

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

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻  
博士課程

宮澤 龍一郎

2018

## 目次

第1章 緒論	1
第2章 抗ギンブナ CD4-1 および CD8 $\alpha$ 抗体のゼブラフィッシュ リンパ球に対する交差性解析	5
2.1 序論	6
2.2 材料および方法	8
2.3 結果	
2.3.1. ゼブラフィッシュリンパ球における抗ギンブナ CD4-1 抗体 および抗ギンブナ CD8 $\alpha$ 抗体の交差反応	12
2.3.2. 抗ギンブナ CD4-1 抗体および抗ギンブナ CD8 $\alpha$ 抗体が認識 する細胞の形態	12
2.3.3. CD4-1 および CD8 $\alpha$ 陽性細胞における遺伝子発現解析	12
2.3.4. HEK293T 細胞に発現させたゼブラフィッシュの CD4-1 および CD8 $\alpha$ 分子と、抗ギンブナ CD4-1 抗体および抗ギン ブナ CD8 $\alpha$ 抗体との反応性	13
2.4 考察	14
第3章 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 疾患原因遺伝子(Aire)の機能解析	24
3.1 序論	25
3.2 材料および方法	27
3.3 結果	

3.3.1	Aire 欠損ゼブラフィッシュの遺伝子型の同定	30
3.3.2	胚発生の観察	30
3.3.3	胸腺における Aire および自己抗原遺伝子の発現解析	30
3.3.4	Aire 欠損ゼブラフィッシュにおける自己免疫疾患様症状の解析	31
3.3.5	Aire 欠損ゼブラフィッシュにおける感染症の発生	31
3.3.6	胸腺細胞リンパ球分画における CD4-1 および CD8 $\alpha$ 陽性細胞の割合	31
3.4	考察	32
第4章	クローンギンブナをモデルとした、二次リンパ器官としての腎臓における CD3 $\epsilon$ の特異な発現機構の解明	45
4.1	序論	46
4.2	材料および方法	49
4.3	結果	
4.3.1	各組織における抗 CD3 $\epsilon$ 抗体を用いた免疫染色	54
4.3.2	ウェスタンブロット法による CD3 $\epsilon$ タンパク質の発現解析	54
4.3.3	FACS ソーティングした CD4-1 および CD8 $\alpha$ 陽性リンパ球における、T 細胞関連マーカー遺伝子の発現解析	54
4.3.4	インサイチュ・ハイブリダイゼーション法による腎臓、胸腺および脾臓における CD3 $\epsilon$ mRNA の発現解析	55
4.3.5	in vitro 培養後の腎臓白血球における CD3 $\epsilon$ タンパク質の発現	55
4.3.6	レシピエントの脾臓へ遊走した腎臓リンパ球における CD3	

ε タンパク質の発現	55
4.4 考察	57
第5章 総括	72
謝辞	78
参考文献	79

# 第 1 章

## 緒論

真骨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および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（正/負の選択）を受けMHC拘束性が生まれ、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へと移動し、生体防御を行う。このように、哺乳類ではTリンパ球が発生・成熟する器官（骨髄と胸腺）を一次リンパ器官と呼び、成熟リンパ球が集まり免疫反応を起こす器官・組織（脾臓・リンパ節・粘膜関連リンパ組織など）を二次リンパ器官と呼ぶ。

哺乳類と異なり、真骨魚類は骨髄とリンパ節を持たないことが知られているが、腎臓造血組織中には、全ての血液細胞の基となる造血幹細胞が存在する（Kobayashi et al., 2007; Kobayashi et al., 2008）。また、胸腺中には、CD4とCD8分子を共に発現する成熟途中のT細胞（ダブルポジティブT細胞）が豊富に存在するなど、魚類の腎臓および胸腺がそれぞれT前駆細胞の発生とT細胞の成熟を行う一次リンパ器官と考えられるが、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一次リンパ器官としての機能を持つと考えられるが、腎臓中にはCD4またはCD8分子のいずれか一方を発現した成熟T細胞（シングルポジティブT細胞）も多く存在する（Toda et al., 2009）。よって同組織は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が、未だ不明な点が多い。

本研究では、まず、真骨魚類のT細胞成熟における胸腺の機能を明らかにするため、哺乳類の胸腺T細胞の成熟において重要な機能を担うAire（Autoimmuneregulator）に着目した。Aireは胸腺における自己抗原遺伝子の発現に関与し、自己反応性T細胞に負の選択を誘導する上で必須の分子である

(Anderson et al., 2005)。Aire 遺伝子を欠損したヒトやマウスでは、自己反応性 T 細胞が末梢に遊出することにより自己免疫疾患を生じる (Liston et al., 2003)。そのため、真骨魚類の胸腺における Aire の機能を解析することにより、真骨魚類の胸腺が持つ一次リンパ器官としての役割が明らかにできると考えられた。そこで、Aire 遺伝子欠損ゼブラフィッシュを用いて、胸腺における負の選択への影響や全身性に認められる表現型を解析した。ゼブラフィッシュはこれまで発生学や遺伝学のヒトのモデルとして用いられてきたが、近年 T 細胞の解析ツールとしても用いられており、様々な T 細胞関連遺伝子欠損個体が作られている。また、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上で優れている。

上述のように、真骨魚類の腎臓は一次リンパ器官としての機能と、二次リンパ器官としての機能を有すると考えられている。全ての T 細胞は、T 細胞受容体 (TCR) と CD3 ファミリーからなる TCR/CD3 複合体を発現している。さらに CD3 $\epsilon$  は CD3 ファミリーを構成する分子であり、TCR から抗原刺激を受け取り細胞内へ伝達する。この CD3 $\epsilon$  も全 T 細胞に発現するため、汎 T 細胞マーカーとして用いられ、ギンブナ (*Carassius auratus langsdorfii*) では CD3 $\epsilon$  に対する抗体が作製されている (Miyazawa et al., 2018)。そこで、抗ギンブナ CD3 $\epsilon$  抗体を用い、ギンブナの腎臓における CD3 $\epsilon$  の発現変化を指標にして、腎臓環境が持つ二次リンパ器官としての機能解析を試みた。また、ギンブナはゼブラフィッシュと同様コイ科魚類に属し、天然雌性発生によりクローン繁殖を行うため、遺伝的に均一な個体が得られることや、CD3 $\epsilon$  に対する抗体のほかに、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞、マクロファージ、顆粒球など、各白血球に対する抗体が既に作製されており (Masuura et al., 2017)、真骨魚類の免疫機構に関する極めて優れた研究モデルである。

以上の研究を通して、真骨魚類と哺乳類の免疫器官を比較し、進化の過程において保存されている機能や独自に進化された機能を考察した。



## 第2章

抗ギンブナ CD4-1 および CD8  $\alpha$  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

## 2.1 序論

ゼブラフィッシュは 100 年以上にわたり胚発生モデルとして使用されており、最近では神経生物学、遺伝学および毒物学などの最先端な研究にも用いられている。更に、ゼブラフィッシュは近年免疫疾患やガンなどのヒト疾患モデルとして(Trede et al., 2004)、また、真骨魚類の疾病研究にも用いられている(van der Sar et al., 2004; Sullivan and Kim, 2008)。

ゼブラフィッシュを解析に用いる利点として、1) 受精および発生は体外で行われ、胚および幼生は透明であり観察が容易である、2)世代交代が早く、また胚発生も 72 時間で完了する、3)全ゲノムの解読が行われているため、遺伝子情報の取り扱いが容易である、などが挙げられる。さらに、近年では TALEN や CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術を用いた、トランスジェニックや遺伝子欠損個体が多数作出されている。この様に、ゼブラフィッシュを用いる利点は多いものの、免疫担当細胞における表現型の解析に当たり、CD4 および CD8 陽性 T 細胞に対するモノクローナル抗体のような、細胞サブセットレベルで解析を可能にするツール不足が問題であった。我々のグループでは、すでにゼブラフィッシュの近縁魚種であるギンブナ (*Carassius auratus langsdorfi*) を用いて、真骨魚類の獲得免疫機構に関する研究を長年にわたって行ってきた。その間に、CD4-1 や CD8 $\alpha$  を始めとする多くの抗体を作製し、ギンブナの CD8 $\alpha$  陽性 T 細胞が、同種アロ抗原に対する特異的細胞傷害性を示すことを発見し、ギンブナの CD8 $\alpha$  陽性リンパ球は哺乳動物の細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) と同等であることが示唆されている (Toda et al., 2009)。また、CD4 陽性ヘルパー T 細胞の機能については混合白血球培養 (MLC) により CD4 陽性 T 細胞の増殖が誘導されることや、Ovalbumin (OVA) や Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) などのモデル抗原

を用いた研究により、二次刺激時には抗原特異的に CD4 陽性 T 細胞の増殖することが示されている(Toda et al., 2011)。さらに、ギンブナだけでなくニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) においても、アロ抗原やウイルスに対する特異的な傷害活性を示すことが証明されている(reviewed in Nakanishi et al., 2011; Fischer et al., 2013)。これらの報告は、真骨魚類においても、CD4 および CD8 $\alpha$  分子が、それぞれヘルパーおよび細胞傷害性 T 細胞の同定や単離のための細胞表面マーカーとして役立つことを示している。

本研究では、ゼブラフィッシュと近縁魚種であるギンブナの CD4-1 および CD8 $\alpha$  に対するモノクローナル抗体を用い、ゼブラフィッシュリンパ球との交差反応性を解析した。

## 2.2 材料および方法

### 2.2.1 供試魚

野生型のゼブラフィッシュは中央水産研究所(横浜、神奈川)より分与された。ゼブラフィッシュは水温  $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で飼育し、給餌は1日2回行った。各解析には6ヶ月から12ヶ月齢の個体を用いた。

### 2.2.2 抗体

ギンブナ CD4-1 に対するモノクローナル抗体(クローン 6D1、IgG2a) および CD8 $\alpha$  に対するモノクローナル抗体(クローン 2C3、IgG2a) のギンブナリンパ球に対する特徴や特異性は、既に報告されている(Toda et al., 2009; Toda et al., 2011)。抗ヒト Zap-70 抗体(CST Japan)は、Zap-70 分子の各動物種において保存性の高い細胞内領域を認識するため、コイやゼブラフィッシュとの交差反応性が報告されている(Piazzon et al., 2015; Miyazawa et al., 2018)。本研究においても、抗ヒト Zap-70 抗体をゼブラフィッシュの汎 T 細胞マーカーとして用いた。

### 2.2.3 白血球の調製

ゼブラフィッシュを 0.01%ベンゾカイン (Sigma) で麻酔し、胸腺と腎臓をそれぞれ摘出した。摘出した臓器をシャーレに移し、100  $\mu\text{m}$  メッシュで摩砕し、0.5% 牛胎仔血清(FBS, Sigma-Aldrich) 添加 Hank's balanced salt solution (HBSS, Nissui) に浮遊した。細胞浮遊液を遠心沈殿 (400 $\times$ g、5 分間) し、上清を捨て、ほぐした細胞ペレットに 1 ml の蒸留水を加え赤血球を溶血した。溶血後すぐに 9ml の HBSS を加え、遠心洗浄を 2 回行った。溶血後の残った白血球の細胞数は血球計算盤でカウントした。細胞調整の各操作は氷上で行った。

### 2.2.4 抗ギンブナ CD4-1 または抗ギンブナ CD8 $\alpha$ 抗体によるゼブラフィッシュ

白血球の免疫染色およびフローサイトメトリー解析

一次抗体として 1mg/ml の抗ギンブナ CD4-1 抗体もしくは抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体を 1:100 に希釈し、 $1 \times 10^5$  個のゼブラフィッシュ白血球と、4°C で 45 分間反応させた。また、アイソタイプコントロールとして抗ラットモノクローナル抗体 (IgG2a) (eBioscience) を用いて同様に反応させた。各サンプルは反応終了後、HBSS に浮遊し遠心洗浄した (500g、5 分間)。二次抗体として 1:500 に希釈した Alexa Fluor® 488 標識 抗ラット IgG(H&L)(Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い、4°C で 30 分間反応させた。その後、HBSS で遠心洗浄を行い、propidium iodide (Thermo Fisher Scientific Inc.) を終濃度 2.5 $\mu$ g/ml になるように加え、死細胞染色を行った。フローサイトメトリー解析 (FCM) 解析には、FACS Canto(Becton Dickinson Heidelberg, Germany) を用い、FSC と SSC ドットプロット上で、FSC<sup>low</sup>SSC<sup>low</sup> の細胞集団をリンパ球分画とし、リンパ球分画における抗体陽性細胞の割合をヒストグラムに示した。

### 2.2.5 抗ギンブナ CD4-1 抗体または抗ギンブナ CD8 $\alpha$ 抗体と、抗ヒト Zap-70 抗体による二重染色

細胞表面に発現する CD4-1 および CD8 $\alpha$  と、細胞内に発現する Zap-70 分子との二重染色において、まず、腎臓白血球を上記の方法により、抗 CD4-1 抗体または抗 CD8 $\alpha$  抗体を用いた免疫染色を行った。その後、2%パラホルムアルデヒド Phosphate Buffered Salin (PBS) 溶液を用いて室温で 15 分間細胞の固定処理を行い、遠心洗浄後、0.1%サポニン加 HBSS 溶液を用いて室温で 15 分間膜透過処理を行った。続いて、1:50 に希釈した抗ヒト Zap-70 抗体と 4°C で 45 分間反応させ、遠心洗浄を行った。最後に、二次抗体として 1:500 に希釈した Alexa Fluor® 647 標識抗ラビット IgG(H&L) を用い、4°C で 30 分間反応させた。FCM 解析は

2.2.4 項と同様の方法で行った。

#### 2.2.6 CD4-1 または CD8 $\alpha$ 陽性細胞の FACS ソーティング

2.2.4 項の方法により腎臓白血球を、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を行った。セルソーティングに際し、FSC-H と FSC-W および SSC-H と SSC-W ゲートによりダブレットの除去を行い、各抗体陽性分画、各抗体陰性分画、リンパ球分画および白血球分画をそれぞれ FACS Aria(Becton Dickinson)を用いて FACS ソーティングした。なお、ソーティングにより分取した各分画の純度は 95%以上であることも確認した。

#### 2.2.7 抗ギンブナ CD4-1 抗体および抗ギンブナ CD8 $\alpha$ 抗体陽性細胞の形態的観察

2.2.6 項の方法により分取した CD4-1 または CD8 $\alpha$  陽性細胞を用いてサイトスピリン標本を作製し、メイ・ギムザ染色により形態観察を行った。

#### 2.2.8 抗ギンブナ CD4-1 抗体および抗ギンブナ CD8 $\alpha$ 抗体陽性細胞の遺伝子発現解析

2.2.6 項の方法により、CD4-1 陽性細胞、CD8 $\alpha$  陽性細胞、各抗体陰性細胞、全リンパ球および全白血球に分けた。各サンプルの全 RNA 抽出は NucleoSpin® RNA XS (TaKaRa)を用いて行い、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いて cDNA を合成した。RT-PCR 法による遺伝子発現解析にあたり、ゼブラフィッシュの CD4-1 (*cd4-1*)、CD4-2 (*cd4-2*)、CD8a (*cd8a*)、TCRa の定常領域 (*tcrac*)、IgM L chain の定常領域 (*iglc*)、macrophage expressed gene 1 (*mpeg1*)および  $\beta$ -actin (*bactin*) の表 1 に記載したプライマーセッ

トを用いた(終濃度 200nM)。PCR 条件は 94°C 2 分 1 サイクル、94°C 10 秒、55°C 10 秒、72°C 30 秒を 35 または 40 サイクル、72°C 3 分を 1 サイクル行った。PCR 反応は全量 20 $\mu$ L とし、GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI)、プライマーセット、および 1 $\mu$ L の cDNA を用いた。PCR 反応産物は 2% アガロースゲルで泳動し、0.1 $\mu$ g/ml ethidium bromide (Wako) で染色を行った。PCR 産物の撮影には AE-6932GXCF Printgraph(ATTO)を用いた。

### 2.2.9 ゼブラフィッシュ CD4-1、CD4-2 および CD8 $\alpha$ 分子の HEK293T 細胞における発現

真骨魚類は哺乳類の CD4 に相当する遺伝子として *cd4-1* および *cd4-2* の 2 種類が報告されている。そこで、ゼブラフィッシュの *cd4-1*、*cd4-2* および *cd8a* のコード領域を遺伝子クローニングした。次に、表に記載した制限酵素サイト付加プライマーを用いて、*cd4-1*、*cd4-2* および *cd8a* の細胞外領域のみを再増幅し、pDisplay™ Vector(Thermo Fisher Scientific Inc.)にそれぞれサブクローニングした。このようにして作製した各発現ベクター (1mg) を X-tremeGENE HP DNATransfection Reagent (Roche Diagnostics)を用い、HEK293T 細胞に遺伝子導入した。HEK293T 細胞上に発現した各分子と抗体との反応性は 2.2.4 項に記載した方法で免疫染色し FCM 解析を行った。また、pDisplay™ Vector にはヘマグルチニン(HA)の配列を含むため、抗 HA 抗体 (Dako) を用いて同様に免疫染色し、発現効率を確かめた。

### 2.2.10 統計解析

統計解析には GraphPad v5.0 for Windows (GraphPad Software) を使用し、群間の統計的比較は、Mann-Whitney U 検定を用い、 $p$  値 < 0.05 が有意であるとした。

## 2.3 結果

### 2.3.1. ゼブラフィッシュリンパ球に対する抗ギンブナ CD4-1 抗体および抗ギンブナ CD8 $\alpha$ 抗体の交差反応

腎臓または胸腺より採取したゼブラフィッシュリンパ球に対する、抗ギンブナ CD4-1 抗体および抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体の交差反応性を FCM により解析した。腎臓リンパ球分画における CD4-1 または 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 (図 1)。一方、胸腺リンパ球分画における CD4-1 または CD8 $\alpha$  陽性細胞の割合はそれぞれ、 $31.0 \pm 12.0\%$  および  $32.0 \pm 5.0\%$  であった (図 2)。抗ギンブナ CD4-1 または CD8 $\alpha$  抗体と抗 Zap-70 抗体との二重染色では、腎臓リンパ球分画における Zap-70 陽性細胞の割合は 35-38% であったが、CD4-1 または CD8 $\alpha$  抗体陽性細胞は、それぞれ約 10% および 5% であり、ほとんどは抗 Zap-70 抗体陽性であった (図 3)。同様に、胸腺リンパ球分画における Zap-70 陽性細胞の割合は 77-78% であり、CD4-1 または CD8 $\alpha$  陽性細胞は、それぞれ約 12% および 25% であり、大部分は Zap-70 陽性であった (図 4)。

### 2.3.2. 抗ギンブナ CD4-1 抗体および抗ギンブナ CD8 $\alpha$ 抗体が認識する細胞の形態

腎臓リンパ球から CD4-1 および CD8 $\alpha$  陽性細胞をセルソーティングし、メイ・ギムザ染色により形態観察を行った。その結果、陽性細胞は小型から中型細胞であり、大きな核や好塩基性の薄い細胞質を有する典型的なリンパ球の形態を示した (図 5)。

### 2.3.3. 抗ギンブナ CD4-1 抗体または抗ギンブナ CD8 $\alpha$ 抗体陽性細胞における遺



## 伝子発現解析

CD4-1 または CD8  $\alpha$  陽性細胞の特徴を明らかにするため、腎臓白血球より陽性細胞をセルソーティングし、遺伝子発現解析を行った。その結果、図 6 に示す様に、CD4-1 陽性細胞では *cd4-1*、*cd4-2*、*tcrac* および *mpeg1* の発現が認められ、*cd8a* および *iglc* の発現は認められなかった。一方、CD8  $\alpha$  陽性細胞では *cd8a*、および *tcrac* の発現が認められたが、*cd4-1*、*cd4-2*、*mpeg1* および *iglc* の発現は認められなかった。また、両抗体陰性細胞では、*cd4-1*、*cd4-2* および *cd8a* の発現は検出されなかった。

### 2.3.4. HEK293T 細胞に発現させたゼブラフィッシュの CD4-1 および CD8 $\alpha$ 分子と、抗ギンブナ CD4-1 および CD8 $\alpha$ 抗体との反応性

HEK293T 細胞上に発現させたゼブラフィッシュの CD4-1 および CD8  $\alpha$  分子と、抗ギンブナ CD4-1 および CD8  $\alpha$  抗体との反応性を調べた。まず発現ベクターが持つヘマグルチニン (HA) 分子タグに対する抗 HA 抗体を用いた免疫染色では、HA 分子は 90%以上の高い発現を示した (データ未表示)。次に、同様の HEK293T 細胞を抗 CD4-1 または CD8  $\alpha$  抗体と反応させ解析したところ、ゼブラフィッシュの CD4-1 分子には抗ギンブナ CD4-1 抗体だけが反応し (図 7A)、抗ギンブナ CD8  $\alpha$  抗体とは反応しないことが明らかになった (データ未表示)。次に、ゼブラフィッシュの CD4-2 分子を発現させた HEK293T 細胞では、いずれの抗体とも反応しなかった (図 7B)。更に、ゼブラフィッシュの CD8  $\alpha$  分子を発現させたものでは、抗ギンブナ CD4-1 抗体とは反応せず (データ未表示)、抗ギンブナ CD8  $\alpha$  抗体とのみ反応性を示した (図 7C)。

## 2.4 考察

本研究では、ゼブラフィッシュの T 細胞サブセットを認識できる抗体が不足しているため、近縁のギンブナで作製された抗ギンブナ CD4-1 抗体や CD8 $\alpha$  抗体が、ゼブラフィッシュの CD4-1 および CD8 $\alpha$  分子と交差反応を示すか検討した。

ゼブラフィッシュのリンパ球分画において、抗ギンブナ CD4-1 または CD8 $\alpha$  抗体陽性細胞は、T 細胞マーカーである抗 Zap-70 抗体に対しても陽性であり、リンパ球の典型的な形態を有することが分かった。さらに、CD4-1 陽性細胞では *cd4-1*、*cd4-2* および *trac* を発現し、*iglc* の発現は確認されなかった。また、抗ギンブナ CD8 $\alpha$  陽性細胞では *cd8a* および *trac* を発現し、*iglc* の発現は確認されなかった。一方、両抗体陰性細胞では、*cd4-1*、*cd4-2* および *cd8a* の発現は検出されなかった。加えて、抗ギンブナ CD4-1 は HEK293T 細胞上ゼブラフィッシュ CD4-1 分子と反応したが CD4-2 分子とは反応せず、抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体はゼブラフィッシュ CD8 $\alpha$  を認識した。これらのことから、抗ギンブナ CD4-1 または CD8 $\alpha$  抗体は、それぞれゼブラフィッシュの CD4-1 および CD8 $\alpha$  陽性 T 細胞を認識していることが明らかになった。

ゼブラフィッシュの腎臓リンパ球分画において、抗 Zap70 陽性細胞は 35-38% 認められた。一方、腎臓における CD4-1 または CD8 $\alpha$  陽性細胞の割合は、それぞれ  $11.1 \pm 1.5\%$  および  $7.2 \pm 2.1\%$  であり、汎 T 細胞マーカーである抗 Zap 抗体が認識する T 細胞の総数に比べ、約半数と予想よりも低かった。この原因として、以下が考えられる。まず、ギンブナとゼブラフィッシュ間の CD4-1 および CD8 $\alpha$  アミノ酸配列の同一性はいずれも低く、特に、CD4-1 の細胞外ドメインの同一性は 50% であり、また、CD8 $\alpha$  の細胞外ドメインの同一性は 41% であった。従っ

て、ギンブナと比較してゼブラフィッシュにおける CD4-1 陽性細胞の割合が低いのは、ギンブナとゼブラフィッシュとの間のアミノ酸配列の同一性が低く抗体の結合活性が低いためと考えられた。さらに、哺乳類には存在しない魚類特有な CD4-2 陽性細胞の存在が考えられる。魚類においては、CD4-1 陽性細胞に加えて CD4-2 の存在は複数の魚種において報告されている (Suetake et al., 2006; Edholm et al., 2007; Nonaka et al., 2008)。さらに、CD4-1 および CD4-2 が異なる細胞集団に発現することが示されている (Somamoto et al., 2014)。本研究において、我々の抗 CD4-1 抗体が、HEK293T 細胞上に発現されたゼブラフィッシュ CD4-2 と反応しないことを示した。従って、ゼブラフィッシュにおいて CD4-1 陽性細胞の割合が低く認められたことは、T 細胞系に CD4-1 や CD4-2 を始めとする CD4 関連集団は存在するが、抗ギンブナ CD4-1 抗体は CD4-1 分子特異的に反応し、CD4-2 のみを発現した T 細胞を認識できないためと考えられる。

本研究において、抗ギンブナ CD4-1 または CD8 $\alpha$  抗体が、低いアミノ酸配列の同一性にもかかわらずゼブラフィッシュの CD4-1 および CD8 $\alpha$  陽性細胞とそれぞれ交差反応することを示した。さらに、抗ギンブナ CD4-1 抗体はゼブラフィッシュ CD4-1 分子に特異的に反応し、また、抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体はゼブラフィッシュ CD8 $\alpha$  分子に特異的に反応することが明らかになった。これまでは、ゼブラフィッシュ CD4-1 または CD8 陽性 T 細胞に対する抗体はなかったが、我々の抗体はゼブラフィッシュの免疫機構を解析するのに有用であると考えられる。

表 1 解析に用いたプライマー

Primer name	Sequence(5'→3')	Accession No.
<b>Expression Analysis</b>		
<i>zfd4-1/F</i>	CATTACGCACAGGTAGGAG	NM_001135096
<i>zfd4-1/R</i>	CTGCGGGTTCCTGTTGATTG	NM_001135096
<i>zfd4-2/F</i>	ATCTGGATTGCTGTAGGAGGCT	EF601915
<i>zfd4-2/R</i>	TGTGAGAGGCTGCCGCATGGAT	EF601915
<i>zfd8a/F</i>	AGACGGAAGTCAAGCATAATGCAA	AB186400
<i>zfd8a/R</i>	ATGGGCTTTGCTCCTTTTTTGTACATAC	AB186400
<i>zftcras/F</i>	ACGTCGGCTGTCCGATATTC	AF246178
<i>zftcras/R</i>	CAGAAGATGCCAGTGACAA	AF246178
<i>zfiglc/F</i>	CTGGACACGGGACGGCTCT	AF246193
<i>zfiglc/R</i>	GCTCTCGCTTCTCCATTCTTC	AF246193
<i>zfmpeg1/F</i>	ATGTGGATTCCCCAACTTCAACT	BC055644
<i>zfmpeg1/R</i>	TGGTAAATGCCACCAAAGCTAAGA	BC055644
<i>zfb-actin/F</i>	CATCAGCATGGCTTCTGCTCTGTATGG	AF057040
<i>zfb-actin/R</i>	GACTTGTCAGTGTACAGAGACACCCT	AF057040
<b>cDNA cloning</b>		
<i>cd4-1F</i>	TGAAGACAAGCGATACGTAACG	
<i>cd4-1R</i>	GAAATACCAGCATCCTCATCT	
<i>cd4-2F</i>	GTCTGGTTTCTCTGTTTCTCACA	
<i>cd4-2R</i>	G TTCAGCCCAGCCG TTC	
<i>cd8aF</i>	AATGCTTGTGCTGGAAACTG	
<i>cd8aR</i>	ACAGACTGAATAATCATAAAGGAGG	
<b>Eukaryotic expression</b>		
<i>cd4-1F</i>	CCGCGGACAAGAAAGCCATGAAGTCATTT AC	
<i>cd4-1R</i>	GTCGACCCAGATGTCCACTGGAGC	
<i>cd4-2F</i>	AGATCTGATGTGCTTTATAAAG	
<i>cd4-2R</i>	GTCGACAAGTTCAACTCCAAAGAAAC	
<i>cd8aF</i>	AGATCTTCCCTCTTCTATGGATG	
<i>cd8aR</i>	GTCGACCCAAGTCTCACAGTTG	

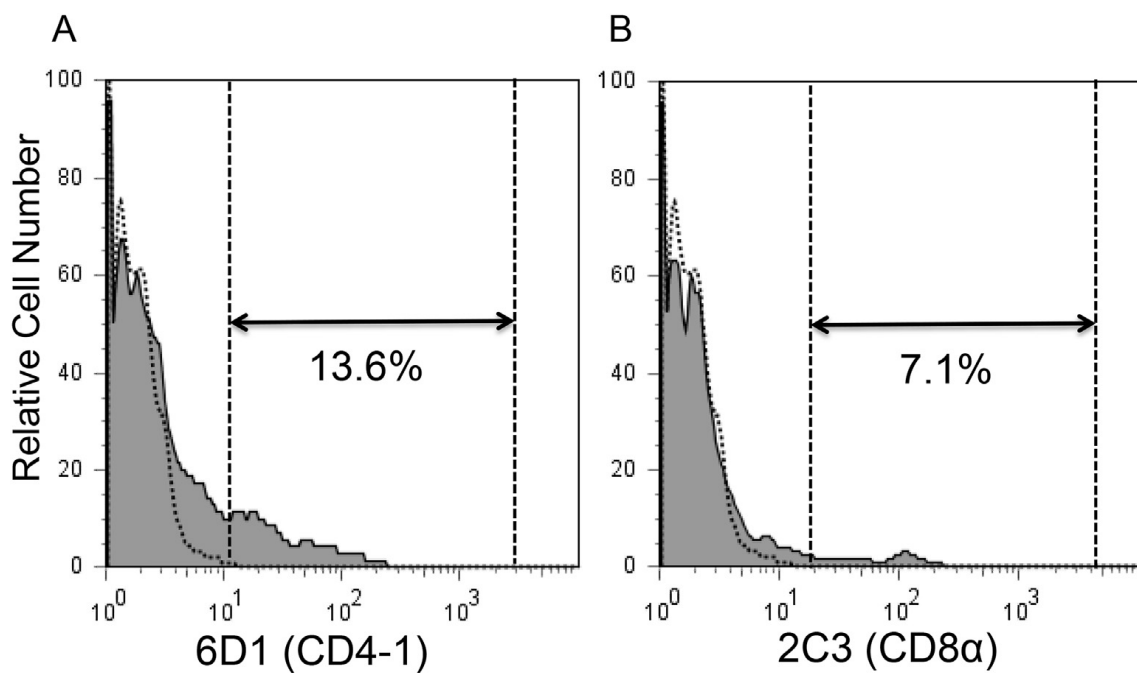


図1 抗ギンブナ CD4-1 または CD8 $\alpha$  抗体とゼブラフィッシュ腎臓リンパ球との交差反応。

ゼブラフィッシュ腎臓白血球を一次抗体として抗ギンブナ CD4-1 または抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体で染色し、続いて二次抗体として Alexa Fluor® 488 標識 抗ラット IgG(H&L)で染色した。死細胞 (PI 陽性細胞) を除いた後、腎臓白血球を FSC と SSC ドットプロット上に展開し、リンパ球分画 (FSC<sup>low</sup>、SSC<sup>low</sup>) における抗体陽性細胞を表示した。点線はアイソタイプコントロールを、実線は抗ギンブナ CD4-1 または抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体との反応性を示す。

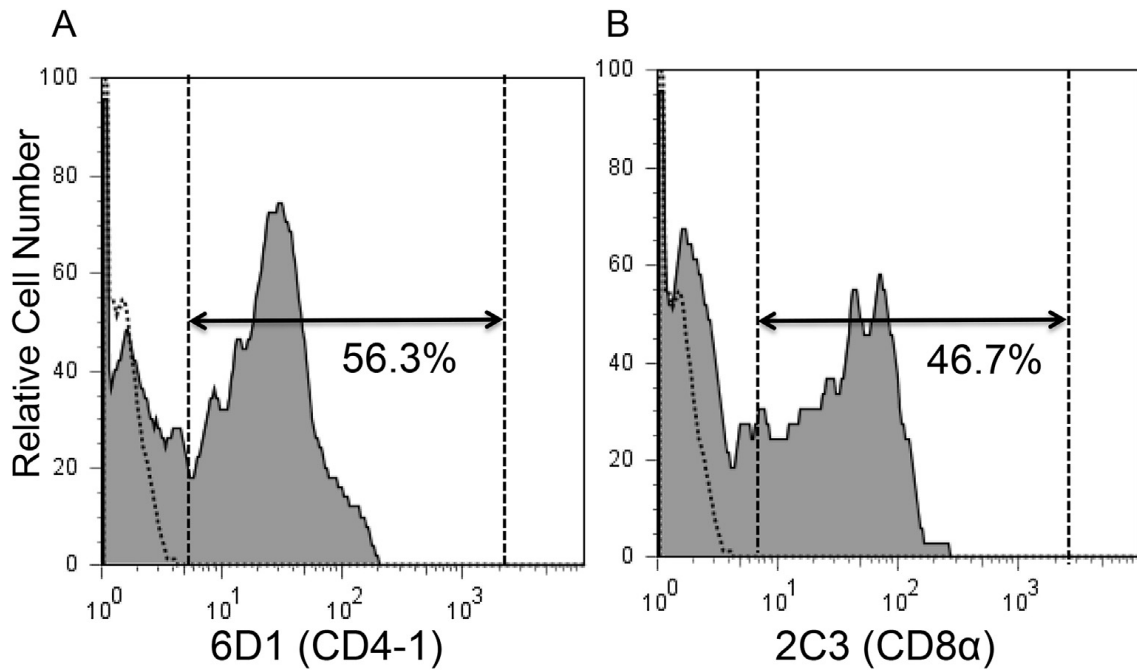


図2 抗ギンブナ CD4-1 または CD8 $\alpha$  抗体とゼブラフィッシュ胸腺リンパ球との交差反応。

ゼブラフィッシュ胸腺白血球を一次抗体として抗ギンブナ CD4-1 または抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体で染色し、続いて二次抗体として Alexa Fluor® 488 標識 抗ラット IgG(H&L)で染色した。死細胞 (PI 陽性細胞) を除いた後、腎臓白血球を FSC と SSC ドットプロット上に展開し、リンパ球分画 (FSC<sup>low</sup>、SSC<sup>low</sup>) における抗体陽性細胞を表示した。点線はアイソタイプコントロールを、実線は抗ギンブナ CD4-1 または抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体との反応性を示す。

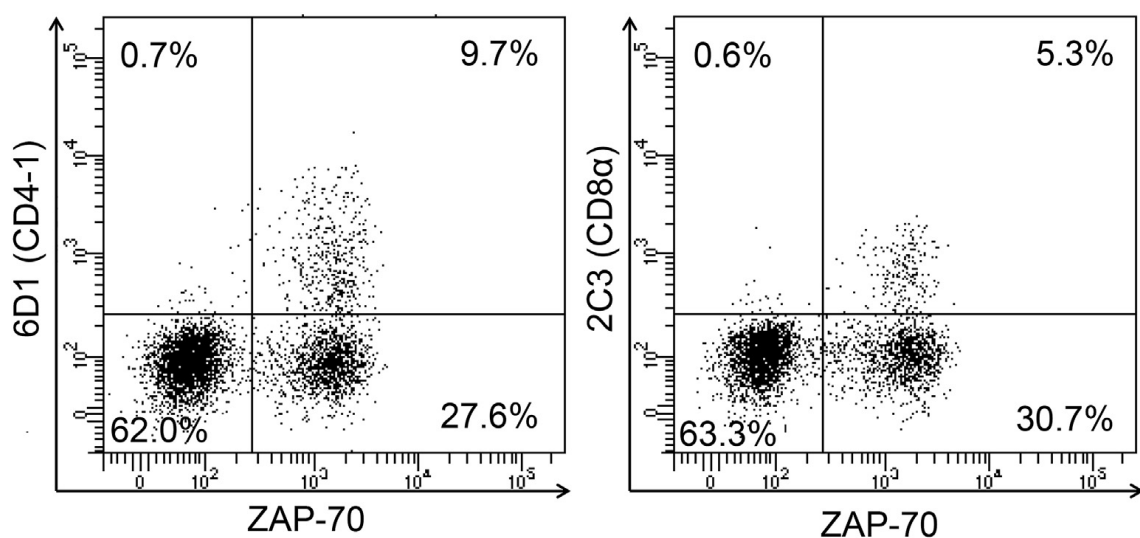


図3 ゼブラフィッシュ腎臓白血球に対する抗 Zap-70 抗体とギンブナ CD4-1 または CD8 $\alpha$  抗体との二重染色。

ゼブラフィッシュ腎臓白血球は抗ギンブナ CD4-1 抗体（左）または抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体（右）で染色し、引き続き Alexa Fluor® 488 標識 抗ラット IgG(H&L)で染色した。PFA による細胞固定と、サポニンを用いた膜透過処理の後、一次抗体として抗 Zap-70 抗体で染色し、引き続き二次抗体として Alexa Fluor® 647 標識ラビット IgG(H&L)で染色した。腎臓白血球を FSC と SSC ドットプロット上に展開し、リンパ球分画における抗体陽性細胞を表示した。

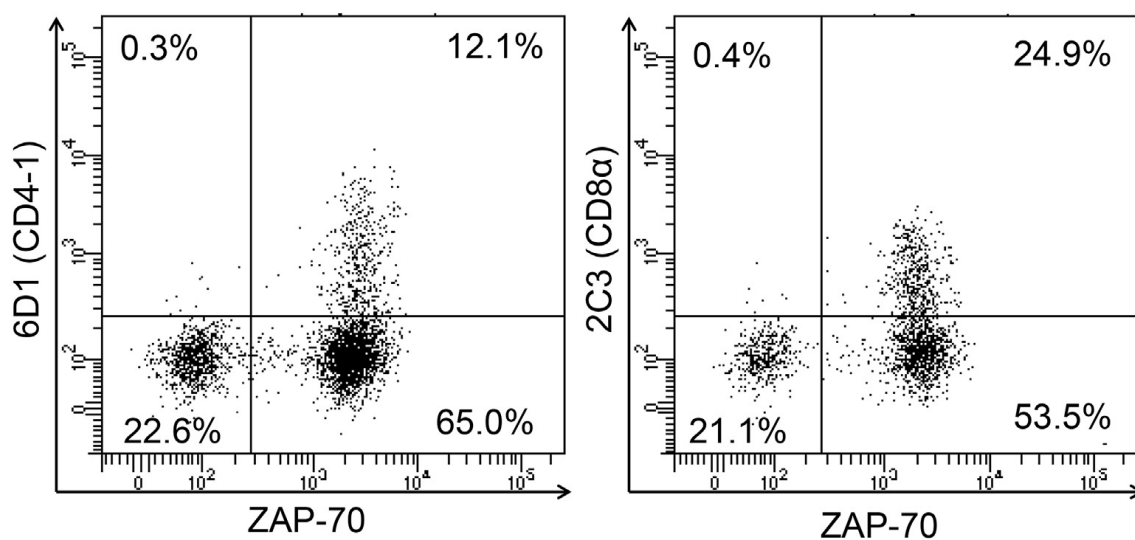
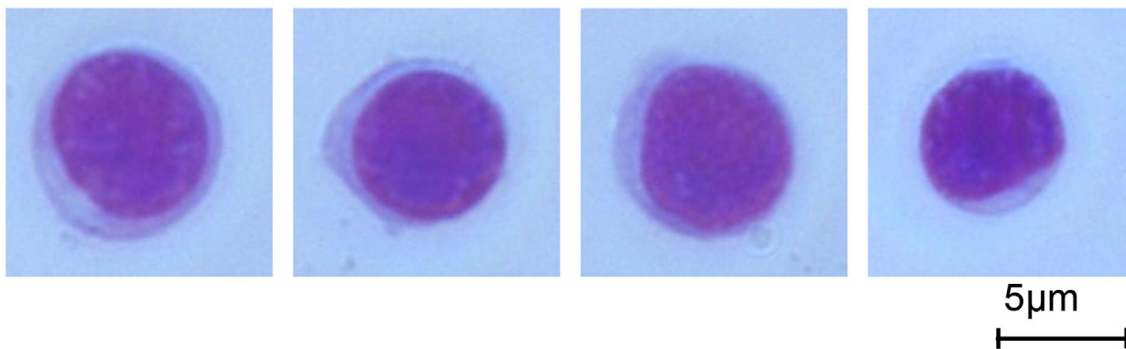


図 4 ゼブラフィッシュ胸腺白血球に対する、抗 Zap-70 抗体とギンブナ CD4-1 または CD8 $\alpha$  抗体との二重染色。

ゼブラフィッシュ胸腺白血球は抗ギンブナ CD4-1 抗体（左）または抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体（右）で染色し、引き続き Alexa Fluor® 488 標識 抗ラット IgG(H&L)で染色した。PFA による細胞固定と、サポニンを用いた膜透過処理の後、抗 Zap-70 抗体で染色し、引き続き Alexa Fluor® 647 標識ラビット IgG(H&L)で染色した。腎臓白血球を FSC と SSC ドットプロット上に展開し、リンパ球分画における抗体陽性細胞を表示した。



## 6D1 (CD4-1)<sup>+</sup>cells



## 2C3 (CD8α)<sup>+</sup>cells

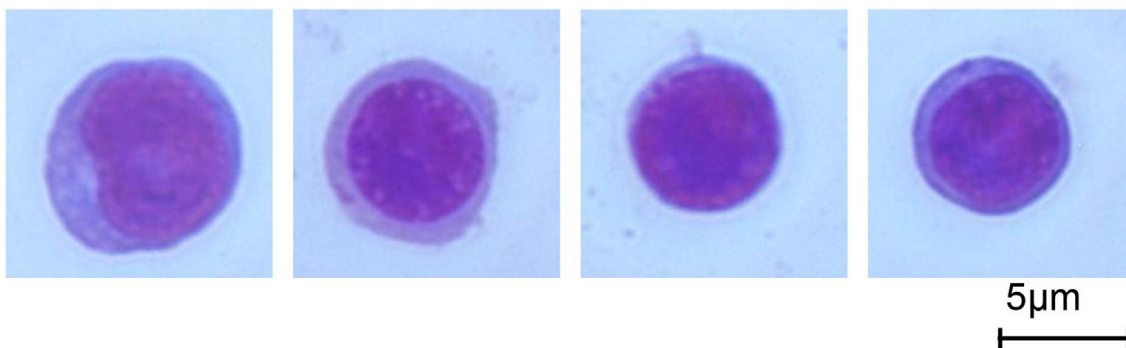


図5 抗ギンブナ CD4-1 または CD8α 抗体によって認識された細胞の形態。

ゼブラフィッシュ腎臓リンパ球を FSC と SSC ドットプロット上でゲーティングし、CD4-1 または CD8α 細胞をソーティングした。ソートした細胞を用いてサイトスピン標本を作製し、メイグリユンワルド・ギムザで染色した。

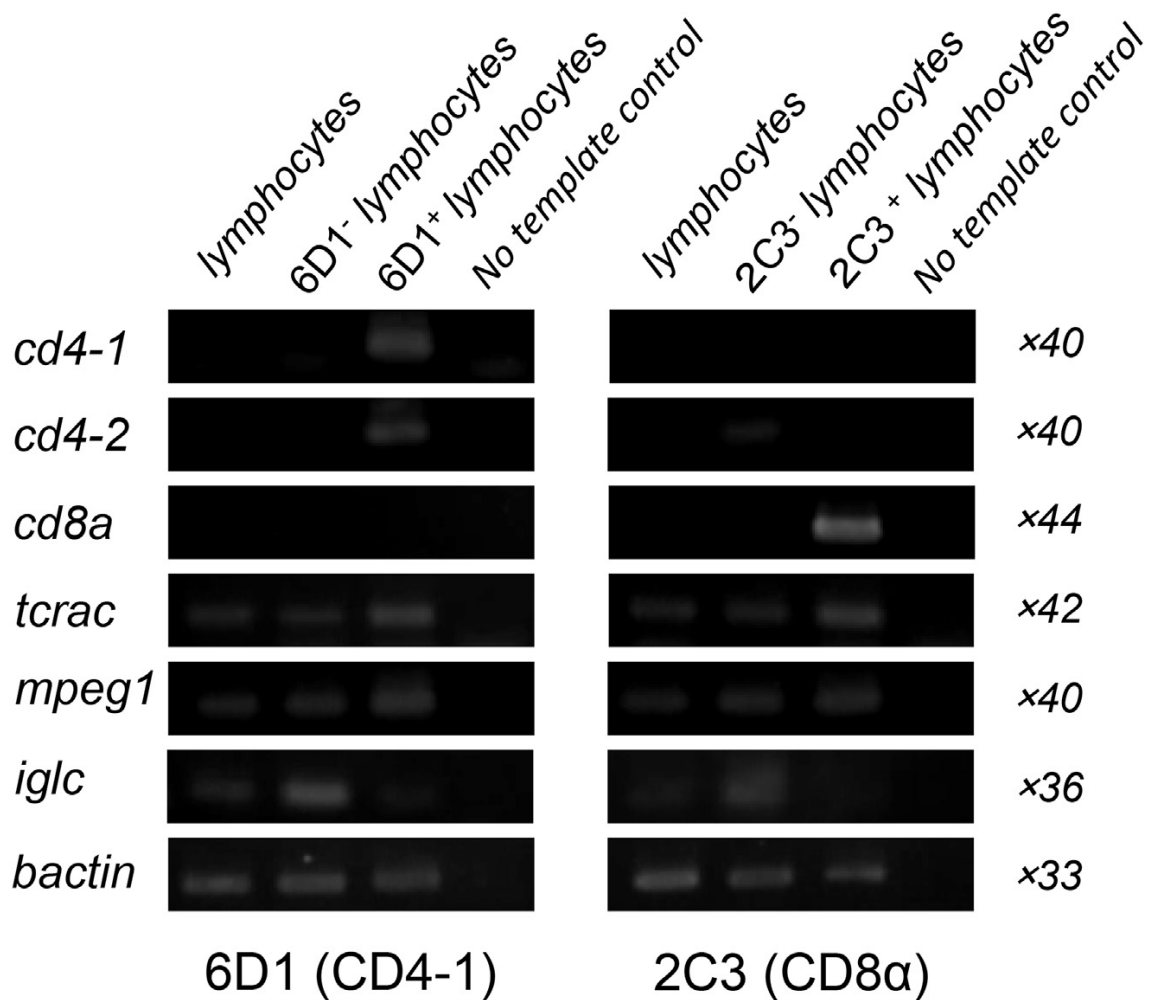


図6 FACSソーティングしたCD4-1またはCD8 $\alpha$ 陽性細胞の遺伝子発現解析。ゼブラフィッシュ腎臓白血球は抗ギンブナCD4-1抗体(6D1)または抗ギンブナCD8 $\alpha$ 抗体(2C3)で染色し、引き続きAlexa Fluor® 488標識抗ラットIgG(H&L)で染色した。死細胞を除いた後、腎臓白血球をFSCとSSCドットプロット上に展開し、リンパ球分画における抗体陽性細胞、抗体陰性細胞、全リンパ球および全白血球をソーティングした。1 $\times$ 10<sup>5</sup>個の細胞より得たRNAは、RT-PCRに用いた。*cd4-1*、*cd4-2*および*cd8a*に加えて、T細胞マーカーの*tcrac*、B細胞マーカーの*iglc*、マクロファージマーカーの*mpeg1*の遺伝子発現を解析した。また、内在性コントロールとして、*bactin*を用いた。

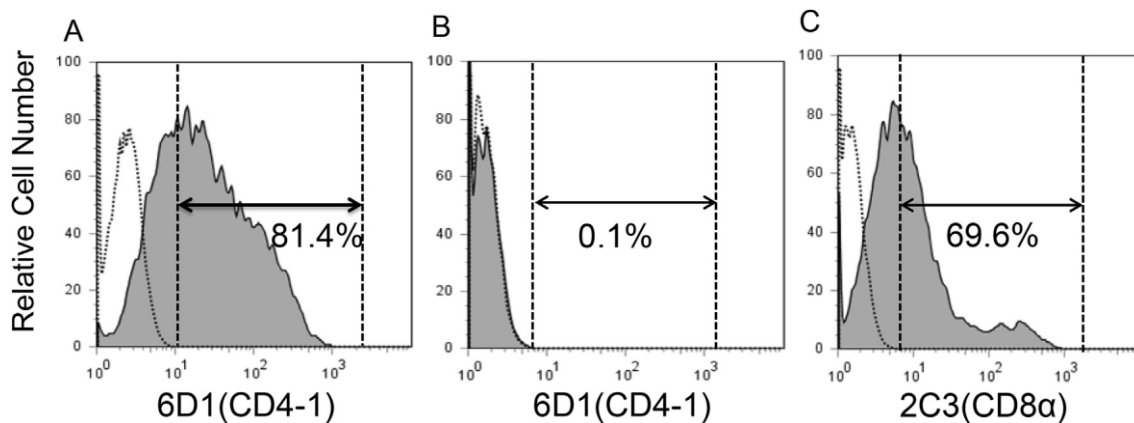


図7 抗ギンブナ CD4-1 または CD8 $\alpha$  抗体と、HEK293T 細胞に発現させたゼブラフィッシュ CD4-1、CD4-2 および CD8 $\alpha$  分子との反応性。

A: HEK293T 細胞に発現させたゼブラフィッシュ CD4-1 分子と、抗ギンブナ CD4-1 抗体との反応性

B: HEK293T 細胞に発現させたゼブラフィッシュ CD4-2 分子と、抗ギンブナ CD4-1 抗体との反応性

C: HEK293T 細胞に発現させたゼブラフィッシュ CD8 $\alpha$  分子と、抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体との反応性

## 第3章

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原因遺伝子(Aire)の機能解析

### 3.1 序論

Aire (Autoimmune regulator)は胸腺髄質上皮細胞 (mTEC) や樹状細胞などに発現する転写因子であり、全身に存在する組織や臓器などの自己抗原を、組織特異的自己抗原 (TRA) として胸腺内で異所性に発現させる。そして、胸腺髄質に発現した TRA により、胸腺 T 細胞に自己・非自己の教育 (負の選択) を行っている。

Aire は、自己免疫性多腺性内分泌不全症 (autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy: APECED) の原因遺伝子であり、疾患家系を用いてポジショナル・クローニングによって同定された (Nagamine et al., 1997)。フィンランドなどの北欧諸国には Aire 遺伝子を欠損した疾患家系が存在し、自己免疫疾患の症状や真菌感染が認められる (Bjorses et al., 2000)。近年、Aire 欠損マウスが作出され、ヒトの APECED 患者と同様に末梢組織へのリンパ球浸潤や自己抗体の産生が起り、標的臓器の免疫傷害が認められ (Liston et al., 2003)、さらに胸腺髄質上皮細胞における TRA の発現が mRNA レベルで減少していた (Liston et al., 2003)。これらのことから、ヒトの Aire 欠損症の病態を再現できることが明らかになり、哺乳類の胸腺における T 細胞の成熟機構の研究に用いられている (Anderson et al., 2005)。

哺乳類の胸腺は心臓上部付近に認められるが、多くの真骨魚類では鰓腔の上部後方に存在し、おおむね頭部に含まれている (Zapata et al., 1996)。また、魚類においても胸腺は若齢個体において発達し、加齢の進んだ個体では退縮することが分かっている (Lange et al., 2004)。さらに、胸腺における白血球の組成は、抗ヒト Zap-70 抗体を用いた解析から哺乳類と同様に主に T 細胞を含むことが明らかになり (Miyazawa et al., 2018)、魚類の胸腺においても、CD4-1 および CD8  $\alpha$  共陽

性未成熟 T 細胞が認められる(Toda et al., 2011)。また、若齢個体の胸腺髄質において、アポトーシスを起こした細胞が認められることから、胸腺における T 細胞の教育(負の選択)が行われていることも示唆されている。一方、これまで Aire など胸腺の T 細胞成熟に直接関与する遺伝子を欠損したモデル魚などは作出されておらず、実際に哺乳類と同じ T 細胞の成熟機構を有するか否かについては不明であった。

ゼブラフィッシュは、これまでに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。近年、T 細胞が除去された Rag 欠損ゼブラフィッシュや、T 細胞を可視化した LCK-GFP トランスジェニックゼブラフィッシュが作出され、T 細胞の機能解析に用いられている(Langenau et al., 2004; Tokunaga et al., 2017)。そこで本研究では、Aire 欠損ゼブラフィッシュを用い、真骨魚類の胸腺における T 細胞成熟機構を解析した。

## 3.2 材料および方法

### 3.2.1 供試魚

Aire 欠損ゼブラフィッシュは徳島大学医学部より分与され、半欠損 (Aire<sup>+/-</sup>) 個体同士の交配により Aire 全欠損 (Aire<sup>-/-</sup>)、半欠損 (Aire<sup>+/-</sup>) および野生型 (Aire<sup>+/+</sup>) ゼブラフィッシュを作出した。これらゼブラフィッシュは1日2回給餌を行い、水温は 27±0.5°C で飼育した。

### 3.2.2 Aire 欠損ゼブラフィッシュの同定

ゼブラフィッシュの尻鰭の一部または受精卵を材料とし、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いゲノム DNA の抽出を行った。得られた DNA をテンプレートとし GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation) を用いて PCR を行った。PCR 条件は 94°C 2 分 1 サイクル、94°C 10 秒、55°C 10 秒、72°C 20 秒を 35 サイクル、72°C 3 分を 1 サイクル行った。PCR 反応は全量を 20µL として行い、また、プライマーは表 1 に記載されたプライマーセット (終濃度 200 nM) を用いた。PCR 反応産物は 8% ポリアクリルアミドゲルで泳動し、1 µg/ml の ethidium bromide (Wako) で 10 分間染色を行った。PCR 産物の撮影には AE-6932GXCF Printgraph (ATTO) を用い、形成されるバンドのパターンにより遺伝子型の特定を行い、Aire 欠損ゼブラフィッシュの同定を行った。

### 3.2.3 胚発生の観察

ゼブラフィッシュの受精卵の発生過程は実体顕微鏡 (Leica MZ16) で、5 時間おきに胚が動き出す 20 時間までタイムラプス撮影を行った。受精卵は撮影中 48 穴プレート (IWAKI) 上で、水温 27±0.5°C に維持した。撮影に用いた受精卵は

3.2.2 項の方法に従い、ゲノム DNA を抽出し遺伝子型の同定を行った。

#### 3.2.4 抗体

抗ギンブナ CD4-1 抗体、抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体、および抗ヒト ZAP-70 抗体は、2.2.2 項に記載されているものを用いた。

#### 3.2.5 胸腺細胞における Aire および自己抗原遺伝子の発現解析

胸腺細胞を 2.2.3 項に記載した方法により調整後、ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System (Promega) により全 RNA を抽出した。その後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を使用して、cDNA を合成した。mRNA 発現解析は、Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa Bio) を用いて定量 PCR によって行った。反応は 25 $\mu$ L 混合物中の 1:50 希釈 cDNA 5 $\mu$ L、SYBR プレミックス Ex Taq (TaKaRa Bio) 12.5 $\mu$ l および表の各特異的プライマーセット (終濃度 200nM) を用いて、95 $^{\circ}$ C 30 秒間、95 $^{\circ}$ C 5 秒間、60 $^{\circ}$ C 30 秒間で 45 サイクル実施した。胸腺上皮細胞における自己抗原遺伝子の発現を解析するため、胸腺髄質上皮の分化を誘導する転写因子 *foxn1* を標準遺伝子として用い各サンプルを標準化し、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法(Livk and Schmittgen, 2001)によって各遺伝子の相対 mRNA 量を解析した。

#### 3.2.6 白血球の調整

2.2.3 項に記載した方法に従い、胸腺または腎臓白血球の調整を行った。

#### 3.2.7 免疫染色および FCM 解析

2.2.4 項に記載した方法に従い、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て FCM 解析を行った。

### 3.2.8 病理切片の作製

ゼブラフィッシュを 0.01%ベンゾカイン (Sigma) で麻酔し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) を用いて 1 日以上 4°Cにて固定を行った後、30%スクロースに 1 日以上浸漬することで PFA の置換を行った。その後、OCT コンパウンド (サクラファインティックジャパン)を用いて組織を包埋し、クリオスタット (GMI Inc) により 8  $\mu$ m の厚さに薄切した。組織の染色にはヘマトキシリン・エオジン (Wako)またはチールネルゼン染色 (武藤化学株式会社) を用いた。

### 3.2.9 免疫組織学的染色

凍結切片 (8 $\mu$ m) に薄切された組織切片は、4°Cで 8 時間、1 : 300 希釈した抗 Zap-70 抗体、または陰性対象としてウサギ IgG アイソタイプコントロール (CST Japan) とそれぞれインキュベートした。PBS により 5 回洗浄を行った後、1 : 500 に希釈した AlexaFluor®488 標識抗ウサギ IgG (H&L) を二次抗体として用い、室温で 90 分間インキュベートした。5 回洗浄を行った後、核を DAPI (Sigma-Aldrich) で染色し、切片を ProLong Gold (Life Technologies) でマウントした。染色した組織切片は、蛍光顕微鏡 (IX71、オリンパス) を用いて観察を行った。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 Aire 欠損ゼブラフィッシュの遺伝子型の同定

Aire 欠損ゼブラフィッシュは、Aire 遺伝子の第 2 エクソンを 11bp 欠失することでフレームシフトが誘導される。そのため、第 2 エクソン領域の PCR で増幅される PCR 産物は、Aire 欠損ゼブラフィッシュでは野生型に比べ 11bp 分泳動速度が速くなる。従って、形成されるバンドの泳動パターンが異なり、それぞれ遺伝子型を判別することが可能であった (図 8)。さらに、Aire 半欠損ゼブラフィッシュでは、野生型および全欠損個体で認められる両方のバンドが形成された。以上のように、形成されるバンドのパターンおよび泳動速度により、Aire 欠損ゼブラフィッシュの遺伝子型の同定が可能であった。

#### 3.2.2 胚発生の観察

Aire 欠損ゼブラフィッシュの胚発生過程を観察したところ、15 時間程度で頭側と尾側の形状がはっきりわかるようになり、その後、30 時間までに発眼、尾の短縮や発育の遅延など、明らかな発生異常は認められなかった (図 9)。また、卵内発生終了後も遊泳などに異常は認められなかった (データ未表示)。

#### 3.3.3 胸腺における Aire および自己抗原遺伝子の発現解析

定量 PCR を用いた胸腺上皮細胞における遺伝子発現解析により、Aire 欠損個体では野生型に比べ、Aire 遺伝子の発現が顕著に低下していた (図 10)。また、C-reactive protein (CRP)、インスリンおよびグルタミン酸デカルボキシラーゼなどの胸腺で異所性に発現する組織特異的自己抗原の mRNA も、Aire 欠損個体では野生型に比べ顕著な発現低下が認められた (図 11)。一方、同じく組織特異的

自己抗原遺伝子であるインスリン B mRNA の発現低下は認められなかった (図 3C)。

### 3.3.4 Aire 欠損ゼブラフィッシュにおける自己免疫疾患様症状の解析

10 ヶ月齢を超えた Aire 欠損ゼブラフィッシュの一部では、卵巣萎縮を示す個体がしばしば認められた (図 12)。その個体を用い、病理切片を作製したところ、卵周囲に細胞の浸潤や線維状の構造が認められた (図 13)。そこで、卵周囲の細胞を同定するため、T 細胞のマーカーである抗 Zap-70 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、卵周囲に陽性に染まった T 細胞が多く認められた。一方、線維化の生じた部位にはほとんど免疫系の細胞は認められなかった (図 14)。

### 3.3.5 Aire 欠損ゼブラフィッシュにおける生存率の低下

10 ヶ月齢を超えた Aire 欠損ゼブラフィッシュでは、立鱗症状や腹水の貯留を示す個体が野生型に比べ多く発生し、生存率の低下が認められた (図 15)。死亡した個体の病理切片では腎臓を中心に肉芽腫の形成が認められ、肉芽腫内には抗酸菌染色に陽性を示す菌体が多数認められた (図 16)。このことは、感染が死亡原因の 1 つになることを示唆している。

### 3.3.6 胸腺細胞リンパ球分画における CD4-1 または CD8 $\alpha$ 陽性細胞の割合

胸腺細胞を用いた FCM 解析の結果、3 ヶ月齢の野生型ゼブラフィッシュのリンパ球分画では、CD4-1 陽性細胞の割合が 30%程度占めるのに対し、Aire 欠損個体では約 10-20%の低下が認められた (図 17A)。同様に、野生型では CD8  $\alpha$  陽性細胞の割合が 40%程度占めるのに対し、Aire 欠損個体では約 20%に低下していた (図 17B)。

### 3.4 考察

本研究において、Aire 遺伝子を欠損したゼブラフィッシュの一部で、10 ヶ月齢以降に卵巣の萎縮など、ヒトに認められる自己免疫疾患に類似した症状が認められた。加えて、抗酸菌に対して易感染性を示す傾向も認められた。これらの表現型が現れた原因として、Aire 欠損ゼブラフィッシュの胸腺では自己抗原遺伝子の発現が低下し負の選択が正常に起こらず、自己反応性 T 細胞が末梢器官へ遊走し、自己免疫疾患様の症状が現れたと考えられた。さらに、易感染性を示した原因として、Aire 欠損ゼブラフィッシュの胸腺細胞において CD4-1 や CD8  $\alpha$  を発現が低下する T 細胞の割合が低下する傾向が認められ、T 細胞の成熟異常を引き起こしたと考えられた。これらの結果は、真骨魚類においても Aire が胸腺 T 細胞の成熟機構に重要な役割を担うことを示すものである。

胸腺では Aire を中心に、自己反応性 T 細胞を除去し生体を守る機構（中枢性寛容）が存在するのに対し、末梢では制御性 T 細胞 (Treg) が自己反応性 T 細胞の抑制（末梢性寛容）に重要な役割を担う(Asano et al., 1996)。Treg のマスター転写因子である Foxp3 を欠損したマウスは Aire 欠損マウスと同様に自己免疫疾患を発症し、Foxp3 欠損マウスの方がより明瞭で重い症状を示すことが分かっている(Chen et al., 2005)。また、Foxp3 欠損ゼブラフィッシュでも 3 ヶ月齢において、ヒトの自己免疫に疾患類似した症状やエラおよび腸管における T 細胞の浸潤が認められ、魚類においても末梢免疫寛容の不全が自己免疫疾患に関与することが報告されている(Kasheta et al., 2017; Sugimoto et al., 2017)。本研究において、Aire 欠損ゼブラフィッシュでは 10 ヶ月齢以降の加齢が進んだ一部の個体において自己免疫疾患様の症状が認められたが、Foxp3 欠損ゼブラフィッシュに比べ、自己免疫疾患様の症状は明瞭ではなく全身性の T 細胞浸潤も認められなかった。

この結果は、哺乳類と同様に、Foxp3 欠損より Aire 欠損のほうが、自己免疫疾患の症状が軽度であることを示すものである。さらに、魚類は最も原始的な脊椎動物であり、T 細胞を始めとする獲得免疫よりも自然免疫が重要な役割を担うため、Aire 欠損による影響が顕著に現れなかった可能性も考えられる。

自己免疫疾患とは別に、ヒトの Aire 欠損患者では真菌に対して易感染性を示すことが知られている(Lionakis 2012)。ヒトの Aire 欠損患者において真菌感染を生じる原因として、真菌に対する免疫機構は主に Th17 サブセットが担っており、近年 Aire が Th17 サブセットの誘導にも関与することが報告されている(Humbert et al., 2018)。また、哺乳類では抗酸菌である *Mycobacterium tuberculosis* 感染においても、Th17 サブセットの重要性が報告されている(Pitt et al., 2012)。これらのことから、本研究における Aire 欠損ゼブラフィッシュが抗酸菌に対して易感染性を示した原因として、Th17 サブセットの誘導性に問題があったことも考えられる。しかし、Th17 に関しては魚類では同定されていないため、今後の課題である。

Aire 欠損ゼブラフィッシュの胸腺細胞のリンパ球分画では、CD4-1 や CD8 $\alpha$  陽性細胞の割合の低下が認められた。この現象は哺乳類において報告されていない。今回、我々が使用した抗体はギンブナに対するものであり、全ての CD4-1 と CD8 $\alpha$  陽性 T 細胞を認識できていない可能性もあり、引き続き Aire 欠損と CD4-1 や CD8 $\alpha$  細胞の割合との関係性を検討する必要がある。

本研究により、Aire 欠損ゼブラフィッシュでは、哺乳類の Aire 欠損個体と類似した自己免疫疾患様の症状が一部の個体で認められ、自己抗原遺伝子の発現低下を示すことが明らかになった。このように、真骨魚類の胸腺も哺乳類と同様、T 細胞の成熟に関与することが示された。

表 2 解析に用いたプライマー

Primer name	Sequence(5'→3')	Accession No.
<b>Genotyping</b>		
Aire-F	GGGGTTACCCTACGGTCCTAAGGCCTTCTGT	
Aire-R	GCTCTAGAAGCTTTGCACTGTACCTTTGGGAAG	
<b>Expression Analysis</b>		
ins-F	GCTTCTTCTACAACCCCAAGAGA	
ins-R	GTCAGCCACCTCAGTTTCCTG	
insb-F	ACACCAACAGAGGCAGGAGA	
insb-R	TCACCTTCTCTTTCAGCGGATC	
crp2-F	GTGAAACTGTGCAGTCAGACCT	
crp2-R	AGTTTTACCACTGAGACCCACTTC	
gad1b-F	TGACATTGCTGACATCTGTGAGA	
gad1b-R	GACGATGCTTTCTGGACATCAAC	
aire-F	TTCACTCTCCACAGTCTCAGC	
aire-R	ATGCCACATGCCATCCTGAT	
foxn1-F	ACAGAGCATTTCCCATACTTTAAGAC	
foxn1-R	ACCTTCTCAAAGCATTTGTTTCAGAG	

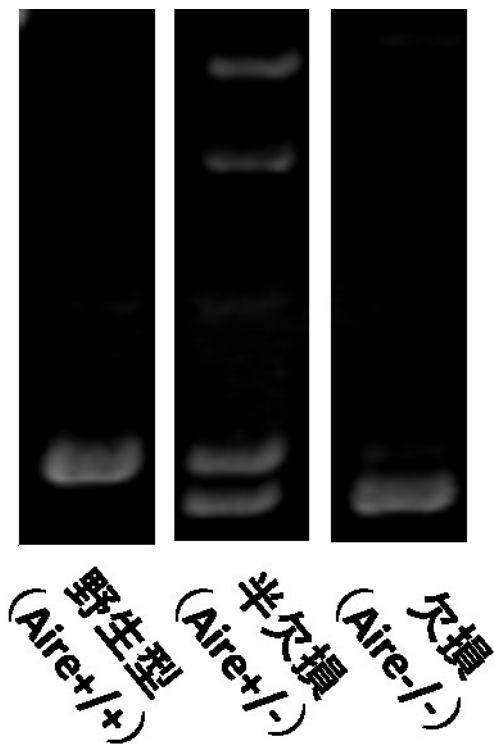


図 8 Aire 欠損ゼブラフィッシュの遺伝子型の同定。

Aire 欠損ゼブラフィッシュでは 11bp 塩基を欠失しているため、野生型（左）に比べ泳動速度が速い（右）。また Aire ヘテロ個体では、野生型と欠損個体に認められるバンドの両方が確認される（中央）。

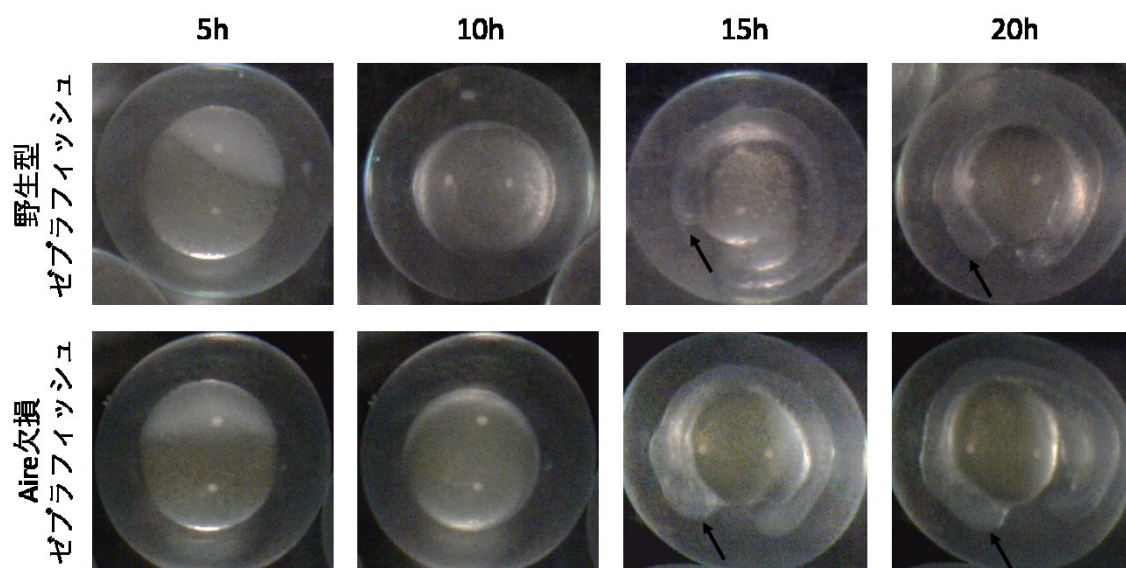


図9 胚発生の観察。

野生型または Aire 欠損ゼブラフィッシュの受精卵は 48 穴プレート内で、5 時間ごと 20 時間まで撮影を行った。野生型（上列）に比べ Aire 欠損ゼブラフィッシュ（下列）では、胚発生過程において顕著な発生異常は認められなかった。頭側方向（矢印）。



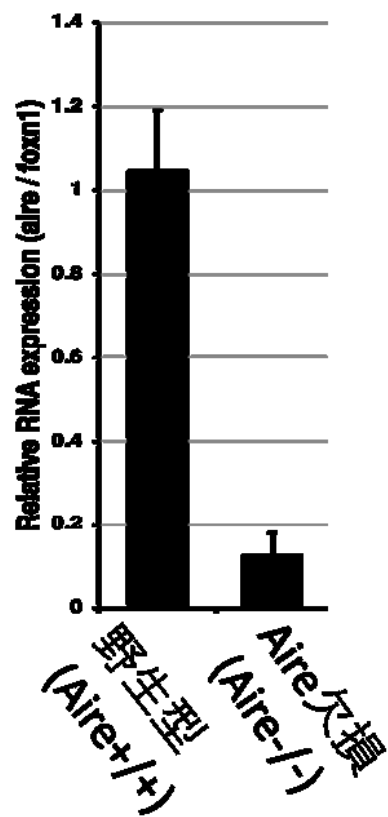


図 10 胸腺における Aire mRNA の発現解析。

定量 PCR の結果、Aire 欠損ゼブラフィッシュの胸腺では、野生型に比べ Aire の mRNA 発現の低下が認められた。

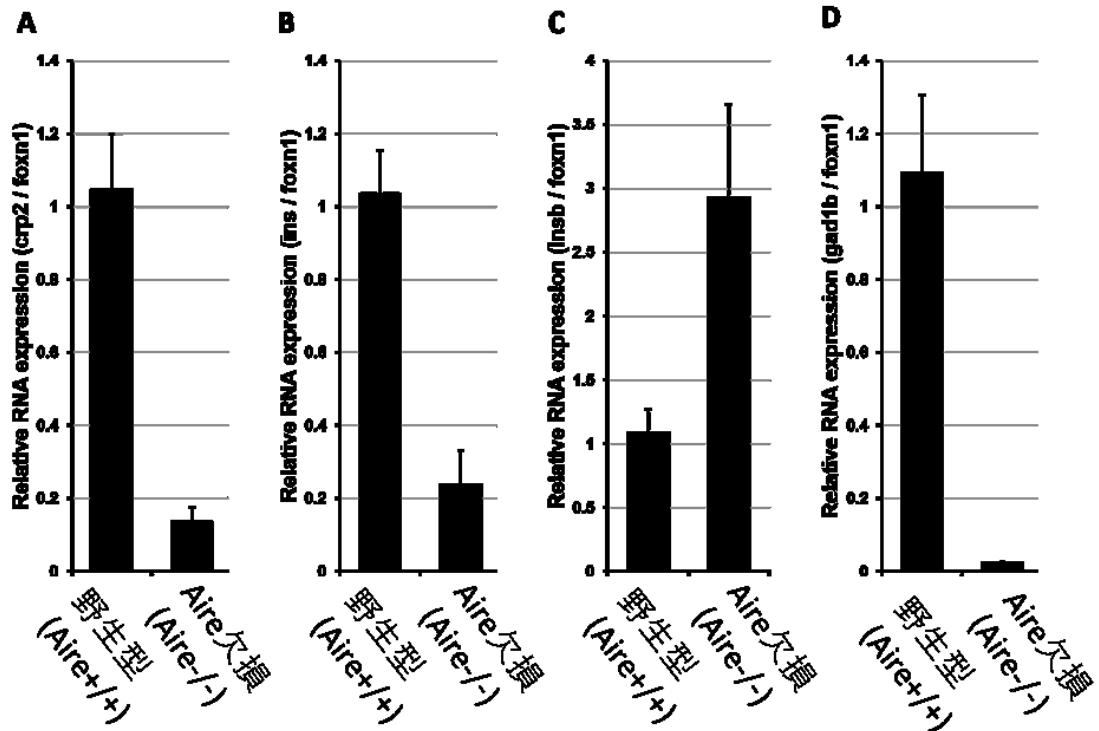


図 11 胸腺における自己抗原遺伝子の発現解析。

Aire 欠損ゼブラフィッシュの胸腺では、野生型に比べ crp2(A)、インスリン (B)、およびグルタミン酸デカルボキシラーゼ (D) などの自己抗原の mRNA の発現低下が認められた。一方、インスリン B mRNA (C) の発現低下は認められなかった。



図 12 Aire 欠損ゼブラフィッシュの表現型の肉眼所見。

卵巣萎縮の生じていない Aire 欠損ゼブラフィッシュでは、発達した卵が認められたのに対し (A 矢印)、卵巣萎縮の生じた Aire 欠損ゼブラフィッシュでは、明瞭な卵が認められない (B 矢印)。

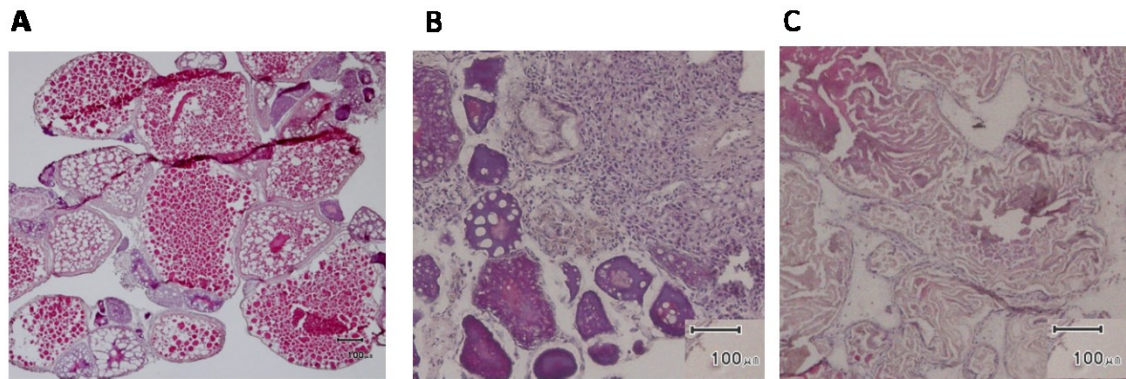


図 13 Aire 欠損ゼブラフィッシュの表現型の顕微鏡所見。

卵巣萎縮が生じていない Aire 欠損ゼブラフィッシュでは、卵細胞が大きく発達し、卵タンパクや脂質を豊富に含んでいた (A)。一方、卵巣萎縮が生じた Aire 欠損ゼブラフィッシュでは、卵細胞の成熟が弱く、周囲には細胞の浸潤が認められ (B)、部分的には線維化したような構造が認められた (C)。

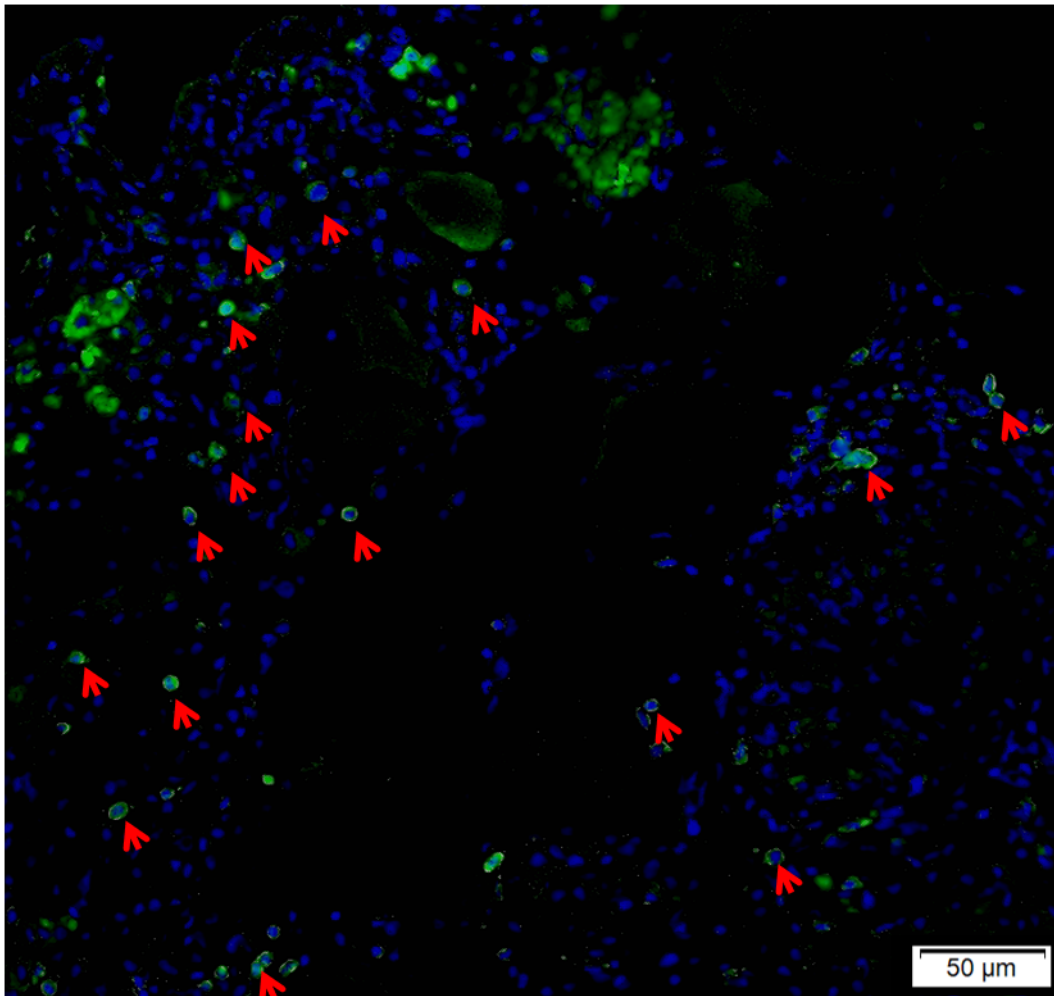


図 14 卵およびその周囲に浸潤した細胞に対する、抗 Zap-70 抗体（T 細胞マーカー）を用いた免疫組織学的染色。

卵細胞は核が少なくタンパク質や脂質を多く含むことから、黒く抜けた部分に存在し、その周囲には抗 Zap-70 抗体陽性細胞（T 細胞）の浸潤が認められた（矢印）。青：DAIP（核） 緑：抗 Zap-70 抗体陽性細胞

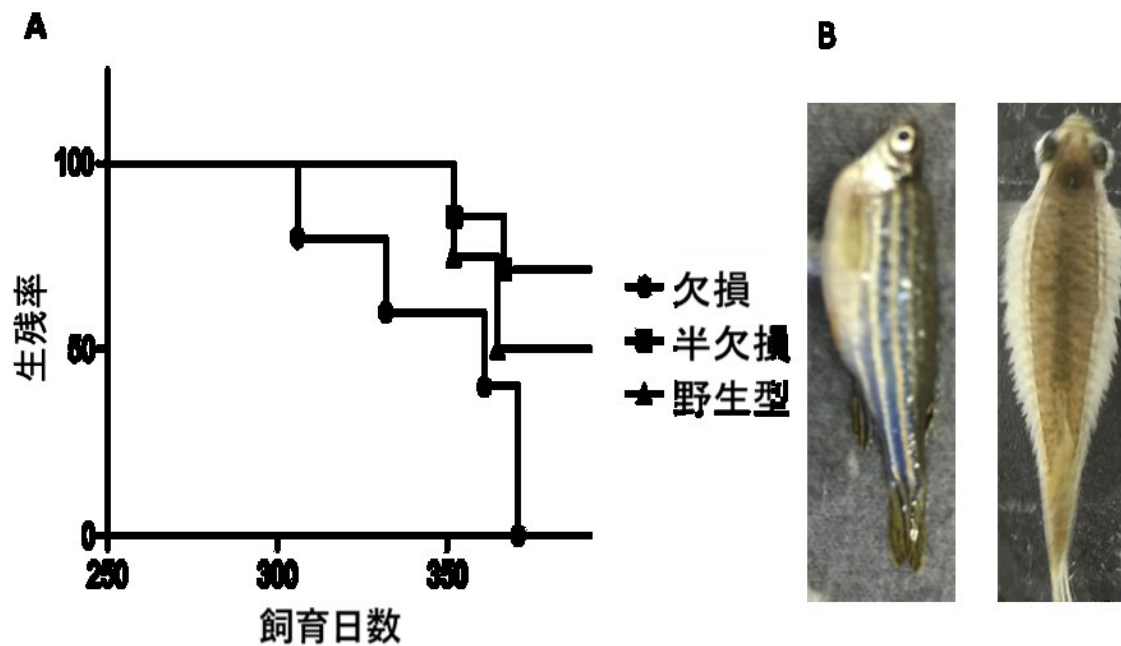


図 15 Aire 欠損ゼブラフィッシュにおける生残率の推移。

Aire 欠損ゼブラフィッシュでは、発育後 300 日前後において感染し死亡する個体が多く認められた。野生型やヘテロにおいても死亡する個体は認められたが、Aire 欠損ゼブラフィッシュで特に多かった (A)。感染が生じ死亡した個体の多くは鱗立症状を呈した (B)。

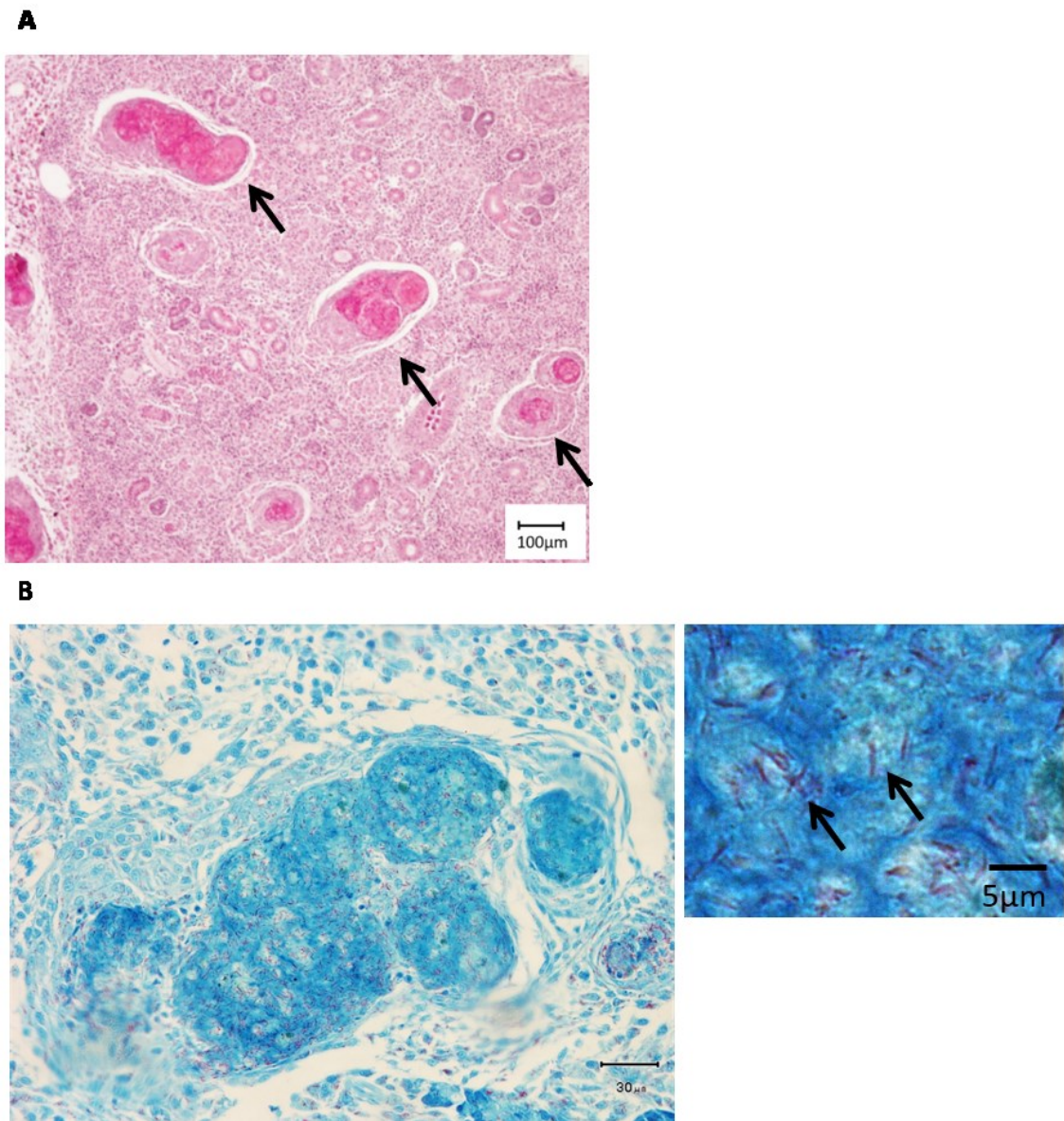


図 16 感染が生じた Aire 欠損ゼブラフィッシュの病理切片。

腎臓を中心に肉芽腫の形成が認められ (A 矢印)、肉芽腫内には抗酸菌染色で陽性となる菌体が認められた (B 矢印)。

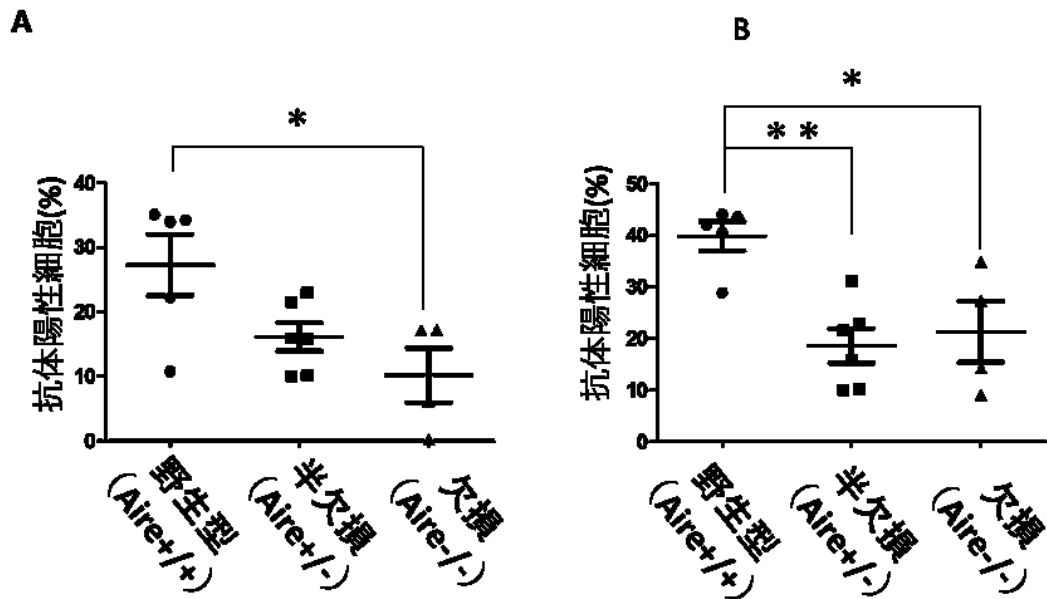


図 17 胸腺細胞における CD4-1 および CD8 $\alpha$  の FCM 法による発現解析。

Aire 欠損ゼブラフィッシュの胸腺細胞のリンパ球分画における CD4-1 の割合は、野生型に比べ低下していた (A)。同様に、野生型に比べ Aire 欠損の胸腺細胞では CD8 $\alpha$  の割合も低下が認められた (B)。\*P<0.05 \*\*P<0.01



## 第4章

クローンギンブナをモデルとした、二次リンパ器官としての  
腎臓における CD3  $\epsilon$  の特有な発現機構の解明

## 4.1 序論

T細胞の表面には抗原受容体であるT細胞受容体(TCR)と共にCD3分子が存在し、複合体を形成する(TCR/CD3複合体)。この内、TCRはMHCによって提示された抗原ペプチドを認識し、その刺激をCD3が細胞内へ伝達することで免疫反応を引き起こす。マウスのT細胞におけるTCR/CD3複合体は、TCRの両端に、それぞれCD3 $\gamma$ とCD3 $\epsilon$ のヘテロ二量体とCD3 $\delta$ とCD3 $\epsilon$ 鎖のヘテロ二量体が存在し、さらにTCRの下部にはCD3 $\zeta$ 鎖のホモ二量体が存在する。これらCD3鎖は、胸腺細胞発生の様々な段階において重要な役割を果たす。例えば、マウスのCD3 $\epsilon$ 欠損個体では、CD4およびCD8ダブルネガティブ(DN)期において胸腺細胞の完全な発達障害をもたらし、CD3 $\gamma$ の欠損は、DN期からCD4およびCD8ダブルポジティブ(DP)期への移行が阻害される(Dave et al., 2009)。また、成熟T細胞の活性化におけるCD3鎖の役割も報告されている(Hayes et al., 2003; Brodeur et al., 2009)。例えば、マウスを用いた *in vitro* における研究では、非活性T細胞に各CD3鎖および特定のTCR遺伝子を強制発現させることで、抗原特異的T細胞の機能を増強することを示されている(Ahmadi et al., 2011)。さらに、CD3タンパク質を過剰に発現させたT細胞は、抗腫瘍活性およびメモリー機能を *in vivo* で増強するのに有効であることが明らかになっている(Ahmadi et al., 2011)。一方、炎症性自己免疫疾患の患者では、T細胞におけるCD3鎖の発現の抑制および、免疫応答の障害が報告されている(Matsuda et al., 1998; Chen et al., 2000; Prado-Garcia et al., 2008)。これらの報告は、T細胞発達および成熟T細胞の活性化等におけるCD3鎖の重要な役割を示している。

魚類のCD3遺伝子は、軟質魚類(コチョウザメ)および真骨魚類(ヒラメ、

フグ、大西洋オヒョウ、スズキ、アトランティックサーモン、コイ)で報告されている(Tang et al., 2017)。また、CD3 の mRNA はリンパ系組織 (胸腺、頭腎、体腎および脾臓)、粘膜組織 (鰓、皮膚および腸) および末梢血白血球において広く発現が認められる(Araki et al., 2005; Shang et al., 2008; Randelli et al., 2011; Tang et al., 2017)。哺乳類の CD3 は、CD3- $\gamma$  鎖、CD3- $\delta$  鎖、CD3- $\epsilon$ 、CD3- $\zeta$  の 4 種類から構成されるが、鳥類、両生類、真骨魚類を始めとする哺乳類以外の脊椎動物は、CD3- $\gamma$   $\delta$  と CD3- $\epsilon$  および CD3- $\zeta$  鎖の 3 種類の CD3 しかなかった。このことから、CD3- $\gamma$   $\delta$  鎖は哺乳類の CD3- $\gamma$  鎖と CD3- $\delta$  鎖の共通祖先だと考えられている(Laing et al., 2011)。このように CD3 分子は脊椎動物の進化を通して比較的よく保存されており、真骨魚類においても T 細胞のシグナル伝達に重要な役割を担うと考えられるが、複合体を形成するのか、また哺乳類と相似の機能を持つのか、依然として未解明な点が多い。

真骨魚類は哺乳類と同様に、胸腺、脾臓および腸管をリンパ器官として持っており、さらに真骨魚類は腎臓が主要なリンパ器官として機能している(Press et al., 1999)。一方、哺乳動物との明らかな違いは真骨魚類は骨髄やリンパ節を持たないことであり、真骨魚類の腎臓が哺乳類の骨髄およびリンパ節と相似な器官であると提唱されている(Zapata et al., 1996)。さらに、ギンブナやゼブラフィッシュの腎臓には、未熟な白血球や芽細胞に加え造血幹細胞が豊富に存在することから、魚類の腎臓は哺乳類の骨髄と同等な造血器官であることが示唆されている(Kobayashi et al., 2007; Kobayashi et al., 2008)。また、哺乳類のリンパ節は T 細胞と樹状細胞との相互作用により免疫応答を開始し(Breart and Bousso, 2006; Hugues et al., 2010)、特に、胚中心が主な免疫応答を担う部位であることはよく知られている(Ramiscal and Vinuesa, 2013)。しかし、真骨魚類ではリンパ節および胚中心に相当する組織または部位に関する情報が限られてい

る。

そこで本研究では、リンパ節と骨髄を持たないギンブナにおいて、腎臓 T 細胞の CD3 $\epsilon$  の発現様式に着目し、腎臓の機能を T リンパ球のリザーバーとしての観点から考察する。

## 4.2 材料および方法

### 4.2.1 供試魚

体重 15~25g の諏訪湖産 3 倍体クローンギンブナ(*Carassius auratus langsdorfii*) および奥尻島産 3 倍体クローンギンブナを用いた。これら 3 倍体クローンギンブナは、3 倍体の成熟卵に UV 照射したドジョウの精子を人工的に受精させ雌性発生を誘発することで作出した。ギンブナは水温 25°C で飼育し、給餌は 1 日 2 回行った。

### 4.2.2 抗体

抗ギンブナ CD3 $\epsilon$  抗体、抗ギンブナ CD4-1 抗体および抗ギンブナ CD8 $\alpha$  抗体は、Miyazawa ら (2018) が報告したものをを用いた。

### 4.2.3 白血球の調整

第二章 2.2.3 項と同様の方法で、腎臓、胸腺、脾臓、腸管および鰓から白血球を分離し調整を行った。また、末梢血から白血球を採取するため、ヘパリンナトリウム (Wako) で処理した 25G の注射針 (テルモ) を用いて尾側血管から採血し、ヘマトックリット遠心管 (フナコシ) に末梢血を 100 $\mu$ l 入れ 500g で 5 分間遠心した。その後、形成された Buffy コート (白血球を多く含む層) を回収し、2.2.3 項と同様の方法により、白血球の調整を行った。

### 4.2.4 細胞培養および遺伝子発現解析

腎臓白血球を、1%ギンブナ血清を添加した RPMI1640 培地 (Thermo Fisher Scientific Inc) に懸濁し、25°C、5%CO<sub>2</sub> で 24 時間、1 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ 2ml /well を 6 ウ

エルプレート上で培養した。3.2.3 項に従い、培養した細胞から RNA 抽出および逆転写反応を行い、表 3 に記載した各特異的プライマーセット（終濃度 200nM）を用いて定量 PCR を行った。培養前後で一部の細胞が死に、白血球における T 細胞の割合が変化するため、T 細胞における標準遺伝子として *lck* を用いて各サンプルを標準化し、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法によって T 細胞における各遺伝子の相対 mRNA 発現量を解析した。

#### 4.2.5 免疫染色および FCM 解析

各組織から採取した白血球  $5 \times 10^6$  cells/ml に対し、2%パラホルムアルデヒド（PFA）を用い室温で固定し、続いて 0.1%サポニン加 HBSS を用いて 10 分間室温で膜透過処理した。次に、1 : 300 に希釈した抗 CD3 $\epsilon$  抗体、または陰性対象としてウサギ IgG アイソタイプコントロール（CST Japan）をそれぞれ 4°C で 45 分間インキュベートし、3 回遠心洗浄後、1 : 500 に希釈した Alexa Fluor 647 標識抗ウサギ IgG（H&L）（Thermo Fisher Scientific Inc）を抗ギンブナ CD3 $\epsilon$  抗体に対して反応させた。その後、細胞を 3 回遠心洗浄し、2.2.4 項と同様の方法で、FCM 解析を行った。

#### 4.2.6 FACS ソーティングした T 細胞サブセットの遺伝子発現解析

2.28 項に記載した方法に従い、CD4-1 または CD8 $\alpha$  陽性細胞を腎臓と脾臓からそれぞれ分取した。3.2.3 項に従い、RNA 抽出および逆転写反応を行い、表の各特異的プライマーセット（終濃度 200nM）を用いて定量 PCR を行った。内部標準遺伝子として *efl-a* を用いて、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法によって相対 mRNA 発現量を解析した。

#### 4.2.7 腎臓および脾臓白血球の同系レシピエントへの移入

腎臓または脾臓白血球を分離後、別のクローンギンブナに移入し、その動態を調べた。すなわち、ギンブナ腎臓または脾臓白血球を上記 4.2.5 項に記載した方法に従って調製し、緑色蛍光色素である CFSE (Invitrogen) を用い、戸田らの方法に従って白血球を標識した(Toda et al., 2009)。すなわち、細胞懸濁液を  $2 \times 10^6$  cells/ml に調整し、室温で 10 分間 5 $\mu$ M CFSE (Invitrogen) で標識した。その後、等量の氷冷 HBSS を加え反応を停止させ、続いて 4°C で 3 回遠心洗浄を行った。次に、100 $\mu$ l の  $5 \times 10^7$  cells / ml の CFSE 染色した腎臓または脾臓白血球を、尾側血管を介してレシピエントギンブナに注射した。CSFE 染色したドナー白血球を移植後 24 時間に、レシピエント魚の腎臓または脾臓細胞懸濁液を調製し、CFSE 陽性細胞のパーセンテージを FCM 法によって解析した。

#### 4.2.8 ウェスタンブロット法

腎臓または脾臓由来の白血球をそれぞれ SDS サンプルバッファー (25mM Tris-HCl (pH7.4)、150mM NaCl、0.1% TritonX-100、0.05% SDS) 中で溶解した。溶解したサンプルを SDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離し、Yabu ら (2011) に記載されている方法で PVDF 膜上 (Thermo Fisher Scientific Inc.) に転写した。PVDF 膜をブロッキング試薬 (Block-Ace、大日本製薬株式会社) で室温にて 1 時間ブロッキングした。次に、PVDF 膜を 4°C で一晩、1 : 300 に希釈した抗ギンブナ CD3  $\epsilon$  抗体と反応させた後、0.5% Tween20 添加 Tris Buffered Saline (TBS-T) で 5 回洗浄し、1:20000 に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギ IgG (H&L) (Sigma-Aldrich) を用いて室温で 1 時間反応させた。その後、TBS-T で 5 回洗浄し、PVDF 膜上のタンパクを可視化するため、Western Lightning ECL Pro (Perkin Elmer) を用いて反応させ、Hyperfilm ECL (GE Healthcare) に感光し

た。

#### 4.2.9 免疫組織染色

3.2.7 項に記載した方法に従い、1 : 300 に希釈した抗 CD3  $\epsilon$  抗体を用いて免疫染色を行った。二次抗体には 1 : 500 に希釈した Alexa Fluor488 標識抗ウサギ IgG (H&L) を用いた。

#### 4.2.10 インサイチュ・ハイブリダイゼーション(ISH)

1295bp のギンブナ CD3  $\epsilon$  cDNA を pGEM-T Easy プラスミドベクター (Promega) にサブクローニングし、表 3 に記載したプライマーセット (終濃度 200nm) を用いた PCR により、T7 または SP6 プロモーター配列をそれぞれ 5' または 3' 末端に付加した。DIG RNA Labeling Kit (Sigma-Aldrich) を用いて、センスまたはアンチセンス RNA プローブを合成した。組織切片を用いた ISH のために、腎臓、脾臓および胸腺の組織サンプルを 4%PFA 中に 4°C で 12 時間固定した。凍結切片 (8 $\mu$ m) をスライド上に張り付けた。ISH の行程は、Nagasawa ら (2009) の方法に準じて行った。次いでプローブ発色にあたり、切片を 0.0018% BCIP (Sigma-Aldrich) および NBT (Nacalai tesque, Japan) を含む NTMT 溶液中に浸し、室温下の暗所でインキュベートした。発色反応を確認した後、反応停止のため切片を PBS で洗浄した。切片の観察には倒立顕微鏡 (BX5、オリンパス) を用いた。

#### 4.2.11 統計解析

2 グループ間の判定には t 検定を用いた。また、FCM 解析の結果は、2 元配置分散分析を用いて統計的に比較し、続いて Tukey の多重比較検定によって陽性



細胞の割合における平均値間の有意差を検出した。 $p$  値が 0.05 未満である場合、統計的に有意とした。

## 4.3 結果

### 4.3.1 各組織に対する抗 CD3 $\epsilon$ 抗体を用いた免疫染色

各組織から得た白血球を FSC と SSC ドットプロット上に展開し、リンパ球分画における CD3 $\epsilon$  陽性細胞の割合をヒストグラムで示したところ、胸腺、脾臓、腸、鰓および末梢血では CD3 $\epsilon$  の発現が認められたが、腎臓リンパ球では発現しは認められなかった (図 18)。さらに、組織標本では、CD3 $\epsilon$  陽性細胞が、胸腺、鰓、脾臓、および腸管などで観察されたが、腎臓では観察されなかった。また、陽性細胞を高倍率に拡大し観察したところ、これらは比較的小型で細胞質が少ない、形態的にリンパ球様の特徴を示していた (図 19)。

### 4.3.2 ウェスタンブロット法による CD3 $\epsilon$ タンパク質の発現解析

FCM 法を用いた解析で腎臓リンパ球分画に CD3 $\epsilon$  の発現がほとんど認められず、より詳細に腎臓における CD3 $\epsilon$  の発現を解析するため、ウェスタンブロット法により CD3 $\epsilon$  の発現を解析した。すると、脾臓白血球より調整したサンプルでは、20kDa 付近に鮮明なバンドが検出されたが、腎臓白血球より調整したサンプルでは検出されず、さらに腎臓サンプルを高用量用いた場合においてもバンドは検出されなかった (図 20)。また、23kDa 付近に検出されたバンドは、糖鎖修飾を受けた CD3 $\epsilon$  だと考えられる。

### 4.3.3 FACS ソーティングした CD4-1 および CD8 $\alpha$ 陽性細胞における、T 細胞関連マーカー遺伝子の発現解析

腎臓に由来する CD4-1 および CD8 $\alpha$  陽性リンパ球の CD3 $\epsilon$  がタンパク質レベルで認められなかったため、次に、mRNA レベルでの CD3 $\epsilon$  および T 細胞受容

体関連遺伝子発現を腎臓と脾臓 T 細胞について解析した。その結果、*tcrb*、*cd3e*、*zap-70* および *lck* を始めとする T 細胞関連遺伝子の発現は、腎臓および脾臓の CD4-1 陽性細胞および CD8  $\alpha$  陽性細胞の両方において同程度発現が認められた (図 21)。

#### 4.3.4 インサイチュ・ハイブリダイゼーション (ISH) 法による腎臓、胸腺および脾臓における CD3 $\epsilon$ mRNA の発現解析

ISH により、胸腺、脾臓および腎臓における CD3  $\epsilon$  mRNA の発現を検討したところ、いずれの組織においても発現が確認された (図 22)。胸腺においては、大部分の細胞が陽性に染色されたが、腎臓および脾臓では陽性細胞数は比較的少なく、特に腎臓では尿細管周囲の間質組織 (intertubular lymphoid tissue) の血球細胞を中心に分布していた。

#### 4.3.5 *in vitro* 培養後の腎臓白血球における CD3 $\epsilon$ タンパク質発現

腎臓における CD3  $\epsilon$  タンパク質の発現低下に、腎臓の環境が関与していると考え、腎臓白血球を培養し腎臓環境外における CD3  $\epsilon$  の発現を FCM 法により解析した。培養前の腎臓白血球には CD3  $\epsilon$  を発現する細胞はほとんど認められなかったが、培養 24 時間では多くの CD3  $\epsilon$  陽性細胞が出現した (図 23A)。また、CD3  $\epsilon$  陽性細胞の数は、培養前はほとんど陽性細胞が認められなかったが、培養後には平均で 70%と約 20 倍に増加していた (図 23B)。しかし、CD3  $\epsilon$  mRNA の発現を培養前と培養後で比較したものでは、培養の前後で差異は認められなかった (図 23C)。

#### 4.3.6 レシピエントの脾臓へ遊走した腎臓リンパ球における CD3 $\epsilon$ の発現

腎臓白血球が培養環境外で CD3 $\epsilon$  タンパク質を発現するようになったことから、腎臓環境が CD3 $\epsilon$  タンパク質の発現を抑制すると考えられた。そこで、CFSE でラベルしたドナー腎臓白血球  $1 \times 10^7$  個を、移植拒絶の起こらない同一クローンのレシピエント個体に投与したところ、各組織にそれぞれ  $3 \times 10^4$  個以上再分布し、腎臓、脾臓または末梢血において 1.2~2.4%を占めていた(データ未表示)。そして、それぞれの組織へ再分布した白血球における CD3 $\epsilon$  の発現を解析したところ、ドナー腎臓中では CD3 $\epsilon$  の発現が陰性であった腎臓白血球は、レシピエントの脾臓、末梢血では CD3 $\epsilon$  陽性細胞の割合が増加したが、レシピエントの腎臓に遊走した場合 CD3 $\epsilon$  の発現は陰性のままであった(図 24A)。一方、同様の方法で CD3 $\epsilon$  を発現しているドナー脾臓白血球を CFSE で標識しレシピエントへ投与したところ、レシピエントの腎臓に遊走した場合 CD3 $\epsilon$  の発現を示さなかったが、脾臓と末梢血に遊走した場合 CD $\epsilon$  の発現は維持された(図 24B)。

#### 4.4 考察

本研究では、胸腺、脾臓、腸、鰓および末梢血の T 細胞は CD3 $\epsilon$  を発現するが、CD4-1 および CD8 $\alpha$  陽性 T 細胞を豊富に含む腎臓の T 細胞において、CD3 $\epsilon$  分子がタンパク質レベルで発現されないことを見出した。また、興味深いことに、腎臓における CD4-1 および CD8 $\alpha$  陽性 T 細胞は、24 時間培養後に CD3 $\epsilon$  タンパク質の発現が陽性となることが明らかになった。さらに、同系統のクローンギンブナを用いた白血球の移入実験では脾臓由来 T 細胞の CD3 $\epsilon$  の発現はレシピエントの腎臓で抑制されたが、腎臓由来 T 細胞はレシピエントの脾臓において CD3 $\epsilon$  を発現した。一方、遺伝子発現解析により、腎臓または脾臓における CD4-1 および CD8 $\alpha$  陽性 T 細胞は、*cd3e* の mRNA を同程度発現した。これらの結果は、腎臓環境において CD3 $\epsilon$  タンパク質の発現は抑制されるが mRNA は抑制されないことを示している。すなわち、CD3 $\epsilon$  発現は転写レベルで調節されるのではなく、タンパク質発現レベルで調整されていることが示唆された。

哺乳類における TCR/CD3 複合体の細胞表面における発現には、CD3 $\epsilon$  および CD3 $\zeta$  鎖の発現が必須であることが報告されている(Kappes and Tonegawa, 1991)。すなわち、ギンブナの腎臓において CD4-1 および CD8 $\alpha$  陽性 T 細胞に CD3 $\epsilon$  の発現が認められないことから、TCR/CD3 複合体も発現していない可能性がある。しかし、ギンブナを始めとする真骨魚類では TCR に対する抗体が作製されておらず、TCR/CD3 複合体の発現も障害されるのか確認することは困難である。

哺乳類において、TCR/CD3 複合体の細胞表面発現については動的かつ迅速な変化が報告されており、複合体の細胞表面における発現レベルは、内在化、再循環、および複合体の分解によりバランスが保たれている(Rovira-Clave et al., 2016)。本研究では、24 時間培養を行うことによって腎臓白血球中にも、CD3 $\epsilon$  陽性細

胞が認められることが明らかになった。我々のこれまでの、同種異系細胞に対する CD8 陽性 T 細胞の細胞傷害性に関する研究では、エフェクター腎臓白血球は、標的細胞に対する傷害活性を誘導する前に少なくとも 8 時間培養する必要がある（未発表データ）、このことから、腎臓細胞における傷害活性に CD3 $\epsilon$  発現上昇が相関することが示唆される。一方、CD3 ファミリーの発現低下は免疫疾患との関連があり、炎症性自己免疫疾患を有する多くの患者において CD3 $\zeta$  の発現の低下し、CD3 $\epsilon$  鎖の発現の低下による細胞性免疫応答の抑制が報告されている(Chen et al., 2000; Prado-Clave et al., 2008)。これらの報告より、CD3 $\epsilon$  の発現が認められないギンブナ腎臓環境において、T 細胞サブセットの機能が抑制されている可能性がある。

真骨魚類の腎臓は重要な造血器官であるとともに(Fänge, 1986)、多くの免疫系の細胞を貯蔵している。哺乳動物では、末梢免疫寛容を維持し、過度の免疫応答を避けるために、免疫応答が一定の段階に達すると活性化 T 細胞を排除することが不可欠である。末梢における休止期の成熟 T リンパ球は、抗原刺激を受け増殖を開始し、T 細胞のさらなる抗原による反復刺激によって活性化されるとアポトーシスを介して活性化誘導細胞死 (AICD) を遂げる(Sikora, 2015)。本研究において、腎臓の T リンパ球では CD3 $\epsilon$  タンパク質の発現とそれに伴う T リンパ球の活性化が抑制され、魚類の腎臓が非活性化成熟 T リンパ球の貯蔵庫として機能し、脾臓などの他の組織に移動し活性化されると考えられた。この仮説は、同系のギンブナを用いた CFSE により蛍光染色したリンパ球の移入実験によって強く支持された。

我々の研究から、コイやキンギョの腎臓においても CD3 $\epsilon$  の発現が認められなかったことから、この現象は他のコイ科魚類においても生じると考えられる（データ未表示）。一方、FCM 法による組織中における CD3 $\epsilon$  タンパク質の発

現解析は、いくつかの魚種において報告されており、ニジマス(Koppang et al., 2010; Boardman et al., 2012) およびヒラメ(Xing et al., 2017)の腎臓リンパ球中に CD3  $\epsilon$  陽性細胞が検出され (10-40%)、コイ科魚類の腎臓における結果と一致しなかった。免疫応答に関しては、魚類生理学における種特異的差異の存在が報告されている。例えば、紫外線 B (UVB) 照射はコイの末梢血における呼吸バーストおよび細胞傷害活性を著しく高めたが、頭腎では抑制的に働いた。一方、ニジマスの呼吸バーストは、最高用量の UVB による曝露後にのみ影響を受けた。これらの現象は、魚種ごとに紫外線による感受性が異なることを意味する (Maekkula et al., 2017)。大西洋タラは、CD4、MHC クラス II および、MHC クラス II の作製や輸送に関与するインバリアント鎖をコードする遺伝子を欠いている (Star et al., 2011)。しかし、大西洋タラは自然条件下で特に病気に罹りやすいわけではない (Pilstrom et al., 2005)。その代わりに、大西洋タラは多くの MHC クラス I 遺伝子と、独自に発達した Toll-like receptor (TLR) 遺伝子を有し、その結果真骨魚類において最も多くの TLR が検出されている。このように、魚類の免疫系は、種間で非常に多様性に富んでいる。従って、ギンブナと他魚種間の腎臓における CD3  $\epsilon$  タンパク質発現の差異は、種間の相違に起因すると考えられる。

結論として、CD4-1 および CD8  $\alpha$  陽性 T 細胞は、CD3  $\epsilon$  mRNA を発現するが、ギンブナの腎臓では CD3  $\epsilon$  タンパク質の発現は認められず、TCR/CD3 複合体の発現の欠如を示唆している。しかし、腎臓における CD4-1 および CD8  $\alpha$  陽性細胞は、24 時間培養後に CD3  $\epsilon$  タンパク質を発現するようになる。また、腎臓リンパ球は、同じクローンに属するレシピエント個体に移入された場合、脾臓や末梢血において CD3  $\epsilon$  タンパク質を発現する。ギンブナの腎臓における CD3  $\epsilon$  タンパク質発現の抑制機序は不明であるが、これらの所見は、CD3  $\epsilon$  の発現が腎臓において抑制され、腎臓が休止成熟 T リンパ球の貯蔵庫としての役割を果たすこ

とを示唆している。



表 3 解析に用いたプライマー

Primer name	Sequence(5'→3')	Accession No.
cDNA cloning		
<i>gcd3eF1</i>	GAAGCCGGAAAAGATGTCAG	
<i>gcd3eF2</i>	CAGTGAAACCGAAGAACAGC	
<i>gcd3eR1</i>	GGTTTGGGGGACGAGGAG	
<i>gcd3eR2</i>	TCTCATAGTCCGGGTTTGG	
<i>gcd3eR3</i>	GAGTCTGAGTGTTTCAGTTTTCATA	
<i>gcd3e-CDS F</i>	TGTCTTCAGGACGATACAGAACC	
<i>gcd3e-CDS R</i>	CCCTATGAATCACCAGAGTTTGA	
<i>gcd3e-del-TM-F</i>	TGTTCTGCCAGAAACAGTGACAG CAAACC	
<i>gcd3e-del-TM-R</i>	TCCGCTCAACTCATAGCAGTTCTC ACAC	
Eukaryotic expression		
<i>gcd3e-rec F</i>	CATATGATCTGCACTGGAGGAGACA ATAGGGTAG	
<i>gcd3e-rec R</i>	CATATGCTACTTATTGAGGCCTGCGT ACAACCCATC	
Expression analysis		
<i>gef1aF</i>	ACCCCAAGGCTCTCAATCT	AB491676
<i>gef1aR</i>	TCAACGCTCTTGATGACACC	
<i>gcd3eF</i>	CTGCTATGAGTTGAGCGGAGTGAT	LC378416
<i>gcd3eR</i>	CTTCGGTTTGCTGTCACTGTTTCT	
<i>gtrcbF</i>	CCTGAAGCCCTCTGAAATCG	AB186399
<i>gtrcbR</i>	TGCTTCCAAGGCTCCATCTT	

<i>gzap70F</i>	TCCGAGAGAGAGAAGAATTTGGA	
<i>gzap70R</i>	CATTGCGTATTTCCCTGATTTGT	
<i>glckF</i>	CCATCCAGTCAAATACAGCAA	AB279594
<i>glckR</i>	CTTTCTCAAACCCAAGGTCATC	
In situ hybridization		
<i>gcd3e</i> probe-t7	TAATACGACTCACTATAGGGGAT GTCAGTGGAGAAGGAAA	
<i>gcd3e</i> probe-sp6	ATTTAGGTGACACTATAGAAGTC ATGTATATCTCTCAGTG	

---

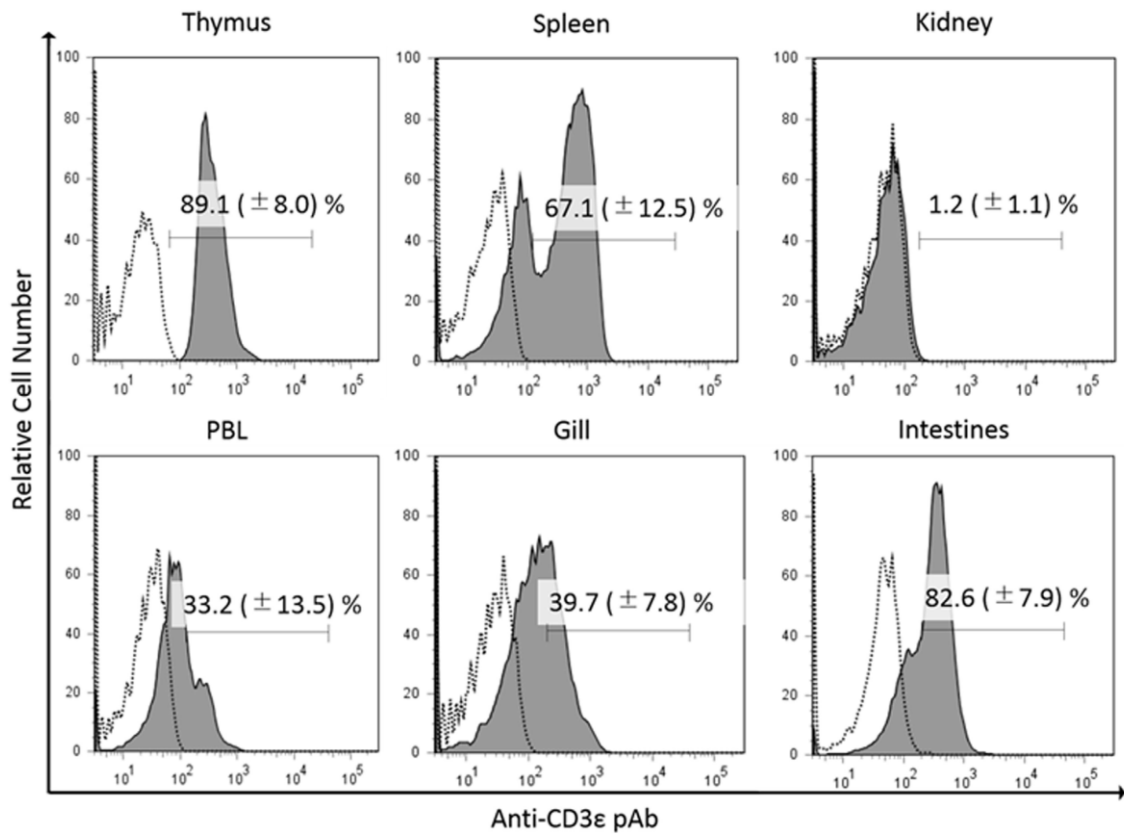


図 18 FCM 解析による各組織に由来するリンパ球画分におけるギンブナ CD3 $\epsilon$  陽性細胞の割合。

胸腺、脾臓、腎臓、鰓腸および末梢血由来の白血球を抗ギンブナ CD3 $\epsilon$  抗体で染色し、続いて AlexaFluor®647 ヤギ抗ウサギ IgG で染色した。FSC と SSC ドットプロット上のリンパ球分画にゲートティングした。点線はアイソタイプ抗体で染色された陰性対照を示し、灰色の影を有する黒い実線は抗ギンブナ CD3 $\epsilon$  抗体陽性細胞を示す。各図中の数字は平均値と標準偏差 (%) 示す。

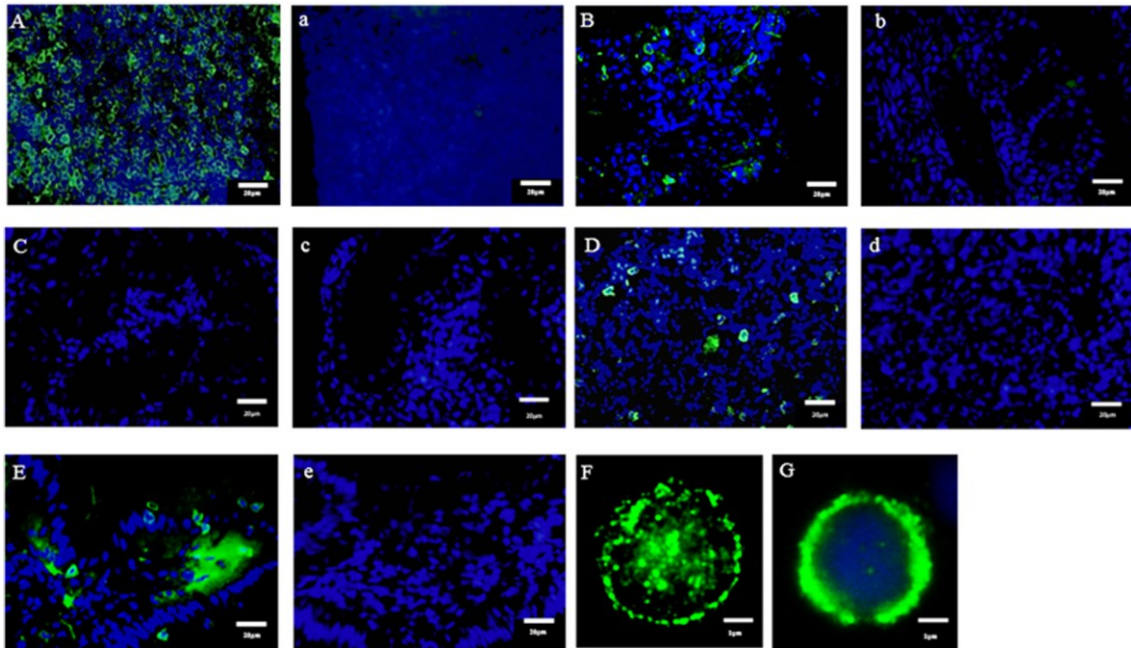


図 19 各組織における抗 CD3  $\epsilon$  陽性細胞の免疫組織染色像。

凍結切片を抗ギンブナ CD3  $\epsilon$  抗体 (A=胸腺、B= 鰓、C=腎臓、D=脾臓および E=腸管) またはアイソタイプ抗体 (a= 胸腺、b= 鰓、c= 腎臓、 d=脾臓および e=腸管) で染色し、続いて Alexa Fluor488 標識抗ウサギ IgG (H&L) (緑色) で染色した。核は DAPI (青色) を用いて染色した。スケールバー=20 $\mu$ m (A、B、C、D および E) を示す。抗体陽性細胞 (緑色) を高倍率 (F) で解析した。抗体陽性細胞 (緑色) を核染色 (青色) (G) と合成した。スケールバー=1 $\mu$ m (F および G)。

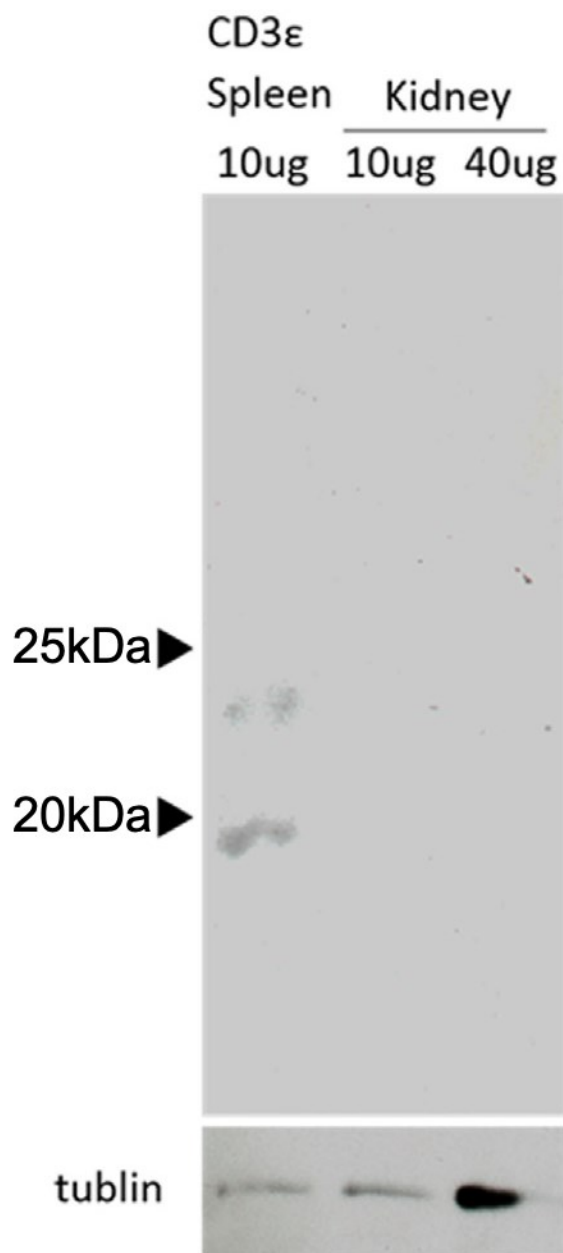


図 20 ウェスタンブロット法による、CD3 $\epsilon$  タンパク質の発現解析。  
腎臓および脾臓白血球由来のタンパク質サンプルの、抗 CD3 $\epsilon$  抗体によるウェスタンブロット解析を示す。両サンプルはチューブリンによって標準化した。

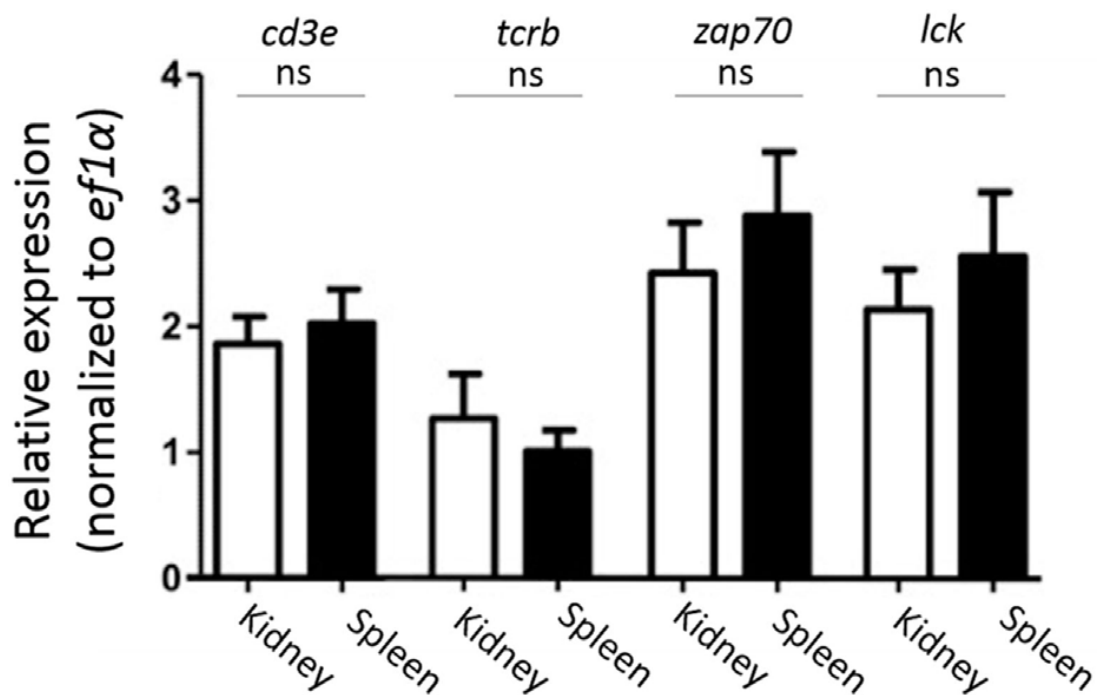


図 21 セルソーターを用いて分取した CD4-1 および CD8 $\alpha$  陽性リンパ球における、T 細胞関連遺伝子の発現。

セルソーターにより分取した T 細胞における *cd3e*、*tcrb*、*zap-70* および *lck* の mRNA 発現を、内部標準遺伝子 *efl1a* で標準化し、相対 mRNA 量を解析した。白いバーが腎臓より分取したサンプルを、黒いバーが脾臓より分取したサンプルを示す。統計解析は t 検定を用いて算出した (ns = 統計的有意差なし、 $P > 0.05$ )。

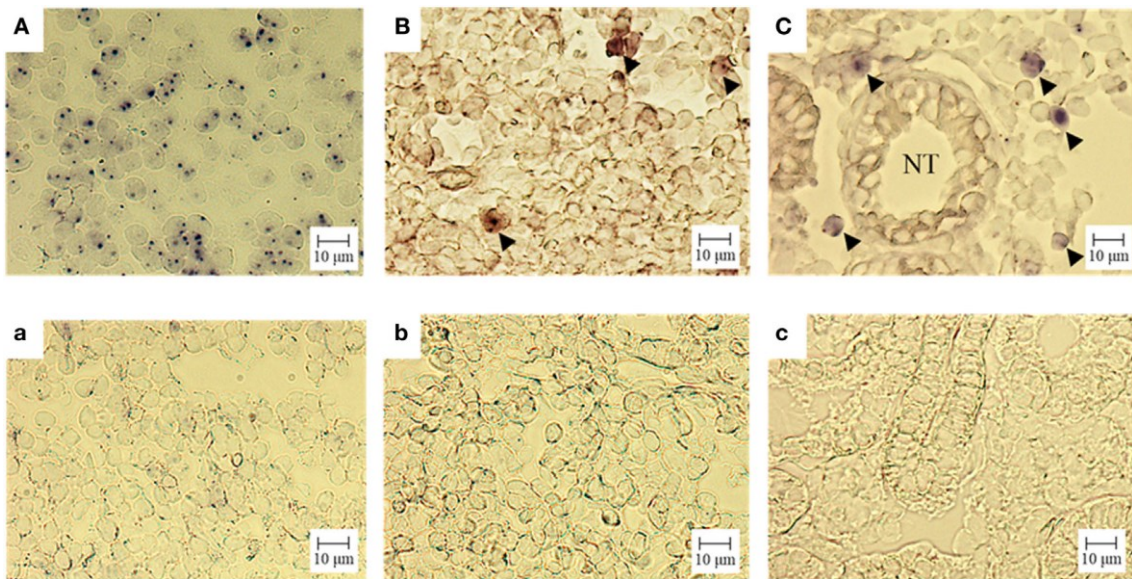


図 22 インサイチュ・ハイブリダイゼーション法による、各組織における CD3 $\epsilon$  の遺伝子発現。

凍結切片を、アンチセンス (A=Thymus、B=脾臓、C=Trunk-kidney)、または、陰性対照であるセンス (a=Thymus、b=Spleen、c=Trunk-kidney) プローブとハイブリダイズさせた。非特異的染色は観察されなかった (a、b、c)。CD3 $\epsilon$  mRNA のシグナルは胸腺、脾臓および腎臓において観察された (A、B および C)。CD3 $\epsilon$  発現細胞は、矢頭 (B、C) で示した。C の NT は腎尿細管を表す。スケールバー=10 $\mu$ m。

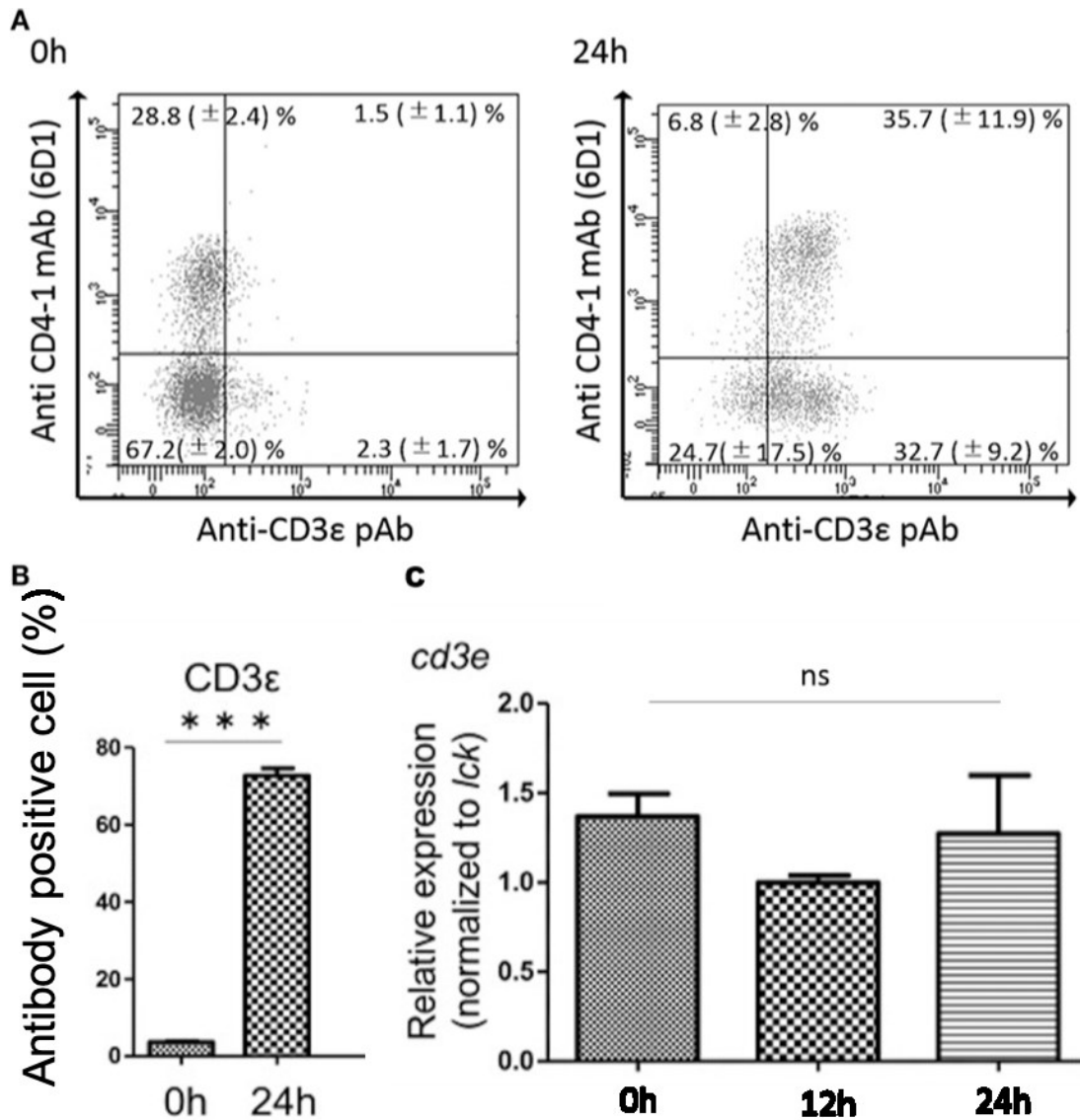


図 23 *in vitro* 培養による、腎臓リンパ球における CD3  $\epsilon$  および Zap-70 の発現動態解析。

(A) 腎白血球を 24 時間培養し、抗 CD3  $\epsilon$  抗体で免疫染色した。数値は抗体陽性細胞の平均値および標準偏差 (%) を示す。

(B) 抗 CD3  $\epsilon$  抗体陽性細胞の平均 (%) を計算した。統計的有意性は、t 検定を用いて計算した (\*\*\*)  $p < 0.005$  (ns、有意差なし、 $p > 0.05$ )。

(C)  $2 \times 10^6$  個の培養細胞から全 RNA を調製し、定量 RT-PCR に使用した。培



養前後で白血球中における T 細胞の割合が変化するため、T 細胞関連遺伝子の *lck* に対して標準化し、培養細胞における *cd3e* の相対 mRNA 発現量を解析した。一元配置 ANOVA を用いて有意差検定を行った (ns、有意差なし、 $p > 0.05$ )。

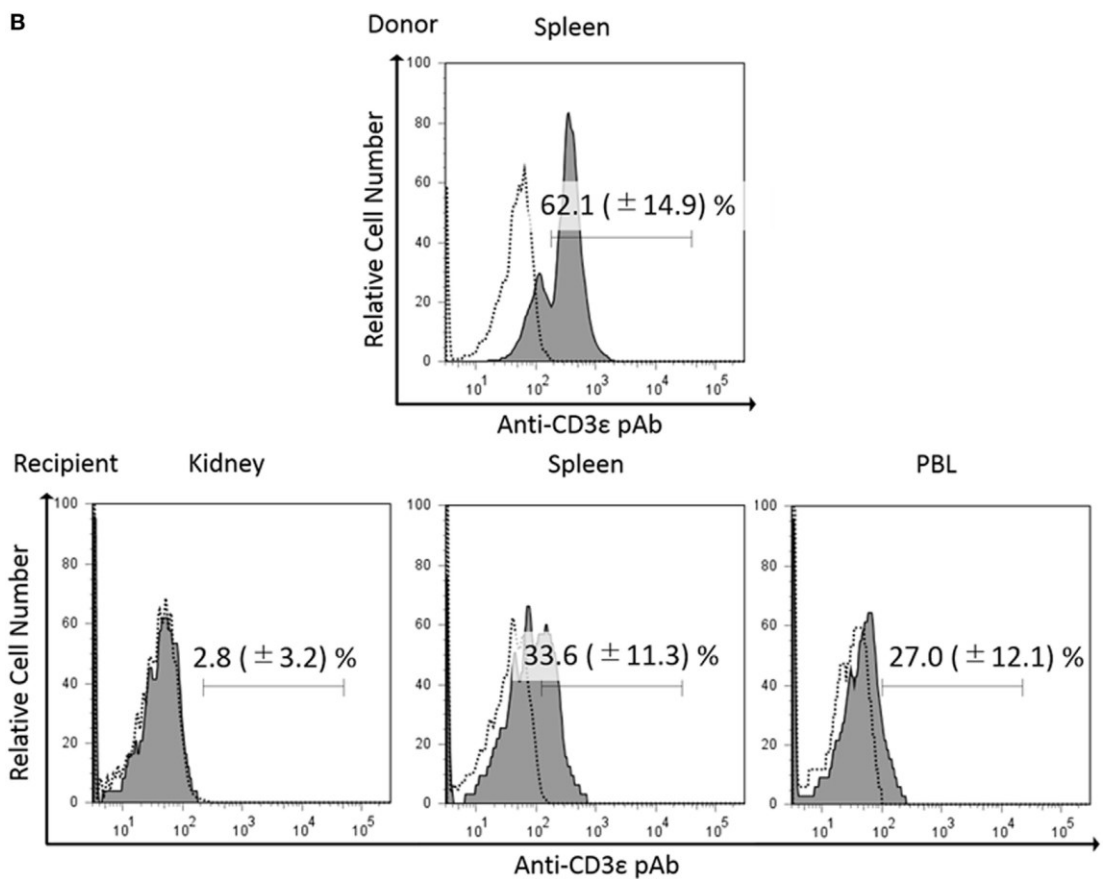
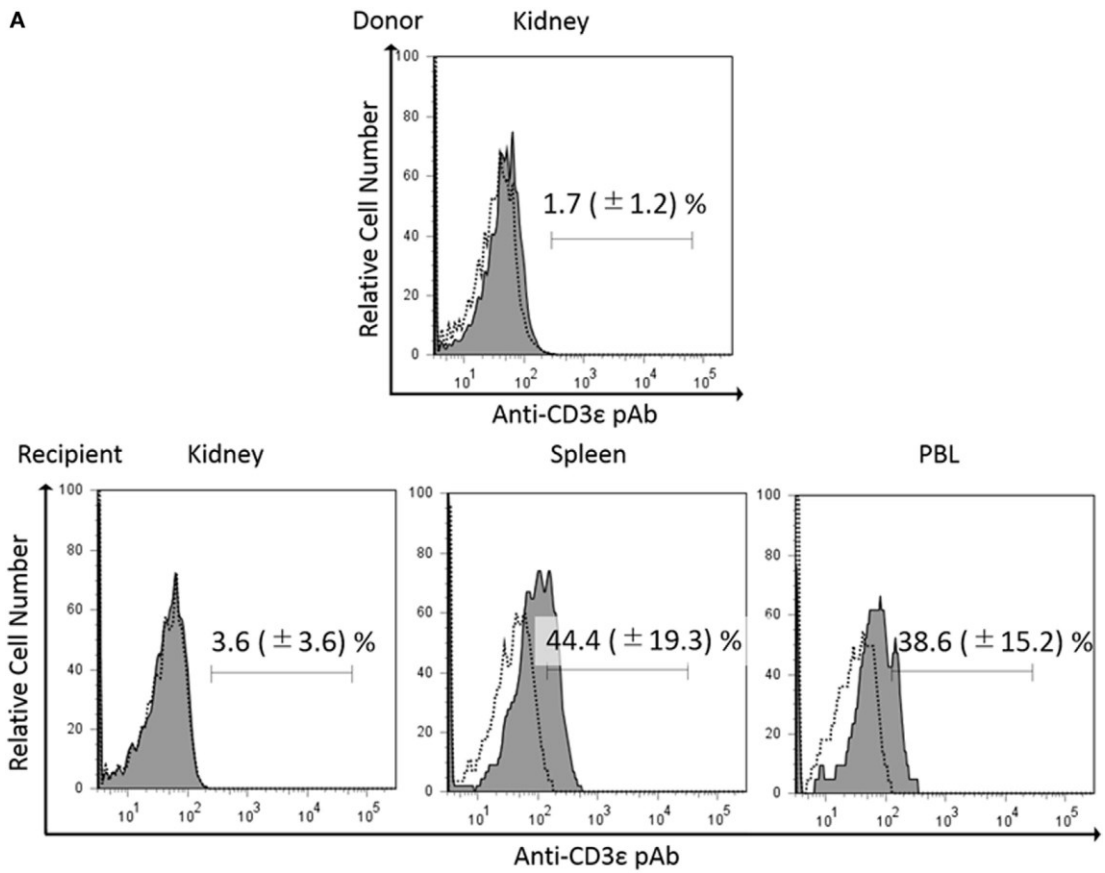


図 24 レシピエント組織に再分布したリンパ球における、CD3 $\epsilon$  の発現解析。

ドナー白血球を CFSE で蛍光染色し、FSC と SSC ドットプロット上でリンパ球分画にゲーティングし、CD3 $\epsilon$  の発現を投与前に FCM で解析した(A 上、B 上)。

投与の 24 時間後、レシピエント腎臓、脾臓および PBL 由来のリンパ球を FSC と SSC ドットプロット上でリンパ球分画にゲーティングした。ヒストグラムは、ドナー由来の抗 CD3 $\epsilon$  抗体および CFSE に二重陽性細胞の (%) を示す。点線はアイソタイプ抗体で染色された陰性対照を示し、灰色の影を有する黒い実線は抗ギンブナ CD3 $\epsilon$  抗体陽性細胞を示す。各図中の数字は平均値と標準偏差を示す。

(A 下) 腎臓由来のドナー白血球をレシピエントに投与した。(B 下) 脾臓由来のドナー白血球をレシピエントに投与した。

## 第5章

### 総括

本研究では、真骨魚類の T 細胞の分化・成熟機構を解析するため、未成熟 T 細胞を豊富に含む胸腺と、真骨魚類の造血器官であり成熟 T 細胞も豊富に含む腎臓の機能に着目し、その機能的な相違点を哺乳類と比較解析した。まず、Aire 欠損ゼブラフィッシュを用いた真骨魚類の胸腺の機能解析では、胸腺における自己抗原遺伝子の発現が低下したことや、一部の個体で自己免疫疾患様の症状が認められたことから、ゼブラフィッシュの胸腺も哺乳類と同様に、一次リンパ器官として Aire を中心に T 細胞教育を行っていることが明らかになった。次に、ギンブナを用いた真骨魚類の腎臓の機能解析では、ギンブナの腎臓は T 細胞の CD3 $\epsilon$  タンパク質の発現を低下させる機能を有し、哺乳類の免疫器官には認められない、独自の進化を遂げていることが明らかになった。

### 抗ギンブナ CD4-1 および CD8 $\alpha$ 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が、抗体を始めとする免疫学の研究ツールは少なく、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 $\alpha$  をはじめとする T 細胞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、第 2 章では、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リンパ球に交差するか検討した。

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 および CD8 $\alpha$  (zCD4-1、zCD4-2 および zCD8 $\alpha$ ) 分子を強制発現させた後、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、ゼブラフィッシュのリンパ球中における CD4-1 および CD8  $\alpha$  陽性 T 細胞と、抗ギンブナ CD4-1 抗体または抗ギンブナ CD8  $\alpha$  抗体との交差反応性を FCM 法により解析を行った。その結果、ゼブラフィッシュ腎臓リンパ球分画において、CD4-1 および CD8  $\alpha$  陽性細胞がそれぞれ  $11.1 \pm 1.5\%$  および  $7.2 \pm 2.1\%$  認められた。各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ところ、CD4-1 陽性細胞は *cd4-1*、*cd4-2* および T cell receptor alpha-chain (*tcrac*) を、CD8  $\alpha$  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 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。

### **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**

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。また、6 ヶ月齢の Aire 欠損ゼブラフィッシュにおいて、組織学的観察により顕著な自己免疫疾患は認められなかったが、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浸潤していることが確認された。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、ほとんどの自己抗原遺伝子の発現が低下

していることが明らかになった。このことから、胸腺で負の選択が正常に起きず、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認められたと考えられた。また、Aire 欠損ゼブラフィッシュでは、同じく 10 ヶ月齢を過ぎた成熟個体では抗酸菌に感染する個体が多いことが、チールネルゼン染色から明らかになった。さらに、胸腺において CD4-1 および CD8 $\alpha$  陽性 T 細胞の分布を FCM 法により解析したところ、野生型の胸腺において CD4-1 および CD8 $\alpha$  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 および CD8 $\alpha$  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。このことから、胸腺における T 細胞の成熟異常により機能が低下し、易感染性を示したと考えられた。以上の結果から、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。

### 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 $\epsilon$ の特異な発現機構の解明

CD3 $\epsilon$  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 $\epsilon$  抗体を用いた FCM 解析では、腎臓中に CD4-1 や CD8 $\alpha$  陽性 T 細胞が認められたが、抗 CD3 $\epsilon$  抗体陽性細胞は認められなかった。一方、脾臓、胸腺および末梢血などから分取した T 細胞からは、抗 CD3 $\epsilon$  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 $\epsilon$  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、遺伝子およびタンパク質レベ

ルによる CD3 $\epsilon$  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 $\epsilon$  の特異な発現機構の解明を試みた。

腎臓における CD3 $\epsilon$  の発現をタンパク質レベルで更に評価するため、免疫組織学的染色およ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 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 $\epsilon$  タンパク質は検出されなかった。一方、腎臓における CD3 $\epsilon$  の発現を遺伝子レベルで解析するため、定量 PCR およびインサイチュハイブリダイゼーションを行った。その結果、腎臓においても脾臓などの T 細胞と同様に CD3 $\epsilon$  mRNA 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 $\epsilon$  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、腎臓環境の影響を調べるため、腎臓から得た T 細胞を 24 時間培養した後に FCM 解析を行ったところ、腎臓 T 細胞においても CD3 $\epsilon$  タンパク質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 $\epsilon$  タンパク質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 $\epsilon$  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、CD3 $\epsilon$  タンパク質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 $\epsilon$  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。



本研究を通して、Aire 欠損ゼブラフィッシュでは、胸腺で自己抗原遺伝子の発現が低下し、一部の個体では自己免疫疾患様の症状を示した。さらに、抗酸菌に対して易感染性を示し、胸腺 T 細胞における CD4-1 や CD8 $\alpha$  の発現低下が考えられた。このことから、ゼブラフィッシュでは哺乳類と同様に、胸腺が一次リンパ器官として Aire を中心に 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、ギンブナの腎臓では TCR/CD3 複合体を構成する CD3 $\epsilon$  タンパク質の発現を、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 $\epsilon$  は T 細胞の活性化に関与しているため、ギンブナで認められたこの現象は、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の抑制する、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。

真骨魚類は、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。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。一方、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。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜った日本大学大学院獣医学研究科魚病/比較免疫学研究室の森友忠昭 教授、片倉文彦 助教、中西照幸 上席研究員に心より感謝申し上げます。また、本論文の厳密なる校正を賜りました日本大学生物資源科学部獣医学科の杉谷博士 教授、日本大学生物資源科学部応用生物科学科の高橋恭子 教授並びに、日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科の間野伸宏 准教授に謹んで感謝いたします。さらには、実験の補助をしてくださった魚病/比較免疫学研究室の宮前二郎氏、岡野雅春氏、西谷広平氏をはじめ同研究室の諸氏並びに日本大学動物医科学研究センターの大学院生の皆様には深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり直接の御指導を賜りました日本大学生物資源科学部応用生物科学科 研究員の藪健史 博士、ペンシルベニア大学獣医学大学院（アメリカ）ポストドクターの柴崎康宏 博士、水産研究・教育機構 増養殖研究所の松浦雄太 博士には心より厚く御礼申し上げます。また、御助言および研究手法・材料を提供してくださった日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科の難波亜紀 博士に心より感謝致します。

最後に、大学院博士課程への進学を応援いただき、終始温かく見守り、支え続けてくれた家族に心から感謝致します。

## 参考文献

- Ahmadi M, King JW, Xue SA, Voisine C, Holler A, Wright GP, Waxman J, Morris E and Stauss HJ. 2011. CD3 limits the efficacy of TCR gene therapy in vivo. *Blood*. 118, 3528–3537.
- Anderson MS, Venzani ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D.. 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*. 298, 1395-1401.
- Araki K, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y. 2005. Characterization and expression analysis of CD3 $\epsilon$  and CD3 g/d in fugu, *Takifugu rubripes*. *Immunogenetics*. 57, 158–163.
- Asano, M, M Toda M, N Sakaguchi N, S Sakaguchi S. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med*. 184(2), 387-396.
- Bjorses P, Halonen M, Palvimo JJ, Kolmer M, Aaltonen J, Ellonen P, Perheentupa J, Ulmanen I, Peltonen L. 2000. Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein. *Am J Hum Genet*. 66, 378-392.
- Boardman T, Warner C, Ramirez-Gomez F, Matrisciano J, Bromage E. 2012. Characterization of an anti-rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) CD3 $\epsilon$  monoclonal antibody. *Vet Immunol Immunopathol*. 145, 511–515.
- Breart B, Bouso P. 2006. Cellular orchestration of T cell priming in lymph nodes. *Curr Opin Immunol*. 18, 483–490.
- Brodeur JF, Li S, da Silva Martins M, Larose L, Dave VP. 2009. Critical and multiple

roles for the CD3epsilon intracytoplasmic tail in double negative to double positive thymocyte differentiation. *J Immunol.* 182, 4844–4853.

Chen X, Woiciechowsky A, Raffegerst S, Schendel D, Kolb HJ, Roskrow M. 2000.

Impaired expression of the CD3-zeta chain in peripheral blood T cells of patients with chronic myeloid leukaemia results in an increased susceptibility to apoptosis.

*Br J Haematol.* 111, 817–825.

Chen Z, Benoist C, Mathis D. 2005. How defects in central tolerance impinge on a deficiency in regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102, 14735-14740.

Dave VP. 2009. Hierarchical role of CD3 chains in thymocyte development. *Immunol Rev.* 232, 22–33.

Dijkstra JM, Somamoto T, Moore L, Hordvik I, Ototake M, Fischer U. 2006.

Identification and characterization of a second CD4-like gene in teleost fish. *Mol Immunol.* 43, 410-419.

Edholm ES, Stafford JL, Quiniou SM, Waldbieser G, Miller NW, Bengten E, Wilson M.

2007. Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, CD4-like molecules. *Dev Comp Immunol.* 31, 172-187.

Fänge R. 1986. Lymphoid organs in sturgeons (Acipenseridae). *Vet Immunol*

*Immunopathol.* 12, 153–161.

Fischer U, Koppang EO, Nakanishi T, 2013. Teleost T and NK cell immunity. *Fish*

*Shellfish Immunol.* 35, 197-206.

Hayes SM, Shores EW, Love PE. 2003. An architectural perspective on signaling by the pre,  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell receptors. *Immunol Rev.* 191, 28–37.

Hugues S. 2010. Dynamics of dendritic cell-T cell interactions: a role in T cell outcome.

*Semin Immunopathol.* 32, 227–238.

- Humbert L, Cornu M, Proust-Lemoine E, Bayry J, Wemeau JL, Vantighem MC, Sendid B. 2018. Chronic mucocutaneous candidiasis in autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *Front Immunol.* 9, 2570.
- Kappes DJ, Tonegawa S. 1991. Surface expression of alternative forms of the TCR/CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88, 10619-10623.
- Kasheta M, Painter CA, Moore FE, Lobbardi R, Bryll A, Freiman E, Stachura D, Rogers AB, Houvras Y, Langenau D M, Ceol CJ. 2017. Identification and characterization of T reg-like cells in zebrafish. *J Exp Med.* 214, 3519-3530.
- Kobayashi I, Moritomo T, Ototake M, Nakanishi T. 2007. Isolation of side population cells from ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorffii*) kidney hematopoietic tissues. *Dev Comp Immunol.* 31, 696–707.
- Kobayashi I, Saito K, Moritomo T, Araki K, Takizawa F, Nakanishi T. 2008. Characterization and localization of side population (SP) cells in zebrafish kidney hematopoietic tissue. *Blood.* 111, 1131–1137.
- Koppang EO, Fischer U, Moore L, Tranulis MA, Dijkstra JM, Köllner B, Aune L, Jirillo E, Hordvik I. 2010. Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *J Anat.* 217, 728–739.
- Laing KJ, Hansen JD. 2011. Fish T cells: recent advances through genomics. *Dev Comp Immunol.* 35, 1282-1295.
- Laing KJ, Zou JJ, Purcell MK, Phillips R, Secombes CJ, Hansen JD. 2006. Evolution of the CD4 family: teleost fish possess two divergent forms of CD4 in addition to lymphocyte activation gene-3. *J Immunol.* 177, 3939-3951.
- Lange S, Bambir S, Dodds AW, Magnadottir B. 2004. An immunohistochemical study on complement component C3 in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus*

- hippoglossus L.*). Dev Comp Immunol. 28, 593-601.
- Langenau DM, Ferrando AA, Traver D, Kutok JL, Hezel JP, Kanki JP, Zon LI, Look AT, Trede NS. 2004. In vivo tracking of T cell development, ablation, and engraftment in transgenic zebrafish. Proc Natl Acad Sci USA. 101, 7369-7374.
- Lionakis MS. 2012. Genetic susceptibility to fungal infections in humans. Curr Fungal Infect Rep. 6, 11-22
- Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC 2003. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. Nat Immunol. 4, 350-354.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. Methods. 25, 402-408.
- Maekkula SE, Salo MH, Rikalainen AK, Jokinen EI. 2017. Different sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) to the immunomodulatory effects of UVB irradiation. Fish Shellfish Immunol. 21, 70-9.
- Matsuda M, Ulfgren AK, Lenkei R, Petersson M, Ochoa AC, Lindblad S, Andersson P, Klareskog L, Kiessling R. 1998. Decreased expression of signal-transducing CD3 zeta chains in T cells from the joints and peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. Scand J Immunol. 47, 254-262.
- Matsuura M, Takaoka N, Miyazawa R, Nakanishi T. 2017. A simple and non-invasive method for analyzing local immune responses *in vivo* using fish fin. Dev Comp Immunol. 74, 136-143.
- Miyazawa R, Matsuura Y, Shibasaki Y, Imamura S, Nakanishi T. 2018a. Cross-reactivity of monoclonal antibodies against CD4-1 and CD8 $\alpha$  of ginbuna crucian carp with lymphocytes of zebrafish and other cyprinid species. Dev Comp Immunol 80, 15-23.

- Miyazawa R, Murata N, Matsuura Y, Shibasaki Y, Yabu T, Nakanishi T. 2018b. Peculiar expression of CD3-epsilon in kidney of ginbuna crucian carp. *Front Immunol.* 9, 1321.
- Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, Krohn KJ, Lalioti MD, Mullis PE, Antonarakis SE, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N 1997. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet.* 17, 393-398.
- Nagasawa K, Takeuchi Y, Miwa M, Higuchi K, Morita T, Mitsuboshi T, Miyaki, K, Kadomura K, Yoshizak, G. 2009. cDNA cloning and expression analysis of a vasa-like gene in pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fish Sci.* 75, 71–79.
- Nakanishi T, Toda H, Shibasaki Y, Somamoto T. 2011. Cytotoxic T cells in teleost fish. *Dev Comp Immunol.* 35, 1317-1323.
- Nonaka S, Somamoto T, Kato-Unoki Y, Ototake M, Nakanishi T, Nakao M. 2008. Molecular cloning of CD4 from ginbuna crucian carp, *Carassius auratus Langsdorfii*. *Fish Sci.* 74, 341-346.
- Øvergård AC, Hordvik I, Nerland AH, Eikeland G, Patel S. 2009. Cloning and expression analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) CD3 genes. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 707–13.
- Piazzon M C, Savelkoul HFJ, Pietretti T, Wiegertjes GF, Forlenza M. 2015. Carp Il10 Has Anti-Inflammatory Activities on Phagocytes, Promotes Proliferation of Memory T Cells, and Regulates B Cell Differentiation and Antibody Secretion. *J Immunol.* 194, 187-199.
- Pilstrom L, Warp WG, Stromberg S. 2005. Why is the antibody response of Atlantic cod so poor? The search for a genetic explanation. *Fish Sci.* 71, 961–971.
- Pitt JM, Stavropoulos E, Redford PS, Beebe AM, Bancroft GJ, Young DB, O'Garra A. 2012. Blockade of IL-10 signaling during bacillus Calmette-Guerin vaccination

enhances and sustains Th1, Th17, and innate lymphoid IFN- $\gamma$  and IL-17 responses and increases protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 189(8), 4079-4087.

Prado-Garcia H, Aguilar-Cazares D, Meneses-Flores M, Morales-Fuentes J, Lopez-Gonzalez JS. 2008. Lung carcinomas do not induce T-cell apoptosis via the Fas/Fas ligand pathway but down-regulate CD3 epsilon expression. *Cancer Immunol Immunother.* 57, 325–336.

Press CMcL, Evensen Ø. 1999The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 309–318.

Ramiscal RR, Vinuesa CG. 2013. T-cell subsets in the germinal center. *Immunol Rev.* 252, 146–155.

Randelli E, Scapigliati G, Buonocore F. 2011. CD3 $\gamma/\delta$  in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): molecular characterization and expression analysis. *Results Immunol.* 1, 31-35.

Rovira-Clavé X, Angulo-Ibáñez M, Tournier C, Reina M, Espel E. 2016. Dual role of ERK5 in the regulation of T cell receptor expression at the T cell surface. *J Leukoc Biol.* 99, 143–152.

Sugimoto K, Hui SP, Sheng DZ, Nakayama M, Kikuchi K.. 2017. Zebrafish FOXP3 is required for the maintenance of immune tolerance. *Dev Comp Immunol* 73, 156-162.

Shang N, Sun XF, Hu W, Wang YP, Guo QL. 2008. Molecular cloning and characterization of common carp (*Cyprinus carpio* L.) TCR $\gamma$  and CD3 $\gamma/\delta$  chains. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 412–425.

Sikora E. 2015. Activation-induced and damage-induced cell death in aging human T



cells. *Mech Ageing Dev.* 151, 85–92.

- Somamoto T, Kondo M, Nakanishi T, Nakao M. 2014. Helper function of CD4<sup>+</sup> lymphocytes in antiviral immunity in gibel carp, *Carassius auratus langsdorffii*. *Dev. Comp. Immunol.* 44, 111-115.
- Star B, Nederbragt AJ, Jentoft S, Grimholt U, Malmstrøm M, Gregers TF, Rounge TB, Paulsen J, Solbakken MH, Sharma A, Wetten OF, Lanzén A, Winer R, Knight J, Vogel JH, Aken B, Andersen O, Lagesen K, Tooming-Klunderud A, Edvardsen RB, Tina KG, Espelund M, Nepal C, Previti C, Karlsen BO, Moum T, Skage M, Berg PR, Gjøen T, Kuhl H, Thorsen J, Malde K, Reinhardt R, Du L, Johansen SD, Searle S, Lien S, Nilsen F, Jonassen I, Omholt SW, Stenseth NC, Jakobsen KS. 2011. The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. *Nature.* 477, 207–210.
- Suetake H, Saha NR, Araki K, Akatsu K, Kikuchi K, Suzuki Y. 2006. Lymphocyte surface marker genes in fugu. *Comp Biochem Physiol. Part D Genomics Proteomics.* 1, 102-108.
- Sullivan C, Kim CH. 2008. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 341-350.
- Tang X, Qin Y, Sheng X, Xing J, Zhan W. 2017. Characterization of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and its response after immunization with formalin-inactivated *Edwardsiella tarda*. *Fish Shellfish Immunol.* 63, 220-227
- Toda H, Saito Y, Koike T, Takizawa F, Araki K, Yabu T, Somamoto T, Suetake H, Suzuki Y, Ototake M, Moritomo T, Nakanishi T. 2011. Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a teleost fish. *Dev*

Comp Immunol. 35, 650-660.

- Toda H, Shibasaki Y, Koike T, Ohtani M, Takizawa F, Ototake M, Moritomo T, Nakanishi T. 2009. Alloantigen-specific killing is mediated by CD8-positive T cells in fish. *Dev Comp Immunol.* 33, 646-652.
- Tokunaga Y, Shirouzu M, Sugahara R, Yoshiura Y, Kiryu I, Ototake M, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M. 2017. Comprehensive validation of T- and B-cell deficiency in rag1-null zebrafish: Implication for the robust innate defense mechanisms of teleosts. *Sci Rep.* 7, 7536.
- Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI. 2004. The use of Zebrafish to understand immunity. *Immunity.* 20, 367-379.
- van der Sar AM, Appelmelk BJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Bitter W. 2004. A star with stripes: zebrafish as an infection model. *Trends Microbiol.* 12, 451-457.
- Xing J, Ma J, Tang X, Sheng X, Zhan W. 2017. Characterizations of CD4-1, CD4-2 and CD8 $\beta$  T cell subpopulations in peripheral blood leucocytes, spleen and head kidney of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol Immunol.* 85, 155–65.
- Yabu T, Toda H, Shibasaki Y, Araki K, Yamashita M, Anzai H, Mano N, Masuhiro Y, Hnazawa S, Shiba H, Moritomo T, Nakanishi T. 2011. Antiviral protection mechanisms mediated by ginbuna crucian carp interferon gamma isoforms 1 and 2 through two distinct interferon gamma-receptors. *J Biochem.* 150, 635-648.
- Zapata AG, Chibá A, Varas A. 1996. Cells and tissues of the immune system of fish. In: *The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment.* (Iwama G, Nakanishi T, editors.) Academic Press, San Diego, pp. 1–62.