

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07585

研究課題名(和文) マダイ腹腔内脂肪組織の炎症反応

研究課題名(英文) Inflammatory responses of the abdominal adipose tissue in red sea bream *Pagrus major*

研究代表者

中村 修 (Nakamura, Osamu)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：00306648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織は単なる脂肪の貯蔵庫ではなく、内分泌器官、免疫器官として重要な働きをしていることが哺乳類で明らかにされている。我が国の代表的な養殖魚の一つであるマダイを対象として、内臓脂肪組織の免疫器官としての特性、および腹腔内投与死菌への応答を調べた。その結果、マダイ内臓脂肪組織には多数の白血球が常在しており、ヒトやニジマスの報告とは異なり、好酸性顆粒球が最も多かった。また腹腔内に死菌を投与したところ、脂肪組織においていくつかの炎症性サイトカイン発現の有意な増加が見られ、マダイ脂肪組織が免疫器官として機能しており、腹腔内の死菌に応答して炎症を誘導することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Abdominal adipose tissue (AAT) is an active immune organ that harbors a number of leukocytes, especially macrophages in mammal. To elucidate properties of AAT of red sea bream *Pagrus major* as an immune organ, I performed differential count of AAT-resident leukocytes. I also analyzed expression of the genes of some proinflammatory cytokines in AAT after intraperitoneal injection of formalin-killed *Vibrio anguillarum*. I found that a number of leukocytes, especially eosinophilic granulocytes are present in the AAT of *P. major*. After injection of *V. anguillarum*, significant up-regulation of gene expression of some proinflammatory cytokines was demonstrated by quantitative PCR. These result indicate that AAT of *P. major* is an active immune organ that can evoke inflammatory responses.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：マダイ 脂肪組織 白血球 炎症性サイトカイン *Vibrio anguillarum*

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織はかつては単なる脂肪の貯蔵庫とみなされていたが、レプチンやアディポネクチンの発見により、内分泌器官として注目され出した。さらに哺乳類の脂肪組織には多くの白血球が存在すること、肥満個体の脂肪組織では TNF などの炎症性サイトカインの発現が高まっており、肥満が慢性的な軽度の炎症状態を誘導すること、さらにそれらがメタボリックシンドロームと深い関係があることが分かり、近年、多くの報告がなされている。

炎症性サイトカインの一つである TNF はインスリン耐性を誘導し、糖尿病

一方、魚類では、養殖魚が天然魚に比べて脂肪を蓄積する傾向があることがよく知られている。しかし、養殖魚において発達した内臓脂肪組織が個体の健康にどのような影響を及ぼしているかは十分に研究されていない。免疫組織としての特性もニジマスや、ヨーロッパヘダイにおけるわずかな報告しかない。哺乳類では脂肪組織への過剰な脂肪の蓄積が炎症状態を誘導し、個体の健康に影響を及ぼしている。養殖魚も、過剰な餌の投与による脂肪の蓄積が、個体の健康を損ない、病気になりやすい魚を作り出している可能性がある。

また、魚類ワクチンの多くは腹腔に投与される。すなわち、内臓脂肪組織は投与されたワクチンと接触しうる場所にあり、魚類の内臓脂肪組織が免疫器官としての機能を持つのであれば、ワクチンへの免疫応答にも関わっている可能性がある。従来の研究では、魚類の主要な免疫器官である頭腎、体腎、脾臓の免疫応答が調べられているが、内臓脂肪組織は着目されていなかった。

このような問題意識のもとに、本研究は計画された。

2. 研究の目的

我が国の代表的な養殖魚であるマダイは内臓周囲に多くの脂肪を蓄積する。しかしその脂肪組織の免疫器官としての特性は全く知られていない。

そこでマダイを用いて、内臓脂肪組織にどのような白血球が存在するか、分離細胞及び組織切片で調べた。また腹腔内に投与された死菌に対して炎症反応を惹起するか、調べた。

3. 研究の方法

1) マダイ脂肪組織の組織切片観察

マダイ成魚(養殖魚)を開腹して内臓脂肪組織を採取した。固定後、パラフィン包埋し、切片を作製した。ヘマトキシリン エオシン (HE)染色に供し、光学顕微鏡で観察した。

またマダイ未成魚腹腔内に朱墨を投与し、同様に組織観察を行った。

2) マダイ脂肪組織を構成する白血球

マダイ内臓脂肪組織を分離し、コラゲナーゼ処理して細胞を解離した。遠心分離後、沈殿した細胞群を回収、洗浄後、メイグリュンワルド・ギムザ(MG)染色し、分類、計数した。腹腔細胞、末梢白血球とも比較した。

3) マダイ CD4 およびマクロファージマンノース受容体 (macrophage mannose receptor; MMR) の cDNA クローニング

マダイは我が国の水産重要種でありながら、免疫関連遺伝子の情報が少ない。白血球マーカー遺伝子情報も少なく、本研究室で細胞傷害性T細胞に主に発現する CD8、B細胞に発現する膜型 IgM(mIgM)、主に形質細胞に発現する分泌型 IgM(sIgM)、マクロファージコロニー刺激因子受容体 (M-CSFR) の cDNA 塩基配列をクローニングしている。

さらにヘルパーT細胞に主に発現している CD4 の cDNA をクローニングした。他魚種の CD4 アミノ酸配列をもとに縮重プライマーを作製し、PCR で得られた産物をクローニングしてマダイ CD4 部分配列を得た。

マクロファージには炎症誘導に関わる M1 マクロファージと、非炎症性の M2 マクロファージという2つの表現型が存在する。哺乳類では、肥満の進行した脂肪組織では M1 マクロファージが増加することが知られている。魚類では確立したマクロファージのマーカーはなく、M1、M2 マクロファージに関する情報、それらを識別するマーカーもわかっていないが、哺乳類で M2 マクロファージのマーカーとして用いられる MMR のクローニングを試みた。CD4 と同様の方法で部分配列を得たのち、最終的には RACE 法により全長を得た。また、MMR 陽性細胞を検出する目的で、MMR の組み替え体タンパク質を作製し、それを用いて抗マダイ MMR 抗体を作製した。

4) マダイ白血球マーカー発現解析

マダイの内臓脂肪組織発見球、腹腔細胞、末梢白血球の cDNA を作製した。ヘルパーT細胞に主に発現する CD4、細胞傷害性T細胞に主に発現する CD8、B細胞に発現する膜型 IgM(mIgM)、主に形質細胞に発現する分泌型 IgM(sIgM)、マクロファージコロニー刺激因子受容体 (M-CSFR)、MMR および MHC class II の発現を、上記の cDNA をテンプレートして PCR を行い、発現を調べた。

5) 死菌に対する炎症反応

マダイを2群に分け、一方の腹腔内に魚病細菌 *Vibrio anguillarum* のホルマリン死菌を、他方に PBS を投与した。継時的に3尾ずつサンプリングし、脂肪組織、脾臓、頭腎、体腎をサンプリング、RNA を抽出、逆転写して定量 PCR 用テンプレートを作製した。

炎症サイトカイン TNF、IL-1、IL-8 の定量 PCR 用プライマーを作製し、SYBR Green 法による定量系を作製して、各組織における

発現を解析した。

4. 研究成果

1) マダイ脂肪組織を構成する白血球

マダイ腹腔内を肉眼的に観察したところ、腸間膜に付随する柔らかい脂肪組織と、それより背面に近い、弾力のある硬めの脂肪組織とが認められた。両者は完全に分離してはいないが、後者は結合繊維を多く含み、重量当たりの白血球の数は少なかった。前者は重量当たり、報告されている人の脂肪組織を上回る数の白血球を含んでいた。

これらの脂肪組織から分離した細胞を MG 染色して観察したところ、好酸性顆粒球、マクロファージ、リンパ球、好塩基性の細胞、またマダイ腹腔で発見された“大型細胞”(Watanabe et al., 1995)などが見られた。各細胞を計数したところ、好酸性顆粒球が最も多く、次いでマクロファージが多かった。好酸性顆粒球は全白血球の 50%以上を占めていた。このような細胞構成は腹腔細胞のそれと類似点があった。ただし、大型細胞は内臓脂肪組織には多くなく、その点は異なっている。一方、末梢血白血球にはリンパ球が最も多く、細胞構成は大きく異なっていた。

ヒト脂肪組織ではマクロファージが最も多い。また、魚類の脂肪組織白血球についての報告は乏しいが、ニジマスでは B 細胞が最も多いと報告されており、マダイの脂肪組織白血球はこれらのいずれとも異なることがわかった。

魚類の好酸性顆粒球は哺乳類のマスト細胞に相当する細胞であるという報告がされているが(Rete and Evensen, 2006)、まだその特性は十分に解明されていない。脂肪組織内でこの細胞がどのような役割を果たしているか、今後明らかにすべき課題である。

組織切片観察では、多数の好酸性顆粒球が主に血管周囲に集積している像が観察された。その他の白血球の分布については、HE 観察では識別できなかった。

腹腔内に朱墨を投与した後の内臓脂肪組織の切片を確認したところ、脂肪組織の主に表層に位置する細胞に朱墨が取り込まれていることを確認した。この結果から、脂肪組織には腹腔内の異物を貪食する細胞が存在することが分かった。しかしこの細胞の種類までは確認できていない。

2) 白血球マーカーのクローニングと発現解析

cDNA クローニングにより、マダイ CD4 の部分配列、および 4797bp からなる MMR 全長を得た。

逆転写 PCR により、CD4、CD8、mIgM、sIgM、M-CSFR、MMR はいずれも脂肪組織で発現していた。このことから、T 細胞、B 細胞、形質細胞、マクロファージの存在が示唆された。また MHC class II も発現していたことから、抗原提示細胞が存在していることも示

唆された。

哺乳類では M2 マクロファージのマーカーの一つとされている MMR の発現が明瞭に認められたことから、本研究で用いた個体の脂肪組織には M2 マクロファージが存在することが示唆された。しかし炎症に関わる M1 マクロファージのマーカーは得られていないため、調べることができなかった。

3) マダイ MMR の組み替え体の作製

MMR の N 末端側配列をもとに組み替え体タンパク質を作製した。これを抗原としたウサギ抗マダイ MMR 抗体の作製を業者に委託した。

しかしウェスタンブロットングにて特性を確認したところ、MMR に相当する分子量には陽性のバンドが得られず、この抗体を用いた実験を行うことはできなかった。

4) 死菌に対する炎症反応

3 種類の炎症性サイトカインについて、定量 PCR を用いた定量系を作製できた。

測定の結果、3 種類のサイトカインで発現動態の違いはあるが、そのうちの 2 種類で死菌投与 6 時間後から、脾臓、頭腎、体腎とともに、脂肪組織における炎症性サイトカインの発現量が有意に増加した。対照群では変化は見られなかった。

この結果から、マダイ内臓脂肪組織は腹腔内の死菌に反応し、炎症反応を惹起することが明らかとなった。したがって、今後、腹腔内ワクチンの作用機序を考えるうえで、内臓脂肪組織における反応も観察する必要があると考えられる。

しかし脂肪組織がこれらの死菌を認識して直接反応したのか、腹腔細胞、あるいは他の免疫組織からのシグナルに反応したのかは不明である。マダイ腹腔内に投与された朱墨が脂肪組織に取り込まれるのが確認されていることから、脂肪組織が死菌を取り込み、反応した可能性が十分考えられるが、今後、*in vitro*での刺激実験などを行い、検証する必要がある。

また、死菌投与前の内臓脂肪組織でも一部のサイトカインが他の組織よりも高い発現量を示した。今回用いたのは養殖魚であり、内臓脂肪組織がよく発達し、多量の脂肪を蓄積していた。マダイでも哺乳類と同様に、多量の脂肪の蓄積が炎症性サイトカインの発現上昇を導いている可能性が考えられる。

過剰な脂肪蓄積がマダイ脂肪組織にどのような影響を与えるかは興味深い点であるが、今回その解明まではできなかった。今後、養殖個体と同サイズの天然個体を入手できれば、それらを比較することにより脂肪蓄積の影響がある程度わかると考えられるが、養殖魚と天然魚では他の生育条件も大きく異なる。稚魚期から飼育して、脂肪蓄積個体と、そうでない個体群とを作ることができれば、それらの間で脂肪組織の特性を比較するこ

とにより、脂肪蓄積が内臓脂肪組織の炎症性サイトカインの発現や、免疫応答などにどのような影響を与えうるのか、解明が進むと考えられる。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Miki Takimoto, Ryouta Hishi, Masanobu Mizuguchi, Yui Machida, Kyouka Mitomi, Shigeyuki Tsutsui and Osamu Nakamura
Immunological activity of the abdominal adipose tissue of red sea bream, *Pagrus major*. The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium "Fisheries Science for Future Generations" (2017 年)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 修 (Nakamura Osamu)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：00306648

(4)研究協力者

筒井 繁行 (Tsutsui Shigeyuki)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：20406911

滝本 未来 (Takimoto Miki)

北里大学・大学院海洋生命科学研究所・修士課程