

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12336

研究課題名(和文) 新生児の免疫機能発達に關与する乳汁中免疫情報伝達物質の探索とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Inquisition of cytokines and chemokines in breast milk involved in the development of immune function in neonate and the elucidation of the mechanism.

研究代表者

茶山 和敏 (Sayama, Kazutoshi)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：30260582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：新生児の免疫機能発達に対する母乳中の免疫情報伝達物質の役割を解明するために、マウス、ヒトおよびウシの母乳中のCCL28、TSLP、IL-7の含有量を経時的に調べた。その結果、いずれの動物種でも、3種の免疫タンパク質が泌乳時期に関係なく含有されていた。また、CCL28とTSLPの経時的な母乳中含有量に強い相関があることが判明した。他方、母乳中CCL28の新生児免疫機能に対する役割を調べるために、人工哺育法及びCCL28ノックアウトマウスを用いて、その免疫学的機能を解析した結果、CCL28は新生児期の胸腺および脾臓の免疫細胞の増殖や分化、あるいは集積に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of cytokines and chemokines in breast milk to the development of immune function in neonate, concentration of CCL28, TSLP and IL-7 in mouse, human and bovine breast milks were analyzed during the lactation period. As a result, the 3 kinds of immune proteins were detected in any lactation periods. Moreover, it was clarified that the level of CCL28 in the milk correlate with the TSLP level during the lactation period. On the other hand, we examined the role of CCL28 in breast milk on the immunological functions in mouse neonate by using artificial feeding experiment used a formula with CCL28 and CCL28 knockout mouse. In consequence, it was indicated that CCL28 might play a very important role to the proliferation, differentiation and accumulation of immune cells in thymus and spleen in mouse neonate.

研究分野：動物機能科学

キーワード：CCL28 IL-7 TSLP 母乳 新生児 免疫機能 胸腺 パイエル板

1. 研究開始当初の背景

ケモカインの一つである CCL25 は腸管免疫、特に腸管内の細菌感染の防御に関与している腸管内の IgA 分泌に中心的な役割を果たしていることが知られている。申請者は、マウスの初乳を採取して、乳汁中での CCL25 の有無を調べた。その結果、初乳中に CCL25 が存在していることを世界で初めて確認した。また、乳汁中 CCL25 が新生児の腸管発達、特に、腸管免疫機能の発達にどのような役割を果たしているかを明らかにするために、CCL25 を添加したマウス用人工乳を用いてマウス新生仔を人工哺育し、腸管免疫や免疫系器官である脾臓や胸腺などの発達に対する効果を検討した。その結果、マウス新生仔では、乳汁中の CCL25 によって、その免疫器官である胸腺の発達が顕著に促進されるとともに、胸腺内の免疫細胞の分化もより強く促されることが判明した。また、腸管内へ誘引される IgA 産生細胞が有意に増加することが明らかとなり、CCL25 のリンパ球誘引作用によって、免疫細胞の集積も含めた腸管免疫の働きが高まることが考えられた。これまでにいくつかのケモカインおよびサイトカイン類が母乳中存在していることが判明しているが、その含有量の継時的な変化や生理学的機能性についてはまったく検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、研究(1)として、これまでに本研究実施者らとその存在と新生児に対する免疫発達促進作用を明らかにしている CCL25 と類似した機能を有している CCL28、過去の論文で母乳中での存在だけは確認されているものの、その含有量の継時的変化や、新生児の生理学的機能について検討されていない TSLP と IL-7、の3種類のケモカイン・サイトカインに注目して、マウス、ウシおよびヒトの母乳中の CCL28、TSLP、IL-7 を継時的に測定した。

また、研究(2)として、CCL25 と類似した機能を有する母乳中 CCL28 に焦点を当てて、新生児の生理機能、特に腸管免疫を含めた免疫機能の発達に対する母乳中 CCL28 の役割を解明することを目的として、CCL28 含有人工乳を用いたマウス新生仔の人工哺育実験によって検討を行った。

さらに、前述の CCL28 の機能をより詳細に検討するために、研究(3)では、CCL28 ノックアウトマウス(CCL28KO マウス)を作製し、そのフェノタイプを新生仔マウスの CCL28KO マウスと正常マウスで比較した。

3. 研究の方法

研究(1)

マウス母乳中の各免疫タンパクの測定は、ddY 系の母マウスを用いて、生後 0、1、2、5 および 10 日目に母乳を採取し、遠心分離して、乳清を採取し、採取した乳清は測

定まで -20 の冷凍庫内で凍結保存した。測定は、マウス CCL28 の ELISA 定量キット (Mouse CCL28 DuoSet ELISA kit, R&D systems, USA) で測定を行った。

ヒト母乳は、静岡済生会病院に出産のために入院している種々の疾患あるいは感染症等 (乳房炎も含む) に罹患していない正常分娩した母親に依頼して、母乳の採取を行った。母乳は、出産した日を 0 日目とし、出産後から 1 日 (24 時間) 単位で 5 日目まで、また 1 ヶ月目に採取し、採取後すぐに冷凍保存した。使用直前に解凍して遠心分離によって乳清を採取し、測定に用いた。ヒト母乳中の CCL28 は、CCL28 ELISA 定量キット (Mouse CCL28 DuoSet ELISA kit, R&D systems, USA) を、TSLP は、TSLP ELISA 定量キット (Human TSLP ELISA Ready-SET-GO, eBioscience, USA)、IL-7 は、IL-7 ELISA 定量キット (Human IL-7 DuoSet ELISA kit, R&D systems, USA) を用いて分析した。ウシ母乳は静岡大学の近隣にある牧場から提供していただき、測定に使用した。生後 0 日目から 5 日目の初乳と生後 1 ヶ月目の常乳を搾乳後すぐに -20 で凍結保存し、使用時に解凍および遠心分離して乳清を採取した。ウシ乳清中の CCL28 の測定はヒトの測定キットを用いて行った。

すべての結果は、乳清 1 ml 当たりの含有量として算出した。

研究(2)

ddY 系の新生仔マウスを生後 2 日齢まで母乳哺乳させ、生後 2 日齢から、1 µg/ml の CCL28 添加あるいは無添加人工乳を用いて人工哺育を行った。生後 10 日目まで 8 日間人工哺育した後に解剖し、小腸及び大腸、脾臓、胸腺の各重量と小腸内のパイエル板の数と大きさを測定した。胸腺と脾臓については、重量計測後、FACS による免疫細胞の数および種類ごとの比率の比較を行った。

研究(3)

国立遺伝学研究所・マウス開発室の准教授の小出剛先生に依頼して、CCL28KO マウスを作製し、静岡大学農学部のマウス飼育室で自家繁殖した。実験には、生後 10 日目の新生仔マウスの、CCL28KO マウスおよび C57BL-6J 正常マウスを使用した。各マウスは解剖前に体重を計測し、解剖後に各臓器重量を計測するとともに、胸腺と脾臓については FACS による免疫細胞の数および種類ごとの比率の比較を行った。小腸内のパイエル板については、重量計測後、ヘマトキシリン染色して、パイエル板の数と大きさを測定した。

4. 研究成果

研究(1)

マウス母乳中 CCL28 の含有量

マウス母乳中の CCL28 の含有量を測定した結果、Fig.1 に示すように、生後 0 および 1

日目の母乳、つまり初乳にはその含有量が非常に少なかった。しかし、生後2日目から増加し始めて、その量は経時的かつ劇的に増加した。その含有量は0日目と比べて、生後2日目では約2倍であったが、生後5日目では約8333倍、生後10日目では約27857倍と、劇的に増加していた。

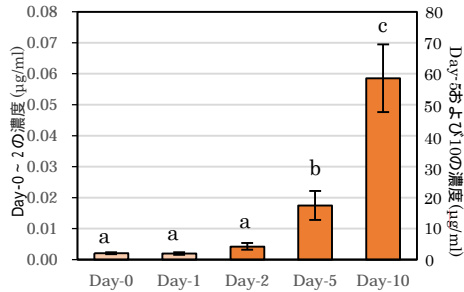


Fig.1 マウス母乳中の CCL28 の含有量の分析
異なるアルファベット間に有意差あり ($P < 0.05$)

ヒト母乳中 CCL28 の含有量

Fig.2 のように、ヒト母乳中の CCL28 は、出産直後（初乳）から含有しており、その含有量は、初乳期間中の生後3日目をピークとして増加し、その後、減少した。その含有量は、生後0日目と比較すると、2～5日目で有意な増加を示していた。

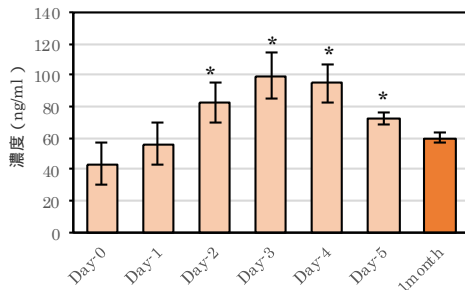


Fig.2 ヒト母乳中の CCL28 の含有量の分析
* : 0日目に対して有意差あり ($P < 0.05$)

ウシ母乳中 CCL28 の含有量

ウシ母乳中の CCL28 を測定した結果を Fig.3 に示す。ウシ母乳にも CCL28 の存在が確認された。その含有量はいずれの採取時期でも差は見られなかったが、初乳期間の5日目までの全体の平均含有量と1ヶ月目の常乳の含有量を比較したところ、常乳のほうが高い傾向を示した。

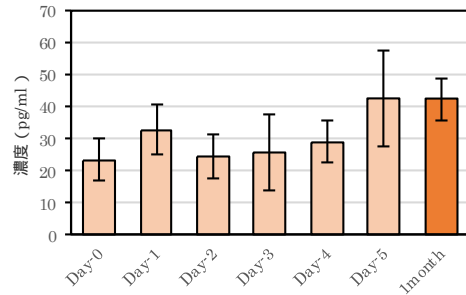


Fig.3 ウシ母乳中 CCL28 の含有量

ヒト母乳中の TSLP の含有量

ヒト母乳中の TSLP も、泌乳時期に関わらず母乳中に存在し、その含有量の経時変化は CCL28 と非常に相関がみられ、生後3日目をピークとして増加し、その後、減少しており、生後0日目と比較すると、2～5日目で有意に増加していた (Fig.4)。

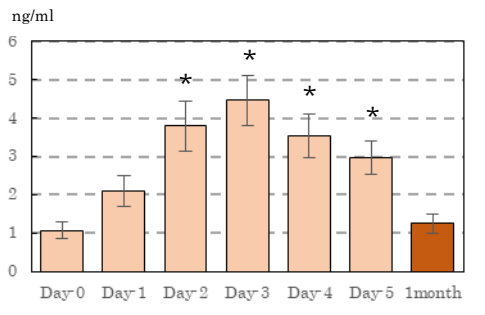


Fig.4 ヒト母乳中の TSLP の含有量の分析
* : 0日目に対して有意差あり ($P < 0.05$)

ヒト母乳中の IL-7 の含有量

IL-7 もまた、ヒト母乳中に、いずれの泌乳時期においても存在し、その含有量には経時的な変化は見られなかった (Fig.5)。

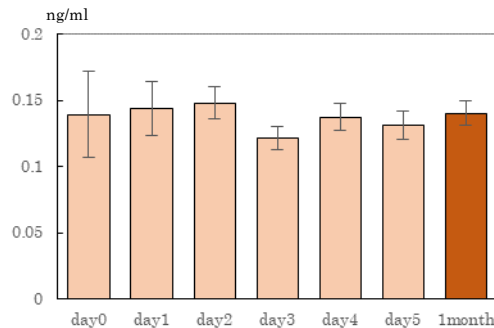


Fig.5 ヒト母乳中の IL-7 の含有量の分析

ヒト母乳中の CCL28 と TSLP の含有量の経時的変化は非常に相関性が高かった。TSLP はサ

イトカイン・ケモカイン類の産生および分泌に関与していることが報告されていることから、ヒト母乳中の CCL28 の産生には、TSLP が関与している可能性が考えられた。

研究 (2)

CCL28 含有人工乳を用いたマウス新生仔の人工哺育実験

母乳中 CCL28 の生理学的機能性を調べるために、CCL28 を添加あるいは非添加した人工乳を用いてマウス新生仔の人工哺育実験を行った。人工哺育後の体重および体重当たりの各種臓器重量を比較した結果、Fig.6 に示すように、体重、臓器重量ともに、CCL28 添加群とコントロール群との間に差は見られなかった。また、小腸内のパイエル板の個数と大きさを比較したが、両群に差は認められなかった。また、胸腺および脾臓の免疫細胞の種類ごとの数と比率をフローサイトメトリ法で解析した。その結果、胸腺内のリンパ球数は CCL28 添加群と非添加群で差は見られなかったが、リンパ球の種類別の比率については、Fig.7 のように、CCL28 添加群の各種 T 細胞の割合が母乳飼育群に近い傾向を示した。これらの結果は、胸腺において、CCL28 が T 細胞の分化に関係している可能性があることを示している。CCL28 の胸腺組織内での発現や生理学的機能はこれまでまったく報告がないことから、今後、胸腺内での CCL28 存在とその役割について検討を進める必要があると考えている。

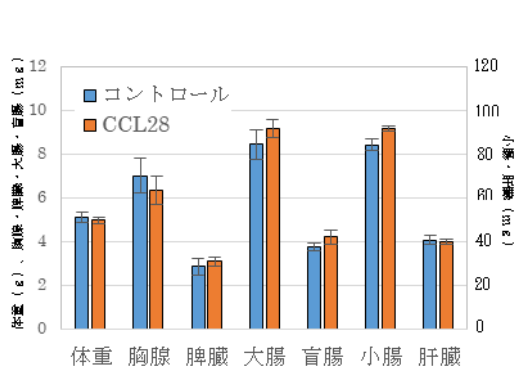


Fig.6 CCL28 添加人工乳による人工哺育後の体重および臓器重量の比較

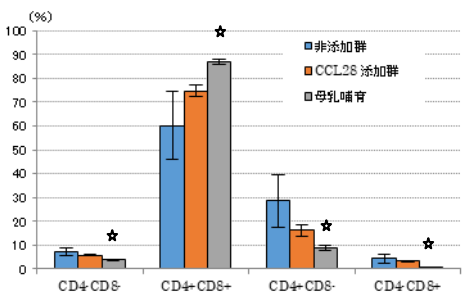


Fig.7 CCL28 添加人工乳による人工哺育後の胸腺内の T 細胞の種類別比率の比較
: 非添加群と比較して有意差あり ($P < 0.05$)

脾臓については、免疫細胞の細胞数および種類別割合ともに、CCL28 による変化は見られなかった。

研究 (3)

新生仔 (10 日齢) の CCL28KO マウスと正常マウスのフェノタイプの比較

CCL28KO マウスと正常マウスの新生仔のフェノタイプを比較した。体重、肝臓および腎臓重量は CCL28KO マウスと比較して、正常マウスのほうがいずれも有意に重かった。一方、小腸、大腸および胸腺の重量は、CCL28KO マウスのほうが有意に重かった。また、小腸内のパイエル板の数と大きさは CCL28KO マウスのほうが、正常マウスよりも数、大きさ共に、有意に大きかった。そのため、新生児期のパイエル板の発達には CCL28 が抑制的に働いている可能性が示唆された。しかしながら、その中の免疫細胞の存在については確認していないことから、パイエル板のサイズや数が大きいことと、その機能とが相関しているかどうかは不明である。そのため、今後、組織学的な検討も必要と考えている。

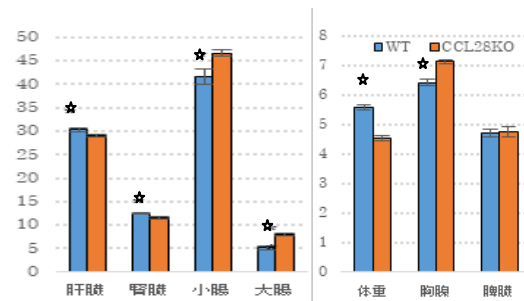


Fig.8 新生仔 CCL28 マウスと正常マウスの体重および臓器重量の比較

: CCL28KO マウスと比較して有意差あり ($P < 0.05$)

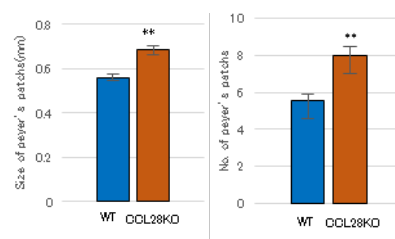


Fig.9 新生仔 CCL28KO マウスと正常マウスのパイエル板の数と大きさの比較

** : 正常マウスと比較して有意差あり ($P < 0.05$)

また、FACS を用いて胸腺と脾臓の免疫細胞の解析を行った結果、胸腺内の免疫細胞には CCL28 が発現していないことによる影響は見られなかったが、脾臓中にはリンパ球がほとんど見つからなかった。そのため、CCL28 は新生児の脾臓中へのリンパ球の集積に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。しかしながら、そのメカニズムについては、本研究では解明できなかったことから、今後研究を進める予定である。

総括

以上の結果から、ヒトおよびマウスの母乳中には、CCL28、TSLP、IL-7 が存在していることが判明した。また、CCL28 は、ヒトではその含有量が初乳で多く、常乳で少ないという結果であったが、マウスでは初乳中には少なく、常乳中に非常に大量に存在することが明らかとなった。他方、ヒト母乳中の CCL28 と TSLP の含有量は非常に相関性が高かった。TSLP はサイトカイン・ケモカイン類の産生および分泌に関与していることが報告されていることから、ヒト母乳中の CCL28 の産生には、TSLP が関与している可能性が考えられた。また、CCL28 含有人工乳を用いたマウス新生仔の人工哺育試験の結果から、CCL28 は胸腺および脾臓の発達には関係していないが、腸管免疫機能に影響している可能性が示唆された。

一方、CCL28 含有人工乳を用いたマウス新生仔の人工哺育実験を行った結果、各臓器重量およびパイエル板の数と大きさについては、いずれも CCL28 投与による変化は見られなかった。しかし、胸腺内の T 細胞の種類別割合が母乳哺育群と類似した結果を示した。胸腺における CCL28 の存在とその機能はこれまでまったく報告がないことから、この発見は胸腺機能に関する新しい知見であることから、今後胸腺における CCL28 の役割について検討を進める予定である。

さらに、CCL28KO マウスの新生仔(10日齢)のフェノタイプを正常マウスと比較した。その結果、胸腺、小腸および大腸の重量が正常新生仔マウスと比較して有意に大きかった。また、小腸内のパイエル板の数と大きさが CCL28KO マウスで大きかったことから、CCL28 がパイエル板発達に抑制的に関与している可能性が示唆された。また、新生児の脾臓中のリンパ球の集積に CCL28 が必須であることが判明した。

本研究の結果は、母乳の重要性を再認識させるとともに、母汁中のケモカインやサイトカインの経口投与研究をより詳細に進めることで、新生児の成長や感染症防止、免疫機能向上をもたらすことができる、より機能性の高い人工乳の開発にも寄与できる可能性がある。さらには、アトピーなどの新生児期から発症するアレルギーや免疫疾患との関連にもつながるかもしれない非常に重要な研究課題と考えられることから、今後の研究の進展に期待するものである。

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)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/abc/sayama/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茶山 和敏 (SAYAMA, Kazutoshi)

静岡大学農学部・准教授

研究者番号：30260582