

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06231

研究課題名(和文) 魚類の頭腎メラノマクロファージセンターは胚中心の機能を持つか

研究課題名(英文) Characterization of melanomacrophages in red seabream

研究代表者

中村 修 (Nakamura, Osamu)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：00306648

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)：本研究では、先の研究でマダイ頭腎MMCでの発現が確認された、抗原提示に関わるMHCクラスII、樹状細胞及び濾胞樹状細胞に強く発現するCD83の発現細胞、およびケモカインの一種CCL20の働きについて調べた。MHCクラスIIの保存性の高い2ドメインの組み替え体を作製し、抗体を作製した。これを用いて免疫染色したところ、MMCが強く染色された。CD83については組み替え体を作製できなかった。CCL20の組み替え体を作製し、様々な組織由来の白血球を用いて遊走試験を行ったが、まだ明瞭な結果を得ていない。頭腎、体腎、脾臓のMMCの形態および貪食能を調べた結果、組織間の差異が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MMCの少なくとも一部はMHCクラスII分子を強く発現しており、T細胞への抗原提示を行うことが示唆された。また様々な異物に対する貪食能を持つことも示され、メラノマクロファージは魚類における重要な抗原提示細胞である可能性が高まった。この結果は、MMCは単なる異物の集積部位ではなく、適応免疫にかかわる構造体であることを示唆しており、未だ謎の多い魚類MMCの機能解明に向けた貴重な知見が得られた。異物を集める魚類MMCの働きが明らかになることで、効率的なワクチン開発の助けとなる情報が得られるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In the previous study, we found that MHC II, CD83 and CCL20 genes were highly expressed in the melanomacrophage centers in the head kidney of red seabream. We prepared recombinant protein of MHC class II alpha and the rabbit antiserum against it. Immunohistochemistry observation revealed that some melanomacrophages strongly expressed MHC II alpha. We also prepared recombinant CCL20 and examined chemotactic assay to identify cell types induced by the chemokine. However, we have not obtained clear result yet. In microscopical observation and phagocytosis assay, we found some differences among melanomacrophages from head and trunk kidney and spleen.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：メラノマクロファージセンター マダイ

1. 研究開始当初の背景

適応免疫を担うリンパ球の一つ、B細胞は、抗体を産生する細胞である。B細胞は前駆細胞から分化するときに免疫グロブリン(Ig)遺伝子の再編成を起こし、特定の配列を持つ膜型 Ig を 1 種類だけ発現するようになる。抗原と接触した B 細胞は分裂、増殖するとともに体細胞突然変異を起こし、ここで再び Ig 遺伝子の多様性が生じる。そのなかからその抗原に対してより親和性の高い抗体を産生する B 細胞が選別されることで、高親和性抗体が増えていく(抗体の親和性成熟)。この B 細胞の増殖と選別は、哺乳類ではリンパ節内に形成される胚中心と呼ばれる領域で行われ、胚中心暗領域で B 細胞が増殖し、明領域で選別が行われる。選別において中心的な役割を果たすのが濾胞樹状細胞である。一般的な樹状細胞は T 細胞に抗原を提示して活性化を導くのに対し、濾胞樹状細胞は細胞表面に抗原を保持して、これと結合しうる抗体を膜上を持つ B 細胞を選別する役割を担う。結合する抗体を作れなかった B 細胞はアポトーシスを起こし消滅する。

魚類も哺乳類同様に適応免疫系を備えており、抗体の親和性成熟も認められる。魚類における適応免疫系の重要性は、魚病ワクチンの普及が感染症被害の減少をもたらしている事実が明瞭に示している。しかし適応免疫系がどのように誘導されるのかについてはまだいくつかのブラックボックスが残されており、抗体の親和性成熟がどこで起きるのか、また胚中心に相当する部位や濾胞樹状細胞に相当する細胞が存在するのかもわかっていない。

魚類はリンパ節を欠き、体内に投与された異物は脾臓や腎臓に蓄積される。これらの器官にはメラノマクロファージセンター (melanomacrophage center、MMC)と呼ばれる、メラニンやリポフスチンなどの色素を持った茶褐色の細胞(メラノマクロファージ)の集団が存在し、脾臓や腎臓に移行した異物は徐々にこの MMC に集積されることが古くから知られていた。しかし MMC が単なる異物の集積場所であるのか、それとも適応免疫系において何らかの役割を果たしているのか、決着はついていない。また、メラノマクロファージの特性も不明である。

MMC の形状や大きさは魚種によってさまざまであるが、申請者らはマダイ *Pagrus major* の頭腎では MMC が発達しており、また物理的に強固で、頭腎から細胞を分離した際に MMC を壊さずに取り出せることを見出した。この方法を利用して、頭腎の MMC と、MMC 以外の部分からそれぞれ RNA を抽出し、次世代シーケンサによるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、MMC に特徴的に発現する免疫関連遺伝子が多数同定され、それらの特徴から MMC には濾胞樹状細胞に似た特徴を示す細胞が含まれる可能性が示唆された。

本研究ではマダイ MMC は胚中心明領域に相当する組織であるという仮説の証明を目指す。

2. 研究の目的

本研究ではマダイ頭腎 MMC が哺乳類の胚中心、特にその明領域に相当する、B細胞選別の場であるという仮説の証明を目指す。

MMC は古くからその存在を知られながらその実態と機能が解明されていない、魚類

免疫学の長年の謎である。これが哺乳類の胚中心に相当することを証明できれば、学問的価値は大きい。2019年9月に行われた日本比較免疫学会学術集会において(1)で述べたトランスクリプトーム解析結果について発表し(文献1)、優れた発表に与えられた古田奨励賞を受賞したことも、研究者の関心の高さを示している。

本研究においてはマダイの頭腎からMMCを単離する方法を見出したことが大きなアドバンテージである。ゲノム情報がないのはフグなどに比べて不利な点ではあるが、次世代シーケンサの登場によって不利は大きく解消された。MMCを単離できるため、さらにMMC内の細胞を分離し、メラノマクロファージとそれ以外の細胞(MMCはメラノマクロファージのみからなるわけではない)に分けて調べることにより、それらの細胞の特性を明らかにできる。

3. 研究の方法

1) 濾胞樹状細胞に相当する細胞の同定

樹状細胞マーカーCD83、濾胞樹状細胞には高発現しないMHCクラスII分子、抗原保持に必要と考えられる補体受容体の組み換え体タンパク質を作製、これらを免疫原としてポリクローナル抗体を作製した。MMおよびMM以外のMMC構成細胞について蛍光抗体法によりMHCクラスII分子の発現の有無を調べた。

2) メラノマクロファージの特性解析

マダイ頭腎からMMCを単離し、さらにトリプシン処理等で細胞を分離した。MMの形態を光学顕微鏡で観察し、頭腎、体腎、脾臓のMMに違いがあるか調べた。さらに種々の異物および老化赤血球を与え、貪食能を調べた。

メラノマクロファージは黒色素を含むため、フローサイトメトリーで容易に識別できる。当学部の生化学研究室所有のセルソーターの附属したフローサイトメーターを利用して、メラノマクロファージとそれ以外の細胞を分取し、トランスクリプトーム解析により両画分の遺伝子発現を比較、それぞれの特性を調べた。トランスクリプトーム解析は、実績のある株式会社生物技研に依頼した。

3) MMCにおけるケモカインの働き

胚中心には抗原との接触で活性化したB細胞が遊走してくる。我々はMMCでCCケモカインの一種(以下,CCXとする)の発現が周囲の組織よりも高いことを見出した。しかし哺乳類ではこのケモカインと胚中心との関連は知られていない。そこで組み換え体を作製し、マダイの種々の白血球をもちいた遊走試験を行った。また単離したMMCをもちいた遊走試験も行った。

4. 研究成果

1) MMCにおけるMHCクラスII陽性細胞、CD83陽性細胞

i) マダイMHCクラスII鎖のcDNAクローニング

3個体のマダイから得た頭腎cDNAをテンプレートとしてMHCクラスII鎖細胞外領域配列を増幅し、シーケンシングしたところ、12クローンから544bpからなる8種類の配列が得られ、翻訳アミノ酸配列では、6種類の異なる配列が得られた。この6種類の配列をアライメントするとともにドメイン構造をPROSITEで調べたところ、

2 ドメインに相当する領域の保存性が高いことが認められた。

ii) マダイ MHC クラス 鎖組み換え体の作製

rPmMHC は 2 ドメインの 93 アミノ酸残基と 213 アミノ酸残基からなる Tag 配列を含むため、その予想分子量は約 30kDa である。発現誘導の結果、不溶性画分で約 28kDa のタンパク質の発現誘導が認められた。

組み換え大腸菌の不溶性画分を可溶化し、Ni アガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーに供したところ、溶出画分に約 28kDa のメジャーなバンドが認められた。

iii) マダイ CD83 組み換え体の作製

CD83 についてはいくつか発現系を変えて試行したが、発現が誘導されず、組み換え体を得ることができなかった。

iv) ウサギ抗 rPmMHC 血清を用いたウェスタンブロッティング

ウサギ抗 rPmMHC 血清を用いて rPmMHC をサンプルとしたウェスタンブロッティングを行ったところ、28kDa のほぼ単一のバンドが検出された。頭腎ライセートを用いた WB を行った結果、マダイ MHC クラス 鎖の推定分子量と一致する 28kDa のほぼ単一のバンドが検出され、抗体の特異性が確認された。

v) 免疫染色

ウサギ抗 rPmMHC 血清を MMC 構成細胞に添加した結果、一部の MM と、色素顆粒を持たない細胞にてシグナルが検出された。ウサギ正常血清を用いた陰性対照では蛍光は検出されなかった。

ウサギ抗 rPmMHC 血清を脾臓、頭腎、体腎の細胞懸濁液に添加した結果、こちらでも一部の MM にて 562 nm の励起光で励起された赤色の蛍光が検出された。ウサギ正常血清を用いた陰性対照では蛍光は検出されなかった。

2) メラノマクロファージの特性解析

i) 形態観察

マダイの頭腎、体腎、脾臓からメラノマクロファージを含む細胞浮遊液を作製し、MM の形態を観察した。いずれの組織でも MM の直径は 10~20 μm 程度であった。核は球形で辺縁部に見られるものが多かった。脾臓には、比較的小型の黒褐色の顆粒を複数含む細胞と、大型の黒褐色顆粒を一つ有する細胞が観察された。頭腎では、橙色の顆粒を有している細胞、大型の黒褐色顆粒を有している細胞、大型の黒褐色顆粒に加えて、小型の無色または黒色素顆粒を複数有している細胞が観察された。体腎では、黄色の色素顆粒を有している細胞と大型の黒褐色顆粒一つと小型の黒褐色顆粒を複数有している細胞、小型の黒褐色顆粒を複数有している細胞が観察された。

また、メラニンらしき黒褐色の色素のみからなる、膜に包まれた構造物がしばしば観察された。微分干渉では核の存在が確認できず、PI を用いて染色を施してもシグナルを検出できなかったことから、細胞ではないと判断した。

ii) 貪食試験

頭腎、体腎、脾臓の MM はいずれの異物も貪食している様子が観察された。また、いずれの場合も脾臓 MM の貪食率が最も高く、頭腎 MM の貪食率が最も低かった。蛍光ポリスチレン粒子とパン酵母に対しては、脾臓と頭腎、脾臓と体腎の MM の貪食率に有意差が見られた。朱墨に対しては脾臓と頭腎の MM の貪食率に有意差が見られた。

加熱処理した標識赤血球を添加した脾臓の細胞懸濁液を微分干渉法により観察したところ、10%前後の MM が赤血球を取り込んでいる様子が観察された。また、CFSE で蛍光標識した赤血球を MM が取り込んでいるか観察した結果、熱処理後の赤血球を与えた場合は、MM が赤血球を貪食していることが明らかになった。一方、熱処理を加えていない正常赤血球の場合は、MM 内に蛍光は見られなかった。

頭腎と体腎に加熱赤血球を加えた場合は、赤血球を貪食している MM は観察されなかった。

iii) フローサイトメトリー

MMC を解離して得た細胞懸濁液をフローサイトメーターにて分画した。その結果、ほぼ純粋な MM 集団を得ることができた。MM 集団と、MM を含まない細胞集団から RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析に供した（生物技研）。現在、その結果を解析中である。

3) ケモカインによる遊走試験

マダイ CCX の組み替え体を作製し、種々の白血球を対象として遊走試験を行ったが、現在まで明瞭な結果は得られていない。

一方、頭腎から単離した MMC を用いた遊走試験も行っているが、こちらもまだ明瞭な結果が得られていない。しかし、ある細胞種の移動数が高い傾向がみられ、現在追試を行っている。

なお、この実験の過程で、ある地方の養殖マダイの頭腎及び脾臓には粘液胞子虫が高頻度で存在することを発見した。18SrRNA の配列を得たところ、新種である可能性が高かった。魚類の MMC から粘液胞子虫が発見されたのはおそらく 2 例目であり、1 例目は地中海で養殖された日本産マダイから発見されている。しかし形態および 18SrRNA 解析から、本種は新種である可能性が高い。本寄生虫がなぜ MMC に集まるのか興味もたれ、この寄生虫についても研究を開始した。しかし、MMC に粘液胞子虫がいるとなると、MMC および周囲の白血球がすでに何らかの刺激を受けていると推測されるため、遊走試験等の評価に問題が生じた。これは予期しえなかった問題で、寄生虫のいない養殖個体を入手する必要が生じ、実験の進捗に影響した。一方、本寄生虫がいる場合といない場合とで白血球の遊走に違いがある可能性が示されたが、まだ結論は得られていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	筒井 繁行 (Tsutsui Shigeyuki) (20406911)	北里大学・海洋生命科学部・准教授 (32607)	

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