

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03075

研究課題名（和文）粘膜免疫活性化による魚類の記憶T細胞の誘導機構の解明

研究課題名（英文）Characterization of memory T cells generated by mucosal vaccinations in teleost fish.

研究代表者

杉本 智軌（Somamoto, Tomonori）

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：40403993

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）：本研究は硬骨魚類の鰓、皮膚、腸管、鼻腔といった粘膜リンパ組織に直接抗原を投与し、誘導されるT細胞およびB細胞の獲得免疫応答を評価した。腸管に直接抗原する経肛門挿管法は、養殖魚の主なワクチン投与方法である注射法よりも、迅速にかつ長期間、抗体産生応答を付与することができた。また、魚類の粘膜組織には、CD8陽性とCD4陽性T細胞が多顆粒球やマクロファージなどの自然免疫系の細胞よりも多く存在しており、T細胞は病原体の侵入門戸である粘膜組織において重要な役割を担っていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水産養殖において感染症による被害は甚大であり、ワクチンは最も効果的な感染症予防法だと考えられている。本研究では、魚の免疫機構の特徴を活かしたワクチンの開発を目的に粘膜組織への抗原投与による獲得免疫誘導機構を調査した。その結果、腸管に直接抗原する経肛門挿管法は、養殖魚の主なワクチン投与方法である注射法よりも、強力な獲得免疫を誘導することが可能であることを明らかにした。この成果は、今後、魚類の腸管免疫の活性化に着目した粘膜ワクチンの開発に貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：The present study demonstrated that adaptive immune responses of T- and B-cells induced by direct antigen administration to mucosal lymphoid tissues such as gills, skin, intestine, and nasal cavity of teleost fish. The anal intubation method, in which antigen was administered directly to the intestine, can confer strongest antigen-specific antibody responses more rapidly and for a longer period of time than the injection method, which the main method of vaccine administration in cultured fish. In addition, CD8- and CD4-positive T cells are more abundant in the mucosal tissues of fish than cells of the innate immune system, such as granulocytes and macrophages, suggesting that T cells play an important role in mucosal tissue where are the site for pathogen invasion.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：粘膜免疫 ギンブナ 型T細胞 型T細胞 ウイルス B細胞 ワクチン 抗体産生応答

1. 研究開始当初の背景

魚類は、体表、エラ、消化管など外界と接する器官がすべて粘膜に覆われおり、哺乳動物よりも強固な粘膜免疫システムを持っていると考えられている。パイエル板や胚中心などの二次リンパ組織を欠く硬骨魚類は、粘膜関連リンパ組織が、哺乳類の二次リンパ器官に相当する役割を持つことが示唆されている。エラ関連リンパ組織 (gill-associated lymphoid tissue: GIALT)、皮膚関連リンパ組織 (skin-associated lymphoid tissue: SALT)、腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue: GALT) や鼻腔関連リンパ組織 (nasopharynx-associated lymphoid tissue: NALT) の4種の組織が主な硬骨魚類の粘膜免疫組織だと考えられている (Salinas 2015)。

T細胞は免疫記憶を司る免疫細胞であり、獲得免疫系の中心的な役割を担っている。そのため、ワクチン効果を長期間持続させるためには、効率よく抗原特異的なT細胞を誘導し、記憶T細胞を体内に長期間滞在させることが重要である。哺乳類の記憶T細胞の集団は、リンパ組織を循環するセントラルメモリーT cell (TCM) や末梢組織を循環するエフェクターメモリーT細胞 (TEM)、さらに組織に移行したのち循環に戻ることなくその組織に長期間滞在し続ける組織常在型T細胞 (TRM) に分類される。その中でもTRMは、様々な非リンパ組織や消化管、皮膚、呼吸器や生殖器上皮などに滞在することから病原体の感染部位で第一線の防御として働き、長期にわたり生存することから、近年ワクチン開発研究において最も注目されている免疫細胞の一つである。

近年、ヒトの医療分野において、粘膜ワクチンは全身性の免疫だけでなく局所へも強い獲得免疫を付与することができるため、有望なワクチンとして注目されている。上述したように、魚類は全身が粘膜組織に覆われているため、強固な粘膜免疫システムを有すると考えられ、病原体の侵入門戸を待ち伏せをするTRMのような細胞は哺乳類よりも重要な役割を担っていると予想される。しかし、魚類の記憶T細胞の研究は、in vivoでのT細胞追跡システムが確立されていないことから、魚類のTRMのみならず記憶T細胞は同定されておらず、上記のような循環型と組織滞常在型の記憶T細胞が存在するのかわかっていない。

2. 研究の目的

本研究は、強固な粘膜免疫を有する硬骨魚類は、粘膜ワクチンによって長い免疫記憶能を獲得でき、組織常在型の記憶T細胞を効率よく誘導できるという仮説のもと、魚類の各粘膜組織に直接抗原を接種したときの獲得免疫応答を解析するとともに、記憶T細胞やB細胞の存在を示し、粘膜からの抗原取り込みによる免疫記憶の成立機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 魚類の粘膜の獲得免疫応答を調べるためには、IgMだけではなく、粘膜で働く魚類特有の抗体であるIgTの産生応答を確かめる必要がある。そこで、抗ギンブナIgT抗体の作製を試みた。まず、ギンブナIgTの遺伝子を同定し、pColdIベクターに導入し、大腸菌による組換えタンパク質を作製して精製した。それをウサギに免疫し抗血清を作製した。得られた抗血清から精製したIgGが、ギンブナ血清および粘液のIgTを検出できるかをウエスタンブロッティングおよびELISAで確かめた。

(2) 粘膜T細胞を分類するために、ギンブナのT細胞受容体のTCRの α 、 β 、 γ および δ 鎖の遺伝子を同定し、各粘膜組織(エラ、腸管、鼻腔、鰭、)とその他のリンパ組織(胸腺、脾臓、腎臓など)におけるmRNAの発現量をリアルタイムqPCRによって測定した。さらにタンパク質レベルで $\alpha\beta$ 型と $\gamma\delta$ 型T細胞の分布を調べるため、TCR β 鎖と δ 鎖の細胞外ドメインからペプチド抗原を設計し、それらを免疫原としてウサギに接種し抗血清を作製した。得られた血清から精製した抗ギンブナTCRウサギIgGを用いて、各組織におけるTCRの発現をウエスタンブロッティングによって解析した。

また、粘膜組織および腎臓におけるCD8⁺T細胞とCD4⁺T細胞や他の白血球の割合をフローサイトメトリーで解析した。

(3) ギンブナに致死量以下 (5.5×10^5 TCID₅₀/50g 魚体重) のギンブナ造血器壊死ウイルス (Crucian carp Haematopoietic Necrosis Virus: CHNV) を25日毎に3回、鰓、鼻腔、皮膚、腸に直接投与 (図1; Somamoto and Nakanishi 2020) または腹腔内に注射し、一次投与後70日間飼育した。コントロール区は全ての投与箇所へPBSを投与した。また、週に一度血清を分離し、抗ギンブナIgMとIgT抗体を用いたELISA法でCHNV特異的IgM、IgTを測定することにより、投与前と投与後の血清中の抗体量の推移、および異なる試験区間でのCHNV特異的IgM、IgT量を比較した。

次に、上記の実験の結果を受け、効果的な免疫投与部位として腸に着目した。CHNVをそれぞれ

れ腹腔注射、腸投与したギンブナから取り出した腸と体腎を PBS 中でホモジナイズし、組織破砕液の上清中の CHNV 特異的 IgM、IgT を ELISA 法で測定し、組織に局在する IgM、IgT の産生量を調べた。さらに B 細胞が抗体産生細胞へ分化する過程に必須の因子である転写抑制因子 Blimp-1 の腸と体腎における発現量をリアルタイム PCR で調べた。

CHNV で免疫後、組織を培養し、CHNV で再刺激することで、培養上清中に抗体が産生されるかを調べることで、組織に滞在する記憶 B 細胞の存在を確かめた。最終免疫から 52 日後にコントロール区、腹腔注射区、腸投与区の腸と体腎の組織片を採取し、腸は、それぞれ 3 つに切り分け、PBS が入ったチューブに浸した。腸を 3 つに切り分ける際、口側、肛門側の組織がそれぞれのチューブに均等に含まれるようにした。CHNV を加えて培養し、培養 3 日後、7 日後に回収した上清中の CHNV 特異的 IgM、IgT の存在を調べた。

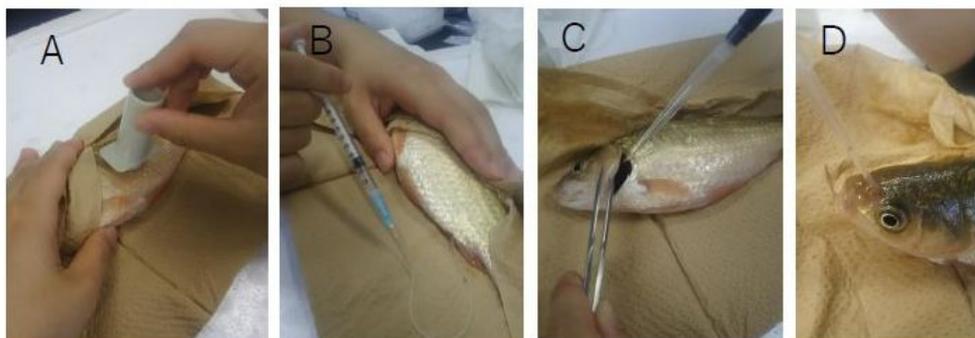


図1.粘膜リンパ組織直接投与法（標的組織）：A スタンプ法（SALT）
B 経肛門挿管法(GALT) C 経鰓投与法(GIALT), D 経鼻腔投与法(NALT)

4. 研究成果

(1) ギンブナ IgT の検出

ゲルろ過クロマトグラフィーで分画した血清をサンプルとして、作製した抗ギンブナ IgT ウサギ抗体を用いた ELISA 実施したところ、IgT が含まれると予想されるフラクションにおいて吸光度が上昇した。また、体表粘液サンプルを同様の ELISA に供試したところ、粘液濃度に依存して吸光度が上昇した。また、同抗体を用いたウエスタンブロッティング解析によって、血清中のギンブナ IgT 重鎖に相当するバンド（分子量 70K）を検出した（図2）。以上の結果から、作製した抗体は、ギンブナの粘液および血清中の IgT を特異的に検出することが可能であることが示された。

(2) 粘膜 T 細胞の亜集団の分布

qPCR の結果、TCR の α 、 β 、 γ および δ は、胸腺、脾臓などのリンパ組織と同様に各粘膜組織で発現しており、すべてで同じような発現パターンを示したことから、 $\alpha\beta$ 型 T 細胞と $\gamma\delta$ 型 T 細胞は、各粘膜組織に同じような割合で分布していると推測される。また、抗ギンブナ TCR β 鎖抗体を用いたウエスタンブロッティング解析の結果、TCR β 鎖と予想される分子量 34K にメインのバンドが見られ、胸腺、脾臓、皮膚、エラなどで TCR β 鎖が発現していることが分かった。しかしながら、今回作製した抗ギンブナ TCR δ 鎖に対する抗体は、非特異的な結合がみられ、ギンブナ TCR δ 鎖を特異的に検出するツールとして利用できなかった。

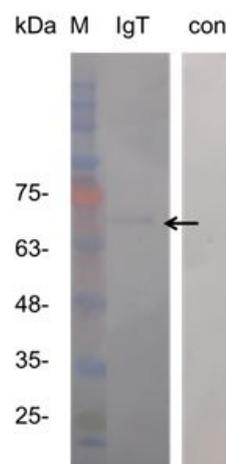


図2. 抗ギンブナIgT抗体を用いたウエスタンブロッティングによる血清IgTの検出。矢印はIgTのH鎖を示している。

CD8⁺T 細胞と CD4⁺T 細胞は、すべての粘膜器官に存在しており、その割合は、腎臓の割合と比べて高かった。その中でも腸管では CD8⁺T 細胞が多く、その他の粘膜器官では CD4⁺T 細胞が多かった。粘膜組織における T 細胞の割合は、マクロファージや顆粒球と比較して高かった（図3）。以上の結果から、粘膜組織において T 細胞は重要な細胞であることが示唆された。

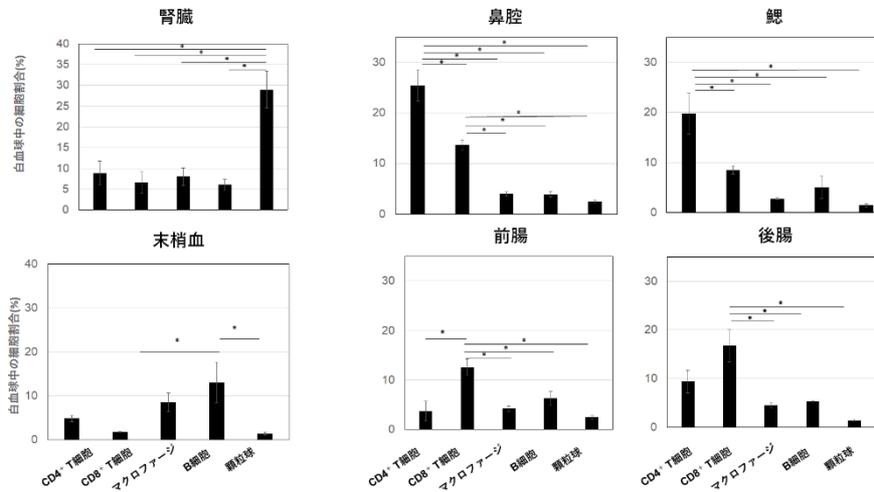


図3. 粘膜組織（鼻腔、鰓、前腸、後腸）と腎臓、末梢血における白血球の割合。* $p < 0.05$

(3) 粘膜リンパ組織直接投与法による獲得免疫応答

経肛門挿管法は、他の粘膜組織投与法（経鰓投与、経鼻腔投与法、スタンプ法）と比較して、最も迅速にかつ長期間（70日間以上）CHNV 特異的 IgM 産生応答を誘導した。腹腔内注射法と比較しても効率よく二次応答を誘導し、測定した期間すべてで、より高い特異抗体産生量を示した。経鰓投与、経鼻腔投与法、スタンプ法は、一時的に CHNV 特異的 IgM 量は増加するものの有意な特異抗体産生の上昇は確認できなかった。以上の結果から、腸管への抗原投与は最も効果的に全身性の抗体産生応答を誘導し、かつ長期にわたり免疫記憶を付与できる粘膜抗原投与法であることが明らかとなった（図4）。

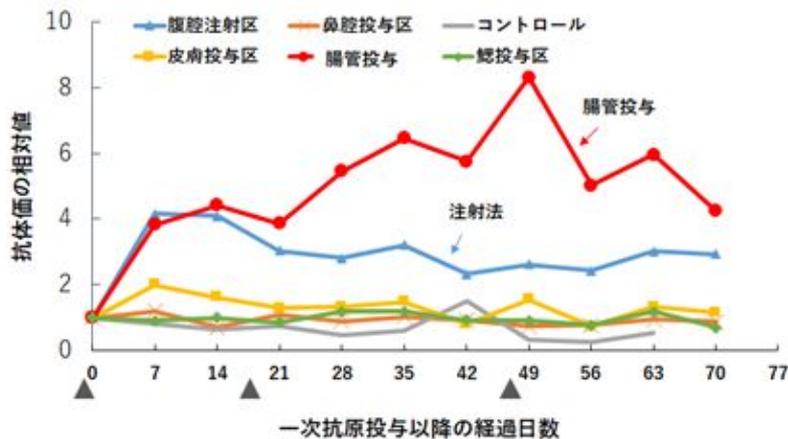


図4. ギンブナの粘膜組織に直接抗原を投与したときの抗体産生応答。矢頭(▲)は抗原投与日を示す。

さらに、注射法と経肛門挿管法に着目し、血清中および腎臓と腸管のホモジナイズ液の IgM と IgT の特異抗体産生量を比較したところ、血清では IgM の高い抗体価が得られた一方で、IgT は検出限界以下であった。また、腹腔注射区の体腎において IgM の抗体価が有意に高かったが、IgT では差はみられなかった。腸管投与区では、血液中への抗体の上昇はみられたが、腎臓と腸管中の IgM と IgT 量に変化はなかった。腸管投与区において有意な変化がみられたのは IgM であり、局所で応答すると予想された IgT の産生応答はみられなかったことから、ギンブナでは局所免疫においても IgM が主要な役割を担っていることが示唆された。Blimp-1 の両投与区において有意な増加はみられなかった。腹腔内接種において、腸管における抗体産生応答が誘導され、経肛門挿管法においては、血中に特異 IgM 産生の上昇がみられたことは以外な結果であり、魚類のワクチン投与の違いによる免疫機構を示す新しいメカニズムが分かるかもしれない。

CHNV 腹腔内接種の最終免疫から 52 日後のギンブナの腸と体腎の組織片を CHNV で刺激したところ、体腎細胞で有意に IgT が産生されたことは、腎臓における粘膜 IgT 陽性メモリー B 細胞の存在を示唆している（図5）。

本研究では、粘膜組織におけるメモリーT細胞の分類や同定するに至らなかった。本研究によって、粘膜組織にT細胞が豊富に存在すること、CHNVの腸管感作後に全身性の獲得免疫が誘導されることが明らかとなり、今後、ギンプナとCHNVを用いることによって、粘膜組織中のメモリーT細胞が分類、同定および機能解明が期待できる。

また、経肛門挿管法が最も効果的な抗原投与方法であったことから、より簡便に肛門から抗原を投与方法や器具の開発など、養殖場への腸管粘膜ワクチンの実用化を目指した研究開発が期待される。

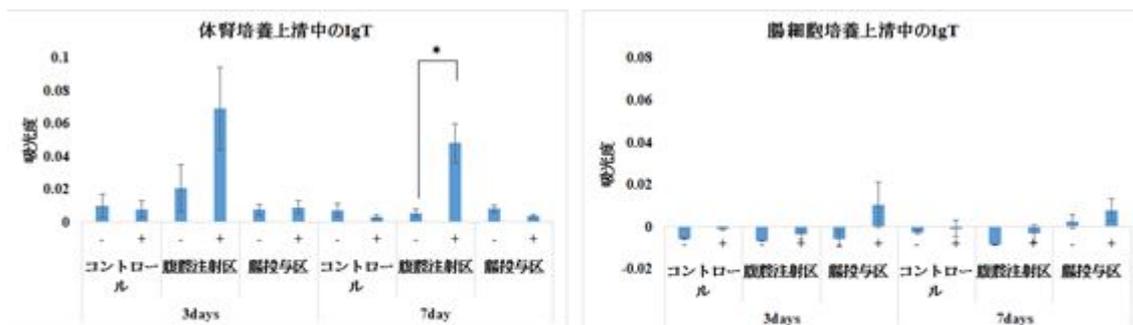


図5 腹腔投与区および腸管投与区の組織にCHNVを添加(+)および無添加(-)し、3、7日間培養した上清の特異IgT抗体量。*P<0.05

研究成果の要約

1) 腸管への抗原を直接投与する経肛門挿管法は、養殖魚の主なワクチン投与方法である注射法よりも、強力な獲得免疫を誘導することができる。

2) 抗ギンプナIgT抗体を用いることによって、血清と粘液からギンプナIgTを検出することができた。しかしながら、粘膜抗原感作によるCHNV特異的IgTの産生応答は誘導されなかった。

3) 魚類の粘膜組織には、リンパ球が豊富に存在し、特にCD8陽性とCD4陽性T細胞が多く存在していた。顆粒球やマクロファージなどの自然免疫系の細胞よりも有意に高ことから、T細胞は病原体の侵入門戸である粘膜組織において重要な役割を担っていると考えられる。

<引用文献>

Salinas I. The mucosal immune system of teleost fish. *Biology (Basel)*. (2015) 12:525-39. doi: 10.3390/biology4030525.

Somamoto T, Nakanishi T. Mucosal delivery of fish vaccines: Local and systemic immunity following mucosal immunisations. *Fish Shellfish Immunol*. (2020) 99:199-207. doi: 10.1016/j.fsi.2020.01.005.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiota K, Sukeda M, Prakasha H, Kondo M, Nakanishi T, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T.	4. 巻 118
2. 論文標題 Local immune responses to two stages of Ichthyophthirius multifiliis in ginbuna crucian carp	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fish and Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 19-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fsi.2021.08.013	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 -
1. 著者名 Tomonori Somamoto, Teruyuki Nakanishi	4. 巻 99
2. 論文標題 Mucosal delivery of fish vaccines: Local and systemic immunity following mucosal immunisations.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fish and Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 199-207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fsi.2020.01.005	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 -
1. 著者名 Masaki Sukeda, Koumei Shiota, Masakazu Kondo, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Tomonori Somamoto	4. 巻 115
2. 論文標題 Innate cell-mediated cytotoxicity of CD8+ T cells against the protozoan parasite Ichthyophthirius multifiliis in the ginbuna crucian carp, Carassius auratus langsdorfii.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental and Comparative Immunology	6. 最初と最後の頁 103886
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dci.2020.103886.	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 -
1. 著者名 Shintaro Matsui, Sota Yoshikawa, Shigenori Suzuki, Tomonori Somamoto, Atsushi Yamamoto, Osamu Nakamura, Shigeyuki Tsutsui	4. 巻 126
2. 論文標題 Expression profile of kalliklectin, a soluble-type mannose receptor, during embryogenesis and early larval development in fugu (Takifugu rubripes)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 129-135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molimm.2020.07.022	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 -

1. 著者名 杉本智軌	4. 巻 7
2. 論文標題 魚類の粘膜を介したワクチン投与法	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アクアネット	6. 最初と最後の頁 54-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 杉本智軌	4. 巻 58
2. 論文標題 魚類の病原体に対する細胞性免疫に関する研究	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 魚病研究 (Fish Pathology)	6. 最初と最後の頁 113-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Sukeda M, Prakash H, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T.	4. 巻 139
2. 論文標題 Non-specific cytotoxic cell receptor protein-1 (NCCRP-1) is involved in anti-parasite innate CD8+ T cell-mediated cytotoxicity in ginbuna crucian carp	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Fish and Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 108904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsi.2023.108904	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉本 智軌
2. 発表標題 魚類の病原体に対する細胞性免疫に関する研究
3. 学会等名 日本魚病学会春季大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Thu Trang Tran, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Tomonori Somamoto
2. 発表標題 Differential expression of two CD83 isotypes in monocyte-macrophage lineage in ginbuna crucian carp
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森岡拓也・趙舸・長澤貴宏・中尾実樹・杣本智軌
2. 発表標題 ギンブナの粘膜T細胞の自然免疫機能
3. 学会等名 日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Thu Trang Tran, Harsha Prakash, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Tomonori Somamoto
2. 発表標題 Characterization of CD83 isotypes expressed in monocyte and monocyte-derived dendritic-like cells in ginbuna crucian carp
3. 学会等名 日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阪中晴子、長澤貴宏、中尾実樹、杣本智軌、
2. 発表標題 粘膜組織を介した抗原投与法の違いによるギンブナ抗体産生応答の比較
3. 学会等名 日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 呉雨、長澤貴宏、中尾実樹、杣本智軌
2. 発表標題 Exploration of antigen-trapping sites in ginbuna crucian carp
3. 学会等名 日本水産学会九州支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野倫一、松浦雄太、梅田剛佑、吉野友晃、中西照幸、松山知正、杣本智軌
2. 発表標題 フナ造血器壊死ウイルス（CHNV）に対するDNAワクチン
3. 学会等名 日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 助田将樹、長澤貴宏、中尾実樹、杣本智軌
2. 発表標題 魚類CD8+ T細胞のMHC非依存的な細胞媒介性細胞傷害における寄生原虫認識受容体の探索
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高井優生、助田将樹、高村匠、長野陽介、島崎洋平、杣本智軌、大嶋雄治
2. 発表標題 魚類リポカリンタンパク質 TBT-bp2 破壊メダカにおける白点虫感染機構の解析
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杣本智軌
2. 発表標題 硬骨魚類の病原体に対する細胞性免疫機構
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会九州支部大会・ミニシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tran Thu Trang, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, TomonoTran Thu Trang, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Tomonori Somamoto
2. 発表標題 Characterization of CD83 isotypes expressed on monocyte-macrophage lineage in ginbuna crucian carp
3. 学会等名 15th Congress of the International Society for Developmental and Comparative Immunology (ISDCI)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tran Thu Trang, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Tomonori Somamoto
2. 発表標題 Expression of CD83 isotypes during the differentiation of monocyte-macrophage lineage in ginbuna crucian carp
3. 学会等名 日本比較免疫学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浅沼里利香、長澤貴宏、中尾実樹、杣本智軌
2. 発表標題 ギンブナ後腸部に存在する嚢状組織のリンパ組織としての特性
3. 学会等名 日本比較免疫学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tran Thu Trang, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Tomonori Somamoto
2. 発表標題 The expression of CD83 homologs on macrophage subpopulations isolated from brain and kidney in ginbuna crucian carp
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2024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
---------	---------