

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 30日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780199

研究課題名（和文）サイトカインネットワークを利用した魚病診断法の確立

研究課題名（英文）Establishment of fish disease diagnosis using cytokine network

研究代表者

河野 智哉（KONO TOMOYA）

宮崎大学・IR推進機構・助教

研究者番号：60527547

研究成果の概要（和文）：19種類のサイトカイン遺伝子をターゲットとしたマルチプレックスシステムを構築し、病原体成分または病原細菌接種時のトラフグにおけるサイトカイン遺伝子の発現動態を解析した。その結果、全ての試験において炎症性サイトカインの発現増加が認められた。さらに、ウイルス疑似核酸物質による刺激においてのみ、I-IFNの顕著な増加が認められた。続いて、病原細菌または寄生虫感染時の腎臓におけるIL-10、IL-17/AF1、IFN- γ 、IL-4/13の発現動態を解析した。細菌感染時は全てのサイトカインについて産生の増加が認められた。また、寄生虫感染時も同様の傾向を示したが、特にIL-4/13の産生が顕著に増加することが確認された。続いて細胞内サイトカインの検出を試み、IFN- γ 産生細胞の検出技術の構築に成功した。当該技術によって、末梢血白血球中のIFN- γ 産生Th細胞は病原体構成成分での刺激によって増加することが確認された。

研究成果の概要（英文）：The multiplex RT-PCR assay targeting 19 cytokine genes was constructed and the expression of cytokine genes in *Fugu* in response to immunostimulants or pathogenic bacteria infection was analyzed using this method. As results, increased expression of pro-inflammatory cytokines was observed in all the experiments. Moreover, the increase in I-IFN gene expression was confirmed only by stimulation with viral mimic polyI:C. Next, production of IL-10, IL-17A/F1, IFN- γ and IL-4/13 was analyzed in the kidney of *Fugu* infected with pathogenic bacteria or parasite. The production of all cytokines analyzed was increased by the bacterial infection. Although similar production pattern was confirmed in parasite infection also, especially a conspicuous increase in IL-4/13 level was recorded. Next, the detection method for intracellular cytokine was established and it enabled us to detect IFN- γ producing cells. Using this method, we found the increased number of IFN- γ producing cells in peripheral blood leucocytes in the stimulation with bacterial component.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,00	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：魚病、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

サイトカインは、免疫系を刺激するシグナル因子としての働きが重要で、抗原提示を受けた未分化のヘルパーT細胞：Th0細胞

を、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞などのエフェクター細胞に分化させ、さらにそれぞれのサブセットは、特定のサイトカインを産生する。Th1系のサイトカインで活性化を

受けた免疫系は、抗細菌(細胞内増殖性)免疫や抗ウイルス免疫を、Th2系のサイトカインの場合は抗寄生虫免疫やアレルギー応答を、Th17系サイトカインは抗細菌(細胞外増殖性)免疫や抗真菌免疫を誘導することが哺乳類において知られている。しかしながら、魚類において、このようなサイトカインによる免疫応答の方向付けが存在するかは不明である。

魚類におけるサイトカインの探索は、1990年代後半から様々な手法により行われてきたが、他の脊椎動物で既報のサイトカインとの相同性は低く、同定作業は困難を極めた。しかし、2002年のフグゲノムデータベースの公開に伴い、魚類におけるサイトカイン遺伝子の分離は飛躍的に加速した。これまでに我々も、急性炎症反応に関与するTNFやIL-6、リンパ球の増殖を活性化するIL-2、リンパ球の炎症部位への遊走を誘起するケモカイン、B細胞の増殖に関与するIL-7などのサイトカインを同定している。しかしながら、哺乳類で知られるサイトカインについて、魚類では未だに分離されていないものがあること、また、分離されたサイトカインについても機能面の解析が進んでいないことから、魚類の免疫応答の解明は哺乳類と比べ進んでいない。

日本の水産業には様々な形態があるが、中でも特に増やす漁業にあたる増養殖業が近年注目を集めている。マグロ養殖の成功は一つの好例であるが、これは食糧問題ばかりでなく、資源保護の観点からも大きな一歩を踏み出したと言える。しかしながら、限られたスペースで養殖される魚類は、常にストレス下におかれており、病原体に対する感受性が高まっている。これまで、細菌やウイルス性の疾病に対し、抗生物質やワクチンの投与が行われてきたが、魚類の免疫に対する知見の乏しさから根本的な解決には至っていない。

2. 研究の目的

サイトカインを分子指標として、魚類における免疫応答の方向付けを理解し、さらに、これを利用した新しい魚病診断法の確立を試みる。

3. 研究の方法

本研究では、1) 遺伝子、2) タンパク質および3) 細胞レベルでの魚病診断技術の確立を目指す。

1) 遺伝子レベルでの魚病診断法の確立

遺伝子レベルでの診断法の確立には、マルチプレックス遺伝子発現定量解析システム(ベックマン・コールター社、GenomeLab

GeXP)を利用する。本法は、キメラプライマー(ターゲット特異配列+ユニバーサル配列)を利用し、1stステップとしてターゲット特異配列部分で mRNA の逆転写を行い、特異的なcDNAを合成する。続いて、ユニバーサル配列部位でPCRテンプレートが増幅されるため、プライマーによる発現のバイアスがかからず、リアルタイムPCRと比較しても、特異性と感度の面で非常に優れている。さらに、一回の解析で最大30遺伝子を同時に解析できるというメリットがある。当該方法を利用し、サイトカイン遺伝子の発現定量解析法を確立することで、これを魚病診断に応用する。ターゲットには、Th細胞の分化および免疫応答の方向付けに関与するインターロイキン(IL)ファミリー(IL-4, 6, 10, 12, 13, 17, 23)、インターフェロン(IFN)- γ 、トランスフォーミング増殖因子(TGF)- β 遺伝子などに加え、炎症促進性のサイトカインであるIL-1 β 、腫瘍壊死因子(TNF)- α 遺伝子、Th細胞の分化を調節する転写因子(T-bet, GATA3, FoxP3 遺伝子)などを候補としている。

続いて、①疑似病原体感染モデル、②病原体感染モデルを作製しサンプリングを行う。具体的には、①グラム陰性細菌の細胞外膜の主要構成成分であるリポポリサッカライド(LPS、疑似細菌感染)や合成二本鎖RNA(polyI:C、疑似ウイルス感染)を魚類(モデルとしてフグを使用)に投与、②実際の病原体：細菌/ウイルス/寄生虫による感染試験を行う。①・②より継時的に血液または組織を摘出し、これよりTh細胞の分取を行う。Th細胞の分取は、Magnetic-Activated Cell Sorting(MACS) technology を利用する。続いて、摘出したサンプルより定法に従いmRNAを精製し、マルチプレックス遺伝子発現定量解析システムによって定量解析を行う。解析結果から、病原体ごとに発現動態の変化するサイトカイン遺伝子を選択し、これを指標にした魚病診断法を策定する。

2) タンパク質レベルでの魚病診断法の確立

タンパク質レベルでの診断法は、抗魚類サイトカイン抗体を用いたELISAによって確立する。特に血中のサイトカインに注目し、測定を行う予定である。平成23年度は、感染初期に血中に産生されることが想定される、炎症促進性のサイトカイン：IL-1 β 、IL-6、TNF- α に対するポリクローナル抗体を作製する。同時に、組換えタンパク質を作製し、作製抗体の特異性をウェスタンブロットティングによって確認する。組換えタン

パク質の作製は、小麦胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系を利用して作製する。さらに、遺伝子レベルの発現解析の結果から、病原体感染時に発現動態の変動が認められたサイトカインについて抗体を作製し、上記と同様の方法で特異性を確認する。特異性の確認された抗体を用い、1. 遺伝子レベルの診断法の確立の項に記載した、病原体感染後に採取した血液(組織)サンプル中のサイトカイン検出法を、ELISA を利用して確立する。ELISA は、抗原を固層化し、作製した抗体を一次抗体として用いることで、サイトカインを検出する。

3) 細胞レベルでの魚病診断法の確立

細胞レベルでの診断法の確立は、FCM を利用して構築する。分化した Th 細胞が産生するサイトカイン(IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22, TGF- β など)に対する抗体を作製する。こちらについても、上記と同様の方法で組換えタンパク質を作製し、ウェスタンブロッティングによって特異性を確認する。特異性の確認された抗体を用い、1. 遺伝子レベルの診断法の確立の項に記載した、病原体感染後に採取した Th 細胞集団について、サイトカイン細胞内染色を施し、発現するサイトカインの種類で細胞集団を区別する。これまでに当該技術を魚類のサイトカイン研究に応用した例はなく、サイトカイン産生細胞と病態の関係を明らかにすることで、新しい魚病診断法が構築されるものと考えられる。

4. 研究成果

1) 遺伝子レベルでの魚病診断法の確立

19 種類のサイトカイン遺伝子をターゲットとしたマルチプレックス遺伝子発現解析システムの構築に成功した。[ターゲットサイトカイン: IL-1 β , IL-6, IL-17A/F3, TNF- α , TNF-N (炎症性サイトカイン), IL-10(抗炎症性サイトカイン), IFN- γ , I-IFN, IL-18(抗ウイルス性サイトカイン), IL-4/13A, IL-4/13B, IL-7, IL-2, IL-15, IL-21, IL-12p35, IL-12p40, TGF- β 1, CSF-1b(リンパ球分化・増殖制御性サイトカイン)(発表論文 2)。続いて、本マルチプレックスパネルを利用し、免疫刺激条件下(LPS, polyI:C またはコンカナバリン A(ConA)による刺激)の Th 細胞におけるサイトカイン遺伝子の発現動態を解析した。その結果、LPS および polyI:C 刺激では Th1 および Th17 系のサイトカイン遺伝子の顕著な発現増加が認められた。さらに、T 細胞マイトジェンである ConA による刺激では、Th サイトカインの発現に目だったパターンは認められず、全ての Th サイトカイン遺伝子の発現が増加することが確認された。さらに、病原体 *Vibrio harveyi* による

感染試験後のサイトカイン遺伝子の発現動態を解析した結果、細菌成分である LPS で刺激した時と類似した発現パターンを示すことが確認された。

2) タンパク質レベルでの魚病診断法の確立
IL-4/13A, IL-4/13B, IL-6, IL-10, IL-17A/F3, TNF- α , IFN- γ , IFN- γ 2 に対するペプチド抗体を作製し特異性を確認した。これらの抗体を用いて Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)を確立した。まず初めに、Th 細胞におけるサイトカイン産生を検討したが、細胞内タンパク質の抽出が上手く行えず、測定には至らなかった。このため LPS を接種したフグの血中炎症性サイトカイン(IL-6 および TNF- α)濃度の測定を試みた。その結果、TNF- α および IL-6 とともに、接種後 3 時間目より血中濃度が上昇し、6 時間目で最も高い産生量となることが確認された。さらに、寄生虫感染時の産生動態を検討した結果、IL-10, IL-17A/F3, IFN- γ 1, IFN- γ 2 の発現変動が認められた。同時に、抗寄生虫免疫を誘導する Th2 サイトカインである IL-4/13A, IL-4/13B の高い産生が認められた。

2) 細胞レベルでの魚病診断法の確立

T 細胞のマイトジェンであるホルボール-12-ミリストート-13-アセタート(PMA)およびイオノマイシンで Th 細胞を刺激し、刺激後の Th 細胞について細胞内染色を行い、産生サイトカインの検出を試みた。その結果、IFN- γ 産生細胞の検出に成功した。当該技術を用い LPS で刺激した Th 細胞の検出を行ったところ、刺激によって IFN- γ 産生細胞の数が有意に増加することが確認された。しかしながら、(疑似)病原体感染フグの Th 細胞集団より IFN- γ 産生細胞を検出することはできなかった。このことは、感染時において細胞内で産生されるサイトカインの産生が微量であるためと考えられる。今後は反応条件等を検討し、検出感度の向上を試みる予定である。

研究 1)~3)の結果から、サイトカインの発現動態を指標とすることで、魚病診断(魚病予測)が可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Kono T., Hamasuna S., Korenaga H., Iizasa T., Nagamine R., Ida T., Sakai M. Characterization and expression analysis of Th-POK from the Japanese pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 164, 124-132. 査読有

(2) Kono T., Takayama, H., Nagamine R., Korenaga H., Sakai M. Establishment of a multiplex RT-PCR assay for rapid detection of fish cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2013, 151, 90-101. 査読有
(3) Wang T., Kono T., Montea M.M., Kuse H., Costa M.M., Korenaga H., Maehra T., Husaina M., Sakai M., Secombes C.J. Identification of IL-34 in teleost fish: differential expression of rainbow trout IL-34, MCSF1 and MCSF2, ligands of the MCSF receptor. *Molecular Immunology*, 2012, 53, 398-409. 査読有
(4) Kono T., Hamasuna S., Korenaga H., Iizasa T., Nagamine R., Ida T., Sakai M. The role of neuromedin U during inflammatory response in the common carp. 2012, 32, 151-160. 査読有

[学会発表] (計6件)

① Kono T., Takayama H., Nagamine R., Korenaga H., Sakai M. A multiplex RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of cytokines in fish. *Cytokine* 2012, 10th Joint Annual Meeting, 13th September 2012, Geneva, Switzerland.

② Nagamine R., Korenaga H., Secombes C.J., Kono T. Characterization and expression analysis of the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes* homologue of the mammalian Th-POK. *International Society of Developmental and Comparative Immunology (The 12th Congress of ISDCI)*, 10th July 2012, Fukuoka Japan.

③ Korenaga H., Kono T., Sakai M. Identification, characterization and expression analysis of IL-17 receptors, Act1 and TRAF6 genes in Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*). *International Society of Developmental and Comparative Immunology (The 12th Congress of ISDCI)*, 10th July 2012, Fukuoka Japan.

④ 久世悠、是永大樹、長峯隆介、河野智哉、「魚類IL-34遺伝子の分離同定とその機能について」、平成24年度日本水産学会春季大会、2012年3月29日、東京

⑤ Hamasuna S., Korenaga H., Iizasa T., Ida T., Sakai M., Kono T. Is carp neuromedin U involved in the immune regulation? 15th EAFP, 13th September 2011, Split Croatia.

⑥ Takayama, H., Kuse H., Korenaga H., Sakai M., Kono T. The expression analysis of fugu cytokine genes by multiplex RT-PCR assay 15th EAFP, 13th September 2011, Split Croatia.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：サイトカイン遺伝子を利用したマルチプレックス RT-PCR による魚類健康診断法
発明者：河野智哉、高山博章
権利者：宮崎大学
種類：特許
番号：特願 2011-191778 号
出願年月日：23年9月2日
国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 智哉 (KONO TOMOYA)
宮崎大学・IR推進機構・助教
研究者番号：60527547

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし