

令和 4 年 3 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02325

研究課題名(和文)ルーメン絨毛組織と宿主免疫系の相互関係の解明による新規ルーメン免疫学の展開

研究課題名(英文)Development of new rumen immunology by elucidating the interrelationship between rumen tissue and host immune system

研究代表者

盧 尚建 (ROH, SANGGUN)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90322130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、反芻動物のルーメン絨毛組織内で生じる免疫応答、恒常性維持と宿主免疫系の相互作用を明らかにした。次のような研究成果を得ている。(1) 離乳後に上昇するCCL5は単球の遊走およびマクロファージへの分化を誘導することが考えられ、ルーメン絨毛組織内の恒常性維持にCCL5-単球/マクロファージ軸は重要な役割を果たしている可能性がある。(2) ルーメン上皮においてIL-1は、離乳によりSCFA、LPS、フラジェリンなどがルーメン内に増加し、ルーメン内環境が変化した際の恒常性維持に寄与することと、ルーメン上皮が損傷した場合には、細胞の増殖を促進することにより損傷の修復に寄与す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

本研究結果により、ルーメン免疫学を視点としたルーメン内微生物、ルーメン絨毛組織と宿主免疫系の相互関係を解明し、畜産学・獣医学領域におけるルーメン免疫応答と恒常性維持を考慮した飼料栄養、飼育管理方法とルーメン絨毛損傷治療法を開発するために必要な基盤技術を構築することができた。

研究成果の概要(英文)：This study was to clarify the interaction between the immune response, homeostasis, and the host immune system that occur in rumen epithelium. The results are as follows: (1) CCL5 elevated after weaning is thought to induce monocyte migration and differentiation into macrophages, and the CCL5-monocyte / macrophage axis may play an important role in maintaining homeostasis in rumen epithelium. (2) In the rumen epithelium, IL-1 contributes to the maintenance of homeostasis when SCFA, LPS, flagellin, etc. increase in the rumen due to weaning and the environment by the environment changes in rumen, and in addition it is suggested to contribute to the repair of damage by promoting cell proliferation.

研究分野：反芻動物の生理学

キーワード：反芻動物 反芻胃 ホメオスタシス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

反芻家畜のルーメンは栄養代謝的に中核になる臓器であり、これまで様々な研究が行われているが、生産性現場において浮き彫りとなった問題点も多数存在する。反芻動物のルーメン(反芻胃)には多種多様な微生物(ルーメン微生物)が共生し、彼らから分泌される消化酵素が触媒する嫌気的な発酵により、反芻動物が摂取した草飼料に含まれる細胞壁の繊維成分を栄養として利用できる。さらに、ルーメンの機能維持には発酵槽として十分な容積と、最低限の種類と量のルーメン微生物が存在しなくてはならない。しかし、近年、乳肉用牛の集約的な生産が進むと、牧草より穀物などの濃厚飼料を多く給与することになり、ルーメンの中では多量のデンプンを発酵させる必要が生じ、その結果、本来の牛には発生し得ない栄養代謝負担とそれによる健康障害(例えば、亜急性ルーメンアシドーシス、第一胃炎、脂肪肝、蹄葉炎、および免疫機能不全)が増加し、畜産現場では深刻な課題となっている。畜産業と食品の安全性を向上させるために克服すべき世界共通の課題となっている。

ルーメンの主要な働きは、嫌気性微生物の発酵による短鎖脂肪酸の産生と上皮細胞における消化吸收、および良質なアミノ酸の供給源となる微生物体タンパク質の生産である。その一方で、飼料を摂取する時に、多くの病原細菌と一緒に口から入り、ルーメンを通して体内に侵入するリスクがあるため、これらの侵入物から身を守る自己防衛体制として、ルーメン絨毛組織には、体の中で最初かつ最大規模の免疫機能が配置されていると考えられる。ルーメン絨毛組織内には恒常性維持のために、免疫の司令塔を担う「抗原提示細胞」や、侵入者を排除する実行部隊「免疫担当細胞」が多数存在している。また、ルーメン柔毛壁にある上皮細胞(吸収細胞)に囲まれて、上皮間リンパ球が存在し、さらに、腸管壁の下方部分にある免疫系領域「パイエル板」と類似機能をもつ領域が存在する可能性も示唆されている。以上より、ルーメン絨毛には免疫器官としての新たな重要な役割がある可能性が極めて高い。したがって、反芻動物のルーメン絨毛組織内で生じる免疫応答、恒常性維持と宿主免疫系の相互作用を明らかにすることは重要である。

2. 研究の目的

反芻動物の離乳期は自然免疫から獲得免疫に代わる重要な時期であり、哺乳期から育成期に確立された免疫システムは生涯にわたり動物の健全性維持に大きく貢献する。上記の背景の基に、本研究はルーメン免疫学を視点としたルーメン内微生物、ルーメン絨毛組織と宿主免疫系の相互関係を解明する成果に繋がり、ルーメン柔毛組織内の免疫応答の一端が明らかにすることが目的である。

実験1では、ルーメン絨毛組織内では、哺乳期から育成期に移行中にルーメン微生物に生じる短鎖脂肪酸(SCFA)とリポ多糖(LPS)に暴露されるために、恒常性の維持のために調節機構が存在する可能性がある。本実験では、ルーメン絨毛組織内の恒常性維持における炎症性サイトカインとケモカインの役割については明らかにした。

実験2では、ルーメンカニューレを装着した成牛において濃厚飼料多給により6週間亜急性ルーメンアシドーシス(Subacute ruminal acidosis :SARA)を誘導し、免疫機能、内分泌機構とルーメン運動を解析した。

実験3では、仔牛では離乳期間において摂取飼料の変化によりルーメン内発酵やルーメン微生物との共生が始まり、離乳後にはその変化によりルーメン内にはフラジェリンやリポポリサッカライド(LPS)などが増加することが知られている。したがって、本研究ではルーメン上皮での防衛応答機構におけるIL-1 β の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(試験1) 本実験では、離乳前(5週齢)および離乳後(15週齢)の黒毛和種仔牛における炎症性サイトカインとケモカインの遺伝子発現量を調査した。さらに、単球の走化性因子とマクロファージへの分化を誘導するCD68の遺伝子発現量を解析した。また、サイトカインとケモカインの局在は免疫組織化学法によって解析した。

(試験2) ルーメンフィステルを装着したホルスタイン種雄牛(n=4)を供試し、SARA誘導を試みた。初めに、14日間(day-13からday0)、アルファルファのみを給餌した。次に、2頭に細断アルファルファ:大麦=5:5(対照区)の割合で、残りの2頭に細断アルファルファ:大麦=3:7(試験区)の割合で計15kg/日、5日間給餌した(day1からday5)。その後、14日間、アルファルファのみを給餌し、クロスオーバー試験を行った。試験中は、経時的にルーメン内のpHを測定した。また、day0、day5においてルーメン絨毛とルーメン液をサンプリングし、day0、day3、day5においては血液をサンプリングした。

(試験3) IL-1 β の局在は免疫組織化学法によって解析した。6頭のホルスタイン種雄仔ウシ(35日齢区(n=3)、63日齢区(n=3、56日齢時に離乳))から単離した培養ルーメン上皮細胞にSCFA、LPS、フラジェリン刺激をした。qRT-PCRにより、IL-1 β の遺伝子発現量を解析した。培養

ルーメン上皮細胞 LPS、IL-1 β 、LPS+IL-1 β で 24 時間刺激し、MTT アッセイと経上皮電気抵抗値 (TER) の測定を行なった。

4. 研究成果

(試験 1) ルーメン絨毛組織における CCL5 (ケモカインリガンド 5) と CCR5 (CCL5 の需要亭) 遺伝子の発現量は、離乳前と比較して離乳後に有意に高値を示した ($P < 0.01$) (図 1)。CCL5 はルーメン上皮組織において基底層および有棘層に局在していた (図 2)。ルーメン絨毛組織における CD68 遺伝子発現は、離乳前より離乳後に有意に高かった ($P < 0.05$) (図 1)。

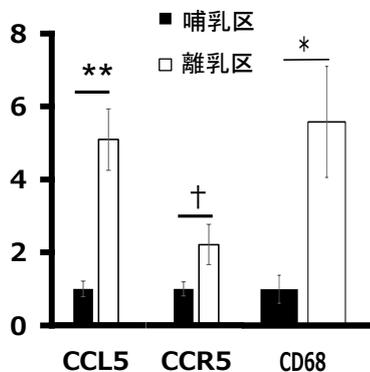


図 1. 哺乳区と離乳区の黒毛和種仔牛のルーメン絨毛組織における CCL5、CCR5 と CD68 の遺伝子発現量 (†: $p < 0.1$, **: $p < 0.01$ vs 哺乳区)

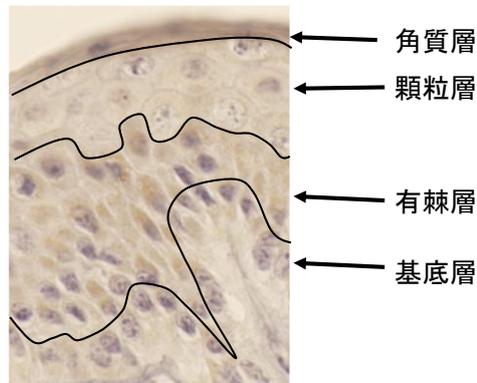


図 2. ホルスタイン種雄 (8 週齢) のルーメン絨毛組織における CCL5 の発現局在
Brown: anti-CCL5 antibody
Blue: nucleus

(試験 2) 試験期間の 5 日間において、pH5.8 以下の時間は 124 ± 38 分/日 (対照区) と 373 ± 95 分/日 (試験区)、pH5.6 以下の時間は 36 ± 19 分/日 (対照区) と 168 ± 63 分/日 (試験区) であった。ルーメン液中のリポ多糖濃度を測定したところ、day 0 から day 5 にかけて両区で有意に上昇した。一方で、血中の LPS 濃度に有意差はなかった。また、炎症の指標である SAA や Hp の血中濃度を測定したところ、両区に有意な差はなかった。したがって、本試験においては、試験区において SARA は誘導できたが、全身性の炎症を惹起する程度のもは誘導できなかったと考えられる。採材した day 0 と day 5 のルーメン絨毛において、免疫関連遺伝子、細胞分裂関連遺伝子、細胞間結合遺伝子の発現量は、両区において有意な差が認められなかった。

(試験 3) IL-1 β はルーメン上皮組織において角質層、顆粒層、基底層および有棘層に局在していた (図 3) 培養ルーメン上皮細胞 (35 日齢、63 日齢) に SCFA、LPS、フラジェリン処理をした場合に、IL-1 β の遺伝子発現量が有意に高かった (図 4)。MTT アッセイより、コントロール区と比較して、IL-1 β (0.5、50ng/ml) 処理区では高い傾向にあり ($P < 0.1$)、IL-1 β (5 ng/ml) 処理区では有意に高くなった ($P < 0.01$) (図 5)。また、LPS 区と比較して、LPS+IL-1 β (0.5、50 ng/ml) 処理区では有意に高くなった ($P < 0.05$ 、 $P < 0.001$) (図 5)。

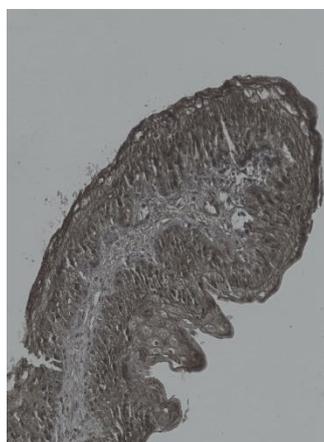


図 3. ホルスタイン種雄 (35 日齢) のルーメン絨毛組織における IL-1 β の発現局在
Brown: anti-IL-1 β antibody
Blue: nucleus

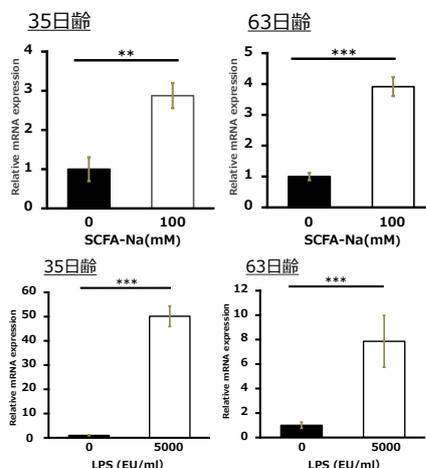


図 4. 培養ルーメン上皮細胞における SCFA と LPS 添加による IL-1 β の遺伝子発現量 (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.01$ vs 0)

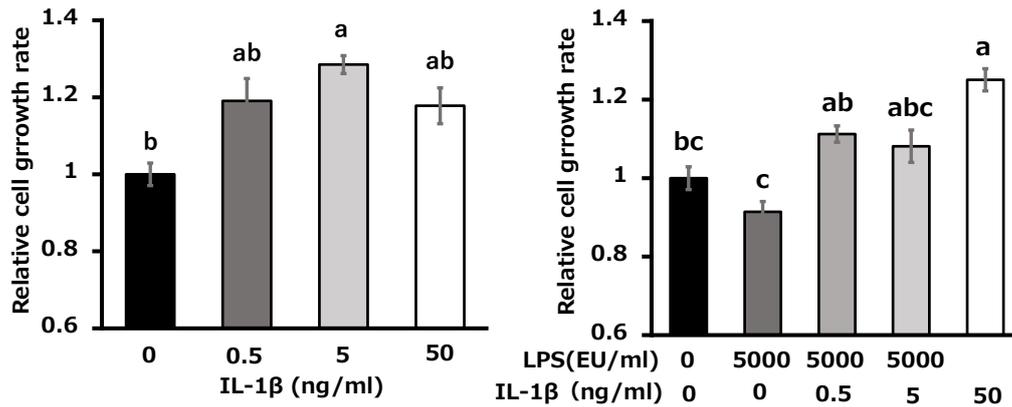


図5. 培養ルーメン上皮細胞における IL-1 β による細胞増殖能
(異文字間で有意差あり、P<0.05)

本研究結果より次のような成果が得られている。

- ① 離乳後に上昇する CCL5 は単球の遊走およびマクロファージへの分化を誘導することが考えられ、ルーメン絨毛組織内の恒常性維持に CCL5-単球/マクロファージ軸は重要な役割を果たしている可能性が示唆された。
- ② ルーメン上皮において IL-1 β は、離乳により SCFA、LPS、フラジェリンなどがルーメン内に増加し、ルーメン内環境が変化した際の恒常性維持に寄与することと、ルーメン上皮が損傷した場合には、細胞の増殖を促進することにより損傷の修復に寄与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishihara, K., Suzuki, Y., Kim, D., Roh SG	4. 巻 90
2. 論文標題 Growth of rumen papillae in weaned calves is associated with lower expression of insulin-like growth factor-binding proteins 2, 3, and 6	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 1289-1292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13270	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 -
1. 著者名 西原昂来、盧 尚建	4. 巻 63(2)
2. 論文標題 ルーメン上皮の恒常性維持機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 栄養生理研究会報	6. 最初と最後の頁 27-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Nishihara K, Kato D, Suzuki Y, Kim D, Nakano M, Yajima Y, Haga S, Ishizaki H, Kawahara-Miki R, Kono T, Katoh K, Roh SG	4. 巻 96
2. 論文標題 Comparative transcriptome analysis of rumen papillae in suckling and weaned Japanese Black calves using RNA sequencing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Animal Science	6. 最初と最後の頁 2226-2237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jas/skx016	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 -
1. 著者名 2. Nakano M, Suzuki Y, Haga S, Yamauchi E, Kim D, Nishihara K, Nakajima K, Gotoh T, Park S, Baik M, Katoh K, Roh SG	4. 巻 96(7)
2. 論文標題 Downregulated Angiopoietin-like Peptide 8 Production at Calving Related to Changes in Lipid Metabolism in Dairy Cows	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Animal Science	6. 最初と最後の頁 2646-2658
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jas/sky162	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Nishihara K, Roh S
2. 発表標題 Roles of Toll-like receptor 5 ligand in rumen epithelium
3. 学会等名 3rd International Symposium on Immunology and Biotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Roh S
2. 発表標題 Antimicrobial peptide in rumen epithelium
3. 学会等名 4th International Animal Science and Biotechnology Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Roh S
2. 発表標題 The control of homeostasis in rumen epithelium of Japanese Black cattle
3. 学会等名 18th Chulalongkorn University Veterinary Conference. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kim MJ, Son GH, Roh S, Ahn JS, Park JK, Park BK, Shin JS.
2. 発表標題 A study on Relationship of Blood Metabolites and Carcass Traits in Hanwoo Steers.
3. 学会等名 International symposium on ruminant physiology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishihara K, Roh SG.
2. 発表標題 Roles of Toll-like receptor 5 ligand in the innate immune system in primary bovine rumen epithelial cells
3. 学会等名 International Symposium on Ruminant Physiology 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Roh SG, Nishihara K
2. 発表標題 The control of homeostasis in rumen epithelium of Japanese Black cattle
3. 学会等名 The 2018 ASAS-CSAS Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishihara K, Haga S and Roh SG
2. 発表標題 CCL5-monocyte/macrophage axis maintains homeostasis in rumen epithelium
3. 学会等名 The 2018 ASAS-CSAS Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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	芳賀 聡 (Haga Satoshi) (90442748)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・主任研究員 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
韓国	Seoul National University			