

論文の内容の要旨

論文発表者氏名：宮澤 龍一郎

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題目： コイ科魚類のリンパ器官における T 細胞の分化・成熟機構の解析

魚類は哺乳類と同様、獲得免疫の司令塔であるヘルパー T 細胞と、特異的に細胞傷害性を行う細胞傷害性 T 細胞などの T 細胞亜集団を有し、それらの細胞表面にはそれぞれ CD4 及び CD8 と呼ばれる糖蛋白質が発現している。

哺乳類において、T 細胞は骨髄で T 前駆細胞として発生し、次に胸腺において教育（負の選択）を受け自己反応性 T 細胞は排除される。その後、これら成熟 T 細胞は、脾臓やリンパ節などの全身の二次リンパ器官へと移動し生体防御を行う。一方、硬骨魚類は骨髄とリンパ節を欠くものの、骨髄の代わりに腎臓中に造血組織が存在し、また、胸腺中には成熟途中の T 細胞が豊富に存在するなど、哺乳類と同様、魚類の胸腺も T 細胞の分化・成熟を行っていると考えられるが、その詳細な機構は明らかになっていない。また、魚類の腎臓は上述のように造血組織を含む一次リンパ器官としての機能を持つ。しかし、腎臓中には CD4 や CD8 を発現した成熟 T 細胞を多く含むことから、二次リンパ器官の様に白血球の貯留にも関与していると考えられるが、未だ二次リンパ器官としての機能は不明な点が多い。

そこで本研究では、魚類 T 細胞の分化・成熟と体内における動態を調べることを目的とした。すなわち、まず、胸腺の負の選択に関わる自己免疫疾患原因遺伝子 (Auto immune regulator: Aire) に着目し、Aire 欠損ゼブラフィッシュをモデルに、魚類の胸腺における T 細胞の分化・成熟機構の解明を試みた。また、Aire 欠損ゼブラフィッシュの解析に先立ち、ゼブラフィッシュ T 細胞の機能解析ツールとして、近縁魚種であるギンブナ CD4-1 及び CD8 α に対する抗体を用いて、ゼブラフィッシュリンパ球との交差性解析を行った。さらに、T 細胞レセプター (TCR) 構成分子である CD3 ϵ の腎臓における特有な発現機構に着目し、ギンブナをモデルに T 細胞の活性化や貯留における腎臓機能解明を試みた。

1. Aire 欠損ゼブラフィッシュを用いた、魚類 T 細胞の機能解析

Aire は胸腺髄質上皮細胞に発現する転写因子であり、胸腺における自己抗原遺伝子の発現を調節し、自己反応性 T 細胞の除去（負の選択）に関与している。これまでに、本遺伝子を欠損した個体では自己反応性 T 細胞が除去されず、自己免疫疾患を発症することが哺乳類の知見から明らかになっている。一方、魚類では末梢器官における自己反応性 T 細胞の抑制に関わる、制御性 T 細胞 (Treg) のマスター転写因子である FOXP3 を欠損したゼブラフィッシュが作出されており、自己免疫疾患を起こすことがわかっている。しかし、Aire を欠損した魚類に関する報告はなく、胸腺における Aire 発現の欠如が、魚類の T 細胞の機能に与える影響は不明である。また、ゼブラフィッシュの寿命は 2 年程度と短いため、自己免疫疾患の病態を解析するモデルとして優れている。そこで、本研究では Aire 欠損ゼブラフィッシュを作製し、胸腺における T 細胞の分化成熟異常による、T 細胞の機能解析を行った。

1) 抗ギンブナ CD4-1 及び CD8 α 抗体を用いた、ゼブラフィッシュ T 細胞に対する解析ツール

の開発

これまでゼブラフィッシュは遺伝学や発生学のモデル動物として多くの研究に用いられてきた。一方、抗体を始めとする免疫学の研究ツールは不足しており、免疫細胞を解析する際に障害となっていた。ギンブナはゼブラフィッシュと同じコイ科に属す近縁魚種であり、CD4-1、CD8 α をはじめとする T 細胞に対するモノクローナル抗体(mAb)が既に作製されている。そこで、これまでに作製されている抗ギンブナ CD4-1 及び CD8 α mAb が、ゼブラフィッシュのリンパ球に交差するか検討した。

まず、哺乳類系培養細胞株である HEK293T 細胞に、ゼブラフィッシュの CD4-1、CD4-2 及び CD8 α (zCD4-1、zCD4-2 及び zCD8 α) 分子を強制発現させた後、抗ギンブナ CD4-1、CD8 α 抗体を用いて免疫染色を行い、フローサイトメトリー (FCM) 法より解析を行った。その結果、抗ギンブナ CD4-1 抗体は zCD4-1 分子と交差反応性を示し、zCD4-2 や zCD8 α 分子とは反応しなかった。一方、抗ギンブナ CD8 α 抗体は zCD8 α 分子とのみ交差反応性を示した。次に、ゼブラフィッシュのリンパ球中における CD4-1 及び CD8 α 陽性 T 細胞と、抗ギンブナ CD4-1、CD8 α 抗体との交差反応性を FCM 法により解析を行なった。その結果、ゼブラフィッシュ腎臓リンパ球分画において、約 10%程度 CD4-1 及び CD8 α 陽性細胞が認められた。各抗体陽性細胞をセルソーターにより分取し、遺伝子発現細胞解析を行った。その結果、抗 CD4-1 抗体陽性細胞は *cd4-1*、*cd4-2* 及び *T cell receptor alpha-chain (tcrac)* を、抗 CD8 α 抗体陽性細胞は *cd8a* と *tcrac* をそれぞれ強く発現していることがわかった。

以上の結果から、抗ギンブナ CD4-1 及び CD8 α 抗体はゼブラフィッシュの CD4-1 及び CD8 α 陽性 T 細胞をそれぞれ特異的に認識することがわかり、ゼブラフィッシュをモデルにした免疫疾患の解析ツールとして有用であることが判明した。

2) Aire 欠損ゼブラフィッシュにおける表現型の解析

Aire 欠損ゼブラフィッシュは共同研究先である徳島大学より供与され、TALEN 法を用い遺伝子欠損個体は作製された。Aire 欠損ゼブラフィッシュの表現型の解明に際し、胚発生期及び成熟個体を用いて各解析を行った。まず、Aire 欠損ゼブラフィッシュの胚発生期における異常を、受精後 3 日間観察を行ったところ、肉眼初見では胚発生に異常は認められなかった。次に、6 ヶ月齢の Aire 欠損ゼブラフィッシュにおける組織切片を作製し、病理組織学的に観察を行ったが、自己免疫疾患と考えられる所見は認められなかった。一方、胸腺において CD4-1 及び CD8 α 陽性 T 細胞の分布を FACS により解析を行ったところ、野生型の胸腺において CD4-1 及び CD8 α 陽性 T 細胞の割合はそれぞれ 40%であったものが、Aire 欠損では、CD4-1 及び CD8 α 陽性 T 細胞の割合は、それぞれ 10%と著しく低下していることが明らかになった。また、10 ヶ月齢前後の Aire 欠損個体の一部から、卵細胞の周囲の細胞浸潤を伴う卵巣の萎縮が認められた。そこで、浸潤細胞を詳細に解析するため、汎 T 細胞マーカーである抗ヒト Zap70 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、T 細胞が卵細胞周囲に特異的に浸潤していることが確認された。本解析から、Aire 欠損ゼブラフィッシュにおいても自己認識性の T 細胞が浸潤し、自己免疫疾患の症状を示すと考えられた。更に、同じく 10 ヶ月齢を過ぎた成熟個体では、ミコバクテリウムに感染する個体が多いことも、病理切片を用いた抗酸菌染色から明らかになった。以上より、Aire 欠損による T 細胞の機能異常は表現型が現れる以前から起り、その異常が蓄積した 10 ヶ月齢前後から、卵巣萎縮を始めとする自己免疫疾患の症状に加え、ミコバクテリウム感染が認められたと考えられた。本研究により、Aire は魚類の T 細胞成熟においても重要な

役割を担っており、CD4-1 及び CD8 α 陽性細胞の減少は哺乳類では報告されておらず、Aire の新たな機能の発見に繋がると考えられる。

2. ギンブナをモデルとした、魚類造血器官である腎臓における CD3 ϵ の特異的な発現機構の解明

CD3 ϵ は TCR と TCR/CD3 複合体を構成する分子であり、全ての T 細胞に発現することから、汎 T 細胞マーカーとして知られており、哺乳類では T 細胞の活性化や細胞内シグナル伝達に関与していることが知られている。しかし、抗ギンブナ CD3 ϵ ポリクローナル抗体を用いた FCM 解析では、腎臓中に抗 CD4-1 や CD8 α 抗体陽性 T 細胞が認められるが、抗 CD3 ϵ 抗体陽性細胞が認められなかった。一方、脾臓、胸腺及び末梢血を始めとする免疫器官から分取した T 細胞からは、抗 CD3 ϵ 抗体陽性細胞が検出された。このことから、腎臓が他の器官とは異なる CD3 ϵ の発現制御機構を持つことが考えられた。本研究では、遺伝子及びタンパク質レベルによる CD3 ϵ の発現を解析し、二次リンパ器官としての腎臓における、CD3 ϵ の特異的な発現機構の解明を試みた。

まず、腎臓における CD3 ϵ の発現をタンパク質レベルで更に評価するため、免疫組織学的染色及びウエスタンブロット法を行った。その結果、これまでの FCM 法による解析と同様に、免疫組織学的染色でも陽性細胞は認められず、ウエスタンブロット法においても腎臓白血球から CD3 ϵ タンパク質は検出されなかった。一方、腎臓における CD3 ϵ の発現を遺伝子レベルで解析するため、定量 PCR 法及び *in situ hybridization* 法を行った。その結果、腎臓においても脾臓などを始めとする器官の T 細胞と同様に CD3 ϵ 遺伝子を発現していることがわかった。これらのことから、腎臓における CD3 ϵ の発現は、mRNA からタンパク質へ翻訳される過程で阻害され、腎臓環境がその発現制御に関与していると考えられた。そこで、腎臓環境の影響を調べるため、腎臓から得た T 細胞を 24 時間培養したのち FCM 解析を行ったところ、腎臓 T 細胞においても CD3 ϵ の発現が認められることが分かった。このことから、腎臓環境において CD3 ϵ の発現が低下すると予想された。ギンブナはクローンであるため、各臓器に由来する白血球の養子移入が可能である。そこで、ドナーギンブナより分取した脾臓白血球を緑色蛍光色素である CFSE により標識した後、同系統レシピエントギンブナへ移入し、レシピエント体内で腎臓に再分布した脾臓由来 T 細胞の CD3 ϵ 発現を FCM 法により解析した。その結果、投与前に CD3 ϵ を発現していた脾臓 T 細胞は、腎臓に再分布後、CD3 ϵ の発現は認められなかった。一方、脾臓や末梢血に再分布した T 細胞では CD3 ϵ が認められた。以上の結果から、ギンブナの腎臓には、T 細胞における CD3 ϵ の発現を抑制する機能があることが明らかになった。

以上より、Aire 欠損ゼブラフィッシュでは CD4-1 及び CD8 α 陽性 T 細胞の減少や、自己免疫疾患様の症状が認められた。このことから、ゼブラフィッシュでは哺乳類と同様に、Aire が胸腺における T 細胞の分化成熟に、一次リンパ器官として重要な役割を担っていることが明らかになった。一方、ギンブナの腎臓では TCR/CD3 複合体を構成する CD3 ϵ 分子の発現を、特異的に低下させていることが明らかになった。哺乳類において、CD3 ϵ は T 細胞の活性化に関与し、T 細胞上で分解や再合成が活発に起り、T 細胞の異常な活性化を抑制している。魚類はリンパ節を欠き、二次リンパ器官における T 細胞の活性化やその抑制機構は不明であった。本研究により、腎臓は CD3 ϵ の発現制御を中心とした、T 細胞の過剰な活性化の抑制などに、二

次リンパ器官としても重要な役割を果たしていると考えられた。

硬骨魚類は、約 4 億～5 億年前に哺乳類との共通祖先から別れ、独自に免疫系を進化させてきた。ギンブナの腎臓は哺乳類とは異なる進化を遂げ、免疫系において重要な役割を担っている。一方、胸腺における T 細胞の成熟機構は、ゼブラフィッシュと哺乳類の間で機能が保存されていることが明らかになった。