

## 論文の内容の要旨

氏名：柴 崎 康 宏

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題目：魚類細胞性免疫機構における  $IFN\gamma\text{rel}$  の機能解明

近年魚類養殖において、ウイルス性疾病および細胞内寄生細菌による疾病が増加している。これらの疾病に対する対策にはワクチンによる予防が重要であるが、有効なワクチンの開発が遅れている。その原因の一つとして、これらの病原体の排除に重要と考えられる細胞性免疫に関する知見が魚類では著しく不足していることが挙げられる。獲得免疫は細胞性免疫と液性免疫に大別され、細胞性免疫においては、CD4陽性T細胞が産生するサイトカインのはたらきにより細胞傷害性T細胞が活性化し、抗原特異的に感染細胞や非自己抗原を発現する標的細胞を傷害する。インターフェロン $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ) は、抗ウイルス活性を誘導するとともに、T細胞やNK細胞より産生され、細胞性免疫の活性化に主要な役割を担うサイトカインである。

魚類において、高等脊椎動物に相同な  $IFN\gamma$  に加えて魚類特有の  $IFN\gamma\text{rel}$  遺伝子の存在が明らかとなっており、これまでに  $IFN\gamma$  については抗ウイルス活性や免疫調節作用がギンブナ、キンギョ等数魚種で明らかとなっている。しかし、 $IFN\gamma\text{rel}$  については、インターフェロンの定義として重要な抗ウイルス活性やその作用機序は明らかとなっていない。

そこで、本研究では魚類細胞性免疫研究の優れたモデルとなっているコイ科魚類のクローンギンブナを用いて、生体内における細胞性免疫の代表的な反応である移植片対宿主反応 (Graft Versus Host Reaction; GVHR) をモデルとして GVHR 誘導に伴う T細胞サブセットの動態を解析した。次に、魚類細胞性免疫における  $IFN\gamma\text{rel}$  の機能を解明するため、 $IFN\gamma\text{rel}$  の生物活性やその受容体、細胞内シグナル伝達機構の解明を試みるとともに、T細胞の関与について検討した。

### 1. 細胞性免疫応答における T細胞サブセットの動態（移植片対宿主反応をモデルとして）

移植片対宿主病 (Graft Versus Host Disease; GVHD) は、移植されたドナー由来の免疫担当細胞がレシピエントの非自己抗原を認識し攻撃する移植片対宿主反応 (GVHR) によって起こり、細胞性免疫が重要な役割を担う。魚類においても感作白血球の移植により GVHR が誘導されることが報告されているが、GVHR 誘導における T細胞の役割については明らかになっていない。そこで、魚類 GVHR における T細胞の関与を明らかにするため、GVHR 誘導に伴う T細胞サブセットの動態を解析した。

ドナーとして諏訪湖産3倍体クローンギンブナ (S3N)、レシピエントとして S3N とキンギョを掛け合わせた4倍体雑種 (S4N) を用いた。2週間おきに2回、S4N から S3N に鱗移植によるアロ抗原感作を行った。最終感作より7日後に、S3N の頭腎および体腎白血球からリンパ球分画を得た。このリンパ球を感作に用いた S4N の尾部血管に投与し移植を行った。GVHD の進行を評価するために、ドナー細胞移植後のレシピエントの死亡率を測定した。その結果、移植30日後には、感作リンパ球移植群のみに GVHD を発症し死亡する個体が認められた。また、GVHR に伴う組織傷害を評価するため、病理組織学的観察を行ったところ、GVHR 誘導時に、レシピエントの各組織への単核球の浸潤とそれに伴う組織傷害が認められた。

次に、GVHR の誘導に伴う T細胞サブセットの動態を明らかにするために、移植3、7、14日後に、哺乳類において GVHD の標的器官として知られている脾臓、肝臓および腸、並びに硬骨魚類の代表的なリンパ・造血器官である腎臓および末梢血からそれぞれ白血球を採取した。ドナー細胞由来細胞とレシピエント細胞を識別するため、生体染色色素である Hoechst33342 による DNA 染色を行うとともに、ギンブナ CD8 $\alpha$  鎖および CD4 に対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色を行い、フローサイトメーターを用いて、レシピエントにおけるドナー T細胞サブセットの動態について解析を行った。その結果、移植後7日目および14日目において、感作リンパ球移植群においてドナー CD4 陽性 T細胞が先ず増加し、組織障害が顕著となる14日目頃に CD8 陽性 T細胞が増加した。

また、CD8 陽性 T細胞による GVHD 誘導について検討するため、Magnetic Cell Sorting (MACS) 法により、

感作したドナーリンパ球より CD8 陽性 T 細胞を除いた白血球を移植し、GVHD の発症の有無について検討した。その結果、CD8 陽性 T 細胞を除いた細胞を移植した群においては GVHD の発症および死亡個体は認められなかった。

以上の結果から、ギンブナにおける GVHR の誘導には、CD4 陽性 T 細胞が関与するとともに、GVHR に伴う組織傷害には CD8 陽性 T 細胞が重要な役割を果たすことが示唆された。

## 2. 魚類特有のインターフェロン、IFN $\gamma$ rel の同定

高等脊椎動物では II 型インターフェロンとして IFN $\gamma$  のみが知られているが、前述のように、一部の魚種では IFN $\gamma$  に加えて魚類特有の IFN $\gamma$  である IFN $\gamma$ rel の存在が報告されている。しかし、その作用機序やインターフェロンの定義として重要な抗ウイルス活性については不明であった。そこで、IFN $\gamma$ rel の機能特性を明らかにするために、ギンブナより IFN $\gamma$ rel 遺伝子の単離を試みたところ、核移行シグナル(NLS)配列の有無により 2 種類の IFN $\gamma$ rel が得られ、それぞれ IFN $\gamma$ rel 1、IFN $\gamma$ rel 2 と名付けた。IFN $\gamma$ rel 1 および IFN $\gamma$ rel 2 の cDNA を HEK293 細胞に遺伝子導入し発現を試みたところ、両分子は共に細胞外に分泌され抗ウイルス活性を示した。このことから、IFN $\gamma$ rel 1 および IFN $\gamma$ rel 2 はいずれも抗ウイルス活性を示すサイトカイン（インターフェロン）であることが明らかとなった。

脊椎動物におけるインターフェロンは、リガンドの構造、相互作用する受容体、および関与する転写因子（JAK-STAT 経路）によって、I 型、II 型および III 型の 3 種類に分類されている。魚類 IFN $\gamma$  は他の脊椎動物同様に、ホモ二量体を形成して IFN $\gamma$  受容体に結合し、転写因子 STAT1 を介して生物活性を示すことが解っているが、IFN $\gamma$ rel については全く不明である。そこで、IFN $\gamma$ rel 1 および IFN $\gamma$ rel 2 の構造および作用機序をインターフェロンの分類に沿って解析した。その結果、IFN $\gamma$ rel 1 および IFN $\gamma$ rel 2 は共に単量体として存在することが判明した。また、哺乳類の IFN $\gamma$  とは異なり、IFN $\gamma$ rel 1 は転写因子 STAT6 を、IFN $\gamma$ rel 2 は STAT3 を介してシグナル伝達を行うことが判明した。受容体の同定には至っていないが、既知の IFN $\gamma$  受容体とは相互作用を示さなかったことから、未知の受容体を介して作用すると考えられた。

以上のことから、IFN $\gamma$ rel 1 および IFN $\gamma$ rel 2 は、脊椎動物における既知のインターフェロンと異なる作用機序により生物活性を示す新規インターフェロンであることが明らかとなった。

## 3. 細胞性免疫における IFN $\gamma$ rel の機能解明および産生細胞の同定

IFN $\gamma$ rel の細胞性免疫応答における役割を明らかにするため、細胞性免疫が重要な役割を担う種々の免疫反応における IFN $\gamma$ rel の投与効果並びに発現動態を解析した。

同種移植片拒絶反応における IFN $\gamma$ rel の役割を明らかにするため、レシピエントに組み換え IFN $\gamma$ rel を投与した後に、同種異系のクローンギンブナより鱗を移植し、移植片の拒絶に及ぼす IFN $\gamma$ rel 投与の影響について検討した。その結果、IFN $\gamma$ rel 1 投与により拒絶反応が促進された。また、GVHR 誘導に伴う IFN $\gamma$ rel の発現動態を解析したところ、T 細胞の増加に伴い T 細胞における IFN $\gamma$ rel の発現上昇が観察された。さらに、細胞性免疫が感染防御に重要な役割を果たす細胞内寄生菌である *Edwardsiella tarda* を人為的にギンブナに感染させた場合、感染初期に一過性の IFN $\gamma$ rel 2 の発現上昇が起こり、時間の経過とともに IFN $\gamma$ rel 1 の発現の上昇が認められた。

次に、IFN $\gamma$ rel の産生細胞の同定のため、産生細胞を刺激する条件について検討した。その結果、白血球を PMA とイオノマイシンで刺激したところ、刺激に伴い IFN $\gamma$ rel 1 および IFN $\gamma$ rel 2 の発現が有意に上昇した。刺激後の白血球を用いて、ギンブナ CD4、CD8 および IgM に対するモノクローナル抗体および抗 IFN $\gamma$ rel 1 または抗 IFN $\gamma$ rel 2 ポリクローナル抗体による二重染色を行い、フローサイトメトリー法にて解析したところ、CD4、CD8 および IgM 陽性細胞の中に、IFN $\gamma$ rel 1 および IFN $\gamma$ rel 2 を産生する細胞が認められた。なお、IgM 陽性細胞には Fc 受容体を発現する NK 細胞が含まれることから、NK 細胞による産生の可能性が考えられる。以上の結果より、IFN $\gamma$ rel は細胞性免疫応答に関与し、主にリンパ球により産生されることが明らかとなった。

本研究は魚類の細胞性免疫の研究に有用なモデルであるクローンギンブナにおいて、魚類特有の 2 種類の IFN $\gamma$ rel 遺伝子を単離し、その構造および機能並びに産生細胞を明らかにした。本研究の成果は、IFN $\gamma$  による魚類の細胞性免疫応答の制御機構の解明に基づく、魚類疾病の予防法の開発に結び付くと考えられ

る。また、本研究により同定された IFN $\gamma$ rel の構造、受容体およびシグナル伝達機構が既知の IFN $\gamma$  と異なることから、脊椎動物における新規のサイトカインである可能性が高く、学術的意義が大きい。