

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450264

研究課題名(和文) 魚類免疫細胞をマーカーとした疾病診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of diseases diagnosis using fish immune cells as marker

研究代表者

河野 智哉 (Kono, Tomoya)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：60527547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：フグTh細胞に組換えフグIL-4/13またはIFN γ を作用させたところ、発現の誘導されるTh系サイトカインの種類が異なることが確認された。同細胞を産生するサイトカインごとに種判別したところ、フグにおいても哺乳類と類似した機能性Th細胞の存在が示唆された。また、当該Th細胞の産生するIFN γ およびIL-4/13は、単球細胞を活性化することが明らかとなった。さらに、Th細胞は刺激する病原体成分の種類ごとに異なる分化パターンを示すことが確認された。以上の結果より、魚体内における機能性Th細胞は魚病診断の指標となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fugu helper T (Th) cells expressed cytokines such as interleukin (IL)-4/13 and interferon (IFN)-gamma related to Th cell differentiation by the stimulation of recombinant Fugu IL-4/13 and IFN-gamma. And there was a difference in the induced expression patterns of cytokines between recombinant IL-4/13 and IFN-gamma stimulated cells. Analysis of cytokine production by the stimulated cells using intracellular cytokine staining assay suggested that Fugu has similar effector Th cells with that of mammalian species. In addition, IL-4/13 and IFN-gamma were produced by the Th cells activated monocytes. Moreover, Th cells stimulated by LPS or chitosan differentiated into each different effector Th cells. From these results, it was suggested that Th cells in fish can be used as markers of fish disease diagnosis.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：魚病 魚類免疫 サイトカイン Th細胞

1. 研究開始当初の背景

体内に侵入した病原体は、マクロファージや樹状細胞などの食細胞(抗原提示細胞)内で分解され、抗原ペプチドとして MHC 分子にのせて膜上に提示される。この情報を受け取った未分化のヘルパー T 細胞(Th0)は、さらに免疫制御分子であるサイトカイン(分泌型タンパク質)の刺激を受け、特異的なサイトカインを産生する機能性 Th 細胞サブセットへと分化する。続いて、各機能性 Th 細胞が産生するサイトカインによって他の免疫細胞が活性化され、病原体排除に必要な免疫応答が誘導される。この免疫誘導には方向性があり、Th1 系サイトカインはウイルスや細菌(細胞内増殖性)に対する免疫を、Th2 系サイトカインは抗寄生虫免疫やアレルギー反応を、Th17 系サイトカインは真菌や細菌(細胞外増殖性)に対する免疫応答を誘導することが哺乳類において知られている。以上のことから、Th 細胞は免疫制御の中樞を担う重要な細胞として認識されており、実際の臨床現場においてもマーカーとして利用されている。一方魚類の免疫システムは深く理解されておらず、免疫応答の指標は病原体に対する抗体の産生能や、病原体の分解に関わる酵素活性、免疫関連分子の発現動態などであり、Th 細胞と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。

魚類の Th 細胞に関する研究の歴史は非常に浅く、哺乳類において Th 細胞の膜表面に発現することが知られる CD4 分子が、2004 年に初めて分離・同定された。その後、当該分子に対する抗体を用いた Th 細胞の分取が試みられ、2011 年にギンブナ (*Carassius auratus langsdorffii*) より初めて Th 細胞の存在を示唆する報告がなされた。同時期に、申請者のグループも養殖対象魚種であるトラフグ (*Takifugu rubripes*) を対象に Th 細胞の分取に取り組んでおり、2012 年に細胞の回収に成功、さらに当該細胞を免疫刺激した際のサイトカイン遺伝子の発現プロファイルを解析した。一方、魚類のサイトカインについての研究(分離・同定・機能解析)は、1990 年代後半より盛んに行われてきた。当初は、他の脊椎動物における既知のサイトカインとの相性の低さから、分離・同定は困難を極めた。しかしながら、2001 年のトラフグゲノム情報の Web 公開を皮切りに、これまでに様々な魚種のゲノム情報がインターネット上で利用可能となっており、データベース解析からのサイトカイン遺伝子の探索・同定は飛躍的に加速した。これまで我々も、哺乳類において

Th 系サイトカインとして知られる腫瘍壊死因子 TNF、インターロイキン(IL)-2、IL-6 さらに T 細胞の増殖因子である IL-7 などのサイトカインを分離・同定している。しかしながら、魚類サイトカインの機能における知見は乏しく、特に Th 細胞の分化誘導能や機能性 Th 細胞の産生したサイトカインによる免疫制御についてはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、以下の項目について検討することを目的とした。

魚類においても哺乳類と同様に サイトカインによって Th 細胞の分化が誘導されるのか、機能性 Th 細胞にはどのような種類が存在し、実際に免疫応答を活性化するのか、病原体に感染した際、機能性 Th 細胞集団に変化は認められるのかの 3 項目について検討し、Th 細胞を指標とした新たな疾病診断技術の構築を目指す。

3. 研究の方法

初年度は、哺乳類において Th 細胞の分化を誘導することが知られるサイトカイン: IL-4、および IFN-gamma(IFNg)に注目し、トラフグにおける各サイトカインの組換えタンパク質を作製した。当初の予定通り組換えタンパク質発現系には、大腸菌コールドショック発現系を利用した。同時に抗フグサイトカイン抗体の作成を行った。続いて、フグの CD4 分子に対する抗体(抗 CD4 抗体)を用い、磁気細胞分離法(Magnetic-Activated Cell Sorting: MACS)によって血液より Th 細胞の分取を行った。分取した Th 細胞(10^5 cells/ml)に、作製した各組換えフグサイトカイン(10~100ng/ml)を作用させ、FCM によって継時的な細胞形態の変化(細胞のサイズ・細胞内構造の複雑さ)を観察した。同時に、Th0 細胞が機能性 Th 細胞サブセットに分化する際、特異的に働く転写因子 [T-bet, STAT1, STAT4 (Th0→Th1)、GATA3, STAT6 (Th0→Th2)、RORgammat, Smads, STAT3 (Th0→Th17)、FoxP3, Smads (Th0→iTreg)] 群の遺伝子発現解析を行った。続いて、組換えサイトカインを作用させた Th 細胞におけるサイトカインの発現パターンをマルチプレックス RT-PCR アッセイによって解析し、機能性 Th 細胞への分化の有無を遺伝子レベルで検討した。以上の研究によって、初年度はサイトカインによって魚類の Th 細胞の分化が誘導されるのかについて検討した。

H27年度は、Th細胞に組換えサイトカインを作用させ、分化の誘導された機能性Th細胞におけるサイトカイン産生パターンを調べた。このために、フローサイトメーター(FCM)を用いた細胞内サイトカイン染色技術の構築を行った。まず初めに、細胞内で産生されたサイトカインの細胞外放出阻止法(Brefeldin A または monensin を使用予定)についても検討した。続いて、構築した FCM-細胞内染色技術によって、「作用させた組換えサイトカイン」と「機能性Th細胞の産生するサイトカイン」の関係を探り、フグに存在する機能性Th細胞の種類を検討した。続いて、機能性Th細胞が産生するサイトカインが、ミエロイド系細胞である単球を活性化するかについて検討した。まず初めに、機能性Th細胞が産生するサイトカイン(IFN γ および IL-4/13)の組換えタンパク質を魚体に接種し、経時的に単球を分離後、当該細胞の活性酸素の産生能、貪食能およびリゾチーム活性を測定した。

最終年度は、病原体感染時のTh細胞サブセットの変化を探ることを計画していたが、保有する病原体の病原性低下により感染試験を実施することができなかった。このため、病原体構成成分(細菌：LPS、寄生虫：キトサン)を用い擬似感染状態をつくり、この時のTh細胞サブセットの変化について FCM 細胞内サイトカイン染色技術を用い検討した。

4. 研究成果

平成26年度は、哺乳類においてTh細胞の分化を誘導することが知られるサイトカイン：IL-4/13, IL-6, IL-12, TGF- β および IFN γ にターゲットにしぼり、トラフグの各サイトカインについて、大腸菌発現系を用い組換えタンパク質を作製した。全ての組換えサイトカインにおいて可溶性タンパク質が得られ、ニッケルカラムを用いた精製、続くエンドトキシンの除去を終えた段階で、以降の実験に供試するために十分な収量が得られた。続いて、抗トラフグ CD4 抗体を用い、MACS 法によって抹消血より CD4 陽性 T 細胞(Th 細胞)の分取を行った。当該細胞に作製した組換えサイトカインを作用させ、フローサイトメーターによって経時的な細胞の形態変化を観察したところ、形態に顕著な変化は認められなかった。続いて、組み換えサイトカインを作用させた Th 細胞におけるサイトカイン遺伝子(19 種類)の発現を、マルチプレックス RT-PCR アッセイによって確認した。その結果、組換え IL-4/13 で刺激された Th 細胞では、

IL-4/13 遺伝子の発現が誘導され、IFN γ で刺激された Th 細胞では、IFN γ 遺伝子の発現が増加することが確認された。さらに Th 細胞の分化誘導に関する転写因子[Th1: T-bet, Th2: GATA3, TH17: ROR γ mat, iTreg: FoxP3 (哺乳類)]の発現を解析したところ、作用させた組換えサイトカインの種類に応じた特異的な発現パターンは確認されなかった。

平成27年度は、初年度に作製した組換えサイトカインならびに抗フグサイトカイン抗体を用い、フローサイトメーターを用いた細胞内染色技術の構築を行った。まず初めに、哺乳類で使用されるサイトカイン放出阻止剤: Brefeldin A または momensin を用い、トラフグ Th 細胞におけるサイトカインの細胞外放出阻止法を検討した。その結果、Brefeldin A はサイトカインの放出を阻止することが確認された。続いて、組換えサイトカインを作用させた Th 細胞を Brefeldin A で処理し、抗フグサイトカイン抗体を用いた細胞内染色技術によってサイトカインの産生パターンを解析した。その結果、前年度の遺伝子レベルでの結果と同様に、1) Th1 サイトカインである IFN γ を作用させた Th 細胞においては、IFN γ の産生が増加し、2) Th2 サイトカインである IL-4/13 を作用させた Th 細胞においては、IL-4/13 の産生が増加することが確認された。これらの結果から、フグにおいても哺乳類と同様の機能性 Th 細胞(Th1 および Th2)の存在が示唆された。続いて、産生されたサイトカインがミエロイド系の細胞を活性化するかについて検討した。まず初めに組換えサイトカイン(IFN γ および IL-4/13)を魚体に接種し、経時的に摘出した食細胞の活性について測定した。その結果、全てのサイトカイン接種区において食細胞の活性酸素の産生能、貪食能およびリゾチーム活性の増強が認められた。さらに、IFN γ の接種区においては、IL-1 β , TNF- α , IL-6 などの炎症性サイトカイン遺伝子の発現が強く誘導されることが認められた。

平成28年度は、病原体感染時のTh細胞サブセットの変化を探ることを計画していたが、保有する病原体の病原性低下により感染試験を実施することができなかった。このため、病原体構成成分(細菌：LPS、寄生虫：キトサン)を用い擬似感染状態をつくり、この時のTh細胞サブセットの変化について検討した。まず初めに、血液より MACS 法によって Th 細胞を分取し、本細胞を LPS またはキトサンで刺激した。刺激後、平成27年度に構築した細胞内サイトカイン染色技術を用い、

Th細胞を4グループ [IFN γ ポジティブ(産生)細胞、IL-4/13 ポジティブ細胞、ダブルポジティブ細胞、ダブルネガティブ(非産生)細胞]に分け、各病原体成分による分化誘導について解析した。

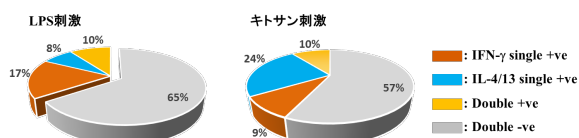


図1 LPSまたはキトサンで刺激したTh細胞におけるサイトカインの産生パターン

その結果、LPSで刺激後のTh細胞のポピュレーションは、IFN γ ポジティブ細胞17%、IL-4/13ポジティブ細胞8%、ダブルポジティブ細胞10%、ダブルネガティブ細胞65%であった。本結果は、平成27年度のフグ組換えIFN γ を作用させたTh細胞のポピュレーション比と酷似しており、細菌感染時にはTh1細胞(IFN γ 産生細胞)への誘導が進むことが示唆された。一方、キトサンで刺激したTh細胞のポピュレーションは、IFN γ ポジティブ細胞9%、IL-4/13ポジティブ細胞24%、ダブルポジティブ細胞9%、ダブルネガティブ細胞57%となり、フグ組換えIL-4/13を作用させたTh細胞のポピュレーション比(H27年度)と類似していた(図1)。このことから、寄生虫感染時にはTh2細胞(IL-4/13産生細胞)への分化が誘導されることが示唆された。

以上の結果より、魚体内のTh細胞集団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3件)

- (1) Tomoya Kono, Takanori Ida, Natsumi Kawahara, Fumiya Watanabe, Gouranga Biswas, Takahiro Sato, Kenji Mori, Mikiya Miyazato. Identification and immunoregulatory function of neuromedin U (NMU) in the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Developmental and Comparative Immunology*, in press, 査読有
- (2) Gouranga Biswas, Ryusuke Nagamine, Jun-ichi Hikima, Masahiro Sakai, Tomoya Kono. Inductive immune responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*)

treated with recombinant IFN- γ , IFN- γ rel, IL-4/13A and IL-4/13B. *International Immunopharmacology*, 2016, 31, 50-56. 査読有

- (3) S. Bilen, G. Biswas, S. Otsuyama, T. Kono, M. Sakai and J. Hikima. Inflammatory responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) head kidney cells stimulated with an inflammasome-inducing agent, nigericin. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 46, 222-230. 査読有

[学会発表](計4件)

- (1) Koshin Mihara, Shun Maekawa, Han-Ching Wang, Takashi Aoki, Tomoya Kono, Masahiro Sakai and Jun-ichi Hikima. Functional characterization of recombinant interleukin(IL)-17A/F1 in the Japanese pufferfish, *Takifugu rubripes*. The 10th IMT-GT UNINET Conference 2016, 2016/12/1, Songkla, Thailand
- (2) M. Sakai, Takashi Morimoto, Gouranga Biswas, Tomoya Kono, Jun-ichi Hikima. Immune responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) head kidney cells stimulated with particulate silica. *International Society of Developmental and Comparative Immunology*, 2015/7/9-13, Murcia, Spain.
- (3) Masahiro Sakai, Shunsuke Kinoshita, Jun-ichi Hikima, Tomoya Kono and Gouranga Biswas. In silico identification and expression analysis of tumor necrosis factor super family genes in the Japanese pufferfish, Fugu (*Takifugu rubripes*). The 10th Aisa-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2014/5/4-8, Taipei, Taiwan.
- (4) Ryusuke Nagamine, Gouranga Biswas, Jun-ichi Hikima, Masahiro Sakai, Tomoya Kono. Immunostimulant effects of recombinant cytokine administration in the Japanese pufferfish, *Takifugu rubripes*. Seventh International Symposium on Aquatic Animal Health, 2014/8/31-9/4, Oregon, USA

6. 研究組織

- (1)研究代表者
河野 智哉 (KONO TOMOYA)
宮崎大学・農学部・准教授
研究者番号: 60527547