

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：23401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06019・19K21158

研究課題名(和文) 魚類の形質細胞の特性および分化機構の解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of teleost plasma cells

研究代表者

瀧澤 文雄 (Takizawa, Fumio)

福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号：60822913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：水産増養殖の現場では魚病対策としてワクチンの使用が進められており、抗体産生細胞である形質細胞の同定や誘導機構の解明が、より効果的なワクチンの開発につながる。本研究では、ニジマス¹の形質細胞の同定・分離に取り組み、IgMのみを発現しているIgM+/IgD⁻ B細胞が、IgM+/IgD⁺ B細胞に比べて、大型の細胞であると共に、細胞内のIgMと小胞体のより多く発現する形質細胞の特徴を有していることを明らかにした。さらに、この細胞がBlimp1などの形質細胞マーカーを発現していることから、IgM+/IgD⁻ B細胞が形質細胞から構成されていることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類のB細胞から形質細胞への分化機構はほとんど分かっておらず、ワクチン投与魚においても主要な抗体産生である形質細胞が誘導されているか分かっていない。そこで本研究は、ニジマスを用いて魚類の形質細胞の同定法を発見し、ヒトの形質細胞と同様な特徴を有していることを明らかにしたものである。本研究結果により、魚類におけるB細胞から形質細胞への分化機構の解析やワクチン投与魚における形質細胞の動態を調べることが可能になり、より効果的な水産用ワクチンの開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Vaccine is a fundamental component of disease prevention in aquaculture and is thought to work by inducing antibody capable of binding specifically to a pathogen. Plasma cells are main antibody-producing cells, which arise from B cells upon antigen stimulation. To isolate and characterize teleost plasma cells, we developed novel and reliable method to identify plasma cells in rainbow trout by using anti-trout IgM and anti-trout IgD antibodies in combination with cell size and endoplasmic reticulum. The plasma-like cells identified in this research exhibit dense nucleus and voluminous cytoplasm, characteristic morphology in human plasma cells. Moreover, they expressed high Blimp1 transcripts while low Pax5 transcripts, a master regulator of plasma cells and mature B cells, respectively. Thus, these findings revealed that teleost plasma cells possess characters similar to those in human and provide useful methods to identify plasma cells in teleost fish.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：抗体 形質細胞 B細胞 ニジマス 魚類

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水産増養殖の現場では、魚病対策としてワクチンによる予防接種が行われている。ワクチンは、一度免疫応答した異物が、再び侵入した時により早くより強い免疫応答を引き起こせるようにする免疫記憶を伴う獲得免疫の仕組みを利用している。獲得免疫のうち、B細胞から分化した形質細胞から産生される抗体が、病原体に対して特異的に結合し、排除する中心的な防御物質となり、つまり、B細胞から形質細胞への分化を促し、病原体に対する抗体の産生が有意に誘導させることが効果的なワクチンを開発するために重要である。

しかしながら、水産用ワクチンは、まだ一部の疾病に対して実用化されており、十分な抗体価の上昇が確認できないものもある。そのため、魚類の液性免疫の新たな知見を集積することが、より有効なワクチンを開発するために必須である。

魚類には、IgM、IgD および魚類特有の IgT の 3 種類の抗体が存在し、細胞表面に膜型の IgM と IgD を発現する IgM⁺/IgD⁺ B細胞と IgT のみ発現する IgT⁺ B細胞の主に 2 種類の B細胞が存在することが知られている(文献 1)。しかしながら、B細胞から分化した形質細胞の同定・分取する方法がなく、*in vitro* において IgM 抗体の産生能を評価することで、抗体産生細胞の評価を行っており、このうち IgM を高度に産生する細胞を B細胞から分化した形質細胞として評価していた。そのため、魚類の形質細胞への分化機構および同細胞の局在・分布などは殆ど分かっておらず、ワクチン開発の核心である液性免疫の誘導機構の解析の障害となっている。一方、哺乳類の形質細胞は、細胞質が大きく粗面小胞体に富むが、細胞表面に膜型の IgM、IgD や IgA などを発現していないと考えられていた。しかし、近年、ヒトやマウスの IgM や IgA を産生する形質細胞は、B細胞からの分化過程で IgD の発現は失うが、細胞表面の IgM や IgA の発現を保持している IgM⁺/IgD⁻ 形質細胞もしくは IgA⁺/IgD⁻ 形質細胞であることが分かってきた(文献 2)。そこで、魚類の IgM 産生形質細胞も、哺乳類と同様な膜型の IgM と IgD の発現パターン(IgM⁺/IgD⁻) である推測され、形質細胞に対する特異的な細胞表面マーカーが分かっていない魚類においても、IgM と IgD の細胞表面発現パターンで形質細胞の同定・分取が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

魚類形質細胞の分取法を開発し、その特性を明らかにすることにより、B細胞から形質細胞への分化機構の解明に繋がり、さらには抗体価の上昇を促す効果的なワクチン開発に寄与できると考えられる。そこで、本研究では、ニジマスの形質細胞を同定・分離し、その形態、表現型および機能などを解析することにより、魚類形質細胞の特性を明らかにする。また、本研究により確立された形質細胞の分離・同定法より、魚類の B細胞から形質細胞への分化および抗原特異的な抗体の産生機構および魚類液性免疫の誘導機構の解明を目指し、形質細胞への分化を促し、抗体価の上昇を誘導できる水産ワクチンの開発へ貢献できることが期待される。

3. 研究の方法

ニジマスは、IgM、IgD および IgT に対する認識するモノクローナル抗体が作製されている唯一の魚種である。そこで、これらモノクローナル抗体を用いて、ニジマスの B細胞と形質細胞を同定し、特性を調べるために以下の研究を行った。

(1) ニジマス白血球における細胞表面 BCR の多重染色

ニジマスの IgM、IgD および IgT に対するモノクローナル抗体を用いて、ニジマスの白血球を染色し、白血球中の各細胞表面 B細胞受容体(BCR)の発現をフローサイトメトリーにより解析し、B細胞亜集団の確認を行った。また、B細胞と形質細胞を特定するために、細胞の大きさや小胞体の発現量について同様にフローサイトメトリーにより確認した。

(2) ニジマス形質細胞における細胞表面 BCR の発現検討

形質細胞は細胞内の分泌型の免疫グロブリンを多く保持していることが知られている。そこで、白血球を固定および透過処理した後に、IgM⁺ B細胞における細胞内 IgM の発現を検討し、細胞内 IgM の発現量の異なる集団が存在する検討を行った。また、(1)と同様に B細胞と形質細胞を特定するために、細胞の大きさや小胞体の発現量について検討した。

(3) ニジマスの CD138 および Blimp1 遺伝子の単離

哺乳類では、CD138 が形質細胞のマーカーとして用いられている。また、B細胞から形質細胞への分化に関わる転写因子として Blimp1 が知られている。そこで、ニジマスにおいて、これら形質細胞の機能に関わる相同遺伝子を探索した。

(4) ニジマス形質細胞における遺伝子発現解析

(1)の実験の結果から IgM⁺/IgD⁺ および IgM⁺/IgD⁻ B細胞についてソーティングを行い、これら細胞集団について、細胞の形態と遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) ニジマス IgM⁺ B細胞には IgM⁺/IgD⁺ および IgM⁺/IgD⁻ B細胞が存在する

ニジマスの IgM および IgD を二重染色する方法を確立し、白血球中におけるこれら細胞表面

BCR の発現を精査したところ、IgM⁺/IgD⁺および IgM⁺/IgD⁻ B 細胞の同定に成功した。これら B 細胞の細胞径を確認したところ、IgM⁺/IgD⁻ B 細胞は通常のリンパ球および IgM⁺/IgD⁺ B 細胞より大型であることから形質細胞であることが示唆された。また、これら 2 つの B 細胞集団の小胞体の発現量を検討したところ、IgM⁺/IgD⁻ B 細胞の小胞体量は IgM⁺/IgD⁺ B 細胞よりも高度であることが明らかになった。

(2) IgM⁺/IgD⁻ B 細胞は細胞内 IgM を高度に発現している

哺乳類の形質細胞は、分泌型の抗体タンパク質を多量に保持し、その合成のための小胞体も多く有していることが知られている。そこで、(1)で同定した 2 つの B 細胞集団を固定・透過処理した後に、細胞内 IgM および小胞体の発現量を確認したところ、IgM⁺/IgD⁻ B 細胞は細胞内 IgM および小胞体を IgM⁺/IgD⁺ B 細胞よりも高度に発現していた。

(3) ニジマス Blimp1 遺伝子は 2 種類存在する

ニジマスのゲノムデータベースを精査したところ、ニジマスには Blimp1 遺伝子 (Blimp1-a, Blimp1-b) が 2 つ存在することが分かった。これら 2 つの Blimp1 遺伝子の cDNA クローニングを行ったところ、Blimp1-a および Blimp1-b の ORF はそれぞれ 2502bp と 2469bp からなり、833 残基および 822 残基のアミノ酸配列をコードしていることが分かった。両遺伝子とも、Blimp1 に特徴的なドメインを有し、哺乳類の Blimp1 の相同遺伝子であることが確かめられた。また、ニジマス CD138 遺伝子の ORF は、576 塩基からなり、191 残基のアミノ酸配列をコードしていた。

(4) ニジマス IgM⁺/IgD⁻ B 細胞は形態および遺伝子発現から形質細胞様の特徴を有している

これまでの結果から、IgM⁺/IgD⁻ B 細胞は細胞径の大きさおよび高度な小胞体の発現量から形質細胞であることが示唆されていることから、この細胞集団についてセルソーターを用いて分離を行い、細胞の形態および遺伝子発現について解析した。IgM⁺/IgD⁺ B 細胞は細胞質が少なく球形のリンパ球の形態をしているのに対して、IgM⁺/IgD⁻ B 細胞は核が偏在し、大きな細胞質を持っていた。また、遺伝子発現解析を行ったところ、IgM⁺/IgD⁺ B 細胞と比べて、IgM⁺/IgD⁻ B 細胞において形質細胞のマーカーである Blimp1 (Blimp1-a および Blimp1-b) が高度に発現している一方で、ナイーブ B 細胞で発現する PAX5 の発現量は弱かった。また、IgM⁺/IgD⁻ B 細胞は分泌型 *ighμ* 遺伝子も強く発現していた。

以上から、IgM⁺/IgD⁻ B 細胞は、主に形質細胞から構成されていることが強く示唆された。つまり、形質細胞のマーカー分子が見つからない魚類においても IgM および IgD の発現を確認することで形質細胞の同定・分離が可能になった。今後、この情報を活かして、ワクチン投与後の形質細胞の割合や抗原特異的抗体の産生能などの評価が可能となり、より詳細な形質細胞の特性の解明につながるとともに、魚類特有の抗体である IgT を産生する形質細胞の同定にも応用できることが期待される。

引用文献

Parra D, Takizawa F, Sunyer JO. Evolution of B cell immunity. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2013 Jan 1;1(1):65-97.

Pinto D, Montani E, Bolli M, Garavaglia G, Sallusto F, Lanzavecchia A, Jarrossay D. A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells. *Blood.* 2013 May 16;121(20):4110-4.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaguchi Takuya, Takizawa Fumio, Furihata Mitsuru, Soto-Lampe Veronica, Dijkstra Johannes M., Fischer Uwe	4. 巻 95
2. 論文標題 Teleost cytotoxic T cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fish & Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 422 ~ 439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsi.2019.10.041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Xu Zhen, Takizawa Fumio, Casadei Elisa, Shibasaki Yasuhiro, Ding Yang, Sauters Thomas J. C., Yu Yongyao, Salinas Irene, Sunyer J. Oriol	4. 巻 5
2. 論文標題 Specialization of mucosal immunoglobulins in pathogen control and microbiota homeostasis occurred early in vertebrate evolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 eaay3254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.aay3254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 0件／うち国際学会 11件）

1. 発表者名 Irene Salinas, Elisa Casadei, Fumio Takizawa, Yasuhiro Shibasaki, Oriol J Sunyer.
2. 発表標題 Interactions between microbiota and the teleost immune system in health and disease,
3. 学会等名 IMMUNOLOGY2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumio Takizawa, Zhen Xu, Yasuhiro SHibasaki, Elisa Casadei, Thomas Sauters, Scott LaPatra, Irene Salinas, J. Oriol Sunyer.
2. 発表標題 AN ESSENTIAL ROLE OF IGT IN PATHOGEN CONTROL AND COMMENSAL HOMEOSTASIS IN GUT AND GILL MUCOSAL SURFACES.
3. 学会等名 14th Congress of the ISDCI (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yang Ding, Yasuhiro Shibasaki, Jacob Paiano, Fumio Takizawa, Joel Wilmore, Daniella Gomez, David Allman, J. Oriol Sunyer.
2. 発表標題 AN EVOLUTIONARILY CONSERVED INNATE IMMUNE ROLE IDENTIFIED IN VERTEBRATE PLASMA CELLS.
3. 学会等名 14th Congress of the ISDCI (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhiro Shibasaki, Fumio Takizawa, Michael Gonzalez, Pierre Boudinot, J. Oriol Sunyer.
2. 発表標題 PERFORIN-EXPRESSING IGT+ B CELL WITH CYTOTOXIC ACTIVITY, A NOVEL PLAYER IN THE INNATE IMMUNE RESPONSE OF TELEOST FISH.
3. 学会等名 14th Congress of the ISDCI (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhiro Shibasaki, Tomas Korytor, Fumio Takizawa, Yang Ding, J. Oriol Sunyer.
2. 発表標題 IDENTIFICATION OF PRIMORDIAL SEMI-ORGANIZED LYMPHOID STRUCTURES IN TELEOST FISH.
3. 学会等名 14th Congress of the ISDCI (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yongyao Yu, Weiguang Kong, Xiaoting Zhang, Fen Dong, Zhenyu Huang, Shuai Dong, Yaxing Yin, Fumio Takizawa, J. Oriol Sunyer, Zhen Xu.
2. 発表標題 THE SWIMBLADDER PLAYS A PREVIOUSLY UNRECOGNIZED NEW FUNCTION IN MUCOSAL IMMUNITY.
3. 学会等名 14th Congress of the ISDCI (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 John D. Hansen, Fumio Takizawa, Irene Salinas, J. Oriol Sunyer.
2. 発表標題 COLLABORATIVE IMMUNE REAGENT NETWORK FOR AQUACULTURED SPECIES (CIRNAS) - AN UPDATE.
3. 学会等名 14th Congress of the ISDCI (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀧澤文雄・Zhen Xu・柴崎康宏・Yang Ding・Elisa Casadei・Irene Salinas・J. Oriol Sunyer
2. 発表標題 ニジマスIgTによる粘膜面の病原体感染および常在細菌叢の制御
3. 学会等名 第30回日本比較免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀧澤文雄・柴崎康宏・Zhen Xu・Susana Magadan・Pierre Boudinot・J. Oriol Sunyer
2. 発表標題 CD4-1 及び CD4-2 の発現様式による魚類ヘルパーT 細胞亜集団の同定
3. 学会等名 第30回日本比較免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀧澤文雄・Zhen Xu・Yang Ding・柴崎康宏・J. Oriol Sunyer
2. 発表標題 ニジマスIL-10の抗炎症作用及びYersinia ruckeri感染症における役割
3. 学会等名 平成30年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀧澤文雄・Zhen Xu・柴崎康宏・Yang Ding・J. Oriol Sunyer
2. 発表標題 ニジマスの鰓におけるIgTを中心とした液性免疫応答
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林忠弘・関澤大輝・小高智之・瀧澤文雄・末武弘章・宮台俊明
2. 発表標題 魚類特有の抗原捕捉の場メラノマクロファージセンターは増やせるか？
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会中部支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhiro Shibasaki, Fumio Takizawa, Michael Gonzalez, Pierre Boudinot, J. Oriol Sunyer.
2. 発表標題 DISCOVERY OF CYTOTOXIC KILLER IGT+ B CELLS IN FISH
3. 学会等名 8th North American Comparative Immunology Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiro Shibasaki, Fumio Takizawa, Yang Ding, Pierre Boudinot, Aleksei Krasnov, J. Oriol Sunyer
2. 発表標題 IDENTIFICATION OF PRIMORDIAL ORGANIZED LYMPHOID STRUCTURE IN THE SPLEEN OF TELEOST FISH
3. 学会等名 3rd INTERNATIONAL CONFERENCE ON FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiro Shibasaki, Fumio Takizawa, Yang Ding, Pierre Boudinot, J. Oriol Sunyer
2. 発表標題 PERFORIN-EXPRESSING IGT+ B CELL WITH CYTOTOXIC ACTIVITY, A NOVEL PLAYER IN THE INNATE IMMUNE RESPONSE OF TELEOST FISH
3. 学会等名 3rd INTERNATIONAL CONFERENCE ON FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 J. Oriol Sunyer, Yasuhiro Shibasaki, Fumio Takizawa, Michael Gonzalez, Pierre Boudinot.
2. 発表標題 Discovery of perforin-expressing killer B cells in vertebrates
3. 学会等名 IMMUNOLOGY2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 末武弘章・小高智之・瀧澤文雄・井戸篤史・西木一生・吉田照豊・宮台俊明
2. 発表標題 ニジマス海面養殖時に発生するピブリオ病
3. 学会等名 平成31年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧澤文雄・Zhen Xu・柴崎康宏・J. Oriol Sunyer
2. 発表標題 ニジマスのCD4+ マクロファージの同定および特性解析
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林忠弘・関澤大輝・小高智之・瀧澤文雄・宮台俊明・末武弘章
2. 発表標題 魚類メラノマクロファージの両能性
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林忠弘、関澤大輝、小高智之、瀧澤文雄、宮台俊明、末武弘章
2. 発表標題 真骨魚類の転写因子Spi-Cは哺乳類とは異なる機能を持つ
3. 学会等名 第 31 回日本比較免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林忠弘・関澤大輝・中山宙・小高智之・瀧澤文雄・宮台俊明・末武弘章
2. 発表標題 魚類特有の転写因子Spic-L
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 末武弘章・瀧澤文雄・宮台俊明
2. 発表標題 アニサキスの簡易迅速な種判別法の開発
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧澤文雄・Zhen Xu・Elisa Casadei・Irene Salinas・Yang Ding・柴崎康宏・J. Oriol Sunyer
2. 発表標題 ニジマスIgTによる鰓の常在細菌叢の制御
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田理沙・瀧澤文雄・猿田裕典・宮台俊明・末武弘章
2. 発表標題 ニジマスIgM+ 形質細胞の同定
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林忠弘・関澤大輝・中山宙・小高智之・瀧澤文雄・宮台俊明・末武弘章
2. 発表標題 メラノマクロファージは末梢血由来か？
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020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
---------	---------------------------	-----------------------	----