

論文の内容の要旨

氏名：西谷 広平

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題目名：コイ顆粒球の造血及び機能を制御する免疫関連サイトカインの研究

真骨魚類は哺乳類と同様、自然免疫と獲得免疫から成る高度な生体防御機構を具えている。このことは、哺乳類と真骨魚類の共通祖先の段階で、免疫システムの大枠が確立していた事を示している。一方、それら免疫システムの分子制御機構は、進化の過程で起きた種々の遺伝子突然変異により、多様性が生じている可能性がある。特に、真骨魚類は哺乳類等の四肢動物と分岐後に全ゲノム重複(WGD)を経験した為、哺乳類と相同な遺伝子に加え、それらの重複遺伝子を多く有している。免疫制御を司るサイトカインにおいても、真骨魚類は哺乳類と相同な遺伝子を複数有し、機能の一部が保存されている事が知られている。しかし、重複分子の機能分担の有無は不明である。また、魚類特有のサイトカイン遺伝子も報告されているが、それらの機能も不明である。

本研究では、真骨魚類サイトカインによる独自の免疫制御機構を明らかにするべく、コイ (*Cyprinus carpio*) の顆粒球の産生及び機能を制御するサイトカインの機能解析を行った。まず、好中球の産生及び活性化を担う顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) について遺伝子解析及び機能解析を行った。続いて、ヒトでは同一サイトカインファミリーに属し、好酸球及び好塩基球の産生を促すインターロイキン (Interleukin, IL)-5、IL-3、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) の3分子に関連する魚類特有の遺伝子を同定し、その機能解析を行った。

1. コイ好中球活性化因子の機能解析

哺乳類の顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、好中球の産生、遊走、活性化を促進するサイトカインである。真骨魚類の G-CSF 遺伝子は、約3億年前に起きた WGD の影響により、遺伝子重複によって生じた2つの遺伝子 (パラログ) として存在する事が知られている。本実験の対象としたコイは約1千万年前に WGD をさらにもう一度経験しているため、4種のパラログが存在する可能性がある。重複分子は進化の過程でその機能について保存、新規化、または消失といういずれかの運命を辿るが、魚類の G-CSF パラログの各分子における詳細な機能解析は行われていなかった。そこで、本研究では、コイの4つの G-CSF パラログの遺伝子発現様式を明らかにし、組み換えタンパク質を用いて造血活性、遊走活性及び活性酸素産生における作用を明らかにした。

コイのゲノムデータベースを探索した結果、4種の G-CSF パラログ (*g-csfa1*, *g-csfa2*, *g-csfb1* 及び *g-csfb2*) が哺乳類と相同な遺伝子の近傍に存在していた。分子系統解析の結果、コイ G-CSF パラログは、*g-csfa1* 及び *g-csfa2* と *g-csfb1* 及び *g-csfb2* がそれぞれ同一のクラスターに分類された。G-CSF パラログについて定量 PCR による発現解析を行った結果、*g-csfa1* と *g-csfa2* はほとんどの組織で高発現だったが、*g-csfb1* と *g-csfb2* は多くの組織で検出限界以下であった。続いて、種々の白血球集団における発現解析を行ったところ、全てのパラログは、他の細胞集団と比較し、マクロファージにおいて高い発現を示した。また、マクロファージにおいて、G-CSFa1 は G-CSFa2 より、G-CSFb1 は G-CSFb2 より有意に高発現していた。さらに、マクロファージを LPS 刺激した結果、*g-csfa1* と *g-csfa2* は5~6倍程度の発現上昇が認められたが、*g-csfb1* と *g-csfb2* では500倍以上もの発現上昇を示した。これらのことから、コイ G-CSF パラログは A グループと B グループに分類され、異なる発現様式を示した。即ち、A グループの G-CSF は組織において恒常的に発現し、B グループの G-CSF は免疫応答の際に発現するサイトカインであると考えられた。

コイ G-CSF の機能解析を行うため、A グループから G-CSFa1 組換え体を、B グループより G-CSFb1 組換え体をそれぞれ作製した。初めに、コイ G-CSF の造血活性を調べるため、コイのリンパ造血器官である腎臓

より白血球を回収後、密度勾配遠心法により分離した造血細胞を用いて、半固形培地を用いたコロニー形成試験を行った。G-CSFb1 は単独でコロニー形成を刺激し、形成されたコロニーは構成細胞における遺伝子発現様式と形態から、好中球前駆細胞由来であると考えられた。一方、G-CSFa1 単独ではコロニー形成が認められなかったが、G-CSFa1 と G-CSFb1 を両方添加した培養において、好中球/マクロファージ共通前駆細胞由来のコロニー形成が刺激された。続いて、コイ G-CSF の腎臓好中球に対する遊走活性試験を Boyden-chamber 法により行った結果、G-CSFa1 と G-CSFb1 は好中球に対して遊走活性を示し、その活性は G-CSFa1 よりも G-CSFb1 の方が高い傾向を示した。最後に、コイ G-CSF の活性酸素産生に対するプライミング作用を明らかにするため、呼吸バースト試験を行った。即ち、腎臓好中球をコイ G-CSF 存在下で 6 時間インキュベートし、Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) で染色後、PMA による活性酸素刺激を行った。DHR 123 は細胞内に取り込まれ、活性酸素産生時に蛍光性物質に酸化されるため、PMA 刺激後の好中球における平均蛍光強度について FACS 解析を行った。FACS 解析の結果、G-CSFa1 または G-CSFb1 で刺激した好中球集団は無刺激のものと比較し、高い蛍光強度を示した。さらに、G-CSFb1 は G-CSFa1 より有意に好中球のプライミングを刺激した。

以上より、コイの G-CSF は A グループと B グループに大別され、G-CSFa1 と G-CSFb1 の間で機能の分担が認められた。G-CSFa1 は種々の組織において、恒常的な遺伝子発現を示し、好中球/マクロファージ共通前駆細胞の増殖を刺激したことから、骨髄球系細胞を数的に維持する役割を持つことが示唆された。一方、G-CSFb1 は感染刺激時に発現し、好中球の産生、遊走及び活性化を強く刺激したことから、コイの自然免疫応答において主要な役割を担っていると考えられた。

2. コイ好塩基球産生因子の同定及び機能解析

ヒトの IL-3、IL-5、GM-CSF は、活性化 T 細胞から産生され、好酸球及び好塩基球の産生を促すサイトカインである。ヒトにおいてこれら 3 分子をコードする遺伝子は、いずれも第 5 染色体上において、Th2 サイトカインである IL-4 及び IL-13 の遺伝子の近傍に位置する。加えて、3 分子は全て共通受容体 βc とその下流の JAK-STAT5 を介してシグナル伝達を行うことから、同一遺伝子から派生したと考えられる IL-5 family サイトカイン群である。真骨魚類では、これら 3 分子と相同な遺伝子は発見されておらず、存在は不明であった。しかし、近年のゲノム解読技術革新によってゾウギンザメやガーといった真骨魚類以外の魚種でゲノムが解読された結果、IL-4 及び IL-13 の相同分子とされる IL-4/13 遺伝子の近傍に、IL-5 family サイトカイン様遺伝子 IL-5fam の存在が示された。

そこで本研究では、真骨魚類で初めてコイ IL-5fam を同定し、その生物活性を明らかにするため、遺伝子発現解析を行うとともに、組換えタンパク質を作製して、シグナル伝達経路、造血活性の検討及び増殖した細胞の性状解析を行った。

コイのゲノム情報を用いて IL-4/13 付近の遺伝子を調べた結果、IL-5fam 遺伝子はパラログ (IL-5fam1, IL-5fam2) として存在していた。また、分子系統解析の結果、コイの IL-5fam は哺乳類の IL-5、IL-3 及び GM-CSF と異なる、魚類 IL-5fam のクラスターに分類された。本研究では、IL-5fam1 について遺伝子発現解析及び組み換えタンパク質による機能解析を行った。IL-5fam1 について定量 PCR による遺伝子発現解析を行った結果、大腸菌死菌を投与したコイの腎臓組織において、非投与群と比較し、発現上昇が認められた。さらに、腎臓白血球を T 細胞マイトジェンであるフィトヘマグルチニンで刺激した結果、無刺激の細胞と比較し、*il-5fam1* の発現が 15 倍程度増強された。続いて、コイ IL-5fam1 の組み換えタンパク質を作製し、機能解析を行った。液体培地に腎臓造血細胞を播種し、様々な濃度の IL-5fam1 存在下で培養を行った結果、IL-5fam1 は 20 ng/ml の濃度で高い増殖活性を示した。続いて、腎臓造血細胞に対するコロニー形成試験を行った結果、IL-5fam1 は主に散在性の細胞から成るコロニー (Type1) の形成を促し、僅かに凝集細胞から成るコロニー (Type2) の形成も促した。コロニーを回収し、構成細胞の性状解析を行った結果、Type1 コロニーにおいて顆粒球様細胞が認められた。コイの顆粒球は好中球と好塩基球に分類されるため、それらの細胞と性状の比較を行った結果、Type1 コロニー細胞は、好塩基球と同様の染色性及び遺伝子発現様式を示し、透過型電子顕微鏡において好塩基球と類似した顆粒が観察された。一方、Type2 コロニーには顆粒球は認められず、マクロファージ系列の幼弱細胞から構成されていた。さらに、2 種類のコロニーはともに、 βc 遺伝子を発現していた。続いて、細胞外 βc 組換え体を用いて IL-5fam1 に対するコロニー形成阻害試験を行った。 βc 組換え体は濃度依存的にコロニー形成を阻害し、 βc を 100 ng/ml 以上添加した培養にお

いて、IL-5fam1 のみを添加した培養と比較し、コロニー形成が半数以下に阻害された。最後に、IL-5fam1 のシグナル伝達経路を明らかにするため、哺乳類 βc のシグナル伝達経路とされる JAK-STAT 経路の活性化について検討した。IL-5fam1 で 30 分刺激した腎臓造血細胞を回収し、細胞溶解液を Western-blotting に供したところ、STAT5 のリン酸化が認められ、当反応は JAK 阻害剤により阻害された。

以上の結果からコイ IL-5fam1 は、免疫刺激によって T 細胞から産生される機能的なサイトカインであり、腎臓造血細胞に作用して好塩基球の分化・増殖を促す事が明らかになった。一方、IL-5fam1 は βc を介して造血活性を示した。このことから、魚類の IL-5fam は哺乳類 IL-5family サイトカインと共通の形質を有する、3 分子と同一の分子から派生したサイトカインであると考えられた。

以上より、コイ G-CSF は好中球の産生、遊走及び活性化を制御すること、IL-5fam は βc 受容体を介して好塩基球の産生を制御することが明らかとなり、脊椎動物のサイトカインにおける本質的な生物活性の普遍性が示された。一方、WGD により生じた A と B の 2 グループの G-CSF は免疫学的に機能分担していること、また、IL-5fam は 3 分子に派生した哺乳類とは異なり祖先形質をそのまま残していることが示唆され、真骨魚類における免疫制御機構の特殊性の一端が示された。本研究の知見は、真骨魚類におけるサイトカイン研究の進展や、顆粒球が関与する自然免疫機構の深い理解に繋がる重要な成果である。これらの知見を応用する事で、今後、魚病における病態解明等、魚病対策への貢献も期待される。