

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 14 年度博士課程 入学

氏名 荒木亨介

指導教官名 鈴木譲

論文題目 トラフグ T 細胞に関する研究

近年の水産養殖業の集約化と発展に伴い、次々に起こる新たな疾病の発生による大きな産業的被害が問題となっている。一方、食品安全性に対する意識が高まり、薬剤使用に対する批判もある中、ワクチン、免疫賦活剤、あるいは耐病性育種といった有効な対策は大きく遅れている。この一因として魚類の免疫学に対する理解が極めて不十分である点があげられる。特に抗体を産生する B 細胞と共に、免疫系の骨格をなす最も重要な細胞である T 細胞は、細胞表面の T 細胞受容体 (TCR) が抗原と結合することで様々な形で免疫応答に関わる細胞であるが、魚類においてはその産生器官としての胸腺の存在、また移植片拒絶現象など、T 細胞の存在を示唆する報告はあるものの知見に乏しい。さらに哺乳類では、細胞傷害性 T 細胞、ヘルパー T 細胞といったサブセットが知られるが、魚類の T 細胞あるいはそのサブセットの識別・単離は未だほとんどなされていない。哺乳類のような T 細胞表面マーカー分子に関する情報、またそれら分子に対する抗体などのツールがまだまだ充実していないためである。本研究はゲノムデータベースが充実しているトラフグを材料に、魚類 T 細胞および T 細胞サブセットの識別のための基礎的知見の蓄積、および機能の解明を目指したものである。

第一章 トラフグ T 細胞表面マーカー分子 CD3、CD4、CD8 の cDNA クローニングと一次構造解析

哺乳類ではすべての T 細胞表面に TCR と共に発現する CD3 分子群、ヘルパー T 細胞表面のみに発現する CD4 分子、細胞傷害性 T 細胞にのみ発現する CD8 分子群をマーカーとすることで、T 細胞および T 細胞サブセットの識別を行っている。そこで、本章ではトラフグゲノムデータベースを利用して、他種の CD3 ϵ 鎖、CD3 γ/δ 鎖、CD4 鎖、CD8 α 鎖、CD8 β 鎖遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を示す配列をもとにプライマーを設計した。次いで、胸腺由来の cDNA を用いた RACE 法による cDNA クローニングを行い、2 つの CD3 ϵ 鎖（それぞれ CD3 ϵ -1、CD3 ϵ -2 とする）、CD3 γ/δ 鎖、CD4 鎖、CD8 α 鎖および CD8 β 鎖 cDNA の塩基配列を決定した。既知の他の脊椎動物のものとホモロジー検索を行った結果、トラフグ CD3 ϵ -1 および CD3 ϵ -2 は他種の CD3 ϵ 鎖と 20~39%の、トラフグ CD3 γ/δ は他種の CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、および CD3 γ/δ 鎖と 20~39%の、トラフグ CD4 は他種の CD4 鎖と 15~20%の、トラフグ CD8 α は他種の CD8 α 鎖と 18~47%の、トラフグ CD8 β は他種の CD8 β 鎖との 15~23%の同一性を示した。また一次構造解析の結果、今回単離したすべての cDNA は細胞外領域、膜貫通領域および細胞質領域から構成される膜タンパクをコードするものであり、それぞれの鎖に特徴的なモチーフが比較的良好に保存されていた。このように、T 細胞および T 細胞サブセットの機能に関わる主要な細胞表面分子である CD3、CD4、CD8 が一魚種内に存在することがトラフグにおいて初めて示された。このことから、魚類においても T 細胞サブセットが分化しているものと推察された。

第二章 トラフグ T 細胞表面マーカー分子 CD3、CD4、CD8 遺伝子の発現解析

RT-PCR 法を用いて、末梢血白血球 (PBL)、胸腺、頭腎、体腎、脾臓、腸管、皮膚、鰓、筋肉におけるトラフグ CD3 ϵ 、CD3 γ/δ 、CD4、CD8 α 、CD8 β 、および TCR α 鎖の遺伝子発現を調べた。その結果、これらのすべての T 細胞マーカー遺伝子は PBL、リンパ系組織 (胸腺、頭腎、体腎、脾臓)、および粘膜組織 (腸管、皮膚、鰓) において発現が認められ、筋肉ではいずれの遺伝子も発現は認められなかった。またこれらすべての

遺伝子は特に胸腺において強く発現していた。次に、リンパ系組織（胸腺、頭腎、体腎、脾臓）において *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、T 細胞マーカー遺伝子発現細胞の分布を調べた。頭腎、体腎、脾臓では、組織全体に渡って、陽性細胞が確認された。また胸腺においてはリンパ球が豊富な層、すなわち *lymphoid outer zone* と、*epithelioid inner zone* において陽性細胞が多数確認された。これらはそれぞれ哺乳類の胸腺の皮質と髄質に相当するものと考えられているが、哺乳類、鳥類と同様に、魚類の胸腺もまた T 細胞の成熟器官であることを示すものである。またすべての T 細胞マーカー遺伝子はリンパ球様の細胞に発現が見られたことから、これら遺伝子は T 細胞に発現しているものと考えられる。本章における発現解析の結果から、魚類の T 細胞は胸腺で分化・成熟し、それらが血管を巡ってリンパ系組織などをくまなく巡ることで、生体防御に寄与しているものと考えられる。

第三章 抗体によるリンパ球サブセットの分離

これまで、魚類 T 細胞に対する抗体はいくつか報告されてきたが、白血球を抗原として得られたものがほとんどであるため、抗原分子（エピトープ）が明らかになっているものは少ない。近年、ニジマスにおいて TCR α 鎖に対する抗体が作製されたが、これを除いて、いまだ T 細胞および T 細胞サブセットを識別・単離できる抗体は存在しない。そこで本章では第一章で明らかにした CD 分子の情報をもとに抗体の作製を行い、得られた抗体によるリンパ球サブセットの分画を試みた。トラフグ CD3 ϵ 鎖、CD4 鎖、CD8 α 鎖のアミノ酸をコードする領域の cDNA を哺乳類細胞発現ベクター pcDNA3 に組み込み、これらをマウスへの免疫抗原とした。マウス筋肉への DNA 免疫を行った結果、いずれのプラスミド抗原も、マウス筋肉内にトラフグ CD 分子遺伝子の強い発現を確認することができた。しかし、CD3 ϵ -pcDNA および CD4-pcDNA 免疫マウスでは血中抗体価の上昇は確認されず、CD8 α -pcDNA 免疫マウスのみで血中抗体価の上昇を確認できた。次に抗トラフグ Ig モノクローナル抗体（福井県立大学 宮台博士より分与）および得られた抗トラフグ CD8 α 鎖抗血清を用いたマグネティックセルソーティングにより PBL を分画し、各画分における細胞の形態、およびリンパ球細胞表面マーカー遺伝子 (TCR α 、CD3 ϵ 、

CD3 γ/δ 、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IgL 鎖) の発現を調べた。その結果、抗 Ig 抗体により B 細胞を含む画分と T 細胞を含む画分に分画できることが示された。また抗 CD8 α 抗血清により、CD8 $^+$ T 細胞を含む画分と、CD4 $^+$ T 細胞および B 細胞を含む画分に分画することに成功した。本章における解析の結果、魚類で初めて T 細胞サブセットを分画する方法を確立した。

第四章 トラフグリンパ球サブセットのマイトジェン応答

免疫担当細胞としての機能を有するリンパ球は非特異的刺激物質であるマイトジェンの刺激により幼若化を起こして活性化することが知られており、ヒトではこの活性を、細胞性免疫能を評価する重要な指標としている。本章では、リンパ球幼若化試験により数種類のマイトジェンに対するトラフグ白血球の応答性を明らかにし、さらには第三章で確立した細胞分画法を用いて各マイトジェンのリンパ球サブセット選択性の検討を行った。

トラフグ PBL をコンカナバリン A (ConA)、リポポリサッカライド (LPS)、フィトヘマグルチニン (PHA)、ポクウィードマイトジェン (PWM) で刺激培養したのち、5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 取り込み法により細胞増殖能を測定した。その結果、すべてのマイトジェンに対してトラフグ PBL は応答性を示した。次にマイトジェンで刺激した PBL に対するフローサイトメトリー解析および RT-PCR 解析、抗体により分画した細胞群をマイトジェン刺激したのちの細胞増殖試験を行ったところ、すべての試験において LPS および PWM は Ig $^+$ 細胞を、PHA は CD8 $^+$ 細胞を活性化し、増殖させることが明らかになった。これらの結果からトラフグにおいて、LPS および PWM は B 細胞マイトジェンであり、PHA は CD8 $^+$ T 細胞マイトジェンであることが示された。LPS および PWM は哺乳類の B 細胞マイトジェンでもあることから、哺乳類と魚類では B 細胞の活性化機構が同様であることが示されたが、T 細胞サブセットに関しては ConA が CD8 $^+$ T 細胞を活性化しないなど哺乳類での知見とは多少異なる結果が示されたことから、T 細胞の活性化機構においては魚類と哺乳類で何らかの相違がある可能性が示された。

以上、本研究により、魚類で初めて一魚種内で T 細胞および T 細胞サブセットを識別するための基礎的知見が集まった。すべての T 細胞に発現する CD3 分子、ヘルパー T 細胞のみに発現する CD4 分子、細胞傷害性 T 細胞のみに発現する CD8 分子の一次構造の決定およびそれら遺伝子の発現解析により、これら分子はトラフグにおいても T 細胞のマーカーとなることが示された。さらに得られた T 細胞マーカー遺伝子情報をもとに作製した抗体を用いて白血球より T 細胞サブセットを分画し、その形態および機能の一端を明らかにした。これまで魚類でも T 細胞が関与して生じると考えられる現象（移植片拒絶、各種サイトカイン遺伝子の発現）が確認されているが、T 細胞が関わる直接的な証拠はまだ得られていない。近年、トラフグを中心に次々に T 細胞に関連したサイトカイン遺伝子が単離されており、これらサイトカイン遺伝子や T 細胞マーカー遺伝子の情報を利用した魚類の獲得免疫機構に関する詳細な解析が今後進められ、水産増養殖分野における防疫対策に応用されることが期待される。