

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07939

研究課題名(和文) 寄生虫に対する魚類粘膜組織における獲得免疫機構の解明

研究課題名(英文) Adaptive immunity of fish mucosal tissues against protozoan parasites

研究代表者

杉本 智軌 (Somamoto, Tomonori)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：40403993

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)：本研究においてギンブナのCD8陽性T細胞が白点虫(Ichthyophthirius multifiliis)を傷害することを明らかにした。その傷害機構は、一般的に知られているT細胞の抗原認識機構とは異なり、自然免疫の受容体であるNCCRP-1で寄生虫を認識して殺傷するという哺乳類ではみられない新規の細胞傷害メカニズムを有していることが示唆された。白点虫の寄生部位であるエラのCD8陽性T細胞が白点虫のセロントを積極的に攻撃していることから、魚類の粘膜組織においてCD8陽性T細胞は寄生虫排除に重要な働きを担っていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の水産養殖では、様々な寄生虫類の感染症が問題となっているものの、寄生虫は発育ステージによって抗原性が変化すること、寄生部位が限定されることから、宿主の防御メカニズムを解明することが困難とされている。特に魚類のT細胞の寄生虫に対する機能は殆んど分かっていなかった。本研究では、魚類のT細胞は、寄生原虫に対する防御機構において重要な細胞あり、自然免疫担当の受容体で寄生虫を認識するという哺乳類ではみられない特徴を有していることを明らかにした。この研究成果は水産養殖業における寄生虫感染症に対する予防法の開発への貢献や比較免疫学へ重要な知見を付与するものである。

研究成果の概要(英文)：The present study has shown that CD8-positive T cells from gill of ginbuna crucian carp directly kill protozoan parasite, Ichthyophthirius multifiliis. CD8-positive T cells recognized the parasite by NCCRP-1, which is a receptor for innate immunity, indicating that teleost T cells possess a unique parasite recognition system. The findings obtained in this study suggest that CD8-positive T cell plays an important role in eliminating the parasite in the mucosal tissue of fish.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：寄生原虫 T細胞 魚類 細胞傷害 免疫 鰓 粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

現在の水産養殖では、細菌、ウイルス、寄生虫など様々な病原体による感染症が問題となっており、それら感染症に対するワクチン開発が急務とされている。現在まで、ウイルスや細菌感染症に対する魚病ワクチンは数多く開発されている一方で、様々な寄生虫類の感染症が問題となっているものの、有効な寄生虫ワクチンは世界的にみても開発・認可されていない。その理由として、寄生虫は発育ステージによって抗原性が変化すること、寄生部位が限定されることから、宿主の防御メカニズムを解明することが困難であることが挙げられる。

ウイルスや細胞内寄生細菌に対する魚類の獲得免疫は、ヘルパーT細胞によって活性化されたキラーT細胞が感染細胞を排除する細胞性免疫が重要な働きを担っていることが分かっている。一方で、IgM や IgT といった抗体が寄生虫に結合するということが分かっているものの、寄生虫に対するT細胞の働きについてはほとんど分かっていない(Wang et al., 2019)。また、寄生虫は、鰓、消化管や体表といった粘膜組織に潜むことが多く、全身免疫よりも粘膜などの局所免疫が重要であると考えられる (Salinas, 2015)。魚類は、哺乳類の免疫系と相同な免疫システムを持つ脊椎動物であるが、鰓や体表粘膜などで覆われているため全身が粘膜組織だと考えられることから、哺乳類よりもより強固な粘膜免疫を有していることが予想される。しかしながら、魚類において「寄生虫」と「粘膜T細胞」の相互関係については、ほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、魚類のT細胞が寄生虫に対してどのように活性化され、どのようなメカニズムで寄生虫を排除しているのかを細胞や生体レベルで明らかにすることを目的とする。我々は、T細胞の機能解析モデルとしてクローンギンブナを用いて、魚類のウイルス感染時における局所および全身免疫におけるT細胞応答を明らかにしてきた。このモデルを利用することによって、獲得免疫系の中樞を担うT細胞を分離し、生体内外での機能を解析することが可能である。

繊毛虫 *Ichthyophthirius multifiliis* (白点虫)は、淡水魚の体表や鰓に寄生する原虫であり、熱帯魚やキンギョなどの観賞魚産業において多大な被害をもたらしている白点病の原因病原体である。白点虫は、キンギョおよびその亜種であるギンブナにも感染し、感染症状を容易に視覚で確認できることから、寄生虫の感染実験モデル構築に適した病原体である。そこで、本研究は白点虫に対する免疫応答をギンブナのT細胞解析モデルを用いて、T細胞受容体(TCR)とMHCを介さないでT細胞が直接寄生虫を排除する「Direct killing」機構に着目して、その特性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 病原体の準備

白点虫 (*I. multifiliis*) は、白点病発症魚と非感染の魚を同居飼育し、新しく白点病魚を作製しすることで、増殖させ継代した。白点病魚の体表からトロフォントを採取し、ピーカー内の水中に移しセロントを発生させた。白点虫は形態観察に加えPCR法とシーケンスによって同定した。

(2) T細胞の寄生虫排除機構 (Direct killing)

a. 白点虫に対するギンブナ白血球の傷害活性

腎臓と粘膜組織であるエラから白血球を採取し磁気ビーズ分離法によってギンブナ CD8 陽性細胞 (キラーT細胞) と CD4 陽性 T 細胞をそれぞれ分離した。これら CD8 陽性細胞 (キラーT細胞) CD4 陽性 T 細胞とその他の白血球 (CD8・CD4 陰性細胞) をエフェクター細胞とした。エフェクター細胞と白点虫 (セロント) と共培養した後にトリパンブルー染色によって死亡した白点虫の個体数を測定し、CD8 陽性 T 細胞の寄生虫に対する細胞傷害活性を評価した。

b. CD8 陽性 T 細胞の白点虫に対する細胞傷害試験における接触要求性

CD8 陽性 T 細胞が白点虫に接触することで寄生虫を傷害するのかを調べるため、CD8 陽性 T 細胞と白点虫の間に双方が通過することが出来ない孔径 0.4 μm のメンブレンフィルターを設置した際の白点虫の死亡数を測定することで、ギンブナ CD8 陽性 T 細胞が寄生虫に細胞傷害活性を示す為には接触する必要があるのかを調査した。

また、白点虫を CFSE で緑色蛍光染色し、CD8 陽性 T 細胞を抗ギンブナ CD8 α 抗体で用いて PE で赤色蛍光標識した。それぞれを共培養したのち蛍光顕微鏡で観察した。

c. CD8 陽性 T 細胞の白点虫を殺傷因子の探索

白点虫を殺傷する際に使用している細胞傷害因子を阻害剤を用いた傷害試験によって探索した。ギンブナ CD8 陽性 T 細胞をパーフォリン阻害剤コンカナマイシン A (CMA) またはセリンプロテアーゼ阻害剤 3,4-ジクロロイソクマリン (DCI) で処理することで、白点虫に対する細胞傷害活性に影響を及ぼすのかを調べた。

d. ギンブナ CD8 陽性 T 細胞の白点虫認識受容体の探索

アメリカナズスの非特異的細胞傷害性細胞 (Non-specific cytotoxic cell: NCC) が寄生虫に対する傷害活性を有することが報告されていることから、Non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1) がギンブナ CD8 陽性 T 細胞による白点虫の認識に関与しているのではないかと考えた。まず、NCCRP-1 が CD8 陽性 T 細胞に mRNA レベルで発現していることを RT-PCR で確認した。過去の研究により NCCRP-1 を介した NCC の活性化には、細胞内の非受容体型チロシンキナーゼの一つであるヤヌスキナーゼ 2 (JAK2) を介した JAK/STAT 経路が関与していると考えられている。よって CD8 陽性 T 細胞を JAK1/2 阻害剤である Baricitinib または TCR を介した細胞の活性化に関与する Src ファミリーキナーゼの阻害剤である Dasatinib で処理することで、白点虫に対する細胞傷害活性に影響を及ぼすのかを調べた。その後ギンブナ NCCRP-1 のアミノ酸配列から抗原認識部位と考えられる配列を推測しその部位を含む 3 種類のペプチドを合成した。また、ギンブナ NCCRP-1 のペプチドを免疫原として、抗ギンブナ NCCRP1 ウサギ抗体を作製し、それを用いたウェスタンブロット解析によって、ギンブナ CD8 陽性 T 細胞が NCCRP-1 をタンパク質レベルで発現しているかを調べた。次に白点虫を合成ペプチドで処理した後にギンブナ CD8 陽性 T 細胞と接触させた際の白点虫の死亡率から、ギンブナ CD8 陽性 T 細胞における寄生虫の認識に NCCRP-1 が関与しているかを評価した。

4. 研究成果

(1) 白点虫に対するギンブナ白血球の傷害活性

単離した CD8 陽性 T 細胞は、他のエフェクター細胞と比較して白点虫に対する高い傷害活性を示した(図1)。マクロファージなどを含む CD8・CD4 陰性白血球は殆んど傷害活性を示さなかった。

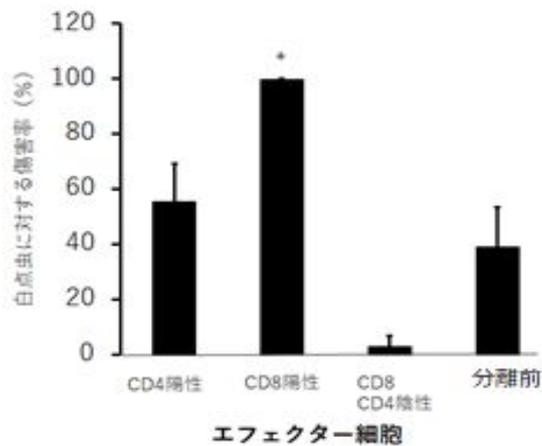


図1. ギンブナ粘膜組織(エラ)の白血球の細胞傷害活性。CD8陽性T細胞が最も強く白点虫を傷害した(p<0.05)。

(2) CD8 陽性 T 細胞と白点虫との接触

CD8 陽性 T 細胞と白点虫の接触を阻害すると白点虫に対する傷害率が大きく減少したことから、CD8 陽性 T 細胞は直接寄生虫を認識し、接触することで寄生虫を殺傷することが示された。また、白点虫と結合している CD8 陽性 T 細胞を顕微鏡で確認することができた(図2)。

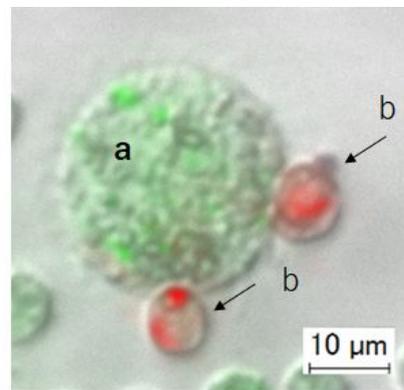


図2. 白点虫(a)に結合しているCD8陽性T細胞(b)

(3) CD8 陽性 T 細胞の白点虫を殺傷因子

CMA と DCI を用いた試験では、両阻害剤により白点虫の死亡率が減少した。この結果から CD8 陽性 T 細胞は、ウイルス感染細胞やアロ細胞と同様にパーフォリンとセリンプロテアーゼを使用することで白点虫を殺傷すると考えられた。

(4) ギンブナ CD8 陽性 T 細胞の白点虫認識受容体の探索

Baricitinib で処理すると CD8 陽性 T 細胞の白点虫に対する傷害率が有意に減少した。ウェスタンブロット解析では、白点虫は NCCRP-1 を発現しているのをタンパク質レベルで確認した(図3)。合成ペプチドを用いた阻害試験では、3種類の合成ペプチドのうち抗原認識部位と推定したペプチドのみで白点虫の死亡率が減少した。以上の結果から CD8 陽性 T 細胞の寄生虫に対する細胞傷害機構に NCCRP-1 が関与していることが示された。

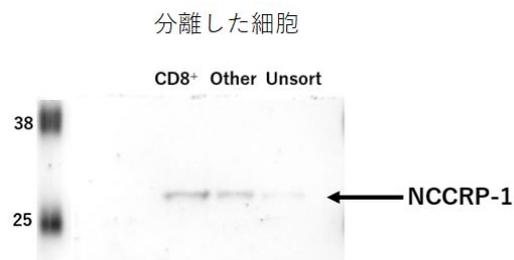


図3. 抗NCCRP1抗体を用いたウェスタンブロット解析。矢印がNCCRP-1の分子量。CD8陽性細胞はNCCRP-1タンパク質を発現している。

以上から、CD8 陽性 T 細胞は、NCCRP-1 で寄生虫を認識して複数の細胞傷害因子によって殺傷するという哺乳類ではみられない新規の細胞傷害メカニズムを有していることが考えられる。白点虫の寄生部位であるエラの CD8 陽性 T 細胞が白点虫のセロントを積極的に攻撃してい

ることから、魚類の粘膜組織において CD8 陽性 T 細胞は寄生虫排除に重要な働きを担っていることが示された。

References

Salinas I. The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology (Basel)*. 2015 Aug 12;4(3):525-39.

Wang Q, Yu Y, Zhang X, Xu Z. Immune responses of fish to *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich): A model for understanding immunity against protozoan parasites. *Dev Comp Immunol*. 2019;93:93-102.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Somamoto T., Nakanishi T.	4. 巻 99
2. 論文標題 Mucosal delivery of fish vaccines: Local and systemic immunity following mucosal immunisations.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fish & Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 199-207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsi.2020.01.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tajimi S, Kondo M, Nakanishi T, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T.	4. 巻 93
2. 論文標題 Generation of virus-specific CD8+ T cells by vaccination with inactivated virus in the intestine of ginbuna crucian carp.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental and Comparative Immunology	6. 最初と最後の頁 37-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dci.2018.12.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tokunaga Y, Shirouzu M, Sugahara R, Yoshiura Y, Kiryu I, Ototake M, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Comprehensive validation of T- and B-cell deficiency in rag1-null zebrafish: Implication for the robust innate defense mechanisms of teleosts.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-08000-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Somamoto T, Maruyama S, Nagasawa T, Nakao M, Sato A, Hatta H, Sato M, Murakami-Yamaguchi Y, Kizu-Mori K, Hirakawa Y, Narita H.	4. 巻 53
2. 論文標題 Development of anti-atypical Aeromonas salmonicida monoclonal antibodies for diagnosis of new ulcer disease in koi carp.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 36-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sukeda M, Shiota K, Kondo M, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T.	4. 巻 115
2. 論文標題 Innate cell-mediated cytotoxicity of CD8+ T cells against the protozoan parasite Ichthyophthirius multifiliis in the ginbuna crucian carp, Carassius auratus langsdorfii.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental and Comparative Immunology	6. 最初と最後の頁 103886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dci.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 助田将樹, 長澤貴宏, 中尾実樹, 杣本智軌
2. 発表標題 魚類CD8+ T細胞のMHC非依存的な細胞媒介性細胞傷害における寄生原虫認識受容体の探索
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高井優生, 助田将樹, 高村匠, 長野陽介, 島崎洋平, 杣本智軌, 大嶋雄治
2. 発表標題 魚類リポカリンタンパク質 TBT-bp2 破壊メダカにおける白点虫感染機構の解析
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 助田将樹・長澤貴宏・塩田昂明・中尾実樹・杣本智軌
2. 発表標題 ギンブナの細胞外寄生原虫に対する 細胞傷害機構におけるシグナル伝達経路の探索
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masaki Sakeda, Koumei Shiota, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Tomonori Somamoto
2. 発表標題 Direct cytotoxic activity of CD8+ T cells against Ichthyophthirius multifiliis in ginbuna crucian carp, Carassius auratus langsdorfii
3. 学会等名 The international society of fish and shellfish immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩田昂明・助田将樹・中西照幸・長澤貴宏・中尾実樹・杣本智軌
2. 発表標題 繊毛虫Ichthyophthirius multifiliisの成長段階の違いによるギンブナの免疫応答の比較
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 助田将樹・塩田昂明・長沢貴宏・中尾実樹・杣本智軌
2. 発表標題 ギンブナCD8+Tリンパ球の寄生原虫に対する細胞遊走活性
3. 学会等名 日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 助田将樹, 長沢貴宏, 中尾実樹, 杣本智軌
2. 発表標題 繊毛虫Ichthyophthirius multifiliisに対する魚類CD8+T細胞の傷害機構
3. 学会等名 日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M.
2. 発表標題 Ligand recognition specificity of carp thrombocytes as the natural type I IFN producing cells.
3. 学会等名 日本水産学会創立85周年記念国際シンポジウム 「Fisheries Science for Future Generations」 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Prakash H, Motobe S, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M.
2. 発表標題 Functional analysis of tecrem, a CD46-like complement regulatory protein, on epithelial cells in the common carp.
3. 学会等名 日本水産学会創立85周年記念国際シンポジウム 「Fisheries Science for Future Generations」 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Prakash H, Motobe S, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M.
2. 発表標題 Homeostatic functional analysis of Tecrem, a CD46-like complement regulatory protein, on epithelial cells in carp.
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 助田将樹・長沢貴宏・中尾実樹・杉本智軌
2. 発表標題 ギンブナCD8+Tリンパ球の細胞外寄生原虫に対する細胞傷害機構の解明
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杣本智軌
2. 発表標題 卵黄抗体で鯉の穴あき病予防
3. 学会等名 日本たまご研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 助田将樹, 長澤貴宏, 中尾実樹, 杣本智軌
2. 発表標題 魚類CD8+ T細胞のMHC非依存的な細胞媒介性細胞傷害における寄生原虫認識受容体の探索
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高井優生, 助田将樹, 高村匠, 長野陽介, 島崎洋平, 杣本智軌, 大嶋雄治.
2. 発表標題 魚類リポカリンタンパク質 TBT-bp2 破壊メダカにおける白点虫感染機構の解析
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------