

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15914

研究課題名(和文) 魚類NK細胞が担う細胞性免疫機構解明と細胞性免疫を誘導する免疫賦活剤の開発

研究課題名(英文) Functional elucidation of the NK cells in cell-mediated immunity and development of immunostimulants that induce cell-mediated immunity in fish

研究代表者

松浦 雄太 (Matsuura, Yuta)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・研究員

研究者番号：40823894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：魚類養殖で問題となる細胞内寄生細菌やウイルスによる感染症に対する感染防御に重要な役割を担うリンパ球として、ナチュラルキラー(NK)細胞が知られているが、魚類におけるNK細胞の特性や機能に関する研究は不十分である。本研究では、実験モデルとしてギンブナを用い、NK細胞の解析を可能にする魚類NK細胞マーカーを見出し、抗体の作製など、NK細胞を用いた研究を進めるための基盤的技術確立した。また、NK細胞の純化技術確立のため、魚類白血球に対する不死化遺伝子導入技術を開発した。最後に、細胞性免疫を誘導する免疫賦活剤としてEnterococcus faecalisの加熱死菌を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NK活性を有する細胞集団を同定し、その集団でのみ高発現している遺伝子をマーカーとして活用するというアプローチは魚類の先行研究にはない新規手法である。これまでの魚類NK細胞研究は、クローンや近交系の存在しない魚種が用いられ、遺伝的に均一な細胞の準備ができないため、養子移入実験などの実施が困難であった。本研究でクローンギンブナに対する研究ツールを開発できたことは、養子移入実験などこれまで解析出来なかった魚類NK細胞の役割を解明する上で非常に重要である。本研究で見出した免疫賦活剤は、現在養殖の現場で問題となっている細胞内寄生細菌等の感染症に対する防除技術として利用でき、社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Infections caused by intracellular bacteria or viruses have been a serious problem in fish aquaculture. Although Natural killer (NK) cells are effector cells involved in the protection against these pathogens, the studies of the function of NK cells in fish have been limited. In this study, we explored marker molecules of fish NK cells and developed an antibody that reacts with it as a research tool for the analysis of the function of NK cells in ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. Besides, we established a method of forced expression of immortalizing genes for fish leukocytes. The method is applicable in generating immortalizing NK cells and obtaining pure NK cell lines. We lastly found that heat-killed *Enterococcus faecalis* was an immunostimulant that could induce cell-mediated immunity.

研究分野：比較免疫学

キーワード：NK細胞 細胞性免疫 ギンブナ

1. 研究開始当初の背景

魚類養殖において、細胞内に侵入し増殖する細胞内寄生細菌やウイルスによる感染症が大きな問題となっている。特にブリ類のノカルジア症は、国内で発生する魚病被害額の15~30%に匹敵するほどの甚大な経済損失をもたらしており、対策が求められている。これら病原体に対する感染防御に重要な役割を担うリンパ球として、ナチュラルキラー（NK）細胞が知られているが、魚類におけるNK細胞の特性や機能に関する研究は不十分である。また、魚類NK細胞の特異的マーカーは未だ見つかっていないため、NK細胞の機能や役割に関する研究の妨げとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、実験モデルとしてギンブナを用い、未だ見つかっていない魚類NK細胞マーカーを見出し、抗体の作製など、NK細胞を用いた研究を進めるための基盤的技術確立を目指した。また、NK細胞の純化技術確立のため、魚類白血球の不死化技術開発を目指した。最後に、NK細胞が関与する細胞性免疫を誘導する免疫賦活剤開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) NK細胞マーカーの探索

NK細胞を同定するため、セルソーターを用いてギンブナの造血器官である腎臓より細胞の大きさおよび食細胞マーカー抗体に対する染色性の違いに基づき白血球集団を分画し、NK活性を有する細胞集団を絞り込んだ。NK活性の測定は、ラジオアイソトープを用いたクロム51放出アッセイにより実施した。次に、分取した細胞集団よりRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を実施した。この時、NK活性を有する集団と既知の細胞集団（キラーT細胞集団、ヘルパーT細胞集団、全リンパ球集団、顆粒球集団、マクロファージ集団、ミエロイド集団）のトランスクリプトームを比較し、NK活性を有する集団において高発現の遺伝子を絞り込んだ。

(2) NK細胞マーカーに対する抗体の作製

(1)において見出した分子の組換え体タンパク質を作製し、BALB/cマウスに免疫した。免疫後同マウスより脾臓を摘出し、ミエロマ細胞株（SP2/0-Ag14）と細胞誘導することによりハイブリドーマを作製した。作製したハイブリドーマのうち、ギンブナ白血球を認識する抗体を産生するものをフローサイトメトリーによりスクリーニングし、その後限界希釈法によるクローニングを実施した。クローニング済みハイブリドーマは無血清培地にて培養し、その培養上清中に分泌された抗体をProtein L担体を用いて精製した。

(3) NK細胞マーカーに対する抗体を用いたNK細胞の分布解析

ギンブナの腎臓、脾臓および末梢血より白血球を分離し、(2)において作製した抗体を用いて免疫染色を実施した。この時、食細胞マーカーと共染色を実施した。染色後の細胞はフローサイトメトリーにより解析した。

(4) 魚類白血球の不死化技術開発

白血球の不死化技術開発のため、白血球に効率良く遺伝子を導入する方法の開発をおこなった。初めに、遺伝子導入が可能か調べるため、緑色蛍光タンパク質GFP導入用レンチウイルスベクターを作製し、ギンブナ腎臓由来白血球に感染させた。次に、不死化遺伝子を導入するため、不死化遺伝子c-Mycとそのレポーター遺伝子としてVenusを共発現させるためのレンチウイルスベクターを作製、同細胞に感染させた。

(5) NK細胞が関与する細胞性免疫を誘導する免疫賦活剤開発

免疫賦活剤の候補として*Enterococcus faecalis*に着目し、本試験を実施した。*E. faecalis*の加熱死菌をギンブナに腹腔内接種し、7日後に腎臓白血球を分離、NK細胞集団の動態を解析した。また、細胞性免疫機能への影響を調べるため、同白血球に含まれる貪食細胞の機能をフローサイトメトリーにより解析した。さらに、細胞内寄生細菌に対する免疫賦活効果を調べるため、ギンブナにおいても高病原性を示す細胞内寄生細菌*Edwardsiella tarda*を用いた人為感染試験を実施した。すなわち、*E. faecalis*の加熱死菌を腹腔内接種し、14日後に*E. tarda*を腹腔内接種により人為感染させ、感染後の生残率を測定した。

4. 研究成果

(1) NK 細胞マーカーの探索

NK 活性を有する細胞は幼若白血球を豊富に含むミエロイド細胞集団のうち食細胞マーカー抗体陰性の集団に存在することが判明した。各白血球集団のトランスクリプトーム解析の結果、NK 活性を有する細胞集団において発現する遺伝子のうちの細胞集団よりも高発現なものは 617 遺伝子であった。このうち、免疫細胞の細胞外に発現することが想定される膜タンパク質は、6 遺伝子であった。このうち、他の細胞集団において発現量の低い遺伝子としてスカベンジャーレセプターを候補とした。哺乳類の先行研究において、スカベンジャーレセプターはマクロファージに発現する分子であることが判明している。しかし、トランスクリプトーム解析の結果、マクロファージ集団における発現は確認されず、NK 活性を有する細胞集団でのみ高発現であることは、哺乳類の知見と異なり興味深い結果である。

(2) NK 細胞マーカーに対する抗体の作製

(1)で見出したスカベンジャーレセプター(図.1)は、分子量 150,000 程度と巨大であるのに加え、膜タンパク質であるために、組換え体タンパク質の作製が困難であることが予想された。リボソーム上にタンパク質を発現させることができる、小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術を利用し、マウスの免疫に用いるタンパク質の作製を行なった。その結果、免疫に必要な十分量のタンパク質を得ることができ、フローサイトメトリーに利用可能、すなわち生きた白血球を認識するモノクローナル抗体を作製することに成功した。これまで、魚類の膜タンパク質に対する抗体作製は、目的の抗原を発現する生細胞を免疫することや抗原を哺乳類細胞に強制発現させたものを免疫することにより作製していたが、目的抗原以外のタンパク質も混入してしまうため効率が悪いという問題があった。本研究は、小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術が魚類白血球に対する抗体作製に利用できることを初めて示すことができた。魚類白血球に対する抗体作製は成功例が少なく、ニジマスやギンブナなど一部の魚種を除いて開発が進んでいない。特に、ブリなど本邦において重要な養殖対象魚種において利用可能な抗体は存在せず、今後は本技術により開発速度が上がることを期待される。なお、本研究にて開発したスカベンジャーレセプターに対するモノクローナル抗体が免疫組織学などフローサイトメトリー以外の解析に応用できるかについて現在検討を行っている。



図.1 本分子のドメイン構造
SRおよびSRCR: Scavenger receptor cysteine rich
青部分：膜貫通領域

(3) NK 細胞マーカーに対する抗体を用いた NK 細胞の分布解析

(2)において作製した抗体を用いて、ギンブナ腎臓(頭腎)由来白血球中の NK 細胞マーカー陽性細胞を調べた。その結果、(1)で判明した NK 細胞を豊富に含む集団以外の集団(リンパ球および顆粒球集団)においても NK 細胞マーカー陽性細胞が確認された。(1)のトランスクリプトーム解析の結果より、これら細胞集団では NK 細胞マーカー遺伝子の発現量が低いことが判明していることから、作製した抗体が本分子のアイソフォームなど、構造が類似している他の分子を認識している可能性がある。そのため、細胞の大きさ等のパラメーターや食細胞マーカー抗体等のツールを組み合わせる必要があると判明した。一方、NK 細胞を豊富に含む、ミエロイド細胞集団における NK 細胞マーカー陽性細胞は 3% ほどであった。このうち、約 1% が食細胞マーカー陽性すなわち、(1)の結果より NK 活性を有さない細胞集団であることがわかった。今後は、食細胞マーカー陰性のミエロイド細胞集団(赤枠 Q3 分画、図.2)を NK 細胞マーカー陽性細胞とする。頭腎以外の組織における NK 細胞マーカー陽性細胞の分布を確認したところ、体腎において 2% ほど陽性細胞が確認された。一方、脾臓および末梢血における NK 細胞マーカー陽性細胞の割合はミエロイド細胞集団のうちそれぞれ 5% および 2% 程度であったが、ミエロイド細胞集団の細胞数が極めて少ないため、NK 細胞マーカー陽性細胞の実数は腎臓由来白血球よりも少ないことが示唆された(図.2)。本抗体を用いれば、セルソーターにより NK 細胞マーカー陽性細胞の分取が可能である。分取できれば、本細胞が NK 活性を有するのかわかれば、養子移入実験などによりウイルスや細胞内寄生細菌感染に対する NK 細胞の役割を調

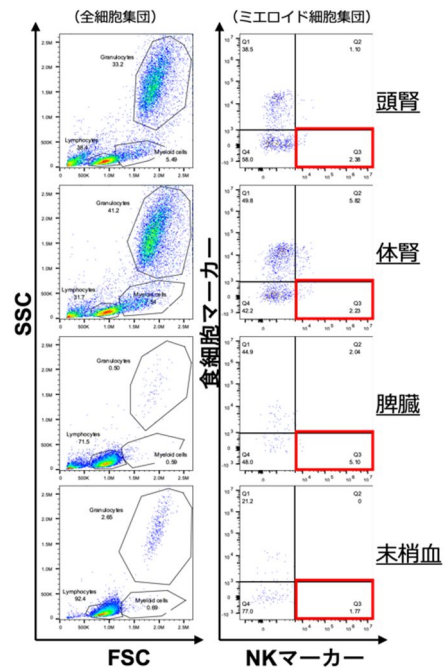


図.2 フローサイトメトリーによるNK細胞の分布解析

べる実験を計画していた。しかし、新型コロナウイルス感染症の蔓延によりセルソーターを保有する機関での実験が困難になったため、今後は社会情勢を考慮しながらセルソーターを用いた実験を再開する予定である。

(4) 魚類白血球の不死化技術開発

レンチウイルスベクターを用い GFP 遺伝子を白血球へ導入した結果、わずかではあるがリンパ球集団で8%、NK細胞集団を多く含むミエロイド細胞集団で3%の GFP 発現細胞が確認された。さらに、レンチウイルス感染の際に、ギンブナヒレ由来細胞株(CFS)をフィーダー細胞として用いると、遺伝子導入効率が上昇することが判明した。しかし、フィーダー細胞を用いる場合、その白血球への混入が生じてしまう。そこで、フィーダー細胞を加えずとも同等の遺伝子導入効率となるような手法を検討した。その結果、ヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメイン (Type III repeat) およびヘパリン結合ドメイン II のキメラタンパク質であるレトロネクチンをコートした培養皿をウイルス感染時に用いることで、その導入効率が30%程度と飛躍的に上昇することが判明した(図.3)。魚類におけるレンチウイルスベクターによる遺伝子導入の試みは、サケ科魚類の細胞①やゼブラフィッシュを用いた先行研究により報告されているが、白血球に対して実施した例はなく、初めての報告である。また、他の遺伝子導入法を用いても *in vitro* で白血球に遺伝子導入することは極めて困難であったため、本研究成果は白血球の機能解析の際のブレイクスルーとなりうる。c-Myc 導入白血球を *in vitro* で培養したが、遺伝子発現は保持されているものの細胞の増殖は確認されず、白血球の不死化は生じていないことが示唆された。現在はギンブナのクローン系統を用いた養子移植実験を活用し、*in vivo* すなわち c-Myc 導入白血球を白血球と同系統のギンブナに移植し、その体内において不死化細胞を作製する方法を検討している。

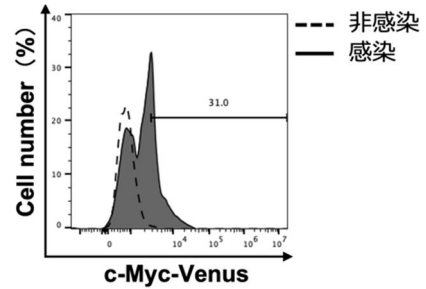


図. 3 c-Myc 遺伝子の導入効率

(5) NK 細胞が関与する細胞性免疫を誘導する免疫賦活剤開発

E. faecalis の加熱死菌をギンブナに接種した結果、接種後7日でNK細胞マーカー陽性細胞数が上昇する傾向が認められたが、統計的有意差は検出されなかった(図.4)。また、細胞性免疫機能を測定するため、貪食細胞の機能すなわちマクロファージおよび好中球の活性酸素産性能を測定した結果、いずれの細胞の活性酸素産性能も本加熱死菌の接種により有意に上昇することが判明した。特にマクロファージの場合、intactな状態すなわち同加熱死菌による再刺激を施さずとも活性酸素産性能が高い状態であることが判明した(図.5)。このことは、体内侵入してきた病原体に対してマクロファージが速やかに応答可能なことを示している。また *E. tarda* を用いた人為感染試験の結果、本加熱死菌は細胞内寄生細菌 *E. tarda* に対する生残率向上効果を持つことが判明した(図.6)。我々のグループはこれまでに、*E. faecalis* の加熱死菌が細胞性免疫の誘導に関与するヘルパーT細胞の増殖やサイトカイン産生能の上昇をもたらすことを報告している②。本研究成果と合わせて考察すると、NK マーカー陽性細胞数の上昇傾向やマクロファージの活性化など、*E. faecalis* の加熱死菌は細胞内寄生細菌に対する細胞性免疫機能を誘導可能な免疫賦活剤となりうるということが明らかとなった。

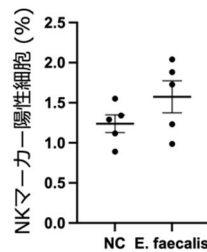


図. 4 *E. faecalis*接種によるNK細胞マーカー陽性細胞数の変化

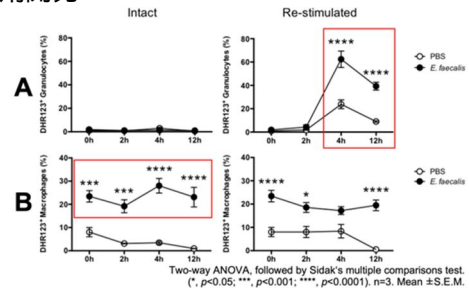


図. 5 顆粒球 (A) およびマクロファージ (B) の活性酸素産性能 (DHR123陽性細胞の割合)

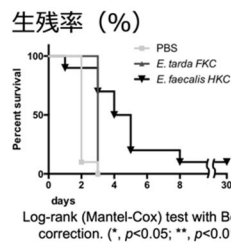
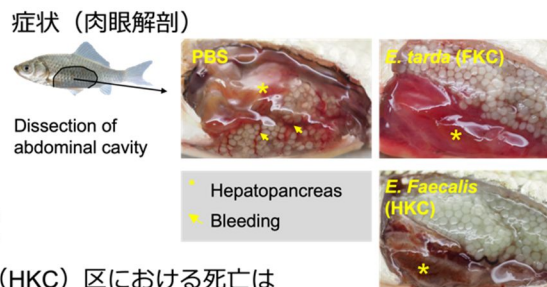


図.6 *E. faecalis*加熱死菌 (HKC) 区における死亡はコントロールおよび *E. tarda* のホルマリン死菌ワクチン (FKC) よりも有意に遅延し、出血や肝臓の炎症も認められない



た(図.5)。このことは、体内侵入してきた病原体に対してマクロファージが速やかに応答可能なことを示している。また *E. tarda* を用いた人為感染試験の結果、本加熱死菌は細胞内寄生細菌 *E. tarda* に対する生残率向上効果を持つことが判明した(図.6)。我々のグループはこれまでに、*E. faecalis* の加熱死菌が細胞性免疫の誘導に関与するヘルパーT細胞の増殖やサイトカイン産生能の上昇をもたらすことを報告している②。本研究成果と合わせて考察すると、NK マーカー陽性細胞数の上昇傾向やマクロファージの活性化など、*E. faecalis* の加熱死菌は細胞内寄生細菌に対する細胞性免疫機能を誘導可能な免疫賦活剤となりうるということが明らかとなった。

<引用文献>

- ① Gratacap et al., Efficient CRISPR/Cas9 genome editing in a salmonid fish cell line using a lentivirus delivery system, BMC Biotechnology, 2020, 20-35
- ② Matsuura et al., Stimulatory effects of heat-killed *Enterococcus faecalis* on cell-mediated immunity in fish, Dev. Comp. Immunol., 74, 2017,1-9

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuura Yuta, Takano Tomokazu, Matsuyama Tomomasa, Sakai Takamitsu, Terashima Sachiko, Nakayasu Chihaya	4. 巻 107
2. 論文標題 Development of a method to quantify endogenous IFN protein in amberjack species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fish & Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 251 ~ 259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsi.2020.10.013	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 Matsuura Yuta, Terashima Sachiko, Takano Tomokazu, Matsuyama Tomomasa	4. 巻 95
2. 論文標題 Current status of fish vaccines in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fish & Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 236 ~ 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsi.2019.09.031	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松浦 雄太, 松山 知正, 高野 倫一, 中易 千早
2. 発表標題 プリ類のインターフェロン (IFN) を定量する方法の開発
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 松浦 雄太, 松山 知正, 高野 倫一, 寺島 祥子, 中易 千早
2. 発表標題 DNAワクチンの効果を高めるプラスミドベクターの設計に関する研究
3. 学会等名 令和2年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松浦 雄太, 松山 知正, 坂井 貴光, 栗田 潤, 高野 倫一, 寺島 祥子, 中易 千早
2. 発表標題 ギンブナ顆粒球由来セリンプロテアーゼによる免疫機構に関する研究
3. 学会等名 令和元年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2020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
---------	---------