

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32669

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658176

研究課題名(和文) 感染防御を司る魚類の造血機能

研究課題名(英文) Fish hematogenesis function associated with defense system to pathogens

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

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)：ヒラメ造血前駆細胞株を利用した魚類造血機能の解析を目指した。同一系統ヒラメおよびヒラメ孵化仔魚への本細胞株の移植を行い、移植細胞が造血組織である腎臓に生着することを確認した。造血細胞の分化評価をするために、細胞表面マーカーを識別するモノクローナル抗体を作製した。複数のマーカーを組み合わせることで、未分化細胞と分化細胞の識別が行えるようになった。移植細胞の分化動態を追跡するために、蛍光発現細胞株の樹立を試みた。良好な蛍光発現を示す発現ベクターと遺伝子導入法は決定できたが、樹立には至らなかった。病原体を投与した個体の造血組織では、感作後2日～3日で細胞分裂のタイミングがあることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We aimed to analyze fish hematogenesis function by utilizing a hematopoietic precursor cell line established from Japanese flounder. We were successful in transplantation of the hematopoietic precursor cells (HPC) into fish with the same genetic lineage and larvae of flounder. Transplanted cells were detected in a hematopoietic organ (kidney) of recipient fish. Some monoclonal antibodies to cell surface molecules were established for estimation of differentiation in Japanese flounder hematopoietic cells. It was possible to recognize immature or mature cells using combinations of the antibodies. We tried to establish GFP-expressing HPC in order to track transplanted cells. Unfortunately, we could not achieve it but suitable expression vector and gene transfection method was found. As a new knowledge, cell division in the hematopoietic organ was induced 2 to 3 days after administration of pathogens.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：造血細胞 移植 細胞分化 細胞表面マーカー 遺伝子導入 魚類 ヒラメ

1. 研究開始当初の背景

感染防御を担う免疫細胞を作り出し、それらを適切かつ安定的に供給しているのは造血機能である。これまでの魚類造血研究は、主に実験モデル魚種を用いて進められており、胚発生の時期に見られる造血器官の形成やそれに伴う血球分化という恒常的な造血機能に着目したものであった。一方、病原体の感染時には、その感染状況に応じて必要とされる免疫細胞を供給する、特異的かつ積極的な造血機能が要求される。しかしながら、そこに着目した研究報告はこれまでなかった。前線で働く免疫細胞を供給するという点から考えると、造血機能は防御体制を構築する根幹とも言える。ワクチンは防御体制の構築を人為的に誘導する手法であるが、特定の病原体に対して防御効果を誘導できない事例がある。もし、適切な防御体制が構築されていないとするならば、造血機能の働きに注目すべきである。すなわち、感染防御を直接支える積極的な造血機能の特性に関する研究が必要とされている。

2. 研究の目的

研究代表者は、ヒラメの造血組織から未分化の特徴を示す造血前駆細胞株 (YS-1 HPC) を樹立した。本細胞の生体内移植技術および追跡解析技術を開発できれば、感染時に見られる造血機能の特性を評価することが可能となると考えた。本研究では、生体内移植技術として、(1) 雌性発生系統ヒラメ (YS-1) および同系統から樹立した YS-1 HPC の同一系統間移植技術、(2) 孵化仔魚への顕微移植技術について検討した。追跡解析技術として、(3) 細胞分化評価のための表面マーカーの開発、(4) 蛍光発現 YS-1 HPC の作出、(5) 病原体感作法について検討した。

3. 研究の方法

(1) 同一系統間の細胞移植評価

本研究では、雌性発生により系統化したヒラメ (YS-1) 家系および本家系のヒラメ腎臓 (造血組織) から樹立した造血前駆細胞 (YS-1 HPC) を使用し、移植細胞に対する宿主の拒絶反応が起こらないようにデザインした。細胞標識蛍光試薬 (CFSE) で標識した YS-1 HPC を、YS-1 家系ヒラメの尾部血管内に移植した。移植後 1 週間および 2 週間目に移植魚から腎臓を摘出し、腎臓内における蛍光標識細胞の有無について FACS による解析を行った。

(2) 孵化仔魚への顕微移植評価

YS-1 ヒラメ家系の一部の親魚が事故により死亡したこと、また、新たな親魚により作出した仔魚の多くが奇形を持ち正常に発生しないことが問題となった。そのため、YS-1 家系を活用した移植試験に代わる解析法について検討する必要性が生じた。近年、生殖細胞を異個体または異種の孵化仔魚に移植し、移植細胞由来の卵や精子を発生させる技術が一部の魚類において

成功している。孵化仔魚では免疫が成立していなく、移植細胞を拒絶しないことが本手法のカギとなっていることから、この技術を実験課題にも利用できると考えた。YS-1 HPC を細胞標識蛍光試薬 (PKH26) で標識後、各発達ステージのヒラメ孵化仔魚の腎臓内に顕微移植した。移植後、仔魚を飼育し、移植細胞の動態を観察した。

(3) 細胞分化評価のための表面マーカーの開発

造血細胞の分化状態を評価するために、各種造血系細胞の表面分子に対するマウスモノクローナル抗体を作製した。抗原には、胸腺細胞または組換えヒラメ IL-8 により走化誘導させた好中球を用い、BALB/c マウスフットパッドに接種した。免疫マウスの膝下リンパ節から得た細胞のハイブリドーマを作製し、培養上清中に分泌された抗体のヒラメ白血球に対する反応性を調べ、有用ハイブリドーマをスクリーニングした。選択されたハイブリドーマを大量培養し、培養上清を回収した。

(4) 恒常的に GFP を発現する YS-1 HPC の作出

移植細胞の追跡を可能にするために、緑色蛍光タンパク (GFP) を恒常的に発現する YS-1 HPC が必要である。本研究では、

YS-1 HPC において高い遺伝子発現を誘導するプロモーターについて、YS-1 HPC への遺伝子導入法について、検討した。解析対象としたプロモーターは、YS-1 HPC で高発現している 4 種類の遺伝子 (CCL4, TLR2, PU-1, EF1) プロモーターおよび 2 種類の汎用プロモーター (CMV, CAG) とした。CCL4, TLR2, PU-1 および EF1 のプロモーター領域は、Vectorette PCR 法によりクローニングした。各プロモーター領域 - eGFP - 各 3'UTR を連結させ、プラスミド (pCR) に組み込み、発現ベクターを構築した。CMV プロモーターについては、pcDNA4 (CMV 制御発現ベクター) に eGFP を組み込ませた発現ベクターを構築し、CAG プロモーターについては、pCAG-GFP を addgene より購入した。YS-1 HPC への遺伝子導入法について、市販の遺伝子導入試薬数種類およびエレクトロポレーション法 2 装置を比較した。導入試薬については、添付のマニュアルに従い、エレクトロポレーションについては、複数の条件を設定し、実施した。

(5) 病原体の感作が誘導する造血組織 (腎臓) における細胞増殖

病原体の感作による造血組織での細胞増殖について検討した。ホルマリン不活化 *Edwardsiella tarda* (0.5mg 湿重量) を約 8g のヒラメ腹腔内に接種し、その 2 日後 (1 回目) および 3 日後 (2 回目) にチミジンアナログである BrdU (0.5mg) を同一ヒラメ腹腔内に投与した。BrdU 2 回目投与翌日に、腎臓中の白血球を回収した。細胞分裂により

ゲノム内に BrdU を取り込んだ白血球は、抗 BrdU 抗体による免疫染色および FACS により検出した。

4. 研究成果

(1) 同一系統間の細胞移植評価

移植 1 週間目および 2 週間目ともに、移植魚の腎臓中に移植細胞が存在した。このことから、本家系間の移植では拒絶反応が起こらないことを確認した。また、予備試験ではあるが、移植細胞が移植 2 ヶ月後にも腎臓中で確認されたことから、長期にわたり移植細胞が造血組織内で維持されることを明らかにした。

(2) 孵化仔魚への顕微移植評価

発達ステージ G~H の変態後期に、腎臓内への顕微注入が安定して可能であることを確認した。本手法により移植された細胞は、移植 1 週間後も腎臓内に認められ、拒絶反応が生じていないことを示した。このことから、本手法は、YS-1 家系を活用した解析に代わる、今後のヒラメ造血細胞分化の解析に有用であることが確認できた。

(3) 細胞分化評価のための表面マーカーの開発

分化した白血球を評価する 5 種類の抗体を選抜した(表)。先に樹立した YS-1 HPC 表面分子(未分化造血細胞マーカーと推定)に対する抗体(#4-3)と合わせて使用することで、移植細胞の分化状態を評価できるようになった。

表. 各モノクローナル抗体の各種白血球に対する反応性

形態別分類	貯蔵臓器	モノクローナル抗体						
		#5-1	#19-1	#26-6	#40-3	#202-2	#4-3	JFW20*
リンパ球	PBL	+	++	+	+	++	-	+
	胸腺	++			+		-	
好中球	腎臓	+	+	-	+	-	-	-
	PBL	-	++	++	++	+	+	-
単球・マクロファージ	腎臓	-	++	++	++	-	-	-
	PBL	-	++	++	++	+	+	++
YS-1 HPC	腎臓	-	+	+	+	-	-	-
	YS-1 HPC	+	++	++	++	-	++	-

*抗ヒラメ IgM 抗体 (Matsuyama et al., 2009)

(4) 恒常的に GFP を発現する YS-1 HPC の作出

各遺伝子(CCL4, TLR2, PU-1, EF1)の上流領域(2kb~5kb)をクローニングし、発現ベクターを構築したが、EF1 プロモーター以外、明瞭な蛍光発現は認められなかった。EF1 プロモーターは汎用 CMV プロモーターとは同等の活性を示したが、汎用 CAG プロモーターには及ばなかった。よって、YS-1 HPC における GFP 発現に適したプロモーターは CAG であることが結論された。遺伝子導入法について検討した結果、試薬では X-treme GENE HP(ロッシユ)が、エレクトロポレーションでは NEPA21(ネッパジーン)が比較的優れていた。しかしながら、YS-1 HPC への遺伝子導入は他の魚類株化細胞(繊維芽細胞および上皮細胞)に比べ極めて困難であり、導入効率は 1%に満たなかった。導入できた

細胞は少数であるが、CAG プロモーターが高発現を示すことから、蛍光発現細胞の検出は容易に行えた(図)。現時点で、蛍光発現 YS-1 HPC の増殖には至っていないが、NEPA21 を用いたエレクトロポレーションの条件および培養条件をさらに検討することで、蛍光発現 YS-1 HPC の増殖維持が可能になるものと期待している。

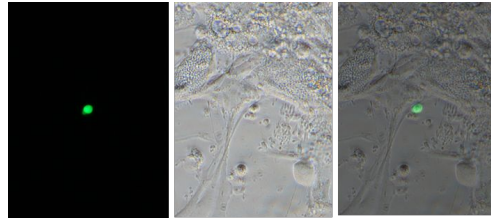


図. GFP 発現 YS-1 HPC (CAG プロモーター)

(5) 病原体の感作が誘導する造血組織(腎臓)における細胞増殖

BrdU が標識された白血球を検出することができた。このことは、不活化 *E. tarda* 投与により、腎臓中の白血球の増殖が誘導されていることを示す。細胞分裂のタイミングは、感作後 2 日~3 日であることが明らかとなった。本手法は移植細胞の分化・増殖を誘導する技術として有効であると考えられる。

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 7 件)

Kurata, O., Wada, S., Matsuyama, T., Sakai, T. and Takano, T. N-terminal region is responsible for chemotaxis-inducing activity of flounder IL-8. *Fish Shellfish Immunol.*, 査読有, 38, 361-366, 2014.

DOI: 10.1016/j.fsi.2014.04.006

Matsuyama, T., Nakayasu, C., Fujiwara, A., Kurita, J., 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, 313-322, 2012.

DOI: 10.1016/j.dci.2012.02.014

[学会発表](計 27 件)

倉田 修. N 末領域を欠くヒラメ IL-8 類似分子について. 平成 27 年度日本水産学会春季大会. 2015 年 3 月 28 日. 東京海洋大学(東京・品川).

倉田 修. *Edwardsiella tarda* 感染ヒラメの肝臓におけるインターロイキン 8 の局在. 平成 27 年度日本魚病学会春季大会. 2015 年 3 月 8 日. 東京海洋大学(東京・品川).

Kurata, O. Inhibition of chemotactic activity of flounder IL-8 by specific antibodies for its N-terminal region. 1st International Conference of Fish and Shellfish

Immunology. 2013 年 7 月 28 日. Vigo (Spain).

倉田 修. *Edwardsiella tarda* 感染ヒラメにおける肝臓の初期病理変化. 平成 26 年度日本魚病学会春季大会. 2014 年 3 月 30 日. 函館国際ホテル(北海道・函館).

倉田 修. ヒラメ EF-1 プロモーター制御による GFP 発現コンストラクトの作製. 平成 26 年度日本水産学会春季大会. 2014 年 3 月 28 日. 北海道大学(北海道・函館).

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 年 3 月 29 日. 東京海洋大学(東京・品川).

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 年 9 月 15 日. 水産大学校(山口・下関).

[産業財産権]

出願状況 (計 2 件)

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

中易 千早 (NAKAYASU, Chihaya)

独立行政法人水産総合研究センター・その他

研究者番号 : 00311225

岡内 正典 (OKAUCHI, Masanori)

独立行政法人水産総合研究センター・研究員

研究者番号 : 40372023

尾崎 照遵 (OZAKI, Akiyuki)

独立行政法人水産総合研究センター・研究員

研究者番号 : 40416045