様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ８ 月 ３１ 日現在

機関番号：１３８０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2013～2014
課題番号：２５５６００４８

研究課題名（和文）乳児の腸管免疫機能の向上を目的とした乳汁中CCL25の生理学的機能性の解明

研究課題名（英文）Elucidation of physiological functionality of CCL25 in milk for the enhancement of gut immunity in neonate

研究代表者
茶山　和敏（SAYAMA, Kazutoshi）

静岡大学・（連合）農学研究科（研究院）・准教授

研究者番号：３０２６０５８２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、第一に、マウス乳汁中のCCL25の継時的な定量を行った。第二に、CCL25を添加した人工乳を用いてマウス新生仔の人工哺育を行い、その成長と免疫器官の発達に対する乳汁中CCL25の機能性を調べた。
マウス乳汁中のCCL25は初乳中に最も多く、常乳中にも常時存在していた。また、CCL25含有人工乳で哺育された新生児の体重と脾臓および胸腺の重量は対照群と比較して有意に重かった。また、小腸内IgA産生細胞とパイエル板はCCL25含有人工乳投与群でその数が多い傾向がみられた。
以上の結果から、乳汁中CCL25はマウス新生児の成長及び免疫器官の発達に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this research, we analyzed the concentration of CCL25 in mouse milks from Day 0 to Day 10 after the parturition. Moreover, mouse neonates were cared by artificial-feeding using CCL25 containing formula and the growth and development of immune organs were examined.
As a result, the concentration of CCL25 in the milk was highest in the colostrum and also contained in regular milk. On the other hand, the growth and weight of spleen and thymus in CCL25 fed neonates were significantly larger than them in the controls. Moreover, the numbers of IgA-producing cells and Peyer patches also showed the tendency to increase in CCL25 fed neonates.
These results indicate that CCL25 in milk was essential to the growth and development of immune organs and the function in mouse neonates.

研究分野：食品機能学

キーワード：CCL25　新生児　人工哺育　腸管免疫

１．研究開始当初の背景

ケモカインの一つである CCL25 は腸管免疫、特に腸管内の細菌感染の防御に関与している腸管内の IgA 分泌に中心的な役割を果たしていることが知られている。申請者は、初乳中の IgA 分泌に CCL25 が関与していると考え、乳腺組織内の CCL25 発現を調べた。しかしながら、CCL25 は乳腺組織内で発現しているものの、初乳中の IgA 産生に直接的にかかわっていることを示唆する結果は得られなかった。
そこで、マウスの初乳を採取して、乳汁中での CCL25 の有無を調べた。その結果、初乳中に CCL25 が存在していることを世界で初めて確認した。
乳児の腸管における CCL25 とそのレセプターである CCR9 の発現は、唯一ブタにおいて報告があるだけで（F.Merrens, et al, 2006）、乳児の腸管内におけるそれらの経時的な発現の変化、乳汁中の CCL25 による腸管内の CCR9 の発現の変化やリンパ球や IgA 産生細胞の誘引、さらには IgA 分泌の促進、腸管内免疫小器官の発達に関する検討はこれまでまったく行われていない。

２．研究の目的

CCL25 はリンパ球や IgA 分泌細胞の胸腺や小腸へのホーミングに関与することが判明しているケモカインの一つで、腸管免疫に深く関与していると考えられている。そして、最近の我々の研究で、マウスの乳汁中に CCL25 が含まれていることが明らかになった。しかしながら、乳汁中のケモカイン CCL25 の生理学的役割については全く報告されていない。そこで、本研究では、研究（１）として、マウス新生児の腸管内における IgA 産生細胞の出現時期と CCL25 および CCR9 の発現時期を確認した。そして、研究（２）では、乳汁中 CCL25 が新生児の腸管発達、特に、腸管免疫機能の発達にどのような役割を果たしているかを明らかにするために、CCL25 を添加したマウス用人工乳を用いてマウス新生仔を人工哺育し、腸管免疫や免疫系器官である脾臓や胸腺などの発達に対する効果を検討した。

３．研究の方法

研究(１)では、ddY 系の新生仔マウスを用いて、生後０日目、生後１日目、生後２日目、生後５日目、生後 10 日目、生後 21 日目の６群を作成した。各マウスから腸管を摘出し、小腸と大腸組織中の CCL25 および CCR９の mRNA 発現量の経時的変化を分析した。さらに、免疫組織化学的染色を用いて、小腸組織中の CCL25 及び IgA 分泌細胞の経時的存在を調べた。
研究（２）では、ddY 系の新生仔マウスを生後２日齢まで母乳哺乳させ、生後３日齢から CCL25 添加あるいは無添加人工乳汁を作製して、人工哺育した。10 日齢まで７日間人工哺育した後に解剖し、小腸及び大腸、脾臓、胸腺の各重量と小腸内のパイエル板の数と大きさを測定した。その後、CCL25 と CCR9 遺伝子発現量を分析するとともに、免疫組織化学的染色によって小腸組織中 IgA 産生細胞の存在を調べた。

４．研究成果

研究(１)

① リアルタイム PCR による腸管組織中 CCL25 mRNA の発現

腸管組織の CCL25 mRNA の発現について解析した結果、離乳時期である生後 21 日目群の発現量を１とした時、小腸での CCL25 mRNA 発現量は、生後０日目群で 0.12±0.07、生後１日目群で 0.09±0.06、生後２日目群で 0.39±0.04、生後５日目群で 0.62±0.003、生後 10 日目群で 0.07±0.05 であり、CCL25 mRNA の発現量は、生後２日目から増加し始めて、その量は経時的に増加し、生後５日目群から生後 21 日目群まで、その発現量は０日目群に比べて、有意に増加した（Fig.1-A）。また、大腸での発現量は、生後０日目群 0.41±0.04、生後１日目群 0.33±0.01、生後２日目群 0.27±0.02、生後５日目群 0.08±0.006、生後 10 日目群 0.09±0.006 であり、生後 21 日目群が最も高かった(Fig.1-B)。

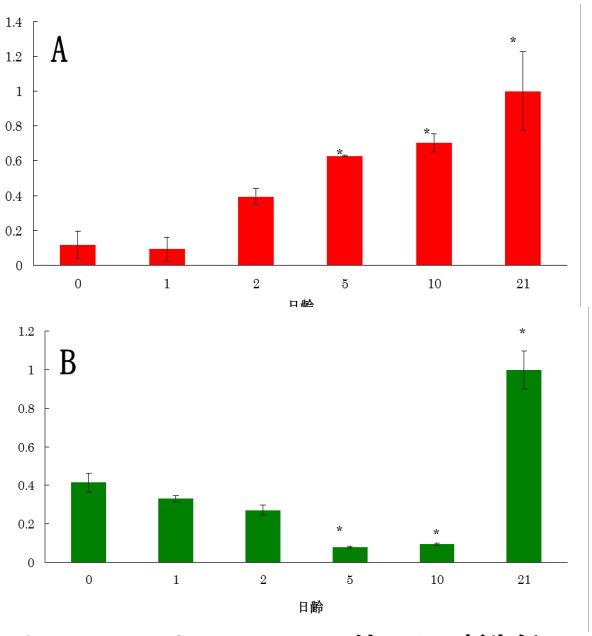


Fig.1 リアルタイム RT-PCR 法による新生仔マウス腸管の CCL25 mRNA の解析。

Ct 値から相対的に mRNA 量を算出し、出生 21 日目の平均値を１として、各群の値を平均±標準誤差で表した。
A．小腸における CCL25 mRNA 発現量の比較
B．大腸における CCL25 mRNA 発現量の比較*：出生０日目の CCL25 mRNA 発現量と比較して有意差あり（$P<0.05$）

② リアルタイム PCR による腸管組織中 CCR9 mRNA の発現

腸管組織の CCR9 mRNA の発現量は、小腸では、生後 21 日目群を１とした時、生後０日目群 0.15±0.04、生後１日目群 0.25±0.006、生後２日目群 0.02±0.01、生後５日目群 0.50±0.01、生後 10 日目群 0.7±0.01 であり、CCR9 mRNA の発現量は、生後０日目に比較して、生後５日目から有意に増加し始め、その量は経時的に増加していた。そして、生後 21 日目群の CCR9 mRNA 量が最も高い値を示した。(Fig.2-A)。大腸での発現量は、生後０日目群 0.006±0.0005、生後１日目群 0.036±0.008、生後２日目群 0.005±0.001、生後５日目群 0.005±0.0003、生後 10 日目群 0.004±0.0004 であり、CCR9 mRNA の発現量は、生後１日目群、生後２日目群、生後５日目群及び生後 10 日目群では低い値を示しており、生後 21 日目群がピークになることが分かった(Fig.2-B)。

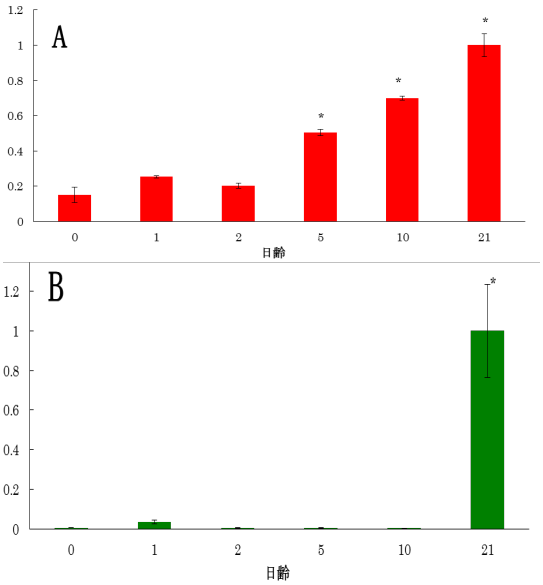
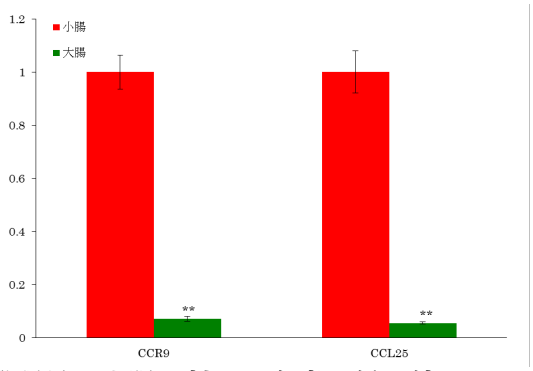


Fig.2 リアルタイム RT-PCR 法による新生仔マウス腸管の CCR9 mRNA の解析。

Ct 値から相対的に mRNA 量を算出し、出生 21 日目の平均値を１として、各群の値を平均±標準誤差で表した。
A．小腸における CCR9 mRNA 発現量の比較
B．大腸における CCR9 mRNA 発現量の比較
*：出生０日目の CCL25 mRNA 発現量と比較して有意差あり（P<0.05）

③ 生後 10 日目大腸と小腸における CCL25 と CCR9 mRNA 発現量の比較

腸管における CCL25 mRNA 発現量は、小腸の発現量を１とした時、大腸の CCL25 mRNA 発現量は 0.07±0.009 である。また、CCR9 mRNA 発現量は、小腸の発現量を１とした時、大腸の CCR9 mRNA 発現量は 0.06±0.003 であり、大腸の CCL25 mRNA 及び CCR9 mRNA の



発現量は小腸に対して有意に低い値を示すすことが明らかとなった(Fig.3)。

Fig.3 生後10日目大腸と小腸における CCL25 mRNA と CCR9 mRNA 発現量の比較。

Ct 値から相対的に mRNA 量を算出し、小腸の CCL25 mRNA 及び CCR9 mRNA の平均値を１として、二群の値を平均±標準誤差で表した。
**:生後10日目の小腸の CCL25 mRNA 及び CCR9 mRNA 発現量と比較して有意差あり（P<0.01）

④ CCL25 抗体を用いた免疫組織化学的染色法による小腸組織の CCL25 の経時的変化

CCL25-FITC 抗体を用いて小腸組織において CCL25 の発現に免疫組織化学染色法を行った。蛍光実体顕微鏡で蛍光染色の陽性部位を観察した結果、生後０日目群、生後２日目群及び生後５日目群において小腸の絨毛上皮に CCL25 の発現はほとんど確認できなかったが、生後１日目群、生後 10 日目群及び生後 21 日目群では、絨毛上皮に CCL25 の発現が確認できた。

⑤ 免疫組織化学的染色法による IgA 抗体を用いた小腸組織の IgA 産生細胞の経時的変化

IgA-RITC 抗体を用いて小腸組織において IgA 産生細胞の発現に免疫組織化学染色法を行った。蛍光実体顕微鏡で蛍光染色後に観察を行った結果、生後０日目群、生後２日目群及び生後５日目群では小腸の絨毛上皮に IgA 産生細胞の発現はほとんど確認できなかったが、生後 10 日目群では、ほとんどの、生後 21 日目群ではすべての絨毛上皮に IgA 産生細胞の存在が確認できた。

研究(２)、CCL25 添加人工乳汁を用いた人工哺育法による新生仔マウス腸管発達の検討

① 人工哺育したマウス新生仔の体重変化

人工哺育した新生仔マウスの体重変化を調べた結果、生後４日齢までコントロール群とほぼ同等の体重だったが、５日齢以降は、CCL25 添加群の新生仔マウスの体重はコントロール群に比べて有意に増加した(Fig.6)。

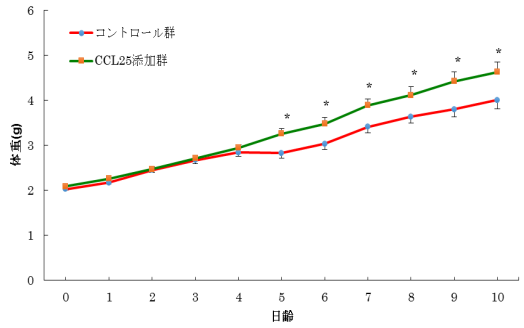


Fig.6 人工哺育した新生仔マウスの体重の継時的比較。
*:コントロール群の小腸の体重と比較して有意差あり（$P<0.05$）

② 人工哺育した新生仔マウスの免疫器官の重量およびパイエル板に対する影響

脾臓や胸腺、及び腸管の重量を CCL25 添加群とコントロール群で比較した(Fig.7)。体重当たり免疫系器官である脾臓や胸腺、及び腸管の体重当たりの重量で比較した結果、コントロール群の脾臓（SP）3.95%±0.05、胸腺（Thy）4.00%±0.06、大腸（LI）7.02%±0.08 及び小腸（SI）5.46%±0.10 であったのに対して、CCL25 添加群の脾臓重量（SP）は 4.99%±0.058、胸腺重量（Thy）は 4.95%±0.059、大腸重量（LI）は 6.99%±0.04 及び小腸重量(SI)は 6.44%±0.06 であった。CCL25 添加群では、コントロール群に対して、小腸の重量が重い傾向が見られ、さらに、脾臓及び胸腺の重さが有意に重かった。これに対して、体重あたりの大腸の重量はコントロール群と CCL25 添加群でほぼ同じ値を示した。

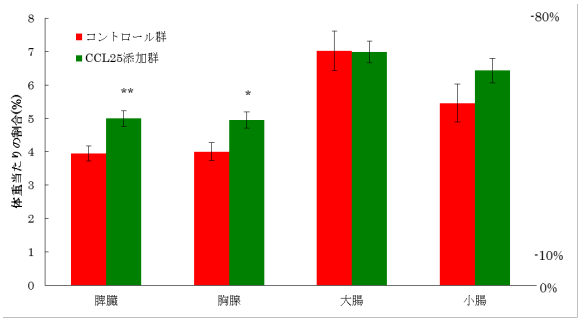


Fig.7 人工哺育した新生仔マウスの体重あたりの臓器重量の比較。

**：コントロール群の小 IgA 産生細胞数と比較して有意差あり（$P<0.01$）

また、パイエル板の個数及び大きさを比較した結果、個々のパイエル板の大きさには差がみられなかったが、CCL25 添加群のパイエル板の個数はコントロール群よりも多い傾向がみられた(Fig.8)。

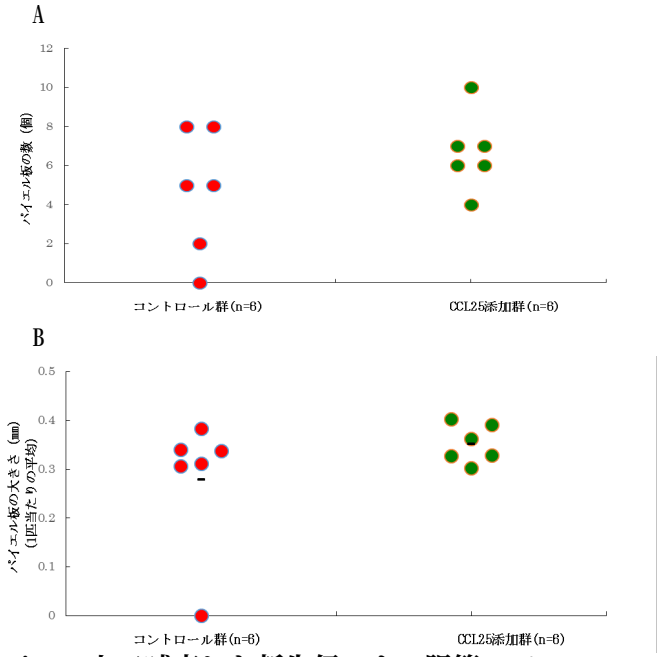


Fig.8 人工哺育した新生仔マウス腸管のパイエルの個数及び大きさの比較。

A. 人工哺育した新生仔マウスのパイエル板の数
B. 人工哺育した新生仔マウスのパイエル板の大きさ

③ 人工哺育したマウス小腸における CCL25 mRNA 発現量の比較

腸管組織の CCL25 mRNA の発現について、コントロール群の小腸 CCL25 mRNA 発現量を 1 とした時、CCL25 添加群での発現量は 0.79±0.11 であり、CCL25 mRNA の発現量は、有意差はないものの、コントロール群で発現量が高い傾向が見られた(Fig.9)。

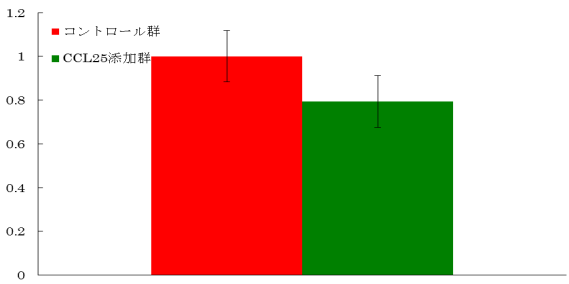


Fig.9 リアルタイム RT-PCR 法による人工哺育した新生仔マウス小腸における CCL25 mRNA 発現量の解析。

Ct 値から相対的に mRNA 量を算出し、コントロール群の平均値を 1 として、CCL25 添加群の値を平均±標準誤差で表した。

④ 人工哺育したマウス小腸における CCR9 mRNA 発現量の比較

腸管組織の CCR9 mRNA の発現量を Fig.10 に示した。コントロール群の小腸 CCR9 mRNA 発現量を 1 とした時、CCL25 添加群での発現

量は 1.29±0.16 であり、有意差はなかったが、CCR9 mRNA の発現量は、CCL25 添加群で発現量が高い傾向が見られた。

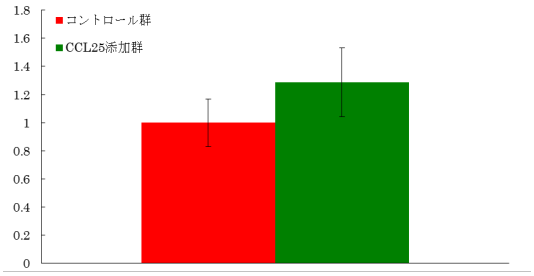


Fig.10 リアルタイム RT-PCR 法による人工哺育した新生仔マウス小腸における CCR9 mRNA 発現量の解析。

Ct 値から相対的に mRNA 量を算出し、コントロール群の平均値を 1 として、CCL25 添加群の値を平均±標準誤差で表した。

⑤ 小腸の腸絨毛における IgA 産生細胞数の比較

IgA-RITC 抗体を用いて小腸組織の IgA 産生細胞の免疫組織化学染色を行い、IgA 産生細胞数を比較した結果、７本の絨毛内に確認できた IgA 産生細胞数は、CCL25 添加群では 43.75±1.24、コントロール群では 1.33±0.2 とほとんど見られず、乳汁中の CCL25 が出産後 10 日目までの IgA の誘引に必須であることが判明した。

以上の結果から、マウス新生仔では、乳汁中の CCL25 によって、その成長が顕著に促進されるとともに、免疫器官の発達もより強く促されることが判明した。また、CCR9 発現リンパ球が腸管上皮へ誘引されることが明らかとなり、CCL25 のリンパ球誘引作用によって、パイエル板の形成やそこへの免疫細胞の集積も含めた腸管免疫の働きが高まることが考えられた。本研究の結果は母乳の重要性を再認識させるとともに、CCL25 を含めた乳汁中のケモカインやサイトカインの経口投与研究をより詳細に進めることで、新生児の成長や感染症防止、検疫機能向上をもたらすことができるより進歩した人工乳の開発にも寄与できる可能性がある。さらには、アトピーなどの新生児からの免疫疾患との関連にもつながるかもしれない非常に重要な研究課題と考えられることから、今後の研究の進展に期待するものである。

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）

〔産業財産権〕
○出願状況（計１件）

名称：免疫機能発達促進剤及び成長促進剤
発明者：茶山和敏
権利者：同上
種類：特許
番号：2015-123682
出願年月日：2015 年 6 月 19 日
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等
http://www.agr.shizuoka.ac.jp/abc/sayama/index.html

６．研究組織
(1)研究代表者
茶山　和敏（SAYAMA Kazutoshi）
静岡大学大学院総合科学時術研究科農学専攻・准教授
研究者番号：３０２６０５８２