

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：12614

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2022

課題番号：17KK0151

研究課題名（和文）魚類の鰓抗原取込細胞は抗原提示能を有するか

研究課題名（英文）Antigen degradation and presentation by gill-epithelial antigen sampling cells

研究代表者

加藤 豪司（Kato, Goshi）

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：50624219

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：ニジマスの鰓上皮抗原取込細胞は、浸漬投与されたワクチン抗原を盛んに取り込むことから、浸漬ワクチンの有効性の理論的根拠となる細胞集団である。本研究ではGAS細胞を起点とする魚類の鰓粘膜免疫応答の誘導機序に迫ることを目的とした。GAS細胞は細胞室内に酸性フォスファターゼやリソソームを有する細胞であり、細菌抗原の取込細胞の共刺激分子であるCD80などの遺伝子が発現上昇しており、抗原を取り込んだGAS細胞とリンパ球共培養すると培養24時間後にはGATA3遺伝子の発現上昇が確認された。以上のことから、GAS細胞は抗原の分解および抗原提示を行うことができ、鰓粘膜免疫応答の起点となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

浸漬ワクチンは稚魚や小型の魚類でも投与することができ、一度に大量に処理できるため、養殖現場からの開発ニーズは非常に高い。しかし、浸漬ワクチンとして有効なものは日本国内で1種類、世界的に見ても3種類の病原体に対するものしかなく、浸漬ワクチン技術の適用範囲の拡大が喫緊の課題である。種pン研究では浸漬ワクチンの根幹ともなるGAS細胞に焦点を当てて研究を行い、GAS細胞が取り込んだ最近抗原を分解し、抗原提示を行うことで鰓粘膜免疫応答の起点となることを示した。今後、さらに浸漬ワクチンによる免疫応答の誘導機序を明らかにすることで、魚類の新たな浸漬ワクチン技術の開発に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Bacterial antigen administered by immersion vaccination were taken up by gill-epithelial antigen sampling (GAS) cells in rainbow trout. We aimed to elucidate the mechanisms of GAS cells to initialize mucosal immune responses after the immersion vaccination. GAS cells were positive for acid phosphatase and lysosome staining, and they can degrade bacterial antigen within 3 h after the immersion. Gene expression of CD80 that is essential for antigen presentation was up-regulated at 3 h post immersion. Further, GATA3 gene expression level was up-regulated after the co-culture of GAS cells harboring the bacterial antigen and lymphocytes of rainbow trout. These data suggest that GAS cells can degrade bacterial antigen within 3 h after uptake and directly present it to T cells for initialization of mucosal immune response in the gill epithelium.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：魚類免疫学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在使用されている水産用ワクチンの用法は、ほとんどの場合が注射であり、稚魚やハンドリングストレスに弱い魚種(アユ・マグロなど)には投与できない場合もある。さらに、術者の安全、労働コストおよび魚体へのストレスなどの問題点からも、注射法に代わるワクチン投与法の開発が重要な課題となっている。ヒトなどの哺乳類では、ワクチン液を粘膜に塗布する「粘膜ワクチン」が開発され、注射を用いず安全に投与できるため注目されている。哺乳類の粘膜上皮組織には、病原体やワクチンなどの抗原を取り込む M 細胞が分布している。M 細胞は、補足した抗原を飲作用により体腔側へと運搬する。M 細胞により取り込まれた抗原は、免疫関連細胞の集まる粘膜関連リンパ組織 (MALT) へただちに運搬され、その抗原に特異的な免疫応答が誘導される。魚類では、病原体の培養液を不活化したワクチン液に魚を浸す浸漬投与法が、*Vibrio anguillarum* および *Aeromonas salmonicida* など限られた病原体に対して使用されている。我々はこれまでに、浸漬投与されたこれらのワクチンが鰓上皮に存在する特定の上皮細胞により取り込まれることを明らかにした。この「鰓上皮抗原取込細胞 (Gill epithelial Antigen Sampling: GAS cell)」による抗原取り込みの機序を明らかにできれば、魚類の新たな浸漬ワクチンの開発につながると考えられる。そこで、基課題では、GAS 細胞の生理学的な特徴を明らかにすることを目的に研究に取り組んでいる。基課題では、これまでに、GAS 細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体 (MAb; 2B4-1) を作製し、本細胞は鰓上皮組織においてかなり広範囲に分布することを明らかにした。また、本抗体を用いた磁気細胞分離法を行い、鰓上皮から剥離した上皮細胞から GAS 細胞のみを分取した。分取した GAS 細胞を May-Grünwald Giemsa 染色したところ、本細胞は塩基性顆粒や食胞を細胞内に持つことを明らかにした。さらに興味深いことに、GAS 細胞は MHC クラス II 分子 (MHCII) を細胞表面に発現しており、その発現レベルは不活化ワクチンの浸漬投与により上昇することを明らかにした。これらの実験結果から、本細胞は補足した抗原を消化し、直接的に T 細胞へ抗原提示できる可能性が示唆された。魚類の鰓上皮には哺乳類にはみられない独自の免疫システムが存在すると考えられる。

2. 研究の目的

哺乳類の M 細胞はリソソームやファゴソームを欠損しているとされており、食胞や顆粒を細胞質内に持たない。そのため、M 細胞により取り込まれた抗原は分解や修飾を受けずに、そのまま上皮下の樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に受け渡される。抗原を受け取った抗原提示細胞が、MALT 内で MHCII 分子を介して T 細胞へ抗原提示する。一方で、GAS 細胞は、浸漬投与した抗原を取り込むこと、食胞や顆粒を細胞質内に多く含むこと、および MHCII 分子を細胞表面に発現することが分かっている。これらのことから、申請者らは GAS 細胞が魚類の鰓粘膜局所において直接的に抗原提示を行い、免疫応答を迅速に誘導するのではないかと考えた。そこで、本研究では、GAS 細胞による MHCII 分子を介した抗原提示能の有無を明らかにすることを目的に、ニジマスを実験魚として用いて以下の実験を行う。

3. 研究の方法

ニジマスの鰓を採取して鰓上皮細胞を分散させ、2B4-1 および GAS 細胞に親和性を有するレクチン UEA-1 で染色した。2B4-1+ UEA-1+ となる GAS 細胞集団をセルソーターで分取し、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。また、分取した GAS 細胞の塗抹標本を作製し、May-Grünwald Giemsa (MGG)、Toluidin blue (TB) および酸フォスファターゼ (ACP) 染色に供した。GAS 細胞のリソソーム染色はフローサイトメトリーによる方法を用いた。さらに、分取した GAS 細胞を透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した。最後に、ニジマスに *A.s.s.* の不活化菌体を浸漬投与して経時的に鰓を採取し、パラフィン切片としてから、2B4-1、UEA-1 および抗 *A.s.s.* 抗体による蛍光免疫組織化学を行った。

ニジマスの鰓を採取し、*A.s.s.* 不活化菌体を加えた細胞培養用培地中に入れ、18°C で 30 時間振とうした。不活化菌体投与前、投与 1 時間後および 3 時間後に鰓を回収し、10 mM EDTA 中で上皮細胞を分散させ、抗 GAS 細胞抗体 (2B4-1) および GAS 細胞に親和性を有するレクチン UEA-1 で染色した。2B4-1+ UEA-1+ の GAS 細胞集団をセルソーターで分取し、次世代シーケンサーを用いて経時的な遺伝子発現パターンの変化を網羅的に解析した。上記同様に *A.s.s.* 不活化菌体を投与した鰓からセルソーターで分取した 2B4-1+ UEA-1+ の GAS 細胞集団 (2×10^5 cells) を、ニジマス脾臓由来の非吸着性白血球 (6×10^5 cells) と混合し、18°C で 24 時間共培養した。対照区には不活化菌体未投与の鰓から分取した GAS 細胞を用いた。培養 15 時間および 24 時間後に細胞を回収し、GATA3 遺伝子の発現変動を real-time PCR で解析した。また、回収した細胞の塗抹標本を作製し、May-Grünwald Giemsa (MGG) 染色、および 2B4-1 と抗 MHC クラス II 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。

4 . 研究成果

2B4-1+ UEA-1+となる GAS 細胞集団では、endocytosis、proteolysis および protein phosphorylation に関わる多くの遺伝子が 2B4-1- UEA-1-の細胞集団に比べ統計的有意に高く発現していた。GAS 細胞分画には、細胞質中に空胞を有し、MGG 染色および TB 染色で細胞質が青染されるものと、そうでないものの 2 種類が存在した。また、GAS 細胞分画のほとんどすべての細胞が ACP 染色で陽性を示した。また、リソソーム染色では 2B4-1+ UEA-1+の GAS 細胞のうち 88.7%が陽性を示した。TEM 解析では、細胞質中の電子密度が高い細胞と低い細胞の 2 種類が観察され、両者においてリソソームおよびエンドソームと思われる細胞小器官が観察できた。不活化菌体の浸漬投与 1 分後では粒子状の菌体シグナルが GAS 細胞表面や細胞内で観察されたが、30 分後ではこれら蛍光シグナルは細胞質内全体に広がるように観察された。以上のことから、GAS 細胞はリソソームを有する抗原分解活性の高い細胞であると考えられ、鰓粘膜で捕捉した細菌抗原を迅速に分解・処理すると考えられる。不活化菌体の投与前に比べ、投与後 1 時間および 3 時間後において GAS 細胞で発現上昇する 269 個の遺伝子が同定された。この中には、HSP70、HSP90 および T 細胞刺激分子である CD80 などが含まれていた。GAS 細胞と非吸着性白血球の共培養 15 時間および 24 時間後において、GATA3 遺伝子の発現レベルは対照区よりも不活化菌体投与区で統計的有意に上昇した。不活化菌体投与区では、共培養後に GAS 細胞を取り囲むようにリンパ球様細胞が結合するロゼット形成が観察された。また、蛍光免疫染色では、MHC クラス II のシグナルが GAS 細胞とリンパ球様細胞の接触面で観察され、免疫シナプスが形成されていると考えられた。以上のことから、GAS 細胞は細菌抗原を取り込んだ後、分解および抗原のプロセッシングを行い、T 細胞に対して抗原提示すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kato G.
2. 発表標題 Gill-epithelial antigen sampling cells in rainbow trout.
3. 学会等名 Animal Health Innovation Asia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihara K., Sano M., Kato G.
2. 発表標題 Detection of antigen specific IgM-secreting B-cells in the lymphoid organs after immersion and injection vaccination by ELISpot assay
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato G., Ikari Y., Franzke K., Yoshihara K., Yamaguchi T., Sano M., Fischer U.
2. 発表標題 Morphological properties of gill-epithelial antigen sampling (gas) cells in rainbow trout
3. 学会等名 3rd International Conference on Fish and Shellfish Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤豪司
2. 発表標題 GAS細胞を起点とする魚類独自の免疫機構
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会 (若手の会シンポジウム) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊月翔・碓 由紀・吉原康平・手塚旭美・吉永樹生・山口卓哉・Kati Franzke・Uwe Fischer・近藤秀裕・佐野元彦・加藤豪司
2. 発表標題 ニジマス鰓上皮抗原取込細胞の生理学的特徴
3. 学会等名 令和5年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山裕美子・伊月 翔・吉永樹生・山口卓哉・Uwe Fischer・近藤秀裕・佐野元彦・加藤豪司
2. 発表標題 ニジマス鰓上皮抗原取込細胞の抗原提示能について
3. 学会等名 令和5年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	フィッシャー ウーヴェ (Fischer Uwe)	フリードリヒロフラー研究所・Institute of Infectology・Head of Laboratory	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	タファラ カロリナ	アニマルヘルスリサーチセンター・Fish Immunology and Pathology Laboratory・Head of Laboratory	
	(Tafalla Carolina)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	Friedrich-Loeffler-Institut			
ドイツ	Friedrich-Loeffler-Institut			
スペイン	Animal Health Research Centre			