

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660213

研究課題名(和文)ニワトリ消化管の抗菌ペプチドによる自然免疫機能とその強化への挑戦

研究課題名(英文)Challenge for enhancement of antimicrobial peptides expression responsible for innate immune functions in the gut of chicks

研究代表者

吉村 幸則 (Yoshimura, Yukinori)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：10167017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒナへのプロバイオティクス給与により、サルモネラ菌由来LPSの感作で誘導される、盲腸での抗菌ペプチドである6分子種のトリディフェンシン(AvBD)と2分子種のカテリシディン(CATH)の発現性が高まること、一方、プロバイオティクスの炎症性サイトカインの発現性への影響は小さいことが示された。プロバイオティクスは、腸内細菌叢の構成に影響して感染防御に寄与するという報告があるが、本実験の結果は、AvBDとCATHの発現性を向上させることを示唆している。このことは、プロバイオティクスは、ヒナ消化管の抗菌ペプチド産生による自然免疫能を高めて、感染防御機能を向上させることを示している。

研究成果の概要(英文)：The results of current study showed that probiotics feeding enhanced the responsiveness to Salmonella lipopolysaccharide for induction of expression of 6 avian defensins (AvBDs) and 2 cathelicidins in the chick cecum. However, probiotics feeding did not affect significantly the expression of inflammatory cytokines. There are reports showing that probiotics regulate the microflora in the intestine to suppress infection by pathogenic microorganisms, whereas the current study suggests that probiotics enhances the functions to synthesize AvBDs and CATHs. It is suggested that probiotics enhances the innate immunity by antimicrobial peptides in the gut, leading to enhancement of defense ability against pathogenic microbes.

研究分野：家畜生体機構学

キーワード：ニワトリ 消化管 プロバイオティクス 抗菌ペプチド 炎症性サイトカイン

### 1 . 研究開始当初の背景

ニワトリ消化管の病原菌による感染はニワトリの健康を傷害し、鶏肉や鶏卵を汚染して食中毒の原因にもなる。Toll 様受容体(TLR)は病原微生物の分子パターンを認識する受容体で、ニワトリでは7種のTLRが同定され、それぞれ異なるリガンドを認識する。このうち、TLR4 はサルモネラ菌などのグラム陰性菌が保有するリポ多糖 (LPS) を認識する。トリ β ディフェンシン(AvBD)とカテデリシディン (CATH) は抗菌ペプチドで、AvBD は 14 分子種、CATH は 4 分子種が同定されている。私達は、これまでのニワトリ卵管における研究成果から、消化管粘膜で TLR が微生物分子を認識すると、炎症性サイトカインや AvBD を産生させ、また白血球の感染部位への遊走や活性化に働くものと推定した。抗菌ペプチドの産生が高まればワクチンが開発されていない病原体に対しても感染防御機能が向上する。乳酸菌等のプロバイオティクス(有用生菌剤)は、腸管正常細菌叢の機能を高めたり、粘膜組織のサイトカインの発現を制御して免疫機能を向上させるものと期待されている。消化管細胞が AvBD を産生し、プロバイオティクスがこの AvBD 産生能を高めることが確立されれば、新たな消化管免疫機能の強化法の開発につながる。この機能は、消化管粘膜でリンパ球が活動する適応免疫系が未発達のヒナでは感染防御に重要であると考えられる。本研究はヒナ消化管における抗菌ペプチドの発現能を高めるためのプロバイオティクスの有効性を追究する考えに至った。

### 2 . 研究の目的

本研究は、ニワトリ消化管の感染防御機能を向上させるために、消化管に抗菌ペプチドの AvBD や CATH、炎症性サイトカインを発現する機能が備わっており、この機能がプロバイオティクスの給与により強化される可能性とその機構を追究することを目的とした。このために、プロイラーヒナの消化管粘膜において微生物成分を認識する TLR が発現して、グラム陰性菌成分の LPS による刺激が AvBD や CATH、炎症性サイトカインを誘導するか、プロバイオティクスは腺胃での AvBD 発現と AvBD 蛋白局在に影響するか、AvBD、CATH、炎症性サイトカインの発現を誘導する LPS の作用がプロバイオティクス給与により高まるか、この LPS の作用は LPS が由来する菌種によって異なるかを解析した。解析に用いた消化管の部位は、摂取した飼料が初期に到達する腺胃、微生物が最も多く生息する盲腸とした。

### 3 . 研究の方法

実験にはプロイラー (チャンキー) 雄初生

ヒナを用い、一部で日本鶏も供試した。プロバイオティクスにはニワトリ用トーアラゼ(乳酸菌  $1 \times 10^8/g$  以上、酪酸菌  $1 \times 10^7/g$  以上、糖化菌  $1 \times 10^7/g$  以上; 東亜薬品工業(株))を用いた。プロバイオティクス給与試験では、プロイラー飼料に 0.4% プロバイオティクス(プロバイオティクス区)または 0.4% 賦形剤(対照区)を 1 週間給与した。

実験 1 で、プロイラーヒナと日本鶏 (土佐地鶏、比内鶏、大軍鶏) を用いて、消化管に発現する TLR の同定、鶏種による消化管で発現する AvBD の差を検討した。実験 2 で、プロバイオティクス給与が腺胃における AvBD 遺伝子発現と AvBD 蛋白局在に及ぼす影響を解析した。実験 3 で、プロバイオティクス給与が、LPS 感作による AvBD、CATH、炎症性サイトカインの発現誘導に及ぼす影響を解析した。実験 4 で、プロバイオティクス給与したヒナをカンピロバクター LPS で感作し、抗菌ペプチド発現の誘導性が菌種によって異なるかを解析した。

AvBD、CATH、炎症性サイトカインの遺伝子発現は RT-PCR 法で解析した。AvBD 蛋白質の局在は私達が作製した抗体を用いて免疫染色により解析した。

### 4 . 研究成果

実験 1 . 消化管に発現する TLR の同定と AvBD 発現の鶏種による差

プロイラー初生ヒナの腺胃と盲腸で発現する TLR と AvBD を解析したところ、両組織で TLR1、2、3、4、5、7、21 のすべての TLR の発現が検出された。また LPS と同結合蛋白複合体の TLR4 による認識に必要な CD14 も両組織で検出された。TLR2 はグラム陽性菌、TLR4 はグラム陰性菌 LPS を認識し、TLR3、5、7、15、21 はそれぞれ dsRNA ウイルス、細菌鞭毛成分 (フラジェリン)、ssRNA ウイルス、細菌の分泌性酵素、CpG-DNA を認識

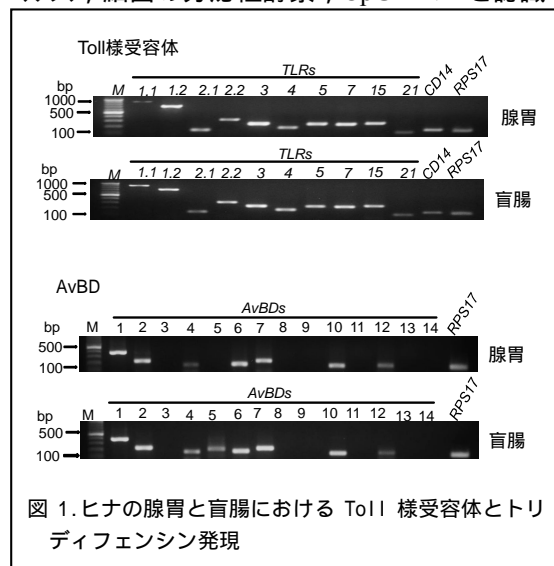


図 1. ヒナの腺胃と盲腸における Toll 様受容体とトリディフェンシン発現

する。本実験の結果から、腺胃と盲腸では多様な細菌とウイルスを認識すると考えられる。

次に、プロイラーと、土佐地鶏、比内鶏、大軍鶏における AvBD の発現様式を解析すると、鶏種を問わずに腺胃と盲腸で AvBD1, 2, 4, 6, 7, 10, 12 の発現が検出されたが、固体によって一部の AvBD 発現が認められず、多様性が存在することが示唆された。腺胃と盲腸で多様な分子種の AvBD が発現することから、これらの AvBD が多様な微生物による感染の防御に寄与するものと推察される。

実験 2 . プロバイオティクス給与が腺胃における AvBD 遺伝子発現と AvBD 蛋白局在に及ぼす影響

プロイラー雄ヒナを、対照区、プロバイオティクス I 区および同 II 区に分け、それぞれプロバイオティクスを 0, 0.2 または 0.4% 添加した飼料を初生時(D0)から 14 日目(D14)まで給与した。D0, D7 および D14 に腺胃を採取し、AvBD の遺伝子発現を解析するとともに、免疫染色による AvBD12 の局在解析を行った。腺胃で発現が認められた AvBD1, 2, 4, 6, 7, 10, 12 について、D7 および D14 の AvBD 発現を解析すると、いずれの AvBD も対照区とプロバイオティクス I 及び II 区との間で発現の差を示さなかった(図 2)。AvBD12 免疫反応産物(ir-AvBD12)は腺胃の表面上皮と深胃腺結合組織の細胞に検出された。対照区では表面上皮の ir-AvBD12 密度は D0 より D7 で増加し、D14 で D0 程度となった。D7 と D14 では、表面上皮 ir-AvBD12 密度は対照区よりプロバイオティクス I 及び II 区で低かった(図 3)。深胃腺の AvBD12 陽性細胞の密度は加齢とともに増加したが、D7 と D14 では対照区とプロバイオティクス I 及び II 区との間で差を示さなかった。これらの結果から、

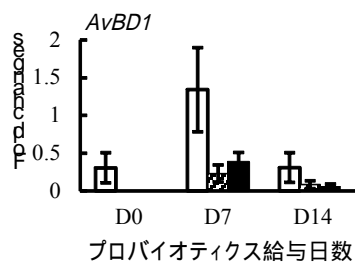


図 2 . プロバイオティクス給与が腺胃の AvBD1 発現に及ぼす影響 (一部のデータを抜粋)

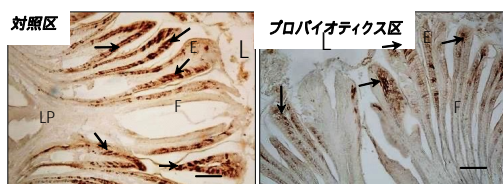


図 3 . プロバイオティクス給与が腺胃の AvBD12 分布に及ぼす影響 (一部のデータを抜粋)

プロバイオティクス給与は、ヒナ腺胃の AvBD 遺伝子発現には影響しないが、表面上皮の ir-AvBD12 密度を減少させると考えられた。この ir-AvBD12 密度の減少はプロバイオティクスが AvBD12 の分泌を促したことによる可能性が推察される。

実験 3 . LPS 感作による AvBD, CATH, 炎症性サイトカインの発現誘導に及ぼすプロバイオティクス給与の影響

プロバイオティクス給与が LPS (サルモネラ・ミネソタ)により誘導される AvBD 発現に及ぼす影響を解析した。プロイラー初生雄ヒナ(チャンキー)に 0.4%の賦形剤またはプロバイオティクスを含む飼料を 7 日間給与した(それぞれ非 P 給与群と P 給与群)。その後、LPS を含まない、1 μg または 100 μg の LPS を含む水溶液を経口投与した(それぞれ 0-LPS 区、1-LPS 区、100-LPS 区)。5 時間後に腺胃と盲腸の粘膜を採取し、AvBD1, 2, 4, 6, 7, 10, 12 発現を qRT-PCR 解析した。

その結果、プロバイオティクスと LPS を与えていないヒナの腺胃と盲腸のいずれでも、AvBD1, 2, 4, 6, 7, 10, 12 の発現が検出された。腺胃では、1 μg LPS 刺激すると(1-LPS 区)、AvBD6 と 12 の発現は P 給与群で非 P 給与群より高かったが、その他の AvBD は P 給与群と非 P 給与群との間で差を示さなかった。また 0-LPS 区と 100-LPS 区では、すべての AvBD 発現に P 給与群と非 P 給与群との間で差はなかった。

盲腸では、1-LPS 区において、AvBD1, 2, 4, 5, 6, 7 の発現が P 給与群で非 P 給与群より高かったが、AvBD10 と 12 の発現は P 給与群と非 P 給与群との間で差を示さなかった。0-LPS 区と 100-LPS 区では、すべての AvBD 発現に P 給与群と非 P 給与群との間で差はなかった。

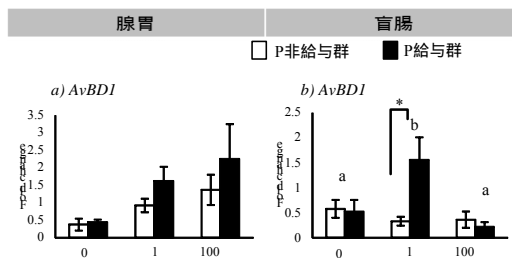


図 4 . LPS (*Salmonella Minnesota*)感作に伴う AvBD1 の発現変化に及ぼすプロバイオティクス給与の影響 (一部のデータを抜粋)

次に、プロバイオティクス給与が LPS (サルモネラ・ミネソタ)により誘導される CATH 発現に及ぼす影響を解析した。上述と同様に初生ヒナに 0.4%の賦形剤またはプロバイオティクスを含む飼料を 7 日間給与した(それぞれ P 給与群と非 P 給与群)。その後、LPS (サルモネラ・ミネソタ)を 0 μg, 1 μg または 100 μg 経口投与した(それぞれ 0-LPS 区、

1-LPS 区, 100-LPS 区)。5 時間後に腺胃と盲腸の粘膜を採取し, CATH 発現を解析した。

その結果, プロバイオティクスと LPS を与えていないヒナの腺胃と盲腸のいずれでも, CATH1, 2, 3 および 4 の発現が検出された。腺胃では, 0-LPS 区と 1-LPS 区の CATH1, 2, 3 発現は, P 給与群と非 P 給与群とで差を示さなかった。100  $\mu$ g LPS で刺激すると, CATH1, 2, 3 の発現は P 給与群と非 P 給与群とで差を示さなかったが, CATH4 発現は非 P 給与群より P 給与群で低かった。

盲腸では, 1  $\mu$ g の LPS で刺激すると, CATH3 と 4 の発現は非 P 給与群と P 給与群とで差を示さなかったが, CATH1 と 2 の発現が非 P 給与群より P 給与群で高かった。

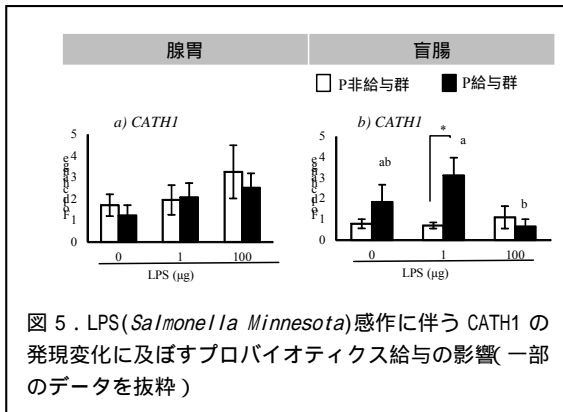


図 5 . LPS (*Salmonella Minnesota*) 感作に伴う CATH1 の発現変化に及ぼすプロバイオティクス給与の影響(一部のデータを抜粋)

次に, プロバイオティクスの給与が, LPS 感作による腺胃と盲腸の炎症性サイトカインの発現に影響するかを追究した。その結果, 腺胃では IL1 $\beta$  (図 6) と IFN $\gamma$  の発現は LPS の刺激に関わらず P 給与群と非 P 給与群とで差を示さなかった。IL6 と TNFS15 の発現は 0 または 10  $\mu$ g LPS の刺激では P 給与群と P 非給与群とで差を示さなかったが, 100  $\mu$ g LPS で刺激すると非 P 給与群より P 給与群が低かった。

盲腸では IL1 $\beta$  (図 6) と IL6 の発現は LPS の刺激に関わらず P 給与群と非 P 給与群とで差を示さなかった。IFN $\gamma$  の発現は 100 $\mu$ g LPS で感作すると非 P 給与群で P 給与群より低く, TNFS15 の発現は LPS 未刺激 (0-LPS) ヒナで, P 給与群が非 P 給与群で低かった。

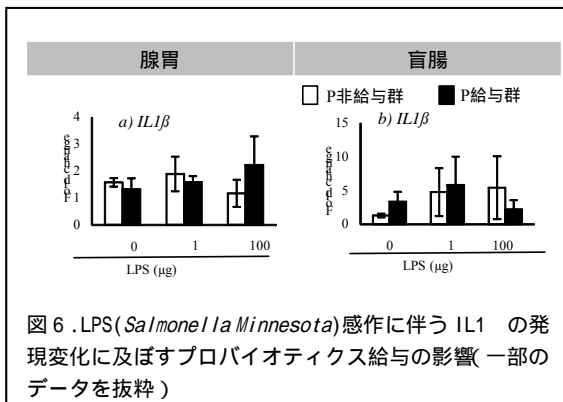


図 6 . LPS (*Salmonella Minnesota*) 感作に伴う IL1 の発現変化に及ぼすプロバイオティクス給与の影響(一部のデータを抜粋)

これらの結果から, 乳酸菌, 酪酸菌, 糖化

菌からなるプロバイオティクスの給与は, ヒナの盲腸においてグラム陰性菌 LPS への応答による AvBD1, 2, 4, 5, 6, 7 の発現性, そして CATH1 と 2 の発現性を高めると考えられた。一方, LPS 刺激に伴う炎症性サイトカインの発現性を高めるプロバイオティクスの作用は認められなかったため, 炎症性サイトカインが誘導する免疫応答へのプロバイオティクスの影響は不明である。しかし, プロバイオティクスは同サイトカインの発現を制御して組織の炎症を抑制する可能性が推定される。

実験 4 . カンピロバクター由来 LPS 感作による AvBD, CATH, 炎症性サイトカインの発現誘導に及ぼすプロバイオティクス給与の影響

プロバイオティクス給与したヒナに, 0, 1 または 100  $\mu$ g のカンピロバクター由来 LPS(cLPS)を経口接種し, 5 時間後に腺胃と盲腸の粘膜を採取し, AvBD1, 2, 4, 6, 7, 10, 12, CATH1-4, 炎症性サイトカインの発現を qRT-PCR 解析した。

その結果, 腺胃では cLPS 刺激後の AvBD1, 2, 4, 6, 7, 10 の発現に P 給与区と非 P 給与区との間に発現レベルの差は認められず, AvBD12 の発現は P 給与区が非 P 給与区より高かった。盲腸では cLPS 刺激後の AvBD の発現に P 給与区と非 P 給与区との間で発現レベルの差は認められなかった (図 7)。

cLPS 刺激後の CATH1-4 の発現レベルには, 腺胃と盲腸の両方で, P 給与区と非 P 給与区との間で差は認められなかった。盲腸では

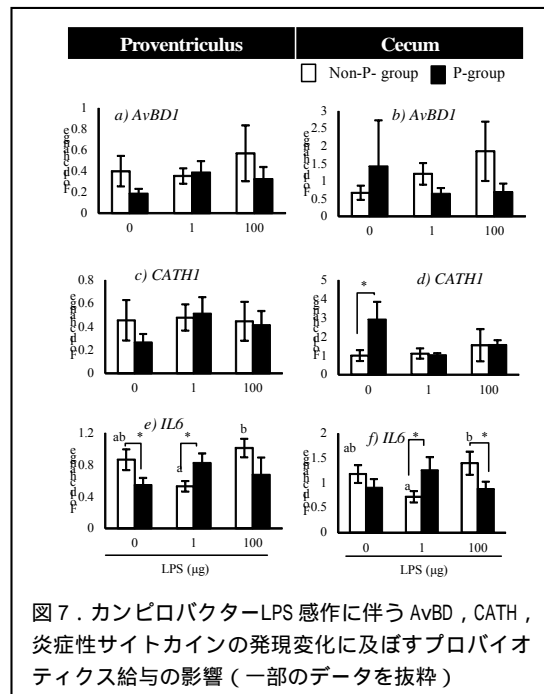


図 7 . カンピロバクター-LPS 感作に伴う AvBD, CATH, 炎症性サイトカインの発現変化に及ぼすプロバイオティクス給与の影響 (一部のデータを抜粋)

cLPS 刺激後の AvBD の発現に P 給与区と非 P 給与区との間で発現レベルの差は認められなかった (図 7)。

次に、腺胃と盲腸のいずれでも cLPS 刺激後の IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNFSF15 の発現レベルに P 給与群と非 P 給与群とで差は認められなかった。しかし、IL6 の発現は 1  $\mu$ g LPS の刺激で P 給与群が P 非給与群より高かった (図 7)。

これらのことから、カンピロバクター LPS はサルモネラ・ミネソタ LPS と異なって、プロバイオティクスを給与しても AvBD と CATH 発現を高めないか、または限定的な作用を示すのみであると考えられた。炎症性サイトカインの発現誘導も同様であるが、IL6 についてはプロバイオティクス給与で cLPS の作用は高まると思われる。

#### 考察とまとめ

本実験により、ヒナへのプロバイオティクス給与により、サルモネラ菌由来 LPS の感作で誘導される、盲腸での抗菌ペプチドである 6 分子種のトリ  $\beta$  ディフェンシン (AvBD) と 2 分子種のカテリシディン (CATH) の発現性が高めること、一方、プロバイオティクスの炎症性サイトカインの発現性への影響は小さいことが示された。プロバイオティクスは、腸内細菌叢の構成に影響して感染防御に寄与するという報告があるが、本実験の結果は、抗菌ペプチドの AvBD と CATH の発現性を向上させて防御機能を高めることを示唆するものである。消化管では LPS を認識する TLR4 とグラム陽性菌パターンを認識する TLR2 の発現が認められた。プロバイオティクスはグラム陽性菌で構成されているので、これの作用は TLR2 を介する可能性が推定される。LPS による抗菌ペプチド発現誘導は TLR4 を介すると思われるが、プロバイオティクスによる TLR4 の LPS 認識能、細胞内情報伝達・転写機能、抗菌ペプチド発現能への影響の機構は今後に解明されなければならない。データは示していないが、本研究では腸管粘膜のアセチル化ヒストンを免疫染色した。今後、プロバイオティクスの TLR とその下流因子への作用が、ヒストンや DNA 修飾によるエピジェネティクスで誘導される可能性を追究することが考えられる。

腺胃ではプロバイオティクスの AvBD と CATH の発現性への影響は認められなかった。この理由には、胃酸が豊富な腺胃の環境ではプロバイオティクスが定着・増殖しにくいことが推定される。一方で、プロバイオティクス給与は、腺胃の AvBD 発現には影響せず、AvBD 蛋白の密度を低下させたので、AvBD の分泌を促す可能性が示唆される。

さらに、カンピロバクター由来の LPS はサルモネラ・ミネソタ由来 LPS と異なって、プロバイオティクスを給与しても AvBD と CATH 発現を増強しなかった。この理由は不明であるが、生体内での LPS に対する抗菌ペプチド発現の反応性は TLR4 に加えて、他にも関与する因子があるかもしれない。データは示していないが、本研究では AvBD10 の免

疫染色により、AvBD10 は盲腸粘膜上皮の杯細胞に粘液と混在して検出されることを見出している。今後、この杯細胞の LPS 認識能を追究する必要もある。

以上、ヒナへのプロバイオティクス給与は、腺胃の AvBD 分泌を促進し、また盲腸でサルモネラ・ミネソタ LPS の感作にตอบสนองして AvBD と CATH を発現する機能を高めることが示された。このことは、プロバイオティクスが、消化管細菌叢を制御するだけでなく、自然免疫能も高めて、感染防御機能を向上させることを示すものである。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Mohammed ESI, Igarashi Y, Isobe N, Yoshimura Y (2015) Effects of probiotics on the expression and localization of avian beta-defensins in the proventriculus of broiler chicks. *Journal of Poultry Science* 52(1): 57-67. (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

寺田拓実・磯部直樹・吉村幸則: プロイラー雛の消化管粘膜におけるメチル化ヒストン局在の成長に伴う変化. 日本家禽学会 2016 年度春季大会 (2016 年 3 月 30 日, 日本獣医生命科学大学)

Mohammed ESI, Isobe N, Yoshimura Y: Probiotics effects on cathelicidins expression in response to LPS in the proventriculus and cecum of chicks. 日本畜産学会第 121 回大会 (2016 年 3 月 28 日-29 日, 日本獣医生命科学大学)

Yoshimura Y, Ariyadi B, Isobe N: Antimicrobial peptides expression for defense system in chicken gastrointestinal and reproductive organs. The 6th International Seminar on Tropical Animal Production (ISTAP) (October 20-22, 2015 Yogyakarta, Indonesia)

寺田 拓実・竹之内 惇・都築 政起・磯部 直樹・吉村 幸則: 異なる日本鶏初生ヒナの消化管粘膜に発現する抗菌ペプチド(トリ ディフェンシン)の比較. 平成 27 年度第 65 回関西畜産学会大会 (2015 年 9 月 3 日-4 日, 愛媛大学)

Mohammed E.S.I.・岡崎愛・磯部直樹・吉村幸則: プロイラー消化管の LPS によるトリ -ディフェンシン(AvBD)発現の誘導性及びプロバイオティクスの影響. 日本家禽学会 2015 年度春季大会 (2015 年 3 月 30 日, 宇都宮大学)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/anat/>

6．研究組織

(1)研究代表者

吉村 幸則 (Yoshimura Yukinori)

広島大学大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号：10167017

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし