

令和元年6月4日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04982

研究課題名(和文) 補体のホメオスタシス機能を活用した魚類粘膜の自然免疫バリアの強化

研究課題名(英文) Enhancement of innate immune barrier of fish mucosa utilizing homeostatic functions of the complement system.

研究代表者

中尾 実樹 (NAKAO, Miki)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：50212080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、コいの鱗由来上皮細胞株(KF-1)を用い、補体制御因子CD46と上皮組織の健全性の関係を解析したものである。特異抗体によってCD46様コイTecremを活性化させると、KF-1の培養基材への接着や増殖が促進され、さらにTecremが創傷治癒にも深く関与することを明らかにした。さらに、Tecremの活性化によってタイトジャンクション構成タンパク質ZO-1の発現が上昇し、コイ上皮細胞株の増殖が促進され、上皮細胞シートを形成する細胞密度が高まることを認めた。したがって、本研究は、硬骨魚類においてCD46様の膜型補体制御因子が上皮細胞の増殖、細胞接着を制御していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粘膜上皮の物理的バリア機構やそのバリアの強化についての研究例は魚類では殆ど無い。本研究は、近年見つけた補体のホメオスタシス機能に着目し、補体が粘膜局所における上皮細胞を中心としたバリアの健全性保持と強化に果たす役割と作用メカニズムを明らかにする点で、新しい着眼点と独創性を持つ。本研究によって、補体活性化とその制御因子を活用した粘膜上皮、ひいては自然免疫バリアの強化法に免疫学的な基盤が与えられ、ワクチンや免疫賦活剤とは異なる次元で、高いレベルの基盤的な感染防御能を魚に付与することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have explored the homeostatic role of Tecrem in maintaining the fish epithelium, by analyzing expression behavior of Tecrem on two epithelial cell lines derived from carp fin (Koi carp fin cell line or KF-1 and gimbuna crucian carp fin cell line or CFS). Cell adhesion and wound-healing assays done on KF-1 cells showed that the cell adhesion and wound healing is enhanced when the cells were incubated with anti-cTecrem antibodies. These results suggest that the normal functional role of cTecrem on epithelial cells can be homeostatic via the induction of surface barrier repair upon pathogen entry or any other injury. This could be due to the signaling events followed by the regulation of TJ protein. This homeostatic function of cTecrem on epithelial cells shows its importance in the first line defense of the carp fishes and it gives the reason why Tecrem is always targeted by many pathogens to enter into the fish body.

研究分野：比較免疫学

キーワード：魚類 補体 制御因子 ホメオスタシス 創傷治癒 生体防御 免疫 上皮細胞

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

1. 研究開始当初の背景

近年、硬骨魚類特異的な抗体クラスである IgT (別名 IgZ) が粘膜組織で優先的な液性免疫応答を担うこと、鰓や腸管からの抗原刺激が全身性の細胞性免疫応答を誘導できることなど、魚類特有の局所免疫機能が報告され、大きく注目を集めていた。一方で、粘膜防御の第一線としては、1) 粘液・上皮細胞による物理的バリアや、2) 恒常的な異物認識と獲得免疫への抗原提示を担う自然免疫因子も極めて重要と考えられるが、1), 2) を統合した「自然免疫バリア」の局所免疫機能の分子・細胞機構は、獲得免疫と比較して解明が著しく遅れていた。

2. 研究の目的

本研究では、完全に閉鎖した細胞シートの形成に重要なタイトジャンクション構造および上皮細胞の増殖とシート形成に及ぼす CD46 の作用機構を分子・細胞レベルで明らかにする。さらに、C1q, プロパージン、CD46 を介した魚類補体のホメオスタシス機能を活用して上皮細胞シートを強化し、魚類の体表、消化管、鰓などにおける外界からの微生物感染に対する防御能を向上させる新方策を開発することを目的とする。

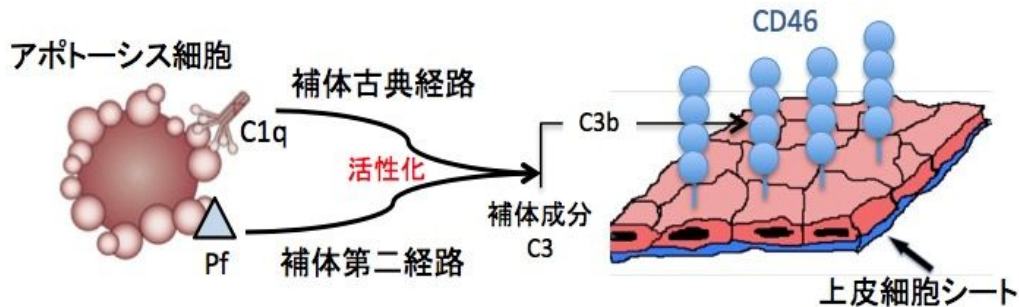


図 1. 本研究がモデルとする補体のホメオスタシス機能：アポトーシス細胞等による補体の活性化によって補体成分 C3 が活性化型 C3b となり、これが上皮細胞上の CD46 に結合すると上皮細胞間のタイトジャンクション形成を制御し、さらに上皮細胞の増殖を刺激して創傷治癒を促進する。

3. 研究の方法

まず、コイ鱸由来上皮細胞株 KF-1 を用い、補体因子 C1q, Properdin, CD46 の発現パターン、組換えタンパク質の発現と特異抗体作成、タンパク質レベルでの発現解析および補体活性化・活性化制御機構への関与を検討した。特に、CD46 様膜型補体制御因子 (Tecrem) については、詳細な機能解析を実施し、上皮細胞シートの密閉性・完全性への関与を、Gap-closure assay および細胞接着 assay によって評価した。さらに、上皮細胞シートの完全性保持に重要な役割を果たす上皮細胞間密着結合の構成タンパク質の機能と Tecrem との関係を解明するために、抗 ZO-1 抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡観察を実施した。

一方、Properdin の機能については、コイ Properdin アイソタイプ (Pf1, Pf2) の特異抗体をツールとして用い、Pf1 と Pf2 の補体成分 C3 アイソタイプとの相互作用を詳細に解析した。

4. 研究成果

まず、CD46 のコイにおけるオルソログと考えられる cTecrem の細胞外ドメインを構成する、4 つの Short Consensus Repeat (SCR) モジュールを、N 末端側の SCR1-2 と C 末端側の SCR3-4 に分けて、組換えタンパク質として発現させた。pCold-1 ベクターと Origami B 大腸菌を用いて可溶性タンパク質として得た SCR1-2 および SCR3-4 のそれぞれでウサギを免疫し、特異性の高いポリクローナル抗体 (抗 SCR1-2 および抗 SCR3-4) を得ることに成功した。また、先行研究で作成された抗 cTecrem モノクローナル抗体 (1F12) と組換え SCR1-2 および SCR3-4 との反応解析から、1F12 の抗原決定基が SCR1-2 内に存在することを明らかにした。

次に、上記 3 種の抗体を用いたフローサイトメトリー、ELISA および免疫蛍光顕微鏡観察によって、抗 SCR1-2 あるいは 1F12 を結合させて cTecrem を活性化させると、KF-1 の培養基材への接着や増殖が促進されることを発見した。さらに、KF-1 の単層細胞シートを用いた Gap-Closure Assay により、人為的に間隙を発生させた KF-1 細胞シートの修復を促進することを見出し、cTecrem が創傷治癒にも深く関与することを明らかにした。

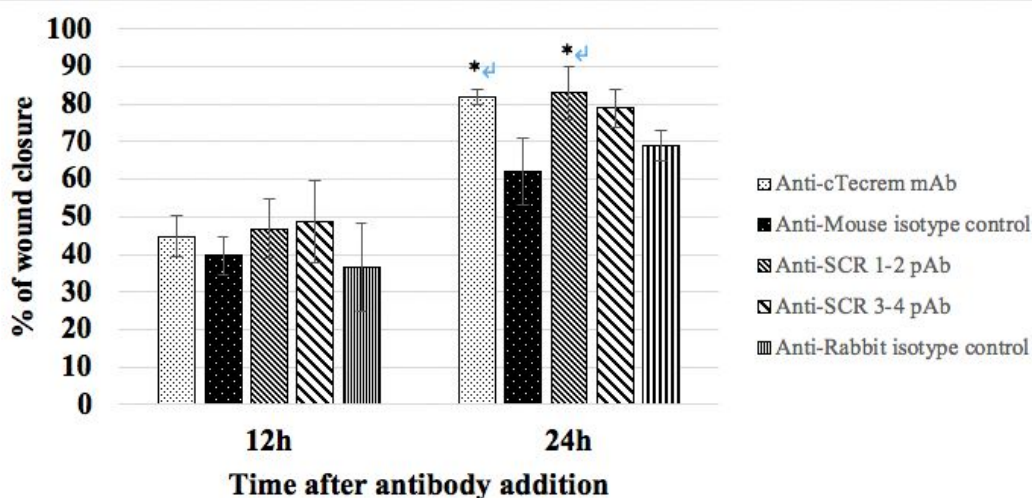


図2. Gap-Closure assayの結果. 抗 Tecrem 抗体による刺激によって、上皮細胞シートに生じたギャップの修復が有意に促進されている。

上皮組織の健全性維持に与える魚類 CD46 の役割をさらに解明するために、KF-1 および CFS 細胞の形態およびタイトジャンクション構成タンパク質 ZO-1 の発現に及ぼす cTecrem およびギンブナ Tecrem (gTecrem) 活性化の影響を、市販の抗マウス ZO-1 抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡観察によって解析した。その結果、Tecrem の活性化によって両細胞の増殖が促進され、上皮細胞シートを形成する細胞密度が高まること、および ZO-1 タンパク質の発現が亢進することを認めた。

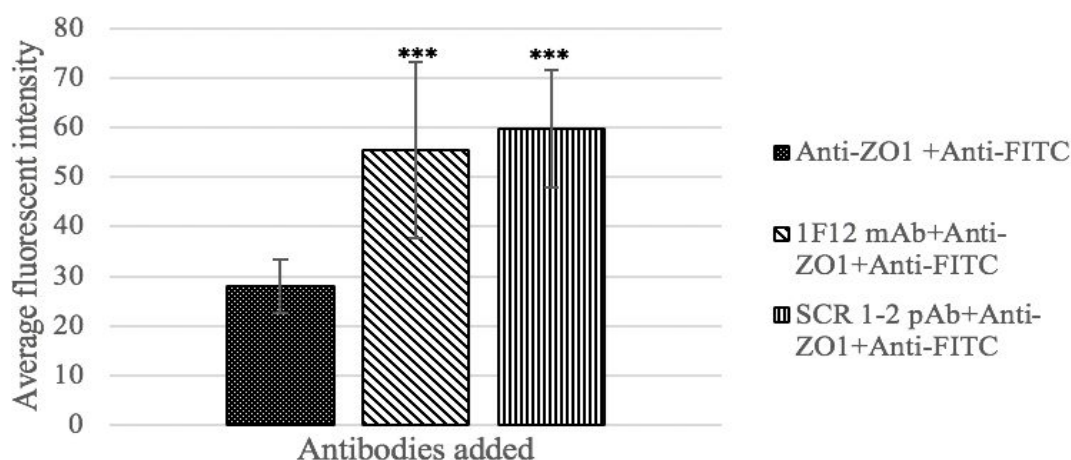


図3. 抗 Tecrem 抗体処理による、KF-1 細胞における ZO-1 タンパク質の発現上昇

さらに、哺乳類でアポトーシス細胞認識分子として知られる補体成分プロパージンが、コイでは2種のアイソタイプとして存在し、それらが補体成分 C3 のアイソタイプと異なる親和性で相互作用することを明らかにした。本年度は、上皮細胞に覆われた魚類の生体防御の第一線として機能する体表粘液における、補体活性化経路の存在を検討した。その結果、体表粘液中に、実際に CD46 のリガンドとなる C3 と、C3 の第二経路による活性化を促進するためのポジティブ・レギュレーターであるプロパージンが存在することを、特異抗体を駆使したウエスタンブロットリングで突き止めた。

以上の結果を総合すると、魚類の体表上皮細胞を覆う粘液中で、主に補体第二経路の活性化が起こり、その結果生じた活性化型 C3 (おそらく C3b) が CD46 のリガンドとして上皮細胞を刺激し、その増殖・シート形成を促して微生物の侵入を最小限にとどめている、という感染防御メカニズムが提唱される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Tajimi S, Kondo M, Nakanishi T, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T, Generation of virus-specific CD8⁺ T cells by vaccination with inactivated virus in the intestine of ginbuna crucian carp, *Developmental and Comparative Immunology*, 2019; 93, 37-44.

- DOI: 10.1016/j.dci.2018.12.009. (査読有)
2. Somamoto T, Maruyama S, Nagasawa T, Nakao M, Sato A, Hatta H, Sato M, Murakami-Yamaguchi Y, Kizu-Mori K, Hirakawa Y, Narita H. Development of anti-atypical *Aeromonas salmonicida* monoclonal antibodies for diagnosis of “New ulcer disease” in Koi carp. *Fish Pathology*, 2018; 53: 36-39. DOI: 10.3147/jsfp.53.36. (査読有)
 3. Somamoto T, Maruyama S, Nagasawa T, Nakao M, Sato A, Hatta H, Sato M, Murakami-Yamaguchi Y, Kizu-Mori K, Hirakawa Y, Narita H. Development of anti-atypical *Aeromonas salmonicida* monoclonal antibodies for diagnosis of “new ulcer disease” in koi carp, *Fish Pathology*, 10.3147/jsfp.53.36, 53, 1, 36-39, 2018.06. (査読有)
 4. Meidong R, Khotchanalekha K, Doolgindachbaporn S, Nagasawa T, Nakao M, Sakai K, Tongpim S. Evaluation of probiotic *Bacillus aerius* B81e isolated from healthy hybrid catfish on growth, disease resistance and innate immunity of Pla-mong *Pangasius bocourti*, *Fish and Shellfish Immunology*, 2018; 73: 1-10. DOI:10.1016/j.fsi.2017.11.032. (査読有)
 5. Prakash H, Motobe S, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M. Expression and homeostatic functions of Tecrem, a CD46-like complement regulatory protein, on epithelial cells in bony fish. *Immunobiology*, 2016;221:1209-1210. DOI: 10.1016/j.imbio.2016.06.187. (査読有)
 6. Kolder IC, van der Plas-Duivesteijn SJ, Tan G, Wiegertjes GF, Forlenza M, Guler AT, Travin DY, Nakao M, Moritomo T, Irnazarow I, den Dunnen JT, Anvar SY, Jansen HJ, Dirks RP, Palmblad M, Lenhard B, Henkel CV, Spaink HP. A full-body transcriptome and proteome resource for the European common carp., *BMC Genomics*, 2016; 17: 701-1-701-12. DOI:10.1186/s12864-016-3038-y. (査読有)

〔学会発表〕(計 25 件)

1. 齋藤武尊, 長澤貴宏, 杣本智軌, 中尾実樹. 魚類炎症反応における C5a の役割解明のための抗ゼブラフィッシュ C5a 抗体の作成, 日本水産学会春季大会, 2019.
2. Nakao M, Iwanaga S, Nagasawa T, Somamoto T. Phylogenetic inference on functions of the classical complement pathway in bony fish. 14th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology. 2018
3. Prakash H, Motobe S, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M. Homeostatic functional analysis of Tecrem, a CD46-like complement regulatory protein, on epithelial cells in carp fish, 日本水産学会春季大会, 2018.
4. Nakao M, Noguchi M, Akahoshi S, Nagasawa T, Somamoto T, Functional diversity of two C7 isotypes in bony fish, a primitive vertebrate model, European Meeting on Complement in Human Disease, 2017.09,
5. Prakash H, Motobe S, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M, Functional analysis of Tecrem, a CD46-like complement regulatory protein, on epithelial cells in the common carp, The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium, 2017.09.
6. 赤司小百合, 長沢貴宏, 杣本智軌, 中尾実樹, コイ補体成分 B/C2-B の組換え体作成と機能解析, 日本比較免疫学会学術集会, 2017.08.
7. 野口真代, 長澤貴宏, 中尾実樹, 杣本智軌, コイ補体 C7 アイソタイプの機能解析, 日本水産学会春季大会, 2017.03.

〔図書〕(計 1 件)

1. 中尾実樹, 補体系の進化, 動物学の百科事典(日本動物学会編) pp 508-509, 2018.

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 杣本 智軌

ローマ字氏名: SOMAMOTO, tomonori

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 大学院農学研究院

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 40403993

研究分担者氏名：長澤 貴宏

ローマ字氏名：NAGASAWA, takahiro

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学院農学研究院

職名：助教

研究者番号（8桁）：70775444

(2)研究協力者

研究協力者氏名：ケンパー クラウディア

ローマ字氏名：KEMPER, claudia

研究協力者氏名：ウィガチャー ヒールト

ローマ字氏名：WIEGERTJES, geert

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。