

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06243

研究課題名(和文) GFP-クローンギンブナを用いた魚類獲得免疫機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of teleost acquired immune responses using GFP clonal ginbuna carp

研究代表者

森友 忠昭 (MORITOMO, Tadaaki)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20239677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：三倍体ギンブナ(*Carassius auratus langsdorfii*) は雌性発生にて子孫を残すため、一尾の母親由来の子孫はすべてクローンと考えられる。今回、我々はGFP遺伝子組換えギンブナ(GFP魚)を作製し、真骨魚類の造血・リンパ器官である腎臓からGFP陽性白血球を分離し、野生型ギンブナに移植した。移植180日後に野生型ギンブナの血液白血球を調べたところ、赤血球以外の血球(顆粒球、リンパ球、単球)がGFP陽性血球に置き換わっていた。これらから、GFPギンブナをドナーとして野生型をレシピエントとする移植実験系を用いることにより、造血幹細胞や免疫細胞の機能解析に有用であることを示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真骨魚類の免疫系は哺乳類の免疫系と似ている。例えば、真骨魚類もヘルパーT細胞、キラーT細胞、B細胞そして免疫グロブリンなどを有する。しかし、真骨魚類は変温動物であり、低温では免疫記憶も形成されない。また、真骨魚類にはリンパ節に相当する抹梢リンパ器官も存在しないなど、異なるところも多い。今回、我々が作製したGFPクローンギンブナの血球は野生型のギンブナに細胞移植しても、拒絶反応を起こさず、自らの白血球と同様に機能できた。これらのことは、獲得免疫系を構成する細胞の体内動態や免疫記憶の存在証明などの解明に役立つと考えられる。このように本研究は従来にない、新たな研究手法を魚類免疫分野に提供できる。

研究成果の概要(英文)：Triploid ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorfii*) reproduce gynogenetically in nature and its progeny are clones, so that allow cell transfer studies to examine the role of immune cells. We here generated a clonal ginbuna transgenic line that expresses constitutive green fluorescent protein (GFP). Flow cytometry analysis of peripheral leukocytes revealed that all leukocyte populations in the F1 and F2 fish exhibited GFP expression. Then, cell transplantation was performed using the transgenic OB1 as donor and wild type OB1 as recipient. Transplantation of GFP + kidney hematopoietic cells to the wild types lethally irradiated resulted in all leukocyte replacement by GFP+ cells and long-term hematopoietic reconstitution for over 180 days, indicating no immune response between the donor and the recipient cells. Together, this transgenic line can be useful for studies on the dynamics of stem cells and immune cells with experimental transplantation.

研究分野：獣医学

キーワード：魚類 獲得免疫 ワクチン 免疫細胞

1. 研究開始当初の背景

魚類(真骨魚類)は、哺乳類と同様、T細胞やB細胞からなる獲得免疫機構を有し、ヘルパーT細胞、キラーT細胞、IgM産生B細胞およびIgT産生B細胞などのリンパ球亜集団の存在もわかっている。しかし、これらリンパ球が産生される場(一次リンパ器官)や、リンパ球が病原体などの抗原と反応する場(二次リンパ器官)は異なるところが多い。例えば、哺乳類の一次リンパ器官は、骨髄および胸腺だが、多くの魚類では腎臓および胸腺である。また、哺乳類の二次リンパ器官は脾臓・粘膜関連リンパ組織・リンパ節など、体の要所々々に配置されているのに対して、魚類では腎臓や脾臓以外に明確なリンパ組織は認められない。このように、魚類は、基本的な免疫機構は多くの点で類似しているが、異なるところも多い。このことは、魚病ワクチンの開発において、単に哺乳類の免疫系にそった理解や解釈を当てはめるだけでは無く、魚類の獲得免疫系を構成する細胞やそれら細胞が反応する場などの魚類免疫系の特徴を知る必要がある。

2. 研究の目的

クローンギンブナ (*Carassius auratus langsdorfi*)は、天然で雌性発生を行うため、その子孫は全て遺伝的に均一なクローンである。従って、同系統間での細胞移植において免疫拒絶を起こさないことから、魚類免疫細胞の動態解析のモデルとして期待される。そこで本研究では、ドナー細胞をレシピエント体内で識別可能にするため、緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入したトランスジェニック・クローンギンブナの作出とその系統の確立を試みた。

3. 研究の方法

国立遺伝学研究所の川上先生より供与されたトランスポゾンベクター (pT2AL200R150G) と Tol2 転移酵素をコードする mRNA を受精直後の胚に微量顕微注入した。注入後のギンブナ仔魚について、蛍光顕微鏡下で緑色蛍光の強弱を確認し、F0 世代における遺伝導入率を算出した。また、F1 および F2 世代への導入遺伝子の伝達を調べるために、蛍光顕微鏡下での胚の観察およびフローサイトメトリー (FCM) による末梢血白血球の解析を行った。

4. 研究成果

蛍光顕微鏡下にて F0 稚魚を観察すると、GFP を高度に発現するキメラ個体が多かったことから、効率よく GFP 遺伝子が導入されたことが示された。また、F0 世代において GFP 強陽性となったギンブナ 1 尾から得られた F1 は 14.9 %、F1 から得られた F2 では 100 % の割合で GFP 陽性個体が多かった。さらに、これら F1 および F2 世代の末梢血白血球を FCM において解析したところ、赤血球を除くすべての血球が GFP 陽性であることがわかった。ま

た、どの個体においても平均蛍光強度に大きな差はなかった。これらから、クローン生殖を行うギンブナでは、一様に GFP 遺伝子が受け渡されており、トランスジェニック系統の確立が容易であることが示された。

次に、これら GFP トランスジェニックギンブナから腎臓造血細胞を分離し、事前に致死量の X 線照射を行った同系統の野生型ギンブナに移植したところ、移植 30 日後には約半分の白血球（顆粒球，単球，リンパ球および栓球）が GFP 陽性細胞に置き換わっており、そして移植 60 日後にはほぼすべての白血球が GFP 陽性細胞となっていた。現在、移植 120 日後を経ても、拒絶反応や移植細胞による宿主への免疫反応（移植片対宿主反応）は見られていない。

以上から、今回、我々が作製した GFP トランスジェニックギンブナをドナーとして、同系の野生型ギンブナをレシピエントとした移植実験は抗原特異的なリンパ球のみならず免疫記憶リンパ球の動態解明に極めて有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 森友忠昭・片倉文彦	4. 巻 622
2. 論文標題 魚類の免疫機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日生研たより	6. 最初と最後の頁 3-12
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 該当する
1. 著者名 Nishiya Kohei, Sawada Mai, Dijkstra Johannes M., Miyamae Jiro, Okano Masaharu, Katakura Fumihiko, Moritomo Tadaaki	4. 巻 108
2. 論文標題 A fish cytokine related to human IL-3, IL-5, and GM-CSF, induces development of eosinophil/basophil/mast-cell type (EBM) granulocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental & Comparative Immunology	6. 最初と最後の頁 103671 ~ 103671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dci.2020.103671	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 Okano Masaharu, Miyamae Jiro, Suzuki Shingo, Nishiya Kohei, Katakura Fumihiko, Kulski Jerzy K., Moritomo Tadaaki, Shiina Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of Novel Alleles and Structural Haplotypes of Major Histocompatibility Complex Class I and DRB Genes in Domestic Cat (<i>Felis catus</i>) by a Newly Developed NGS-Based Genotyping Method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgene.2020.00750	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 SATO Keita, MIYAMAE Jiro, SAKAI Manabu, OKANO Masaharu, KATAKURA Fumihiko, SHIBUYA Hisashi, NAKAYAMA Tomohiro, MORITOMO Tadaaki	4. 巻 82
2. 論文標題 The utility of DLA typing for transplantation medicine in canine models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1138 ~ 1145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.20-0142	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0件

〔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
---------	---------