

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18780148
 研究課題名 (和文) 魚類におけるウイルス抗原特異的リンパ球の培養システムの構築
 研究課題名 (英文) In vitro generation of viral-antigen specific T-lymphocytes from teleost
 研究代表者
 柚本 智軌 (SOMAMOTO TOMONORI)
 九州大学大学院農学研究院 准教授
 研究者番号：40403993

研究成果の概要：ウイルス性疾患は、細菌性疾患と異なり、抗菌剤や抗生物質では防除できないことから、有効なワクチンの開発が最も効果的なウイルス疾患対策だと考えられる。ワクチンの有効性を評価するためには、獲得免疫を評価する実験系の確立が必要であるが、魚類におけるウイルスに対する T 細胞の機能は殆ど解析されていない。獲得免疫の主役である T 細胞は主要組織適合抗原 (MHC) によって拘束されるため、その機能解析には MHC の遺伝型が適合した近交系あるいはクローン系統の実験動物が不可欠である。本研究では、クローンギンブナ、それらと同系の抗原提示細胞及び標的細胞株を用いることにより、①T 細胞のウイルス抗原特異的な増殖、②細胞傷害性 T 細胞によるウイルス感染細胞の破壊、といった獲得免疫系の応答を *in vitro* で再現し、魚類の抗ウイルス獲得免疫応答を評価する実験系を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	300,000	3,800,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：魚病、魚類免疫、細胞性免疫、ウイルス、ワクチン

1. 研究開始当初の背景

コイヘルペスウイルス (KHV) 病によるコイ養殖業への被害でも明らかなように、ウイルス感染症は我が国の水産増養殖業に甚大な被害をもたらしている。ウイルス性疾患は

細菌性疾患と異なり、抗菌剤、抗生物質では防除できないことから、ワクチンが最も効果的な防除手段だと考えられる。しかしながら、魚類におけるウイルス感染症に対するワクチンとしては、マダいのイリドウイルスしか

実用化されていない。その理由として、魚類の獲得免疫を評価する実験系の確立が困難であったことが挙げられる。

ワクチンの有効性を判断するには獲得免疫が成立するかどうか指標となる。哺乳類におけるウイルス抗原に対する獲得免疫成立の概要は以下の通りである。先ずウイルスが体内に侵入すると、樹状細胞、マクロファージなどの抗原提示細胞が、ウイルス抗原を主要組織適合抗原 (MHC) クラス II と共に提示する。次にヘルパーT細胞は遺伝的に同一の MHC クラス II とウイルス抗原を認識、増殖する。増殖したヘルパーT細胞は、B細胞に働きかけ抗体の産生を促進させる。また、ヘルパーT細胞の補助によって細胞傷害性 T細胞 (CTL) が遺伝的に同一の MHC クラス I を発現するウイルス感染細胞を排除する。すなわち、抗ウイルス機構における獲得免疫系は、①ヘルパーT細胞の抗原特異的な増殖、②特異抗体の産生、③細胞傷害性 T細胞による感染細胞の破壊 1、といった3種の免疫応答の評価が必要となる。

魚類は哺乳類と相同な獲得免疫系を有しているが、その獲得免疫系の中心である T細胞の細胞レベルでの機能解析は哺乳類と比べ著しく遅れている。その理由は、T細胞は主要組織適合抗原 (MHC) によって拘束されるため、その機能解析には MHC の遺伝型が適合した近交系あるいはクローン系統の実験動物が不可欠であり、魚類ではそのような実験動物を揃えることが困難であったことからである。しかしながら、我々は、自然界で雌性発生を行うギンブナに着目し、幾つかのクローン系統とそれら由来の細胞株を樹立することにより、*in vitro* での同種異系 (アロ) 抗原に対する CTL 様細胞の増殖を誘導することに成功した。従って、クローンギンブナ、それらと同系の抗原提示細胞及び

標的細胞株を用いれば、上述した3種の獲得免疫系の応答を *in vitro* で再現することが可能だと考えられる。

2. 研究の目的

背景で述べたようにクローン魚をモデル動物と利用した研究が殆ど行われていなかったため、魚類における T細胞依存性の抗ウイルス獲得免疫系の研究は、立ち遅れている。そこで、本研究では、クローンギンブナを実験魚とし、ギンブナに強い病原性を示すギンブナラウドウイルス (CHNV) を抗原として、ウイルス抗原特異的な T細胞の培養系を確立し、魚類における抗ウイルス獲得免疫応答を *in vitro* で再現する実験系を構築する。

3. 研究の方法

(1) CHNV 特異的リンパ球の *in vitro* での増殖誘導

まず、致死量以下の CHNV を S3n 系統のギンブナに感染させ、*in vivo* で CHNV 特異的リンパ球を誘導した。感作した魚から末梢血を採取し、比重分離法にてリンパ球を分離した。また、別個体の非感染 S3n 系統ギンブナから抗原提示細胞群 (リンパ球と MHC 型が一致) を比重分離法にて分離し、CHNV を感染させ、刺激細胞とした。リンパ球と刺激細胞を混合培養することによってリンパ球増殖の誘導を試みた。増殖能の測定は、³H-チミジンの取り込みあるいは BrdU の取り込み試験により評価した。

(2) 培養リンパ球の機能解析

① 細胞傷害性 T細胞 (CTL) 活性

(1) で増殖した培養リンパ球をエフェクター細胞 (傷害する側の細胞) とした。また、S3n ギンブナ鱗由来細胞株、CFS 細胞に CHNV を感染させ、標的細胞 (傷害される側

の細胞)とした。対照とし、他系統由来の細胞株 (CFK) 細胞を標的細胞として用いた。

これらエフェクター細胞と標的細胞を混合培養とし、⁵¹Cr 遊離法あるいは LDH 遊離法にて、エフェクター細胞の細胞傷害活性を測定した。

②中和抗体価

(1)の培養リンパ球の上清を採取し、その上清の CHNV に対する中和抗体価を測定した。

(3)培養リンパ球の同定

増殖した培養リンパ球の中に、CTL やヘルパーT 細胞が含まれているのかを確かめるため、CD8, TCR, CD4 等の T 細胞マーカーの mRNA 発現解析を行った。また、塗抹標本作製し、培養細胞の形態的特徴を観察した。

①ギンブナ CD4 分子のクローニング

CTL のマーカーであるギンブナの CD8 α 分子は、既にクローニングされているが、ヘルパーT 細胞のマーカーである CD4 分子の配列については、ギンブナでは明らかにされていない。そこで既知の CD4 分子の配列を基に縮重プライマーを作製し、PCR 法にてギンブナ CD4 分子のクローニングを試みた。

②培養リンパ球の T 細胞マーカーの mRNA 発現をリアルタイム PCR と *in situ* hybridization 法にて解析した。

4. 研究成果

本研究において、クローンギンブナを用いたウイルス抗原特異的リンパ球の培養系の確立に成功した。なお、本成果の大部分は、投稿論文 (①Somamoto *et al.*, 2009 *in press*) で公表されている。

(1)CHNV 特異的リンパ球の増殖

CHNV 感染クローンギンブナから採取したリンパ球は、*in vitro* で同系統由来の CHNV

感染抗原提示細胞群と混合培養することによって CHNV 特異的に増殖することが明らかとなった。その一方で、抗原提示細胞にリンパ球とは異なる系統由来の細胞を用いた場合は、CHNV 特異的な増殖は誘導されなかった。以上のことから、ギンブナの感作リンパ球は、ウイルス抗原刺激によって *in vitro* で増殖すること、哺乳類と同様に遺伝的に拘束を受けてウイルス抗原を認識することが明らかとなった。

(2) 培養リンパ球の機能解析

①培養開始後、8 日、12 日に採取したリンパ球は、CHNV 感染細胞を殺傷した。しかし、その培養細胞は、非感染同系細胞、CHNV と異なるウイルス(EVA)感染細胞や CHNV 感染同種異型 (アロ) 細胞は殺傷しなかったことから、誘導された細胞は、哺乳類の CTL と同様の抗原認識機構を持つことが示唆された。したがって、本培養系においてウイルス抗原特異的な細胞傷害性リンパ球が *in vitro* で誘導可能であることが示された。

②本培養系において、培養上清中のウイルス中和抗体は、検出できなかった。

(3) 培養リンパ球の同定

培養開始直後の細胞では、成熟した小型のリンパ球が 80%以上の割合で存在していたが、培養 4 日目になると、大型のリンパ芽球様細胞が 60%以上を占めるようになった。培養 12 日目では、リンパ芽球様細胞に加え、成熟した小型のリンパ球が新たに出現してきた。この結果は、抗原提示細胞上に CHNV 抗原をリンパ球が認識し、リンパ球が増殖に伴い幼若化したのち、成熟し傷害活能を有するようになったことを示唆している。また、*in situ* hybridization 法によって、ウイルス刺激によって誘導されてきたリンパ芽球様細胞

は、CD8 と TCR 陽性細胞であることが明らかとなった。また、感染細胞と結合し、実際に感染細胞を傷害している細胞は、CD8 と TCR 陽性細胞であることが確認された。よって、本培養系により、魚類の CTL が誘導されることが確認された。

以上の結果をまとめると、1) CHNV で感作したギンブナのリンパ球は、*in vitro* で CHNV を感染させた同系統由来の抗原提示細胞と混合培養することにより、抗原特異的な T 細胞が誘導されること、2) その誘導された培養リンパ球は抗原特異的に CHNV 感染同系細胞株を傷害すること、3) 増殖した細胞群の多くに CTL が含まれていることが明らかとなった。魚類の抗ウイルス機構の研究において、T 細胞の活性を評価する実験系の確立は困難だとされていたが、本研究により、ウイルス抗原特異的 T 細胞を培養することが可能となった。今後、本培養系を用いることにより、魚類の抗ウイルス機構における T 細胞の機能解析が進展することが期待され、魚類の獲得免疫機構の特徴に応じたワクチンの開発やワクチン投与方法の開発に貢献するであろう。

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 6 件)

① Tomonori Somamoto, Nobuaki Okamoto, Teruyuki Nakanishi, Mitsuru Ototake, and Miki Nakao,

In vitro generation of viral-antigen dependent cytotoxic T-cells from ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorffii*,

Virology, in press, 2009 (査読有)

② Seiko Nonaka, Tomonori Somamoto, Yoko Kato-Unoki, Mitsuru Ototake, Teruyuki Nakanishi, Miki Nakao, Molecular cloning of CD4 from ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorffii*, *Fisheries Science*, 74: 341-346., 2008. (査読有)

③ Hiroaki Suetake, Kyosuke Araki, Kanako Akatsu, Tomonori Somamoto, Johannes Martinus Dijkstra, Yasutoshi Yoshiura, Kiyoshi Kikuchi and Yuzuru Suzuki. , Gene organization and expression of CD8alpha and CD8beta genes in fugu *Takifugu rubripes*. , *Fish and Shellfish Immunology*, 23(5):1107-18, 2007. (査読有)

④ Miki Nakao, Takayuki Kajiya, Yuho Sato, Tomonori Somamoto, Yoko Unoki-Kato, Misao Matsushita, Munehiro Nakata, Teizo Fujita and Tomoki Yano. , Lectin pathway of bony fish complement: Identification of two homologues of the mannose-binding lectin associated with MASP2 in the common carp (*Cyprinus carpio*), *Journal of Immunology*, 177:5471-5479. 2006 (査読有)

⑤ Tomonori Somamoto, Yasutoshi Yoshiura, Atsushi Sato, Miki Nakao, Teruyuki Nakanishi, Nobuaki Okamoto, Mitsuru Ototake, Expression profiles of TCRβ and CD8α mRNA correlate with virus-specific cell-mediated cytotoxic activity in ginbuna crucian carp, *Virology*, 348: 370-377, 2006. (査読有)

⑥ Uwe Fischer, Katrin Utke, Tomonori Somamoto, Bernd Köllner, Mitsuru Ototake, Teruyuki Nakanishi, *Cytotoxic activities of fish leucocytes*, **Fish & Shellfish Immunology**, 20,209-26, 2006.

(査読有)

[学会発表] (計 28 件)

① 杣本智軌, ギンブナのウイルスに対する細胞性免疫応答, シンポジウム「ウイルス感染防御のための魚類細胞性免疫機構の解明」, 2009年3月13日, 日本大学

② 長沢貴宏・杣本智軌・中尾実樹, コイ栓球の免疫機能解析, 日本水産学会, 2009年3月29日, 東京海洋大学

③ 占部慎二・鮫島史朗・杣本智軌・中尾実樹, ウイルス感染時におけるギンブナ MHC class I 遺伝子の発現動態, 水産学会九州支部大会, 2009年1月24日, 長崎大学

④ 鮫島史朗・鶴木陽子・杣本智軌・中尾実樹, ギンブナ 2B4 様分子, 水産学会九州支部大会, 2009年1月24日, 長崎大学

⑤ Miki Nakao, Junichi Mutsuro, Yoko Kato-Unoki, and Tomonori Somamoto, Structural and functional diversity of the complement components in bony fish: implication for innate immune defense, International Conference of Advanced Research on Marine Bioresources, 2008年10月21日, 横浜

⑥ Miki NAKAO, Tomonori SOMAMOTO, Yoko KATO-UNOKI, and Junichi MUTSURO, The Complement System of Teleost: Isotypic Diversity of Its Components in the Structure, Expression, and Functions., International Conference of Advanced Research on Marine Bioresources, 2008年10月21日, 横浜

⑦ Masakazu TSUJIKURA, Tomonori SOMAMOTO, Yoko KATO-UNOKI, and Miki NAKAO, Molecular Identification of a Novel Regulator of Complement Activation in Teleost Immune System, World Fisheries Congress, 2008年10月21日, 横浜

⑧ 占部慎二・鮫島史朗・杣本智軌・中西照幸・中尾実樹, ギンブナ由来細胞株における 4

種の MHC クラス I 遺伝子のクローニングおよび、CHNV 感染後の発現動態, 日本比較免疫学会, 2008年8月25日, 東京医科歯科大学

⑨ 辻倉正和・杣本智軌・鶴木陽子・中尾実樹, コイおよびゼブラフィッシュの膜型補体制御因子, 日本比較免疫学会, 2008年8月25日, 東京医科歯科大学

⑩ 辻倉正和・杣本智軌・鶴木陽子・中尾実樹, 魚類における新規補体制御因子の同定, 日本水産学会, 2008年3月30日, 東海大学

⑪ 杣本智軌, 中西照幸, 乙竹充, 中尾実樹, ウイルス特異的傷害活性を有するギンブナ培養リンパ球の CD8 α と TCR β の mRNA の発現解析, 日本水産学会, 2008年3月30日, 東海大学

⑫ 野中誠子・杣本智軌・中西照幸・乙竹充・中尾実樹, 2種類のギンブナ CD4 様分子, 日本水産学会九州支部会, 2008年1月26日, 東海大学

⑬ Nevien K. Abdelkhalek, Asuka Komiya, Yoko Kato-Unoki, Tomonori Somamoto, Miki Nakao, Identification and expression analysis of a novel interleukine 8 (IL-8)-like CXC chemokine in carp (*Cyprinus carpio*), 日本魚病学会, 2007年9月27日, 北海道大学

⑭ Satoko Ichiki, Yoko Kato-Unoki, Tomonori Somamoto, and Miki Nakao, Functional analysis of carp C3 isotypes using monoclonal antibodies, Japan-Germany International Cooperative Project on Education and Research, 2007年9月13日, 九州大学

⑮ 市居 敬, 杣本智軌, 鶴木(加藤)陽子, 中尾実樹, コイ補体成分 C1 タンパク質の同定, 補体シンポジウム, 2007年8月24日, 東海大学

⑯ 一木智子, 鶴木(加藤)陽子, 杣本智軌, 中尾実樹, モノクローナル抗体を用いたコイ C3 アイソタイプの機能解析, 補体シンポジウム, 2007.8月24日, 東海大学

⑰ 辻倉正和, 杣本智軌, 鶴木(加藤)陽子, 中尾実樹, 魚類における新規補体制御因子の同定, 補体シンポジウム, 2007年8月24日, 東海大学

⑱ 鮫島史朗, 鶴木陽子, 杣本智軌, 中尾実樹, ギンブナ頭腎, 体腎, 脾臓の Expressed

Sequence Tag 解析,日本比較免疫学会,2007年8月21日,浜松市

⑱ 杣本智軌、占部慎二、鮫島史朗、中西照幸、中尾実樹,クロンギンブナ由来細胞株におけるMHCクラスIによる抗原提示機構関連遺伝子のクローニング,日本比較免疫学会,2007年8月21日,浜松市

⑲ 大蔵千恵、杣本智軌、近藤昌和、中尾実樹,コイの個体発生における補体成分アイソタイプの発現解析,日本比較免疫学会,2007年8月8月21日,浜松市

⑳ 大蔵千恵、新原美樹、杣本智軌、中尾実樹、近藤昌和,発現パターンから見た魚類補体の生体防御機能の推定,南中九州・西四国水族防疫会議,2007年2月14日,宮崎

㉑ Miki Shinbara, Vo Kha Tam, Yoko Kato-Unoki, Tomonori Somamoto, and Miki Nakao,Identification of the genes encoding complement components from the zebrafish genome database,Asia-Pacific Aquatic Genomics Symposium 2006,2006年11月3日,Hawaii USA.

㉒ 辻倉正和・杣本智軌・加藤陽子・中尾実樹,ゼブラフィッシュ新奇補体制御因子のcDNAクローニング,日本魚病学会,2006年9月14日,長崎大学

㉓ 吉田大志、杣本智軌、加藤陽子、中尾実樹,コイの新奇補体制御因子のcDNAクローニング,日本比較免疫学会学術集会,2006年8月24日,広島

㉔ 杣本智軌・Vo Kha Tam・加藤陽子・中尾実樹,コイ補体C1q A, B, C鎖のcDNAのクローニング,補体シンポジウム,2006年8月18日,九州大学

㉕ 小池拓人、戸田秀明、瀧澤文雄、荒木亨介、杣本智軌、末武弘章、鈴木譲、乙竹充、森友忠昭、中西照幸,ギンブナCD8α鎖に対するモノクローナル抗体の特性解明,生体防御学会,2006.7月27日,北海道大学

㉖ Tomonori Somamoto, Vo Kha Tam, Miki Nakao, Molecular cloning and characterization of the complement C1q A, B, and C chains in common carp,10th International Society of Developmental and Comparative Immunology Congress,2006年7月2日, South Carolina USA.

㉗ Seiko Nonaka, Tomonori Somamoto, Yoko Kato, Mitsuru Ototake, Teruyuki Nakanishi, and Miki Nakao. ,Molecular cloning and characterization of CD4 in ginbuna crucian carp. ,10th International Society of Developmental and Comparative Immunology Congress,2006年7月3日, South Carolina USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杣本智軌 (SOMAMOTO TOMONORI)
九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号 : 40403993

