

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15913

研究課題名(和文) 魚類2型免疫応答機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the type 2 immune system in teleost fish

研究代表者

片倉 文彦 (KATAKURA, Fumihiko)

日本大学・生物資源科学部・専任講師

研究者番号：10756597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の寄生虫性疾患に対する主な生体防御機構である2型免疫応答のしくみを解明することは、それら疾患に対する予防法の開発につながる。本研究では、魚類2型免疫応答関連分子の同定とその機能解析に取り組み、魚類特有のIL-5famがコイの好酸球/好塩基球/マスト細胞(EBM)型顆粒球の産生を制御するサイトカインであることを明らかにした。さらに、魚類2型免疫応答を測定可能な解析系の開発を行った。即ち、抗原特異的B細胞増殖を再現可能な培養系を開発するとともに、細胞移入実験が可能なクローンギンブナを用いて、リンパ球のin vivo動態解析を可能とするEF1⁺:GFP遺伝子導入ギンブナ系統を作出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類の免疫機構は哺乳類のそれと類似しているものの、分子・細胞レベルでは異なる点が多い。本研究では、魚類特有のIL-5famサイトカインがEBM型顆粒球の造血因子であることを明らかにした。本分子は哺乳類の好酸球などの産生に重要なIL-3/IL-5/GM-CSFファミリーの関連分子と考えられ、脊椎動物の免疫機構の普遍性と多様性の理解に重要な因子であることが示された。また、魚類の2型免疫応答時における細胞の性状や動態を解析可能な新規実験系を開発した。これらのことは、魚類免疫機構をさらに理解するための重要な研究ツールとなり、今後の魚病の制御法の開発に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of the mechanism of type 2 immune response, which is the main biological defense mechanism against parasitic diseases of fish, will lead to the development of preventive methods against those diseases. In this study, we identified and characterized molecules related to the type 2 immune system in fish, and revealed that IL-5fam, which is unique to fish, is a cytokine regulating the production of eosinophil/basophil/mast cell (EBM)-type granulocytes in carp. Furthermore, we have developed analysis systems which can measure the fish type 2 immune responses. Namely, we developed a culture system that can reproduce antigen-specific B cell proliferation, and produced an EF1⁺:GFP ginsuna crucial carp strain that enables to analyze lymphocyte dynamics in vivo in cell transfer experiments.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：魚類2型免疫 サイトカイン 抗原特異性 GFPクローン魚

1. 研究開始当初の背景

水産養殖は、動物性タンパクの質的・量的な安定供給や天然資源の保全などのために、近年、世界的に需要が高まっている。しかし、養殖現場では高密度飼育環境下のため、時に感染症が蔓延し、養殖業経営にとっての重大な不安定要素の一つになっている。薬剤耐性菌への懸念や食の安全のため魚病対策の基本は“治療より予防”とされ、魚類細菌病やウイルス病を対象としたワクチンは近年盛んに開発されている。一方、寄生虫病に対しては寄生体側の分類・生理・生態の複雑さに加え宿主の生体防御機構に不明な点が多いため、上市されたワクチンは存在せず対策法も限られている。

2型免疫応答は、哺乳類では寄生虫感染等で活性化した2型ヘルパーT(Th2)細胞や2型自然リンパ球(ILC2)などが司令塔となり惹起される反応である。それらの細胞から産生されたインターロイキン(IL)-4やIL-5、IL-13などの種々の2型免疫サイトカインの作用により好酸球、好塩基球やB細胞などを活性化し、寄生虫を排除することが知られている。大多数の有用魚種が属する真骨魚類は哺乳類と同様、自然免疫と獲得免疫の両機構を具える動物種群であり、免疫機構の大枠は魚類と哺乳類とで類似している。一方で、真骨魚類は四肢動物群と分岐後に全ゲノム重複を経験しているため、保存された免疫関連分子は多いもののその数や構成が四肢動物群のそれと異なる。すなわち、比較免疫学的観点から脊椎動物は共通して2型免疫応答が寄生虫感染防御に働くと考えられるものの、それを担う細胞およびサイトカインや抗体などの分子は生物群ごとに多様である。近年、次世代シーケンサーの普及により多くの魚種におけるゲノムプロジェクトが進展し、魚類における免疫関連分子の同定が進んでいるものの、真骨魚類の寄生虫感染時において、いつ、どこで、何の細胞が、どのような分子を介して2型免疫応答を担っているのかという全体像は不明である。

2. 研究の目的

哺乳類の2型免疫応答は、寄生虫感染時やアレルギー抗原侵入時等に活性化したTh2やILC2により産生されるIL-4やIL-5などの種々のサイトカインの作用により、好酸球、好塩基球、肥満細胞、マクロファージ、B細胞といった多彩な免疫細胞が活性化し働くことによって引き起こされる複雑な免疫反応である。魚類でも2型免疫応答を担う一部の細胞・分子が同定されているものの、その理解は不足しており、免疫システムの全体像把握には至っていない。本研究は、寄生虫感染魚における免疫関連分子と細胞の時空間的ネットワークの解明に向けて、魚類の2型免疫応答を担う新規の分子および細胞を同定しそれらの役割を明らかにするとともに、細胞の性状、機能および体内動態を解析可能な実験系の構築を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、環境適応能力が高く飼育が容易であり2014年にゲノムが解読されたコイ(*Cyprinus carpio*)およびその近縁種でありクローン系統が存在するために白血球移入実験などの免疫学研究に適したギンブナ(*Carassius auratus langsdorfii*)を主な対象魚種として、以下の課題に取り組んだ。

(1) 新規魚類サイトカイン IL-5fam の同定と機能解析

コイのゲノムデータベースよりTh2サイトカイン領域をシグネチャー解析により探索し、新規サイトカイン(IL-5fam)遺伝子領域を予測した。当該領域の配列を特異的に認識するプライマーを作製しRT-PCRにより増幅後、cDNA塩基配列を決定した。コイの種々の臓器や白血球におけるIL-5fam遺伝子発現を調べるとともに、当該遺伝子の組換えタンパク質を作製し、コロニー形成刺激能等を指標としてコイ腎臓白血球に対する機能やリガンド-受容体-細胞内シグナルの種間保存性を評価した。

(2) 抗原特異的リンパ球培養系の構築

魚類の獲得免疫活性化機構、特にT細胞とB細胞による相互作用と抗体産生細胞分化のしくみを解明するための実験系構築を目指し、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)を抗原モデルとして、抗原特異的リンパ球の増殖を再現した培養系の構築を試みた。すなわち、フロイント完全アジュバント(FCA)と混合したKLHで免疫したコイまたはギンブナの2次リンパ器官とされる臓器(脾臓および腎臓)より単核白血球を回収し、KLH存在下で培養し、細胞の増殖とその性状を解析した。

(3) リンパ球の *in vivo* 動態解析が可能な実験系の開発

クローンギンブナは単為生殖にて子孫を残すため、同系のギンブナ個体は全て同じゲノムを持ち、同系の個体間で免疫拒絶反応を起こすことなく細胞・組織の移植実験が可能である。そこ

で当魚種を用いて、抗原認識して活性化した T・B 細胞を他の魚に移植しその動態を解析することを可能とする蛍光タンパク遺伝子導入魚の作出を行った。すなわち、1 対のトランスポゾン (ToI2) 転移酵素認識配列間にアフリカツメガエル由来の EF1 プロモーターと EGFP 遺伝子を組み込んだ DNA コンストラクトを作製し、ToI2 転移酵素をコードする mRNA とともに受精直後の OB1 系統のギンブナ胚 (1~2 細胞期) にマイクロインジェクションを施し、全身でモザイク状に蛍光を示すギンブナ個体を作成した。その内、GFP 強陽性を示す F0 世代の個体より次 (F1) 世代を得て、それらについて GFP 蛍光を指標に選別し、さらに F2 世代を得た。各世代の魚の末梢白血球における GFP 発現をフローサイトメトリー解析し、GFP クローン系統の樹立を確かめた。

4. 研究成果

(1) 新規魚類サイトカイン IL-5fam の同定と機能解析

哺乳類の IL-3、IL-5 および GM-CSF は共通 鎖受容体を介して STAT5 リン酸化などの細胞内シグナル伝達を経て好酸球や好塩基球などの産生を制御する IL-5 ファミリーサイトカインとして知られるが、これまでに魚類ではそれらに相当する遺伝子が見つかっていなかった。しかし、近年ゾウギンザメ (軟骨魚類) やスポッテッドガー (全骨類) のゲノムシニエー解析により IL-5 ファミリーに類似したサイトカイン様遺伝子が発見された。そこで真骨魚類であるコイのゲノムデータベース (PRJNA73579) を用いてシニエー解析を行い、IL-5 ファミリー様遺伝子 *il-5fam* の同定と全長配列の決定に成功した。また、他の真骨魚類でも相同遺伝子を探索したところ、キンギョ・アメリカナマス (骨鰈上目) やアメリカウナギ (カライワシ上目) などの原始的な真骨魚類では見つかったものの、進化的に高等とされる正真骨類では見られなかった。これらのことは、*il-5fam* は軟骨魚類から一部の真骨魚類までの比較的原始的な脊椎動物が保存する遺伝子であり、進化の過程で欠失または遺伝子重複などによる機能変化を起こすなど多様性が生じていることが示唆された。

続いて当遺伝子の役割を明らかにするために、コイの各組織ならびに種々のマイトジェン (PHA, LPS, polyI:C) により刺激した腎臓白血球における *il-5fam* の発現を定量 RT-PCR により調べた。コイ *il-5fam* 発現は、大腸菌死菌接種された個体の腎臓において有意に増強されたことから免疫に関連する分子であると考えられた。また、T 細胞マイトジェンである PHA 刺激された腎臓白血球において *il-5fam* 発現が有意に増強されたことから、T 細胞が主な産生細胞であることが示唆された。

さらに、組換えコイ IL-5fam を HEK 293T 細胞発現系にて作製し、その生化学的性状を調べるとともに、腎臓細胞の増殖、STAT5 活性化、コロニー形成に及ぼす効果を *in vitro* で解析した。また、組換えコイ c 細胞外領域タンパク質存在下における IL-5fam のコロニー形成能を評価した。その結果、組換えコイ IL-5fam はコイ腎臓細胞に対して増殖、JAK 依存的な STAT5 活性化、好酸球 / 好塩基球 / マスト細胞 (EBM) 型顆粒球 (PAS⁺; peroxidase⁻; *gata2*⁻; c⁺ および EBM type granules⁺) のコロニー形成を促した。一方、組換え c 存在下においては IL-5fam のコロニー形成に及ぼす効果は著しく減弱した。以上より、魚類 IL-5fam は哺乳類 IL-3、IL-5 および GM-CSF と同様、c 受容体-JAK/STAT5 シグナル経路を介して EBM 型顆粒球の産生を促すことが明らかとなり、その役割が当サイトカインファミリーの祖先形質であることが示唆された。以上の成果は、魚類の EBM 型顆粒球の役割の解明に大きく役立つだけでなく、脊椎動物の造血・免疫系、特に 2 型免疫機構の成り立ちとその制御機構の理解に大いに貢献すると考えられる。

(2) 抗原特異的リンパ球培養系の構築

KLH で免疫しておいたコイまたはギンブナの脾臓および腎臓より細胞を回収し、KLH 存在下で培養した結果、非存在下のものと比較して顕著な増殖が認められた。一方、同細胞を異なる抗原オボアルブミン (OVA) 存在下で培養した結果、陰性対照とほぼ同様であった。KLH 刺激により増殖した細胞の性状をフローサイトメトリー (FCM) 解析した結果、IgM 陽性細胞をはじめとするリンパ球様細胞で構成されていた。これらのことから、KLH 特異的な B 細胞増殖を再現した培養系を構築できたものと考えられる。現在、抗原特異的な増殖を示した細胞性状の詳細な解析をギンブナで進めるため、魚類の粘膜免疫に重要と考えられている免疫グロブリンアイソタイプ IgT、さらにはヘルパー T 細胞の表面抗原マーカー CD4-2 などの分子に対するモノクローナル抗体の作出を試みている。今後、本培養系を応用していくことで、種々の組織由来のリンパ球活性化機構を解析するための強力なツールとなり得ると考えられる。

(3) リンパ球の *in vivo* 動態解析が可能な実験系の開発

EF-1 :GFP 遺伝子導入ギンブナ系統の樹立のため、最も強く GFP 蛍光を示した個体 (F0) から採卵して次世代 (F1) を得、さらに次々世代 (F2) を得た。蛍光顕微鏡下において、F0 個体は全身がモザイク状に GFP 蛍光を示した。同個体から採卵して得られた F1 世代のうち、14.5% がほぼ全身が緑色蛍光を示す GFP 陽性個体であったが、残りは全て GFP 陰性であった。さらに、GFP 陽性の F1 個体から得られた F2 世代は全ての個体が GFP 陽性を示した。このことは、F0 個体は

生殖細胞のおよそ 15%が GFP 遺伝子導入されたキメラであり、その GFP 陽性卵から得られた次世代は全細胞が GFP 遺伝子を持つ個体であると考えられた。GFP 陽性を示す各世代の魚の末梢白血球を FCM 解析した結果、F0 魚の白血球はリンパ球、顆粒球、単球のいずれの分画の細胞においても GFP 蛍光陽性細胞と陰性細胞が混在していたのに対し、F1 および F2 世代の白血球は全分画の細胞が GFP 陽性を示した。以上のことから、F0 に導入された EF-1 :GFP 遺伝子が次世代へと伝わり GFP 陽性クローニングシステムを確立することができた。すなわち、GFP 陽性リンパ球を野生型の同系個体に移入することによりその増殖・遊走・活性化などの体内動態を容易に解析することが可能な世界に類を見ない実験系の構築に成功した。

本研究を通して、寄生虫感染魚における細胞と分子のネットワークの解明までには至らなかったものの、魚類特有のサイトカインの機能解明や活性化リンパ球の機能・動態などを解析可能な *in vitro* および *in vivo* 解析系の開発に成功した。本研究で得られた成果を、今後、感染魚における免疫機能評価などへ応用・発展させることにより、魚類免疫機構の深い理解につながり、魚病の診断・予防法の開発などに大きく寄与すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 森友忠昭、片倉文彦	4. 巻 68
2. 論文標題 魚類の免疫機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日生研たより	6. 最初と最後の頁 3-11
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 無
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 Nishiya Kohei, Sawada Mai, Dijkstra Johannes M., Miyamae Jiro, Okano Masaharu, Katakura Fumihiko, Moritomo Tadaaki	4. 巻 108
2. 論文標題 A fish cytokine related to human IL-3, IL-5, and GM-CSF, induces development of eosinophil/basophil/mast-cell type (EBM) granulocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental & Comparative Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dci.2020.103671	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 Kobayashi Isao, Kondo Mao, Yamamori Shiori, Kobayashi-Sun Jingjing, Taniguchi Makoto, Kanemaru Kaori, Katakura Fumihiko, Traver David	4. 巻 9
2. 論文標題 Enrichment of hematopoietic stem/progenitor cells in the zebrafish kidney	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-50672-5	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 桜井公平、岡野雅春、宮前二郎、山口卓哉、片倉文彦、森友 忠昭
2. 発表標題 コIT細胞受容体（TCR） / 遺伝子の発現調節
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西谷広平・澤田真衣・Johannes M. Dijkstra・宮前二郎・岡野雅春・片倉文彦・森友忠昭
2. 発表標題 哺乳類IL-3, IL-5およびGM-CSFと近縁な魚類サイトカインIL-5famは好酸球/好塩基球/マスト細胞(EBM)型顆粒球の産生を促す
3. 学会等名 令和2年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kohei Nishiya, Mai Sawada, Jiro Miyamae, Masaharu Okano, Johannes M. Dijkstra, Fumihiko Katakura, Tadaaki Moritomo
2. 発表標題 A novel ligand of common receptor subunit beta chain in common carp promotes development of basophils and macrophages
3. 学会等名 19th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------