

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：(主 査) 教授

森 友 忠 昭

(副 査) 教授

伊 藤 琢 也

(副 査) 教授

壁 谷 英 則

哺乳類と真骨魚類は共通の祖先を有するため、血球組成等の免疫システムには類似している。しかし、真骨魚類は約 4~5 億年前に哺乳類等の四肢動物の祖先と分岐した後、さらなる全ゲノム重複 (WGD) を経験したため、免疫システムの分子制御機構においては哺乳類等のそれとは異なる特殊性が存在している可能性がある。そこで、本学位論文では、真骨魚類における進化の独自性に着目し、重複分子や魚類特有の分子が存在する魚類サイトカインの機能解析を行うことで、魚類特有の免疫制御機構を明らかにした。本研究では、コイ (*Cyprinus carpio*) の顆粒球の産生および機能を制御するサイトカインについて、機能解析を行った。まず、哺乳類において好中球活性化因子として知られ、多くの魚種で重複分子の存在が明らかになっている、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およ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、好酸球およ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。本研究で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および機能解析を行い、魚類の重複サイトカインによる免疫制御機構を明らかにした。

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*, *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、A グループ (*g-csfa1*, *g-csfa2*) と B グループ (*g-csfb1*, *g-csfb2*) 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、A グループの G-CSF はほとんどの組織で高発現だったが、B グループの G-CSF は多くの組織で検出限界以下であった。また、全てのパラログは、哺乳類において G-CSF 産生細胞とされるマクロファージにおいて高い発現を示した。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。これらことから、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。半固形培地を用いたコロニー形成試験を行ったところ、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学的特徴から、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、高い活性酸素産生を示し、コイ G-CSF は好中球のプライミング作用を有することが明らかとなった。さらに、G-CSFb1 は G-CSFa1 より強力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、骨髓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、遊走およ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。

コイ好塩基球産生因子の同定および機能解析

ヒトの IL-3、IL-5、GM-CSF は、活性化 T 細胞から産生され、好酸球およ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 および 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-STAT 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、近年ゾウギンザメやガーといった真骨魚類以外の魚種で IL-5 family サイトカイン様遺伝子 IL-5fam の存在が示された。本研究では、真骨魚類のコイで初めて 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、造血活性の検討およ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、哺乳類の IL-4 と IL-13 の相同遺伝子と考えられる IL-4/13 付近の遺伝子を検索した結果、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 および 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および組換えタンパク質による機能解析を行った。

IL-5fam1 について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やマイトジェン刺激した腎臓白血球において発現上昇が認められた。特に、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 倍程度増強されたため、IL-5fam1 は免疫刺激時に活性化 T 細胞より産生されることが示唆された。

次に、コイ IL-5fam1 の組換えタンパク質を作製し、機能解析を行った。組換えコイ IL-5fam1 が液体培地上で、腎臓白血球に対する増殖活性を示したため、増殖細胞の性状解析を目的として、コロニー形成試験を行った。その結果、IL-5fam1 は主に散在性の細胞から成るコロニー (Type 1) の形成を促し、僅かに凝集細胞から成るコロニー (Type 2) 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、Type 1 コロニーにおいて好塩基球と同様の染色性および遺伝子発現様式を示す顆粒球が認められた。それらの顆粒球は、透過型電子顕微鏡において好塩基球と類似した顆粒が認められたため、Type 1 コロニーが好塩基球系列の前駆細胞由来であると考えられた。一方、Type 2 コロニーには形態観察では、顆粒球は存在せず、幼若な細胞のみが認められた。また、遺伝子発現解析では、マクロファージ系列のマーカーを発現した。そのため、Type 2 コロニーはマクロファージ前駆細胞に由来することが示唆された。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。

IL-5fam1 が βc と相互作用を示すかを明らかにするため、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。その結果、 βc 組換え体は濃度依存的にコロニー形成を阻害した。また、IL-5fam1 の腎臓白血球におけるシグナル伝達経路を検討したところ、

JAK-STAT 経路を活性化していることが明らかになり、IL-5fam は哺乳類と同様に βc を介して JAK-STAT 経路を介したシグナル伝達経路を行うことが明らかになった。

このような結果からコイ 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、腎臓白血球に存在する造血細胞に作用して好塩基球の分化・増殖を促すことが明らかになった。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、本研究の成果により、コイ G-CSF は好中球の産生、遊走およ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。これらの研究は今後、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。

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

令和 4 年 2 月 22 日