

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292115

研究課題名(和文) 魚類免疫系における脳ホルモンの役割

研究課題名(英文) Roles of neuropeptides in the immune system of teleost fish

研究代表者

天野 勝文 (Amano, Masafumi)

北里大学・海洋生命科学部・教授

研究者番号：10296428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：魚類における内分泌系と免疫系のネットワークの解明の端緒として、内分泌系の最上位に位置する脳ホルモン(神経ペプチド)の魚類免疫器官における存在について、分子生物学的手法と免疫組織化学染色で調べた。その結果、GnRH(生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン)、CRH(副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン)、PrRP(プロラクチン放出ペプチド)などの脳ホルモンが、ニジマス、キンギョ、コイ、ニホンウナギ、トラフグ、ヒラメなどの多くの魚類の血球、腎臓、脾臓に広く存在することがわかった。この結果は、魚類においても内分泌系と免疫系が密接に関わることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：To gain a better understanding of the interaction between endocrine and immune systems in fish, we examined whether some neuropeptide hormones, such as gonadotropin-releasing hormone (GnRH), corticotropin-releasing peptide (CRH) and prolactin-releasing peptide (PrRP), exist in the immune organs of several teleost fishes by molecular biological technique and immunocytochemistry. These neuropeptides were detected in the immune organs (blood cells, kidney, and spleen) of teleost fishes such as rainbow trout, goldfish, common carp, Japanese eel, tiger puffer, and Japanese flounder. These results suggest that the interaction exists between endocrine and immune systems in teleost fish.

研究分野：水族生理学

キーワード：魚類 免疫系 脳ホルモン 腎臓 脾臓 白血球

## 1. 研究開始当初の背景

生体は、神経系、内分泌系および免疫系によって制御されている。これら3つの系はそれぞれ独立の系であると同時に互いに密接な相互ネットワークを構築している。しかし魚類においては、神経系と内分泌系の相互ネットワークに比較して、内分泌系と免疫系の相互ネットワークについては研究が進んでいない(引用文献)。

魚類の内分泌系は、脳下垂体標的器官系によって制御される。脳では脳ホルモン(神経ペプチドとも呼ばれる)と総称されるペプチドホルモンが合成され、脳ホルモンが下垂体と標的器官を制御することで多様な生理機能を発揮する。たとえば、生殖には GnRH(生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン)、ストレス応答には CRH(副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン)、体色調節には MCH(メラニン凝集ホルモン)がそれぞれ重要な生理機能を発揮する(引用文献)。

魚類の免疫系は、生体防御に関わる細胞や体液成分については哺乳類と共通の部分も多い。しかし、魚類はリンパ節を欠き、侵入した異物を脾臓や腎臓でトラップして効果的に処理するなどのユニークな特徴をもつ。免疫系には自然免疫と適応免疫がある。そのうち適応免疫(異物の侵入を受けて初めて後天的に獲得する特異性の高い防御システムであり、リンパ球と抗体(免疫グロブリン; IgM)が中心的役割を果たす)は進化の過程において魚類で初めて獲得されたものであり、魚類をモデルにした研究は比較免疫学的に重要である。言うまでもなく、魚類の免疫系の徹底的な理解は、水産増養殖における魚病対策にも直結する点で重要である(引用文献)。

前述のように、魚類における内分泌系と免疫系の連携に関する知見は乏しい。しかし、一部の魚類において、免疫応答の場である脾臓やリンパ球に脳ホルモンの発現が認められるなど、内分泌系と免疫系の関連性を示唆する断片的ではあるが興味深い報告がある。

(1) キンギョの胸腺に CRH が存在する(引用文献)。

(2) ニホンウナギの白血球で GnRH 遺伝子の発現がある(引用文献)。

(3) ニジマスではエンドルフィンがインターフェロンの産生を高める(引用文献)。

(4) コイではエンドルフィンが貪食細胞を活性化する(引用文献)。

(5) ニベ科魚類の一種のリンパ球に GnRH が存在する(引用文献)。

(6) カレイ目魚類マツカワの脾臓で MCH 受容体遺伝子が発現する(引用文献)。

以上の知見から、魚類においても内分泌系と免疫系の相互ネットワークが存在することが強く予想される。それを証明するためには、多くの魚種を用いて系統的かつ網

羅的に検証する必要がある。そこで本研究は「魚類免疫系における脳ホルモンの役割」と題し、内分泌系と免疫系の相互ネットワークについて脳ホルモンを指標として解明することを目指す。これらの解明は、比較免疫学的に興味深いと同時に、将来的には水産増養殖における魚病対策の基盤となることが期待される。

## 2. 研究の目的

以上の学術的背景の下で本研究は「魚類免疫系における脳ホルモンの役割」と題し、魚類の内分泌系と免疫系の相互ネットワークについて脳ホルモンを指標として解明することを目指す。具体的には、水産重要種とモデル実験魚を含むさまざまな魚種の免疫器官から脳ホルモンを、分子生物学的手法および免疫組織化学染色で同定する。

## 3. 研究の方法

(1) 魚類の血球における脳ホルモンの遺伝子発現による網羅的検索

魚類における内分泌系と免疫系の相互作用を解明する端緒として、さまざまな魚類(ニジマス、キンギョ、マダイ、ヒラメ、トラフグ)の血球中の脳ホルモンの存在の有無を PCR 法で調べた。対象とする脳ホルモンは、GnRH、MCH および CRH の3種類とした。各魚種から血液と脳(ポジティブコントロール)を採取し、常法通り RNA を抽出後、cDNA を合成した。GenBank に登録されている各魚種の脳ホルモンの mRNA 配列を基にして設計したプライマーとテンプレートを PCR に供し、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供して、そのバンドサイズを確認した。

(2) 魚類の血球における脳ホルモンの免疫組織化学染色による検出

さまざまな魚類(ニジマス、キンギョ、メダカ、ドジョウ、ニホンウナギ、ゼブラフィッシュ)の血球の塗抹標本作製し、ギムザ染色で白血球を確認した。その後、脳ホルモンの存在を免疫組織化学染色で調べた。

(3) 魚類の免疫器官における脳ホルモンの免疫組織化学染色による検出

ニジマス、キンギョおよびメダカの腎臓および脾臓をブアン液で固定後、パラプラスチック切片を作製し、脳ホルモンの分布を免疫組織化学染色で調べた。

(4) 魚類の免疫器官における脳ホルモンの遺伝子発現による網羅的検索

魚類における内分泌系と免疫系の相互作用の解明のために、さまざまな魚類(ニジマス、ヒラメ、キンギョ、ニホンウナギ)

の免疫器官における脳ホルモンの存在の有無を PCR 法で調べた。対象とする脳ホルモンは、GnRH と MCH とした。各魚種から免疫器官と脳（ポジティブコントロール）を採取し、常法通り RNA を抽出後、cDNA を合成した。GenBank に登録されている各魚種の脳ホルモンの mRNA 配列を基にして設計したプライマーとテンプレートを PCR に供し、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供して、そのバンドサイズを確認した。

#### (5) トラフグの白血球における脳ホルモンの遺伝子発現

トラフグの白血球から、T 細胞、B 細胞、マクロファージを分離し、それぞれの細胞における脳ホルモン遺伝子の発現の有無を PCR 法で調べた。

#### (6) コイの免疫器官における脳ホルモンの検出

魚類における内分泌系と免疫系のクロストークの解明を目的として、コイの免疫器官における神経ペプチドホルモンの存在を分子生物学的手法で調べた。対象とする神経ペプチドホルモンは、プロラクチン放出ペプチド (PrRP)、CRH、CRH 受容体および GnRH とした。コイ 5 尾 (体重 10~15 g) から、免疫器官 (血球、脾臓、腎臓) と脳 (ポジティブコントロール) を採取し、常法通り RNA を抽出後、cDNA を合成した。GenBank に登録されている塩基配列情報を基にプライマーを設計し、PCR で遺伝子を増幅した。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供して、目的遺伝子の増幅を確認した。増幅が確認された場合には、ダイレクトシーケンスで塩基配列を確認した。さらに、コイの血球の塗抹標本作製し、抗 PrRP 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

## 4. 研究成果

#### (1) 魚類の血球における脳ホルモンの遺伝子発現による網羅的検索

ニジマス、キンギョ、マダイ、ヒラメ、トラフグにおいて、脳ではすべての魚種で予想バンドサイズと同じ位置にバンドが確認できた。血球においては、ニジマスで MCH と CRH、キンギョでサケ型 GnRH (sGnRH)、ニワトリ型 GnRH (cGnRH-II) および MCH、ヒラメでタイ型 GnRH (sbGnRH)、トラフグで sGnRH と cGnRH-II の遺伝子発現が確認できた。マダイにおいては、脳ホルモンの発現は検出されなかった。

#### (2) 魚類の血球における脳ホルモンの免疫組織化学染色による検出

ニジマス、キンギョ、メダカ、ドジョウ、ニホンウナギ、ゼブラフィッシュの血球の塗抹標本を用いて、脳ホルモンの存在を免疫組織化学染色で調べたが、いずれの魚種

においても、免疫陽性反応は検出されなかった。

#### (3) 魚類の免疫器官における脳ホルモンの免疫組織化学染色による検出

ニジマス、キンギョおよびメダカの腎臓および脾臓には、免疫陽性反応は検出されなかった。

#### (4) さまざまな魚類の免疫器官における脳ホルモンの遺伝子発現による網羅的検索

ニジマス、キンギョ、ヒラメ、ニホンウナギの脳では、すべての魚種・個体において、予想バンドサイズと同じ位置にバンドが確認できた。ニジマスでは脾臓に sGnRH と cGnRH-II 遺伝子発現が検出された。キンギョでは腎臓と脾臓に sGnRH、血球と脾臓に MCH 遺伝子発現が検出された。ヒラメでは腎臓と脾臓に sbGnRH、ニホンウナギでは血球、腎臓と脾臓に哺乳類型 GnRH (mGnRH) の遺伝子発現が検出された。

#### (5) トラフグの免疫器官における脳ホルモンの遺伝子発現

トラフグの T 細胞が CRH mRNA を、マクロファージ、B 細胞、T 細胞が CRH-receptor 1 mRNA を発現していることがわかった。この結果は、T 細胞で産生された CRH がサイトカインとして機能すること、および CRH がマクロファージ、B 細胞、T 細胞にオートクラインあるいはパラクラインによって何らかの効果を及ぼすことを示唆する。

#### (6) コイの免疫器官における脳ホルモンの分布

PrRP 遺伝子発現は全個体の血球で検出されたが、脾臓と腎臓には検出されなかった。一部の個体において、CRH 遺伝子発現は血球と腎臓に、CRH 受容体遺伝子発現は脾臓と腎臓に、sGnRH 遺伝子発現は血球、脾臓、腎臓でそれぞれ検出された。cGnRH-II 遺伝子発現は脳でのみ検出された。ダイレクトシーケンスで得られた塩基配列は、既報の配列ときわめて高い同一性を示した。免疫組織化学染色の結果、白血球において PrRP 免疫陽性反応が検出されたことから、PCR の結果を支持した。以上の結果、コイの免疫器官に数種の神経ペプチドホルモンが発現していることが明らかとなった。

#### <引用文献>

- 鈴木 譲, 植松一真, 渡部終五, 会田勝美. 第 1 章 総論. 「増補改訂版 魚類生理学の基礎」(会田勝美, 金子豊二編), 恒星社厚生閣, 東京, 2013; 1-27.  
天野勝文, 小林牧人, 金子豊二, 会田勝美. 第 6 章 内分泌. 「増補改訂版 魚類生理学の基礎」(会田勝美, 金子豊二編), 恒星社厚生閣, 東京, 2013; 122-148.  
鈴木 譲, 末武弘章. 第 12 章 生体防御.

「増補改訂版 魚類生理学の基礎」(会  
田勝美, 金子豊二編), 恒星社厚生閣,  
東京, 2013; 234-251.

Ottaviani E, Franchini A, Franceschi  
C (1998) Presence of corticotrophin-  
releasing hormone and cortisol  
molecules in invertebrate haemocytes  
and lower and higher vertebrate  
thymus. *Histochemistry Journal* 30,  
61-70.

Okubo K, Suetake H, Aida K (1999)  
Expression of  
gonadotropin-releasing hormone  
(GnRH) precursor genes in various  
tissues of the Japanese eel and  
evolution of GnRH. *Zoological  
Science* 16, 471-478.

Watanuki N, Takahashi A, Yasuda A,  
Sakai M (1999) Kidney leucocytes of  
rainbow trout are activated by  
intraperitoneal injection of  
-endorphin. *Veterinary Immunology  
and Immunopathology* 71, 89-97.

Takahashi A, Takasaka T, Yasuda A,  
Amemiya Y, Sakai M, Kawauchi H (2000)  
Identification of carp proopio-  
melanocortin-related peptides and  
their effects on phagocytes. *Fish and  
Shellfish Immunology*, 10, 273-284.  
Mohamed JS, Khan IA (2006) Molecular  
cloning and differential expression  
of three GnRH mRNAs in discrete brain  
areas and lymphocytes in red drum.  
*Journal of Endocrinology* 188,  
407-416.

Takahashi A, Kosugi T, Kobayashi Y,  
Yamanome T, Schiöth HB, Kawauchi H  
(2007) The melanin-concentrating  
hormone receptor 2 (MCH-R2) mediates  
the effect of MCH to control body  
color for background adaptation in  
the barfin flounder. *General and  
Comparative Endocrinology* 151,  
210-219.

## 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1件)

Amano M, Amiya N, Yokoyama T, Onikubo  
K, Yamamoto N, Takahashi A (2016)  
Immunohistochemical detection of  
corticotropin-releasing hormone  
(CRH) in the brain and pituitary of  
the hagfish, *Eptatretus burgeri*.  
*General and Comparative  
Endocrinology* 236, 174-180. 査読有  
DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.07.018

〔学会発表〕(計1件)

天野勝文・筒井繁行・山崎 郁・大谷み  
ゆ・平野 渉・阿見彌典子・水澤寛太・  
高橋明義 (2017). コイの免疫器官にお  
ける神経ペプチドの分布. 平成 29 年度  
日本水産学会春季大会. 平成 29 年 3 月  
26 ~ 30 日 東京海洋大学(東京都港区).

〔図書〕(計8件)

天野勝文, 田川正朋 共編(2016)「ホ  
ルモンから見た生命現象と進化シリー  
ズ 発生・変態・リズム」裳華房,  
212 ページ.

伊藤道彦, 高橋明義 共編(2016)「ホ  
ルモンから見た生命現象と進化シリー  
ズ 成長・成熟・性決定」裳華房,  
183 ページ.

水澤寛太, 矢田 崇 共編(2016)「ホ  
ルモンから見た生命現象と進化シリー  
ズ 生体防御・社会性」裳華房, 258  
ページ.

Amano M (2015) Corticotropin-  
Releasing Hormone Family. In  
"Handbook of Hormones, Comparative  
Endocrinology for Basic and Clinical  
Research", Takei Y, Ando H, Tsutsui  
K (eds). Academic Press, San Diego,  
USA, pp. 21-22.

Amano M (2015) Corticotropin-  
Releasing Hormone. In "Handbook of  
Hormones, Comparative Endocrinology  
for Basic and Clinical Research",  
Takei Y, Ando H, Tsutsui K (eds).  
Academic Press, San Diego, USA, pp.  
23-25.

Amano M (2015) Urotensin-I. In  
"Handbook of Hormones Comparative  
Endocrinology for Basic and Clinical  
Research", Takei Y, Ando H, Tsutsui  
K (eds). Academic Press, San Diego,  
USA, pp. 26-27.

Amano M (2015) Urocortins. In  
"Handbook of Hormones Comparative  
Endocrinology for Basic and Clinical  
Research", Takei Y, Ando H, Tsutsui  
K (eds). Academic Press, San Diego,  
USA, pp. 28-29.

Amano M (2015) Sauvagine. In  
"Handbook of Hormones Comparative  
Endocrinology for Basic and Clinical  
Research", Takei Y, Ando H, Tsutsui  
K (eds). Academic Press, San Diego,  
USA, p. 30.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

天野 勝文 (AMANO, Masafumi)  
北里大学・海洋生命科学部・教授  
研究者番号：10296428

### (2) 研究分担者

高橋 明義 (TAKAHASHI, Akiyoshi)  
北里大学・海洋生命科学部・教授  
研究者番号：10183849

水澤 寛太 (MIZUSAWA, Kanta)  
北里大学・海洋生命科学部・准教授  
研究者番号：70458743

筒井 繁行 (TSUTSUI, Shigeyuki)  
北里大学・海洋生命科学部・講師  
研究者番号：20406911

阿見彌 典子 (AMIYA, Noriko)  
北里大学・海洋生命科学部・講師  
研究者番号：20588503