

総 説

ウシの免疫機能と乳腺免疫

山口高弘

東北大学大学院農学研究科

(〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1)

末梢血中の白血球やT細胞サブセットの存在比率やバランスは、免疫応答を把握する上で重要な指標となるが、ウシの末梢血における白血球（顆粒球、T細胞、B細胞、単球）およびT細胞サブセット（CD4⁺、CD8⁺、 $\gamma\delta$ T細胞）の出現割合は十分に把握されていない。

ウシ $\gamma\delta$ T細胞は、Workshop Cluster 1 (WC1) とCD8の発現パターンによって、WC1⁺CD8⁻ $\gamma\delta$ T細胞、WC1⁻CD8⁺ $\gamma\delta$ T細胞とWC1⁻CD8⁻ $\gamma\delta$ T細胞のサブセットに分類され、WC1とCD8を共に発現する $\gamma\delta$ T細胞は存在しない。WC1分子は、215kDaの膜糖タンパク質であり、ウシの $\gamma\delta$ T細胞でのみ発現し、ヒトやマウスのT細胞では認められない。機能的には、IL-2のシグナルを制御することで $\gamma\delta$ T細胞の増殖を抑制することが知られている。また、WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞はレプトスピラやマイコバクテリアなどの感染病原体を認識して、活性化や増殖を行う。さらに、WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞は、子ウシの末梢血中に非常に高い割合で存在することから、幼若期のウシの免疫機能の恒常性の維持に重要な役割を持つと考えられている。CD8⁺ $\gamma\delta$ T細胞は脾臓や粘膜組織に多く存在し、マイクロアレイ解析ではWC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞がWC1⁻ $\gamma\delta$ T細胞より細胞増殖に関連した遺伝子の発現が高いことが報告されている。したがって、WC1分子の発現の有無が、ウシの $\gamma\delta$ T細胞サブセットの機能に深く関与していることが予想される。一方で、乳腺では $\gamma\delta$ T

細胞は免疫抑制的に作用している。しかしながら、ウシの $\gamma\delta$ T細胞サブセット機能の詳細は十分に理解されていない。

シンポジウムでは、ウシの末梢血でのT細胞サブセット、 $\gamma\delta$ T細胞サブセットの存在割合、機能的特性と乳腺免疫に関する我々の知見を中心に紹介する。

1) ウシ末梢血の白血球とT細胞サブセットの出現割合

黒毛和種の1ヵ月齢の子牛において、雌では顆粒球が、雄ではT細胞がそれぞれ高い出現率を示した。B細胞と単球の割合、T/B細胞比に雌雄間の有意な差は認められなかった。2ヵ月齢の雌において、顆粒球の割合が1ヵ月齢の47.3%から2ヵ月齢の33.0%に、B細胞の割合が12.3%から23.5%に有意に変化した。T細胞割合の変化は認められなかった。その結果T/B細胞比は2.4から1.4に低下した。

T細胞サブセットの出現割合は、雌雄間で有意な差は認められず、CD4⁺/CD8⁺T細胞比は雌雄ともに2以上であった。1ヵ月齢から2ヵ月齢にかけて、雄の $\gamma\delta$ T細胞の割合が53.2%から42.1%に有意に減少し、なかでもWC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞の割合が著しい減少を示した。これらのことから、黒毛和種新生子牛では、雌雄間の免疫応答に違いがある可能性が示された。

一方、育成過程の日本短角種牛では、顆粒

球は 20.8 ~ 24.3%、T 細胞は 33.5 ~ 42.7%、B 細胞は 28.5 ~ 36.2%、単球は 6.9 ~ 8.9% で推移し、有意な変動は認められなかった。T 細胞サブセットの割合は、 $\gamma\delta$ T 細胞が最も高く 43.4 ~ 48.3% で、 $CD4^+$ T 細胞、 $CD8^+$ T 細胞の順であり、 $\gamma\delta$ T 細胞では $WC1^+$ $\gamma\delta$ T 細胞が優勢を占めた。 $CD4^+/CD8^+$ T 細胞比は 1.5 以下であった。また、 $CD25$ 陽性の活性化型 T 細胞は $WC1^+$ $\gamma\delta$ T 細胞で最も高く出現した。このことから、日本短角種牛は同月齢の黒毛和種牛に比べて $\gamma\delta$ T 細胞の割合が高く、 $CD4^+/CD8^+$ T 細胞比がやや低いことが示された。以上より、ウシの品種によって末梢血の白血球ならびに T 細胞サブセットの存在割合が異なることが示された。

2) 末梢血 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの出現割合と形態学的特徴

黒毛和種牛の末梢血 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの割合を解析したところ、 $WC1^+$ $\gamma\delta$ T 細胞は、成長に伴って有意に減少したが、 $CD8^+$ $\gamma\delta$ T 細胞は、成長に伴う変動はなく、一定して低い割合であった (図 1)。このことから、成長に伴う $\gamma\delta$ T 細胞の割合の低下は、主に $WC1^+$ $\gamma\delta$ T 細胞の低下に起因することが示された。また、 $CD4^+$ T 細胞は成長に伴って増加したが、 $CD8^+$ T 細胞の割合には変動が見られなかった。

$\gamma\delta$ T 細胞サブセットを Magnetic cell sorting (MACS) 法により、 $WC1^+$ $\gamma\delta$ T 細胞と $WC1^-$ $\gamma\delta$ T 細胞とに調整し、形態学的特徴を観察した。光学顕微鏡下ではこれらサブセットの染色性に大きな違いは見られなかった。透過型電子顕微鏡下で、 $WC1^+$ $\gamma\delta$ T 細胞は比較的大きく、核が多形で分葉しているものが認められ、ユークロマチンが多く、細胞小器官の発達を観察された。一方、 $WC1^-$ $\gamma\delta$ T 細胞は比較的小さく、核は卵円形をしており、細胞質の発達は乏しかった。

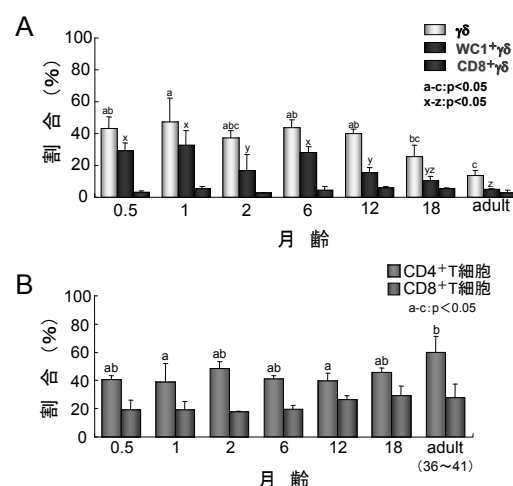
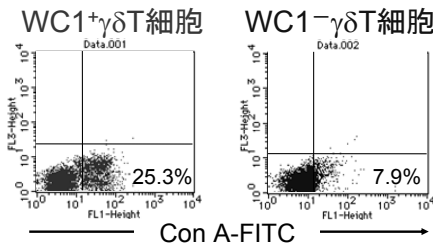


図 1 末梢血 T 細胞サブセットの出現割合

3) 末梢血 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの機能特性

MACS 法で調整した $WC1^+$ $\gamma\delta$ T 細胞と $WC1^-$ $\gamma\delta$ T 細胞に、FITC 標識の Concanavalin A (ConA) を添加して 12 時間後の結合能を測定した。その結果、 $WC1^+$ $\gamma\delta$ T 細胞の ConA 結合能は $WC1^-$ $\gamma\delta$ T 細胞より高かった (図 2)。このことから、末梢血 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットは細胞表面の糖鎖構造に違いがあることが示された。そこで、ConA 刺激 (24 時間) 下で T 細胞活性化マーカー ($IL-2R\alpha$) の発現を解析したところ、 $WC1^+$ $\gamma\delta$ T 細胞は無刺激状態で $IL-2R\alpha$ の発現が高く、ConA 刺激によってさらに発現が増強されることが判明した。一方、 $WC1^-$ $\gamma\delta$ T 細胞は ConA 処理でほとんど影響が認められなかった。

次に、同様に分離した $WC1^+$ $\gamma\delta$ T 細胞と $WC1^-$ $\gamma\delta$ T 細胞の ConA 刺激 (12 時間) 下でのサイトカイン mRNA 発現を解析した。その結果、 $WC1^+$ $\gamma\delta$ T 細胞は、 $IFN-\gamma$ 、 $GM-CSF$ 、 $TNF-\beta$ 、 $IL-2$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $TGF-\beta$ の mRNA を発現した。一方、 $WC1^-$ $\gamma\delta$ T 細胞は ConA 刺激の有無に関わらず $TGF-\beta$ の mRNA のみ発現しており、その他のサイトカインの mRNA 発現は認められなかった。

図2 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの ConA 結合能

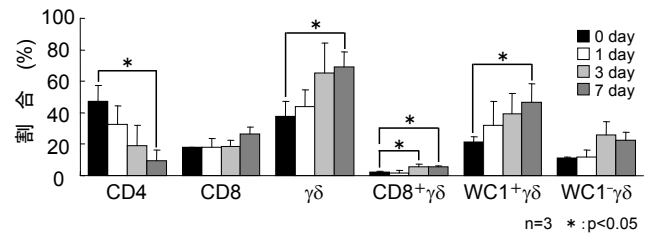
さらに、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞と WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞のアポトーシス関連遺伝子発現について検討した。アポトーシス抑制遺伝子 (Bcl-xL、Bcl-2) の mRNA 発現は WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞で認められ、WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞では認められなかった。一方、アポトーシス誘導遺伝子 (caspase-3、caspase-8) の mRNA 発現は、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞と WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞でともに発現した。これらのことから、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞と WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞ではアポトーシスの誘導は起こるが、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞では WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞とは異なり、アポトーシスの抑制機能が働くことが示された。

以上のことから、ウシ末梢血中の $\gamma\delta$ T 細胞は、WC1 分子の発現の有無により機能が異なり、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞は活性化状態で機能的であること、WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞は不活性化状態であることが判明した。

4) $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの活性化に伴う機能的特徴

IL-2 は T 細胞の増殖と分化を促すサイトカインである。そこで、ウシ $\gamma\delta$ T 細胞サブセットを IL-2 で刺激し、活性化に伴うこれらのサブセットのエフェクター細胞への分化と活性化したサブセットの機能的特徴を解析した。

末梢血単核球 (PBMC) を IL-2 (20U/ml) で刺激を行い、 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの割合変化を検討した。WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞は刺激 1 日目以降有意に増加した (図 3)。IL-2 刺激した $\gamma\delta$ T 細胞サブセットでの IL-2R α の

図3 IL-2 刺激による $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの誘導

発現は、1 日目で WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞が約 75% であるのに対し、WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞は約 30% であった。このことから、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞は IL-2 の刺激に対して WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞より速やかに活性化されることが示された。増殖活性は IL-2 刺激をした WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞で、WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞より高いことが示された。細胞傷害活性に関連する遺伝子発現は、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞と WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞では共に、IL-2 刺激により Perforin と GranzymeB の mRNA 発現が増加し、また IL-2 の刺激の有無に関わらず、恒常的に Bo-lysin と NKp46 の mRNA を発現した。

以上のことから、IL-2 刺激により WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞が速やかに活性化され、エフェクター細胞に分化することが示された。

5) ウシの乳腺での免疫機能

ウシの乳腺内には腸管のようなリンパ組織は存在しない。しかしながら、末梢血に比べ T 細胞の存在割合が高く、乳腺上皮細胞間にはリンパ球 (mammary intraepithelial lymphocytes: mIEL) が存在する。この mIEL がサイトカインを介して乳腺上皮細胞の機能に影響し、また mIEL 存在様式が泌乳期と乾乳期で異なる。そこで、mIEL のサイトカイン産生と乳腺上皮細胞との相互作用、乳腺上皮細胞での Toll like receptor (TLRs) の発現と TLRs を介する免疫作用について検討した。

（イ）mIEL のサイトカイン産生と乳腺上皮細胞との相互作用

乳汁中では、CD4⁺T 細胞は乾乳期に、CD8⁺T 細胞は泌乳期に多く存在した。MACS 法で得られた T 細胞サブセットはサイトカイン発現が泌乳期と乾乳期で異なり、CD4⁺T 細胞は乾乳期で、CD8⁺T 細胞は泌乳期でサイトカイン発現が高かった。CD8⁺T 細胞で高発現した TGF- β 、TNF- α 、c-kit、IL-2R は $\gamma\delta$ T 細胞でさらに増強した。 $\gamma\delta$ T 細胞は IL-10、GM-CSF、IFN- γ 、TGF- β 、TNF- α 、c-kit、FasL、IL-2R を発現することが確認された。一方、培養乳腺上皮細胞（BMEC）は stem cell factor (SCF) を発現した。c-kit は SCF のレセプターであり、泌乳期では $\gamma\delta$ T 細胞は乳腺上皮細胞由来の SCF で活性化され、増殖あるいはサイトカイン産生を増加する。このように、乳腺上皮内では mIEL と上皮細胞間にサイトカイン-サイトカインレセプター情報伝達（イントラネット）機構が存在し、これら細胞間相互作用で乳腺上皮細胞ならびに mIEL の分化ならびに機能が制御される可能性が考えられる。

（ロ）乳腺上皮細胞の Toll like receptors (TLRs) の発現と TLRs を介する LPS と Pam₃CSK₄ の作用

BMEC での Toll like receptor (TLR) -2、-4、-9 の発現を、また TLR-2、TLR-4 のリガンドである Pam₃CSK₄ と LPS の TLRs での認識とそのシグナル伝達、さらには TLRs 依存性のサイトカイン産生を解析し、乳房炎の起炎菌による乳腺上皮細胞の活性化と乳房炎に伴う免疫応答に対する関与を検討した。

BMEC は TLR- 1、-2、- 3、-4、-6（図 4）と MD-2、CD14、IL-1 β 、IL-6、TNF- α の mRNA を恒常的に発現した。LPS 刺激の 1 時間後に新たに IL-8 の発現が認められ、TNF-

α と TLR-4 の mRNA 発現が増強した。刺激 3 時間後には IL-1 β 、6 時間後に IL-6、IL-8 の mRNA 発現が増強し、IL-1 α が新たに発現した。泌乳期の正常ホルスタイン牛の乳腺では、TLR-2、-4、の発現が確認され、実験感染乳房炎牛の乳腺では、これらの発現が増加した。一方、SEC 刺激では、BMEC のサイトカイン産生ならびに TLRs 発現は影響されなかった。このことから、SEC と LPS の乳腺上皮細胞への作用は異なり、LPS の TLR-4 を介する乳腺上皮細胞でのサイトカイン産生が示された。この知見は、黄色ブドウ球菌と大腸菌の感染に伴う乳房炎発症機序の相違を示すものであり、乳腺上皮細胞の感染性を解明する上で重要である。

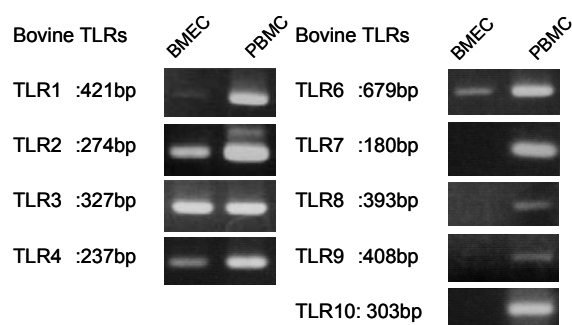


図 4 BMEC での TLRs の発現

LPS 刺激による NF κ B の活性化に関して、無刺激の BMEC では、I κ B α の明確な発現が認められたが、リン酸化 I κ B α の発現は弱かった。LPS 刺激後、30 分後にはリン酸化 I κ B の発現が増強され、I κ B α がリン酸化されて NF κ B が活性化されることが示された。また、免疫組織染色法で、LPS 刺激後 30 分に NF κ B が核内へ移行することが確認された。CD14 は TLR4 の LPS 認識に必要であり、CD14 抗体はその機能をブロックする。LPS 刺激前に抗 CD14 抗体（10 μ g/ml）で 1 時間処理し、LPS で 30 分間刺激した。その結果、NF κ B は核内へ移行せず、無刺激と同様に核の周囲に強い陽性反応が観察された。このことから、BMEC に発現している TLR-4 は CD14

を介して、機能的に作用することが示された。

一方、Pam₃CSK₄ 刺激は BMEC での炎症性サイトカインとケモカインの mRNA 発現を有意に増強した。このことから、ウシ乳腺上皮細胞は TLR2 を介して、菌体膜成分を認識し、炎症性因子の誘導に関与することが示された。Pam₃CSK₄ 刺激した BMEC の培養上清は、添加 10 分後から顆粒球の遊走活性を誘導し、その活性は 45 分後まで有意であった。このこと

は、Pam₃CSK₄ 刺激によって、BMEC が産生する液性因子が、顆粒球に短時間で作用し、その遊走能を増強することを意味する。

以上より、ウシの乳腺において、mIEL と乳腺上皮細胞間のサイトカイン-サイトカインレセプターイントラネットが乳腺上皮細胞の機能さらにその膜上に発現する TLR2、IL-4 を介する乳房炎起因菌の分子構造を認識し、乳腺免疫応答の制御に関与することが示された。

Immune function and mammary gland immunity in cattle

Takahiro Yamaguchi

Graduate School of Agriculture Science, Tohoku University
(Sendai, 981-8555.JAPAN)