

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580284

研究課題名(和文) 魚類ヘルパーT細胞亜集団の同定

研究課題名(英文) Characterization of teleost helper T cell subsets

研究代表者

森友 忠昭 (MORITOMO, Tadaaki)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20239677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：魚類のヘルパーT細胞(Th細胞)の亜集団の同定を目的として、クローン化コイト細胞株の樹立を試みた。すなわち、コイの主要な造血・リンパ臓器である腎臓より白血球を分離し、支持細胞(線維芽細胞)上に播種し、選択的に増殖したTh細胞をクローン培養した。現在までに、十数個のクローン化T細胞株が得られているが、これらのサイトカイン産生能を調べたところ、IL-4/13A・IL-4/13Bを強く発現するTh2様クローンとIFN γ を強く発現するTh1様クローンを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：To identify teleost helper T cell (Th cell), we tried to establish clonal T cell lines from carp (*Cyprinus carpio*). Kidney leukocytes were obtained from kidney, and cultured with feeder cells (fibroblasts cell layer). In this culture condition, carp Th cells selectively proliferated, and single Th cells were picked and seeded into a well of 96 well plates. Until now, 10 Th clones have been obtained. We found some cell lines predominantly produced Th1 cytokine (IFN γ), and other cell lines predominantly produced Th2 cytokines (IL-4/13A and B).

研究分野：魚病

キーワード：魚類 ヘルパーT細胞 クローン化T細胞株

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の Th 細胞は、I 型ヘルパー T 細胞 (Th1), II 型ヘルパー T 細胞 (Th2), Th17 細胞 (Th17), 制御性 T 細胞 (Treg) など主に 4 つの亜集団に分けられる。これら Th1・Th2・Th17・Treg は、それぞれ“細胞性免疫”・“液性免疫”・“炎症”・“免疫寛容”を誘導するサイトカインを分泌し、キラー T 細胞・マクロファージ, B 細胞, 好中球などを制御することで、免疫反応を調整する。

Th 亜集団の発見は、1986 年の Mosmann らの報告までさかのぼる。当時から、マウスやヒトでは多くのクローン化 T 細胞株が樹立されていたが、Mosmann らはこれらの中にサイトカイン産生パターンが異なる 2 つの亜集団が存在することを見出し、Th1・Th2 細胞と命名した。その後、Treg・Th17 なども発見され、現在、医学分野では、これら亜集団をターゲットとした、病態解明、創薬、治療法・ワクチン開発などの研究が活発に行われている。

魚類でも、近年のゲノム解析から、Th 関連遺伝子が次々に同定され、Th 亜集団の存在が示唆されている。しかし魚類では、先駆的なアメリカナマズの研究を除いて、T 細胞の培養技術は確立されておらず、そのため T 細胞株もほとんどない。魚類 Th 亜集団の同定には、哺乳類で行なわれたように、1 個の Th 細胞を増幅し作られるクローン化 Th 細胞株の樹立と、これら均一な細胞集団を用いて、Th 亜集団の性状解析を行う必要がある。

2. 研究の目的

ヘルパー T 細胞 (Th 細胞) は獲得免疫の司令塔と呼ばれる細胞群である。哺乳類では、主に 4 つの亜集団に分類され、それぞれ異なったサイトカインを分泌することで、免疫系を制御する。

魚類でも近年、Th 亜集団に関する多くの研究がなされ、それらの存在は示唆されてきているが、未だに同定には至っていない。そこで本研究では、申請者が独自に開発したコイ Th 細胞の培養法を用いて、1 個の Th 細胞を増幅し、クローン化 Th 細胞株を樹立する。そして、これら均一な細胞集団を用いて、魚類 Th 亜集団の同定・性状解析などを行う。

3. 研究の方法

コイの腎臓・脾臓・胸腺および血液から白血球を分離し、胸腺由来細胞株などの支持細胞上で培養すると、ヘルパー T 細胞の活発なポリクローナルな増殖が観察される。そこで、ポリクローナル培養で増幅した Th 細胞を 1 個ずつマイクロピペットで分取し、あらかじめ支持細胞層を形成させた 96 穴プレートの各穴に、播種する。そして、ポリクローナル培養から得た“ならし培地”や組換えコイ IL-2 を増殖因子として加え、各組織からの、クローン化 Th 細胞株を樹立した。

4. 研究成果

腎臓白血球の培養から出発した、5 つのクローンにおいて安定的な継代培養が可能となった。これらクローン (Clone 1~5) の性状を解析したところ、TCR- α , TCR- β , CD4-1 及び CD4-2 の遺伝子の発現は見られたが、CD8 α 及び CD8 β の発現は見られなかった。次に、Clone 1~5 を PHA で刺激し、Th1 関連サイトカイン遺伝子である IFN- γ と Th2 関連サイトカイン遺伝子と考えられる IL-4/13A および IL-4/13B の発現の変化を調べた。その結果、Clone 1 では IL4/13A および IL-4/13B, Clone 2 および Clone 3 では IFN- γ , さらに、Clone 5 では IFN- γ rel の発現増強が認められた。Clone 4 ではどのサイトカイン遺伝子においても、他のクローンと比較して、発現の増強が見られなかった。以上のことから、Clone 1 は Th2 様のクローン、Clone 2 および Clone 3 は Th1 様のクローンであると考えられた。

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 7 件)

1. Shibasaki, Y., Matsuura, Y., Toda, H., Imabayashi, N., Nishino, T., Uzumaki, K., Hatanaka, C., Yabu, T., Moritomo, T., and Nakanishi, T. (2015). Kinetics of lymphocyte subpopulations in allogeneic grafted scales of ginbuna crucian carp. *Developmental & Comparative Immunology*. 52, 75-80. 査読有
2. Yamasaki, M., Araki, K., Maruyoshi, K., Matsumoto, M., Nakayasu, C., Moritomo, T., Nakanishi, T., and Yamamoto, A. (2015). Comparative analysis of adaptive immune response after vaccine trials using live attenuated and formalin-killed cells of *Edwardsiella tarda* in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*). *Fish & shellfish immunology*. 45, 437-442. 査読有
3. Takizawa, F., Araki, K., Ohtani, M., Toda, H., Saito, Y., Lampe, V.S., Dijkstra, J.M., Ototake, M.,

- Moritomo, T., and Nakanishi, T. (2014). Transcription analysis of two Eomesodermin genes in lymphocyte subsets of two teleost species. *Fish & shellfish immunology* 36, 215-222. 査読有
4. Matsuura, Y., Yabu, T., Shiba, H., Moritomo, T., and Nakanishi, T. (2014). Identification of a novel fish granzyme involved in cell-mediated immunity. *Developmental & Comparative Immunology* 46, 499-507. 査読有
 5. Araki, K., Takizawa, F., Yamasaki, M., Esumi, M., Moritomo, T., Ototake, M., Yamamoto, A., and Nakanishi, T. (2013). Expression profiles of interferon gamma genes in response to immunostimulants and alloantigen in ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. *Fisheries science* 79, 213-220. 査読有
 6. Yamaguchi, T., Katakura, F., Someya, K., Dijkstra, J.M., Moritomo, T., and Nakanishi, T. (2013). Clonal growth of carp (*Cyprinus carpio*) T cells in vitro: Long-term proliferation of Th2-like cells. *Fish & shellfish immunology* 34, 433-442. 査読有
 7. Nakano, R., Edamura, K., Sugiya, H., Narita, T., Okabayashi, K., Moritomo, T., Teshima, K., Asano, K., and Nakayama, T. (2013). Evaluation of mRNA expression levels and electrophysiological function of neuron-like cells derived from canine bone marrow stromal cells. *American journal of veterinary research* 74, 1311-1320. 査読有
- 〔学会発表〕(計8件)
1. 森友忠昭・魚類の造血機構に関する研究, 平成26年度日本魚病学会春季大会(函館国際ホテル), 2014/03/31
 2. 銘苅 裕二・石原 裕美・染谷 和江・山口卓哉・藪 健史・森友 忠昭・中西 照幸, コイインターロイキン2のT細胞増殖効果, 平成26年度日本魚病学会春季大会(函館国際ホテル), 2014/03/31
 3. 岡本修太・柴崎康宏・松浦雄太・藪健史・森友忠昭・中西照幸, GVHD誘導に伴うドナーTリンパ球における免疫関連遺伝子の発現解析, 日本比較免疫学会 第25回学術集会(岡山理科大), 2013/08/26
 4. 銘苅 裕二・石原 裕美・染谷 和江・山口卓哉・藪 健史・森友 忠昭・中西 照幸, コイ IL-2 関連サイトカインの遺伝子クローニングとT細胞培養系における発現解析, 日本比較免疫学会 第25回学術集会(岡山理科大)・2013/08/26
 5. 宮前 二郎・四反田 聡・山口卓哉・森友 忠昭・中西 照幸, コイの各臓器における T細胞の多様性について, 日本比較免疫学会 第25回学術集会(岡山理科大), 2013/08/26
 6. 染谷 和江・山口 卓哉・藪 健史・森友 忠昭・中西 照幸, コイのヘルパーT細胞亜集団, 平成24年度日本水産学会秋季大会(下関水産大学校), 2012/09/14
 7. T. Yamaguchi, F. Katakura, J.M. Dijkstra, T. Moritomo, and T. Nakanishi, Clonal culture of carp Th2-like cells whose immune status is hallmarked by IL-4/13B gene expression, 12th International society of developmental and comparative immunology (ヒルトン

福岡シーホーク), 2012/07/13

8. Y. Sugie, F. Katakura, T. Yamaguchi1, T. Kato, T. Yabu, T. Moritomo and T. Nakanishi , Carp thrombopoietin in combination with kit ligand a induces the formation of colonies derived from unipotent progenitors for thrombocytes and bipotent progenitors for thrombocytes and erythrocytes ,12th International society of developmental and comparative immunology (ヒルトン福岡シーホーク), 2012/07/13

〔図書〕(計1件)

1. 児玉洋・川本恵子・森友忠昭・和田新平, 魚病学, 分担 pp 28-42, pp48-51, 緑書房, 2012年

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~vetfish/start.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

森友 忠昭 (MORITOMO Tadaaki)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 20239677

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号: