

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05969

研究課題名（和文）魚類免疫機能の種独自性の解明

研究課題名（英文）Elucidation of species-specific immune functions in fish

研究代表者

岩波 礼将（Iwanami, Norimasa）

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・特任准教授

研究者番号：10360504

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）：魚類の種間で共有された免疫システムの機能と種内で独自に獲得された機能を理解するために、モデル動物であるメダカにおける免疫機能の理解は不可欠である。本研究では、メダカの免疫系は成魚における正常な腸内細菌のバランスの維持に必要であり、逆にメダカ免疫系の成熟には腸内細菌と腸管上皮細胞の相互作用が必要であることを明らかにした。また、メダカナチュラルキラー（NK）細胞を特定し、細胞内寄生細菌に対する免疫応答に重要な役割を持つことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類の免疫システムは種間で多様性を持つことが知られているが、その理解にモデル動物での遺伝学的なアプローチは大変有用である。本研究では免疫不全メダカの作成に加えてメダカにおいて初めて無菌飼育を実現することで免疫システムと腸内細菌の相互作用を明らかにするとともに、NK細胞の特定と機能解明を達成した。これにより、ゼブラフィッシュを含む他の魚類との比較による種特異性と共通性の理解を通じて養殖などへの応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to understand the functions of the immune system shared among fish species and those acquired uniquely within a species, it is essential to understand the immune function in the model animal, medaka. In this study, we clarified that the medaka immune system is necessary for maintaining a normal balance of intestinal microbiota in adult fish, and conversely, that the maturation of the medaka immune system requires the interaction between intestinal bacteria and intestinal epithelial cells. We also identified medaka natural killer (NK) cells and demonstrated that they play an important role in the immune response against intracellular parasitic bacteria.

研究分野：免疫学、遺伝学、魚類生理学

キーワード：免疫システム メダカ 腸内細菌 NK細胞 サイトカイン受容体

1. 研究開始当初の背景

免疫システムは感染や腫瘍に対する生体防御に不可欠であり、個体の生存に必須の機構である。無脊椎動物にも見られる外来微生物表面のパターン認識を含めた自然免疫に加え、脊椎動物では多様な抗原受容体を用いた適応免疫も発達しており、高度に特異的な抗原認識や免疫記憶などに重要な役割を果たす。

脊椎動物の免疫システムに関してはヒトやマウスなどの哺乳類で多くの研究が進められ、分子細胞メカニズムが明らかにされてきた。しかしながら、脊椎動物の免疫システムは決して一様ではない。例えば、ヤツメウナギなどの無顎類は他の脊椎動物と異なり、リンパ球は VLR という独特な抗原受容体を持つ (Pancer et al. Nature (2004))。また、タラのゲノムは MHC クラス 2 分子とその抗原提示機構に関わる遺伝子を完全に欠失しており、CD4 陽性 T 細胞による免疫応答の欠損が示唆されるが、個体の生存には影響を与えない (Star et al. Nature (2011))。さらに、ゲノムを魚類の種間や哺乳類と魚類で比較すると、MHC 分子や抗原受容体レパートアの数、抗原受容体の使い分けなど、多くの相違が認められる。また NK 細胞は哺乳類において抗腫瘍や感染防御において重要な役割を果たすが、その細胞表面受容体の種間での多様性により、魚類で特定が困難であった。ゼブラフィッシュにおいても NK 細胞の表面受容体の候補が報告されているが機能は不明であった。

脊椎動物のそれぞれの種は、特異的外来抗原認識と免疫記憶といった個体の生存に重要な共通の目的を持ちつつ、生息環境に応じて免疫系を独自に進化させてきたといえる。さらに、各動物種の生息環境は腸内細菌叢にも影響を与え、免疫システムの形成にも関与することが知られている。このような種ごとに独自に進化した免疫システムがどのようにバランスをとって個体の生存を維持しているかを知ることにより、免疫システムの構築に関する新たな知見を得ることが期待される。

免疫システムのどの機能が魚類の種間で普遍的に共有され、どの機能が種内で独自の環境適用によって獲得されたかを理解するための足掛かりとしてメダカ免疫システムの理解が不可欠と考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、小型魚類のモデル動物であるメダカを用いて比較ゲノムと機能解析により、魚類の種間で共有された免疫システムの機能と種内で独自に獲得された機能を明らかにすることを最終的なゴールとした。そのため特に個体を取り巻く細菌叢と免疫システムとの相互作用の観点で研究を進め、具体的には遺伝学モデルの作成により、これまで十分に知られていないメダカの自然免疫および適応免疫、またその相互作用としてのサイトカイン産生のしくみを理解し、その過程でゼブラフィッシュをはじめとした他の魚類との比較により免疫システムの機能の種特異性を明らかにすることを目指した。すなわち以下の 2 つの目的で研究を進めた。

メダカ自然免疫および適応免疫システムの役割と腸内細菌との相互作用の解明
メダカサイトカインシグナルネットワークの解明と NK 細胞の同定

3. 研究の方法

メダカ自然免疫および適応免疫システムの役割と腸内細菌との相互作用の解明

まず、CRISPR-Cas9 システムを用いて適応免疫および自然免疫の免疫不全メダカパネルを作成した。T 細胞および B 細胞の分化に必須の *rag1*、欠損すると NK 細胞も含めた重症複合免疫不全を示すことが予想されるインターロイキン 2 受容体ガンマサブユニット (*il2rg*)、toll 様受容体 (TLR) シグナルを介して自然免疫に中心的な役割を果たす *myd88* 遺伝子への変異導入を行い、リンパ球分化や免疫関連遺伝子の発現などについて表現型を解析した。T 細胞および NK 細胞特異的 *lck* 遺伝子のプロモーター下で EGFP を発現するコンストラクトを初期胚に注入することでトランスジェニックメダカを作成して野生型および変異体でイメージングに用いた。

免疫不全の腸内細菌叢への影響を知るため、野生型および *il2rg* 変異体の腸内細菌 DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子配列を MiSeq で解析した。一方ゼブラフィッシュでの方法に倣い、野生型メダカ卵の滅菌処理と幼魚の無菌環境での飼育により、腸内細菌のいない germ-free およびメダカ腸管由来の *Aeromonas* 属細菌のみが存在する gnotobiotic 環境でのメダカ幼魚育成の方法を確立した。これらの環境および conventional な環境で育成した幼魚の腸管切片作成による表現型解析を行うとともに、germ-free 条件の免疫系発生への影響を知るためトランスクリプトーム解析 (RNA-Seq) を行った。

また、適応免疫の変異体では蛍光を発現するメダカメラノーマ細胞株 MM-Z (放射線医学総合研究所より提供) 移植に対する拒絶応答を、適応免疫および自然免疫に関わる変異体においては *Edwardsiella* 属細菌 (国立研究開発法人水産研究・教育機構より提供) 感染への感受性を検

討した。

メダカサイトカインシグナルネットワークの解明とNK細胞の同定

まず、*rag* 変異体と *il2rg* 変異体との表現型の比較により、細菌感染防御やメダカメラノマ MM-Z に対する抗腫瘍効果におけるメダカ NK 細胞の役割を検討した。

次に、野生型および T 細胞および B 細胞を欠損する *rag1* 遺伝子変異体のリンパ器官である腎臓、胸腺、脾臓からリンパ球を FACS でソーティングし、先進ゲノム支援を受けてシングル

セルトランスクリプトーム (scRNA-Seq) 解析により *rag1* 非依存性クラスターの中で NK 細胞の特定とメダカ NK 細胞マーカー同定を進めた。その中で、サイトカイン受容体のひとつをゲノム編集によりノックアウトしてリンパ器官の細胞を用いた FACS と qPCR によって NK 細胞の欠損を確認するとともに、*Edwardsiella* 属細菌感染防御への影響を検討した。

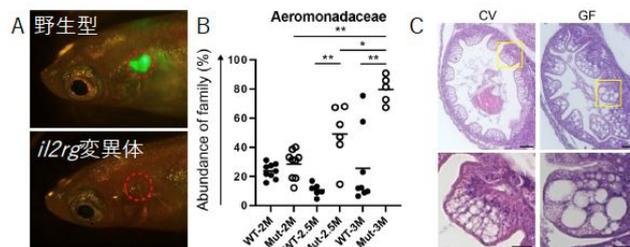


図1 免疫システムと腸内細菌との相互作用

A) Tリンパ球とNK細胞を欠く免疫不全メダカの樹立。B) 免疫不全メダカの腸内細菌叢におけるAeromonadaceae科細菌の割合の顕著な増加。C) germ-freeメダカ腸管の成熟異常。通常飼育幼魚 (CV) と比較してgerm-free幼魚 (GF) では吸収性空砲の肥大が見られる。

4. 研究成果

メダカ自然免疫および適応免疫システムの役割と腸内細菌との相互作用の解明

免疫不全を示す *il2rg* 変異体メダカ系統を樹立し、T 細胞および NK 細胞を欠くことを明らかにした。この変異体では MM-Z 腫瘍株の移植に対する拒絶が見られなかった。野生型成魚では腸内細菌叢に変動が見られないのに対し、*il2rg* 変異体では 2 ヶ月齢では野生型と顕著な差がないものの 2.5-3 ヶ月齢にかけて腸内細菌叢のバランス異常が見られることから、適応免疫不全により腸内細菌叢が時期特異的にダイナミックに変化すること、すなわちメダカの免疫系は成魚における正常な腸内細菌のバランスの維持に必要であることを明らかにした。

一方、germ-free および gnotobiotic 環境でのメダカ幼魚の育成に成功した。germ-free メダカにおいて腸管上皮細胞に肥大した吸収性空砲が見られることから腸管上皮の成熟遅延と考えられ、gnotobiotic 環境ではそれが回復した。また、RNA-Seq や qPCR で明らかになった germ-free 腸における自然免疫関連遺伝子、特に抗微生物ペプチドを含めた TLR シグナル下流遺伝子の発現異常から、メダカ免疫系の成熟には腸内細菌と腸管上皮細胞の相互作用が必要であることを明らかにした (Sakaguchi et al. Front Immunol (2023)、図 1)。

TLR シグナル伝達因子である *myd88* 変異体も作成したが、*Edwardsiella* 属細菌感染への感受性が高いものの、ゼブラフィッシュのオーソログ遺伝子の変異体と異なり通常環境下では生存に影響しないことが明らかになった。これは比較免疫の観点で興味深く、現在作成中の別経路の自然免疫不全変異体との二重変異体で表現型を解析することで、自然免疫と適応免疫のバランスに関する知見を得ることができると期待している。

メダカサイトカインシグナルネットワークの解明と NK 細胞の同定

T および NK 細胞特異的 EGFP 発現トランスジェニックメダカの樹立に成功し、と関連して *il2rg* の変異体において T 細胞およびナチュラルキラー細胞の発生異常を見出した。

また抗原受容体の遺伝子再編成に異常を示す *rag1* 変異体を樹立した結果、メダカにおいても T および B 細胞の発生異常を示すことが分かった。野生型および *rag1* 変異体の腎臓、脾臓、胸腺内リンパ球分画の scRNA-Seq 解析の結果 *rag1* 非依存性の NK 細胞分画を特定し、NK 細胞特異的に発現する機能遺伝子の候補を得ることができたが、その中でサイトカイン受容体サブユニットの遺伝子を欠損するメダカ変異体を樹立した。この変異体では NK 細胞の欠失が見られ、*Edwardsiella* 属の細菌感染に対する致死率が上昇した (図 2)。このことから、メダカ NK 細胞は細胞内寄生細菌に対する免疫応答に重要な役割を持つことが明らかになった。

本研究により、メダカ免疫

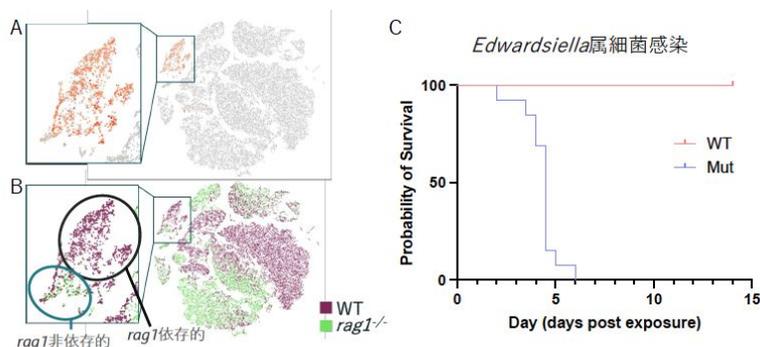


図2 NK細胞の特定と機能解析

A,B) 野生型および *rag1* 変異体腎臓リンパ球分画の scRNA-Seq 解析。 *lck* を発現する T 細胞および NK 細胞 (A) の中で *rag1* 非依存性のクラスター (B) を NK 細胞として特定した。C) NK 細胞に特異的に発現するサイトカイン受容体遺伝子変異体における *Edwardsiella* 属細菌感染への感受性の上昇。

システムの機能に関する知見を得ることができ、ゼブラフィッシュを含む他の魚類との比較による種特異性と共通性の理解への足がかりとなる。今後、scRNA-Seq 解析により見つかった NK 細胞特異的サイトカイン受容体を手始めに、サイトカインおよびその受容体欠損による免疫細胞分化、活性におけるサイトカインシグナルの役割を調査し、哺乳類や他の魚類との比較による種特異性と共通性の理解が期待される。

<引用文献>

Pancer Z, Amemiya CT, Ehrhardt GR, Ceitlin J, Gartland GL, Cooper MD. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature*. 430:174-80. (2004)

Star B, Nederbragt AJ, Jentoft S, Grimholt U, Malmstrøm M, Gregers TF, Rounge TB, Paulsen J, Solbakken MH, Sharma A, Wetten OF, Lanzén A, Winer R, Knight J, Vogel JH, Aken B, Andersen O, Lagesen K, Tooming-Klunderud A, Edvardsen RB, Tina KG, Espelund M, Nepal C, Previti C, Karlsen BO, Moum T, Skage M, Berg PR, Gjøen T, Kuhl H, Thorsen J, Malde K, Reinhardt R, Du L, Johansen SD, Searle S, Lien S, Nilsen F, Jonassen I, Omholt SW, Stenseth NC, Jakobsen KS. The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. *Nature*. 477:207-10. (2011)

Sakaguchi H, Sato Y, Matsumoto R, Gomikawa J, Yoshida N, Suzuki T, Matsuda M, Iwanami N. Maturation of the medaka immune system depends on reciprocal interactions between the microbiota and the intestinal tract. *Front Immunol*. 14:1259519. (2023)

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 Sakaguchi Hiyori, Sato Yuna, Matsumoto Ryo, Gomikawa Joe, Yoshida Namie, Suzuki Tomohiro, Matsuda Masaru, Iwanami Norimasa | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Maturation of the medaka immune system depends on reciprocal interactions between the microbiota and the intestinal tract | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Immunology | 6. 最初と最後の頁 1259519 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1259519 | 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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Sakaguchi H, Matsuda M, Iwanami N. |
| 2. 発表標題 Analysis of fish innate immunity using mutant medaka of the genes involved in TLR signaling and NK cell development |
| 3. 学会等名 第29回小型魚類研究会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sakaguchi H, Matsuda M, Iwanami N. |
| 2. 発表標題 Maturation of the medaka immune system depends on reciprocal interactions between the microbiota and the intestinal tract. |
| 3. 学会等名 第29回小型魚類研究会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Iwanami N, Gomikawa J, Sakaguchi H Matsuda M. |
| 2. 発表標題 Inhibition of maturation of intestinal epithelial cells in germ-free medaka. |
| 3. 学会等名 第28回小型魚類研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Sakaguchi H, Matsuda M, Iwanami N. |
| 2. 発表標題 Phenotypic analysis of immunodeficient medaka |
| 3. 学会等名 第28回小型魚類研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Iwanami N |
| 2. 発表標題 Visualization of medaka fish lymphocytes. |
| 3. 学会等名 International Workshop on Optics, Biology, and Related Technologies (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Norimasa Iwanami, Yuna Sato, Ryo Matsumoto and Masaru Matsuda |
| 2. 発表標題 Understanding the species-specific nature of the fish immune system |
| 3. 学会等名 第27回小型魚類研究会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------|
|---------|---------|