

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292127

研究課題名(和文) 栓球による魚類免疫応答の活性化と制御の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of activation and regulation of immune response by thrombocytes in fish

研究代表者

中尾 実樹 (Nakao, Miki)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50212080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：栓球は哺乳類以外の脊椎動物に存在する、血液凝固に関わる血球である。哺乳類の血小板とは異なり有核の細胞であり、形態的には他の白血球と類似している。血液凝固作用以外にも、炎症関連分子の発現、外来異物を取り込む貪食作用等、免疫系への関与も示唆されているが、その詳細は不明なままであった。本研究では、栓球が生体防御において果たす役割を明らかにするため、魚類や両生類といった下等脊椎動物をモデル生物として用い、栓球を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて栓球を標識し、その機能を解析した。その結果、栓球が止血作用のみならず、病原体の排除に対しても大きく貢献していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Thrombocytes are regarded as the functional equivalent of anucleated mammalian platelets. Additional immune functions, including phagocytosis, have also been suggested, but no conclusive experimental evidence for their potential ingestion and clearance of infiltrating microbes has been provided till date. Here we demonstrate the active phagocytic ability of thrombocytes in lower vertebrates using teleost fishes and amphibian models. Carp thrombocytes were able to ingest live bacteria and kill them. We found that thrombocytes represented nearly half of the phagocyte population in the common carp total peripheral blood leukocyte pool. Phagocytosis efficiency was further enhanced by serum opsonization. Particle internalization led to phagolysosome fusion and killing of internalized bacteria, pointing to a robust ability for microbe elimination. We find that this potent phagocytic activity is shared across fish and frogs, implying its conservation throughout the lower vertebrate lineage.

研究分野：比較免疫学

キーワード：魚類 栓球 免疫 血液凝固 白血球 食細胞 貪食活性

1. 研究開始当初の背景

栓球は、哺乳類以外の脊椎動物において血液凝固を担う血液細胞で、哺乳類の血小板（巨核細胞から遊離した無核の細胞小片）と異なり、紡錘形あるいは球形の有核細胞である。血液凝固に加えて、栓球が異物の貪食などの免疫反応にも関与することが示唆される一方で、否定的な報告もあり、その免疫機能の真相は不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究では、栓球が生体防御において果たす役割を明らかにするため、コイ、ヒラメ、ツメガエルといった下等脊椎動物をモデル生物として用い、各魚種の栓球を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて栓球を標識し、その機能を解析した。

さらに、栓球による異物認識や貪食後に免疫系にどのような応答を惹起するかについては不明である。また、栓球が創傷後の止血と異物排除の両面に働くと考えられるが、止血と貪食という異なる反応がどのように分別して誘起されるのかは全く明らかでない。そこで、栓球の凝固作用や食作用を支える細胞表面受容体タンパク質、凝固・貪食刺激による細胞内でのタンパク質発現の違い、これら栓球刺激によって起こる魚類免疫系の活性化・制御作用を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) コイの栓球を磁気分離法によって精製し、その免疫関連遺伝子の発現を RT-PCR 方によって解析した。

(2) 外来異物のモデルとして蛍光ビーズおよび蛍光標識大腸菌を用い、末梢血白血球、精製栓球等を供試したフローサイトメトリーによって、in vitro 貪食試験を行った。

(3) コイ生体に直接ビーズを注射した後、各種臓器を摘出し、分離した白血球をフローサイトメトリーで解析して in vivo 貪食試験を行った。

(4) 栓球のファゴリソゾーム形成は、lysotracker 色素を用いた蛍光顕微鏡観察および ImageStream 解析によって確認した。

4. 研究成果

(1) コイ栓球の免疫関連遺伝子発現

磁気分離法によって精製したコイの栓球は、炎症誘引型のサイトカインや異物認識、殺菌作用、外来抗原の抗原提示に働く因子の発現が認められ、栓球が自然免疫応答に関与している可能性が強く示唆された。(図1)

(2) in vitro での栓球の貪食活性

コイ、キンギョ、ヒラメ、アフリカツメガエルの何れの種においても、栓球による活発な異物の取り込みが認められた。直径 1~3 μm のビーズを取り込める点で、栓球は、好

中球やマクロファージなどの典型的な食細胞や、近年食細胞として同定された B 細胞に匹敵する貪食能を発揮した。(図2) この栓球による異物の取り込みは、温度、培養時間、細胞伸長の阻害剤の影響を顕著に受け、補体の結合によるオプソニン化によって促進される等、既知の典型的な食細胞と同様なメカニズムによるものであることが確認された。その一方で、これらの栓球の異物取り込みは、単離した栓球ではほとんど認められず、他の白血球の存在下もしくはその培養上清の添加によって誘起されたことから、免疫系における栓球と他の免疫細胞との密接な相互作用が示唆された。

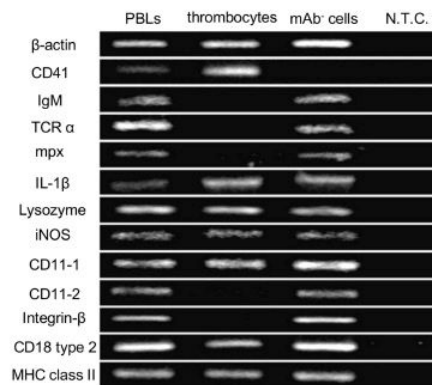


図1 コイ栓球の遺伝子発現プロファイル

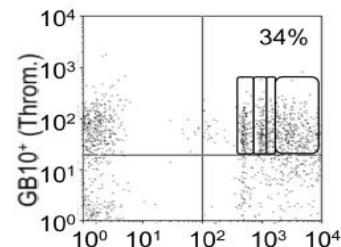


図2 フローサイトメトリーによるコイ栓球の貪食活性の証明

(3) in vivo における栓球の貪食活性

コイ生体に直接ビーズを注射した in vivo 貪食試験では、末梢血中、脾臓、腎臓でビーズを取り込んだ栓球が観察された。特に末梢血中では実際にビーズを取り込んだ白血球の半数近くが栓球であったことから、生体内に侵入した異物の除去に栓球が大きく貢献していることが示唆された。(図3)

(4) 魚類栓球の異物分解・殺菌活性

異物を取り込んだキンギョおよびコイの栓球では、取り込んだビーズや菌体の周囲に lysosome と考えられる酸性の細胞小器官が集合・融合し、phagolysosome を形成することが、lysosome 標識蛍光色素を用いた顕微鏡観察によって確認された。さらに、コイ栓球に大腸菌の生菌を加え培養、貪食させると、

栓球内に取り込まれた生菌数が経時的に減少したことから、栓球は異物の取込みのみならず、殺菌能をも備えた機能的に完全な食細胞として機能することが確認された。(図4)

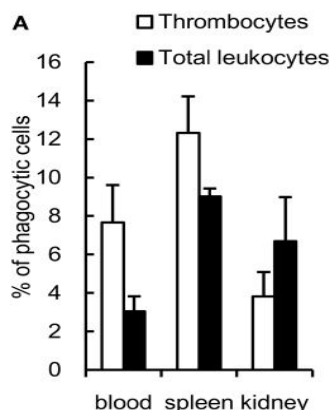


図3 異物貪食した栓球の組織分布

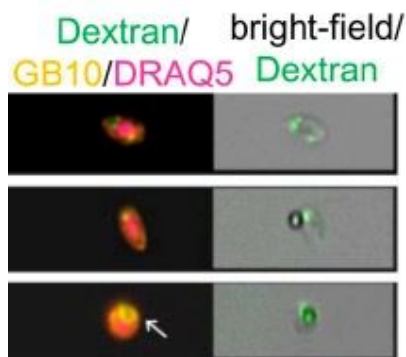


図4 異物貪食した栓球におけるファゴリソゾームの形成(矢印がLysotracker色素で示されたファゴリソゾームを示す。)

(5)栓球と同様に貪食能を持つ魚類 B 細胞によるマクロファージ貪食活性化作用
LPS で活性化した B 細胞の培養上清を採取し、末梢白血球中の貪食細胞(主に単球・マクロファージ)の食作用活性に及ぼす影響を調べたところ、LPS 刺激した B 細胞の培養上清で処理した末梢白血球は、PBS 処理した B 細胞の培養上清で処理した白血球よりも有意に高い貪食率 ($p < 0.01$) を示した。したがって、栓球や B 細胞が異物を貪食すると、他の貪食細胞を活性化する液性のシグナル分子を分泌する可能性が考えられた。

(6)栓球単独による異物貪食
精製した栓球の貪食能をフローサイトメトリーで測定したが、ほとんど貪食活性は認められなかった。一方、栓球を特異的に除去した末梢白血球画分を得て、これを PMA や LPS で刺激した培養上清を精製栓球に与えると、栓球の貪食能が復活した。PMA、LPS そのものは栓球の貪食能を全く活性化しな

かった。(図5)

この結果は、栓球の貪食能は、異物を認識した他の白血球から分泌される液性因子(サイトカイン類)によって活性化されることを示唆している。この点は、他の白血球の関与なしに貪食活性を示しうる B 細胞と対照的である。

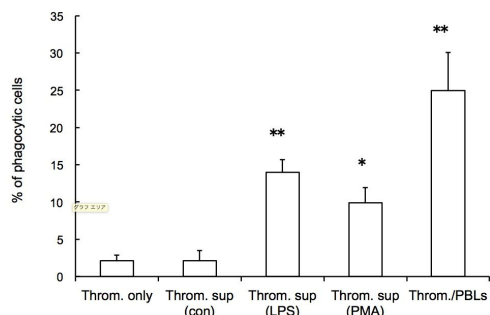


図5 LPS/PMA 刺激白血球培養上清による栓球貪食能の活性化

以上の結果から、比較的原始的な脊椎動物においては、栓球が止血作用のみならず、他の白血球と連携して、侵入した病原体の排除に対しても大きく貢献していることが明らかとなった。さらに栓球が食細胞として機能することは、近年提唱されている脊椎動物白血球の新たな分化・系統分類モデルを支持するものであり、免疫細胞の系統発生の解明にも貢献する知見である。

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5件)

(1) Indriyani Nur, Nevien Kamel Abdelkhalak, Shiori Motobe, Ryota Nakamura, Masakazu Tsujikura, Tomonori Somamoto, Miki Nakao. Functional analysis of membrane-bound complement regulatory protein on T-cell immune response in ginbuna crucian carp. Mol Immunol. 2016 Feb;70:1-7.doi:10.1016/j.molimm.2015.11.010. (査読あり)

(2) Takahiro Nagasawa, Tomonori Somamoto, Miki Nakao. Carp thrombocyte phagocytosis requires activation factors secreted from other leukocytes. Dev. Comp. Immunol. 2015; 52(2): 107-111. doi: 10.1016/j.dci.2015.05.002. (査読あり)

(3) Tomonori Somamoto, Yuichi Miura, Teruyuki Nakanishi, Miki Nakao. Local and systemic adaptive immune responses toward viral infection via gills in ginbuna crucian carp. Dev Comp Immunol.

2015;52(1):81-87. doi: 10.1016/j.dci.2015.04.016. (査読あり)

(4) Masakazu Tsujikura, Takahiro Nagasawa, Satoko Ichiki, Ryota Nakamura, Tomonori Somamoto, Miki Nakao. A CD46-like Molecule Functional in Teleost Fish Represents an Ancestral Form of Membrane-Bound Regulators of Complement Activation, *J. Immunol.* 2015; 194: 262-272. doi: 10.4049/jimmunol.1303179. (査読あり)

(5) Takahiro Nagasawa, Chihaya Nakayasu, Aja M. Rieger, Daniel R. Barreda, Tomonori Somamoto, Miki Nakao. Phagocytosis by thrombocytes is a conserved innate immune mechanism in lower vertebrates. *Frontiers in Immunology*, 2014: 445. doi: 10.3389/fimmu.2014.00445. (査読あり)

(6) Indriyani Nur, Hikari Harada, Masakazu Tsujikura, Tomonori Somamoto, Miki Nakao. Molecular characterization and expression analysis of three membrane-bound complement regulatory protein isoforms in the ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. *Fish Shellfish Immunol.* 2013; 35: 1333-1337. doi: 10.1016/j.fsi.2013.08.002. (査読あり)

〔学会発表〕(計7件)

(1) Harsha Prakash, Shiori Motobe, Takahiro Nagasawa, Tomonori Somamoto, Miki Nakao. Expression and homeostatic functions of Tecrem, a CD46-like complement regulatory protein, on epithelial cells in bony fish. *International Complement Workshop*, 2016.9.4-8, Kanazawa (Japan).

(2) Kazuki Yoshioka, Yoko Kato-Unoki, Takahiro Nagasawa, Tomonori Somamoto, Miki Nakao. Carp properdin: structural and functional diversity of two isotypes. *International Complement Workshop*, 2016.9.4-8, Kanazawa (Japan).

(3) 吉岡和紀, 鷓木陽子, 杣本 智軌, 中尾実樹, コイ補体 Properdin アイソフォームの機能解析, 日本水産学会春季大会, 東京海洋大学, 2015.03.27.

(4) Takahiro Nagasawa, Tomonori Somamoto, Miki Nakao. Phagocytosis by carp thrombocyte needs activation factors secreted from other leukocytes population. 13th Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology. 2015.6.30, Murcia (Spain).

(5) Kazuki Yoshioka, Yoko Kato-Unoki, Tomonori Somamoto, Miki Nakao, Structural and functional diversity of properdin isotypes in the common carp complement system. 13th Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology, 2015.06.30, Murcia (Spain).

(6) 元部詩織, 辻倉正和, 中村亮太, 杣本智軌, 中尾実樹, CD46様コイ補体制御因子(Tecrem)の上皮細胞における表面発現動態, 第51回補体シンポジウム, 神戸常磐女子大学, 2014.08.22.

(7) 長澤貴宏, 中易千早, Aja M. Rieger, Daniel R. Barreda, 杣本智軌, 中尾実樹, 魚類栓球の異物分解・殺菌作用, 日本水産学会春季大会, 北海道大学水産学部, 2014.03.28.

〔図書〕(計1件)

(1) Miki Nakao, Tomonori Somamoto, The evolution of complement system functions and pathways in vertebrates. in *THE EVOLUTION OF THE IMMUNE SYSTEM: A BALANCE BETWEEN CONSERVATION AND DIVERSITY*, Ed. By Davide Malagoli, Elsevier, pp 151-171. 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 実樹 (NAKAO, Miki)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 50212080

(2) 研究分担者

杣本 智軌 (SOMAMOTO, Tomonori)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 40403993