

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03061

研究課題名(和文) 鰓上皮抗原取込細胞の選択的な抗原取込機序の解明とワクチンデリバリーへの応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms for antigen uptake 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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、浸漬投与した不活化菌体を取り込むニジマスの鰓上皮抗原取込細胞(Gill-epithelial antigen sampling cell: GAS細胞)を同定している。そこで、本研究では、様々な細菌の不活化菌体を用いてGAS細胞の選択的な抗原取込能について詳細に検討した。GAS細胞は浸漬ワクチンとして使用されている魚病細菌は取り込むが、浸漬ワクチンとしては効果がないとされている魚病細菌および大腸菌は取り込まなかった。不活化菌体の浸漬ワクチンとしての有効性は、GAS細胞による取り込みの可否により重大な影響を受けると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりニジマスの鰓で浸漬ワクチンを取り込むGAS細胞が、特定の細菌主の身を取り込むことが明らかになった。このことは浸漬ワクチンが有効性を示す感染症と、ほとんど効果を示さない感染症があることの科学的裏付けになると考えられる。今回の研究では宿主側のレセプター分子および細菌側のリガンド分子の同定には至らなかったものの、今後引き続きこれら分子の同定を行うことで、魚類の新しい浸漬ワクチンデリバリーシステムの構築を行っていきたい。

研究成果の概要(英文)：Previously, we showed that gill epithelial antigen sampling (GAS) cells take up inactivated *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (A.s.s.) after immersion vaccination, while no uptake of polystyrene beads were observed. In this study, we investigated what kind of bacteria are taken up by GAS cells in the gill epithelium. GAS cells harboring inactivated bacteria were found in A.s.s.-vaccinated group, in *V. anguillarum*-vaccinated group, and in *Y. ruckeri*-vaccinated group. In contrast, a few, or no GAS cells positive for inactivated cells of *F. psychrophilum*, *S. iniae*, and *E. coli* were observed after Ex vivo immersion. In this way, GAS cells uptake the specific type of bacteria during immersion vaccination, suggesting that the cells are responsible for the mechanisms underlying efficacy of immersion vaccines.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：魚類免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

現在、水産用ワクチンは注射ワクチンが主流であるが、最近ではより簡便で安価な「魚を浸すワクチン(浸漬ワクチン)」開発の要望が高まっている。申請者らは、最近、浸漬投与されたワクチン抗原を鰓上皮で取り込む細胞：鰓上皮抗原取込細胞(GAS細胞)を世界に先駆けて同定した。本細胞は浸漬ワクチンとして効果のある不活化菌体は取り込むが、効果のないものは取り込まない。このことから、GAS細胞は選択的に不活化菌体を取り込み、魚類の粘膜免疫応答の起点となると考えられる。そこで、本研究では、GAS細胞の選択的な不活化菌体取り込みに関与するレセプター分子の同定を行い、その機能を解析する。また、同定したレセプター分子を標的としたワクチンデリバリーシステムの構築を試みる。本研究の成果は、より簡便で安価な魚類の新たな浸漬ワクチン技術の開発に大きく貢献すると考えられる。

哺乳類のM細胞はGP2分子により *Escherichia coli* や *Salmonella enterica* の 型線毛を認識することでこれら病原体を選択的に取り込む。哺乳類では、GP2に対するモノクローナル抗体をワクチンの「運び屋」として利用することで、M細胞を標的とした粘膜ワクチンの開発も行われている。一方、GAS細胞は浸漬投与で有効性の認められる *V. anguillarum*、*Y. ruckeri* および *A.s.s.*の不活化菌体を選択的に取り込む。しかし、これら不活化菌体に対するレセプターは同定されておらず、GAS細胞による選択的な抗原取込機序は不明である。GAS細胞のレセプター分子を同定することができれば、当該レセプターを標的としたワクチンデリバリーシステムの構築も可能だと考えられる。

近年、魚類でも粘膜免疫系の研究が盛んに行われるようになり、哺乳類同様に腸管粘膜の免疫系については研究成果が続々と報告されている。しかし、鰓は魚類および両生類に特徴的な器官であることから、研究が遅れており、その粘膜免疫系に関する知見は少ない。鰓上皮組織で抗原を取り込む GAS細胞は申請者らが世界に先駆けて発見・同定したものであり、国際的に大きな注目を集めている。また、GAS細胞に関する研究のノウハウを持っているのは申請者を代表とする国際共同研究グループのみであり、GAS細胞を起点とした免疫応答に関する研究についても引き続き世界をリードしていける。

本研究計画では、GAS細胞の選択的な抗原取込能に直接関与するレセプター分子を同定し、それを標的としたワクチンデリバリーシステムの構築を試みる。鰓粘膜でワクチン抗原を取り込む GAS細胞は魚類の浸漬ワクチン技術の理論的根拠とも言える。水産用ワクチンの浸漬投与法は経済性・簡便性に非常に優れており、水産増養殖分野では浸漬法の適用範囲を様々な感染症にまで広げることが世界的な喫緊の課題である。本研究成果により、ハンドリングストレスに弱い魚種(国内養殖魚種：アユ・マグロ)および魚価が低く注射ワクチンを使用できない魚種(東南アジア養殖魚種：ナマズ・コイ科魚類)など、どんな養殖魚にも投与できる魚類の新たなニードルフリーワクチンの開発が大きく進展すると考えられる。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、GAS細胞による選択的な抗原取込に関与するレセプター分子を同定する。さらに、これらレセプター分子による抗原取込機序の解明を行い、モノクローナル抗体を用いてレセプター分子を標的としたワクチンデリバリーシステムを構築する。

## 3. 研究の方法

M細胞のレセプターGP2は *E. coli* や *S. enterica* の 型線毛を認識する。GAS細胞により取り込まれる *A.s.s.*および *V. anguillarum* も 型線毛を持ち、これらは宿主細胞への接着に関与する。一方で、*Y. ruckeri* では細菌表面のLPSが宿主細胞との接着に関与する。本研究ではこれらのことを利用し、GAS細胞による選択的な抗原取込に関与するレセプターを網羅的に同定する。

- *A.s.s.*、*Vibrio anguillarum* および *Yersinia ruckeri*、*Flavobacterium psychrophilum* および *Streptococcus iniae*、および *Escherichia coli* を終濃度 0.3% のホルマリンで不活化し、SYT061 を用いて染色した。これらの不活化菌体を  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL となるように細胞培養用培地に懸濁し、ニジマスから採取した鰓を加えた。鰓上皮細胞を分散し、フローサイトメトリー解析に供した。
- *A.s.s.*、*Y. ruckeri* および *V. anguillarum* から LPS を抽出し、静電氣的または共有結合により磁気ビーズへの結合を試みた。
- *A.s.s.*、*Y. ruckeri* および *V. anguillarum* から膜タンパク質を抽出し、静電氣的または共有結合により磁気ビーズへ結合させた。これらビーズをニジマスの鰓に浸漬投与し、GAS細胞により取り込まれるかどうかフローサイトメトリーで解析した。
- *A.s.s.*、*Y. ruckeri* および *V. anguillarum* の 型線毛タンパク質について、大腸菌発現系を

用いて組換えタンパク質を作製し、静電的また共有結合により磁気ビーズに結合させる。以降、上記と同様にレセプター分子を同定する。

#### 4 . 研究成果

まず、GAS 細胞により取り込まれる細菌主の同定を目的に種々細菌の不活化菌体を浸漬投与し、フローサイトメトリーで取り込みの有無を確認した。その結果、*A.s.s.*、*V. anguillarum* および *Y. ruckeri* の不活化菌体は GAS 細胞により取り込まれるが、*F. psychrophilum*、*S. iniae* および *E. coli* の不活化菌体はほとんど取り込まれないことが分かった。そこで、*A.s.s.* の LPS を抽出し、蛍光マイクロビーズへの修飾を試みた。しかし、マイクロビーズに陽電荷を付加することが非常に困難であり、LPS 就職うビーズを得ることはできなかった。続いて、*A.s.s.* の膜タンパク質を抽出し、共有結合性反応を利用して蛍光ビーズへ修飾した。これらビーズをニジマスの鰓に浸漬投与して GAS 細胞による取り込みの有無をフローサイトメトリーで解析した。膜タンパク質コートビーズは GAS 細胞によりやや取り込まれるが、*A.s.s.* 不活化菌体の取り込みと比較してその取り込み量は低い結果となった。続いて、*A.s.s.* の I 型線毛タンパク質遺伝子 *FimF* および *TapB* の組換えタンパク質を作製し、それらを蛍光ビーズに結合させた。これらビーズをニジマスに浸漬投与したが、GAS 細胞による取り込みは確認されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Terumi Tezuka, Motohiko Sano, Goshi Kato
2. 発表標題 Identification of ligand molecules recognized by gill-epithelial antigen sampling (GAS) cells in rainbow trout
3. 学会等名 The Control of Aquatic Animal Diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細川瑞穂・手塚旭美・松本 萌・Uwe Fischer・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における選択的な取り込みに関する研究
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
---------------------------	-----------------------	----

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		