

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07731

研究課題名(和文)ウシの黄色ブドウ球菌性乳房炎の慢性化におけるCXCL8の持続的放出の役割

研究課題名(英文) Role of prolonged release of CXCL8 during bovine mastitis caused by intramammary infection of *Staphylococcus aureus*

研究代表者

渡部 淳 (Watanabe, Atsushi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・上級研究員

研究者番号：60442810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌性乳房炎が慢性化する過程で観察されるケモカインCXCL8の持続的放出について、ウシ乳腺上皮細胞におけるCXCL8の発現は主に黄色ブドウ球菌リポテイコ酸等によって誘発され、ラクトフェリンのエラスターゼ分解産物である催炎性ラクトフェリン由来ペプチドもCXCL8発現に部分的に関与することが示唆された。また同乳房炎においてCXCL8同様に持続的に放出される好中球エラスターゼは好中球の細胞死に伴って放出され、その細胞死には壊死や好中球細胞外トラップ形成が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：On the prolonged release of chemokine CXCL8 during *Staphylococcus aureus* mastitis, it was suggested that expression of CXCL8 in bovine mammary epithelial cell is mainly induced by stimulation with lipoteichoic acid of *Staphylococcus aureus* and inflammatory lactoferrin-derived peptides (released from lactoferrin digested with elastase) is partially involved in the induction of CXCL8. On the prolonged release of neutrophil elastase in the *Staphylococcal* mastitis, the enzyme is released from the neutrophil which died by necrosis or by formation of neutrophil extracellular traps.

研究分野：獣医生化学

キーワード：獣医学 畜産学 乳房炎 黄色ブドウ球菌 好中球

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳房炎は酪農経営に大きな経済的被害を与える疾病であり、黄色ブドウ球菌は主要な乳房炎起因菌の一つである。ウシの黄色ブドウ球菌性乳房炎は慢性化しやすく、慢性化すると、その治療はきわめて困難となる。

(2) 乳房炎原因菌新規感染の機会は乾乳期初期と産後期に多く、分娩後に発症する乳房炎の多くは乾乳期における感染に引き続いて起きると考えられる。

(3) 研究代表者らは乳頭槽内に黄色ブドウ球菌を接種して実験的に乾乳期乳房炎を誘発し、潜在期、急性期、亜急性期を経て慢性乳房炎に至る病態モデルを作出した。

慢性期においても菌の乳汁中への排出は続くが、乳腺組織では病理学的に炎症の収束および損傷部位修復の組織像が観察された。乳中の凝集物には多数の死滅した好中球が含まれていることを観察した。

(4) 活性化した好中球はアポトーシスとは異なる機構で能動的に細胞死を起し、核DNAを放出する。放出されたDNAは繊維状の部分と瘤状の部位(球形領域)をもって網状に広がり、細菌を捕捉するトラップとなる。またDNAと共に放出されたヒストンや好中球エラスターゼは殺菌作用を持つ(好中球細胞外トラップ)。

Science 303, 1532-1535 (2006)

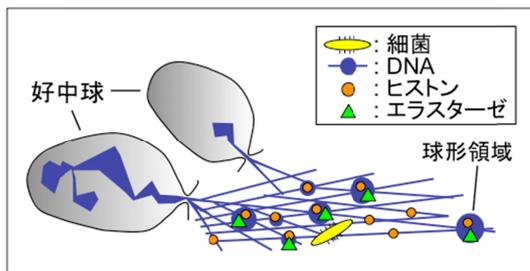


図1. 好中球細胞外トラップ (模式図)

(5) 好中球エラスターゼはラクトフェリンを分解し、乳腺上皮細胞におけるCXCL8の発現を誘導する催炎性ラクトフェリン由来ペプチドを放出させる。

J. Vet. Med. Sci. 68, 715-723 (2006)

(6) 研究代表者らはケモカインCXCL8および好中球エラスターゼの放出を伴う炎症の増幅(好中球エラスターゼ介在性炎症増幅機構)がウシ乾乳期乳房炎の病態の発現に重要であることを示唆した。

Can. J. Vet. Res. 72, 291-296 (2008)

Vet. Med. Int. 2012, Article ID 172072 (2012)

ウシ組換えCXCL8の乳槽内投与は好中球の浸潤に加え、乳タンパク質の分泌抑制、血液-乳バリア透過性亢進および細胞外基質タンパク質分解酵素を誘導し、組織障害を起こしうることを示した。

CXCL8を乳槽内に投与し、乾乳期のウシに乳房炎原因菌フリーの乳房炎を実験的に誘発したところ、好中球の著増、凝集物出現、好中球エラスターゼ活性上昇、CXCL8および催炎性ラクトフェリン由来ペプチドの出現を認めた。この状況は乳房炎発症後1週間持続した。

以上の背景を基に、黄色ブドウ球菌性乾乳期乳房炎の慢性化には好中球介在性炎症増幅機構(持続的な好中球エラスターゼおよびCXCL8の放出)が関わることを想定した。

感染(炎症) CXCL8濃度増加

好中球の浸潤・活性化

好中球エラスターゼ放出

ラクトフェリンの分解

催炎性ラクトフェリン由来ペプチドの放出

乳腺上皮細胞からのCXCL8の放出

(第2のサイクルへ)

(第3のサイクルへ)

(第nのサイクルへ)

((慢性化、難治性乳房炎)))

2. 研究の目的

本研究は連鎖的なCXCL8および好中球エラスターゼの持続的放出が黄色ブドウ球菌性乳房炎の慢性化に関与することを検証し、それらの持続的放出が起きる機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 黄色ブドウ球菌性乾乳期乳房炎における乳中凝集物および乳腺組織の採取

ホルスタイン乳牛(4~6歳齢)の乾乳時に黄色ブドウ球菌(65-80コロニー形成単位/5ml生理食塩水)を接種(反対側の対照乳房には生理食塩水のみを注入)して誘発した乳房炎の乳汁および乳中凝集物を採取した。また試験終了時(乳房炎発症後20日目)に乳腺組織を採取した。

乳房炎の発症およびその状態は、乳房の視診・触診、乳の色調および凝集物の有無、対細胞数の計測、細菌数計測および分離菌の同定によって診断した。

(2) 病理学検査および組織化学的試験

採取した乳中凝集物および乳腺組織(対照

分房および乳房炎分房)を材料に凍結およびパラフィン切片を調製した。

パラフィン包埋切片をヘマトキシリン-エオジン染色した乳腺組織の標本を顕微鏡観察し、乳房炎の炎症フェーズを診断した。

乳腺組織および乳中凝集物の切片について、核 DNA を蛍光色素で染色し、黄色ブドウ球菌菌体およびヒストン(H1, H2B および H3)を間接蛍光抗体法で多重染色した。アポトーシスを起こした細胞は抗活性型カスパーゼ 3 抗体を用いた免疫組織化学的染色により検出した。

(3) 脱脂乳中のエラスターゼ活性および CXCL8 濃度の測定

採取した乳を遠心して脂肪球と体細胞を除去し、脱脂乳を調製した。脱脂乳中のエラスターゼ活性はザイモグラフィーで測定し、CXCL8 濃度は ELISA により測定した。

(4) ウシ乳腺上皮細胞における CXCL8 およびその mRNA の発現

無血清培地に順化したウシ乳腺上皮細胞(90-95% コンフルエント)に合成催炎性ラクトフェリン由来ペプチド(100 μM)あるいは黄色ブドウ球菌リポテイコ酸(1 μg/ml)を添加し、4 および 24 時間後の培養液および細胞を回収した。

培養液中の CXCL8 濃度を ELISA で測定し、細胞溶解液(LIPA 溶解緩衝液で調製)中の CXCL8 を免疫プロット法で検出した。

CXCL8 mRNA を RT-PCR で検出し、グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素(GAPDH)mRNA の RT-PCR 産物との比較による半定量を行った。



図 2. 合成催炎性ラクトフェリン由来ペプチド

(5) サイトカイン刺激によるウシ好中球の特殊顆粒内物質およびアズール顆粒内物質の放出

ホルスタイン乳牛の抹消血液より分離した好中球を Ca²⁺を含むハンクス液に懸濁し、CXCL8 あるいは顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を添加して 1 時間反応させた後、遠心分離によって細胞と反応液を分けた。反応前の好中球を界面活性剤(0.2% Triton-X100)で溶解して遠心分離し、抽出液を得た。

反応液および抽出液中のラクトフェリン(特殊顆粒内物質)濃度およびエラスターゼ(アズール顆粒内物質)活性をそれぞれ、免疫プロット法およびザイモグラフィーで測定した(それぞれ抽出液中の濃度および活性に対する比として計算した)。

(6) 催炎性ラクトフェリン由来ペプチドが

結合する乳腺上皮細胞上のタンパク質の探索

FLAG 配列をアミノ末端側に付加した催炎性ラクトフェリン由来ペプチド(FLAG-LDP)を合成した。90-95% コンフルエントのウシ乳腺上皮培養細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、ウシ血清アルブミン(0.1%, w/v)および架橋剤 bis [sulfosuccinimidyl] suberate (5 mM) 存在下、FLAG-LDP (100 μg/ml) と氷上で 2 時間反応させた。反応を停止させた後、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄することにより未反応の FLAG-LDP を除去し、細胞溶解液を調製した。

ウシ乳腺上皮細胞の溶解液について、抗 FLAG モノクローナル抗体を用いた免疫プロット法により、FLAG-LDP が架橋されたバンドを検出した。

4. 研究成果

(1) ウシの黄色ブドウ球菌性乾乳期乳房炎病態モデルにおける乳中凝集物中の好中球細胞死

ウシの黄色ブドウ球菌性乾乳期乳房炎における好中球細胞死の実態を把握する目的で、好中球が多数含まれる乳中凝集物における細胞外トラップ形成およびアポトーシス陽性細胞を組織化学的方法で観察した。

黄色ブドウ球菌を接種した分房では全例において、接種 1~2 日目より乳房の腫脹、乳中対細胞数の増加、黄色ブドウ球菌の乳中への排菌が起きた(臨床型乳房炎発症)。これらは試験終了時まで続いた。

乳中凝集物は臨床型乳房炎発症後 3~6 日目より観察され始め、その後、試験終了時まで観察された。乳中凝集物中には多数の好中球が含まれ、日数の経過とともに核の消失を伴う死滅した好中球の割合が増えていき、発症後 20 日目にはほとんどの好中球が核の消失を伴う細胞死の像を示していた。

間接蛍光抗体法による観察によって、核 DNA が微細な繊維状あるいは網目状になった部位に粒子状にヒストンタンパク質が局在する部位(細胞外トラップ構造)が散在しており、黄色ブドウ球菌の多くはヒストンタンパク質が局在する部位に観察された。こうした部位は発症後 6~9 日目をピークに実験終了時まで見られた。活性型カスパーゼ 3 陽性細胞は少数がまばらにみられ、その観察される数は乳房炎発症後の経過日数と関連性がなかった。

以上の結果から、乳中凝集物中には死滅した好中球が多数含まれ、その細胞死は壊死に加えて細胞外トラップ形成が関わることが示唆された。

(2) ウシの黄色ブドウ球菌性乾乳期乳房炎

病態モデルにおける好中球エラストラーゼ活性および CXCL8 濃度

ウシの黄色ブドウ球菌性乳房炎の慢性化過程における CXCL8 および好中球エラストラーゼの持続的放出を確認するため、同菌による乾乳期乳房炎病態モデルにおける乳中の CXCL8 濃度および好中球エラストラーゼ活性の動態を調べた。

黄色ブドウ球菌接種乳房における乳中の CXCL8 濃度および好中球エラストラーゼ活性の著増は臨床型乳房炎発症後 3～6 日目より観察され始め、試験終了時まで続いた。

以上の結果から、CXCL8 および好中球エラストラーゼは同乳房炎の亜急性期～慢性期の病態に関与することが示唆された。

(3) 催炎性ラクトフェリン由来ペプチドによるウシ乳腺上皮細胞における CXCL8 の発現誘導 (黄色ブドウ球菌リポテイコ酸との比較)

催炎性ラクトフェリン由来ペプチドが黄色ブドウ球菌性乳房炎における CXCL8 の持続的放出にどの程度関わっているかを知る目的で、催炎性ラクトフェリン由来ペプチドおよび黄色ブドウ球菌リポテイコ酸 (黄色ブドウ球菌の主要な催炎性因子) でウシ乳腺上皮細胞を刺激し、CXCL8 およびその mRNA の発現を調べた。

催炎性ラクトフェリン由来ペプチドおよび黄色ブドウ球菌リポテイコ酸の培養液中への添加により、添加 24 時間後のウシ乳腺上皮細胞溶解液中に CXCL8 の発現が認められた (無添加対照では検出されず)。免疫ブロット法で検出されたバンドは黄色ブドウ球菌リポテイコ酸で刺激した場合に濃かった。

CXCL8 mRNA 発現相対量は催炎性ラクトフェリン由来ペプチド添加後 4 時間目で無添加対照の 2.5 倍、24 時間目で 2 倍程度であった。黄色ブドウ球菌リポテイコ酸で刺激した場合は、添加後 4 時間目で無添加対照の 7 倍、24 時間目で 3.5 倍であった。無添加対照では 4 時間目および 24 時間目の発現量に違いはみられなかった。

以上の結果から、黄色ブドウ球菌性乳房炎における CXCL8 の持続的増加には主に、リポテイコ酸等の黄色ブドウ球菌由来の因子が関わり、催炎性ラクトフェリン由来ペプチドも部分的に関与することが示唆された。

(4) CXCL8 および顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子による好中球エラストラーゼの放出

アズール顆粒内物質であるエラストラーゼ

は細胞外に放出されないと考えられるが、好中球を活性化するサイトカインによって放出されることはないかどうかを確認する目的で、CXCL8 および顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子で好中球を刺激し、細胞外へのラクトフェリン (特殊顆粒内物質) およびエラストラーゼ (アズール顆粒内物質) の放出を調べた。

CXCL8 および顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子で刺激した場合、どちらも総量の 10% 程度のラクトフェリンが細胞外に放出されたが、明らかなエラストラーゼの放出はみられなかった。

以上の結果から、好中球エラストラーゼの細胞外への放出に CXCL8 や顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子は直接関わっていないことが明らかとなった。好中球エラストラーゼの細胞外への放出は細胞死に伴うものと推察された。

(5) 催炎性ラクトフェリンが結合するウシ乳腺上皮細胞表面タンパク質の探索

催炎性ラクトフェリン由来ペプチドはウシ乳腺上皮細胞における CXCL8 の放出に関与することが示唆されるが、同ペプチドによる乳腺上皮 CXCL8 発現誘導機序を解明する端緒として、同ペプチドが結合するウシ乳腺上皮細胞表面のタンパク質を探索した。

FLAG 配列を付した催炎性ラクトフェリン由来ペプチド (FLAG-LDP) をウシ乳腺上皮培養細胞に反応させて架橋した試料を免疫ブロット法で解析したところ、74 kDa および 29 kDa の位置に抗 FLAG モノクローナル抗体が認識するバンドが得られた。

以上の結果は乳腺上皮細胞上に催炎性ラクトフェリン由来ペプチド受容体が存在する可能性を示す。しかし、結合した物質は未同定であり、リガンド-受容体の結合によるものかどうかは未確定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Watanabe, A., Hata, E., Slama, P., Kimura, K. and Hirai, T. Characteristics of mammary secretions from Holstein cows at approximately 10 days before parturition: with or without intramammary infection, *J. Appl. Anim. Res.*, 査読有, 46 巻, 2018, 604-608

Kiku, Y., Nagasawa, Y., Tanabe, F., Sugawara, K., Watanabe, A., Hata, E., Ozawa, T., Nakajima, K.I., Arai, T. and

Hayashi, T. The cell wall component lipoteichoic acid of *Staphylococcus aureus* induce chemokine gene expression in bovine mammary epithelial cells, J. Vet. Med. Sci., 査読有, 78 巻, 2017, 1505-1510

〔学会発表〕(計 4 件)

Watanabe, A., Hata, E., Slama, P. and Kimura, K. Effect of intramammary infection on serum albumin, IgG₁ and IgG₂ levels in mammary secretions from dairy cows at 9-12 days before calving. NMC Milano 2018 (The 2018 international Bovine Mastitis Conference). 2018 年 6 月 11-13 日, ミラノ, イタリア

Watanabe, A., Hirai, T. and Hata, E. Characteristics of mastitic mammary secretions from Holstein cow at 8-12 days before parturition, The 29th World Buiatrics Congress (2016), 2016 年 7 月 3-8 日, ダブリン, アイルランド

Slama, P., Sladel, Z., Kabourkova, E., Havlicek, Z., Watanabe, A. and Kwak, J.Y. Lymphocyte apoptosis and CD44 expression during inflammatory response of bovine mammary gland induced by lipopolysaccharide, 4th European Congress of Immunology, 2015 年 9 月 6-9 日, ウィーン, オーストリア

Watanabe, A., Hata, E., Slama, P., Kadota, K., Chikayama, Y., Ishikawa, Y. and Kimura, K. Possible involvement of neutrophil elastase and inflammatory lactoferrin-derived peptides in the development of bovine mastitis induced by intramammary infusion of *Staphylococcus aureus* in the early dry period, The Congress on Controversies & Consensus in Bovine Health, Industry & Economics, 2015 年 8 月 27-30 日, ベルリン, ドイツ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 淳 (WATANABE ATSUSHI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・上級研究員
研究者番号：60442810

(3) 連携研究者

木村 和弘 (KIMURA KAZUHIRO)

国立大学法人北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：30192561

木村 享史 (KIMURA TAKASHI)

国立大学法人北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：90261338

秦 英司 (HATA EIJI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・上級研究員

研究者番号：50355153

中島 恵一 (NAKAJIMA KEI-ICHI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・上級研究員

研究者番号：70362150

林 智人 (HAYASHI TOMOHITO)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・上級研究員

研究者番号：90297630