

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 6 月 11 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380112

研究課題名（和文） 免疫応答を導く魚類ケモカインの初期制御機構

研究課題名（英文） Role of chemokines in immune response of teleost fish

研究代表者

倉田 修（KURATA OSAMU）

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：90277666

研究成果の概要（和文）：ヒラメが持つ 2 種類のケモカイン（IL-8 および CXCL13）が白血球（IL-8 は好中球、CXCL13 は B リンパ球）の走化性を誘導することを明らかにした。各ケモカインに対する抗体を作製し、本抗体を用いたケモカインの定量法を確立した。定量解析の結果、IL-8 の産生動態は病原体の種類によって異なることを明らかにした。ヒラメの感染症では、病原体の種類によって免疫応答が異なるが、IL-8 の産生動態がそれに関連していることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：We revealed chemotactic activity of two types of chemokines, IL-8 and CXCL13 in Japanese flounder. IL-8 and CXCL13 induced selectively the migration of neutrophils and B lymphocytes, respectively. We also produced specific antibodies to these chemokines and developed immunoassays to estimate the quantity of these chemokines. Flounder leukocytes showed various responses in their IL-8 production that induced by stimulation with several species of bacterial pathogens. We suggested that IL-8 production is relevant to diversity of immune response observed in infectious diseases of Japanese flounder.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2012 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：魚類免疫学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：ケモカイン・IL-8・CXCL13・好中球・B リンパ球・炎症・ヒラメ

1. 研究開始当初の背景

病原体の種類によって動員される細胞および炎症の組織形態は異なることから、病原体に応じた免疫応答の選択機構が存在する考えた。防御反応の方向を決めているのは、白血球の動員に係わる初期応答で、魚類免疫系は、病原体の排除に適した機能を有する細胞をまず患部に動員し、細胞の機能分化そし

て機能発現を経て、炎症反応を成熟させていると予想した。細胞動員を主たる機能とするケモカインがこのシステムの成立を司ると思われるが、ケモカインによる細胞調節作用の基礎的知見はなかった。ケモカインによる白血球機能の調節作用を明らかにすることで、免疫応答の選択機構の解明に迫ることができると考えた。

2. 研究の目的

可溶性分子による細胞の機能調節作用は、当該分子とそのレセプターの相互作用、さらにレセプター保有細胞の機能発現を明らかにすることで理解できる。本研究では解析魚種にヒラメを用いる。ヒラメは、ケモカインとして6種類の遺伝子が研究当初クローニングされていた。本研究では、これらケモカインの白血球機能調節作用について以下の視点から明らかにする。

- (1) 白血球走化性の誘導と標的細胞
- (2) 標的細胞との相互作用に係る機能調節領域
- (3) 標的細胞の機能発現
- (4) 主要病原体に対するケモカイン産生応答

3. 研究の方法

本研究は、ケモカインによる細胞調節機能を探ることから、タンパクレベルの解析が必須となる。タンパク解析を基盤とした研究を遂行するために、以下の方法を計画した。

(1) ケモカイン組換えタンパクの作出

組換えタンパクは魚類と同じ脊椎動物であるヒト培養細胞発現系を利用する。天然型に近い構造を保持しているヒト培養細胞組換えタンパクは、本研究で計画している白血球機能解析および分子間相互反応試験において、実際の機能に即した評価が行える。浮遊細胞を用いた大量発現系の利用により、機能解析等に必要なたんぱく量(数十 μ g)の精製が可能である。

(2) ケモカインに対する抗体の作製

組換えケモカインに対するポリクローナル抗体(ウサギ)およびモノクローナル抗体(マウス、ラット)を作製する。本抗体を用いたケモカイン検出および定量解析法を確立する。

(3) ケモカインによる白血球走化性の誘導と標的細胞の特定

作出された組換えケモカインによる白血球走化性の誘導能について、定法のケモタキシスアッセイにより評価する。走化性を示した細胞について、形態、機能および表面マーカーによる同定を行う。

(4) 機能調節領域の特定

走化性誘導が確認されたケモカインについて変異体を作成し、機能調節に係る領域を探索する。合わせて同領域に対する抗体を作製し、抗体による機能阻害効果を確認する。

(5) ケモカインによる機能発現

ケモカイン標的細胞の機能発現は、炎症性

サイトカイン遺伝子の発現および標的細胞の分化により評価する。腎臓または末梢白血球から、好中球(大型&顆粒性)およびBリンパ球(細胞表面IgM陽性)をセルソーターにより回収し、各ケモカインにより誘導される発現遺伝子をRT-PCRにより解析する。また、細胞分化については、ヒレ由来細胞株(JFF07-1)をフィーダー細胞に用いた造血細胞の長期培養技術を利用した造血細胞と組換えケモカインの混合培養による、または孵化仔魚への組換えケモカインの移入試験による血球細胞の変化を観察する。

(6) 病原体感作によるケモカイン発現動態

本研究で確立するケモカインタンパクの定量解析法により、ヒラメ主要病原細菌(*Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, *Nocardia seriolae*)で感作した白血球から産生されるケモカインを定量し、各種病原体に対するケモカイン産生応答を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 各種ケモカインの白血球走化性誘導

各ケモカインの組換え体に対するヒラメ白血球の走化性を調べた結果、顕著な白血球走化性を誘導したケモカインはIL-8およびCXCL13の2種類であった。走化性を示した細胞についてそれぞれ解析したところ、IL-8の標的細胞は、大型で細胞内に顆粒を有し、ザイモザンに対して貪食能を示したことから、好中球であると同定された(図1A)。一方、CXCL13の標的細胞は、小型で細胞内顆粒が乏しく、細胞表面上にIgMを発現していたことから、Bリンパ球であると同定された(図1B)。これらケモカインの白血球走化性誘導能は、哺乳類で知られている機能と同等であることが分かった。

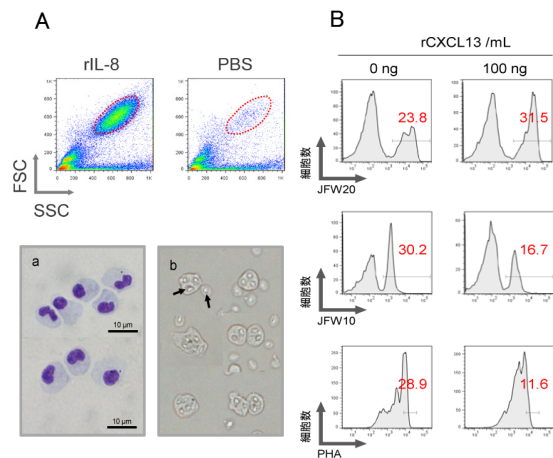


図1. ヒラメIL-8(A)およびCXCL13(B)に対し走化性を示す白血球。(A)遊走細胞のFCM、形態(a)および貪食能(b)。(B)遊走細胞のFCM。JFW20: 抗IgM抗体、JFW10: 抗粒球抗体、PHA: T細胞は強反応性を示す(Kurata et al., 2011)

(2) ヒラメ IL-8 の機能調節領域

IL-8 の N 末端の一次構造を明らかにし (図 2A)、走化性機能を担う分子領域に関する解析を行った。N 末端のアミノ酸を一つずつ削除した変異体に対する好中球の走化性を調べたところ、末端から 6 残基の削除より、好中球の走化性が有意に低下した (図 2B)。また、9-11 残基の変異は走化性誘導に影響を及ぼさなかったことから、好中球の走化性に関与するヒラメ IL-8 の機能領域は、N 末 6-8 残基に位置するロイシン-グリシン-バリン (LGV) であることが示唆された。さらに、ヒラメ IL-8 N 末領域に対する特異抗体を作製し、IL-8 の機能阻害に成功した (図 3)。

哺乳類では、IL-8 の好中球に対する作用は、N 末領域に存在するグルタミン酸-ロイシン-アルギニン (ELR) モチーフの関与が知られているが、ヒラメを含めた多くの魚種の IL-8 には ELR モチーフが存在しない。本成果は、IL-8 レセプター間の相互作用に係る機能領域について、ELR モチーフと異なる作用機序を初めて提示し、魚類 IL-8 による好中球の機能調節作用に関する議論を可能にした。また、本領域に反応し、IL-8 の機能阻害を示す抗体は、今後の生体内における解析に欠かせないツールとなった。

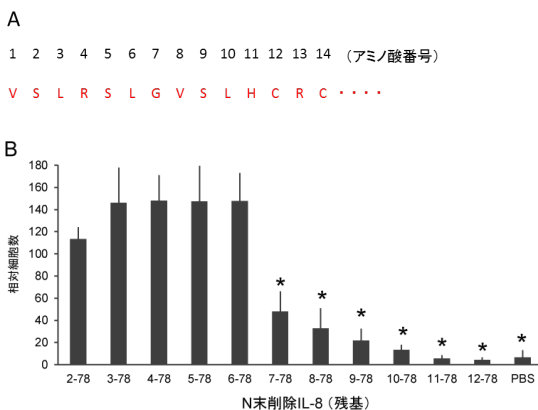


図 2. 分泌型ヒラメ IL-8 の N 末端アミノ酸配列 (A) および N 末アミノ酸削除組換え IL-8 (100ng/mL) に対する好中球の走化性 (B). 相対細胞数は、天然型 IL-8 (100ng/mL) に対する遊走細胞数に比較して算出された。

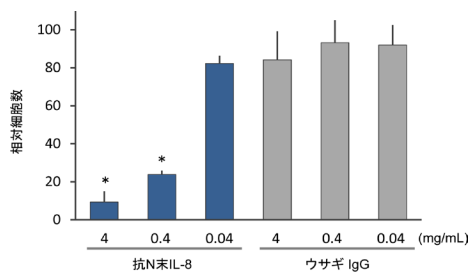


図 3. 抗ヒラメ IL-8 N 末抗体による IL-8 機能阻害. 相対細胞数は、IL-8 に対する遊走細胞数に比較して算出された。

(3) ケモカイン標的細胞の機能発現

IL-8 および CXCL13 により活性化された好中球および B リンパ球における発現遺伝子について調べた結果、好中球は IL-8 遺伝子を、B 細胞は CXCL13 遺伝子をそれぞれ発現することが分かった。このことから、各ケモカインにより遊走誘導された各細胞は、同種の細胞をさらに誘導する働きを持つことが推測された。

ケモカインによる細胞分化の誘導については、造血細胞の長期培養技術により、また、孵化仔魚へのマイクロインジェクション技術により検討したが、顕著な分化作用は認められなかった。

(4) 主要病原細菌に対するケモカイン産生応答

ヒラメ白血球の走化性を誘導する IL-8 および CXCL13 に対するモノクローナル抗体 (マウスおよびラット由来) を複数作製した。これら抗体を用いた各ケモカインタンパクの定量解析法 (サンドイッチ ELISA) を開発し、IL-8 タンパクおよび CXCL13 タンパクの検出・定量に魚類で初めて成功した。E. tarda または N. seriolae で感作した白血球は IL-8 タンパクを産生したが、S. iniae で感作した白血球は IL-8 タンパクの有意な産生を示さなかった (図 4)。さらに、白血球の IL-8 タンパク産生動態は、より長期の感作における E. tarda と N. seriolae の間でも異なり、E. tarda 感作白血球の IL-8 タンパク産生は低下し、N. seriolae 感作白血球の IL-8 タンパク産生は維持されていた。病原体に応じた IL-8 産生動態の違いは、各感染症で生じる炎症反応の違いと関連している可能性があり、本研究で明らかにした IL-8 による好中球の機能調節作用が、免疫応答の選択機構の解明の糸口となるであろう。

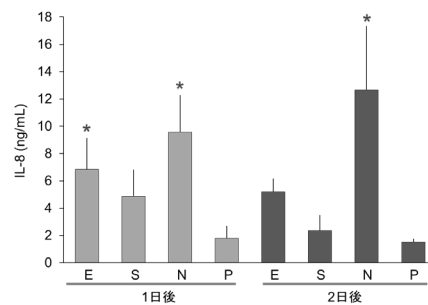


図 4. 各病原細菌感作白血球により産生された IL-8. E: *E. tarda* S: *S. iniae* N: *N. seriolae* P: PBS 日数は感作時間を示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 16 件)

- ① Yamaguchi, T., Katakura, F., Someya, K., Dijkstra, J. M., Moritomo, T. and Nakanishi, T. Clonal growth of carp (*Cyprinus carpio*) T cells in vitro: Long-term proliferation of Th2-like cells. Fish Shellfish Immunol., 査読有, 34, 433-442, 2013, 10.1016/j.fsi.2012.11.005.
- ② Matsuyama, T., Nakayasu, C., Fujiwara, A., Kurita, Takano, T., Ito, T. and Sano, M. Ontogeny of anti-viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) immunity in developing Japanese flounder. Dev. Comp. Immunol., 査読有, 37, 312-322, 2012, 10.1016/j.dci.2012.02.014.
- ③ Matsuyama, T., Fujiwara, A., Takano, T. and Nakayasu, C. Suppression subtractive hybridization coupled with microarray analysis to examine differential expression of genes in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* leucocytes during *Edwardsiella tarda* and viral hemorrhagic septicemia virus infection. Fish Shellfish Immunol., 査読有, 31, 524-532, 2011, 10.1016/j.fsi.2011.06.015.
- ④ Toda, H., Yabu, T., Shiba, H., Moritomo, T. and Nakanishi, T. Evaluating antigen-specific cytotoxicity of CD8+ T cells in fish by Granzyme B-like activity. Vet. Immunol. Immunopathol., 査読有, 141, 168-172, 2011, 10.1016/j.vetimm.2011.02.020.
- ⑤ Toda, H., Araki, K., Moritomo, T. and Nakanishi, T. Perforin-dependent cytotoxic mechanism in killing by CD8 positive T cells in ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. Dev. Comp. Immunol., 査読有, 35, 88-93, 2011, 10.1016/j.dci.2010.08.010.
- ⑥ Takano, T., Matsuyama, T., Sakai, T., Nakayasu, C. Protective efficacy of a formalin-killed vaccine against atypical *Edwardsiella tarda* infection in red sea bream *Pagrus major*. Fish Pathol., 査読有, 46, 120-122, 2011, 10.3147/jsfp.46.120.
- ⑦ Sakai, T., Miyoshi, Y., Matsuyama, T., Nakayasu, C., Kamaishi, T., Fukuda, Y. and Iida, T. Detection of Japanese flounder antibody against fimbrial major protein of *Edwardsiella tarda*. Fish Pathol., 査読有, 46, 23-26, 2011, 10.3147/jsfp.46.23.
- ⑧ Kurata, O., Kitancharoen, N., Fujiwara, A., Nakayasu, C., Wada, S. and Hatai, K. Activity of granulocytes and chemokines in the leukocyte-encapsulation response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol., 査読有, 45, 121-129, 2010, 10.3147/jsfp.45.121.
- ⑨ Kurata, O., Iwasaki, T., Matsuyama, T., Nakayasu, C., Wada, S. and Hatai, K. Lymphocytes with T-cell-like properties express the Fas ligand in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Shellfish Immunol., 査読有, 30, 509-514, 2011, 10.1016/j.fsi.2010.11.030.
- ⑩ Ozaki, T., Hatakeyama, H., Wada, S. and Kurata, O. Long-term culture technology for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* leukocytes. Fish Pathol., 査読有, 46, 11-18, 2011, 10.3147/jsfp.46.11.
- ⑪ Sakai, T., Miyoshi, Y., Matsuyama, T., Nakayasu, C., Kamaishi, T., Fukuda, Y. Iida, T. Detection of Japanese flounder antibody against fimbrial major protein of *Edwardsiella tarda*. Fish Pathol., 査読有, 46, 23-26, 2011, 10.3147/jsfp.46.23.
- ⑫ Matsuyama, T., Nakayasu, C. and Sano, M. Immunocytochemical studies of the ontogeny of peripheral blood leucocyte subpopulations in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Shellfish Immunol., 査読有, 29, 362-365, 2010, 10.1016/j.fsi.2010.03.005.
- ⑬ Takano, T., Matsuyama, T., Oseko, N., Sakai, T., Kamaishi, T., Nakayasu, C., Sano, M., Iida, T. The efficacy of five avirulent *Edwardsiella tarda* strains in a live vaccine against Edwardsiellosis in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish Shellfish Immunol., 査読有, 29, 687-693, 2010, 10.1016/j.fsi.2010.07.012.
- ⑭ Katakura, F., Yamaguchi, T., Yoshida, M., Moritomo, T. and Nakanishi, T. Demonstration of T cell and macrophage progenitors in carp (*Cyprinus carpio*) kidney hematopoietic tissues. Dev. Comp. Immunol., 査読有, 34, 685-689, 2010, 10.1016/j.dci.2010.01.015.
- ⑮ Yamaguchi, T., Katakura, F., Shitanda, S., Niida, Y., Toda, H., Ohtani, M., Yabu, T., Suetake, H., Moritomo, T. and

Nakanishi, T. Clonal growth of carp (*Cyprinus carpio*) T cells in vitro. Dev. Comp. Immunol., 査読有, 35, 193-202, 2010, 10.1016/j.dci.2010.09.007.

- ⑩ Kobayashi, I., Ono, H., Moritomo, T., Kano, K., Nakanishi, T. and Suda, T. Comparative gene expression analysis of zebrafish and mammals identifies common regulators in hematopoietic stem cells. Blood, 査読有, 115, e1-e9, 2010, 10.1182/blood-2009-07-232332.

[学会発表] (計7件)

- ① 倉田 修. ヒラメ IL-8 タンパク検出のための特異抗体の作製, 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2013. 3. 29, 東京海洋大学.
- ② 倉田 修. 好中球の走化性に関するヒラメ IL-8 の N 末領域, 平成 24 年度日本水産学会秋季大会, 2012. 9. 15, 独立行政法人水産大学校.
- ③ Kurata, O. N-terminal region responsible for chemotactic activity of flounder IL-8. The 12th congress of ISDCI, 2012. 7. 10, Hilton Fukuoka Sea Hawk Hotel.
- ④ 倉田 修. ヒラメ CXC ケモカインに対する白血球走化性について. 平成 23 年度日本魚病学会秋季大会, 2011. 10. 2, 長崎大学文教キャンパス.
- ⑤ 倉田 修. 支持細胞上で増殖するヒラメ白血球の起源. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 2011. 10. 1, 長崎大学文教キャンパス.
- ⑥ Takano, T. Immune-related gene expression in leukocyte subpopulations of Japanese flounder. The 15th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 2011. 9. 14, Split, Croatia.
- ⑦ 倉田 修. ヒラメ CXC ケモカインの機能解析. 平成 23 年度日本水産学会春季大会, 2011. 3. 28, 東京海洋大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田 修 (KURATA OSAMU)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授
研究者番号 : 90277666

(2) 研究分担者

森友 忠昭 (MORITOMO TADAAKI)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号 : 20239677

松山 知正 (MATSUYAMA TOMOMASA)

独立行政法人水産総合研究センター・研究員

研究者番号 : 20372021

高野 倫一 (TAKANO TOMOKAZU)

独立行政法人水産総合研究センター・研究員

研究者番号 : 40533998

坂井 貴光 (SAKAI TAKAMITSU)

独立行政法人水産総合研究センター・研究員

研究者番号 : 50416046

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :