

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860750

氏名

柴崎 康宏

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ペンシルバニア大学 （国名： 米国 ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
魚類粘膜免疫応答における T 細胞と B 細胞の協調作用
3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 20 日
4. 受入機関名及び部局名
ペンシルバニア大学 獣医学部
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可）**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【研究の目的】

魚類は皮膚や鰓などの粘膜組織で外界と接しており、病原体の主要な侵入経路となっている。高等脊椎動物では、細菌や寄生虫などの感染時にはリンパ節や粘膜関連リンパ組織等のリンパ濾胞（胚中心）において、CD4+ヘルパーT細胞とB細胞の相互作用により、獲得免疫が活性化し、病原体に特異的な抗体が産生されることで強力な免疫反応を示す。しかし、魚類はリンパ節を持たず、粘膜関連リンパ組織におけるリンパ濾胞が見つからないため、粘膜面におけるT細胞とB細胞の相互作用の場は不明である。

派遣先は、魚類特有の免疫グロブリンIgT およびIgMを産生するIgT+B細胞を発見した。さらに、粘膜指向性の感染症時には病原体がIgTで覆われ、粘液中の抗原特異的な抗体価もIgMでなくIgTが上昇することを示し、哺乳類におけるIgA、魚類粘膜免疫におけるIgTの重要性を証明してきた。現在では、魚類の免疫システムにおいては、全身免疫応答を担うIgM、粘膜免疫応答に特化したIgTという考えが広く受け入れられている。

近年、鰓の一次鰓弁間にT細胞の集塊を含む鰓内リンパ様組織（ILT: Intra-Branchial Lymphoid Tissue）の存在が報告された（文献6）。さらに、申請者は、ILTにIgT+B細胞が存在することを見出した。これにより、ILTがT細胞とB細胞の相互作用、IgTの産生誘導の場となる二次リンパ組織である可能性が示された。

本研究は、粘膜面での獲得免疫の誘導機構を明らかにするため、ニジマスを対象に、感染及びワクチン接種時の粘膜免疫応答におけるCD4+T細胞とIgT+B細胞の役割及び相互作用の解明に取り組んだ。

【研究の成果】

粘膜組織におけるCD4+T細胞とIgT+B細胞および全身免疫応答におけるCD4+T細胞とIgM+B細胞の相互作用、活性化の場を組織学的に探索することを主目的として以下の研究を行った。

1. フローサイトメトリーによる増殖の動態解析

T細胞やB細胞は特異的な抗原との遭遇時に活性化し、活発に増殖する。そこで、まず最初にT細胞やB細胞の活性化の動態を理解するため、感染後におけるCD4+T細胞、IgT+B細胞、IgM+B細胞の増殖を測定した。感染試験には養殖産業で大きく問題となっており、粘膜組織寄生性の寄生虫感染症である白点虫の感染モデルを用いた。

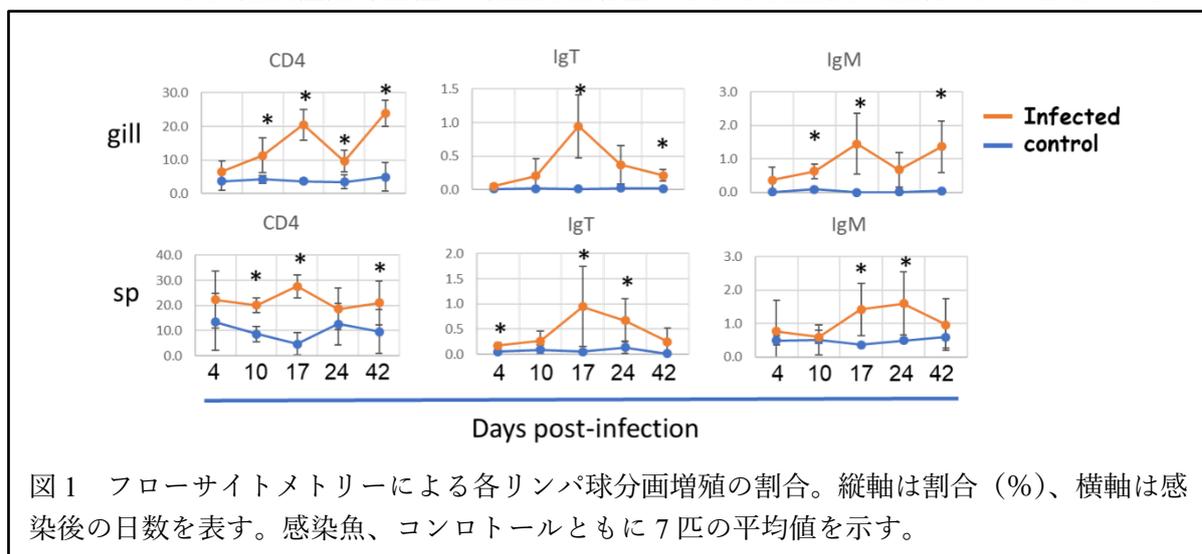


図1 フローサイトメトリーによる各リンパ球分画増殖の割合。縦軸は割合（%）、横軸は感染後の日数を表す。感染魚、コントロールともに7匹の平均値を示す。

その結果、感染 17 日後以降に CD4+T 細胞、IgT+B 細胞、IgM+B 細胞がコントロールと比較し、活発に増殖が認められた (図 1)。

2. 免疫組織学的な解析

フローサイトメトリーによる解析結果を受け、感染後 17 日を中心として、白点虫感染魚のサンプリングを行い、免疫組織学的手法により、T 細胞および B 細胞の増殖像を調べた。

その結果、感染後、2-3 週間後に脾臓において IgM+B 細胞が CD4+T 細胞と共に凝集塊を形成し、活発に増殖している像が認められた。さらに、その凝集塊はメラノマクロファージセンター (脾臓に散見される褐色色素を含有するマクロファージの集塊) を中心として形成されていることが明らかとなった (図 2)。なお、IgT+B 細胞は脾臓において増殖細胞は認められたものの、IgM+B 細胞のような増殖、凝集像は認められなかった。

さらに T 細胞依存性抗原として広く用いられている、DNP-KLH を投与した魚についても同様の結果が得られた。

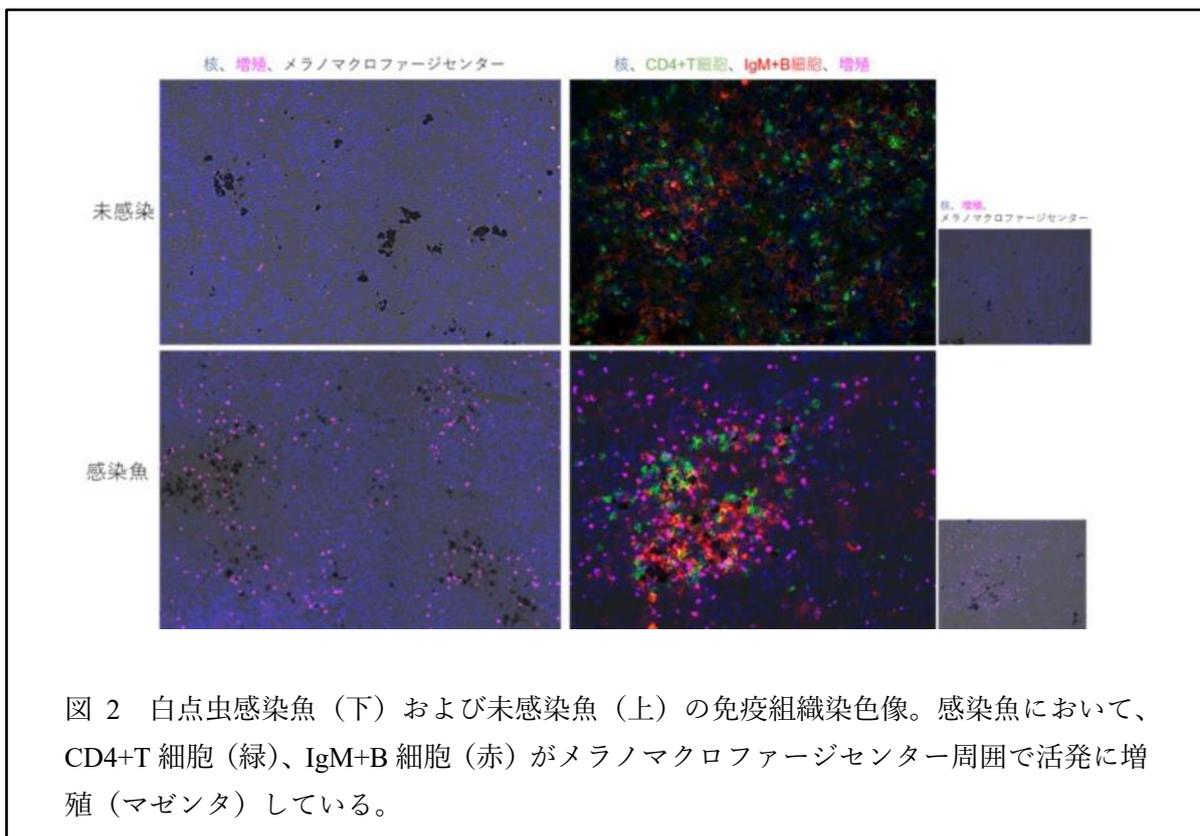


図 2 白点虫感染魚 (下) および未感染魚 (上) の免疫組織染色像。感染魚において、CD4+T 細胞 (緑)、IgM+B 細胞 (赤) がメラノマクロファージセンター周囲で活発に増殖 (マゼンタ) している。

3. IgM のレパトア解析

本研究以前から、メラノマクロファージセンターは、浸漬暴露や腹腔投与した蛍光色素や墨汁が検出される等の報告から、外来抗原の取り込み場所としての可能性が示唆されていた。哺乳類においては、液性免疫活性化の初期段階における重要な反応として、胚中心において抗原を特異的に認識する B 細胞がクローン増殖することが挙げられる。魚類においては、脾臓のメラノマクロファージセンターが胚中心機能を持ちえるかどうかを調べた。具体的には、白点虫感染および DNP-KLH 投与魚、コントロール魚の脾臓から Laser Capture Microdissection を用いて、メラノマクロファージセンター周囲に形成される濾胞様構造を回

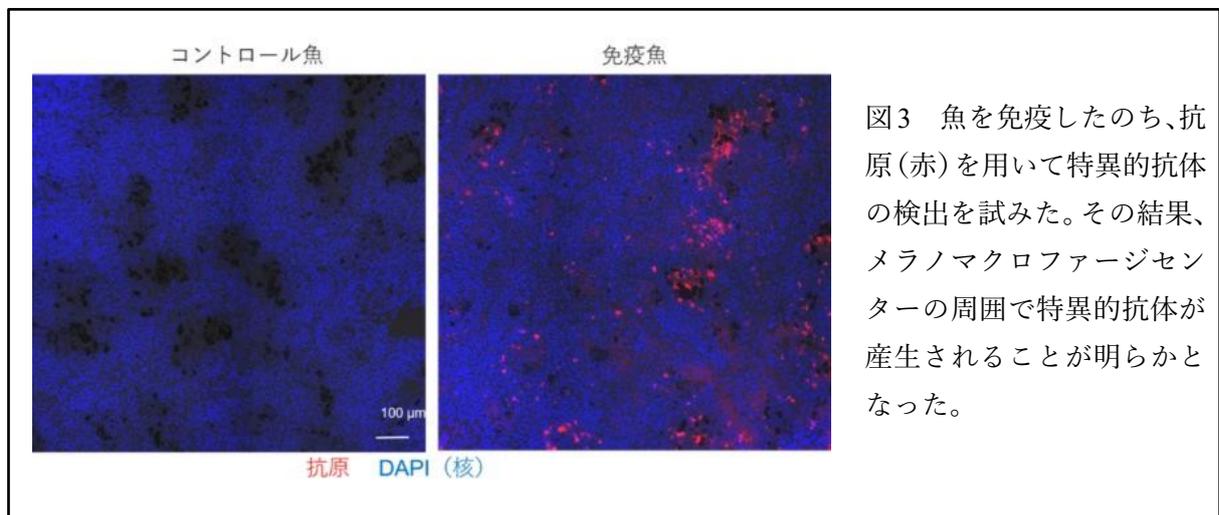
収し、RNA を抽出後、次世代シーケンサーを用いて、メラノマクロファージセンターに局在する IgM のクロノタイプを網羅的に解析した。

その結果、それぞれのメラノマクロファージセンターに局在する B 細胞は、一つあるいはごく少数の母細胞よりクローナルに増殖してきたことが明らかとなった。

4. 抗原特異的 B 細胞の検出方法の確立。

上記より、白点虫感染および DNP-KLH 免疫時に脾臓のメラノマクロファージセンターにおいて B 細胞の活性化が起きていることが明らかとなった。最後にこの増殖した B 細胞達が抗原に対して特異的な抗体を産生することができるかどうかを調べた。

その結果、抗原はメラノマクロファージセンターを中心とした場所に結合した (図 3)。さらに、IgM、CD4 に対する抗体と共染色したところ、IgM 陽性細胞が抗原を捉えていることが確認された。



以上の結果より、魚類において、免疫刺激時に、脾臓のメラノマクロファージセンターにおいて B 細胞の活性化が起こり、抗原特異的 B 細胞が誘導されることが明らかとなった。

一方、上述の研究を通して、脾臓においては IgT+B 細胞の凝集塊の形成は認められなかった。申請者はこれまでに鰓において感染時に増殖細胞が小さい凝集を形成することを確認している。今後、上記と同様の手法により、鰓における IgT+B 細胞の活性化、形質細胞産生の可能性について検討していく予定である。

以上の成果の一部は 2018 年 6 月の 14th Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology および、2019 年 6 月の 3rd International Conference on Fish & Shellfish Immunology にて発表した。また、現在論文執筆中である。