

平成21年 6月 1日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18780151

研究課題名（和文） 魚類の Th1/Th2 バランス制御機構の解明

研究課題名（英文） Control mechanism of Th1/Th2 balance in fish

研究代表者

荒木 亨介 (ARAKI KYOSUKE)

鹿児島大学・水産学部・助教

研究者番号：30409073

研究成果の概要：養殖魚類における疾病の発生を防ぐためにはワクチンが最も有効な手段であるが、その開発は難航している。魚類の免疫システムの理解が不足しているためである。そこで本研究では魚類のヘルパーT細胞やキラーT細胞を同定するツールを作製し、またT細胞が産生する免疫関連因子の遺伝子を多数明らかにした。さらにこれらツールを用いて、未だワクチンが開発されていない疾病の原因細菌に対する感染防御機構を分子レベルで解析した。これらの成果は魚類のワクチン開発を飛躍的に発展させるものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	180,000	3,680,000

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：クローンギンブナ、トラフグ、Th1/Th2、T細胞、細胞性免疫、サイトカイン、転写因子、モノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

近年の水産増養殖業の集約化と発展に伴い、養殖魚に次々に発生する新たな疾病による大きな産業的被害が問題となっている。特に、近年アウトブレイクを引き起こしたコイヘルペスウイルス病を初めとする、従来の薬剤を用いた治療が効果を示さない種々のウイルス性疾病が養殖魚や天然魚に蔓延しており、これらの予防にはワクチンが最も有効な手段とされている。しかし、現在我が国で実用化されているワクチンはイリドウイルス病のみであり、その他のウイルス性疾病に対するワクチン開発は大きく遅れている。ウイルス病に対する感染防御には、液性免疫よりも細胞性免疫が重要な役割を果たすことが魚類においても示唆されているにもかかわらず、ほとんどの魚種において近交系がないために細胞性免疫の機能検査法が確立さ

れていないことが大きな原因である。

一方で申請者が属する研究グループにおいて、魚類の細胞性免疫機構の解明を目指した、クローンギンブナを用いた、in vivo および in vitro におけるアロ抗原やウイルス抗原特異的細胞障害試験法が確立されている。近年、フナ造血器壊死症ウイルス (CHNV) を用いて、ギンブナのウイルスに対する感染防御には細胞性免疫が重要な役割を果たすことが個体レベルで示された (Somamoto et al. 2002, Virology)。すなわち、養殖魚においても細胞性免疫を增強させることができればウイルス性疾病に対する抵抗性を賦与することができると思われる。

ヘルパーT細胞は産生するサイトカインの違いから Th1 と Th2 と呼ばれる異なる細胞集団に分類され、Th1 が細胞性免疫能を、Th2 が液性免疫能を增強させることが知られてい

る。近年の医学や獣医学領域において、体内でのTh1/Th2のバランスを人為的に制御することで、疾病の治療や予防を目指す研究が精力的に進められている。ごく最近、Th1、Th2によるサイトカインの産生にT細胞特異的に発現する転写因子(T-bet, Eomes, GATA-3)が大きく関与することが明らかにされ、サイトカインと共にTh1、Th2の分化・誘導に重要な役割を果たすことが示された。さらに、これまで産生するサイトカインの種類でしか識別ができなかったTh1、Th2について、ほ乳類においてそれぞれの細胞表面に特異的に発現する分子(TIM; T-cell immunoglobulin mucin domain containing molecule)の存在がごく最近明らかになった。また、すでに遺伝子が単離されているCD4やCD8に対するモノクローナル抗体の作製やサイトカイン遺伝子の単離も進めることで、さらにTh1/Th2バランス制御機構に関する詳細な知見が得られるだろう。

2. 研究の目的

これまで適当な細胞表面マーカーがなかったためにTリンパ球やTリンパ球サブセットを識別することができなかったが、近年ギンブナにおいてもいくつかのリンパ球表面抗原(TCR α 、TCR β 、TCR γ 、CD4、CD8 α)やサイトカイン(IL-12、IFN- γ 、IL-10)、転写因子(T-bet, Eomes)遺伝子が単離され、リンパ球サブセットの同定が可能になった。そこで本研究では、Th1、Th2についてより詳細な解析を行うためTIM-3(Th1に特異的に発現)、TIM-1(Th2に強く発現)、TIM-4(成熟樹状細胞に特異的に発現)を利用したTリンパ球サブセットおよび成熟樹状細胞を識別・単離し、各細胞集団の性状を明らかにする。さらに、ギンブナを用いてアロ抗原刺激やウイルス感染に伴って発現する上記の免疫関連遺伝子を経時的に解析することで病態を把握し、免疫関連遺伝子発現プロファイルを利用することで細胞障害試験にたよらずにTh1/Th2バランスをモニタリングする測定系の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) Tリンパ球サブセットの同定およびTリンパ球表面抗原遺伝子のクローニング

申請者が属する研究グループにおいて、すでにギンブナTCR α 、CD8 α 、IgM等の遺伝子を単離済みであり、さらにはCD4、TCR β 、TCR γ 遺伝子の部分配列を得ている。申請者はこれまでにトラフグよりCD3、CD4、CD8遺伝子の単離に成功しており(研究業績2, 4, 5)、細胞表面分子の遺伝子の単離について十分な経験を積んでいる。また、TIM-1、TIM-3、TIM-4遺伝子について、ゼブラフィッシュおよびトラフグのゲノムドラフト配列内にそ

の存在を確認しており、TIM-4についてはすでにギンブナより部分配列を単離している。そこでまずギンブナのTIM-1、TIM-3、TIM-4遺伝子の完全長を単離する。

(2) サイトカインおよび転写因子の遺伝子クローニングと定量PCR法による遺伝子発現解析系の確立

すでに申請者が所属するグループにおいて、T-bet遺伝子は完全長、Eomes遺伝子は部分配列をギンブナより単離済みである。そこで引き続きEomes遺伝子の完全長を単離する。またGATA-3遺伝子についてはゼブラフィッシュのゲノムドラフト配列内にすでに存在を確認しているため、この配列をもとに完全長の単離を行う。サイトカイン遺伝子に関しては、Th1型サイトカインであるIL-12p35、IL-12p40、IFN- γ 、またTh2型サイトカインであるIL-10がすでに単離済みである。そこでこれらの遺伝子と1)で単離したTIM遺伝子について、定量PCR法による遺伝子発現解析系を確立する。

(3) Tリンパ球サブセットの分離のためのモノクローナル抗体の作製

ギンブナCD4、TIM-1、TIM-3、TIM-4に対するモノクローナル抗体の作製を試みる。申請者は以前にDNA immunization法を用いてトラフグCD8 α 鎖に対する抗体の作製に成功している。また、レトロウイルスとラット培養細胞を用いて作製した安定発現細胞株を作製し、これにフットパット法を組み合わせたモノクローナル抗体作製法により抗トラフグCD4鎖モノクローナル抗体の作出にも成功している(投稿準備中)。これらの報告は魚類において初であり、さらに申請者はこれら抗体を利用して、これまで魚類においてその存在さえ知られていなかったCD8 α 陽性樹状細胞の同定・単離にも成功している(博士論文、研究業績1)。本研究においても、抗体の作製や細胞の単離などこれまでの経験を活かして効率的に研究を進めることができる。そこで、ギンブナCD4、TIM-1、TIM-3、TIM-4について、前述のいずれかの方法によるモノクローナル抗体の作製を行う。

(4) ギンブナTh1、Th2、樹状細胞の分離と性状解析

(3)で作製した抗体を用いて、実際にギンブナよりCD4陽性細胞、Th1細胞、Th2細胞、樹状細胞をセルソーターにより単離し、各細胞集団について、細胞表面マーカーや転写因子、サイトカイン遺伝子の発現を2)で確立した定量PCR法、および各プローブを用いたin situハイブリダイゼーションにより解析することで性状を明らかにする。

(5) アロ抗原刺激、ウイルス感染後のリンパ系組織および末梢血における Th1, Th2 の分化・誘導

アロ抗原刺激、あるいは CHNV を感染させたギンブナのリンパ系組織および末梢血より経時的に白血球を単離し、抗 TIM 抗体を用いて Th1, Th2 の細胞数を調べる。また各白血球集団において、サイトカイン、転写因子、細胞表面マーカー遺伝子の発現の定量的な解析、細胞障害試験による細胞性免疫能の評価、CHNV に対する血中抗体価を統合的に解析することで、Th1 優位状態および Th2 優位状態時における免疫関連遺伝子の発現プロファイリングを行う。

4. 研究成果

(1) Th1/Th2 バランスの指標となる分子の cDNA クローニング

ヘルパー T 細胞は産生するサイトカインの違いから Th1 と Th2 と呼ばれる異なる細胞集団に分類され、Th1 が細胞性免疫能を、Th2 が液性免疫能を増強させることが知られている。近年の医学や獣医学領域において、体内での Th1/Th2 のバランスを人為的に制御することで、疾病の治療や予防を目指す研究が精力的に進められている。そこで、魚類の Th1/Th2 バランスの指標分子の同定を目的として、Th1, Th2 の分化・誘導に重要な役割を果たす転写因子である T-bet および Eomes 遺伝子を、ゼブラフィッシュおよびギンブナより単離した。各遺伝子について RT-PCR 解析を行った結果、いずれの分子もリンパ系組織やリンパ球に発現が認められた。これらの結果から、魚類においてもこれら転写因子はリンパ球に発現して生体防御に関与していることが示唆された。〈Th1・Th2 特異的細胞表面マーカー分子の探索〉 TIM (T-cell immunoglobulin mucin containing molecule) 群は、ほ乳類のヘルパー T 細胞サブセット (Th1, Th2) および成熟樹状細胞の細胞膜表面に特異的に発現する分子として最近明らかにされた分子分である。我々は魚類 Th1・Th2 特異的マーカー分子の探索を目的として、ゼブラフィッシュを用いて TIM 遺伝子群の cDNA クローニングおよび発現解析を行った。その結果、3 種類の TIM 様遺伝子 (TIM-LA, TIM-LB, TIM-LC) の単離に成功し、組織および細胞レベルでの発現解析により TIM-LA および TIM-LB 遺伝子が腎臓や脾臓などリンパ系組織や白血球で強く発現していることを明らかにした。

(2) Th1/Th2 バランス制御に関わる遺伝子の単離

Th1/Th2 分化や成熟に関わる転写因子である T-bet 遺伝子および GATA-3 遺伝子をギンブナより単離した。GATA-3 にはいくつかの変異体が存在することが明らかになったが、い

ずれの遺伝子も細胞表面イムノグロブリン (sIg) 陰性リンパ球で発現が見られたことから、T 細胞の機能に関与することが示唆された。

細胞性免疫を誘導する Th1 型サイトカインである Interferon- γ (γ -IFN) について遺伝子の単離を行った。魚類には 2 種類の IFN- γ 遺伝子 (IFN- γ 1, IFN- γ 2) の存在が知られているが、ギンブナでは IFN- γ 1 について 2 種類存在することが明らかとなった。発現解析の結果、これら遺伝子はいずれも免疫担当器官や白血球において発現が見られ、さらに T 細胞マイトジェン (PHA) による刺激やアロ抗原感作によりその発現量は著しく上昇した。また白血球の中でも sIg 陽性リンパ球画分ではなく、sIg 陰性リンパ球画分において発現していることから、魚類においても IFN- γ は T 細胞に発現することが示唆され、またこれら分子は細胞性免疫に関与していることが示された。

(3) T 細胞サブセットの同定・分離のためのモノクローナル抗体作製

ギンブナ CD8 \cdot 鎖に対する Mab を作製した。この Mab は sIg 陰性リンパ球とのみ反応性を示し、Mab 陽性細胞は TCR 遺伝子と CD8 \cdot 遺伝子を発現していた。また、アロ抗原感作により、ギンブナ腎臓における Mab 陽性細胞数が増えたことから、本 Mab は細胞障害性 T 細胞を認識していることが考えられた。

(4) ギンブナ Perforin 遺伝子の解析

魚類の細胞性免疫に関わる因子としてギンブナより Perforin 遺伝子を単離した。ギンブナには 3 種類の Perforin 遺伝子が存在し、それぞれ発現部位が異なっていた。鱗移植によるアロ抗原感作の結果、1 種類の Perforin が移植部位周辺に発現していた。一方で腎臓白血球を *in vitro* で同種異系細胞株と共培養した結果、鱗移植部位に発現したものは異なる Perforin 遺伝子の発現が確認された。これらのことから、魚類においても Perforin は細胞性免疫に関与していることが示された。

(5) *Edwardsiella tarda* 感染後のギンブナにおける細胞性免疫関連遺伝子の動態

一般に哺乳類では細胞内寄生細菌に対する感染防御には液性免疫ではなく細胞性免疫が重要とされている。*E. tarda* は魚類に感染するエドワジエラ症原因菌であり、本細菌も細胞内寄生細菌であることが知られている。本原因菌の感染防御には液性免疫は有効ではないことから、本研究では *E. tarda* 感染後のギンブナにおける細胞性免疫関連遺伝子の発現動態を調べた。*E. tarda* 感染後の体内菌数が減少するのに合わせて

Interferon- γ 遺伝子の発現レベルが上昇しマクロファージ数が増加した。その後、CD8 α 遺伝子や Perforin 遺伝子の上昇も確認され、リンパ球数が増加した。一方、血中抗体価にはほとんど変化がなかったことから、ギンブナにおいて *E. tarda* の感染防御には細胞性免疫が有効であることが示された。

本成果は、水産養殖において発生する魚病に対する予防技術の開発に大きく貢献するものである。

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 9 件)

- ① Araki K., Akatsu K., Suetake H., Kikuchi K and Y. Suzuki, Characterization of CD8 $^+$ leukocytes in fugu (*Takifugu rubripes*) with antiserum against fugu CD8 alpha. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 850-853, 2008 査読有
- ② Takizawa F., Mizunaga Y., Araki K., Moritomo T., Ototake M. and T. Nakanishi, GATA3 mRNA in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*): cDNA cloning, splice variant and expression analysis. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 898-907, 2008 査読有
- ③ Kobayashi I., Saito K., Moritomo T., Araki K., Takizawa F. and T. Nakanishi, Characterization and localization of side population (SP) cells in Zebrafish kidney hematopoietic tissue. *Blood* 111, 1131-1137, 2008 査読有
- ④ Mayumi M., Takeda Y., Hoshiko M., Serada K., Murata M., Moritomo T., Takizawa F., Kobayashi I., Araki K., Nakanishi T. and H. Sumimoto, Characterization of teleost phagocyte NADPH oxidase - Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) phagocyte NADPH oxidase-. *Mol. Immunol.* 45, 1720-1731, 2008 査読有
- ⑤ Takizawa F., Araki K., Kobayashi I., Moritomo T., Ototake M. and T. Nakanishi, Molecular cloning and expression analysis of T-bet in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*). *Mol. Immunol.* 45, 127-136, 2008 査読有

⑥ Saha N. R., Bei J. X., Suetake H., Araki K., Kai W., Kikuchi K., Lin H. R. and Y. Suzuki, Description of a fugu CXC chemokine and two CXC receptor genes, and characterization of the effect of different stimulators on their expression. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 1324-1332, 2007 査読有

⑦ Suetake H., Araki K., Akatsu K., Somamoto T., Dijkstra J.M., Yoshiura Y., Kikuchi K. and Y. Suzuki, Expression and genetic organization of fugu CD8 alpha and CD8 beta genes in fugu, *Takifugu rubripes*. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 1107-1118, 2007 査読有

⑧ Araki K., Hirano K., Takizawa F., Moritomo T., Ototake M. and T. Nakanishi, Identification and Characterization of multiple Lck genes in ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Fish. Sci.* 73, 1017-1024, 2007 査読有

⑨ Takizawa F., Araki K., Ito K., Moritomo M. and T. Nakanishi, Expression analysis of two Eomesodermin homologues in zebrafish lymphoid tissues and cells. *Mol. Immunol.* 44, 2324-2331, 2007 査読有

[学会発表] (計 14 件)

① Sun J. J., Ouyang Z. L., Araki K., Huang X. H., Nakanishi T. and Q. W. Qin, Histopathological changes and expression profile of immune-related genes induced by Spring Viremia of Carp Virus A1 in Zebrafish, *Danio rerio*. 5th World Fisheries Congress, October 2008, 横浜

② Suetake H., Araki K., Kikuchi K. and Y. Suzuki, Characterization of tiger puffer *Takifugu rubripes* (fugu) CD4 $^+$ and CD8 $^+$ leukocytes. 5th World Fisheries Congress, October 2008, 横浜

③ Katakura F., Takizawa F., Yoshida M., Yamaguchi T., Araki K., Moritomo T. and T. Nakanishi, Co-culture of carp (*Cyprinus carpio*) kidney hematopoietic cells with feeder layer resulted in long-term proliferation

of T cell lineages. 5th World Fisheries Congress, October 2008, 横浜

- ④ Takizawa F., Araki K., Toda H., Ohtani M., Moritomo T., Ototake M. and T. Nakanishi, Molecular cloning and expression analysis of two Eomes genes in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*). 5th World Fisheries Congress, October 2008, 横浜
- ⑤ Araki K., Takizawa F., Esumi M., Konishi M., Moritomo T., Ototake M. and T. Nakanishi, Interferon-gamma and perforin correlate with cell-mediated immunity in ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. 5th World Fisheries Congress, October 2008, 横浜
- ⑥ Nakanishi T., Saito Y., Koike T., Toda H., Takizawa F., Araki K., Somamoto T., Suetake H., Suzuki Y., Ototake M. and T. Moritomo, Production and characterization of monoclonal antibodies against CD4 and CD8 · in clonal ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. 5th World Fisheries Congress, October 2008, 横浜
- ⑦ 末武弘章・赤津可南子・松永貴芳・荒木亨介・菊池潔・鈴木讓、トラフグのヘルパーT細胞、平成19年度 日本魚病学会大会、2007年9月29日 函館
- ⑧ 齋藤泰孝・瀧澤文雄・荒木亨介・戸田秀明・柚本智軌・末武弘章・鈴木讓・乙竹充・森友忠昭・中西照幸、ギンブナ CD4 に対するモノクローナル抗体の特性解明、日本比較免疫学会 第19回学術集会、2007年8月22日 浜松
- ⑨ 三浦正晴・末武弘章・荒木亨介・吉浦康寿・菊池潔・鈴木讓、トラフグ IL-2 の発現・機能解析、日本比較免疫学会 第19回学術集会、2007年8月21日 浜松
- ⑩ 小西麻理子・荒木亨介・瀧澤文雄・乙竹充・森友忠昭・中西照幸、ギンブナ Perforin 遺伝子におけるアイソタイプの構造及び発現解析、日本比較免疫学会 第19回学術集会、2007年8月21日 浜松
- ⑪ 世良田研・森友忠昭・小林功・荒木亨介・

中西照幸、コイ好中球の炎症部位における NADPH 酸化酵素遺伝子の発現変化、第18回日本生体防御学会学術総会、2007年7月26日 福岡

- ⑫ 小林功・森友忠昭・荒木亨介・瀧澤文雄・中西照幸、ゼブラフィッシュ腎臓における side population (SP)細胞の同定と局在、第40回日本発生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会、2007年5月30日 福岡
- ⑬ 瀧澤文雄・水永夕葉・荒木亨介・森友忠昭・乙竹充・中西照幸、ギンブナ GATA3 遺伝子の cDNA クローニング及び発現解析、平成19年度日本水産学会春季大会、2007年3月30日 東京
- ⑭ 荒木亨介・江角真梨子・佐藤匡浩・瀧澤文雄・森友忠昭・乙竹充・中西照幸、ギンブナ IFN- γ ・アイソタイプの細胞性免疫への関与、平成19年度日本水産学会春季大会、2007年3月30日 東京

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 亨介 (ARAKI KYOSUKE)
鹿児島大学・水産学部・助教
研究者番号：30409073

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者