

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 9 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580257

研究課題名(和文) サイトカイン遺伝子を用いた魚類の自然免疫応答の測定

研究課題名(英文) The determination of innate immune responses using cytokine genes in fish

研究代表者

酒井 正博(sakai, masahiro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：20178536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：サイトカインは、免疫系の数々の調節に関与する低分子のタンパク質で魚類でも数多くが同定されている。このサイトカインの発現の動態を調べることによって自然免疫応答を解析することが可能であるかについて検討した。19種類のフグのサイトカイン遺伝子の網羅的な定量発現解析が出来るMultiplex RT-PCRシステムを構築し、それを用いてプロバイオティクス効果を示す*Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* の有効性について検討した。その結果、本菌はフグの炎症性サイトカインを誘発することにより、病原体に対する抵抗性を増加させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To monitor the expression of cytokine genes in Japanese pufferfish, a novel platform for quantitative multiplexed analysis was developed. This custom-designed multiplex RT-PCR assay was used to analyze the expression profiles of 19 cytokine genes, including pro-inflammatory, anti-inflammatory, T-cell proliferation/differentiation, B-cell activation/differentiation, NK cell stimulation, induction of anti-viral activity, and monocyte/macrophage progenitor cell proliferation cytokines in head kidney cells under immune stimulatory conditions. The expression profiles were dissimilar in the unstimulated control and immune-stimulated cells. Moreover, increased expression profile was observed due to different stimulations for IL-1b, IL-6, IL-10, IL-12p35, IL-12p40, IL-21, TNF-a, TNF-N, I-IFN-1 and IFN-g genes. These results suggest that cytokine genes could be used as biomarkers to know the innate immune status of fish.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産一般

キーワード：サイトカイン フグ 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

サイトカインは、免疫系の数々の調節に関与する低分子のタンパク質で、現在までにヒトでは100種以上が知られている。このサイトカインは、免疫応答(特に、自然免疫)に重要な役割を示すことが知られている。特に感染防御に重要なサイトカインとして、炎症時に重要なインターロイキン1 (IL-1) や腫瘍壊死因子 (TNF)、ウイルス感染において重要な役割を示すタイプ1インターフェロン (type1IFN)、細胞内寄生病原体に有効とされているインターフェロン (IFN) やナチュラルキラー細胞の活性化の重要なインターロイキン12 (IL-12) が知られている。これまで私は、魚類のサイトカインの存在を確認するために、これらの遺伝子のクローニングを行ってきた。その結果、魚類でも、ヒトとほぼ同様なサイトカインの存在が明らかになってきている。

2. 研究の目的

このサイトカインの応答を調べることによって、自然免疫応答のみならず有害物質の影響を調べることが可能である。本研究の目的は、このサイトカインの発現を、網羅的に、しかも簡単に定量できるシステムを開発し、それを用いて、免疫賦活物質の有効性を検討する事である。

3. 研究の方法

マルチプレックス RT-PCR システムによるフグサイトカイン遺伝子発現解析システムの構築

- 1) フグの遺伝子データベースより、19種類 (インターロイキン (IL) 1、IL-2、IL-4/13A、IL-4/13B、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12p35、IL-12p40、IL-17/F3、IL-18、IL-21、腫瘍壊死因子 (TNF)-、TNF-N、インターフェロン (IFN) タイプ1、IFN-1、IFN-2、コロニー刺激因子 (M-CSF-1)、TGF-1) のサイトカイン遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定した。
- 2) 決定したサイトカイン遺伝子配列を基に、GenomeLab™ GeXP (ベックマン・コールター株式会社) を用いて、各遺伝子のキメラプライマーを設計した。
- 3) 19種類の遺伝子の増幅を一つのチューブで行い、その発現と定量を、キャピラリーシークエンサーで行った。

で開発されたマルチプレックス PT-PCR システムを用いて LPS、PolyI:C およびイムキモットで処理を行ったフグ頭腎細胞でのサイトカイン遺伝子の発現解析

- 1) フグから頭腎細胞を分離し、それを細胞培養液で1日間培養後、LPS、PolyI:C もしくはイムキモットを加えて培養した。
- 2) その後、1、4、8、12、24、4

8時間後に、それぞれの細胞から RNA を分離し、mRNA を抽出した。

- 3) このmRNA を用いて、マルチプレックス PCR を行い、19種類のサイトカイン遺伝子の定量発現を行った。

マルチプレックス PT-PCR システムを用いてプロバイオティクスの有効性の検討

- 1) ほ乳類においてプロバイオティクス効果を示す *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* (06TCa22) 株 と *L. plantarum* (06CC2) 株を用いた。
- 2) フグから頭腎細胞を分離し、それを細胞培養液で1日間培養後、これらの菌を加えて培養した。
- 3) その後、1、4、8、12、24、48時間後に、それぞれの細胞から RNA を分離し、mRNA を抽出した。
- 4) このmRNA を用いて、マルチプレックス PCR を行い、19種類のサイトカイン遺伝子の定量発現を行った。

*L. paracasei* spp. *paracasei* (06TCa22) 株を経口投与されたフグの免疫賦活効果

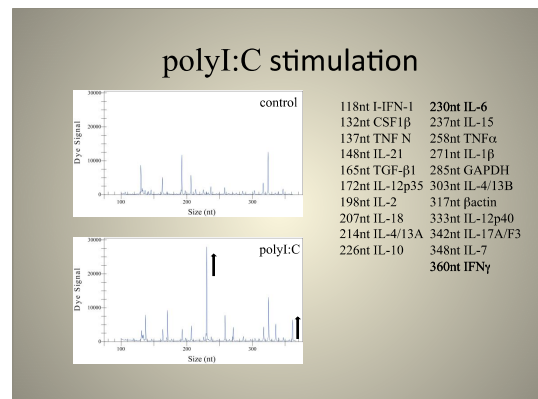
- 1) *L. paracasei* spp. *paracasei* (06TCa22) 株を、平均体重50グラムのフグに3日間経口投与を行い、その後、1、4、8、12、24、72、120時間後に頭腎細胞を分離した。
- 2) それぞれの頭腎細胞からmRNA を抽出し、マルチプレックス PCR を行い、19種類のサイトカイン遺伝子の定量発現を行った。
- 3) それぞれの頭腎細胞を用いて、貪食能とNBT還元能の検討を行った。

4. 研究成果

マルチプレックス RT-PCR システムによるフグサイトカイン遺伝子発現解析システムの構築

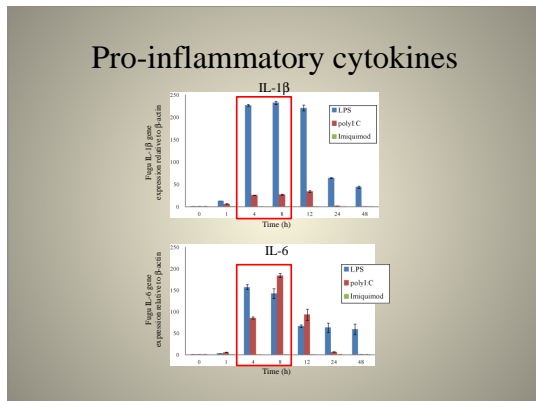
今回の研究で、フグ19種類のサイトカイン遺伝子の発現と定量を同時に調べることが可能となった (図1はキャピラリーシークエンサーによる各サイトカイン遺伝子の PCR 産物の泳動結果)。

図 1



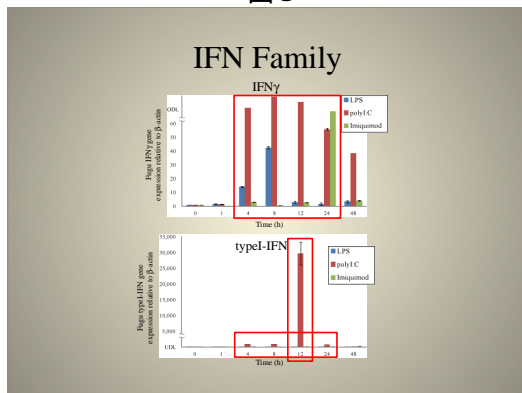
本法を用いて LPS、PolyI:C およびイムキモット刺激によるサイトカイン遺伝子の発現解析を行った。LPS で頭腎細胞を刺激した場合、PolyI:C やイムキモットに比べて、IL-1 の発現量の顕著な増加が確認された (図 2)

図 2



一方、PolyI:C で処理された頭腎細胞では、インターフェロンの増加が確認された (図 3)

図 3



イムキモットで処理したフグの頭腎細胞では、LPS や PolyI:C と比較して、IL-4/13B と IL-12p35 の顕著な発現の上昇が観察された (図 4, 5)

図 4

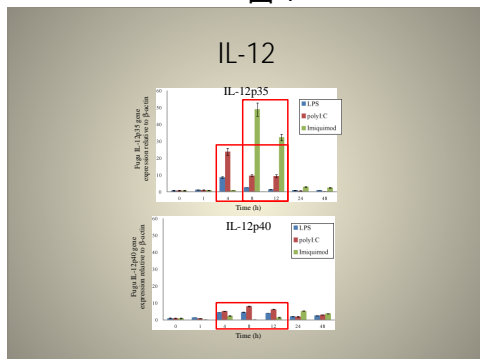
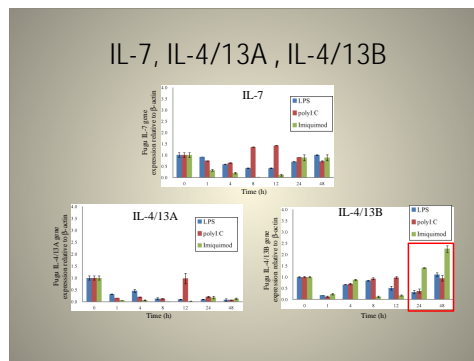


図 5



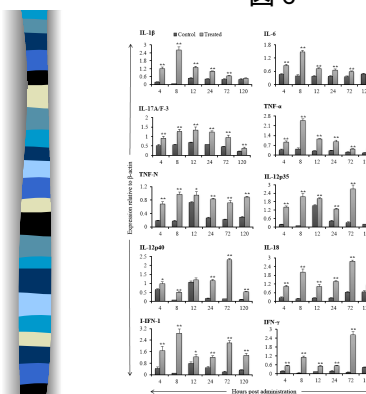
*L. paracasei* spp. *paracasei* (06Tca22) 株もしくは *L. plantarum* (06CC2) 株で処理したフグ頭腎細胞のサイトカイン応答

*L. paracasei* spp. *paracasei* (06Tca22) で処理させたフグの頭腎細胞は、処理後 1 から 12 時間目に炎症性サイトカインである IL-1、IL-6、IL-17A、TNF- $\alpha$ 、TNF-N の遺伝子と、IFN- $\gamma$  の発現の増加が確認された。一方、*L. plantarum* (06CC2) 株で処理したフグ頭腎細胞においても、同様に IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  遺伝子の発現の増加が確認されたが、IL-17A の発現はまったく確認出来なかった。抗ウイルス作用を示す IL-12 と IL-18 は、処理後 1-48 時間と長期にわたって発現の上昇が確認された。

*L. paracasei* spp. *paracasei* (06Tca22) 株を経口投与されたフグの免疫賦活効果

*L. paracasei* spp. *paracasei* (06Tca22) 株を投与されたフグでは、IL-1、IL-6 等の前炎症性サイトカインの上昇が確認された。さらに、タイプ 1 IFN や IFN- $\gamma$  の増加の顕著であった (図 6)

図 6



*L. paracasei* spp. *paracasei* (06Tca22) 株を投与されたフグの頭腎細胞の貪食能 (図 7) と NBT 還元反応 (図 8) も、有意な上昇を示した。従って、本菌は、自然免疫機能を増加させることが明らかとなった。

図 7

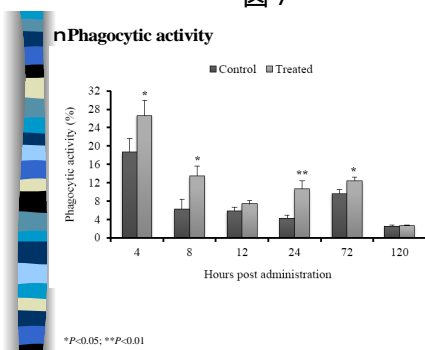
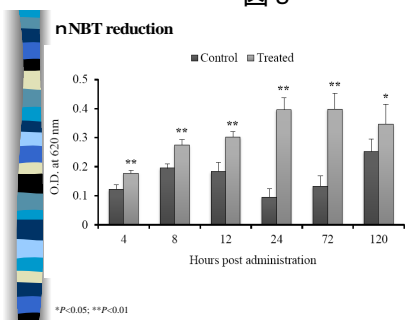


図 8



このように、本研究で作製したフグサイトカイン測定用のマルチプレックス RT-PCR システムは、自然免疫応答を一挙に測定することが可能である。本システムを用いることによって、新しい免疫賦活剤やプロバイオティクスの開発が容易になると考えられる。今後、このシステムを用いて、様々な生理機能の解明が期待される。

##### 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4件)

Kono, T., Takayama, H., Nagamine, R., Korenaga, H., Sakai, M. Establishment of a multiplex RT-PCR assay for the rapid detection of fish cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 151, 90-101 (2013) 査読有り。

Biswas, G., Korenaga, H., Nagamine, R., Takayama, H., Kawahara, S., Takeda, S., Kikuchi, Y., Dashnyam, B., Kono, T., Sakai, M. Cytokine responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) head kidney cells induced with heat-killed probiotics isolated from the Mongolian dairy products. *Fish and Shellfish Immunology*, 34, 1170-1177 (2013) 査読有り。

Biswas, G., Korenaga, H., Nagamine, R., Kawahara, S., Takeda, S., Kikuchi, Y., Dashnyam, B., Yoshida, T., Kono, T., Sakai, M. Cytokine mediated immune responses in the Japanese pufferfish

(*Takifugu rubripes*) administered with heat-killed *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* (06TCa22) isolated from the Mongolian dairy product. *International Immunopharmacology*, 17, 358-365 (2013) 査読有り。

Biswas, G., Korenaga, H., Nagamine, R., Kawahara, S., Takeda, S., Kikuchi, Y., Dashnyam, B., Yoshida, T., Kono, T., Sakai, M. Elevated cytokine responses to *Vibrio harveyi* infection in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) treated with *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* (06TCa22) isolated from the Mongolian dairy product. *Fish and Shellfish Immunology*, 35, 756-765 (2013) 査読有り。

[学会発表](計4件)

Takayama, H., Kuze, H., Korenaga, H., Sakai, M., Kono, T. The expression analysis of fugu cytokine genes by multiplex RT-PCR assay. The 15<sup>th</sup> EAFP(2011年9月12日、スプリット、クロアチア)

Kono, T., Takayama, H., Nagamine, R., Korenaga, H., Sakai, M. A multiplex RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of cytokines in fish. 10<sup>th</sup> Joint Annual Meeting of International Cytokine Society and International Society for Interferon and Cytokine Research(2012年9月11日、ジュネーブ、スイス)

Korenaga, H., Hamasuna, S., Ida, T., Sakai, M., Nagamine, R., Kono, T. A breakthrough in identifying neuropeptide using "reverse pharmacology" from fish. 1<sup>st</sup> International Conference of Fish and Shellfish Immunology(2013年6月25日、ビーゴ、スペイン)

加藤翔太、是永大樹、引間順一、河野智哉、酒井正博 ホタテ貝およびアワビの煮術で処理したトラフグ頭腎細胞におけるサイトカイン遺伝子の発現 平成25年度日本水産学会秋季大会(平成25年9月19日、津)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~abs/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 酒井 正博  
宮崎大学・農学部(教授)

研究者番号: 20178536

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：