

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15602

研究課題名（和文）ヒトデ幼生の自己・非自己認識に関わる種特異的糖鎖の探索

研究課題名（英文）Exploration of species-specific glycans involved in self- and nonself-recognition in starfish larvae.

研究代表者

古川 亮平（FURUKAWA, Ryohei）

慶應義塾大学・文学部（日吉）・助教

研究者番号：90458951

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）：棘皮動物イトマキヒトデの幼生の免疫細胞である間充織細胞は、同じ種であることを特異的に認識し、認識できないものを異物とみなす、「missing-species（種の喪失）認識」によって生体防御を行っている。本研究は、この認識機構を司る種特異的な分子を探索するものであったが、条件検討の過程で予備データに疑義が生じ、本研究における仮説そのものを再考する必要性に迫られる結果となった。一方、他のアプローチを試行錯誤する過程で、イトマキヒトデの成体型免疫系が稚ヒトデ期に成熟し、同種異個体を非自己とみなす能力を獲得することが明らかになった。この発見は、免疫系の個体発生を考える上で非常に重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、研究の進行過程で仮説を支える予備データに疑義が生じたため、目的の達成には至らなかった。一方で、副次的に、稚ヒトデ期に成熟する成体型免疫系が、父親、母親からそれぞれ受け継いだ自己マーカー遺伝子群のうち、少なくとも片方が一致すれば自己とみなすというメカニズムによって、同種異個体を識別していることを示唆することができた。無脊椎動物において免疫系の成熟時期が明らかになっている種はほとんどなく、免疫系の個体発生メカニズムを明らかにするための研究基盤を確立することができた。これにより、成体が有する自己マーカーの探索を通して、幼生が認識する種特異的な分子を探索できる可能性が見出された。

研究成果の概要（英文）：Mesenchyme cells, the immune cells of the starfish larvae, regulate the immune response by "missing-species" recognition, in which they specifically recognize that the cells are of the same species and consider those they cannot recognize as foreign. This study was designed to search for species-specific molecules that control this recognition mechanism. However, in the process of examining the experimental conditions, doubts arose about the preliminary data, and it became necessary to reconsider the hypothesis of this study itself. On the other hand, through the process of trial and error of other approaches, it became clear that the adult-type immune system of the starfish matures during the juvenile stage after metamorphosis and acquires the ability to consider allogeneic individuals as non-self. This finding is very important for the ontogeny of the immune system.

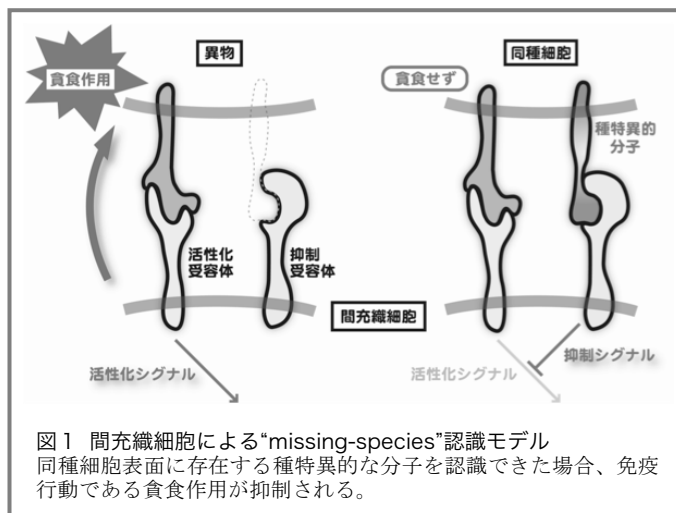
研究分野：比較免疫学

キーワード：棘皮動物ヒトデ 自己・非自己認識 missing-species認識 missing-self認識 免疫系の発達

### 1. 研究開始当初の背景

免疫という現象は、「自己」と「非自己」を識別し、「非自己」を体内から排除する生体反応である。その生理的な意義は、「自己」を維持し、その存在を保証することである。免疫システムによって「自己」が維持されれば、個体は決して「種」という枠組みからはみ出さない。従って、免疫システムは、結果として種の存続を保証するシステムでもある。

「非自己」という存在は「自己」という存在なしには成立し得ない。すなわち、「非自己」を識別するためには「自己」という存在が確立されていなければならない。申請者はこれまで、棘皮動物イトマキヒトデの幼生において唯一の免疫細胞である間充織細胞に着目し、免疫応答時の細胞行動やそれを裏打ちする分子メカニズムを詳細に解析してきた[Furukawa *et al.*, 2009, Furukawa *et al.*, 2012, Furukawa *et al.*, 2016]。その過程で、間充織細胞が、同じ種であることを特異的に認識し、認識できないものを異物とみなす、「missing-species (種の喪失) 認識」によって生体防御を行っている可能性を見出した(図1)。つまり、イトマキヒトデの幼生にとって、「自己=同種」である。実際、体内に存在するはずのない同種の精子を幼生に注射しても、精子は生きている限り間充織細胞に貪食されることはない。



抗体等を用いて異物に対して特異的に応答する獲得免疫システムと異なり、異物に対して非特異的に応答する自然免疫システムは、非特異的であるがゆえに「自己とは何か？」という生命の本質に迫る問題に直結する。獲得免疫を有する脊椎動物では、主要組織適合遺伝子複合体が自己マーカーとして機能する。しかし、自然免疫しか有していない無脊椎動物において、自己マーカーの候補が報告された動物は原索動物ウスイタボヤ [De Tomaso *et al.*, 2005]や、刺胞動物ヒドロ虫 [Rosa *et al.*, 2010]に限られている。無脊椎動物がどのように「自己」を認識しているのかという問題は、個体の生命とその進化を考える上で避けて通ることができない重要な課題である。

### 2. 研究の目的

ヒトデ幼生の間充織細胞による missing-species 認識モデルは、無脊椎動物の自己認識システムとその進化を理解する上で有用なモデルである。この認識システムを可能にするには、細胞表面に何らかの種特異的な分子が必要(図1)であり、これこそがヒトデ幼生における自己マーカーの候補である。そこで本研究では、イトマキヒトデの精子を材料に、missing-species 認識を可能にする種特異的な分子の探索を目指した。

### 3. 研究の方法

#### 【missing-species 認識に関わる種特異的な糖鎖の分子特性の解析】

グリコシダーゼミックスで処理したイトマキヒトデの精子を幼生に顕微注射した予備実験から、間充織細胞による missing-species 認識を司る種特異的な分子は、糖鎖であることが予測されていた。そこで、このグリコシダーゼミックスに含まれる酵素をそれぞれ単独で使用して精子を処理し、これらの精子を幼生に顕微注射した際に、間充織細胞による免疫応答が促進される酵素探索した。また同様に、各種レクチンで処理した精子を顕微注射することで、間充織細胞による免疫応答が抑制されるレクチンも探索した。これら2つのアプローチにより、種特異性認識に関わる糖鎖の分子特性を明らかにすることを試みた。

#### 【幼生と成体における自己・非自己認識様式の比較検討】

後述するように、精子を材料とした上記の分子特性解析の結果、予備実験で得られていたデータの信頼性が疑われる事態に陥った。そこで、胚・幼生期の解離細胞による個体の再構築系を利用してキメラ幼生を作製し、幼生の免疫系が missing-species 認識によって自己・非自己認識を行っていることを再検証した。また、成体の免疫系においても missing-species 認識によって自己・非自己認識が行われているかを調べた。これらの解析を通して、イトマキヒトデがどのように「自己」を認識しているのかという問題に対して、個体発生を通じた解析基盤の確立と、自己認識メカニズムのモデル構築を目指した。

#### 4. 研究成果

##### 【各種糖鎖切断酵素で処理した精子の顕微注射実験】

精子の酵素処理においては、海水中での処理と、酵素の至適条件での処理の2通りで検討した。海水中での処理の場合、短時間の酵素処理は精子の生存に影響を及ぼさなかった一方で、間充織細胞による貪食作用を抑制する酵素の発見には至らなかった。また長時間の酵素処理の場合、一部の酵素処理精子に対する貪食作用は観察されたものの、これらの酵素処理精子の生存性は低く、死んだ精子に対して貪食作用が生じたものと推測された。

酵素の至適条件で精子を処理した場合、著しく精子の生存性が低下し、同様に死んだ精子に対する貪食作用が観察された。これらの結果から、予備実験で確認された、グリコシダーゼミックスで処理した精子に対する貪食作用の亢進は、精子の生存性の低下によるアーティファクトである可能性が浮かび上がってきた。

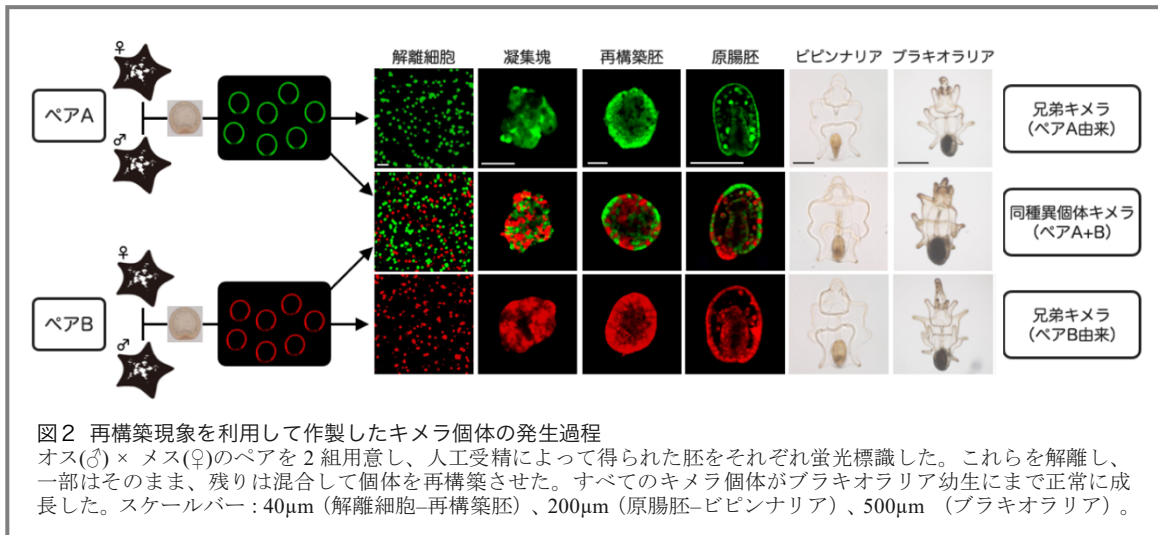
##### 【各種レクチンで処理した精子の顕微注射実験】

各種 FITC 標識レクチン (ConA, DBA, PNA, RCA120, SBA, UEA-1, WGA) を結合させた精子を幼生体内に顕微注射し、間充織細胞による貪食作用の有無を調べたところ、ConA 結合精子に対して比較的強い貪食作用が観察された。一方、ConA と同等の染色性を示した SBA 結合精子に対する貪食作用はほとんど認められなかった。ただし、SBA を含め他のレクチンを結合させた精子が全く貪食されなかったわけではなかったことから、レクチン染色時の操作が精子の生存性に影響を及ぼした可能性を排除できなかった。また、7種類のレクチンの混合液で処理した精子の顕微注射でも同様であった。

##### 【幼生の自己・非自己認識様式の再検証】

上記の結果から、予備実験で得られていたデータの信頼性に疑義が生じたため、幼生の自己・非自己認識メカニズムが、間違いなく missing-species 認識であるかを再検証した。先行研究では、生きた同種精子に対して間充織細胞が免疫応答を生じないことと、幼生体内に移植した他個体由来の間充織細胞が、ホスト個体の間充織細胞と共存することから、missing-species 認識モデルが提唱されていた。そこで、本実験では、他個体由来の細胞が入り混じったキメラ個体を作成するというアプローチで、missing-species 認識を再検証した。

イトマキヒトデの胚・幼生は、単一の細胞にまで解離しても再度凝集し、個体を再構築できることが知られている (Dan-Sohkawa *et al.*, 1986)。この再構築現象を利用し、キメラ個体の作製を試みた。仮に、幼生の免疫系が missing-species 認識によって自己・非自己を認識しているのであれば、キメラ幼生は簡単に作製できるはずである。本研究では、再構築の材料として複数胚を用いたため、対照群は兄弟キメラ、実験群は同種異個体キメラになる。これらの再構築キメラ個体に変態可能なブラキオラリア幼生まで成長した(図2)ことから、幼生の免疫系は、missing-species 認識によって生きた同種細胞を自己とみなしていることが確認された。

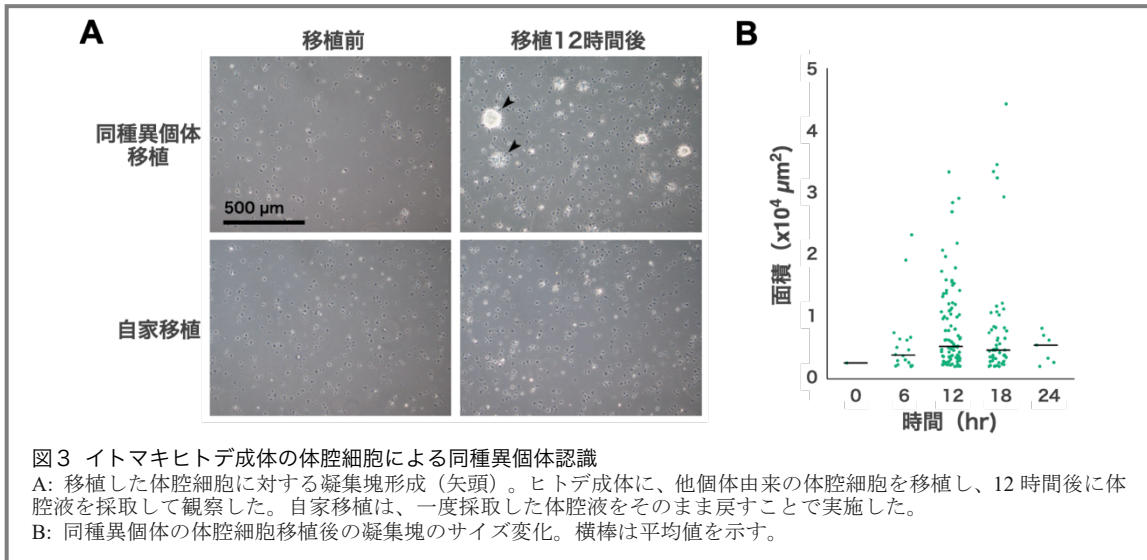


##### 【成体の免疫系における認識様式の検証】

これまで、成体の免疫系が、幼生の免疫系と同様に missing-species 認識であるかは未確認であった。もし成体の免疫系も missing-species 認識であるならば、採取が簡単な成体の免疫細胞である体腔細胞が、認識メカニズムを解析するための材料として利用可能になる。そこで、体腔細胞の移植実験を通して、成体の免疫系の認識様式を検証した。

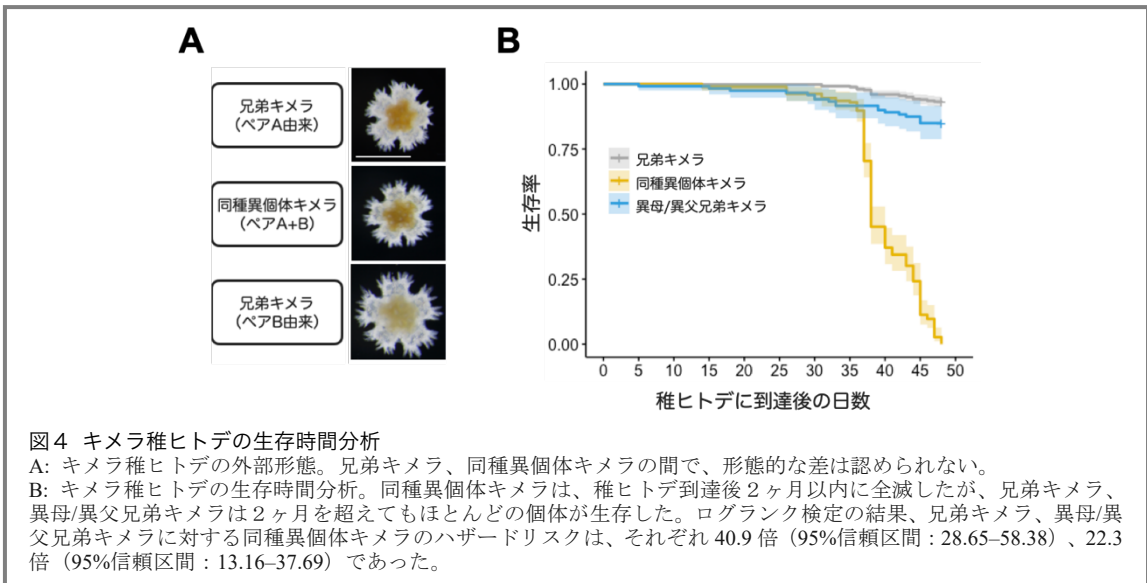
その結果、成体の免疫系は、移植した体腔細胞に対し、自家移植では生じない凝集塊を形成した(図3A)。この凝集塊は、移植に伴ってサイズが増加し、そのピークは移植後12~18時間後であった。これらの結果から、成体の免疫系は、幼生と異なり、missing-self (自己の喪失) 認識

によって同種異個体を識別できる能力を獲得していることが明らかとなった。



### 【キメラ幼生に対する変態誘導実験】

イトマキヒトデの免疫系における自己・非自己認識様式が、幼生と成体で異なることが明らかになったことから、その変化がいつ生じるかを確かめるために、キメラ幼生を変態させることで検証した。その結果、兄弟キメラ、同種異個体キメラともに、正常な変態過程を経て稚ヒトデにまで成長し、形態的な差は一切認められなかった (図 4 A)。ところが、稚ヒトデに成長後 2 週間を超えると、同種異個体キメラは死に始め、2 ヶ月以内に全滅した (図 4 B)。さらに、異母/異父兄弟を用いて同様の実験を行ったところ、異母/異父兄弟キメラは稚ヒトデに成長後、2 ヶ月を超えても生存することが明らかになった (図 4 B)。



以上の結果から、イトマキヒトデの成体型免疫系は稚ヒトデ期に成熟し、父親、母親からそれぞれ 1 セットずつ受け継いだ自己マーカー遺伝子群のうち、少なくとも片方が一致すれば自己とみなして攻撃しないというメカニズムによって、自己・非自己を識別していると推測される。

### 5. 今後の課題と展望

本研究は、幼生の間充織細胞による missing-species 認識を司る種特異的な分子を、精子を材料として探索するものであった。しかし、条件検討の過程で、予備実験で得られていたデータに疑義が生じ、本研究における仮説そのものを再考する必要性に迫られる結果となった。自己を特異的に認識し、認識できないものを異物とみなすメカニズムにおいては、免疫応答を生じないことがデフォルトであるため、このメカニズムを司る自己マーカー的物質の探索は非常に難しい。これを探索するためには、本研究のアプローチであった、自己に対する応答を活性化させる物質を探すか、異物に対する応答を抑制する物質を探すかの 2 通りが考えられる。本研究では、予備実験段階で糖鎖という候補が得られていたことから、自己の糖鎖を認識できないようにするとい

うアプローチを選択した。このような候補がない場合、自己に対する応答を活性化するモノクローナル抗体を作製するという戦略が有効であると考えられる。本研究では、予算の都合上、このアプローチは選択できなかったが、今後の課題として検討する必要がある。

一方、他のアプローチを試行錯誤する過程で、イトマキヒトデ成体の免疫系が同種異個体を非自己とみなすこと、成体型免疫系は稚ヒトデ期に成熟することが明らかになった。この発見は、免疫系の個体発生を考える上で非常に重要な知見である。加えて、幼生の間充織細胞が認識する種特異的な分子と、成体の体腔細胞が認識すると考えられる自己マーカー分子が、同一のものなのか別のものなのかという問いも生じる。個体特異性を強く反映していると考えられる自己マーカーの探索はゲノム科学的アプローチが有効であると考えられるため、その探索を通して、成体型免疫系の認識対象である自己マーカー遺伝子群に個体間で共通の構造があるかを調べれば、幼生型免疫系の認識対象の候補が得られるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taguchi, T., Minakata, K., Tame, A., Furukawa, R.	4. 巻 13
2. 論文標題 Establishment of the immunological self in juvenile Patiria pectinifera post-metamorphosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.1056027	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古川亮平
2. 発表標題 イトマキヒトデの変態を制御する遺伝子ネットワークとその免疫学的意義
3. 学会等名 日本比較免疫学会 第32回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南方宏太、田口瑞姫、多米晃裕、古川亮平
2. 発表標題 イトマキヒトデ成体の体腔細胞による同種異個体認識反応の動態解析
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 南方宏太、田口瑞姫、古川亮平
2. 発表標題 イトマキヒトデ成体の同種異個体認識応答時における体腔液成分の分析
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

〔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
---------	---------