

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：23401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2019
課題番号：16K07878
研究課題名(和文) 魚類の二次リンパ組織における抗原捕捉機構

研究課題名(英文) Antigen trapping in fish lymphoid organs

研究代表者

末武 弘章 (Suetake, Hiroaki)

福井県立大学・海洋生物資源学部・教授

研究者番号：00334326

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)：魚類ではワクチンなどの抗原は脾臓や腎臓のメラノマクロファージセンター(MMC)が捕捉する。魚類では、抗原捕捉・保持に関わると考えられる補体受容体やFc受容体が複数存在することが明らかになった。魚類MMでは、同様の機能と特徴を持つ哺乳類脾臓細胞と分化に関わる転写因子の発現パターンが異なることから、MMが魚類独自の分化機構を持つことが示唆された。また、トランスクリプトーム解析により魚類のMMCが哺乳類で抗原を保持し、親和性成熟を担う胚中心に近い役割をもつことが示唆された。さらに、少なくともMMCの一部は、循環血中由来である可能性とともに、人為的にMMCを増殖可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類のワクチンの作用部位である二次リンパ組織は、哺乳類と魚類では分子細胞レベルで異なる。本研究では、新たにメラノマクロファージセンター(MMC)の中心的な細胞であるメラノマクロファージが機能的に類似する哺乳類細胞とは異なる由来の細胞であるものの、MMCが免疫記憶形成の中核である胚中心と類似することを明らかにできた。これらのことは、魚類免疫機構の哺乳類との共通性と独自性の両方を示す結果となった。今後ますます拡大するだろう養殖における魚病対策の根幹となるワクチンの作用機序の理解に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In fish, antigens such as vaccine were trapped at melanomacrophage center (MMC). We found some antigen trapping-related molecules from some fish species. Fish MM is functionally analogous to mammalian spleen macrophage, but the transcription factor, which is related to differentiation of mammalian spleen macrophage, showed different expression pattern from MMs. This indicates the mammalian macrophages and MMs have different origins. NGS analysis of MMC in sea bream kidney demonstrated that fish MMC showed similar expression pattern to mammalian germinal center, which retains antigens and is the location for affinity maturation. We also found that at least part of MMs are derived from circulating blood and MMC is inducible.

研究分野：魚類生理学

キーワード：ワクチン 免疫 魚類 抗原

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年タンパク源として魚類の利用が世界的に盛んになっており、世界中で養殖が大ブームである。世界的な養殖の拡大に伴い、世界中で魚病の被害が大きな問題となっている。魚病対策として、薬剤の投与などが行われているが、安心安全を求める消費者のニーズに応えるために、魚類の免疫力を活かしたプロバイオティクスやワクチンの使用が盛んになってきている。とくに、ワクチンの効果は目覚ましく、養殖業者たちの期待は大きい。

ワクチンの作用は抗原に対する免疫応答によってもたらされるが、魚病ワクチンについては抗原の開発に関する知見に偏っており、いかにして適切な免疫応答を誘導するかというワクチンの作用機序に関してはほとんどブラックボックスのままである。哺乳類ではリンパ節や脾臓などの二次リンパ組織がワクチン作用の基盤となる獲得免疫応答の中核である。これらの組織には、末梢から血液やリンパ液を介して、獲得免疫反応を引き起こす抗原の情報が集積される。また、こうした抗原の捕捉・保持が免疫記憶の形成・維持に重要な役割を担っていると考えられている (Barrington et al., 2002)。魚類においても魚病ワクチン開発や投与法の改良には獲得免疫活性化と免疫記憶の形成・維持の仕組みの理解が求められる。

申請者はこれまでに抗原を取り込み、獲得免疫を活性化する細胞を魚類で初めて同定しており (科研費若手B「トラフグの抗原提示細胞」、Sugamata et al., 2009、日本水産学会水産学奨励賞 2010)、さらに、抗体を産生するB細胞の活性化機構を解明しつつある (Kaneda et al., 2012; 科研費基盤C「注射ワクチンはなぜ効くのか?」)。これらの研究により、魚類の獲得免疫の活性化に関わる機構がわかってきた。しかし、獲得免疫の活性化および免疫記憶の成立・維持に重要と考えられる魚類の二次リンパ組織での抗原の捕捉・保持の分子機構についてはわかっていない。哺乳類では補体受容体や抗体受容体が二次リンパ組織での抗原捕捉因子であることが知られている (Barrington et al., 2002)。魚類ではこれらの受容体は見つかっておらず、これらの発見が魚類の獲得免疫活性化および免疫記憶成立機構を理解するための鍵となる。また、魚類二次リンパ組織ではマウスにはないエリプソイドやメラノマクロファージセンターが抗原の捕捉・保持に関与していることから、魚類独自の抗原捕捉および獲得免疫活性化機構の解明も期待される。

トラフグ、ゼブラフィッシュ、メダカなどではゲノム情報が利用可能となっており、こうした情報を駆使することで、未知の魚類遺伝子の同定が以前に比べ著しく容易になった。また、マウス以外では実質的に非常に困難であった遺伝子ノックアウト (KO) 技術が近年、魚類でも利用可能となった (CRISPR/Cas9 法)。この技術は革新的であり、これまで魚類では初期胚の時期を除きほとんど不可能であった *in vivo* (生体内) での遺伝子機能解析がこれで可能となった。申請者らはすでにこの方法を導入し遺伝子KO魚の作出に成功している (平成27年度日本水産学会春季大会「遺伝子ノックアウトによる脾臓欠損メダカの作出」)。この技術を用いて作出した抗原捕捉因子遺伝子KO魚に抗原を投与し、その遺伝子の抗原捕捉や獲得免疫活性化への影響を明らかにすることができる。本研究ではこのように、ワクチン作用の鍵となる二次リンパ組織での抗原捕捉・保持の分子機構を解明し、魚類の獲得免疫機構の理解を深めることで、ワクチン開発や投与法の改良に貢献したい。

2. 研究の目的

魚病ワクチンは高い効果を示すが、どのように免疫記憶を形成する獲得免疫応答を活性化させるかは十分にはわかっていない。哺乳類では二次リンパ組織で抗原捕捉細胞により捕捉された抗原は獲得免疫の活性化や免疫記憶の形成・維持に重要である。魚類の二次リンパ組織でも抗原捕捉は観察されるが、その分子機構は全くわかっていない。本研究では最新の研究手法を用いて、魚類の抗原捕捉・保持に関わる機構が明らかにする。本研究の成果は、魚類のワクチン投与方法開発の重要な基盤となるだろう。

3. 研究の方法

獲得免疫応答がワクチンの基盤であるが、その中核である二次リンパ組織における抗原捕捉・保持の細胞・分子機構は魚類ではわかっていない。哺乳類では抗体受容体や補体受容体が抗原を捕捉することがわかっている。また、魚類の抗原捕捉細胞に類似した哺乳類細胞の分化に関わる転写因子がすでに報告されている。申請者はゲノム情報を利用できる魚種でこれらの候補遺伝子を見だし、その発現パターンを解析するとともに、近年確立されたCRISPR/Cas9法により候補遺伝子を破壊し、これら遺伝子の影響を検討することを目指す。さらに、抗原捕捉部位のトランスクリプトーム解析を行うことにより、魚類の抗原捕捉に関わる因子を同定し、哺乳類の抗原捕捉部位との関係性を検討する。本研究により魚類の抗原捕捉・保持の細胞・分子機構の一端が明らかにする。

4. 研究成果

(1) 小型魚への免疫法の開発

ゼブラフィッシュを用いた小型魚への免疫法であるが、30Gの注射針と1mLのハミルトンシリンジを使用し、魚を麻酔後、湿らせたスポンジ上で固定し、10 μ Lを腹腔に投与した場合、

高い生残率を示したことから、今後はこの方法で免疫可能であることが明らかになった。実際に異物として墨汁を投与したところ、1週間後に予想どおり、脾臓における捕捉が確認された。この手法を用いてメラノマクロファージセンター(MMC)の増殖を促す実験を行った。

(2) 抗原捕捉関連遺伝子の同定

魚類ではいまだ報告されていない補体受容体と抗体の受容体であるFc受容体といった抗原捕捉因子をトラフグおよびゼブラフィッシュのゲノムデータから見出した。いくつかのFc受容体はトラフグにおいて実際に発現していることを明らかにしたが、魚類にはない抗体に対する受容体なども見つかったことから、どの遺伝子が実際に抗原捕捉に関わるかは解明できなかった。補体受容体候補遺伝子はトラフグでは脾臓に特異的に発現することが見出されたが、ゼブラフィッシュでは脾臓に加え、腎臓などいくつかの組織での発現が認められた。さらに、ゼブラフィッシュを用いて補体受容体候補遺伝子のCRISPR/Cas9法による遺伝子ノックアウト魚を作出し、抗原捕捉との関連を検討中である。

MMCは魚類のリンパ組織において長期間抗原を保持しつづけるシステムであるが、その細胞、遺伝子レベルでの実体は十分にはわかっていない。メラノマクロファージは変温脊椎動物で広く見られる機構であることから、その応用範囲は広いことが期待できる。メラノマクロファージ(MM)は赤血球を取り込み、鉄のリサイクルに関与する細胞であると考えられている。この性質は哺乳類の脾髄や骨髄のマクロファージと機能的に相同である。また、MMは自家蛍光を発するが、この特徴も同様である。これらのマクロファージはその分化にETSファミリーに属する転写因子が必須である。そこで、MMにおいてこの転写因子が分化に関わると考えた。ところが、本転写因子をコードする遺伝子は哺乳類とは異なり、魚類では複数あることが広く軟骨魚類から真骨魚類まで認められたことから、どちらが哺乳類の機能的相同遺伝子であるかを検証するための遺伝子発現解析を行った。ところが、トラフグで組織別発現を調べたところ、これらの遺伝子の発現パターンが異なっていることが明らかになり、魚類と哺乳類の抗原捕捉細胞の分化機構が異なることが予想された。さらに、転写因子遺伝子についてはゼブラフィッシュを用いたノックアウト魚の作出に成功しており、今後の研究に活かしたい。

魚類の抗原捕捉細胞の分化パターンが哺乳類とは異なる可能性が見えたことから、MMの由来を探ることとした。MMの特徴である赤血球リサイクル機構を調べるために、ゼブラフィッシュやトラフグに傷害を与えた赤血球を投与したところ、MM様細胞が脾臓や腎臓に速やかに現れた。また、溶血性貧血を引き起こすと、大量のMM様細胞が非常に短期間でリンパ組織内に現れることが明らかになった。こうした細胞は、血中にも存在することから、これらの細胞が血中由来である可能性が高まった。さらに、これら細胞は時間がたつにつれて、MMC様のクラスターを形成することが認められたことから、魚類では溶血により、人為的に抗原捕捉の場であるMMCを増加させることができる可能性が新たに示された。

(3) MMCで発現する遺伝子

MMCが明瞭であるマダイを利用して腎臓を磨砕後、フィルターで濾過し、MMCの単離に成功した。これにより、マイクロダイセクションを行わずに発現遺伝子の解析が可能となった。これらMMCに特異的に発現するタンパク質を2次元電気泳動によって解析したところ、MMCの機能的特異性に関わるかが不明なセラチンなどの発現のみが認められた。そのため、MMCを用いたトランスクリプトーム解析を行い、MMC画分に特徴的な遺伝子の検索を行った。MMC画分ではT細胞、B細胞、マクロファージの存在を示す遺伝子の発現が見られたが、非MMC画分と量的な差は見られなかった。MHC分子も両画分に差はなかった。しかし樹状細胞に特徴的な遺伝子の発現がMMC画分で高発現していた。さらに、抗原捕捉において重要な因子である補体因子と補体受容体のいくつかはMMC画分により強く発現していた。こうした結果はこれまで報告されておらず、本研究で想定していた補体による免疫複合体の捕捉機構がMMCに存在することを強く示唆するものである。さらに、多くのサイトカインやケモカインが発現しており、そのうちのいくつかはMMC画分で特徴的に発現していた。また、アポトーシスに関連する遺伝子のいくつかもMMCで強く発現していた。

このように、魚類には複数の抗原捕捉因子と考えられる遺伝子が存在することが明らかになり、その一部はリンパ組織特異的な発現を示した。また、魚類のMMCが哺乳類で抗原を保持し、親和性成熟を担う胚中心に近い役割をもつことが示唆された。少なくともMMの一部は、循環血中由来である可能性が示され、魚類の抗原捕捉機構において中心的な役割を果たすMMCが人為的に増加させられる可能性を示す新たな知見が得られた。本研究の成果により、2018年度に日本水産学会中部支部大会優秀発表賞、2019年度に日本比較免疫学会古田奨励賞を受賞した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 末武弘章・梅谷智大・中西瞭・小高智之・前田知己・宮台俊明
2. 発表標題 魚類の補体受容体候補遺伝子
3. 学会等名 平成28年度日本水産学会中部支部大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 林忠弘、関澤大輝、小高智之、瀧澤文雄、末武弘章、宮台俊明
2. 発表標題 魚類特有の抗原捕捉の場メラノマクロファージセンターは増やせるか？
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会中部支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林忠弘・関澤大輝・小高智之・末武弘章・宮台俊明
2. 発表標題 魚類の持つ2種類のSpi-C遺伝子
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林忠弘、関澤大輝、小高智之、瀧澤文雄、宮台俊明、末武弘章
2. 発表標題 魚類メラノマクロファージの両能性
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊 莉玖、筒井 繁行、末武 弘章、中村 修
2. 発表標題 マダいのメラノマクロファージセンターで発現する遺伝子の網羅的解析
3. 学会等名 日本比較免疫学会第 31 回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林忠弘、関澤大輝、小高智之、瀧澤文雄、宮台俊明、末武弘章
2. 発表標題 真骨魚類の転写因子Spi-Cは哺乳類とは異なる機能を持つ
3. 学会等名 日本比較免疫学会第 31 回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 末武 弘章
2. 発表標題 ゲノム編集を利用した魚類二次リンパ組織機能の解析
3. 学会等名 日本比較免疫学会第 31 回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 忠弘、関澤大輝、中山 宙、小高智之、瀧澤文雄、宮台俊明、末武弘章
2. 発表標題 魚類特有の転写因子Spic-L
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

2018年度 日本水産学会中部支部大会優秀発表賞
2019年度 日本比較免疫学会古田奨励賞

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	宮台 俊明 (Miyadai Toshiaki) (20157663)	福井県立大学・海洋生物資源学部・名誉教授 (23401)	
研究 分担者	中村 修 (Nakamura Osamu) (00306648)	北里大学・海洋生命科学部・准教授 (32607)	
研究 分担者	筒井 繁行 (Tsutsui Shigeyuki) (20406911)	北里大学・海洋生命科学部・講師 (32607)	