

## 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 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：23401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780172

研究課題名（和文） 魚類の粘膜免疫系におけるケモカインの役割

研究課題名（英文） Fish mucosal chemokines

研究代表者

末武 弘章 (SUETAKE HIROAKI)

公立大学法人福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号：00334326

研究成果の概要（和文）：魚類体表は病原体侵入の場であるとともにそれを防ぐ免疫応答の場でもある。魚類体表にはリンパ球などの白血球が存在しており、抗体を産生するなどの役割を担っている。本研究では、これら白血球を引き寄せる役割を果たすと考えられる細胞誘引因子であるケモカインとその受容体遺伝子を同定し、これらが、皮膚や鰓など外界と直接に接する場で特異的に発現することを明らかにした。これらのケモカインによる細胞誘引機構が体表に白血球を動員する役割を担うことが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this project, two fugu mucosal chemokines were identified, One of them was expressed in the skin, gills and thymus of fugu. In the skin, *in situ* hybridization revealed that the fugu epidermal cells expressed this chemokine. This expression pattern was consistent with the localization of the skin leukocytes. A putative receptor for this chemokine was expressed in the same organs. The second mucosal chemokine and its putative receptor were expressed in the skin, gills, thymus, and intestine of fugu. These mucosal chemokines would play pivotal roles in the fish mucosal skin immune system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：魚、免疫、ケモカイン、粘膜

## 1. 研究開始当初の背景

魚類は常に水中の病原体に曝されており、表皮、鰓、腸管などの粘膜組織が病原体の主要な侵入門戸であると考えられている。逆に、魚類の側から見ると粘膜組織こそが免疫応答の最前線と言える。粘膜組織において獲得

免疫が機能していることは、粘膜を介したワクチン(粘膜ワクチン)処理の有効性から疑いないが、粘膜組織の免疫機構がほとんど不明なため、粘膜ワクチンがなぜ、どのように効くのかはわかっていない。粘膜ワクチンは作業の省力化、魚の注射ストレスからの解放な

ど、産業上のメリットが大きいものの、現在のところ注射免疫法より一般的に効果が低いと考えられている。粘膜免疫系の作用機序を理解することこそが、侵入段階での病原体に対する局所での防御能を高める効果的な粘膜ワクチン開発につながるはずである。本研究では、抗原を取り込みリンパ球を活性化する抗原提示細胞や獲得免疫の主役であるリンパ球が病原体侵入の最前線である粘膜組織に動員される機構を明らかにすることにより、魚類粘膜免疫系の解明に迫る。

ワクチンの作用は獲得免疫のシステムに依存している。ほ乳類では、抗原を取り込んだ抗原提示細胞が、獲得免疫を制御する細胞であるヘルパーT細胞を活性化し、その結果として、細胞傷害性T細胞や抗体を産生するB細胞が活性化されると考えられている。一方、魚類の獲得免疫系活性化機構は長いこと完全なブラックボックスであった。これはヘルパーT細胞や抗原提示細胞の存在や機能が不明だったからにほかならない。2000年代に入るとトラフグ全ゲノム解読や各種魚類のEST解析などにより、ゲノム情報を利用した免疫系に関する解析が可能となった。申請者は、科学研究費補助金課題「魚類のリンパ球を識別する」（2004-2005年）で、T細胞を識別するための主要なマーカー分子を同定した。特に、ヘルパーT細胞のマーカーであるCD4は変温動物では初めての報告であった。次いで、これらを利用した細胞の単離法を報告した。さらに、科学研究費補助金課題「トラフグの抗原提示細胞」（2007-2008年）において、抗原提示細胞の存在を魚類で初めて示し、抗原提示細胞によりT細胞、すなわち獲得免疫系が活性化されることを明らかにした。このように、魚類においても抗原提示細胞やB細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞などのリンパ球の同定が可能となり、免疫系の活性化機構は細胞レベルで解明され始めている。この上で、魚類粘膜組織における抗原提示細胞やリンパ球の動態を把握し、どのようにはたらき、どのように制御されるのかを明らかにすることが、魚類の免疫系を理解するために必要である。

抗原提示細胞が効果的に抗原を取り込むためには、病原体の侵入部位すなわち粘膜組織に抗原提示細胞が集まっていることが必要である。また、免疫応答の最前線で抗体を産生するB細胞やウイルスに感染した細胞などを殺す細胞傷害性T細胞などのリンパ球が粘膜組織に集まってくることも重要であると考えられる。実際、粘膜上皮内に多くの白血球が存在することはよく知られている

が、これら細胞の免疫応答における役割はほとんどわかっていない。申請者らはトラフグの皮膚に炎症を起こすと抗原提示細胞様の細胞が出現することを見出している。また、申請者らは魚類の皮膚や腸の粘液中に分泌されている抗体の一つであるIgMが、皮膚や腸管のリンパ球によって産生されていることや粘液中へのIgMの運搬機構を魚類で初めて明らかにした。ニジマスでは細胞傷害性T細胞が腸管に多く存在することが示唆されている。さらに、粘液中ではIgTという最近発見された抗体が重要であることも報告されており、IgT産生細胞の重要性が認識されるようになってきている。粘膜組織にこれら抗原提示細胞やリンパ球が集まる機構を明らかにすることで、効果的に粘膜免疫応答を引き起こすことが可能になるのではないだろうか？

ほ乳類では感染部位や粘膜組織などの末梢組織へ抗原提示細胞やリンパ球を呼び寄せているのは、ケモカインと称される走化性因子である。魚類にも白血球の走化性に相当するシステムが存在することは予想されるが、その詳細は全くわかっていない。本研究課題では既に確立しているトラフグの白血球に関する知見とトラフグゲノム情報を利用し、魚類の獲得免疫応答の活性化過程における白血球の動員システムをケモカインに着目して明らかにすることを目指す。

## 2. 研究の目的

魚類の体表粘膜は環境水と接しており、病原体侵入の門戸であると同時にそれを防ぐ免疫応答の場でもある。また哺乳類とは異なり皮膚が角質化していないため、物理的に脆弱である。このような魚類の皮膚には免疫システムが発達していることが想定される。しかし、粘膜での免疫機構はほとんどわかっておらず、浸漬ワクチンなどの粘膜を介したワクチン投与がなぜ効果があるのかも不明である。本研究では、抗原を取り込む抗原提示細胞や免疫応答の主役であるリンパ球が粘膜組織へ動員される仕組みを、白血球を局所に誘引する分子であるケモカインに着目して明らかにすることにより、粘膜免疫系の理解を深める目的で企画した。

## 3. 研究の方法

「白血球はどのようにして粘膜組織に動員されるのか？」という問いに答えるため、細胞の移動を制御するケモカインとその受容体に着目する。まず、ゲノム情報を利用できるトラフグを材料として、皮膚で発現してい

ることが哺乳類で知られているケモカインとその受容体遺伝子を相同性検索する。さらに、シンテニー解析などを行い、これらの遺伝子を同定する。次に、これらケモカイン遺伝子の発現組織を RT-PCR を行い明らかにする。その際体表特異的な発現が確認された場合、cRNA をプローブとした *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、皮膚における発現細胞を明らかにする。さらに、粘膜組織の白血球が発現するケモカインとケモカイン受容体の組換え体を作製し、その機能解析によって、粘膜ケモカインとの対応関係を明らかにすることを旨とする。

#### 4. 研究成果

##### ケモカインとケモカイン受容体の同定

哺乳類においてケモカインやその受容体がリンパ球や抗原提示細胞の粘膜への移動に関わることが知られている。そこで、トラフグゲノムデータベースを利用した相同性解析により、ケモカイン及びその受容体遺伝子の探索を行った。

哺乳類で皮膚や腸管にリンパ球を動員するケモカインである CCL27 および CCL28 の両方に相同な遺伝子を見いだした。続いてその配列をもとに設計したプライマーを用いて cDNA クローニングを行った。魚類では哺乳類と異なり遺伝子は一つのみであり、シンテニー解析から CCL28 のオースログであることが示唆された。一方、ヒトゲノム上の CCL27 遺伝子存在部位周辺領域に相当するトラフグゲノム領域には CCL27 に対応する遺伝子は見つからなかった。このことから、CCL27 遺伝子は魚類と哺乳類が分化したあとに生じたものである可能性が示された。

ついで、このケモカインの受容体であると考えられる CCR10 の遺伝子をゲノムデータベースから見つけ出し、同様に cDNA クローニングを行った。得られた配列は 7 回膜貫通構造をもつ受容体であり、系統樹解析とシンテニー解析からトラフグ CCR10 であることを確認した。

さらに、哺乳類で体表に抗原提示細胞を動員する CCL20 とその受容体であると考えられる CCR6 の遺伝子をデータベースから探索し、同様に cDNA クローニング、系統樹解析とシンテニー解析により同定した。

##### ケモカインとその受容体遺伝子の発現解析

ケモカインは特定の細胞や組織で特異的に発現し、その受容体を発現する細胞を引き寄せる。トラフグの CCL28 遺伝子の発現組織を RT-PCR で調べたところ、皮膚・胸腺・鰓

でのみ発現が確認できた。このように体表組織で発現が確認されたことから、さらに、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、表皮細胞で強く発現していることが明らかとなった。この発現パターンは体表の白血球の分布パターンと非常によく対応しており、このケモカインが魚類体表の白血球の動員に関わることが強く示唆された。また、この発現パターンは哺乳類の CCL28 よりむしろ CCL27 と似たパターンであり、先の遺伝子解析実験の結果と考え合わせるとこのトラフグのケモカインは CCL27 と CCL28 の両方の性質を備えた哺乳類の CCL27 と CCL28 の先祖型に近い遺伝子であると言えそうである。

ケモカイン受容体 CCR10 遺伝子の発現パターンを様々な組織で調べたところ、リガンドであると想定される CCL28 遺伝子と同じく、皮膚、腸、鰓で発現が確認できた。哺乳類の CCL27 や CCL28 と同様にこの受容体がトラフグ CCL28 の受容体である可能性が高まった。さらに、魚類の二次リンパ器官である脾臓においても発現が確認された。

もう一つの体表ケモカインである CCL20 は CCL28 遺伝子と同様に皮膚・胸腺・鰓で発現が確認された。さらに、腸管での発現も確認され、広く粘膜組織に発現するケモカインであることが明らかになった。さらに、その受容体であると想定される CCR6 は CCL20 と同様の発現パターンを示した。このことから、CCL20 と CCR6 がこれら粘膜組織で働くケモカインシステムであることが推測された。

##### 組換えケモカインとケモカイン受容体の作製

マウスのリンパ球細胞株にトラフグ CCR10 遺伝子を導入し、細胞表面に発現することを確認した。このことは、魚類 CCR10 が細胞表面で作用することを示唆するものである。

ケモカイン CCL28 の組み換え体は大腸菌で作製し、脾臓、皮膚白血球との結合をフローサイトメーターで調べたが、結合は確認できなかった。このことから、今回得られた組換え CCL28 は生理的な活性を持たないものと判断した。今後は活性をもつ組み換え体の作製を目指す。

これらのケモカインやその受容体は魚類で初めて見つかった体表特異的に発現するケモカインである。ケモカインの進化を考える上で興味深い結果が得られただけでなく、これらの発見により、病原体の侵入をサーベイし、粘膜免疫系を活性化する免疫細胞を積極的に粘膜組織に動員する機構の一端が明らかになった。これらの知見は、粘膜組

織へ免疫細胞を誘引することによる効果的な粘膜ワクチン処理やワクチン投与効果の評価に有用であろう。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 田内博久、末武弘章、菊池潔、鈴木讓、宮台俊明、トラフグケモカイン受容体、CCR7、CCR10、平成 23 年度日本水産学会秋季大会、長崎大学文教キャンパス、長崎県、2011 年 10 月 1 日
- ② 田内博久、末武弘章、菊池潔、宮台俊明、鈴木讓、トラフグ皮膚に発現するケモカイン-III-、平成 23 年度日本水産学会春季大会、東京海洋大学品川キャンパス、東京都、2011 年 3 月 28 日
- ③ 末武弘章、鈴木讓、魚類 (トラフグ) の生体防御機構に関する研究、日本比較免疫学会第 22 回学術集会、九州大学西新プラザ大会議室、福岡県、2010 年 8 月 3 日
- ④ 田内博久、末武弘章、菊池潔、鈴木讓、宮台俊明、皮膚に発現する二つのトラフグケモカイン、日本比較免疫学会第 22 回学術集会、九州大学西新プラザ大会議室、福岡県、2010 年 8 月 3 日
- ⑤ 宮台俊明、末武弘章、鈴木讓、粘膜免疫研究のモデルとしての魚類、北陸腸内細菌研究会、ホテル金沢、石川県、2010 年 7 月 10 日
- ⑥ Hiroaki Suetake、Fugu genome unveils fish adaptive immune system International Symposium Aquatic animal defense mechanisms against invading pathogens、Jeju National University International Center (Jeju、韓国)、2010 年 6 月 25 日
- ⑦ Hiroaki Suetake、Fugu genome unveils fish adaptive immune system International Symposium Aquatic animal defense mechanisms against

invading pathogens、Gyeongsang National University (Jinju、韓国)、2010 年 6 月 23 日

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

末武 弘章 (SUETAKE HIROAKI)

公立大学法人福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号：00334326

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：