

ルーメン上皮由来の抗菌ペプチドの新規生理作用の解明

東北大学大学院農学研究科・教授 盧 尚建

■ 目的

反芻動物にとってルーメンは短鎖脂肪酸(SCFA)の産生、代謝および吸収を担う重要な器官である。易発酵性飼料の給餌は、乳牛、肉牛の生産性向上や仔ウシの短期間での成長に不可欠であるが、亜急性ルーメンアシドーシス(SARA)の誘導によりルーメン上皮に損傷を与える可能性がある。これまで、黒毛和種仔ウシにおけるトランスクリプトーム解析により、離乳前後のルーメン絨毛組織でS100タンパク質ファミリーの発現が変動することが示唆された。S100タンパク質ファミリーは、ルーメンと同じ重層扁平上皮を持つ皮膚において自然免疫を担うことから、ルーメンにおいても同様の機能を持つと考えられる。よって、本研究では、ルーメン上皮におけるS100タンパク質ファミリーの機能を明らかにすることを目的とした。

■ 方法

(実験1)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))とホルスタイン成畜からルーメン組織採材した。ホルスタイン種雄仔ウシのルーメン組織に関して、S100タンパク質ファミリーの遺伝子発現量をqRT-PCRにより解析した。また、免疫組織化学染色により、採材したルーメン組織におけるS100A8の局在を解析した。

(実験2)実験1の離乳前後の仔ウシ、成畜から単離した培養ルーメン上皮細胞に、SCFAと低pH、 β -ヒドロキシ酪酸、乳酸、リポポリサッカライド(LPS)、フラジェリン、インターロイキン-1 β 処理をした後、S100A8とS100A9の遺伝子発現量を解析した。これにより、成長段階によるS100タンパク質ファミリー発現量を解析した。

(実験3)培養ルーメン上皮細胞にカルプロテクチンを処理し、細胞生存率をMTT法により解析した。

■ 結果および考察

(実験1)qRT-PCRの結果より、S100A7が35日齢区と比較して63日齢区で有意に低かった($P<0.05$)。S100A2、S100A8とS100A9については35日齢区と比較して63日齢区で低値を示した。また、免疫組織化学染色より、離乳前後と成畜のルーメン組織においてS100A8はルーメン上皮の顆粒層と有棘層に局在していた。ヒトやウシの乳腺組織においてS100A7は抗菌活性を持つことから、特に、離乳前のルーメン上皮の自然免疫を担うことが示唆された。

(実験2)SCFA処理した培養細胞(35日齢、成畜)では、S100A8($P<0.001$)、S100A9($P<0.001$)の遺伝子発現量が有意に低かった。これらのことから、短鎖脂肪酸はS100ファミリーの上方発現には寄与しないと考えられる。また、LPS処理した培養細胞(35日齢、63日齢、成畜)においてS100A8($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.001$)、S100A9($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.001$)の発現量が有意に高かった。LPSはルーメン内pHの変化によりグラム陰性菌から放出されるため、易発酵性飼料給餌時によるルーメン内pH変化時に、S100ファミリーの発現が上方制御される可能性が示唆された。

(実験3)MTTアッセイの結果では、培養ルーメン上皮細胞の細胞生存率において、カルプロテクチン添加(2と4 $\mu\text{g/ml}$)による影響はなかった。

■ 結語

本研究により、ルーメン上皮においてカルプロテクチンは、(1)離乳期においては、離乳後ではなく離乳前の自然免疫を担うこと、(2)易発酵性飼料給餌時には、SCFAではなく、ルーメン内で放出されるLPSにより上方制御され、上皮の崩壊に備えることが明らかになった。