

ビタミンDによる黒毛和牛の細菌感染予防のための免疫賦活化効果の検証

飯笹 英一

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科社会・行動医学講座心身内科学

鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘 8 丁目 35-1

eiizasa@m.kufm.kagoshima-u.ac.jp

要旨

我々は、これまでの研究で、黒毛和牛 PBMC において、ビタミンDが細菌の細胞壁に含まれるリポ多糖(LPS)に対する免疫応答を増強することを見出した。しかし、その免疫増強メカニズムは不明であったため、そのメカニズムを検証した。ビタミンDは、免疫制御分子である DUSP1、CD38、SMAD3 の発現には影響しないことがわかった。また、免疫応答を増幅する自然免疫受容体 TREM1 は、ビタミンDを認識しないこともわかった。さらに、マウスモデルを用いて、ビタミンDが自然免疫応答を訓練し、trained immunityによって、免疫応答を増幅している可能性を検証した。その結果、IL-6 の応答には、ビタミンDの訓練が関与している可能性が示された。

1. 緒言

鹿児島県は、黒毛和種牛の飼養頭数が全国1位(シェア 18.2%) (鹿児島県 HP より)であり、黒毛和種牛は鹿児島県の畜産で欠かすことができない。黒毛和種は日本固有の肉用牛品種で、特有の形質を有している¹⁾。しかし、近年、黒毛和種の仔牛を室内で集団飼育する大規模農場が増えており、このような環境で飼育された仔牛は、集団内での順位争いなど鼻と鼻の接触による水平感染や、環境のストレスにより、感染症にかかりやすい²⁾。さらに、黒毛和種は他の品種に比べて免疫細胞の数が少なく、感染症にかかりやすい傾向がある³⁾。また、近年の抗生物質耐性菌の増加により、畜産動物における抗菌剤の使用は制限されている⁴⁾。その結果、仔牛の感染症予防対策がより重要になってきており、その一つとしてビタミンDが役立つ可能性がある。我々の研究グループはこれまで、黒毛和種の仔牛の末梢血単核球(PBMC)に、ビタミンDを添加すると、細胞内の殺菌に重要な一酸化窒素(NO)の合成酵素 iNOS や抗菌ペプチドであるβディフェンシンの発現を上昇させることを見出した⁵⁾。すなわち、ビタミンDが細菌感染に対する免疫応答を賦活化することを見出した。ヒトにおいても、ビタミンDは、iNOS やディフェンシンなどの発現を誘導することにより、結核菌の殺菌能を高めることが報告されている⁶⁾。

グラム陰性菌由来の PAMPs の一つであるリポ多糖(LPS)は、TLR4によって認識され、抗菌ペプチド、炎症性サイトカイン、殺菌性の一酸化窒素(NO)などの多様な自然免疫応答を引き起こす⁷⁾。ビタミンDは、骨や歯の形成、ならびに腸管におけるリンやカルシウムの吸収に関わる脂溶性ビタミンである⁸⁾。ビタミンD3は、皮膚中の前駆体である7-デヒドロコレス

テロールから日光 (UV-B) または食事を通じて産生される。ビタミン D₃ は肝臓と腎臓で代謝され、生理活性型である 1, 25-ジヒドロキシビタミン D₃ (1, 25(OH)₂D₃) に変換される。多くの報告では、1, 25(OH)₂D₃ 処理によってヒトおよびマウスにおける炎症性サイトカインの産生が抑制されることが示されている。たとえば、1, 25(OH)₂D₃ は、MAPK ホスファターゼ-1 (MKP-1) の活性化を介して、ヒト単球およびマウス骨髄由来マクロファージにおける LPS 誘導性の IL-6 および TNF の産生を抑制する⁹⁾。また、1, 25(OH)₂D₃ は LPS で刺激されたマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 において、Cox-2 および炎症性サイトカインの発現を誘導する NF-κB の活性化を阻害する¹⁰⁾。一方で、1, 25(OH)₂D₃ がヒトおよびマウス細胞における LPS 誘導性炎症性サイトカインの産生をむしろ促進するという報告もある¹¹⁻¹³⁾。さらに、1, 25(OH)₂D₃ は、NO を産生する誘導性一酸化窒素合成酵素 (iNOS) および抗菌ペプチドの発現を、LPS の存在下および非存在下の両方においてヒト細胞で誘導する¹⁴⁾。1, 25(OH)₂D₃ はまた、カテリシジンや β-ディフェニン (BDNF) などの抗菌ペプチドの発現を誘導することにより、抗マイコバクテリア活性を付与する¹⁴⁾。

一方で、ウシ免疫に対する 1, 25(OH)₂D₃ の影響についての研究は限られているものの、これまでの報告から、1, 25(OH)₂D₃ がウシにおける自然免疫応答を増強する可能性が示唆されている。具体的には、1, 25(OH)₂D₃ は、ホルスタイン乳牛の単球において、iNOS および RANTES (活性化時に発現・分泌される正常 T 細胞由来因子) 遺伝子を誘導するが、カテリシジン遺伝子には影響しない¹⁴⁾。また、RNA-seq および定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) 解析により、1, 25(OH)₂D₃ はホルスタイン乳牛における BDNF の発現を誘導する一方で、舌および気管の抗菌ペプチド (それぞれ LAP および TAP) には影響を与えないことが明らかとなっている¹⁵⁾。

他方、肉用牛における免疫応答に対する 1, 25(OH)₂D₃ の影響については、ほとんど研究されていない。乳牛と肉用牛では、それぞれ乳質および肉質といった異なる形質に対して選抜育種が行われており、その遺伝的形質や飼育環境の違いが免疫にも影響を与えている可能性がある。実際に、乳用牛と肉用牛の子牛の間で免疫応答に違いがあるとの報告もある¹⁶⁻¹⁷⁾。

したがって、黒毛和種におけるビタミン D の免疫応答への影響を明らかにすることが重要である。そこで、本研究では、黒毛和種の末梢血単核球 (PBMC) を用いて、ビタミン D が LPS の免疫応答を増強する分子メカニズムの解明を目指した。また、黒毛和牛におけるビタミン D の自然免疫応答増強作用が、訓練された免疫応答 (Trained immunity) に類似しているため、その可能性をマウスの細胞を用いて検証した。

2. 実験

2.1 動物

本研究で使用した黒毛和種はすべて、日本の鹿児島県内の農場で飼育されたものである。出生後、子牛は 1 週間の間、母牛とともに飼養され、その後、生後 2 週齢まで個別のハッチに移された。3 週齢から 12 週齢までは、1 群 18 頭でパドックに収容され、ミルク代用乳が給与された。13 週齢に達すると離乳され、6 頭単位のパドックに移された。すべての子牛には、日本の肉用牛飼養標準 (農業・食品産業技術総合研究機構, 2008) に準拠した栄養要求量を

満たすように、同等の処置および栄養が与えられた。農場における飼料の栄養成分は表 1 に示す。血液採取は、朝の給餌後の 9 時 30 分から 10 時 30 分の間に行った。

マウスは、九州動物株式会社から購入した 8-10 週齢の C57BL/6 系統のマウスを用いた。全てのマウスは、12-h の明暗期、 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $50 \pm 10\%$ の湿度で、鹿児島大学先端科学研究推進センター生命科学動物実験ユニットで飼育された。

全ての動物実験は、鹿児島大学の動物実験ガイドラインに従い行われた。

2.2 黒毛和牛 PBMC の採取

血液は、24~32 週齢の子牛 21 頭から一度ずつ、頸静脈よりバキュテナーのヘパリン加採血管を用いて採取した。PBMC の分離は、先行研究¹⁸⁾に従って行った。簡単に述べると、10 mL のヘパリン加全血をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 倍に希釈し、分離用比重液 (Lymphocyte Separation Medium 1077、免疫生物学研究所、日本；比重 1.077) 上に重層した後、 15°C で $400 \times g$ 、60 分間遠心した。単核球層を回収し、PBS で 2 回、 $400 \times g$ 、5 分間の遠心で洗浄した。回収細胞に 0.83% アンモニウム塩化物を加え、5 分間軽く攪拌して残存する赤血球を除去した。単離された PBMC は PBS で洗浄後、ペニシリン G (100 U/mL ；明治製菓、東京、日本) を含む RPMI1640 培地 (Invitrogen, 東京、日本) に懸濁した。

2.3 黒毛和牛 PBMC の *in vitro* 培養および刺激

単離した PBMC ($n = 21$) を 5×10^6 個/ウェルの密度で 48 ウェルプレートに播種し、10% 熱不活化ウシ胎児血清 (FCS) を含む RPMI1640 培地 1 mL/ウェルに懸濁した。細胞は 37°C 、湿潤 5% CO_2 条件下で培養した。PBMC における免疫応答に対する $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の効果を評価するため、LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) を 10 nM $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の有無で添加し、上記と同様に刺激した。24 時間刺激後、細胞を回収し、RNA 抽出のために Trizol (Thermo Fisher Scientific) に懸濁した。

2.4 定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR)

全 RNA 抽出は、Trizol を用いてメーカーのプロトコールに従って行った。抽出した全 RNA のうち各 200 ng を用い、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO、日本) で逆転写反応を行った。定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) は、THUNDERBIRD NEXT SYBR qPCR Mix (TOYOBO) および StepOnePlus Real-Time PCR システムを用いて実施した。相対的遺伝子発現量は、 $\beta 2$ -ミクログロブリンを内在性コントロールとして $\Delta \Delta \text{Ct}$ 法により算出した。

2.5 TREM1 レポーター細胞

2B4 NFAT-GFP 細胞に、N 末端に FLAG が融合した DAP12(FLAG-DAP1)2 と N 末端に HA タグが融合した TREM1 (HA-TREM1) を発現したものを TREM1 レポーター細胞として用いた¹⁹⁾。TREM1 レポーター細胞を 100 nM $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、または、プレートコートした $25 \mu\text{g}$ anti-HA 抗体 (HA-11) (Biolegend) と $25 \mu\text{g}$ Donkey anti-mouse antibody (DAM) で刺激し、24 時間後の GFP の

蛍光をフローサイトメーターCytoflex(Beckman coulter)を用いて解析した。

2.6 マウス骨髄由来マクロファージ(BMDM)の分化および刺激

C57BL/6 マウスから骨髄を採取し、M-CSF を用いて以前の報告と同様に BMDM を誘導した¹⁹⁾。BMDM に 100 nM₁, 25(OH)₂D₃ を加え、24 時間後に 1, 25(OH)₂D₃ を除去し、洗浄した。その後 5 日間無刺激で培養した(レスティング)細胞を 100 ng/ml LP で刺激し、24 h 後に全 RNA を抽出し、qRT-PCR で遺伝子発現を解析した。

2.7 RAW264.7 の刺激および NO 産生測定

RAW264.7 細胞株に 100 nM₁, 25(OH)₂D₃ を加え、24 時間後に 1, 25(OH)₂D₃ を除去し、洗浄した。その後 5 日間無刺激で培養した細胞を 100 ng/ml LP で刺激し、24 h 後に Griess assay で NO 産生を定量した。

2.8 統計解析

統計解析は、GraphPad Prism 10 ソフトウェアを用いて実施した。

外れ値の検出には ROUT 検定を用い、検出されたデータは除外した。2 群間の比較には両側検定の非対応 t 検定を用い、複数群間の比較には一元配置分散分析 (one-way ANOVA) および Dunnett の T3 事後検定を用いた。P 値が 0.05 未満の場合を統計的に有意と判断した。

3. 結果

3.1 黒毛和牛 PBMC におけるビタミン D の免疫増幅作用のメカニズム検証

我々は、これまでの研究で、黒毛和牛の PBMC において、ビタミン D が LPS によって誘導される誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) やケモカインの 1 種 CXCL8 など細菌の排除に重要な遺伝子の発現を増強させることを見出した(図 1A)⁵⁾。そこで、まずそのメカニズムを検証するために、Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1)、CD38、SMAD family member 3 (SMAD3) の発現を調べた。DUSP1 は、MAPK、ERK などの免疫応答に重要な MAP キナーゼ (MAPK) のリン酸化を制御し、マウスにおいては、ビタミン D で発現が誘導され、MAPK の活性化を制御することが報告されている。また、CD38 も M1 型の免疫応答に重要な分子である。SMAD3 は、免疫抑制シグナルである TGF β の下流で不可欠なシグナル伝達分子である。ビタミン D によってこれらの遺伝子発現に変化があれば、ビタミン D による LPS の免疫増強作用に関与する可能性がある。そこで、LPS 単独、1, 25(OH)₂D₃ 単独、LPS と 1, 25(OH)₂D₃ 両方で黒毛和牛の PBMC を刺激し、これらの遺伝子発現を調べた。その結果、LPS 単独刺激と LPS と 1, 25(OH)₂D₃ 両方で刺激した PBMC でこれらの遺伝子発現を比較したところ、有意に差は見られなかった(図 1B)。

続いて、黒毛和牛の PBMC を $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と LPS で同時に刺激すると、LPS 単独刺激に対して、自然免疫受容体 TREM1 の発現が有意に変動することを見出していたため(図 1)、TREM1 に着目した。TREM1 は、LPS による敗血症や免疫応答を増強することが報告されている。また、TREM1 と近縁の受容体である TREM2 は、様々な脂質を認識する受容体

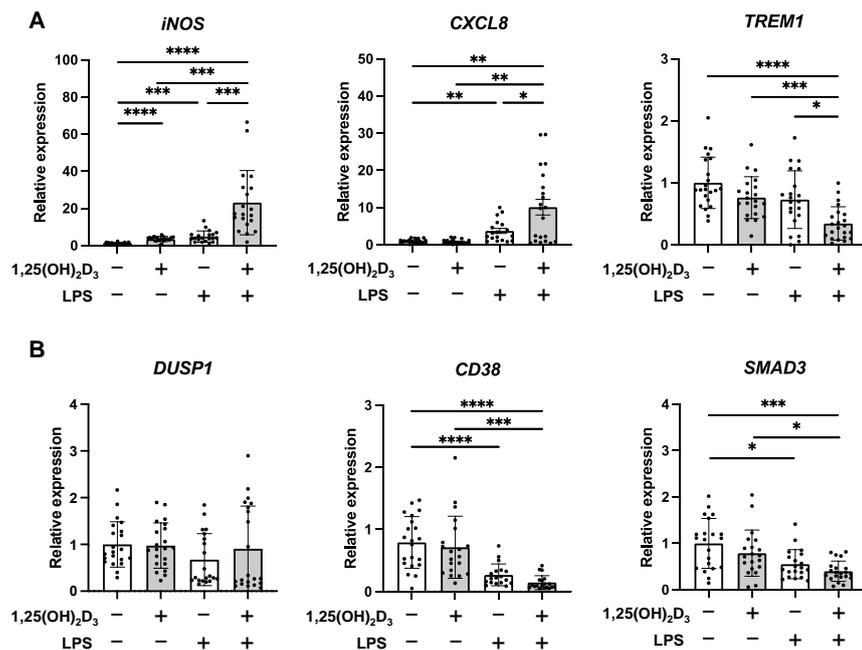


図1:黒毛和牛PBMCをLPSと $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ で刺激した際の遺伝子発現 (A, B)黒毛和牛PBMCをLPS単独、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 単独、および、LPSと $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 両方で刺激した際の各種遺伝子発現をqRT-PCRで調べた。**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

であり、我々も結核菌の脂質認識に TREM2 が重要であることを報告している¹⁹⁾。そのため、TREM1 も脂溶性ビタミンのビタミン D を直接認識し、LPS の免疫応答を制御している可能性が示唆されるため、マウスの TREM1 レポーター細胞を用いて、その可能性を検証した。TREM1 レポーター細胞は、TREM1 がリガンドを認識すると下流の NFAT が活性化し、GFP の発現が誘導される細胞である。ポジティブコントロールの anti-HA 抗体 (α -HA) による TREM1 のクロスリンクでは、GFP の発現が誘導されたのに対し、100 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ では、その発現が誘導されなかった(図 2)。この結果から、TREM1 は、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を認識しないことがわかった。

3.2 ビタミン D が Trained immunity を誘導する可能性の検証

我々は、これまでの研究で、黒毛和牛 PBMC で、DEFB10, LAP などのディフェンシン遺伝子や iNOS の発現が、ビタミン D 刺激単独でも誘導され、それが LPS によるそれらの遺伝子発現を増強することを見出した(図 1A)⁵⁾。このことは、ビタミン D が単独でも免疫応答を惹起する可能性を示している。近年、LPS などの微生物由来の物質で、マクロファージなどの免疫細胞が 1 度活性化されると、その後の LPS やそれ以外の微生物由来の物質で誘導される免疫応答が増強される現象が報告されている²⁰⁾。これは、訓練された免疫応答、trained immunity と呼ばれる。ビタミン D が自然免疫応答を惹起するのであれば、ビタミン D が trained immunity の訓練するための最初の刺激(プライミング)に働いている可能性がある。そこで、マウス BMDM や RAW264.7 細胞株を用いて、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ で刺激後、5 日間の無刺激(レスティング)期間をお

いて、LPS で刺激し、その応答がどうなるか iNOS や IL-6 の発現を調べることで検証した。

まず、黒毛和牛の PBMC で発現増強が見られた iNOS の発現をマウス BMDM で調べたところ、マウス BMDM では、ビタミン D で訓練ため刺激し、レステイング期間後 LPS で刺激しても iNOS の発現は、変化しなかった(図 3A)。また、iNOS が合成する一酸化窒素(NO)の産生量もビタミン D のプライミングがあっても変化しないことがわかった(図 3B)。一方で、IL-6 の発現は、ビタミン

D の訓練刺激があると、LPS で刺激した際に、訓練刺激がないものに比べ、増加傾向にあることがわかった。このことは、マウスの BMDM において、ビタミン D が IL-6 産生のため自然免疫応答を訓練する可能性があることが示唆された。

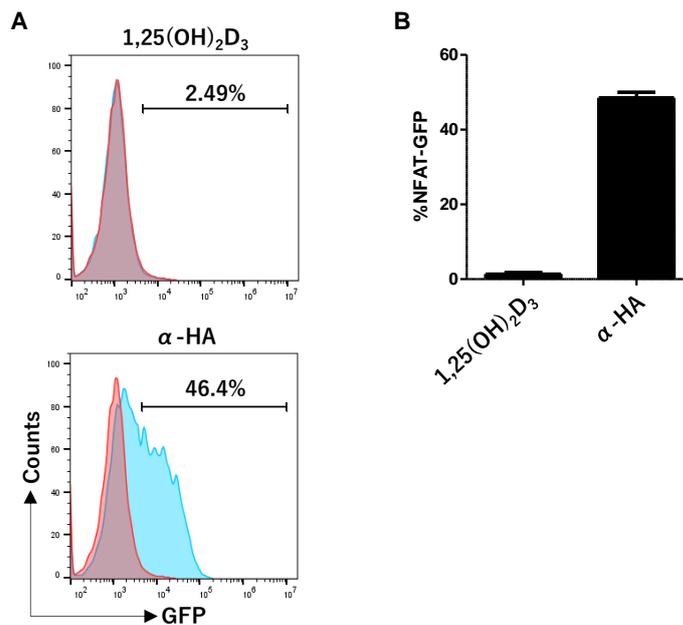


図2:マウスTREM1レポーター細胞を1,25(OH)₂D₃で刺激した際のGFPの発現応答 (A)マウスTREM1レポーター細胞を100 nM 1,25(OH)₂D₃またはα-HA抗体でクロスリンク(ポジティブコントロール)して、FCMで解析したヒストグラム。(B)(A)の結果をグラフにしたもの。

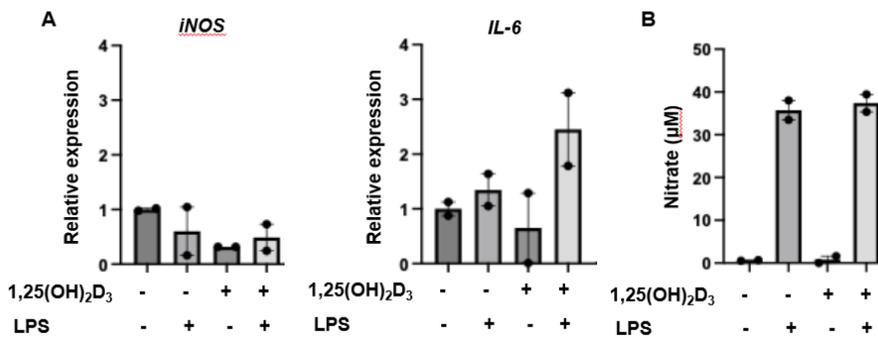


図3:LPSでプライミング後、1,25(OH)₂D₃で刺激した際の遺伝子発現とNO産生 (A) マウスBMDMを100 nM 1,25(OH)₂D₃でプライミング後、5日間レステイング後(刺激がない休息期間)、LPS(100 ng/ml)で刺激した際の遺伝子発現をqRT-PCRで調べた。(B) RAW264.7を100 nM 1,25(OH)₂D₃でプライミング後、5日間レステイング後(刺激がない休息期間)、LPS(100 ng/ml)で刺激した際のNO産生。

3. 考察

まず、黒毛和牛 PBMC におけるビタミン D の自然免疫増強のメカニズムを明らかにするため、免疫応答制御に

関与する遺伝子、DUSP1、CD38、SAMD3 の発現を調べたところ、これらの遺伝子の発現には、LPS 単独刺激群と 1, 25(OH)₂D₃ と LPS 同時刺激群に差はなかった。また、マウス TREM1 レポーター細胞を用いて、免疫応答増幅分子の TREM1 がビタミン D を認識し、LPS の免疫応答を増強する可能性も検証したが、TREM1 は 1, 25(OH)₂D₃ を認識しないことがわかった。そのため、これらの分子以外の他の分子がビタミン D の自然免疫増強に関与していると考えられる。ただし、TREM1 については、マウスの TREM1 を用いていたため、黒毛和牛の TREM1 で

は、違う結果になる可能性は排除できない。さらに、DUSP1、CD38、SMAD3 の遺伝子発現ではなく、その翻訳後の機能がビタミン D の免疫応答増強に関わっている可能性も排除できない。

また、マウスモデルを用いて、黒毛和牛のビタミン D が自然免疫応答を訓練し、LPS による免疫応答が増強する可能性も検証した。その結果、黒毛和牛の PBMC でビタミン D によって発現増強が見られた iNOS の発現誘導には、差が見られなかったが、IL-6 の発現は、ビタミン D の訓練によって発現が増強される可能性が示唆された。そのため、今後は、黒毛和牛 PBMC を用いて、黒毛和牛でも同様の現象が見られるか検証する必要がある。

4. 結論

黒毛和牛 PBMC におけるビタミン D による自然免疫応答には、少なくとも DUSP1、CD38、SMAD3 の発現は、関与しない。また、マウスの TREM1 はビタミン D を認識しない。マウスモデルでは、IL-6 の産生には、ビタミン D の刺激による免疫応答の訓練に関与している可能性があり、今後黒毛和牛の PBMC でも同様の現象が起こるか検証する必要がある。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をして頂いた公益財団法人サンケイ科学振興財団に深く感謝いたします。

6. 引用文献

- 1) Motoyama, M., Sasaki, K., & Watanabe, A. (2016). Wagyu and the factors contributing to its beef quality: A Japanese industry overview. *Meat Science*, *120*, 10–18.
- 2) Cobb, C. J., Obeidat, B. S., Sellers, M. D., Pepper-Yowell, A. R., & Ballou, M. A. (2014). Group housing of Holstein calves in a poor indoor environment increases respiratory disease but does not influence performance or leukocyte responses. *Journal of Dairy Science*, *97*(5), 3099–3109.
- 3) Ohtsuka, H., Ono, M., Saruyama, Y., Mukai, M., Kohiruimaki, M., & Kawamura, S. (2011). Comparison of the peripheral blood leukocyte population between Japanese Black and Holstein calves. *Animal Science Journal*, *82*(1), 93–98.
- 4) Schrijver, R., Stijntjes, M., Rodríguez-Baño, J., Tacconelli, E., Babu Rajendran, N., & Voss, A. (2018). Review of antimicrobial resistance surveillance programmes in livestock and meat in EU with focus on humans. *Clinical Microbiology and Infection*, *24*(6), 577–590.
- 5) Oyamada Y, Iizasa E, Usa A, Otomaru K. (2023) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ potentiates the innate immune response of peripheral blood mononuclear cells from Japanese Black cattle. *Anim. Sci. J.* *94*(1):e13906.
- 6) Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Krutzik, S. R., Ochoa, M. T., Schaubert, J., Wu, K., Meinken, C., Kamen, D. L., Wagner, M., Bals, R., Steinmeyer, A., Zügel, U., Gallo, R. L., Eisenberg, D., Hewison, M., Hollis, B. W., Modlin, R. L. (2006). Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. *Science*, *311*(5768), 1770–1773.

- 7) Hazlett, L., & Wu, M. (2011). Defensins in innate immunity. *Cell and Tissue Research*, 343(1), 175–188.
- 8) Eder, K., & Grundmann, S. M. (2022). Vitamin D in dairy cows: Metabolism, status and functions in the immune system. *Archives of Animal Nutrition*, 76(1), 1–33.
- 9) Zhang, Y., Leung, D. Y. M., Richers, B. N., Liu, Y., Remigio, L. K., Riches, D. W., & Goleva, E. (2012). Vitamin D Inhibits Monocyte/Macrophage Proinflammatory Cytokine Production by Targeting MAPK Phosphatase-1. *The Journal of Immunology*, 188(5), 2127–2135.
- 10) Chen, Y., Liu, W., Sun, T., Huang, Y., Wang, Y., Deb, D. K., Yoon, D., Kong, J., Thadhani, R., & Li, Y. C. (2013). 1,25-Dihydroxyvitamin D Promotes Negative Feedback Regulation of TLR Signaling via Targeting MicroRNA-155–SOCS1 in Macrophages. *The Journal of Immunology*, 190(7), 3687–3695.
- 11) Di Rosa, M., Malaguarnera, G., De Gregorio, C., Palumbo, M., Nunnari, G., & Malaguarnera, L. (2012). Immuno-modulatory effects of vitamin D3 in human monocyte and macrophages. *Cellular Immunology*, 280(1), 36–43.
- 12) Kim, T.-H., Lee, B., Kwon, E., Choi, S. J., Lee, Y. H., Song, G. G., Sohn, J., & Ji, J. D. (2013). Regulation of TREM-1 expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human monocytes/macrophages. *Immunology Letters*, 154(1), 80–85.
- 13) Rigo, I., McMahan, L., Dhawan, P., Christakos, S., Yim, S., Ryan, L. K., & Diamond, G. (2012). Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) in airway epithelial cells by 1,25(OH)₂ vitamin D3. *Innate Immunity*, 18(2), 250–257.
- 14) Nelson, C. D., Reinhardt, T. A., Lippolis, J. D., Sacco, R. E., & Nonnecke, B. J. (2012). Vitamin D Signaling in the Bovine Immune System: A Model for Understanding Human Vitamin D Requirements. *Nutrients*, 4(3), Article 3.
- 15) Merriman, K. E., Kweh, M. F., Powell, J. L., Lippolis, J. D., & Nelson, C. D. (2015). Multiple β -defensin genes are upregulated by the vitamin D pathway in cattle. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 154, 120–129.
- 16) Johnston, D., Mukibi, R., Waters, S. M., McGee, M., Surlis, C., McClure, J. C., McClure, M. C., Todd, C. G., & Earley, B. (2020). Genome wide association study of passive immunity and disease traits in beef-suckler and dairy calves on Irish farms.
- 17) Surlis, C., Earley, B., McGee, M., Keogh, K., Cormican, P., Blackshields, G., Tiernan, K., Dunn, A., Morrison, S., Arguello, A., & Waters, S. M. (2018). Blood immune transcriptome analysis of artificially fed dairy calves and naturally suckled beef calves from birth to 7 days of age. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1.
- 18) Otomaru, K., Miyahara, T., Saita, H., & Maeda, Y. (2022). Effects of Vitamin E Supplementation on Antioxidant, Inflammatory Biomarker, and Cell Viability of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Japanese Black Calves with or without Lipopolysaccharide Stimulation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*,

- 19) Iizasa E, Chuma Y, Uematsu T, Kubota M, Kawaguchi H, Umemura M, Toyonaga K, Kiyohara H, Yano I, Colonna M, Sugita M, Matsuzaki G, Yamasaki S, Yoshida H, Hara H. (2021). TREM2 is a receptor for non-glycosylated mycolic acids of mycobacteria that limits anti-mycobacterial macrophage activation. *Nat Commun.* 16;12(1):2299.
- 20) Owen AM, Fults JB, Patil NK, Hernandez A, Bohannon JK. (2021). TLR Agonists as Mediators of Trained Immunity: Mechanistic Insight and Immunotherapeutic Potential to Combat Infection. *Front Immunol.* 18;11:622614.

Evaluation of the immune potentiation of Vitamin D for the Prevention of Bacterial Infections in Japanese Black Cattle

Ei'ichi Iizasa

Department of Psychosomatic Medicine, Division of Social and Behavioral Medicine, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima, Kagoshima Prefecture, Japan
eiizasa@m.kufm.kagoshima-u.ac.jp

In our previous research, we found that vitamin D enhances the immune response of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from Japanese Black cattle against lipopolysaccharide (LPS), a component of bacterial cell walls. However, the underlying mechanism of this immune enhancement remained unclear. In this study, we investigated the mechanism. We found that vitamin D did not affect the expression of DUSP1, CD38, or SMAD3, which are immune regulatory

molecules. Additionally, the innate immune receptor TREM1, which amplifies immune responses, was found not to recognize vitamin D. Furthermore, using a mouse model, we examined the possibility that vitamin D trains the innate immune system and enhances immune responses through trained immunity. The results suggested that vitamin D training might be involved in the IL-6 response.