

令和元年6月12日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07881

研究課題名(和文) コイヘルパーT細胞亜集団の同定 - 抗原特異的クローン化T細胞株を用いた検討 -

研究課題名(英文) Identification of helper T cell populations in carp

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類のヘルパーT細胞(Th)において、Th1・Th2・Th17など多くの亜集団が知られている。申請者らはすでにコイのクローン化Th細胞株の性状を調べることにより、魚類でも亜集団が存在することを示している。しかし、クローン化Th細胞株の培養が難しく十分な数のクローン株が得られていなかった。また、今まで得られたTh細胞株は健康なコイより樹立したため非機能的なものが多かった。そこで本研究ではより安定的にクローン化Th細胞株を得るためコイIL-2組換えタンパク質を作製し、安定的なクローン化Th細胞株の樹立法の確立を行った。またコイの混合リンパ球反応を行い、アロ抗原特異的なTh細胞の培養を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年魚類でもTh亜集団の同定に向けた多くの研究が行われて来ている。しかし、その多くは、魚類Th関連遺伝子の単離と、臓器・組織レベルの発現解析によるものであり、魚類Th亜集団の存在を直接証明しているものは無かった。一方、我々が行ったクローン化T細胞株の作製は、魚類Th細胞を直接証明できる。真骨魚類は、哺乳類と同様、T・B細胞を主体とした獲得免疫機構を持つ。そのため獲得免疫反応の中心的な制御機構を構成するTh細胞の存在や性状を調べることは、魚病の病態解明・予防・ワクチン開発などに大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：Helper T cells (Th) are called the “control tower” of the immune system, and many subpopulations such as Th1, Th2, Th17 are known in mammals. We already established a method for obtaining clonal Th cell lined from carp. We have already shown that subpopulations exist in fish by examining the characteristics of cloned Th cell lines in carp, but culture of cloned Th cell lines is difficult. Sufficient number of clones was not obtained. In addition, Th cell lines obtained so far were more nonfunctional because they were established from healthy carp. Therefore, in this study, in order to obtain a cloned Th cell line more stably, we prepared a recombinant protein of carp IL-2 and established a method for establishing a stable cloned Th cell line. In addition, we performed mixed lymphocyte reaction of carp and tried to culture alloantigen-specific Th cells.

研究分野：魚病学

キーワード：魚類 ヘルパーT細胞 T細胞亜集団

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘルパーT細胞(Th)は免疫系の司令塔と呼ばれ、哺乳類ではTh1・Th2・Th17など多くの亜集団の存在が知られている。これらTh亜集団はそれぞれ特有の機能を持つが、中でもTh1とTh2はそれぞれ細胞性免疫と液性免疫を制御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、獲得免疫を制御する。

魚類は哺乳類と同様の細胞性と液性免疫機構を有し、ゲノム解析等からもTh1およびTh2に関連する遺伝子の存在が明らかである。このことは、魚類も哺乳類と似たTh亜集団が存在することを示唆するが、未だに同定には至っていない。

我々は、すでに魚類Th亜集団の性状解析を目的として、コイのTh細胞を選択的に増幅する培養法に取り組んでおり、1個のコイTh細胞を増幅してクローン化Th細胞株を得ることに成功している。また、得られたいくつかのTh細胞株を比較することにより、Th1およびTh2関連サイトカインのいずれの発現も弱いナイーブTh細胞(Th0)様のもや、Th2関連サイトカイン(IL-4/13, IL-10)を強く発現するが、Th1関連サイトカイン(INF)はほとんど産生しないTh2様のものであることを報告している。

2. 研究の目的

上述のように、魚類においてもTh2様やTh0様の性状を示す集団が存在することは示された。しかし、これらの細胞株はいずれも健康なコイより得られたものであり、生体防御における機能的なTh細胞の性状を示しているとは言い難い。実際今回得られたクローンの多くは、Th0様のものである。哺乳類では機能的なTh細胞株の作製のため、抗原刺激やIL-2等のT細胞増殖因子の添加が必須である。そこで本申請研究では、あらかじめコイを種々の抗原で免疫し、活性化状態のTh細胞を誘導しておく。次に、これら免疫したコイから白血球を分離し、抗原と抗原提示細胞さらにT細胞増殖因子を加え培養することで、抗原特異的なクローン化T細胞株の樹立を試みる。特に、今回はTh1様細胞を得ることを目的として、混合リンパ球反応(MLR)を行う。MLRでは、同種異型抗原を認識したTh細胞が増殖すると考えられるが、我々はすでにコイのMLR反応にて、抗原特異的なTh細胞が選択的に増幅することを示している。

MLRではTh細胞のみならず、細胞傷害性T細胞(Tc細胞)の増殖も期待できる。そのため、各種T細胞増殖因子を添加するなどし、コイTc細胞の増殖も試みる。また、抗原感作個体より、B細胞も分離し、抗原と伴にIL-7, IL-4/13などをB細胞増殖因子として加えることでB細胞の増殖も試みた。

3. 研究の方法

コイT細胞増殖因子の検討: 哺乳類では、T細胞増殖活性を持つサイトカインとしてIL-2が知られている。そこで、哺乳類IL-2のホモログ遺伝子(IL-2AおよびIL-2B)をコイで遺伝子クローニングし、大腸菌発現系を用いて組換えタンパク質を作製した。次に、これらコイIL-2の活性は、申請者がすでに確立しているコイT細胞培養系を用いて調べた。すなわち、コイの造血・リンパ組織である腎臓から白血球を分離し、支持細胞(ギンブナ胸腺由来GTS9細胞株)上に播種すると、ヘルパーT細胞(Th)が選択的に増殖する。これらTh細胞を回収し48穴プレートに 2×10^4 個/穴の濃度で播種し、これにrcIL-2AまたはrcIL-2Bを終濃度0, 1, 10, 100および1000 ng/mLになるよう加え、30℃, 5%CO₂存在下で培養した。

コイのクローン化Th細胞の作製法の改善: 哺乳類のIL-2は別名T細胞増殖因子とも呼ばれ、T細胞の増殖に必須である。そこで、より効率良くコイのクローン化Th細胞を得る目的で、クローン化培養に、コイrIL-2AおよびrIL-2Bを加えた。具体的には従来から行って来た1個のTh細胞から増幅させる培養にrIL-2等を添加し、添加しない場合と比較した。

コイ(Cyprinus carpio)の頭腎および体腎から白血球を分離し、ギンブナ由来線維芽細胞株(支持細胞)上で培養すると、コイTh細胞が選択的に増幅する(バルクTh細胞培養)。これら増幅したTh細胞を顕微鏡下でピペットを用いて1細胞ずつ分取し、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1個ずつ播種した。そして、バルクTh細胞培養から得た「ならし培地」を30%と、100 ng/mlのrcIL-2Aを加え培養し、1個のTh細胞に由来する、クローン化Th細胞を得た。得られたクローンは10 ng/mlのPHAで5時間刺激した後、RT-PCRおよびリアルタイムRT-PCRによりT細胞受容体定常領域(C α ・C β ・C γ), Th細胞マーカー(CD4-1), キラーT細胞(Tc細胞)マーカー(CD8 α ・CD8 β), Th1関連サイトカイン(IFN γ ・IFN β rel), Th2関連サイトカイン(IL-4/13A・IL-4/13B)等の遺伝子発現解析を行った。

混合リンパ球反応による抗原特異的Th細胞の培養: あるコイ(Stimulator, St)から採血し、

白血球を分離した。この白血球を別のコイ (Responder, Re) の尾部血管に移入・免疫した。その後、7 日間隔でさらに 2 回免疫し、最後の免疫から 7 日後に St および Re それぞれのコイから採血し、Percoll (1.075g/mL) を用いた遠心分離法等により白血球を分離した。得られた白血球を培養液 (20 %ウシ胎仔血清および 2.5%コイ血清を加えた ERDF 培地) 中に 2.0×10^6 cells/mL になるよう懸濁し、48 穴プレートの各穴にそれぞれのコイ白血球を 0.2 mL ずつ入れ混合した。その後、30 で 7~9 日間培養し、細胞数のカウントやメイギムザ染色による白血球の形態観察等を行った。また、本培養にシクロスポリン (0, 0.01, 1.0 μ g/mL) を添加し、その効果を調べた。あるコイ (stimulator) から白血球を分離し、別のコイ (responder) に移入し、同種異系抗原に対する免疫を誘導する (抗原感作)。その後、これらコイの白血球を混ぜて培養すると、responder の Th 細胞は stimulator 細胞の抗原を認識し、活性化し、増殖する。これら抗原特異的な Th 細胞を出発材料として rIL-2 存在下でクローン化培養を行った。

4. 研究成果

コイ rclIL-2 の T 細胞増殖に及ぼす効果: コイ rclIL-2A および IL-2B とともに、100 ng/mL 以上の濃度でコイ Th 細胞の活発な増殖が認められた。すなわち、rclIL-2 を加えていない培養 (無添加群) においては、培養 9 日目までに培養開始時の細胞数の約 1.45 倍の細胞増殖しか認められなかったのに対し、100 ng/mL の rclIL-2 存在下においては、約 2.5 倍まで細胞増殖が認められた。

このように、コイ IL-2 は哺乳類の IL-2 と同様に Th 細胞へ作用し、増殖を促進することがわかった。

コイ rclIL-2 のクローン化 T 細胞培養における効果: rclIL-2A 存在下でクローン化培養をした場合、96 穴プレート 1 枚あたり 5~14 穴 (平均 9 穴) において細胞増殖が認められた。一方、rclIL-2A を加えなかった場合、96 穴プレート 1 枚あたり 0~4 穴と少ない穴で増殖が認められた。rclIL-2A 存在下で増殖した細胞は、その後継代を繰り返し行い、現在までに 10 個のクローン化 Th 細胞株が得られ、これらのクローンを clone1~10 と名付けた。それらの性状解析を行ったところ、Clone1~10 において C および C 遺伝子の発現が見られ、そのうち clone1~7 においては、Th 細胞マーカーである CD4-1 の発現が見られた。一方、Tc マーカーである CD8 および CD8 の発現は、clone2, 3, 8 で、また CD8 の発現は見られたものの、CD8 の発現はすべてのクローンにおいて見られなかった。また、Th1 および Th2 サイトカインの遺伝子発現をリアルタイム PCR で調べたところ、クローン間で Th1 または Th2 関連サイトカインの発現に違いが見られた。

このように、rclIL-2A はコイ Th 細胞のクローン化培養において効果があった。また、クローン化 Th 細胞株を検討することで魚類における Th 細胞亜集団の同定に有用であると考えられた。

混合リンパ球反応による抗原特異的 Th 細胞の培養: St と Re の白血球を混ぜて培養したところ、培養 7 日後には一部の細胞で活発な増殖が観察され、コロニー状に増殖した。そして 7 日後には元の細胞数より約 3~4 倍に増えていた。また、これらの細胞をト抹し観察したところ幼若化 (大形化し、細胞質が好塩基性を増す) および活発な細胞増殖を示す分裂像が観察された。一方、St のみ、または Re のみの培養では幼若化・増殖は観察されなかった。また、St の代わりに他のコイ白血球を Re と混ぜて培養したところ、幼若化・増殖は観察されなかった。また、St と Re の白血球を混ぜた培養にシクロスポリンを添加したところ、0.01 と 1.0 μ g/mL の濃度で細胞の幼若化・増殖は認められなくなった。

MLR は St の白血球に特異的に起こったことから抗原特異的であり、さらにシクロスポリンを添加することで幼若化・増殖が抑制されたことから、コイの MLR においても IL-2 が増殖に必要である事が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Katakura, F., K. Nishiya, A. S. Wentzel, E. Hino, J. Miyamae, M. Okano, G. F. Wiegertjes and T. Moritomo (2019). "Paralogs of common carp granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) have different functions regarding development, trafficking and activation of neutrophils." *Frontiers in immunology* 10: 255. 査読有り

Katakura, F., Y. Sugie, K. Hayashi, K. Nishiya, J. Miyamae, M. Okano, T. Nakanishi and T. Moritomo (2018). "Thrombopoietin (TPO) induces thrombocytic colony formation of kidney cells synergistically with kit ligand A and a non-secretory TPO variant

exists in common carp." *Developmental & Comparative Immunology* 84: 327-336. 査読有り .

Miyamae, J., S. Suzuki, F. Katakura, S. Uno, M. Tanaka, M. Okano, T. Matsumoto, J. K. Kulski, T. Moritomo and T. Shiina (2018). "Identification of novel polymorphisms and two distinct haplotype structures in dog leukocyte antigen class I genes: DLA-88, DLA-12 and DLA-64." *Immunogenetics* 70(4): 237-255. 査読有り .

Yamaguchi, T., S. Miyata, F. Katakura, T. Nagasawa, Y. Shibasaki, T. Yabu, U. Fischer, C. Nakayasu, T. Nakanishi and T. Moritomo (2016). "Recombinant carp IL-4/13B stimulates in vitro proliferation of carp IgM+ B cells." *Fish & shellfish immunology* 49: 225-229. 査読有り .

Kolder, I., S. Van Der Plas-Duivesteijn, G. Tan, G. Wiegertjes, M. Forlenza, A. Guler, D. Travin, M. Nakao, T. Moritomo and I. Irnazarow (2016). "A full-body transcriptome and proteome resource for the European common carp." *BMC genomics* 17(1): 701. 査読有り .

Shibasaki, Y., C. Hatanaka, Y. Matsuura, R. Miyazawa, T. Yabu, T. Moritomo and T. Nakanishi (2016). "Effects of IFN administration on allograft rejection in ginbuna crucian carp." *Developmental & Comparative Immunology* 62: 108-115. 査読有り .

Matsuura, Y., T. Yabu, H. Shiba, T. Moritomo and T. Nakanishi (2016). "Purification and characterization of a fish granzymeA involved in cell-mediated immunity." *Developmental & Comparative Immunology* 60: 33-40. 査読有り .

Kobayashi, I., F. Katakura and T. Moritomo (2016). "Isolation and characterization of hematopoietic stem cells in teleost fish." *Developmental & Comparative Immunology* 58: 86-94. 査読有り .

[学会発表](計 10 件)

澤田真衣・西谷広平・岡野雅春・宮前二郎・Johannes M. Dijkstra・片倉文彦・森友忠昭 . コイ interleukin-5 様分子の同定および機能解析, 第 30 回日本比較免疫学会学術集会, 2018 年 8 月

西谷広平・片倉文彦・宮前二郎・岡野雅春・森友 忠昭, コイ Kit ligand a は造血前駆細胞の増殖・維持を促す, 第 30 回日本比較免疫学会学術集会, 2018 年 8 月

Fumihiko Katakura・Kohei Nishiya・Annelieke S. Wentzel・Erika Hino・Jiro Miyamae・Masaharu Okano・Geert F. Wiegertjes・Tadaaki Moritomo, PARALOGS OF CARP GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR (G-CSF) HAVE DIFFERENT FUNCTIONS WITH REGARD TO DEVELOPMENT, TRAFFICKING AND ACTIVATION OF NEUTROPHILS, The 14th ISDCI Congress, 2018 年 6 月

Jiro Miyamae¹・Hayato Yagi・Masaharu Okano・Fumihiko Katakura・Takashi Shiina・Tadaaki Moritomo, Quantification and characterization of allo-reactive T cells in dog, The 14th ISDCI Congress, 2018 年 6 月

Kohei Nishiya・Fumihiko Katakura・Jiro Miyamae・Masaharu Okano・Tadaaki Moritomo, IDENTIFICATION OF NEUTROPHILIC PROGENITORS USING A COLONY ASSAY SYSTEM IN THE PRESENCE OF RECOMBINANT CARP GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR PARALOGS, The 14th ISDCI Congress, 2018 年 6 月

森友忠昭・小林功・片倉文彦, 魚類の腎臓造血, 第 88 回 日本動物学会, 2017 年 9 月

西谷広平・日野エリカ・宮前二郎・岡野雅春・片倉文彦・森友忠昭, コイ顆粒球コロニー刺激因子 GCSF の造血活性の検討 共同, 第 88 回日本動物学会, 2017 年 9 月

片倉文彦・西谷広平・日野エリカ・Annelieke Wentzel・宮前二郎・岡野雅春・Geert Wiegertjes・森友忠昭, コイ顆粒球コロニー刺激因子は好中球の造血および遊走を促す, 日本比較免疫学会 第 29 回学術集会, 2017 年 8 月

岡野雅春・宮前二郎・片倉文彦・森長真一・森友忠昭, コイ T 細胞レセプター(TCR)

遺伝子領域のゲノム解析，第 159 回日本獣医学会，2016 年 9 月

片倉文彦・西谷広平・日野エリカ・宮前二郎・森友忠昭，種々の造血因子を用いたコロニー形成培養法によるコイ造血前駆細胞の同定，第 159 回日本獣医学会，2016 年 9 月

〔図書〕(計 2 件)

魚類学の百科事典(丸善出版)，一般社団法人日本魚類学会編，血液と造血器官の頁を執筆，森友忠昭 他，134-135，2018 年 10 月

魚類発生学の基礎(恒星社厚生閣)，大久保範聡・吉崎悟朗・越田澄人編，第 12 章 循環系の発生の頁を執筆，磯貝純夫・小林麻己人・森友忠昭 他，130-143，2018 年 9 月

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。