

令和元年6月13日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07749

研究課題名(和文)ウシ乳腺組織におけるマイコプラズマの高度免疫回避機能に関する細胞生物学的研究

研究課題名(英文) A cell biological approach to immune escape mechanism of Mycoplasma in bovine mammary tissue

研究代表者

樋口 豪紀 (Higuchi, Hidetoshi)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：00305905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：M. bovisの高度免疫回避機構の解明を試みた。ウシ乳腺感染培養モデルの構築を行った。好中球のCL反応はMOI依存性に有意な上昇が確認された。PMAによって誘導される好中球のNET形成能はM. bovisの添加によって著しく阻害されることが明らかになった。M. bovisを好中球に添加することにより、対照群ではMOIの増加に伴ってアポトーシスが誘導された。この時、好中球のcaspase-3および9のmRNA発現量の増加が認められた。ウシ乳腺感染培養モデルにより、M. bovisに暴露された好中球およびリンパ球との培養により乳腺上皮細胞にアポトーシスが誘導された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイコプラズマは多くの動物種において慢性・持続性の感染症を惹起し、それらは難治性疾患へと移行することが獣医学領域において広く注目されている。本研究では、マイコプラズマが免疫担当細胞の機能的側面への影響や細胞死に及ぼす影響を調べるとともに、乳腺感染モデルを用い乳腺上皮細胞への影響について検討した。その結果、マイコプラズマが高度に免疫担当細胞や乳腺上皮細胞の機能を制御し、自身の生存にとって有利な環境を構築していることが明らかになった(長期生存戦略)。今後、ワクチンや抗菌性薬剤等、これらの知見を基盤とした先制的な本病制圧技術の構築が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified immune avoidance mechanism of Mycoplasma bovis in cow. 1 We established bovine mammary tissue model by using Mammary Epithelial Cells. 2 Chemiluminescent response of neutrophils stimulated with M. bovis is increased depend on MOI. 3 Neutrophil Extracellular Traps (NETs) formation of neutrophil stimulated with PMA is strongly inhibited by M. bovis. 4 Apoptosis of neutrophils is induced by M. bovis depend on MOI, and increase of mRNA expression of Caspase 3 and 9 are detected. 5 Apoptosis of mammary epithelial cells are induced in bovine mammary tissue model co-cultured with neutrophils or lymphocytes stimulated with M. bovis.

研究分野：獣医衛生学

キーワード：マイコプラズマ ウシ 乳房炎

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

### 1. 研究開始当初の背景

マイコプラズマとウシ乳腺感染症：マイコプラズマによるウシ乳腺感染症の発生率は2008年頃より世界的に急増し日本の酪農地域でも本感染症による被害額が1酪農家で1億円に達する事例も報告されている。原因菌種は *M. bovis* であり高い病原性と強い伝染性を有することが特徴である。乳腺感染が成立すると強い臨床症状が誘導され、不可逆的な乳腺機能不全（泌乳停止）に至る。有効な治療および予防技術も未だ構築されていない。

申請課題の着想：*M. bovis* の長期生存戦略における免疫回避機構の発現システムの本質的な機構解明にあつては「微生物(*M. bovis*)」、「乳腺上皮細胞」および「白血球」の相互関連性を保ちながら網羅的にこれらを解析する培養技術が必要である。申請者らは2006-2008年基盤研究C(申請代表)/2009-2011年基盤研究C(申請代表)で三次元乳腺感染培養モデルの樹立に成功しその応用段階に入っている。本申請課題は発展型研究であり、その解析手段は新たな学術知見の構築を担保し得るものである。

### 2. 研究の目的

マイコプラズマは多くの動物種において慢性・持続性の感染症を惹起し、それらは難治性疾患へと移行することが獣医学領域において広く注目されている。マイコプラズマは長い進化の過程で自身のゲノムサイズと生物学的機能を極限まで退化(退行性進化)させ、宿主動物への機能的依存性を高めた。これらは生体におけるマイコプラズマの長期生存戦略の一端を担うとされるが、宿主免疫応答に関する研究知見は乏しく、その本質を解明するには至っていない。本研究では、人類にとって重要な生物資源であるウシに対し極めて重篤な感染症を引き起こすマイコプラズマ種(*Mycoplasma bovis*: *M. bovis*)に着目し、長期生存戦略に関わる機能的特性、すなわち *M. bovis* の免疫回避機構を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) *M. bovis* 株の分離および同定

*M. bovis* (PG45 標準株 1株)：基準菌株を使用

*M. bovis* (ウシ乳房炎由来株 40株)：乳房炎乳汁より分離および Cloning

）被検乳汁を液体培地に量接種

）37℃で24-48時間の増菌培養を実施

）マイコプラズマ用平板培地に規定量塗布

）出現したコロニーを単離し、再度マイコプラズマ用液体培地に接種

）PCR およびシークエンスにより *M. bovis* 同定および保存

#### (2) 三次元ウシ乳腺感染培養モデルにおける *M. bovis* の抗原性変化に関する分析

乳腺上皮細胞の分離および培養および三次元ウシ乳腺感染培養モデルの構築

）ホルスタイン種乳牛由来正常乳腺組織を無菌的に生体より分離する。

）トリプシンおよびコラゲナーゼ処理により乳腺上皮細胞を分離(Nakajima, K. et. al. 2008. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72:1103-1106)。

）トランスウェル下段にマトリジェル(コラーゲン)を調製しゲル内に乳腺上皮細胞を三次元構築する。

）乳汁分泌能の発現を目的とした立体構造の構築を図る。

）トランスウェル上段に免疫担当細胞(好中球とマクロファージ...分離は2)に記載)をそれぞれ生着させ培養を継続する。

白血球分離および培養(Higuchi, et. al., 1997. *Can. J. Vet. Res.* 59: 271-276)

）既報に準じて実施

三次元ウシ乳腺感染培養モデルにおける *M. bovis* の培養

本培養系の上部液相に *M. bovis* を MOI (細胞および微生物比率) 1~1000 の菌数を接種し培養。

#### (3) 好中球および PBMC の培養および回収

好中球：10%FBS 加 RPMI を添加した 40 mm のシャーレ(TPP, Trasadingen, スイス)に細胞浮遊液を  $4 \times 10^6$  cells/well で播種した。その後 *M. bovis* 生菌を Multiplicity of infection(MOI) 10、100 および 1000 で添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下で3時間培養した。最終液量は 1.5ml となるよう調整し、*M. bovis* 非添加を control とした。培養後、10%FBS 加 RPMI でシャーレを洗浄後、終濃度 20 $\mu$ M となるように STS を添加(STS 添加群)、対照には等量の DMSO を添加(対照群)し6時間培養した。

PBMC：10%FBS 加 RPMI を添加した 40 mm のシャーレ(TPP, Trasadingen, スイス)に細胞浮遊液を  $4 \times 10^6$  cells/well で播種した。その後 *M. bovis* 生菌 MOI 10、100 および 1000 で添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下で18時間培養した。最終液量は 1.5ml となるよう調整し、*M. bovis* 非添加を control とした。培養後、10%FBS 加 RPMI でシャーレを洗浄後、終濃度 20 $\mu$ M となるように STS を添加(STS 添加群)、対照には等量の DMSO を添加(対照群)し6時間培養した。

(4) 好中球およびPBMCの細胞生存率、アポトーシスおよびcaspase活性の測定  
培養後の好中球およびPBMCの細胞生存率をMuse™ Count & Viability、アポトーシスを Muse Annexin and Dead Cell Kit および caspase 活性を Muse MultiCaspase Kit を用いて Muse Cell Analyzer (Muse : メルク株式会社、東京)にて測定した。

#### (5) Total RNA 抽出

回収したウシ好中球およびPBMCから、Total RNA purification Kit (Jena Bioscience GmbH, ドイツ)にて total RNA (tRNA) を抽出し、TURBO DNA-free (RNA Free DNase Set, Qiagen, Duesseldorf, ドイツ)にて 37 °C で 90 分反応させ脱 DNA 処理を行った。その後、液量の 10 分の 1 量の 3M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍量の 100% エタノールを添加し、軽く混和した後 15,000rpm で 25 分間遠心した。上清を捨て 70% エタノールを加えて軽く混和した後再び 15,000rpm で 5 分間遠心した。上清を除去して真空乾燥後、RNA free 超純水により抽出した。

#### (6) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

抽出した好中球の tRNA 80ng および PBMC の tRNA 140ng を使用し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (東洋紡、大阪)の Kit を用いて各々に 5×RT Master Mix 2μl、超純水を加え 10μl としたものを RT(+)とした。5×RT Master Mix の代わりに、5×RT Master Mix no-RT Control を加え 10μl としたものを RT(-)とし、37 °C 15 分、50 °C 5 分、98 °C 5 分加熱し cDNA 化した。20μl の超純水を加え 3 倍希釈し、全量を 30μl にした。各サンプルの cDNA 1μl を使用し、-actin プライマー および Taq DNA polymerase (NEB)を用い 94 °C 2 分の熱変性、熱変性 94 °C 30 秒、アニーリング 60 °C 30 秒、伸長反応 72 °C 30 秒で 40 サイクル反応させた。PCR 反応後、Loading Buffer を混合した 10μl の増副産物を 1.5% TAE アガロースゲルで 30 分間電気泳動した。エチジウムブロマイドで 30 分間染色した後、紫外線照射下で RT(+)では増副産物があることを、RT(-)では増副産物が無いことを確認した。

#### (7) Real time-PCR (rt-PCR)

(8) にて逆転写した cDNA を用いた rt-PCR 反応は、THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (東洋紡、大阪)と MyiQ-icycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, アメリカ)を用い使用法に準拠して行った。-actin、14-3-3 protein zeta/delta (YWHAZ)、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、caspase-9 および -3 のプライマーは融解曲線分析を行い、1 つだけの産物が増幅されていることを確認し、また BLAST によりプライマーシークエンスは目的遺伝子のみ増幅していることを確認した。Thermal cycling は初期変性 95 °C 5 分、熱変性 95 °C 15 秒、アニーリング 60 °C 30 秒、伸長反応 72 °C 30 秒で 40 サイクル反応させた。融解曲線分析を用いて PCR 後に、反応液の温度を 55 °C から 0.5 °C ずつ 95 °C まで上昇させ、SYBR Green のシグナルを検出した。各細胞におけるそれぞれの遺伝子のコピー数の発現量は Ct 法を用いて計算され、内部標準遺伝子である -actin、YWHAZ および GAPDH のコピー数より標準化した。本試験で使用したプライマーは表 1 に記載した。

#### (8) 統計処理

Steel 検定を用いて行い、有意水準は 5% 未満 ( $p < 0.05$ ) とした。caspase-3 および 9 の mRNA 発現量の成績は M. bovis および STS 無添加のものを control とし、このサンプルにおける各遺伝子の 2-<sup>Ct</sup> 値を 1 とした各サンプルの相対値+標準誤差で示した。

### 4. 研究成果

#### (1) M. bovis が免疫担当細胞の機能に及ぼす影響

好中球のルミノール依存性化学発光反応は MOI 依存性に有意な上昇が確認された。PMA によって誘導される好中球の NET 形成能は M. bovis の添加によって著しく阻害されることが明らかになった。

リンパ球幼若化反応は M. bovis の添加による有意な変化は認められなかった。

好中球のアポトーシスは M. bovis の添加によって有意に上昇した。

リンパ球のアポトーシスは M. bovis の添加によって有意に低下した。

以上のことより、好中球は M. bovis に対して一定の免疫応答性を示すものの、重要な殺菌系である NETs の形成能は阻害され、さらにアポトーシスも誘導されることが確認された。また、リンパ球では免疫応答能に対する影響は少なく、また、アポトーシスを阻害する可能性も示唆された。以上の結果より、M. bovis はウシ好中球およびリンパ球の免疫応答性を調整し、これらは M. bovis の生存戦略に関連している可能性が示唆された。

#### (2) M. bovis が免疫担当細胞の細胞死に及ぼす影響

好中球に M. bovis を感染した際に、MOI の増加に従って細胞生存率の低下が認められた。

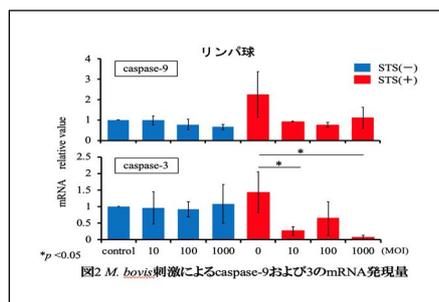
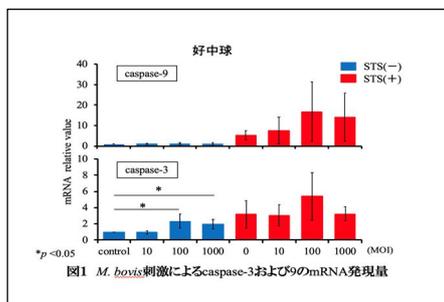
M. bovis を好中球に添加することにより MOI の増加に伴ってアポトーシスが誘導された。

好中球の caspase の活性は M. bovis 刺激により増加することが示された。さらに M. bovis 刺激により好中球の caspase-3 および 9 の mRNA 発現量の増加が認められた。

M. bovis を PBMC に添加したところ、アポトーシスの抑制が認められた。

M. bovis を PBMC に添加したところ caspase-9 および-3 の mRNA 発現量を減少、細胞内の caspase-9 および-3 の蛋白発現量の低下が確認された。

以上のことより、好中球において M. bovis はアポトーシスを誘導することが明らかになった。また、これらの細胞王党派 caspase-9 および-3 の mRNA 発現量を増加による細胞内の caspase-9 および-3 の蛋白発現量増加によるものであることが示された。



### (3) ウシ乳腺感染培養モデルの応答性

ウシ乳腺感染培養モデルにおいて M. bovis に暴露された好中球またはリンパ球との共培養により、乳腺上皮細胞にアポトーシスが確認された。

ウシのマイコプラズマ乳房炎では、正常乳の 10~100 倍の好中球やリンパ球が誘導されること、また、乳腺組織におけるアポトーシスの促進を確認している。本結果は、マイコプラズマ乳房炎における乳腺上皮細胞のアポトーシスの促進およびそれに伴う泌乳量の急激な低下に關与している可能性が示唆された。

以上、本研究の結果よりマイコプラズマが高度に免疫担当細胞や乳腺上皮細胞の機能を制御し、自身の生存にとって有利な環境を構築していることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計6件)

Prevalence and risk factors of Mycoplasma bovis infection in dairy farms in T northern Japan, Kiyokazu Murai, Hidetoshi Higuchi. Res. Vet. Sci. 123: 29-31

Innate immune response of bovine mammary epithelial cells to Mycoplasma bovis. Gondaira, S., Higuchi, H., Iwano H., Nishi, K., Nebu, T., Nakajima, K, and Nagahata, H. J Vet Sci. (2018)

Increase of cells expressing PD-1 and PD-L1 and enhancement of IFN- production via PD-1/PD-L1 blockade in bovine mycoplasmosis. Goto S, Konnai S, Okagawa T, Nishimori A, Maekawa N, Gondaira S, Higuchi H, Koiwa M, Tajima M, Kohara J, Ogasawara S, Kato Y, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immun. Inflamm. Dis. 5: 355-363. (2017)

Mycoplasma bovis isolates from dairy calves in Japan have reduced susceptibility to all approved macrolides, resulting from a point mutation (G748A) combined with multiple species-specific nucleotide alterations in 23S rRNA. Sato T, Higuchi H, Yokota SI, Tamura Y. Microbiol. Immunol. 61: 215-224. (2017)

Mycoplasma bovis escapes bovine neutrophil extracellular traps. Gondaira, S., Higuchi, H., Nishi, K., Iwano, H. and Nagahata, H. Vet. Microbiol. 199: 68-73. (2017)

Cytokine mRNA profiling and the proliferative response of bovine peripheral blood mononuclear cells to Mycoplasma bovis. Gondaira, S, Higuchi, H., Iwano, H., Nakajima, K., Kawai, K., Hashiguchi., S, Konnai, S., Nagahata, H. Vet Immunol Immunopathol. 165: 45-53. (2015).

### 〔学会発表〕(計6件)

日本家畜衛生学会(2018.12.14) Mycoplasma bovis 特異抗原を用いた ELISA 系の構築 ○杉本 侃司・西 航司・藤木純平・岩野英知・権平 智・樋口豪紀

日本マイコプラズマ学会(2017.5.26) ウシマイコプラズマによる全身性感染症 ~ 診断・予防・治療への問題点と解決策へ向けて ~ 樋口豪紀

日本獣医学会(2017.9.13) 牛マイコプラズマ感染症における免疫抑制機序の解明 後藤伸也、今内 覚、岡川朋弘、西森朝美、前川直也、樋口豪紀、小岩政照、田島誉士、小原潤子、加藤幸成、鈴木定彦、村田史郎、大橋和彦

日本獣医学会(2017.9.13) 根室地区におけるマイコプラズマ乳房炎の発生に関する疫学調査 藤本悠理、伊藤弘貴、樋口豪紀、蒔田浩平、大野 浩

日本マイコプラズマ学会(2016.5.24) 獣医学領域で注目されているウシのマイコプラズマ感染症 Bovine mycoplasma infection in veterinary medicine 権平 智・樋口 豪紀・岩野 英

知・永幡 肇

日本家畜感染症学会 (2015.12.4) Mycoplasma bovis かのウシ NETs に対する免疫回避機構  
権平 智、岩野 英知、樋口 豪紀、永幡 肇

〔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：岩野英知

ローマ字氏名：IWANO HIDETOMO

所属研究機関名：酪農学園大学

部局名：獣医学群

職名：教授

研究者番号(8桁): 60382488

研究分担者氏名：鈴木一由

ローマ字氏名：SUZUKI KAZUYUKI

所属研究機関名：酪農学園大学

部局名：獣医学群

職名：教授

研究者番号(8桁): 60382488

### (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。