

令和元年6月26日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06201

研究課題名(和文) 魚類鰓抗原取り込み細胞の細胞生理学的研究：魚類独自の抗原捕捉システムの解明

研究課題名(英文) Characterization of gill epithelial antigen sampling cells

研究代表者

加藤 豪司 (Kato, Goshi)

東京海洋大学・学術研究院・助教

研究者番号：50624219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,800,000円

研究成果の概要(和文)：浸漬ワクチンは、養殖魚へのストレスが少なく、ワクチン投与にかかる経済的コストも抑えられるため、その適用範囲の拡大が求められている。本研究では、浸漬ワクチンの成分を取り込む鰓上皮抗原取込細胞が、リソソームやファゴソームを有し、ワクチン抗原の取り込みおよび抗原提示が可能であることを示した。今後、鰓上皮抗原取込細胞を標的とした新たなワクチンの開発が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

浸漬ワクチンは、これまで限られた病原体に対してのみ使用可能であった。本研究では、鰓上皮抗原取込細胞によりワクチン成分が取り込まれるか否かにより、その浸漬ワクチンとしての有効性が担保される可能性を示した。今後、鰓上皮抗原取込細胞により取り込まれやすい細菌や取り込まれやすい分子を明らかにすることで、鰓上皮抗原取込細胞を標的とした新たな浸漬ワクチンの開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Bath-vaccination is a cost-effective technique to apply vaccines to fish. However, mechanisms of antigen uptake and immune recognition on the mucosal surfaces of fish are largely unknown. We have demonstrated that bacterial vaccine antigens are taken up by gill epithelial antigen sampling (GAS) cells. In this study, we showed that teleost GAS cells have functions in antigen processing and antigen presentation. These results may contribute to develop a new technique for fish bath-vaccination.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：粘膜免疫 浸漬ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

水産用ワクチンは養殖魚の感染症予防に使用されており、魚病被害の軽減に大きく貢献している。しかし、水産用ワクチンの用法はほとんどの場合が注射であり、稚魚や魚種によっては投与できない場合もある。さらに、術者の安全、労働コストおよび魚体へのストレスなどの問題点から注射法に代わるワクチン投与方法の開発が重要な課題となっている。ヒトなどの哺乳類では、ワクチン液を粘膜に塗布する「粘膜ワクチン」が開発され、注射を用いず安全に投与できるため注目されている。哺乳類の粘膜上皮には、ワクチンなどの抗原を取り込む小嚢細胞(M細胞)が存在する。M細胞は腸管や鼻腔などの粘膜上皮組織に分布しており、GP2などのレセプター分子により病原体を捕捉し、飲作用により抗原を体腔側へと運搬する。また、M細胞はレクチンの一種 *Urex europaeus agglutinin 1* (UEA1)に結合するため、組織学的に判別することができる。最近では、M細胞に接着しやすい分子(GP2リガンドやUEA1など)を用いたワクチンデリバリーシステムの研究・開発が進められている。

病原体を含む微生物の豊富な水中で生活している魚類は、外界と接するほとんどの部分が粘膜で覆われており、粘膜組織における免疫系も発達している。魚類では、病原体の培養液を不活化したワクチン液に魚を浸す浸漬投与方法が、*Vibrio anguillarum*、*Yersinia ruckeri* および *Aeromonas salmonicida* に対して用いられている。浸漬ワクチンについては、可溶性抗原が皮膚および腸管から取り込まれ、腎臓などの二次リンパ組織においてその抗原に対する抗体が産生されると考えられている(3-4)。一方で、魚類の粘膜組織における菌体などの粒子状抗原の取り込みについては知見が乏しい。そこで、申請者らは各種細菌の不活化菌体を浸漬投与することで、魚類の粘膜上皮における抗原の取り込みについて研究を行った。

その結果、浸漬投与方法でワクチン効果が得られる *A. salmonicida*、*V. anguillarum*、および *Y. ruckeri* は鰓上皮組織の一部の細胞により取り込まれていることを明らかにした(図A)。一方で、浸漬投与してもワクチン効果を得られない *Streptococcus iniae* の不活化菌体は鰓上皮組織から取り込まれなかった。また、浸漬ワクチン処理後には、鰓で炎症性サイトカイン遺伝子(IL-1、IL-6およびTNF)が発現上昇することを明らかにした。

次にレクチン結合性について解析した結果、哺乳類のM細胞同様に鰓上皮抗原取り込み細胞もUEA1+であることを明らかにした。また、これら抗原を取り込むUEA1+細胞は鰓の上皮組織を構成する細胞のうち約11%を占める細胞集団であり、鰓弓に近い部分の一次鰓弁、二次鰓弁およびInterbranchial lymphoid tissue(鰓弁基部に存在するリンパ球が集合した部位)に多く観察された。以上の研究成果から、魚類でも鰓粘膜組織には抗原を取り込む細胞が存在しており、抗原の運搬および免疫応答の誘導に関与することが示唆された。この細胞集団による抗原の認識・捕捉のメカニズム、および抗原刺激に対する本細胞の免疫応答を明らかにできれば、魚類の免疫機構に関する新たな知見が得られる。また、魚類の鰓粘膜を標的とした新たなワクチン投与方法の開発につながると考えられ、本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、鰓上皮組織の抗原取り込み細胞(Gill epithelial Antigen Sampling cells: GAS細胞)について研究期間内に以下の3つの点を目的に研究を行う。

1. GAS細胞の形態および組織分布を明らかにする。
2. 抗原刺激に対するGAS細胞の免疫応答を明らかにする。
3. GAS細胞の抗原レセプターおよびそのリガンドとなる細菌由来分子を同定する。

### 3. 研究の方法

#### 1. GAS細胞の形態および組織分布

これまでの研究では、GAS細胞を不活化菌体を取り込んだUEA1に結合する細胞として識別してきた。しかし、この方法では抗原で刺激されていない定常状態のGAS細胞について解析ができなかった。そこで、以下の実験を行う。

- ・博士マウスにUEA1陽性の鰓上皮細胞を抗原として接種する。Flow cytometryを用いてGAS細胞に反応するモノクローナル抗体(mAb)をスクリーニングにし、樹立する。
- ・作製したmAbにより認識されるGAS細胞の表面分子をウェスタンブロットおよび免疫沈降法を用いて明らかにする。
- ・作製したmAbを金コロイドで修飾し、GAS細胞の形態について細胞表面および内部の構造を電子顕微鏡により観察する。
- ・作製したmAbを用いて免疫組織化学を行い、鰓におけるGAS細胞の分布を明らかにする。

#### 2. 抗原刺激に対するGAS細胞の応答

これまでの研究成果から、浸漬ワクチン処理後には鰓で炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6およびTNF)の遺伝子発現が上昇することを明らかにした。また、哺乳類の粘膜組織では、特定の細菌による刺激に対してM細胞が上皮組織中で増加し、抗原の取り込みが促進されることが知られている。そこで、以下の実験を行う。

- ・ *A. salmonicida* の不活化菌体をニジマスに浸漬投与し、鰓上皮組織における GAS 細胞の増減を、作製した mAb を用いて Flow cytometry で解析する。
- ・ *A. salmonicida* の不活化菌体をニジマスに浸漬投与し、作製した mAb を用いた磁気細胞分離法 (MACS) により GAS 細胞を分取する。抗原刺激による遺伝子発現の変化を網羅的に次世代シーケンサーで解析する。
- ・ 抗原刺激による遺伝子発現の変化が顕著だった遺伝子について、鰓の組織切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法を行い、当該遺伝子が GAS 細胞で発現しているか確認する。

### 3. GAS 細胞の抗原レセプターおよびそのリガンドとなる細菌由来分子の同定

これまでの研究成果から、特定の病原性細菌が GAS 細胞により取り込まれると考えられる。哺乳類の M 細胞は、特定の細菌のフィンブリントタンパク質をレセプター分子 GP2 により認識・捕捉することによりこれら抗原分子を取り込む。また、GP2 の発現は炎症性サイトカインにより制御されている。そこで、GAS 細胞について以下の実験を行う。

- ・ 上記の抗原刺激後の GAS 細胞の遺伝子発現解析の結果から、抗原刺激後に発現上昇する遺伝子のうち細胞表面分子を探索し、抗原レセプター候補を絞り込む。
- ・ これら細胞表面分子のプロモーター領域の配列解析およびレポーターアッセイによる遺伝子発現制御解析を行い、当該遺伝子の制御機構を明らかにする。
- ・ これらの抗原レセプター候補について His-tag を付加した組換えタンパク質を作製し、*A. salmonicida*、*V. anguillarum* および *Y. ruckeri* と反応させた後、抗 His-tag 抗体を用いた免疫染色を行い抗原レセプター候補と細菌の相互作用を解析する。
- ・ 同定した抗原レセプターが認識する細菌由来タンパク質を、二次元電気泳動および抗原レセプターの組換えタンパク質を用いたウェスタンブロッティングによりスクリーニングする。抗原レセプターに認識されたスポットを二次元電気泳動ゲルから切り出し、質量分析によりリガンドとなる細菌由来分子を同定する。

### 4. 研究成果

ニジマスの鰓上皮には、浸漬投与したワクチン抗原を取り込む鰓上皮抗原取込 (Gill epithelial antigen sampling (GAS)) 細胞が存在する。これまで、GAS 細胞はレクチンの一種 *Ulex europaeus* agglutinin 1 (UEA1) に親和性を有すること、*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (*A. s. s.*) の不活化菌体を取り込むことの二点を利用し識別してきた。そこで本研究では、より簡便に GAS 細胞を識別するために、モノクローナル抗体 (mAb) を作出し、それを使用して GAS 細胞の形態学的な特徴を解析した。ニジマスの鰓上皮から分離した UEA1 陽性細胞を PFA で固定し、マウスに免疫した。常法によりハイブリドーマを作製し、UEA1 および Syto61 で染色した *A. s. s.* 不活化菌体で標識した GAS 細胞を用いてスクリーニングを行った。また、鰓の凍結切片およびパラフィン切片を作製し、これら mAb を用いた蛍光免疫染色を行った。さらに、mAb を利用して GAS 細胞を分取し、得られた細胞を May-Grunwald Giemsa 染色して観察した。ハイブリドーマのスクリーニングの結果、UEA1+A. s. s.+ の GAS 細胞に特異的に反応する mAb (2B4-1) を得た。2B4-1 は、アセトンおよび PFA で固定した凍結切片だけでなく、パラフィン切片にも感度良く反応した。2B4-1 で染色された GAS 細胞は、一次鰓弁と二次鰓弁の上皮組織、およびそれらの基部に多く観察された。2B4-1 を用いて分画された GAS 細胞は、細胞質内に顆粒を多く含んでいた。このように、mAb 2B4-1 を使用することで、GAS 細胞の形態に関する詳細な解析が可能となった。

#### Monoclonal antibody (mAb) against GAS cells

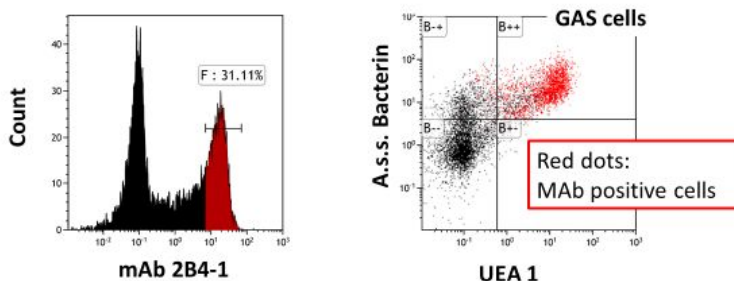
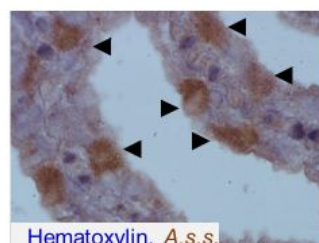
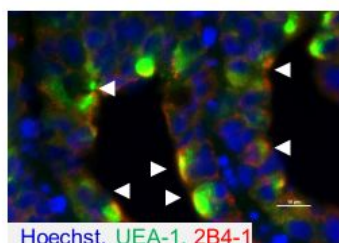


図 1. GAS 細胞に対するモノクローナル抗体の作出

GAS 細胞 (UEA-1+Ass+) を特異的に認識するモノクローナル抗体 2B4-1 を作出した。



初年度に作製した抗ニジマス GAS 細胞モノクローナル抗体を用いて、GAS 細胞の抗原刺激に対する応答の解析を行った。まず、ニジマスに *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ホルマリン不活化菌体を浸漬投与して、鰓上皮細胞を剥離した。剥離した鰓上皮細胞中の赤血球などをパーコール密度勾配遠心法で取り除き、磁気細胞分離法で GAS 細胞の分取を試みた。市販の磁気細胞分離法について、いくつかの方法を試してみたが、いずれの方法を用いても目的細胞の純度が不十分であり、今後さらに条件検討が必要となった。一方で、これまでの実験では使用できなかった *Y. ruckeri* を共同研究先から入手し、実験を行ったところ、*Y. ruckeri* も GAS 細胞に取り込まれることを明らかにした。さらに、フローサイトメトリーによる細胞分取法で *Y. ruckeri* 不活化菌体を浸漬投与したニジマスの鰓上皮細胞から GAS 細胞を分取したところ、十分な純度で細胞を採取することができた。採取した GAS 細胞における抗原取込、抗原の消化、および抗原のプロセッシングに関わる遺伝子群について遺伝子発現解析を行ったところ、浸漬 1 時間後までには大きな遺伝子発現の変化はないことが分かった。一方で、浸漬ワクチン処理後に、GAS 細胞特異的に高発現する膜結合型タンパク質遺伝子を同定することができた。

以前に行った抗原刺激後の GAS 細胞の遺伝子発現解析の結果から、GAS 細胞で発現上昇する膜型タンパク質をコードする遺伝子を探索したところ、合計で 253 の候補配列が該当した。そのうち、細胞外領域のサイズが妥当なもの、ドメイン検索で代謝系の酵素等に特異的な配列を含まないもの、発現レベルが一定以上のもの (FPKM 値 > 100) をスクリーニングすると、最終的にレセプター候補と考えられる 5 つの配列が得られた。これらの中には、zymogen granule membrane 16 protein-like (ZG16L) およびその他 4 つの機能未知な Uncharacterized protein が含まれていた。ZG16L は、糖タンパク質やマンノース (病原体の表面に普遍的に存在する分子) を認識する Jacalin 様レクチンドメインを有しており、細菌由来 LPS の認識に関与すると考えられた。そこで、これら遺伝子の GAS 細胞による発現を real-time PCR により確認したところ、確かに ZG16L の遺伝子発現レベルは不活化菌体の浸漬投与後に上昇することがわかった。また、ニジマス各組織由来の cDNA を鋳型に RT-PCR を行ったところ、ZG16L は鰓上皮に特異的に発現することがわかった。そこで、ZG16L の組換えタンパク質について大腸菌の系を用いて作製を試みた。しかし、本研究課題では予想したサイズの組換えタンパク質の作製はできず、ZG16L のリガンドの決定することはできなかった。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kato Goshi, Miyazawa Haruya, Nakayama Yumiko, Ikari Yuki, Kondo Hidehiro, Yamaguchi Takuya, Sano Motohiko, Fischer Uwe. A Novel Antigen-Sampling Cell in the Teleost Gill Epithelium With the Potential for Direct Antigen Presentation in Mucosal Tissue. *Frontiers in Immunology*. 9. 2116. (2018)

### 〔学会発表〕(計 5 件)

1. 碓 由紀・市田健介・山口卓哉・Uwe Fischer・佐野元彦・加藤豪司. ニジマス鰓上皮抗原取込細胞に対するモノクローナル抗体の作出. 平成 29 年度日本魚病学会春季大会
2. Haruya Miyazawa, Uwe Fischer, Takuya Yamaguchi, Hidehiro Kondo, Motohiko Sano, Goshi Kato. Comprehensive gene expression analysis in gill-epithelium antigen sampling cells of rainbow trout. The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium Fisheries Science for Future Generations. 2017
3. Yumiko Nakayama, Takuya Yamaguchi, Uwe Fischer, Hidehiro Kondo, Motohiko Sano, Goshi Kato. MHC class II expression on gill epithelial antigen sampling cells. 10th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. 2017.
4. Yuki Ikari, Kensuke Ichida, Takuya Yamaguchi, Uwe Fischer, Motohiko Sano, Goshi Kato. Development of a monoclonal antibody against gill epithelial antigen sampling cells of rainbow trout. 10th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. 2017.
5. Goshi Kato, Haruya Miyazawa, Yumiko Nakayama, Yuki Ikari, Hidehiro Kondo, Takuya Yamaguchi, Motohiko Sano & Uwe Fischer. GILL-EPITHELIAL ANTIGEN SAMPLING CELLS IN RAINBOW TROUT. The 14th Congress of the International Society for Developmental and Comparative Immunology. 2018

### 〔図書〕(計 1 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。