

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03054

研究課題名(和文) 魚類免疫記憶形成機構の解明

研究課題名(英文) Antigen-capturing cells in fish immunological memory formation

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) 14,690,000円

研究成果の概要(和文)：魚類には免疫記憶はあるものの、その実態はわかっていない。免疫記憶形成に関わる獲得免疫応答の中核である二次リンパ組織は魚類と哺乳類では大きく異なっている。本研究では魚類の二次リンパ組織の抗原捕捉細胞に着目した。これらの細胞は魚類独自の細胞であり、その分化機構は哺乳類において相同の機能を持つ細胞とは異なることが明らかになった。さらに、赤血球代謝に関わること、T細胞を誘引し、獲得免疫応答を促すなど複数の機能を持つ細胞であることを分子レベルで明らかにした。このように魚類の抗原捕捉機構は哺乳類とは分子・細胞レベルで異なるが、魚類の免疫記憶形成は魚類独自の二次リンパ組織内の構造体で生じることが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の免疫記憶の形成は二次リンパ組織で形成されると考えられるが、魚類ではその構造、とくに抗原捕捉とリンパ球との応答の場が哺乳類とは大きく異なっていることから、リンパ組織における抗原捕捉細胞の役割に着目した。本研究の結果、魚類抗原捕捉細胞は、哺乳類の相同の機能を持つと考えられる細胞とは細胞分化制御機構が異なることが示された。このことは、魚類では哺乳類とは異なる細胞が免疫応答において相同の機能を有していることを示唆している。さらに、魚類独自のリンパ組織内構造で免疫応答が起こることが示唆された。このように、水産学、比較生物学、免疫の進化に関する新たな知見を提示できた。

研究成果の概要(英文)：Although fish have an immune memory, the actual feature of this memory has not been known. The secondary lymphoid tissue, the center of the acquired immune response involved in the formation of immune memory, is very different between fish and mammals. In this study, we focused on antigen-capturing cells in fish secondary lymphoid tissues. These cells are unique to fish, and their differentiation mechanism is different from that of cells with homologous functions in mammals. Furthermore, it was clarified at the molecular level that these cells have multiple functions, such as being involved in erythrocyte metabolism, attracting T cells, and promoting an acquired immune response. Thus, although the antigen capture mechanism in fish differs from that in mammals at the molecular and cellular levels, it was inferred that immune memory formation in fish occurs in the microenvironment within secondary lymphoid tissues unique to fish.

研究分野：魚類生理学

キーワード：免疫 ワクチン 魚 リンパ組織

1. 研究開始当初の背景

世界的な養殖の増加とともに魚病の問題は拡大の一途にある。これまで魚病対策として抗菌剤が盛んに使われ、一定の効果を上げてきたが、近年薬剤耐性の問題が世界的に顕在化してきている。農林水産省では徹底した魚病の予防対策としてワクチンの開発と使用を強く押し進める感染予防・管理の考え方の普及・推進をはかっている。

ワクチンは免疫記憶を利用した感染症予防法であり、様々な感染症で利用されている。免疫記憶とは一度感染した病原体に対して抗体が産生され、二度目以降に同じ抗原に対して強く早い免疫応答を起こすことである。哺乳類では、ワクチンは免疫応答の中核であるリンパ節や脾臓などの二次リンパ組織内にある胚中心という構造で捕捉され、これに反応した抗体産生細胞である B 細胞が記憶細胞として残ることで免疫記憶が形成される。水産養殖で用いられる魚病ワクチンも高い効果を示し、魚類にも免疫記憶が存在することは明らかであるが、魚類には胚中心がない。このことは魚類には哺乳類とは異なる独自の免疫記憶形成機構があることを意味する。

魚類では、投与されたワクチンは魚類のリンパ組織である脾臓や腎臓にあるメラノマクロファージセンター (MMC) という構造に集まる。そのため、魚類においては MMC が胚中心と相同のはたらきをすると予想されているが、MMC は哺乳類の胚中心とは構造や構成する細胞が異なっており、免疫記憶がどこで形成されるかは長い間不明のままである。これまでに申請者らは魚類の免疫記憶の基盤である獲得免疫を活性化する仕組みを明らかにし、魚類と哺乳類のリンパ組織の違いに関わる因子を明らかにした。このように魚類が持つ独自の免疫応答の分子機構が明らかになり、免疫記憶形成機構解明のための仕組みの理解や解析ツールが整ってきた。さらに、ゲノム編集技術を用いることで個体レベルでの遺伝子の機能解析が可能になったことから本研究を計画した。

2. 研究の目的

魚病ワクチン作用の基盤となる魚類の免疫記憶がどこでどのようにして形成されるかはいまだにわかっていない。本研究ではゲノム編集と遺伝子発現解析を用いることにより、リンパ組織、リンパ組織内微小構造、細胞、分子レベルで魚類の免疫記憶形成機構に関わる抗原捕捉細胞の役割を中心に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 魚類に対する抗 IgM 抗体の作製

ワクチン投与では、ワクチンに含まれる抗原に対する特異的抗体ができ、その抗体価を測定することでワクチンの効果を評価する。本研究では、小型魚類であるメダカとゼブラフィッシュを用いるが、これらの魚は小型であることもあり、抗体自体を単離することが困難であり、これら魚類の抗体を認識できる有効な抗体が存在しない。

メダカは、IgT を欠き、IgM のみを主要な抗体として用いるシンプルな液性免疫機構を持つため、魚類の主要な抗体である IgM および IgM+B 細胞の機能を解析するために最適なモデルである。そこで、これらの解析を可能にするために、メダカ IgM に対する抗体の作製に取り組んだ。クローニングしたメダカ IgM 遺伝子からリコンビナントタンパク質を作製するにあたり、C μ 1 領域は IgD にも同様の構造が存在している一方、C μ 2 領域は IgM の膜型および分泌型の両方に存在することから C μ 2 領域を抗原として用いた。作製した発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、リコンビナントタンパク質を作製した。導入した哺乳類細胞による IgM の発現を確認し、ラットを免疫した。免疫した動物からリンパ節を回収し、リンパ節白血球とミエローム細胞を融合させ、メダカ IgM 抗原である組み換えタンパク質への反応およびメダカ抗体への反応を確認した。

魚類の主要な抗体である IgM および IgM+B 細胞の機能を解析するためにゼブラフィッシュの主要な抗体である IgM に対する抗体の作製に取り組んだ。クローニングしたゼブラフィッシュ IgM 遺伝子のうち、膜型 IgM と分泌型 IgM の両方を認識可能な定常領域部を標的抗原となるようにマウス Fc 融合タンパク質発現ベクターに組み込み、哺乳類細胞に導入し、リコンビナントタンパク質を作製した。

(2) 魚類の抗原捕捉細胞の単離

魚類の抗原保持の場である MMC を構成する中心的な細胞であるメラノマクロファージ (MM) は自家蛍光を持つことから、この性質を利用して、セルソーターを用いて、末梢白血球では見られない強い蛍光を持つ細胞を脾臓や腎臓といった二次リンパ組織から単離した。

哺乳類では脾臓の胚中心で抗原が長期保持されるが、その前にまず脾臓のマージナルゾーンで抗原が捕捉される。ヒトではその周辺に免疫記憶細胞が存在することが知られている。そこで、トラフグに蛍光標識した抗原を投与し、投与後速やかに脾臓を摘出し、セルソーターを用いて、脾臓のエリブソイドにおける蛍光陽性細胞単離した。

(3) 魚類の抗原捕捉細胞の発現解析

上述により単離した MM およびエリブソイド抗原捕捉細胞について RNA-seq 解析を行い、発現遺伝子から免疫記憶形成に関わる機能を推測した。さらに興味深い遺伝子についてはリアルタイム定量 PCR による発現解析を行った。

(4) 魚類の抗原捕捉細胞の欠失

メラノマクロファージは、傷ついた赤血球の貪食と鉄の再利用に関わる。この性状は哺乳類の赤脾髄マクロファージ (RPM) と類似している。そこで、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 法を用いて、哺乳類 RPM の分化に必須である転写因子 Spi-C のノックアウトゼブラフィッシュを作成した。また、魚類には RPM はないが、MM が RPM のように赤血球の貪食と鉄の再利用に関わることが知られている。この際に生じるヘムは化学的に活性が高く毒性が強いため、過剰の蓄積が起こるとフェロトシスという細胞死が起こる。ヘム代謝に関わるヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) はヘムを分解し無毒化する。この酵素の遺伝子を欠失したマウスや変異を持つヒトでは、これらの障害により RPM が失われる。RPM 数が著しく減少することが知られていることから、本研究では CRISPR/Cas9 法により、HO-1 遺伝子ノックアウトゼブラフィッシュを作成した。

脾臓エリブソイドの抗原捕捉細胞は特異的にマクロファージマーカー遺伝子を発現していることが明らかになり、マクロファージの 1 種であることが強く示唆された。哺乳類のマージナルゾーンマクロファージ (MZM) 分化因子のオーソログについてゲノム編集をゼブラフィッシュに施した。さらに、抗原捕捉におけるリンパ球の役割を理解するために、リンパ球を欠く RAG1 変異ゼブラフィッシュに抗原を投与し、エリブソイドにおける抗原取り込みを比較した。

4. 研究成果

(1) 魚類に対する抗 IgM 抗体の作製

作出したメダカ IgM 抗体は抗原とした組み換えタンパク質に対しては反応を示すものの、メダカの実際の IgM には反応を検出することができなかった。

一方で、組み換えゼブラフィッシュ IgM に対するモノクローナル抗体を作成した。本抗体はゼブラフィッシュの IgM に特異的に反応することが明らかになり、IgM⁺B 細胞の単離にも成功した。IgM⁺B 細胞の免疫応答性を確認するために、ゼブラフィッシュに LPS を投与したところ、脾臓の IgM⁺B 細胞が対照群と比較して有意に増加した。また、B 細胞の可変領域の再構成に関わる RAG1 遺伝子の機能欠損したゼブラフィッシュでは IgM⁺B 細胞はほとんど見られなかった。また、血漿中の IgM も認められなかった。さらに、IgM⁺B 細胞は小型のものと大型のものに分けられたことから、これらが B 細胞と抗体産生細胞であるプラズマ細胞に相当することが推測された。これらの結果から、小型魚であるゼブラフィッシュの抗体産生能を評価することが可能になった。

(2) 魚類の抗原捕捉細胞の単離

自家蛍光細胞は光学顕微鏡による観察から、組織内の MM と酷似した形態を示すこと、ベルリンブルー染色により鉄を保持していること、鉄代謝に関わるヘモキシゲナーゼ 1 (HO-1) 遺伝子を発現していることが確認できたことから、MM の単離に成功したと考えた。

蛍光抗原投与初期において、蛍光顕微鏡を用いた組織観察により、脾臓のエリブソイドにおける抗原捕捉を確認した。さらに、この蛍光を利用してセルソーターで蛍光陽性細胞を単離した。MGG 染色の結果、核が不定形で細胞質が青く染まるマクロファージの特徴を持つ細胞であり、マクロファージマーカーとして知られる CSF1R 遺伝子を発現していた。

(3) 魚類の抗原捕捉細胞の発現解析

メラノマクロファージ (MM) は RNA-seq 解析により、抗原提示に関わる遺伝子の強い発現が認められたこと、抗原取り込み、分解に関わる遺伝子が強く発現していることが示された。また、マクロファージマーカー遺伝子が発現しており、MM がマクロファージであることが示された。抗原提示に関わる MHC クラス II の発現と T 細胞を誘引するケモカインの発現が顕著であったことから、MMC が抗原を保持する MM と T 細胞の応答の場として、免疫記憶形成に関わることが示唆された。

エリブソイド抗原捕捉細胞では RNA-seq 解析により、MM と同様の抗原提示に関わる遺伝子が発現していたが、MM とは異なる抗原捕捉関連遺伝子の発現が認められた。これらのことから、エリブソイド抗原捕捉細胞は MM と同様にマクロファージであると考えられるが、分子レベルでの発現パターンの違いから、抗原に対する応答に違いがあることが示された。

(4) 魚類に抗原捕捉細胞の欠失

MM はリンパ組織である脾臓でも腎臓でも認められる。Spi-C 遺伝子欠損魚でも同様にこれらの組織で MM が認められたことから、MM と RPM は傷ついた赤血球の貪食と鉄の再利用な

どの機能面では相同であるが、分化様式が異なる細胞である可能性が示され、MMはSpi-C非依存的な分化機構を持つことが示唆された。

MMはRPMと同様に鉄の代謝に関わる。RPMでは、赤血球に含まれるヘムを分解する酵素であるHO-1遺伝子の欠失により、細胞数が減少する。そこで、本研究ではゼブラフィッシュHO-1遺伝子のノックアウト魚を作製したところ、通常の状態ではMMの減少は認められなかったものの、赤血球を破壊する溶血剤でゼブラフィッシュを刺激したところ、野生型と比較して、有意にMMの数が減少することが示された。また、HO-1遺伝子ノックアウトマウスではRPM数は時間をかけて少しずつ減少することが知られているが、ゼブラフィッシュにおいても同様に半年以上の長時間でMM数が野生型と比較して減少する傾向が認められた。これらのことから、HO-1遺伝子のノックアウト魚はMMおよびMMCの免疫記憶形成における役割を明らかにするための有効なシステムであると期待される。

哺乳類のMZM分化因子欠損ゼブラフィッシュでは、哺乳類とは異なり、変異魚と野生魚間での抗原捕捉に差は見られなかったが、抗原捕捉分子の発現量の有意な低下が認められた。このことは、MZM分化因子は、魚類では抗原捕捉細胞の分化には関与しないが、抗原取り込み分子の発現を制御していることを示唆する。さらに、リンパ球を欠くRAG1変異ゼブラフィッシュでは野生型と比較してエリプソイドにおける抗原取り込み量の減少が認められた。一方で、抗原取り込み分子の発現量には有意な差は認められなかった。このことは、脾臓中のマクロファージ数は減少しないが、エリプソイドへの局在性が失われることが推測された。哺乳類ではマージナルゾーンの形成にはB細胞が必要であることが知られているため、同様の機構が魚類エリプソイドにも存在することが示唆された。

このように、魚類では抗原捕捉機構が分子・細胞レベルで異なるが、魚類の免疫記憶形成は魚類独自の構造であり抗原の長期保持に関わるMMCにおいて行われることが推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 清水友斗、林 忠弘、中山宙、杉浦羅央、瀧澤文雄、宮台俊明、末武弘章
2. 発表標題 トラフグ脾臓エリブソイドの抗原捕捉細胞
3. 学会等名 令和3年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉浦羅央、林 忠弘、宮台俊明、瀧澤文雄、末武弘章
2. 発表標題 トラフグ脾臓のメラノマクロファージの単離
3. 学会等名 日本比較免疫学会第32回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水友斗、瀧澤文雄、宮台俊明、末武弘章
2. 発表標題 魚類と哺乳類の脾臓における抗原捕捉細胞の類似性
3. 学会等名 日本比較免疫学会第32回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉浦羅央、林忠弘、清水友斗、宮台俊明、瀧澤文雄、末武弘章
2. 発表標題 トラフグメラノマクロファージのケモカイン発現解析
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉浦羅央、林 忠弘、宮台俊明、瀧澤文雄、末武弘章
2. 発表標題 トラフグメラノマクロファージの単離
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀧澤文雄、山本和弥、上野広海、清水友斗、杉浦羅央、矢倉卓磨、大谷真紀、吉浦康寿、宮台俊明、末武弘章
2. 発表標題 ゼブラフィッシュIgMに対する抗体の作製および特性解析
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉浦羅央、林忠弘、宮台俊明、瀧澤文雄、末武弘章
2. 発表標題 脾臓メラノマクロファージ のケモカイン発現
3. 学会等名 日本比較免疫学会第33回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉浦羅央、林忠弘、清水友斗、宮台俊明、瀧澤文雄、末武弘章
2. 発表標題 トラフグ赤血球貪食細胞の分取
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuto Shimizu, Fumio Takizawa, Toshiaki Miyadai, Hiroaki Suetake
2. 発表標題 Isolation of antigen-capturing cells from spleen ellipsoids in tiger puffer, Takifugu rubripes.
3. 学会等名 The 4th congress of the international society of fish & shellfish immunology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fumio Takizawa, Hiroumi Ueno, Kazuya Yamamoto, Yuto Shimizu, Maki Ohtani, Toshiaki Miyadai, Hiroaki Suetake
2. 発表標題 Development and characterization of monoclonal antibodies against zebrafish IgM
3. 学会等名 The 4th congress of the international society of fish & shellfish immunology (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗体又は抗体フラグメント	発明者 瀧澤 文雄、大谷真紀、宮台俊明、末武弘章	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023- 15918	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	瀧澤 文雄 (Takizawa Fumio) (60822913)	福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授 (23401)	

	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
研究協力者	清水 友斗 (Shimizu Yuto)	福井県立大学 (23401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	杉浦 羅央 (Sugiura Rao)	福井県立大学 (23401)	

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