

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658224

研究課題名(和文) 乳腺上皮細胞が放出する白血球遊走因子のウシ乳房炎早期診断・治療法開発への応用戦略

研究課題名(英文) Cyclophilin A is a early stage maker of bovine mastitis.

研究代表者

麻生 久 (Aso, Hisashi)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50241625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：シクロフィリンA(CyPA)は、乳房炎を発症した乳腺上皮細胞、乳汁および浸潤部位で強く発現し、潜在性および急性乳房炎の乳汁中で高感度に検出され、乳房炎早期診断マーカーとなり得る可能性が示唆された。

牛末梢血から顆粒球を比重遠心分離法で調整し、トランズウエルを用いて細胞遊走活性を解析した。精製した組換え型牛シクロフィリンAは細胞遊走活性を有し、至適濃度が存在することが判明した。シクロフィリンAの細胞遊走活性は抗体より中和されることを確認した。よって、牛シクロフィリンAは細胞遊走能を有することが判明し、乳房炎における炎症の発動に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Cyclophilin A (CyPA), a member of the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family, is known as a cyclosporin binding-protein. Although CyPA was initially believed to function primarily as an intracellular protein, recent studies have revealed that it can be secreted by cells in response to inflammatory stimuli. Therefore, CyPA may play a role in cardiovascular diseases, viral infections and others. Further, extracellular CyPA has a potent chemotactic effect on leukocytes, monocytes, and lymphocytes through CD147 cell receptor.

We investigated the expression of CyPA in bovine mammary gland. CyPA was detected in mammary epithelial cells of mastitis cow stronger than healthy cow. Surprisingly, CyPA in milk was stained in mammary gland alveolus of mastitis cow with inflammation of leukocytes, but not in healthy cow. The content of CyPA in milk was greater in mastitis cow than healthy cow. These data indicate that CyPA in milk may be a marker of mastitis.

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：乳房炎 シクロフィリンA 遊走因子 診断法 炎症 乳汁 CyPA 乳腺上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

乳房炎はウシの疾病の中で最も発生率が多く、乳量の低下、抗生物質などの治療費、感染牛の廃用など経済的な損失は年間100億円と推定されている。現在、乳房炎治療の多くが抗生剤を用いた治療を中心に行われており、乳房炎牛の生乳や食肉からメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の検出は世界的に多く報告され (Epidemiol Infect 2010)、食肉、牛乳を介して耐性菌がヒトに伝播していく可能性が大いに考えられる (Euro Surveill 2010)。よって、その防除は今日の獣医畜産領域において重大な課題であり、ウシ乳房炎早期診断・治療法の開発が望まれている。

シクロフィリン A は免疫抑制剤シクロスポリン A の細胞内結合蛋白として 1984 年に発見され (Science 1984)、熱ショック蛋白のイムノフィリンシャペロン複合体としてカベオリンとコレステロールの生産を行い (JBC 1998)、蛋白質の折りたたみと構築の促進因子として働く (J Exp Med 2007 ; FEBS Lett 1995)。近年、細胞膜上 CD147 がシクロフィリン A の主要なシグナル受容体であり、急性肺炎のマウスモデルを用いてシクロフィリンと CD147 の結合が炎症反応に寄与することが証明された (J Immunol 2005, 2006)。また、マウスモデルを用いた腹部大動脈瘤形成には、血管平滑筋細胞内および分泌された細胞外シクロフィリン A による活性酸素種 (ROS) 産生およびマトリックスメタロプロテイナーゼ 2 活性化が必須であることが示された (Nat Med 2009)。以上より、シクロフィリン A が細胞外に放出され、炎症反応における白血球遊走因子ケモカインの一つであることが明らかにされた。

2. 研究の目的

ウシ乳房炎が細菌感染によって障害を受けた乳腺上皮細胞に免疫担当細胞が浸潤して炎症を引き起こすことに着目し、実験的に乳房炎を誘起したウシ乳腺胞を用いて細胞遊走因子の発現解析を行い、世界で初めて白血球遊走因子シクロフィリン A が炎症性腺胞の乳腺上皮細胞で強く発現し、さらに腺胞内乳汁へ分泌されることを発見した。よって、本研究は、乳房炎発症組織におけるシクロフィリン A の発現様式および乳房炎乳汁中におけるシクロフィリン A の検出方法を確立し、その分泌と病態との関連性を明らかにすることにより、ウシ乳房炎早期診断・治療法開発への応用戦略を図る。

3. 研究の方法

(1) 乳腺組織におけるシクロフィリン A の発現解析を行い、シクロフィリン A のウシ乳房炎の炎症の進行度、白血球細胞浸潤との関連性および乳汁への分泌が明らかにする。

(2) 乳腺上皮細胞株モデル系を用いたシクロフィリン A の発現解析では、申請者が樹立

した正常二倍体細胞のウシ乳腺上皮細胞株 (BMEC 細胞) をマトリゲル中で培養し、分化誘導因子の刺激を加えることにより、腺胞形成と乳汁蛋白質を合成分泌する成熟乳腺上皮細胞に分化誘導する系を確立している (J Dairy Res 2002)。また、より簡便なトランズウエルを用いた分化誘導系も構築しており (J Dairy Science 2005)、乳腺上皮細胞におけるシクロフィリン A の発現様式を明らかにする。

(3) 乳房炎発症と乳汁中シクロフィリン A の関連性を明らかにする目的で、正常乳および乳房炎罹患牛の生乳を用いて、乳腺上皮細胞から乳房炎乳中に分泌されたシクロフィリン A を検出し、分泌される時期およびその濃度を明らかにすることにより、シクロフィリン A 分泌と乳房炎罹患との関連性を解析する。

4. 研究成果

本研究は、乳房炎発症組織におけるシクロフィリン A (CyPA) の発現様式および乳房炎乳汁中における CyPA の検出方法を確立し、その分泌と病態との関連性を明らかにすることにより、ウシ乳房炎早期診断・治療法開発への応用戦略を図ることを目的とする。

本研究においては、まず乳腺上皮細胞における CyPA の発現機構解析を行った。組織解析には、分娩後約 300 日で 2 産目ホルスタイン種牛の乳頭孔に Staphylococcal Endotoxins-C (SEC) を接種、あるいは分娩後約 60 日で初産ホルスタイン種牛の乳頭孔に Staphylococcus aureus (S. A.) を接種した実験的乳房炎組織を使用した。CyPA 発現は、免疫組織化学染色法を用いて解析した。

SEC 接種乳房炎組織では、正常および乳房炎の乳腺上皮細胞が共に CyPA を発現していた。特に、乳房炎を発症した乳腺組織では、乳腺上皮細胞、乳汁および浸潤部位で強く CyPA が発現し、異常な形態と重度な細胞浸潤が認められる乳腺上皮では CyPA 発現がさらに強まった。S. A. 接種乳房炎組織においても、正常な乳腺上皮細胞で CyPA 発現が確認され、炎症が認められる乳腺上皮および細胞浸潤が見られる乳汁中で CyPA が強く確認された。一方、乳腺胞が退化した部位や炎症の進行に伴う間質肥大によって乳腺胞が委縮した乳腺上皮では、CyPA 発現が弱いことを確認した。本研究により、CyPA は乳腺上皮細胞で発現し、泌乳期では腺胞内乳汁中へ微量分泌されることが判明した。また、乳房炎発症により、乳腺上皮細胞からの乳汁中へ大量に CyPA が分泌され、顆粒球の動員などの炎症を誘起する可能性が示された。以上より、泌乳期における乳汁中 CyPA は、潜在性および急性乳房炎の乳汁中で高感度に検出され、乳房炎早期診断マーカーとなり得る可能性が示唆された。

次に、組換え型シクロフィリン A を作成し、その細胞遊走活性を検討した。pPAL7 ベクタ

ーに牛シクロフィリンA配列を組み込み、大腸菌で発現させ、アフィニティーカラム、ゲル濾過カラムにより、組換え型牛シクロフィリンAを精製した。牛末梢血から顆粒球を比重遠心分離法で調整し、トランズウエルを用いて細胞遊走活性を解析した。精製した組換え型牛シクロフィリンAは細胞遊走活性を有し、至適濃度が存在することが判明した。ウサギ抗牛シクロフィリンAポリクローナル抗体を作成し、中和試験を行い、シクロフィリンAの細胞遊走活性は抗体より中和されることを確認した。よって、牛シクロフィリンAは細胞遊走能を有することが判明し、乳房炎における炎症の発動に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

既に確立している牛シクロフィリンAのウエスタンブロット解析およびELISA法は、測定機器および測定に必要な時間などを考えると全く実用性に乏しい。酪農現場での応用を図るには、簡便な乳汁中シクロフィリンAの検出方法を確立する必要がある。作成した組換え型牛シクロフィリンAに対するウサギ・ポリクローナル抗体および作成に成功したマウス・モノクローナル抗体を用いて、現在イムノクロマトキットの開発を試みている。

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)

[雑誌論文] (計11件)

(1) H. Takahashi, K. Sato, T. Yamaguchi, M. Miyake, H. Watanabe, Y. Nagasawa, E. Kitagawa, S. Terada, M. Urakawa, M. T. Rose, C. D. McMahon, K. Watanabe, S. Ohwada, T. Gotoh, H. Aso: Myostatin alters glucose transporter-4 (GLUT4) expression in bovine skeletal muscles and myoblasts isolated from double muscled (DM) and normal muscled (NM) Japanese shorthorn cattle. Domestic Animal Endocrinology、査読有り、48巻、2014年、62-68、DOI:10.1016/j.domaniend.2014.01.007

(2) Hitoshi Watanabe, Ryo Saito, Tatsuya Nakano, Hideyuki Takahashi, Yu Takahashi, Keisuke Sumiyoshi, Katsuyoshi Sato, Xiangning Chen, Natsumi Okada, Shunsuke Iwasaki, Dian W. Harjanti, Natsumi Sekiguchi, Hiroaki Sano, Haruki Kitazawa, Michael T. Rose, Shyuichi Ohwada, Kouichi Watanabe, Hisashi Aso: Effect of peripheral 5-HT on glucose and lipid metabolism in wether sheep. PLoS ONE、査読有り、9(2)巻、2014年、e88058、DOI:10.1371/journal.pone.0088058

(3) Tomosada, Y., J. Villena, K. Murata, E. Chiba, T. Shimazu, H. Aso, N. Iwabuchi, J.-z. Xiao, T. Saito, H. Kitazawa: Immunoregulatory effect of bifidobacteria strains in porcine intestinal epithelial cells through modulation of

ubiquitin-editing enzyme A20 expression. PLoS ONE、査読有り、8(3)巻、2013年、e59259、DOI:10.1371/journal.pone.0059259

(4) Kozue Murata, Julio Villena, Yohsuke Tomosada, Risa Hara, Eriko Chiba, Tomoyuki Shimazu, Hisashi Aso, Yoshihito Suda, Noriyuki Iwabuchi, Jin-Zhong Xiao, Tadao Saito, Haruki Kitazawa: Bifidobacteria Upregulate Expression of Toll-Like Receptor Negative Regulators Counteracting Enterotoxigenic Escherichia coli Mediated Inflammation in Bovine Intestinal Epitheliocytes. Open Journal of Veterinary Medicine、査読有り、3巻、2013年、143-155、DOI:10.4236/ojvm.2013.32023

(5) Takanashi, N., Y. Tomosada, J. Villena, K. Murata, T. Takahashi, E. Chiba, M. Tohno, T. Shimazu, H. Aso, Y. Suda, S. Ikegami, H. Itoh, Y. Kawai, T. Saito, S. Alvarez, H. Kitazawa: Advanced application of bovine intestinal epithelial cell line for evaluating regulatory effect of lactobacilli against heat-killed enterotoxigenic Escherichia coli-mediated inflammation. BMC Microbiology、査読有り、13巻、2013年、54-69、DOI: 10.1186/1471-2180-13-54

(6) Iwasaki S., Miyake M., Watanabe H., Kitagawa E., Watanabe K., Ohwada S., Kitazawa H., Rose M. T., Aso H.: Expression of myostatin in neural cells of the olfactory system. Molecular Neurobiology、査読有り、47巻、2013年、1-8、DOI 10.1007/s12035-012-8342-1

(7) Miyake M, Takahashi H, Kitagawa E, Watanabe H, Sakurada T, Aso H, Yamaguchi T. AMPK activation by AICAR inhibits myogenic differentiation and myostatin expression in cattle. Cell and Tissue Research、査読有り、349(2)巻、2012年、615-623、DOI: 10.1007/s00441-012-1422-8

(8) Villena, J., R. Suzuki, H. Fujie, E. Chiba, T. Takahashi, Y. Tomosada, T. Shimazu, H. Aso, S. Ohwada, Y. Suda, S. Ikegami, H. Itoh, S. Alvarez, T. Saito, H. Kitazawa: Immunobiotic Lactobacillus jensenii modulates toll-like receptor 4-induced inflammatory response via negative regulation in porcine antigen presenting cells. Journal: Clinical and Vaccine Immunology、査読有り、19(7)巻、2012年、1038-1053、DOI: 10.1128/CVI.00199-12

(9) Eriko Chiba, Julio Villena, Shoichi Hosoya, Naoya Takanashi, Tomoyuki Shimazu, Hisashi Aso, Masanori Tohno, Yoshihito Suda, Yasushi Kawai, Tadao Saito, Kenji Miyazawa, Fang He, Haruki Kitazawa: A newly established bovine intestinal

epithelial cell line is effective for in vitro screening of potential antiviral immunobiotic microorganisms for cattle. Research in Veterinary Science, 査読有り、93 巻、2012 年、688-694、DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.10.002

(10) Takashi NAKAMURA, Miki SAITO and Hisashi ASO: Effects of a Lactobacilli, Oligosaccharide and Organic Germanium Intake on the Immune Responses of Mice. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 査読有り、76 (2)巻、2012 年、375-377、DOI: 10.1271/bbb.110655

(11) Tomoyuki Shimazu, Julio Villena, Masanori Tohno, Hitomi Fujie, Shoichi Hosoya, Takeshi Shimosato, Hisashi Aso, Yoshihito Suda, Yasushi Kawai, Tadao Saito, Seiya Makino, Shuji Ikegami, Hiroyuki Itoh, Haruki Kitazawa: Immunobiotic Lactobacillus jensenii elicit anti-inflammatory activity in porcine intestinal epithelial cells by modulating negative regulators of the toll-like receptor signaling pathway. Infection and Immunity, 査読有り、80 (1)巻、2012 年、276-288、DOI:10.1128/IAI.05729-11

[学会発表] (計 13 件)

(1) 高梨 暁、乳房炎牛乳汁中に増量するシクロフィリンAの細胞遊走活性、第 118 回日本畜産学会大会、2014 年 3 月 27 日、つくば市、国際会館

(2) 浦川めぐみ、乳房炎多発症牛への枯草菌給与における血中樹状細胞の動態、第 117 回日本畜産学会大会、2013 年 9 月 9 日、新潟市、新潟大学

(3) 佐藤勝祥、乳房炎発症牛への枯草菌給与における栄養因子への影響、第 117 回日本畜産学会大会、2013 年 9 月 9 日、新潟市、新潟大学

(4) 佐藤勝祥、乳房炎発症牛への枯草菌給与における分娩後の栄養因子およびストレス指標の変動、第 63 回東北畜産学会大会、2013 年 8 月 29 日、山形市、山形テルサ

(5) 浦川めぐみ、乳房炎多発症牛への枯草菌給与による乳房炎発症予防と血中樹状細胞の動態、第 63 回東北畜産学会大会、2013 年 8 月 29 日、山形市、山形テルサ

(6) 長澤裕哉、腸管 M 細胞における解糖系酵素アルドラーゼ A を介したプリオン蛋白質取り込み機構、第 116 回日本畜産学会、2013 年 3 月 28 日、名古屋、安田女子大学

(7) 染谷俊輔、炎症性腸疾患における腸上皮細胞由来シクロフィリン A の作用解明、第 116 回日本畜産学会、2013 年 3 月 28 日、名古屋、安田女子大学

(8) Nagasawa Y., Role of aldolase A in transcytosis of intestinal M cells. 2012 ASCB Annual Meeting. The American Society for Cell Biology, 2012 年 12 月 17 日、San

Francisco, USA

(9) 麻生久、乳汁中リンパ球遊走因子シクロフィリン A の乳房炎早期診断マーカーへの応用、第 17 回日本乳房炎研究会学術集会、2012 年 10 月 12 日、南青山会館、東京

(10) 長澤裕哉、腸管 M 細胞における解糖系酵素アルドラーゼ A を介した抗原取り込み機構、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 14 日、岩手大学

(11) 染谷俊輔、マウス DSS 誘導大腸炎と白血球遊走因子シクロフィリン A との関連性、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 14 日、岩手大学

(12) 菅原静夏、高抗病性ランドレース豚の免疫担当臓器におけるサイトカイン発現の特性解析、第 62 回東北畜産学会大会、2012 年 8 月 29 日、秋田県立大学

(13) Nagasawa Y., Prion protein binding proteins of bovine intestine M cell. Asian Pacific Prion Symposium 2012、2012 年 7 月 29 日、Yokohama, Japan

[図書] (計 2 件)

(1) 麻生久、デーリー・ジャパン社、乳房炎の防除: 乳質向上と免疫力アップ、2012 年、175 ページ

(2) Takashi Kanaya, Tetsuya Hondo, Kohtaro Miyazawa, Michael T. Rose and Hisashi Aso, Publisher: InTech, The Expression of Cytokeratins in Bovine Intestinal Microfold (M) Cells. In: Cytokeratins-Tools in Oncology, Gerhard Hamilton (Ed.), 2012 年、pp. 3-14,

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/keitai/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

麻生 久 (ASO, HISASHI)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：50241625

(2) 研究分担者

北澤 春樹 (KITAZAWA, HARUKI)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：10204885

渡邊 康一 (WATANABE, KOUICHI)
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：80261494

(3) 連携研究者

()

研究者番号：