

## 論文審査の結果の要旨

氏名：宮澤龍一郎

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：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

審査委員：（主査） 教授 森友 忠昭

（副査） 教授 杉谷 博士

教授 高橋 恭子

准教授 間野 伸宏

魚類は哺乳類と同様、獲得免疫の司令塔である CD4 陽性ヘルパー T 細胞と細胞傷害活性を示す CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞を有す。哺乳類において、T 細胞は造血器官である骨髄で 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、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、生体防御を担う。一方、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が造血を担い、また、胸腺は成熟途中の T 細胞を豊富に含む。これらのことは魚類の腎臓や胸腺が、哺乳類の骨髄や胸腺と同様、T 細胞の発生・成熟の場であると考えられる。また、魚類の腎臓は上述のように一次リンパ器官としての機能を持つが、CD4 または CD8 のいずれかを発現した成熟 T 細胞も多く含み、二次リンパ器官としても機能していると考えられている。しかし、魚類の免疫器官と T 細胞の成熟に関する知見は乏しく、不明な点が多い。そこで本研究では、魚類 T 細胞の成熟と機能に対する胸腺および腎臓の役割について検討した。

### 1. 抗ギンブナ CD4-1 および CD8 $\alpha$ 抗体のゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) リンパ球に対する交差性解析

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が、抗体を始めとする免疫学の研究ツールは乏しく、免疫細胞を解析する上で障害となっていた。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 や CD8 $\alpha$  に対するモノクローナル抗体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 抗体および抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体が、ゼブラフィッシュの T 細胞に反応するか検討した。まず、ゼブラフィッシュの CD4-1、CD4-2 および CD8 $\alpha$  (zCD4-1、zCD4-2 および zCD8 $\alpha$ ) 分子を強制発現させた HEK293T 細胞に対して抗ギンブナ CD4-1 抗体または抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体を用いて免疫染色し、フローサイトメトリー (FCM) 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 $\alpha$  分子とは反応しなかった。一方、抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体は zCD8 $\alpha$  分子とのみ交差反応性を示

した。次に、当抗体が認識するゼブラフィッシュリンパ球の表現型を解析した。ゼブラフィッシュ腎臓細胞を抗ギンブナ CD4-1 抗体または抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体を用いて免疫染色し FCM 解析した結果、リンパ球分画中の CD4-1 および CD8 $\alpha$  陽性細胞の割合はそれぞれ 11.1 $\pm$ 1.5% および 7.2 $\pm$ 2.1% であった。各陽性細胞をセルソーターにより分取し、遺伝子発現解析を行ったところ、CD4-1 陽性細胞は *cd4-1*、*cd4-2* および T cell receptor alpha (*tcra*) を、CD8 $\alpha$  陽性細胞は *cd8a* と *tcra* を強く発現していた。

以上より、抗ギンブナ CD4-1 および CD8 $\alpha$  抗体はゼブラフィッシュの CD4-1 および CD8 $\alpha$  陽性 T 細胞をそれぞれ特異的に認識することが示され、ゼブラフィッシュをモデルにした魚類免疫系の解析ツールとして有用であることを明らかにした。

## 2. ゼブラフィッシュをモデルにした胸腺における自己免疫疾患遺伝子 (Aire) の機能解析

Auto immune regulator (Aire) は胸腺髄質上皮細胞に発現する転写因子であり、自己抗原遺伝子発現を制御することで T 細胞成熟過程における負の選択に関与すると考えられているものの、魚類におけるその役割は不明である。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た。Aire 欠損ゼブラフィッシュの胚発生を受精後 3 日間観察したところ、顕微鏡所見上異常は認められなかった。また、6 ヶ月齢の Aire 欠損ゼブラフィッシュにおいても解剖学的・組織学的に自己免疫疾患は顕在しなかった。しかし、10 ヶ月齢前後の Aire 欠損個体の一部に、卵細胞周囲への細胞浸潤を伴う卵巣の萎縮が認められた。そこで卵巣萎縮を呈した組織に対して汎 T 細胞マーカーである抗ヒト Zap70 抗体を用いた免疫組織染色を行ったところ、卵細胞周囲の浸潤細胞は T 細胞であることが示された。さらに、胸腺における自己抗原遺伝子の発現を定量 PCR により解析したところ、解析したほとんどの自己抗原遺伝子の発現が Aire 欠損個体では正常個体と比較して低下していた。このことから、Aire 欠損個体では胸腺における T 細胞の負の選択が正常に行われず、自己反応性 T 細胞が末梢へ遊出したため自己免疫疾患様の症状が現れたと考えられた。また、10 ヶ月齢を過ぎた Aire 欠損ゼブラフィッシュでは、常在菌である抗酸菌の感染症例が多かった。さらに、胸腺中のリンパ球に占める CD4-1 および CD8 $\alpha$  陽性 T 細胞の割合を FCM 解析したところ、野生型個体ではいずれも約 40% であったものが、Aire 欠損個体ではいずれも約 10% と著しく低値を示した。このことから、Aire 欠損個体は胸腺における T 細胞の成熟異常とそれに伴う数的劣化により免疫機能が低下し、易感染性を示したと考えられた。以上より、Aire はゼブラフィッシュにおいても負の選択に関与し、哺乳類と同様に胸腺が一次リンパ器官として機能することが明らかになった。

## 3. ギンブナ (*Carassius auratus langsdorfii*) をモデルとした、二次リンパ器官としての腎臓における CD3 $\epsilon$ の特異的な発現機構の解明

CD3 $\epsilon$  は TCR と複合体を構成して細胞内シグナル伝達を介した T 細胞の活性化に関与する分子であり、哺乳類では全ての 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いる。しかし、抗ギンブナ CD3 $\epsilon$  ポリクローナル抗体等を用いたギンブナ腎臓白血球の FCM 解析の結果、CD4-1 や CD8 $\alpha$  陽性 T 細胞は認められたのに対し、CD3 $\epsilon$  陽性細胞は認められなかった。一方、ギンブナの脾臓、胸腺および末梢血などから分取した T 細胞からは、CD3 $\epsilon$  陽性細胞が検出された。このことから、魚類の腎臓が他の器官とは異なる CD3 $\epsilon$

の発現抑制機構を持つことが考えられた。

そこで本研究では、ギンブナ T 細胞における CD3 $\epsilon$  の発現を遺伝子およびタンパク質レベルで解析し、二次リンパ器官としての腎臓における魚類特有な CD3 $\epsilon$  発現機構の解明を試みた。まず、腎臓白血球における CD3 $\epsilon$  タンパク質の発現を更に評価するため、免疫組織染色およびウエスタンブロット法による CD3 $\epsilon$  の検出を試みた。その結果、これまでの FCM 解析と同様に免疫組織染色においても CD3 $\epsilon$  陽性細胞は認められず、またウエスタンブロット法においても腎臓白血球から CD3 $\epsilon$  タンパク質は検出されなかった。一方、腎臓白血球における CD3 $\epsilon$  の発現を遺伝子レベルで調べるため、定量 RT-PCR 法およびインサイチュハイブリダイゼーション法により解析した。その結果、腎臓白血球は脾臓に分布する T 細胞と同様に CD3 $\epsilon$  mRNA を発現していた。これらのことから、腎臓における CD3 $\epsilon$  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、CD3 $\epsilon$  発現に対する腎臓環境の影響を調べるため、腎臓から得た T 細胞を 24 時間培養後に抗 CD3 $\epsilon$  抗体を用いて FCM 解析を行ったところ、CD3 $\epsilon$  タンパク質の発現が認められた。このことから、腎臓環境外では T 細胞における CD3 $\epsilon$  タンパク質翻訳阻害が起こらず正常に発現することが示された。ギンブナは天然で雌性発生を行うクローンであるため、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ドナー脾臓由来 T 細胞における CD3 $\epsilon$  発現を FCM 法により解析した。その結果、投与前に CD3 $\epsilon$  タンパク質を発現していた脾臓 T 細胞は、腎臓に再分布後は CD3 $\epsilon$  タンパク質を消失していた。一方、脾臓や末梢血に再分布したドナー脾臓由来 T 細胞においては CD3 $\epsilon$  タンパク質の発現が認められた。以上の結果から、ギンブナの腎臓には、T 細胞における CD3 $\epsilon$  タンパク質の発現を抑制する機能があることが明らかになった。

真骨魚類は、約 4 億～5 億年前に哺乳類との共通祖先から分岐し、独自に免疫系を進化させてきた。本研究から、ゼブラフィッシュでは哺乳類と同様、胸腺は Aire を中心に一次リンパ器官として T 細胞の分化・成熟に重要な役割を担っていることが明らかになった。一方、ギンブナの腎臓は哺乳類とは異なる進化を遂げ、リンパ節を持たないギンブナにおいて腎臓が T 細胞の過剰な活性化を抑制する二次リンパ器官として免疫系において重要な役割を担っていると考えられた。

本論文は、T 細胞の成熟や機能の制御に焦点を当てて魚類における胸腺と腎臓の役割を明らかにしものであり、獣医学分野における魚病免疫学の発展に大きく貢献するものと考えられる。

よって本論文は、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

平成 31 年 2 月 21 日