

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19323

研究課題名(和文)鳥類卵巣の抗菌ペプチドによる自然免疫機能の強化への挑戦

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

研究代表者

吉村 幸則 (Yoshimura, Yukinori)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授

研究者番号：10167017

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):本研究はワクチン接種によりニワトリ卵巣の自然免疫系機能が強化される可能性を追究した。まず、微生物分子が産卵鶏卵胞膜の炎症性サイトカインとAvBDsの産生を誘導することを明らかにした。一方、産卵鶏にサルモネラ菌ワクチンを接種すると卵胞膜で微生物パターン分子を認識するTLRsと抗菌ペプチドのAvBDsの発現が増加すること、ヒナに4種類のワクチンを接種すると一部のTLR発現やAvBDs発現に影響すること、これらのワクチン接種はヒストン修飾によるリプログラミングを誘導して免疫機能に影響する可能性を示した。以上、鶏卵巣の自然免疫機能はワクチン接種の影響を受けることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ニワトリの卵形成に重要な卵巣の感染防御機能を強化するために行ったものである。これまでに卵巣の自然免疫機能を強化することを示した報告はないが、ワクチンがこれに影響したので、より有効なワクチンと接種方法を開発するうえで基礎となる有効な成果である。また、ヒストン修飾によるリプログラミングで自然免疫関連分子の発現制御が起こる可能性を示したので、これがワクチン開発の指標の1つとなる可能性があるという学術的意義もある。他の臓器でもワクチンによる自然免疫機能の強化が可能であれば個体の感染防御機能を高めることにつながり、卵の細菌汚染や個体の健康を守って安全な食料生産に寄与するという社会的意義がある。

研究成果の概要(英文):This study investigated the possibility that the innate immune function could be modulated by vaccination in the chicken ovary. It was shown that microbe molecules induced the expression of proinflammatory cytokine and AvBDs, which are antimicrobial peptides, in the follicular theca of the laying hens. It was also demonstrated that expressions of TLRs, which are the receptors recognizing the microbe-associated molecular patterns, and AvBDs were affected in response to Salmonella enteritidis vaccination in the follicle of laying hens. The expression of TLRs and AvBDs were also modulated by the routine multiple vaccination in the chick ovary. The modulation of the expression of these innate immune molecules was associated with by histone modification, suggesting the possibility that reprogramming could be induced by vaccination to affect their expression. Thus, it was suggested that the innate immunity function of the chicken ovary could be modulated by the vaccination.

研究分野：畜産学

キーワード：ニワトリ卵巣 自然免疫 Toll様受容体 抗菌ペプチド サイトカイン 感染防御

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

私達はニワトリの健康を維持し、卵の安全性を高めることを目的として、生殖器の感染防御機能を追究している。Toll 様受容体 (TLRs) は微生物パターン分子認識する受容体で自然免疫応答を開始させる。トリ ディフェンシン (AvBDs) は抗菌ペプチドで、14 分子種が同定されているが、各分子の抗菌スペクトルは広く、1 つの分子が細菌やエンベロープウイルス等多種の微生物を死滅させる。卵管で、TLRs が微生物分子を認識すると、AvBDs と炎症性サイトカインが産生され、さらに産生された炎症性サイトカインの IL1 も AvBDs 産生を誘導するという感染防御系が構築されていることを明らかにした。卵管粘膜細胞は、TLR2-5, 7, 21 のリガンドに反応して炎症性サイトカインを産生し、この細胞内応答に転写因子の NF- $\kappa$ B が関わることも明らかにした。一方、卵巣はサルモネラ菌やニワトリ伝染性気管支炎ウイルス (IB) 等のウイルスが感染して卵の汚染や卵形成機能の障害が起こりやすい臓器である。卵巣においても TLRs が発現し、サルモネラ菌リポ多糖 (LPS) の刺激で AvBDs と炎症性サイトカインの発現が誘導されることを明らかにした。しかし、その他の微生物パターンが AvBDs と炎症性サイトカインの発現に及ぼす影響と、これらを誘導する細胞内の情報伝達機構は解明されていない。また、感染防御機能を高めるために TLRs と AvBDs の産生機能を強化することが期待されるが、ワクチン接種で強化される適応免疫とは異なり、自然免疫系の機能を強化する方策は確立されていない。哺乳類では、結核ワクチン菌ワクチン (BCG) 等の接種により、当該の微生物感染だけでなく、ワクチン内抗原以外の微生物による感染も抑制されること、これには自然免疫関連分子の発現に関わるエピジェネティクスとそれによる免疫記憶が誘導されることが示唆されている。これらのことから、卵胞における AvBDs 産生機構の解明とワクチン接種によるこの機能の強化作用を追究するという構想に至った。

### 2. 研究の目的

ニワトリの卵巣には多数の卵胞が存在して卵黄が発達する。卵黄は卵胞壁の顆粒層と卵胞膜に被われている。卵胞が細菌やウイルスにより感染すると卵巣の機能が障害され、卵は微生物に汚染される。安全な鶏肉・鶏卵を生産するために、卵巣の感染防御機能を高めることは重要である。自然免疫は、適応免疫に比べて特異性が低く、多様な微生物の排除に働く。養鶏現場では多様な微生物が存在しているので、これらによる感染を防ぐには、適応免疫系だけでなく、作用範囲が広い自然免疫系を強化することも重要である。自然免疫応答過程では、TLRs が細菌とウイルスの微生物パターンを認識することから開始され、細胞内の情報伝達を経て、サイトカインや抗菌ペプチドを産生させる。抗菌ペプチドの AvBDs は 14 分子種が同定されており、それぞれが多様な細菌とウイルスを死滅させて、感染の拡大を抑制する。

私達は、ニワトリの卵巣や卵管で、自然免疫系の微生物パターンを認識する TLR が発現し、これがグラム陰性菌の分子パターンであるリポ多糖 (LPS) を認識すると、炎症性サイトカインや AvBDs の発現を誘導すること、炎症性サイトカインも AvBDs 発現を促進することを見出した。自然免疫機能を強化することは野外の多様な微生物に感染するリスクを低減させるために有効で、これを強化できれば新たな感染防御策の開発に結びつく。このためには、TLR による分子パターン認識から炎症性サイトカインと AvBDs 産生までの機能を明らかにして強化することが必要である。

適応免疫系は、ワクチン接種でリンパ球の記憶細胞を形成させることにより強化できる。一方、自然免疫系では免疫細胞の記憶は形成されないと考えられており、自然免疫系を強化する有効な方策は確立されていない。しかし、私達は抗原であるワクチンの刺激が、細胞内の情報伝達分子の機能を強化すること、エピジェネティクスによる免疫記憶の誘導により AvBDs 等の発現機能を強化する可能性を考えている。抗菌ペプチドの産生機能がワクチンにより強化されるのであれば、ワクチン接種が多様な微生物を攻撃する自然免疫機能を強化するという効果も有することを実証でき、効果的なワクチンを開発する基盤を形成できる。

このため、本研究は、卵胞細胞の自然免疫機能の強化を目指して、抗菌ペプチド産生機能の解明と、この機能を強化するためのワクチン接種の作用機構の追究を目的とした。

### 3. 研究の方法

産卵鶏の卵巣において TLR による微生物パターンの認識と、その刺激により炎症性サイトカインの発現が誘導されるという、自然免疫系が形成されているかを追究した(実験 1)。次いで、産卵鶏卵胞におけるこの自然免疫機能がサルモネラ菌ワクチン接種により変動するかを追究した。このワクチンが発現に影響する過程の機構を追究するためにヒストンアセチル化やメチル化の修飾が変動するかを解析した(実験 2)。次に、ヒナに通常施されているワクチン接種が卵巣の TLR、抗菌ペプチド、炎症性サイトカインの自然免疫分子の発現に影響するかを追究し、さらに、ワクチンが影響する機構を検討するためにヒストン修飾の程度も解析した(実験 3)。また、ワクチン接種が卵巣以外の組織である腎臓の自然免疫機能にも影響するかを追究し、DNA ウイルスの MD ワクチンと RNA ウイルスの IB ワクチンの作用に差があるかも解析した(実験 4)。得られた結果から、卵胞における自然免疫機能に関わる抗菌ペプチド産生機構と、この機能を強化するためのワクチン接種の効果について総合的に考察した。

## 4. 研究成果

### (実験1)ニワトリ卵胞膜のTLRリガンド刺激がサイトカイン発現に及ぼす影響

ニワトリ卵胞膜のサイトカイン発現に及ぼすTLRリガンドの影響とその過程の転写因子としてNF- $\kappa$ Bが関わる可能性を追究した。

卵胞膜(内層と外層)を培養し、Pam3CSK4(TLR2リガンド)、poly I:C(TLR3)、LPS(TLR4)、flagellin(TLR5)、R837(TLR7)またはCpG-ODN(TLR21)を添加または非添加して3時間インキュベートした。これらの組織のサイトカイン発現(IL-1、IL-6、TNFSF15、CXCLi2、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ )をリアルタイムPCR解析した。さらに、卵胞膜組織をPam3CSK4、poly I:C、LPSまたはCpG-ODNとともにBAY 11-7085(NF- $\kappa$ B阻害剤)を添加して3時間インキュベートし、サイトカイン発現を解析した。

その結果、卵胞膜内層と外層の両方で、TLR1(type 1)、TLR2(type 1と2)、3、4、5、7と15のPCR産物が検出され、TLR1(type 2)と21の産物は少なかった。Pam3CSK4によりすべてのサイトカイン(IL-1、IL-6、TNFSF15、CXCLi2、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ )の発現が上昇し(図1)、LPSによりIFN- $\beta$ を除く他のサイトカイン発現が増加した。poly I:CはIL-6、CXCLi2とIFN- $\beta$ の発現を増加させ、CpG-ODNはIL-1の発現を増加させた。FlagellinとR837はサイトカインの発現に影響しなかった。

次に、LPSによるIL-1、IL-6、CXCLi2とIFN- $\beta$ の発現の上昇はBAY 11-7085で抑制されることが示された。Pam3CSK4、poly I:CとCpG-ODNがサイトカイン発現に及ぼす作用にBAY 11-7085は影響しなかった。

これらの結果から、卵胞膜にはTLRによる微生物パターン認識とサイトカイン発現の自然免疫機能が形成されており、このうち、ウイルスパターンより細菌パターンの認識能が形成されているものと考えられた。

### (実験2)ニワトリ雛卵巣の自然免疫因子とヒストン修飾に及ぼす複合ワクチン接種の影響

ニワトリ雛への複合ワクチン接種が卵巣のTLRs、サイトカイン、AvBDsの発現に及ぼすか、そしてリポ多糖(LPS)に対するこれらの分子の発現応答に影響するかを明らかにすることを目的とした。また、ワクチンが自然免疫分子の発現に影響する機構にヒストン修飾によるエピジェネティックなリプログラミングが関わる可能性も追究した。

白色レグホン雌ヒナに初生時から14日齢まで4種のワクチンを複合接種(マレック病(MD)、ニワトリ伝染性気管支炎(IB)、ニューカッスル病(ND)、ファブリキウス嚢腫(BD))した(ワクチン区)。対照区のヒナにはワクチンを水またはPBSに置き換えて投与した。採取した卵巣組織を細切し、LPSを含むまたは含まない培地中で3時間インキュベートし、自然免疫分子のTLRsとサイトカイン、AvBDsの発現をリアルタイムPCR法で解析した。また、一部の卵巣組織はインキュベートせず、ヒストン蛋白を抽出して、これのアセチル化とメチル化による修飾をウエスタンブロット解析した。

その結果、TLR1-1、2-1(図2)、2-2と21の発現が対照区よりワクチン区で高かった。しかし、TLR1-2、4(図3)、7の発現はLPSの刺激下で、対照区よりワクチン区で低かった。ワクチン接種はサイトカインの発現には影響しなかったが、AvBD1(図4)、2、4と7の発現を抑制した。また、ワクチン区では対照区よりH3K9me2(図5)とH3K9acの相対量が多かった。

これらの結果から、ヒナへの複合ワクチン接種は卵巣の自然免疫因子であるTLRs、TNFSF15とAvBDsの発現に影響するものと考えられた。さらにワクチン接種はヒストンメチル化とアセチル化の修飾をもたらしたので、卵巣におけるリプログラミングを誘導する可能性が考えられた。このリプログラミングが自然免疫因子の発現に関連する可能性は不明であるが、これらが関連するのであれば、ヒストン修飾を制御する有効なワクチンやワクチンプログラムを開発することで、自然免疫機能を向上させることができるかもしれない。

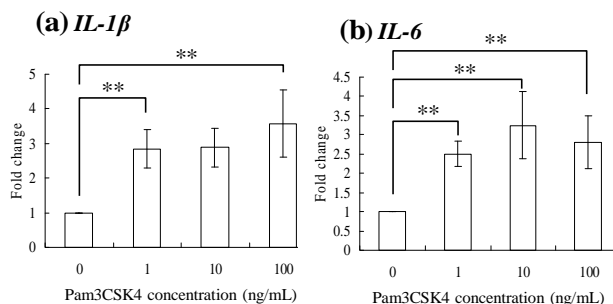


図1. TLR2リガンドのPaM3CSK4が卵胞膜のサイトカイン発現に及ぼす影響。

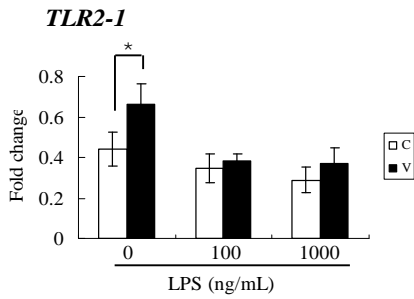


図2. LPS 刺激または非刺激条件におけるヒナ卵巣の TLR2-1 発現のワクチン接種区と対照区との差 対照区、 ワクチン区

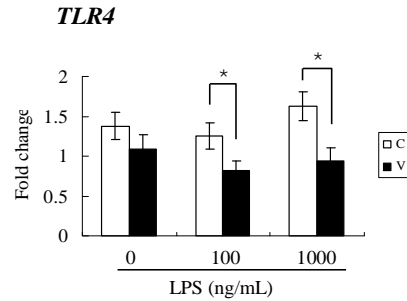


図3. LPS 刺激または非刺激条件におけるヒナ卵巣の TLR4 発現のワクチン接種区と対照区との差 対照区、 ワクチン区

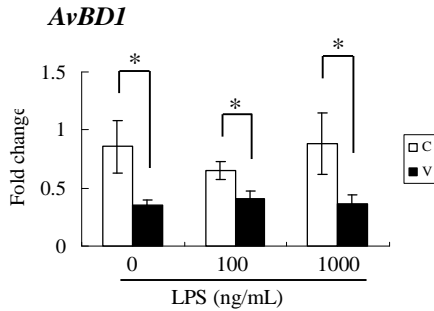


図4. LPS 刺激または非刺激条件におけるヒナ卵巣の AvBD1 発現のワクチン接種区と対照区との差 対照区、 ワクチン区

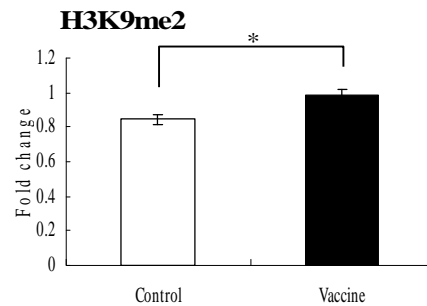


図5. LPS 刺激または非刺激条件におけるヒナ卵巣の H3K9me2 相対量のワクチン接種区と対照区との差 対照区、 ワクチン区

### (実験3)産卵鶏卵胞膜の自然免疫因子とヒストン修飾に及ぼすサルモネラ菌ワクチン接種の影響

産卵鶏へのサルモネラ菌 (*S. enteritidis*; SE) 死菌ワクチン接種が卵胞膜の自然免疫因子の発現に影響し、この過程にエピジェネティックリプログラミングをもたらす可能性のあるヒストン修飾の変化があるかの追究を目的とした。

白色レグホン産卵鶏に SE ワクチン (ワクチン区) またはリン酸緩衝生理的食塩水 (対照区) を投与し、1週間後に最大卵胞を採取した。卵胞膜から全 RNA とヒストン蛋白を抽出し、TLRs とサイトカイン、AvBDs の発現をリアルタイム PCR 法で解析し、アセチル化及びメチル化ヒストンの相対量をウエスタンブロット法で解析した。

その結果、ワクチン区では対照区に比べて、TLR1-1、2-1 (図6) 4 (図7) と 15 の発現が高く、他の TLR は対照区とワクチン区で差を示さなかった。解析した6種のサイトカイン (IL-1、IL-6、TNFSF15、CXCLi2、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ ) の発現も対照区とワクチン区で差を示さなかった。抗菌ペプチドのうち、AvBD1 (図8) 2、4と7の発現は対照区に比べてワクチン区で高かったが、AvBD12 発現は両区の間で差を示さなかった。

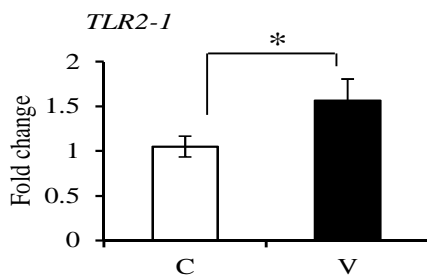


図6. 産卵鶏への SE ワクチン接種が卵胞膜の TLR2-1 発現に及ぼす影響 C=対照区、V=ワクチン区

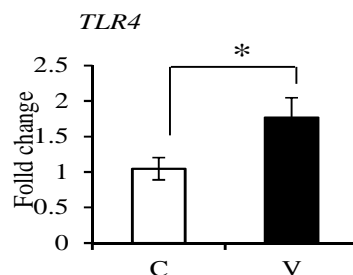


図7. 産卵鶏への SE ワクチン接種が卵胞膜の TLR4 発現に及ぼす影響 C=対照区、V=ワクチン区

次に、ヒストン修飾を解析すると、H3K9me2 (図9) と H3K9ac の相対量はワクチン区で対照区より高く、一方、H3K4me2/3 and H3K27ac の相対量は両区の間で差を示さなかった。

これらのことから、SE ワクチン接種は卵胞膜において TLRs と AvBDs の発現を増加させて自

然免疫機能を高める可能性があること、これに連動して H3K9me2 のヒストン修飾も増加することが示唆された。

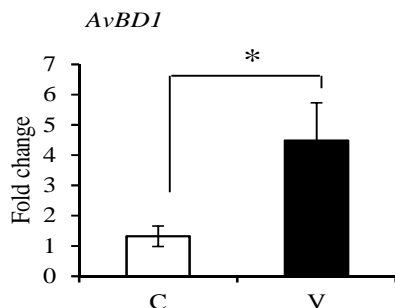


図8.産卵鶏への SE ワクチン接種が卵胞膜の AvBD1 発現に及ぼす影響 C=対照区、V=ワクチン区

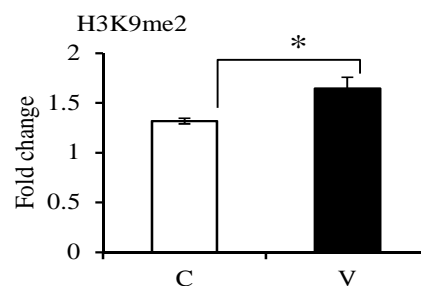


図9.産卵鶏卵胞膜における H3K9me2 相対量のワクチン接種区と対照区との差 C=対照区、V=ワクチン区

#### (実験4)異なるワクチンの接種がニワトリ雛腎臓の自然免疫因子の発現に及ぼす影響

ワクチン接種が卵巣の自然免疫関連分子の発現に影響することが明らかにされたので、次に卵巣以外の器官でも自然免疫機能への影響が起こるかを追究した。

このため、DNA ウイルスの MD ワクチンと RNA ウイルスの IB/ND ワクチンを初生ヒナに接種し、3日齢または10日齢で腎臓の TLRs と AvBDs の発現をリアルタイム PCR 解析した。対照区のヒナにはワクチン接種を施さなかった。また、AvBD2 と AvBD4 蛋白の局在を免疫組織化学により解析した。

その結果、IB/ND ワクチンを接種すると、対照区に比べて、3日齢で TLR3、7、21 の発現が高く、TLR15 は低かった。各 TLR の発現は、10日齢では IB/ND 区と対照区とで差を示さなかった(データは示さず)。MD ワクチン接種の影響を解析すると、3日齢の TLR4 と10日齢の TLR15 発現が MD ワクチン区で対照区より低かった。次に、AvBD 発現に及ぼす両ワクチン接種の影響を解析すると、3日齢では、AvBD4、5、6、7 は対照区より MD 区で高かったが、IB/ND 区では対照区との間で差を示さなかった(データは示さず)。これらの AvBD のうち、AvBD2 は間質結合組織に分布する多型核白血球に認められ、AvBD4 は集合管から尿管にかけての上皮細胞に見られた(データは示さず)。

これらの結果から、ワクチン接種により卵巣だけでなく腎臓の自然免疫機能も制御できる可能性が示され、また、MD ワクチンが TLR に、IB/ND ワクチンが AvBD 発現に影響したように、作用する標的はワクチン種で異なることが示唆された。

#### (まとめ)

本研究の結果から、卵巣細胞は TLR とサイトカイン、AvBD を発現して自然免疫系による感染防御システムを形成していると考えられた。ヒナへの複合ワクチンや産卵鶏への SE ワクチンの接種は卵巣の TLR や AvBD 発現に影響することが明らかとなった。このことから、卵巣の自然免疫による感染防御機能をワクチン接種で制御できる可能性が示唆された。また、ワクチン接種はヒストン修飾にも影響したので、これが自然免疫分子の発現性の変化に関わる可能性がある。ヒストン修飾によるエピジェネティックなリプログラミングが起こるとすると、これを指標に自然免疫分子の発現を制御するための、より有効なワクチンの開発やワクチンネーションプログラムを開発できるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kang Ye, Nii Takahiro, Isobe Naoki, Yoshimura Yukinori	4. 巻 55
2. 論文標題 Effects of TLR Ligands on the Expression of Cytokines and Possible Role of NF- $\kappa$ B in its Process in the Theca of Chicken Follicles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 288 ~ 300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.2141/jpsa.0170217">https://doi.org/10.2141/jpsa.0170217</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kang Y, Nii T, Isobe N, Yoshimura Y	4. 巻 56
2. 論文標題 Effects of Salmonella enteritidis vaccination on the expression of innate immune molecules and histone modifications in the follicular theca of laying hens.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 298-307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.2141/jpsa.0190034">https://doi.org/10.2141/jpsa.0190034</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Y. Kang, T. Nii, N. Isobe, and Y. Yoshimura	4. 巻 98
2. 論文標題 Effects of the routine multiple vaccinations on the expression of innate immune molecules and induction of histone modification in ovarian cells of layer chicks	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Poultry Science	6. 最初と最後の頁 5127-5136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez214">http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez214</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ye Kang, Takahiro Nii, Naoki Isobe, Yukinori Yoshimura
2. 発表標題 Effect of TLR ligands on cytokine expression in chicken follicular theca and vaccination on the response to antigen in chick ovary
3. 学会等名 The 38th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Immunology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukinori Yoshimura, Takashi Kamimura, Ahmad Abdel-Mageed, Takahiro Nii, Naoki Isobe
2. 発表標題 Innate immune system in the oviduct mucosa of hens
3. 学会等名 The 38th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Immunology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 康 暉、新居隆浩、磯部直樹、吉村幸則
2. 発表標題 産卵鶏卵胞膜の自然免疫関連分子の発現とヒストン修飾に及ぼすサルモネラ菌ワクチン接種の影響
3. 学会等名 日本畜産学会第125回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 康 暉、新居隆浩、磯部直樹、吉村幸則
2. 発表標題 ニワトリヒナ卵巣の自然免疫関連分子の発現とヒストン修飾に及ぼすワクチン接種の影響
3. 学会等名 日本家禽学会2019年度春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 康 暉・新居隆浩・磯部直樹・吉村幸則
2. 発表標題 ニワトリ卵胞膜内層と外層におけるサイトカインとトリ ディフェンシン発現の卵胞成長に伴う変化
3. 学会等名 日本家禽学会2018年度春季大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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/publication.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----