum exosome does not correlate with concentration of miRNA and c) colostrum exosome can stimulate differentiation of piglet's lymphocyte (in vitro). When wild-type newborn piglet ingested fluorescent colostrum immune cells, we found cells possessing same fluorescence in piglet's spleen or ileum. This is the direct evidence that colostrum immune cells can transfer into piglet's body circulation.

研究分野：畜産学

キーワード：ブタ 初乳 エキソソーム 移行免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、養豚では感染症増加などの問題から早期離乳が見直され始めているが、敷地面積の問題もあり、長期哺乳の実現は容易ではない。このためわが国の養豚には、早期離乳しても弊害が出にくい養豚システムの構築が求められており、そのためには早期離乳に耐えうる免疫系をできるだけ早く仔豚に構築させる必要がある。免疫系構築の鍵は「初乳からの十分な移行免疫」にあると考えられるが、初乳中のタンパク質以外の免疫成分「エキソソーム (細胞外小胞)」と「免疫細胞」については重要性が示唆されるのみで、研究が進んでいない。

## 2. 研究の目的

本研究は、「エキソソーム」及び「免疫細胞」に焦点を当て、これらの成分や移行成分としての役割を解明することを目的とした。移行免疫の機序・役割を更に詳細に解明することで、新たな養豚システム構築へ向けた基盤情報とすることを目指す。

## 3. 研究の方法

### 3-1. エキソソームのプロテオーム解析

母豚 2 頭から初乳 (分娩時) と常乳 (分娩後 21 日) を採取した。それぞれからエキソソームを市販のキットで単離し、LC-MS/MS によるプロテオーム解析を行った。

### 3-2. エキソソームの miRNA 解析

母豚 10 頭から初乳を採取し、市販のキットでエキソソームを単離し、濃度を測定した。その後 miRNA を抽出し、リアルタイム PCR によって既報 (Gu *et al.*, 2012) から選抜した 5 つの miRNA の定量を行った。

### 3-3. エキソソームによる仔豚血中 T 細胞の分化・増殖促進効果の検証

*In vitro* で初乳中エキソソームと仔豚の末梢血単核球 (PBMC) の共培養試験 (試験 1 から 3) を行った。試験 1 では母豚 7 頭分の初乳中エキソソームと仔豚 13 頭分の PBMC を使用し、計 28 通りの組み合わせで共培養を行った。共培養後、フローサイトメトリー解析により、T 細胞の割合を測定した。試験 2 では PBMC にエンドサイトーシス阻害剤 (ダイナミン) を処理した後、共培養、フローサイトメトリー解析を実施した。試験 3 では通常の共培養後の培養上清を試料とし、既報から選抜した細胞傷害性 T (Tc) 細胞の活性化や増殖に関する 3 つのサイトカインの濃度測定を行った。

### 3-4. SLA (主要組織適合遺伝子複合体) 遺伝子を対象とした次世代シーケンス解析

初乳、母豚及び種豚の毛根、仔豚の毛根から抽出した RNA を SLA 特異的プライマーセットで増幅し、次世代シーケンサー MiSeq によるアンプリコンシーケンスを行った。これにより次世代シーケンサーを用いた母子、父子判別の分析技術を構築し、さらに初乳摂取後の仔豚の血液、臓器中の SLA 解析を行った。

### 3-5. トランスジェニックブタを用いた初乳摂取試験

赤色蛍光タンパク (クサビラオレンジ) 遺伝子を導入されたトランスジェニックブタの初乳を野生型の仔豚に摂取させ 1 日齢の仔ブタの血液及び臓器 (空腸、回腸、肝臓、脾臓、腸管膜リンパ節) を採取した。フローサイトメトリー解析により、血液及び臓器中の細胞の蛍光値を測定した。また同サンプルを市販抗体 (抗ブタ CD3, CD4, CD8, CD21 抗体) で染色し、フローサイトメトリー解析に供した。

### 3-6. 初乳が仔豚の組織発達に及ぼす影響の検証

出生直後の仔豚を初乳摂取群と非摂取群にわけ (各群 12 頭)、それぞれに初乳または人工乳を生後 24 時間摂取させた。生後 24 時間で解剖を行い、小腸を採取し、重量を測定した。ホルマリン固定した後、HE 染色標本作製し、光学顕微鏡下で絨毛高の測定及び組織形態学的な評価を行った。

## 4. 研究成果

### 4-1. エキソソームの成分と機能

#### 4-1-1. プロテオーム解析

初乳からは 177 種、常乳からは 142 種のタンパク質が同定された。これらのうち、127 種は初乳、常乳で共通して検出された。初乳のみで検出、または初乳で常乳より顕著に多く検出されたタンパク質には Acute phase proteins (APPs) に分類されるものが多く、これらは自然免疫系の液性因子であり、病原体の直接的な排除に寄与する。またレクチンであるフィコリン 2 も初乳のみで検出されており、これも自然免疫系の液性因子である。これらの結果から、初乳中のエキソソームには自然免疫系の液性因子が多く含まれることが示唆され

た。初乳中エクソソームは初乳の大きな役割の一つである、仔豚の初期感染防御において、重要な要素であると考えられる。

#### 4-1-2. miRNA 解析

産歴に関係なく、初乳中のエクソソーム濃度は個体によって異なることがわかった (図 1)。一方、定量した 5 つの miRNA の構成はいずれの個体でも類似しており、miR30a-5p 及び miR30d-5p が全ての個体の初乳中エクソソームにも多く含まれていた (図 2)。これらの miRNA はヒトで抗炎症性サイトカインの IL-10 の合成を促し、免疫抑制機能をもつことが報告されている (Gaziel-Sovran *et al.*, 2011)。

初乳中エクソソーム濃度と同様に miRNA 濃度は母豚間で個体差が大きく、最も差が大きく表れた miR148a-3p では約 100 倍の濃度差が確認された。しかしながら、初乳中エクソソーム濃度と miRNA 濃度には相関関係が全く認められなかったことから、初乳中に含まれるエクソソーム量と miRNA 濃度といった質の個体差は必ずしも連動しないことが示唆された。

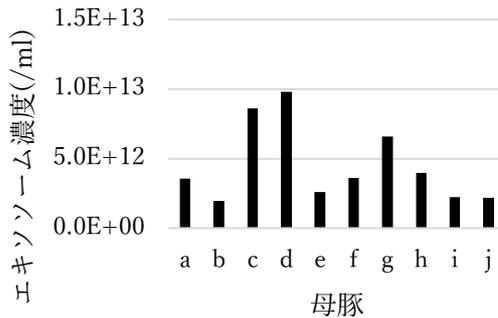


図 1. 初乳中のエクソソーム濃度

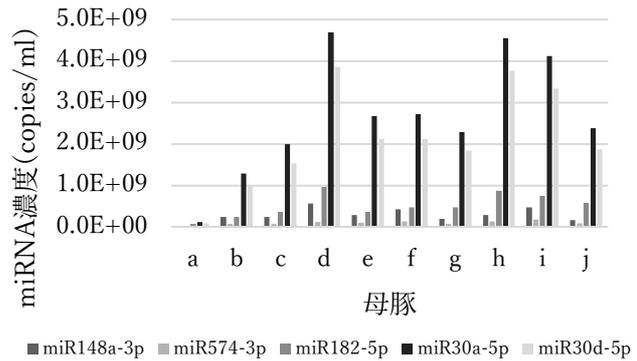


図 2. 初乳中エクソソームの miRNA 濃度

#### 4-1-3. エクソソームによる仔豚血中 T 細胞の分化・増殖促進効果の検証

試験 1: エクソソームを添加した 20/28 処理区で Tc 細胞の割合が増加したため (図 3)、初乳中エクソソームは仔豚の Tc 細胞の分化または増殖を促進することがわかった。

試験 2: 試験 1 で Tc 細胞の割合が増加した処理区のうち 8 処理区でエンドサイトーシス阻害剤の処理後、共培養を行った。その結果、全ての処理区で阻害剤処理により Tc 細胞の分化・増殖促進効果は消失した (図 4)。このことから、エクソソームが Tc 細胞の分化・増殖を促進するためには、エクソソームがエンドサイトーシスを介して受容細胞へ取り込まれる必要があることが示唆された。

試験 3: エクソソーム添加により 3 つのうち 1 つのサイトカインの培養上清中の濃度が増加することがわかった。このサイトカインは Tc 細胞の増殖・成熟を促すサイトカインであるため、エクソソームはある種のサイトカインの産生を誘導し Tc 細胞の増殖を促進すると推察される。

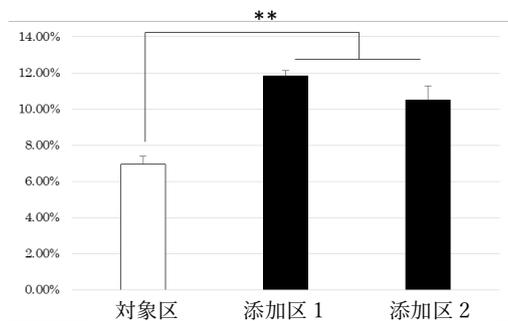


図 3. エクソソーム添加時の Tc 細胞の割合

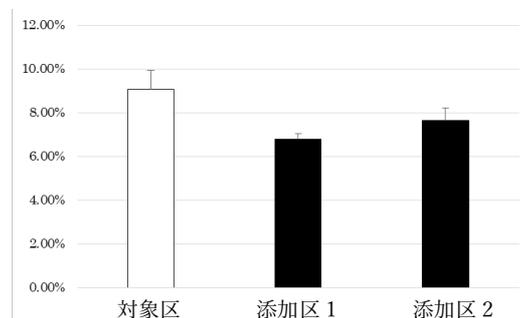


図 4. 阻害剤処理時の Tc 細胞の割合

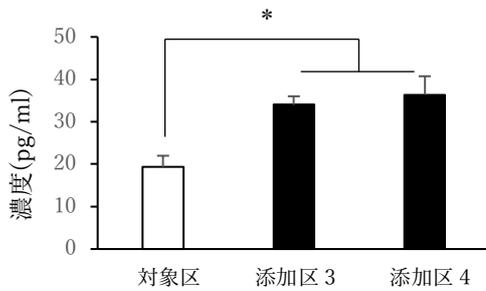


図 5. 測定した 3 つのうち 1 つのサイトカインの培養上清中濃度

#### 4-2. 初乳による仔豚への細胞移行の検証

##### 4-2-1. SLA 遺伝子を対象とした次世代シーケンス解析

初乳、母豚の毛根からは同じ 2 つの SLA 型が、種豚からは母豚とは異なる 2 つの SLA 型が検出され、仔豚は母豚、種豚のいずれかの SLA 型を 1 つずつ継承していることがわかった。これは遺伝学的なセオリーに反せず、これにより次世代シーケンサーを用いた母子、父子判別の分析技術が構築できた。また初乳摂取後の仔豚の血液、臓器中の SLA 解析の結果、仔豚血液または臓器から検出された SLA は仔豚のものと同じ（母豚のもつ SLA のひとつ、種豚の SLA のひとつのみ）であり、母豚由来の初乳細胞がもつと考えられる母豚型の SLA の存在は確認できなかった。

##### 4-2-2. トランスジェニックブタを用いた初乳摂取試験

回腸と脾臓での蛍光をもつ細胞が確認され（図 6）、初乳中細胞が仔豚へ移行することが示唆された。しかしながら蛍光タンパク質（クサビラオレンジ）の蛍光強度が強く、市販抗体の蛍光を検出することが困難であったため、移行細胞の細胞種は特定できなかった。

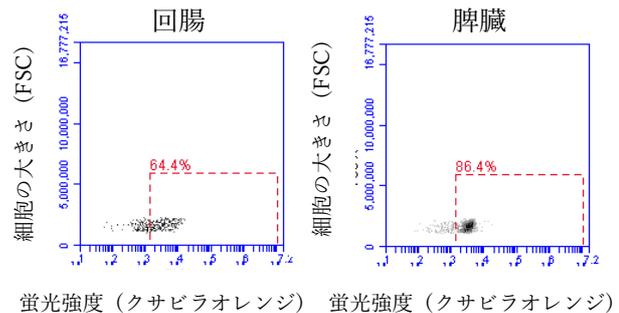


図 6. 蛍光タンパク発現細胞の検出

##### 4-3. 初乳が仔豚の組織発達へ及ぼす影響の検証

生後 24 時間の初乳摂取により小腸重量が増加し、絨毛が著しく伸長することがわかった（図 7）。最も顕著な部位の絨毛は非摂取群の仔豚の 2 倍以上に伸長したことから、初乳により餌の消化・吸収効率は上がると考えられる。ブタによって離乳時の餌の変化による絨毛委縮は健全成育の妨げとなるため、初乳による絨毛伸長効果は健全離乳への重要な要素となり得る。

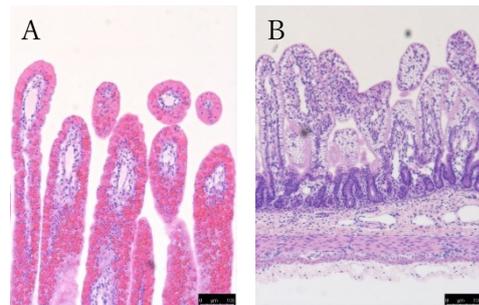


図 7. 仔豚の小腸絨毛（スケールバー: 100  $\mu$ m）  
初乳摂取群 (A)、非摂取群 (B)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okutani, M. Tsukaharam T. Kato, Y. Fukuta, K. Inoue, R.	4. 巻 89
2. 論文標題 Gene expression profiles of CD4/CD8 double-positive T cells in porcine peripheral blood.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 979-987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/asj.13021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神保いつき、前田真知、川崎浄教、井上亮
2. 発表標題 ブタ初乳中エキソソームが仔豚血中T細胞に与える影響
3. 学会等名 日本畜産学会125回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田真知、河田祐樹、小林良奈、田井翔也、玉置竜士、神保いつき、瓜生遥、森島爽、山下大河、塚原隆充、井上亮
2. 発表標題 生後24時間の初乳摂取が仔豚の小腸の組織形態に及ぼす影響
3. 学会等名 日本畜産学会125回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田真知、河田祐樹、小林良奈、田井翔也、玉置竜士、今井田耀、神保いつき、井上亮
2. 発表標題 生後24時間の初乳摂取が仔ブタの発達に及ぼす影響
3. 学会等名 日本畜産学会124回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	尾関 基行  (Ozeki Motoyuki)  (10402744)	武庫川女子大学・生活環境学部・講師   (34517)	
研究 分担 者	川崎 浄教  (Kawasaki Kiyonori)  (30739206)	香川大学・農学部・助教   (16201)	