

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660217

研究課題名(和文)ウシ乳房炎発症時に減少する血中樹状細胞の機能解明と新規治療法開発への応用戦略

研究課題名(英文)Function of blood dendritic cells in mastitis cow

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞は骨髄中の未熟な前駆細胞から分化し、抗原提示を行う免疫応答に必要な細胞である。本研究は、血中樹状細胞の発現動態とその機能を解析し、乳房炎発症制御機構との関連性を明らかにすることを目的とする。

乳牛では分娩後に乳房炎発症率が増加するが、枯草菌飼料添加剤給与は血中CD172a+CD11c+樹状細胞の割合を有意に増加させ、T細胞を活性化する第一シグナルCD40陽性率を低下させずに維持し、T細胞を活性化する第二シグナルであるCD80を増加する傾向があることを発見した。よって、枯草菌飼料添加剤は、樹状細胞の活性維持および活性化することによって乳房炎発症予防効果を発現することが判明した。

研究成果の概要(英文)：Dendritic cells (DC) are bone marrow-derived antigen presenting cells. They play an important role in priming adaptive immunity and in mature immune responses against pathogens. The biological activities of DC are highly dependent on their migratory potential and on the expression of adhesion molecules with T lymphocytes. DC secretes the cytokines and then polarizes immune responses to Th1-mediated cellular or Th2-mediated antibody responses.

We obtained blood samples from cows at 30 days before and after parturition, and then purified DC at more than 85% using MACS system. All of DC-fraction cells expressed DC surface makers such as MHC-II, CD172a and CD11c. Probiotic feed containing Bacillus subtilis C-31-2 strain increased the expression of costimulatory molecules CD80/86 and CD40 on the cell surface of DC. These data indicate that probiotics Bacillus subtilis C-31-2 strain is able to modulate the functions of T cells and inhibit the inflammation in mastitis cow.

研究分野：細胞生物学

キーワード：乳房炎 牛 樹状細胞 枯草菌飼料添加剤 イムノバイオティック飼料 CD40 CD80 補助因子

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 1000 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リ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、ウシ乳房炎の発症機構の解明とその治療法の開発が望まれている。

我々は、枯草菌飼料添加剤給与が毎年繰り返し発症するウシの乳房炎発症を予防することを見出し、血中樹状細胞の数的変動がその乳房炎発症に関連していることを世界で初めて発見した。樹状細胞(dendritic cell: DC)は骨髄中の未熟な前駆細胞から分化し、樹状あるいは樹枝状の形態で、主要組織適合性抗原複合体(MHC)クラス II 分子を恒常的に発現し、抗原提示を行う免疫応答に必須な細胞である(Nat Rev Immunol 2007)。樹状細胞は血液によって運ばれ、体中のあらゆる組織や器官に分布し、調節性 T 細胞(Treg)を活性化し、エフェクター T 細胞の誘導を抑制してキラー T 細胞を積極的に産生することにより、病原性微生物やその感染細胞を生体から効率的に排除し、炎症制御において主要な役割を担っている(Front Immunol 2013)。樹状細胞の免疫調節制御には、T 細胞活性化に必要な補助刺激分子を細胞上に発現し、サイトカイン産生することが必須であるが、乳房炎における樹状細胞の機能発現機構は殆ど解析されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

枯草菌飼料添加剤“イムノバイオティック飼料”給与が乳房炎を出産直後に毎年繰り返し発症するウシの乳房炎発症を予防することを見出した。その際、末梢血中免疫担当細胞の発現割合の解析を行い、非給与区の乳房炎発症した牛では出産直後から血中樹状細胞の割合が低値となり、枯草菌給与区の発症予防が確認されたウシでは血中樹状細胞が高い発現であることを世界で初めて発見した。よって、本研究は、粘膜免疫の調節機構において重要な役割を担う血中樹状細胞の発現動態とその機能を解析し、乳房炎発症制御機構との関連性を明らかにすることにより、ウシ乳房炎治療法開発への応用戦略を図る。

3. 研究の方法

本研究では、血中樹状細胞を磁気ビーズ法で精製し、免疫調節制御関連サイトカイン産生能および細胞表面上に発現した T 細胞活性化補助刺激分子の解析を行う。さらに、申

請者が確立した乳腺上皮細胞株と乳房炎原因菌による in vitro 乳房炎モデル系を用いて、血中樹状細胞の制御性 T 細胞誘導能を含めた機能性を解析し、乳房炎の炎症制御に関わる樹状細胞の動的・質的役割に加え、枯草菌を含めた免疫活性化型飼料“イムノバイオティック飼料”の有効性とその作用機構を明らかにすることにより、ウシ乳房炎治療法開発への応用戦略を図る。

我々は、乳房炎発症した牛では血中樹状細胞の割合が低値となり、発症予防が確認されたウシでは血中樹状細胞が高い発現であることを世界で初めて発見した。よって、健康牛および乳房炎発症牛より末梢血を採取し、磁気ビーズカラムを用いた MACS 法で末梢血中樹状細胞を精製し、細胞表面上に発現した T 細胞の活性化に必要な種々の補助刺激分子「MHC クラス II, B7 補助受容体(CD80, CD86), programmed cell death protein 1-ligand 1 (PDL1)」の FACS 解析に加え、サイトカイン産生能は real-time PCR 解析で行う。さらに、枯草菌飼料添加剤“イムノバイオティック飼料”を分娩予定日 1 ヶ月前から分娩後 1 ヶ月まで給与し、給与前および給与後の血液から MACS によって樹状細胞を精製し、FACS によって樹状細胞の機能性に関連する表面マーカーを測定し、さらに Real-Time PCR により精製した樹状細胞の遺伝子の発現も解析する。

4. 研究成果

(1) CD172a+CD11c+樹状細胞の割合

枯草菌飼料添加剤“イムノバイオティック飼料”給与区の血中 CD172a+CD11c+樹状細胞の割合は、給与により有意に増加した。

(2) CD172a+CD11c+樹状細胞の表面マーカーの解析

CD172a+CD11c+ 樹状細胞を用いて、MHC Class II (ヘルパー T 細胞に抗原提示を行う分子)、CD205 (組織樹状細胞が抗原を接着する分子)、CD40 (ヘルパー T 細胞表面の CD40L に接着し、T 細胞を活性化する第一シグナル) および CD80/CD86 (T 細胞を活性化する第二シグナル) の発現を解析した。

① MHC Class II+樹状細胞の割合

樹状細胞は MHC Class II を用いて、ヘルパー T 細胞に抗原提示を行う。枯草菌飼料添加剤“イムノバイオティック飼料”給与区の樹状細胞 MHC Class II の陽性率は分娩前後で有意な変化がなかった。

② CD205+樹状細胞の割合

CD205 は組織で樹状細胞の表面に存在し、抗原を接着する分子である。枯草菌飼料添加剤“イムノバイオティック飼料”給与区の樹状細胞 CD205 の陽性率は、分娩後が分娩前より減少する傾向があった。

③ CD40+樹状細胞の割合

CD40 はヘルパー T 細胞表面の CD40L を接着し、T 細胞を活性化する第一シグナルである。対照区では分娩後に減少したが、枯草菌飼料

添加剤“免疫バイオティック飼料”給与区の樹状細胞 CD40 の陽性率は分娩前後で変化がなかった。

④ CD80+樹状細胞の割合

CD80はT細胞を活性化する第二シグナルである。対照区では分娩後に減少したが、枯草菌飼料添加剤“免疫バイオティック飼料”給与区の樹状細胞 CD80 の陽性率は分娩後が分娩前より増加する傾向があった。

⑤ CD86+樹状細胞の割合

CD86はT細胞を活性化する第二シグナルである。対照区では分娩後に2例ともに減少したが、枯草菌飼料添加剤“免疫バイオティック飼料”給与区の樹状細胞 CD86 の陽性率も分娩後が分娩前より減少する傾向があった。

以上より、乳牛では分娩後に免疫系が低下して乳房炎発症率が増加するが、枯草菌飼料添加剤“免疫バイオティック飼料”給与は血中 CD172a+CD11c+樹状細胞の割合を有意に増加させ、樹状細胞のT細胞を活性化する第一シグナル CD40 陽性率を低下させずに維持し、T細胞を活性化する第二シグナルであるCD80を増加する傾向があることを発見した。よって、枯草菌飼料添加剤“免疫バイオティック飼料”は、樹状細胞の活性維持および活性化することによって乳房炎発症予防効果を発現することが判明した。

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 17 件) (以下全て査読有り)

1. Ishizuka, T., P. Kanmani, H. Kobayashi, A. Miyazaki, J. Soma, Y. Suda, H. Aso, T. Nochi, N. Iwabuchi, J.-z. Xiao, T. Saito, J. Villena, H. Kitazawa. Immunobiotic Bifidobacteria strains modulate rotavirus immune response in porcine intestinal epitheliocytes via pattern recognition receptor signaling. *PLoS One*. 11(3): 1-19, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0152416
2. Hitoshi Watanabe, Tatsuya Nakano, Ryo Saito, Daisuke Akasaka, Kazuki Saito, Hideki Ogasawara, Takeshi Minashima, Kohtaro Miyazawa, Takashi Kanaya, Ikuro Takakura, Nao Inoue, Ikuo Ikeda, Xiangning Chen, Masato Miyake, Haruki Kitazawa, Hitoshi Shirakawa, Kan Sato, Kohji Tahara, Yuya Nagasawa, Michael T. Rose, Shyuichi Ohwada, Kouichi Watanabe, Hisashi Aso, Serotonin improves high fat diet induced obesity in mice. *PLoS ONE* 11(1): e0147143, 1-14, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0147143
3. Jahidul Islam, Hitoshi Shirakawa, Thomas Kim Nguyen, Hisashi Aso, Michio Komai, Simultaneous analysis of serotonin, tryptophan and tryptamine levels in common

fresh fruits and vegetables in Japan using fluorescence HPLC. *Food Bioscience*, 13, 56-59, 2016.

doi:10.1016/j.fbio.2015.12.006

4. Hitoshi WATANABE, Xiangning CHEN, Noriaki SHOJI, Ryo SAITO, Tatsuya NAKANO, Kazuki SAITO, Keisuke SUMIYOSHI, Michael T. ROSE, Natumi OKADA, Kouichi Watanabe and Hisashi Aso; The stimulatory effect of plasma samples from fattening cattle on adipogenesis related gene expression in preadipocyte cells. *Animal Science Journal*, 86, 698-706, 2015. doi: 10.1111/asj.12344

5. Satoru Takanashi, Tomonori Nochi, Miku Abe, Nanami Itaya, Megumi Urakawa, Katsuyoshi Sato, Tao Zhuang, Saori Umamura, Tomohito Hayashi, Yoshio Kiku, Haruki Kitazawa, Michael T. Rose, Kouichi Watanabe and Hisashi Aso, Extracellular cyclophilin A possesses chemotactic activity in cattle. *Veterinary Research*, 46:80-89, 2015.

doi:10.1186/s13567-015-0212-1

6. Nagasawa Y, Takahashi Y, Itani W, Watanabe H, Hidaka Y, Mr. Morita S, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Imamura M, Yokoyama T, Horiuchi M, Sakaguchi S, Mohri S, Michael Rose, Nochi T, Aso H. Prion protein binds to aldolase A of bovine intestinal M cells. *Open journal of veterinary medicine*. 5: 43-60, 2015. DOI: 10.4236/ojvm.2015.53007

7. Yo Murofushi, Julio Villena, Kyoko Morie, Paulraj Kanmani, Masanori Tohno, Tomoyuki Shimazu, Hisashi Aso, Yoshihito Suda, Kenji Hashiguchi, Tadao Saito, Haruki Kitazawa: The toll-like receptor family protein RP105/MD1 complex is involved in the immunoregulatory effect of exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* N14. *Molecular Immunology* 64: 63-75, 2015.

doi:org/10.1016/j.molimm.2014.10.027

8. Masahiko Suzuki, Asuka Tada, Paulraj Kanmani, Hitoshi Watanabe, Hisashi Aso, Yoshihito Suda, Tomonori Nochi, Kenji Miyazawa, Kazutoyo Yoda, Fang He, Masataka Hosoda, Tadao Saito, Julio Villena, Haruki Kitazawa: Advanced Application of Porcine Intramuscular Adipocytes for Evaluating Anti-Adipogenic and Anti-Inflammatory Activities of Immunobiotics. *PLoS ONE* 10(3): e0119644, 2015.

DOI:10.1371/journal.pone.0119644

9. Nagai, Yasuhiro; Shiraiishi, Daisuke; Tanaka, Yukinori; Nagasawa, Yuya; Ohwada, Shyuichi; Shimauchi, Hidetoshi; Aso Hisashi; Endo, Yasuo; Sugawara, Shunji: Transportation of sublingual antigens

across sublingual ductal epithelial cells to the ductal antigen-presenting cells in mice. *Clinical & Experimental Allergy*, 45(3): 677-686, 2015. DOI: 10.1111/cea.12329

10. Villena J., Aso H. Kitazawa H., Regulation of toll-like receptors-mediated inflammation by immunobiotics in bovine intestinal epitheliocytes: Role of signaling pathways and negative regulators. *Frontiers in Immunology* 5 (421): 1-10, 2014. doi: 10.3389/fimmu.2014.00421

11. Takahashi T., Sato K., Kato S., Yonezawa T., Kobayashi Y., Ohtani Y., Ohwada S., Aso H., Yamaguchi T., Roh S.G., Katoh K., Increased plasma ghrelin suppresses insulin release in wethers fed with a high protein diet. *Journal of Endocrinology* 221(3): 371-380, 2014. DOI: 10.1530/JOE-13-0501

12. Satoshi Wachi, Paulraj Kanmani, Yohsuke Tomosada, Hisakazu Kobayashi, Toshihito Yuri, Shintaro Egusa, Tomoyuki Shimazu, Yoshihito Suda, Hisashi Aso, Makoto Sugawara, Tadao Saito, Takashi Mishima, Julio Villena, Haruki Kitazawa: Lactobacillus delbrueckii TUA4408L and its extracellular polysaccharides attenuate Enterotoxigenic Escherichia coli-induced inflammatory response in porcine intestinal epitheliocytes via Toll-like receptor-2 and 4. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58 (10): 2080-2093, 2014. DOI: 10.1002/mnfr.201400218

13. Yoshihito Suda, Julio Villena, Eriko Chiba, Maria Guadalupe Vizoso-Pinto, Yohsuke Tomosada, Takuya Takahashi, Takamasa Ishizuka, Hisashi Aso, Susana Salva, Susana Alvarez, Haruki Kitazawa, Immunobiotic Lactobacillus rhamnosus strains differentially modulate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial and antigen presenting cells. *BMC Microbiology*, 14 (126): 1-16, 2014. doi:10.1186/1471-2180-14-126

14. Shinichi Yonekura, Shohei Hirota, Yukako Tokutake, Michael T. Rose, Kazuo Katoh and Hisashi Aso: Dexamethasone and acetate modulate cytoplasmic leptin in bovine preadipocytes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 27 (4): 567-573, 2014. doi: org/10.5713/ajas.2013.13559

15. 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*, 48: 62-68, 2014. doi:10.1016/j.domaniend.2014.01.007

16. 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* 9(2): 1-20, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0088058

17. Kozue MURATA, Yohsuke TOMOSADA, Julio VILLENA, Eriko CHIBA, Tomoyuki SHIMAZU, Hisashi Aso, Noriyuki IWABUCHI, Jin-zhong XIAO, Tadao SAITO and Haruki Kitazawa. Bifidobacterium breve MCC-117 Induces Tolerance in Porcine Intestinal Epithelial Cells: Study of the Mechanisms Involved in the Immunoregulatory Effect. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 33 (1): 1-10, 2014. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2011.00837.x

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 高梨暁、浦川めぐみ、鈴木京、田口輝明、菊佳男、林智人、佐藤秀俊、渡邊康一、野地智法、麻生久(2016)乳汁に分泌される白血球遊走因子シクロフィリンAを指標とした乳房炎診断法への応用、第121回日本畜産学会大会(東京、日本獣医生命科学大学、2016年3月28日、29日)

2. 浦川めぐみ、高梨暁、佐藤秀俊、芦田延久、今林寛和、渡邊康一、野地智法、麻生久(2016)乳房炎多発牛への枯草菌給与と血中免疫担当細胞の動態、第121回日本畜産学会大会(東京、日本獣医生命科学大学、2016年3月28日、29日)

3. 浦川めぐみ・佐藤秀俊・芦田延久・今林寛和・高梨暁・渡邊康一・野地智法・麻生久(2015)枯草菌給与によるウシ乳房炎発症予防と血中免疫担当細胞の動態解析、第65回東北畜産学会大会(仙台、東北大学、2015年8月27日、28日)

4. 庄 涛・浦川めぐみ・渡邊康一・野地智法・麻生久(2015)ウシにおける末梢血中樹状細胞サブセットの同定、第2回乳房炎サマーカーキャンプ(宮城県、川渡公民館、8月22日、23日)

5. 麻生久、佐藤秀俊、浦川めぐみ、佐藤勝祥、板谷奈波、高梨暁、梅村紗緒里、芦田延久、今林寛和、渡邊康一、野地智法: 枯草菌給与による乳房炎発症予防効果とその作用機構。2015年ルーメン研究会、招待講演(2015年3月27日、宇都宮市、宇都宮大学)

6. 梅村紗緒里・高梨暁・板谷奈波・浦川めぐみ・菊佳男・林智人・渡邊康一・野地智法・麻生久：乳房炎誘導牛における乳汁中シクロフィリンA濃度の定量分析と乳房炎早期発見への応用。第119回日本畜産学会大会（2015年3月28日、宇都宮市、宇都宮大学）
7. 浦川めぐみ・佐藤秀俊・佐藤勝祥・板谷奈波・芦田延久・今林寛和・高梨暁・梅村紗緒里・渡邊康一・野地智法・麻生久：枯草菌給与による乳房炎牛の血中免疫担当細胞の動態解析。第119回日本畜産学会大会（2015年3月28日、宇都宮市、宇都宮大学）
8. 梅村紗緒里・高梨暁・板谷奈波・佐藤勝祥・浦川めぐみ・菊佳男・林智人・渡邊康一・野地智法・麻生久（2014）乳房炎発症と乳汁中シクロフィリン分泌量の関連性、第19回日本乳房炎研究会学術集会（2014年10月10日、東京、南青山会館）
9. 佐藤勝祥・佐藤秀俊・浦川めぐみ・板谷奈波・高梨暁・梅村紗緒里・芦田延久・今林寛和・渡邊康一・野地智法・麻生久（2014）枯草菌給与による乳房炎発症予防効果の検討、第19回日本乳房炎研究会学術集会（2014年10月10日、東京、南青山会館）
10. 浦川めぐみ・佐藤勝祥・佐藤秀俊・板谷奈波・高梨暁・梅村紗緒里・芦田延久・今林寛和・渡邊康一・野地智法・麻生久（2014）枯草菌給与が乳牛の血中免疫担当細胞へ与える影響、第19回日本乳房炎研究会学術集会（2014年10月10日、東京、南青山会館）
11. 浦川めぐみ・佐藤勝祥・佐藤秀俊・板谷奈波・高梨暁・芦田延久・今林寛和・渡邊康一・野地智法・麻生久（2014）枯草菌給与による乳牛の血中免疫担当因子への影響、第64回東北畜産学会大会（2014年9月11日、福島市、コラッセ福島）
12. 佐藤勝祥・佐藤秀俊・浦川めぐみ・板谷奈波・高梨暁・芦田延久・今林寛和・渡邊康一・野地智法・麻生久（2014）枯草菌給与による乳房炎発症予防効果の検討と分娩前後の栄養状態への影響、第64回東北畜産学会大会（2014年9月11日、福島市、コラッセ福島）
13. 梅村紗緒里・高梨暁・板谷奈波・佐藤勝祥・浦川めぐみ・菊佳男・林智人・渡邊康一・野地智法・麻生久（2014）乳汁中シクロフィリン測定による乳房炎発症リスクの定量的分析、第64回東北畜産学会大会（2014年9月11日、福島市、コラッセ福島）
14. 高梨暁・梅村紗緒里・板谷奈波・阿部未来・佐藤勝祥・浦川めぐみ・渡邊康一・野地智法・麻生久（2014）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1回乳房炎サマーキャンプ（2014年8月9日、北海道旭川市）

〔図書〕（計2件）

1. 麻生久：第5章「筋肉の構造」p116-128、第8章「免疫機能」p166-179、新編家畜生理学（編：加藤和雄ほか）（養賢堂）平成27年

（2015年）4月10日

2. 獣医組織学 第6版（編集：日本獣医解剖学会，学窓社，2014） 分担執筆：渡邊康一・麻生久，「第6章 筋組織」，p.73-84.

〔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

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

野地智法 (NOCHI TOMONORI)
 東北大学・大学院農学研究科・准教授
 研究者番号：10708001

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