

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007-2008

課題番号：19780144

研究課題名（和文）トラフグの抗原提示細胞

研究課題名（英文） Fugu antigen presenting cells

研究代表者

氏名（アルファベット）末武 弘章 (Suetake Hiroaki)

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号 00334326

研究成果の概要：

トラフグの貪食細胞である単球はその細胞表面に B7 という共刺激分子を発現しており、この B7 を介して獲得免疫系を制御する重要な細胞である T 細胞の活性を制御していることを明らかにした。さらに、B7 陽性単球は、抗原提示に関わる MHC クラス II を発現していることから、魚類では単球が抗原提示細胞として中心的な役割を担っていると考えられる。また、B7 陽性単球は、複数の細胞集団から構成されており、獲得免疫活性化が複雑に制御されていることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,000,000	0	2,000,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：水産学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：魚類、免疫、抗原提示細胞、単球、B7

## 1. 研究開始当初の背景

病原に対して抗体産生や細胞性免疫で応答する獲得免疫系の主役はリンパ球であるが、この系はリンパ球のうちT細胞、特に免疫応答の制御に関わるヘルパーT細胞が活性化されることにより始まる。そのT細胞の活性化を直接刺激するのは抗

原提示細胞(APC)と言われる細胞であり、マクロファージ、樹状細胞、B細胞(抗体産生細胞)が主なAPCである。また、APCにより活性化を受けたT細胞は細胞間の情報伝達物質であるサイトカインを産生することが知られている。こうした哺乳

類での知見の一方で、魚類の獲得免疫系活性化機構は長いこと完全なブラックボックスであった。これはヘルパーT細胞やAPC、そしてサイトカインの存在や機能が不明だったからにほかならない。2000年代に入るとフグ全ゲノム解読や各種魚類のEST解析などにより魚類の免疫担当細胞に関する知見が急速に蓄積された。こうした中申請者は、ヘルパーT細胞の細胞表面マーカーと考えられるCD4を魚類で初めて見いだした。これに加えて、T細胞のマーカーとなるCD3やCD8もトラフグで同定している。また、T細胞の分化や活性化において中心的な役割を担うであろうサイトカインであるIL-2、IL-6、IL-10、IL-12、IFN- $\gamma$ がトラフグで同定され、その発現解析が可能となっている。さらに最近、ニジマスなどの魚類においてT細胞に発現するT細胞活性化の補助刺激分子受容体であるCD28やCTLA-4が同定された。申請者はすでにトラフグCD28分子のcDNAクローニングを完了している。このようにヘルパーT細胞やサイトカインに関わる知見はトラフグを中心に魚類でも蓄積されつつあるが、現時点においても魚類のAPCは不明であり、獲得免疫の活性化機構理解のための足枷となっている。本研究ではそのブレイクスルーを目指し、APCの同定とその機能解析を通して、獲得免疫系の活性化機構に迫る。

## 2. 研究の目的

哺乳類では樹状細胞、マクロファージ、B細胞などが抗原提示細胞（APC）として知られており、これらによりT細胞が活性化され獲得免疫が発動する。魚類では現在までに樹状細胞の存在が知られていないだけでなく、機能的な抗原提示細胞も明らかになっていない。そこで、魚類の獲得免疫発動機構を明

らかにすることを旨とし、魚類のAPCを同定し、そのT細胞活性化作用を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では細胞からと分子からの大きく2つのアプローチを試みる。

### A) 分子からのアプローチ

哺乳類ではAPCによるT細胞の活性化には2つのステップを要する。一つは抗原認識であり、もう一つは補助刺激である。補助刺激はT細胞上の膜タンパク質であるCD28などの補助刺激受容体とAPC上で発現しているB7ファミリー分子の相互作用を介して行われる。本研究ではAPCのマーカーとなると考えられるB7ファミリー分子の遺伝子を同定し、その機能解析を行うとともに、抗体を作製し、APCの単離・同定を行う。

(1) B7ファミリー分子のcDNAクローニング  
トラフグゲノムデータベース上で見いだした3個のB7ファミリー分子（B7分子）のホモログはゲノム上で周辺遺伝子との位置関係（シンテニー）がヒトと共通であることから魚類のB7分子であると考えられる。そこで、魚類における抗原提示の場であると予測される頭腎を材料としたRACE法により、これら分子のcDNAクローニングを行った。さらに、トラフグの様々な組織からRNAを抽出してRT-PCRを行い、B7分子の遺伝子発現組織を調べた。

### (2) 補助刺激分子受容体の探索

昆虫細胞を用いてIgGのFc部分をトラフグB7分子の細胞外領域と結合させたFc融合タンパク質を作製し、その受容体を探索した。すなわち、ナイロンウール法や吸着法を用いてトラフグから得たT細胞画分にマイトジェンなどの細胞活性剤を加えて培養し、B7-Fc融合タンパク質との結合をフローサイトメーターを

用いて調べた。

(3) 補助刺激分子によるT細胞の活性化  
哺乳類ではAPCによるT細胞への抗原提示、補助刺激により、T細胞の増殖が始まることが知られている。そこで、補助刺激分子によるT細胞の活性化能を調べるために、低濃度マイトジェン刺激を行ったT細胞画分にB7-Fc融合タンパク質を加え、その増殖をBrdU法で調べた。また、RT-PCR法によりIL-2, IL-4/13, IL-10, IFN- $\gamma$ 遺伝子の発現を調べ、T細胞の活性化の様態を明らかにした。

(4) 補助刺激分子陽性細胞の同定  
抗B7分子抗体を作製して、B7分子陽性APCを単離・同定した。B7-Fc融合タンパク質を抗原として抗血清を得、様々な細胞分画からこれら抗血清に対する陽性細胞をMACS法により単離した。さらに、フローサイトメトリーや各種染色による顕微鏡での観察、RT-PCRによる遺伝子発現の確認を行った。

B) トラフグAPCの同定  
申請者はトラフグ皮下へのカラジーン投与後に集まってくる細胞の中にCD8 $\alpha$ に対する抗血清に陽性であり、マクロファージ様の形態をとる細胞の存在を見いだしている。哺乳類ではCD8陽性の樹状細胞が存在することが知られていることから、申請者は本細胞が魚類の樹状細胞であると考え、その単離・同定を目指す。

(5) CD8陽性マクロファージ様細胞  
トラフグ抗CD8 $\alpha$ 抗血清を用いてMACS法によりCD8陽性マクロファージ様細胞単離する。この細胞がAPCであるかどうかを調べるために、単離した細胞からRNAを抽出してRT-PCRを行い、APCに発現していることが予想される抗原提

示に関わるMHCクラスIIや補助刺激に関わるB7分子や各種樹状細胞マーカー遺伝子の発現を調べた。また、蛍光ビーズなどを用いて貪食能を調べ、本細胞が抗原取り込み能を有するかどうかを調べた。

#### 4. 研究成果

トラフグゲノムデータベースから見いだした3種類の補助刺激分子B7ファミリー分子をcDNAクローニングした。さらに、ほ乳類では抗原提示細胞の中で最もT細胞活性化能の高いことが知られている樹状細胞のマーカー分子のcDNAクローニングをトラフグで試みた。魚類では樹状細胞といえる細胞は同定されていないが、樹状細胞のマーカー分子のcDNAを得ることができた。さらに、これらの抗原提示細胞マーカーの遺伝子は2次リンパ器官で主に発現していることが明らかになった。

次に、B7分子の配列情報をもとに組み換え体とそれを抗原とした抗体を作製した。これらを使用して、B7分子が活性化したT細胞に結合すること、抗B7抗体が活性化したマクロファージに結合するが、リンパ球には結合しないことを明らかにした。これらの結果はマクロファージ上のB7分子が活性化したT細胞上の受容体に結合することを示唆する。

魚類でも補助刺激分子B7を介した補助刺激によりT細胞の増殖が制御されることを明らかにした。さらに、抑制的に作用するB7では免疫系を抑制的に制御すると考えられているサイトカインであるIL-10の発現が増加した。一方で、促進的に作用するB7はT細胞によるIL-10の産生を抑制すると同時に、T細胞増殖を促進すると考えられているIL-2の発現を増加させた。これらのことから魚類においてもB7がT細胞のサイトカイン産生を制御することによりT細胞の増殖を調節していることが示唆された。

魚類の活性化された単球上に発現するB7

はT細胞のサイトカイン産生を制御し、獲得免疫系の制御において中心的な役割を担うT細胞の増殖を制御していることが明らかになった。これらの結果は魚類にも機能的な抗原提示細胞が存在することを示した初めての成果であり、Journal of Immunology 誌に掲載された。

トラフグにはCD8陽性単球が存在することを見いだしているが、この細胞をCD8 $\alpha$ 抗血清で単離し、その性状を解析した。この細胞は活性化によりCD8を表出し、樹状細胞マーカーとして知られているCD83やCD205遺伝子や抗原提示に関わるMHC class II $\alpha$ 遺伝子を発現するようになること、またラテックスピーズを貪食する能力があることが示された。また、蛍光染色により、樹状の突起を有していることが示された。これらの結果は本細胞が魚類の樹状細胞であることを示唆するものである。

#### 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 1件)

Sugamata R, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y. The Journal of Immunology, 査読あり 182: 6799-6806. 2009. Teleost B7 expressed on monocytes regulates T cell responses

〔学会発表〕(計 6件)

1) 菅又龍一、末武弘章、菊池潔、鈴木謙 トラフグ B7 ファミリー分子の同定 に本比較免疫学会第19回学術集会 8月21-23日、2007年、浜松

2) 菅又龍一、末武弘章、菊池潔、鈴木謙 トラフグ単球はB7を介してT細胞の活性を制御する 平成20年度日本水産学会春季大会 3月27-31日、2008年、静岡

3) 末武弘章、菊池潔、鈴木謙

トラフグゲノム情報を利用した魚類免疫系の研究第11回マリンバイオテクノロジー学会 5月24-25日、2008年、京都

4) Sugamata R, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y Fish B7+ monocytes as antigen-presenting cells. Fifth international symposium of The Japanese Society for Fish Pathology Oct. 18-19, 2008, Tokyo

5) 菅又龍一、末武弘章、城夕香、菊池潔、鈴木謙 トラフグB7+抗原提示細胞の多様性 平成21年度日本水産学会春季大会 3月27-31日、2009年、品川

6) 菅又龍一、末武弘章、城夕香、菊池潔、鈴木謙 トラフグのCD8 $\alpha$ +樹状細胞 平成21年度日本水産学会春季大会 3月27-31日、2009年、品川

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

末武弘章 (SUETAKE HIROAKI)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし