

## 博士論文要約 (Summary)

平成 28 年入学

連合農学研究科農水圏資源環境科学専攻

氏 名 松本 萌

タイトル	Interleukin-12 を指標とした魚類の細胞内寄生細菌感染症に対する細胞性免疫誘導型ワクチンの開発
------	---

キーワード (Interleukin-12) (ブリ類養殖) (細胞性免疫)

### 序論

ブリ類養殖に発生する細胞内寄生細菌感染症(ノカルジア症およびミコバクテリウム症)は近年、経済的被害が最も報告されている疾病である。感染すると腹水の貯留や臓器の癒着、結節の形成等が見られ、このような症状はすべて外観症状を示すことなく進行する。さらに薬剤による治療も結節内部には行き届きにくく困難であるため、ワクチンによる予防が強く求められている。現在、水産用ワクチンとして認可されているワクチンのほとんどは、生菌をホルマリンで不活性化した「不活化ワクチン」である。この不活化ワクチンは、宿主の液性免疫(B細胞による抗体を主体とした免疫応答)を強く誘導する一方で細胞性免疫(感染した細胞を他細胞により直接破壊する免疫応答)の誘導が弱いことを特徴とする。細胞内に寄生する細菌に対しては細胞性免疫の強い誘導が必要であるが、現時点で実用可能な細胞性免疫誘導型ワクチンは存在していない。そこで本研究では、細胞性免疫に必須のサイトカインである Interleukin-12(IL-12)を指標として、カンパチのノカルジア症に対する細胞性免疫誘導型ワクチンの開発を試みた。

### 「第 1 章：カンパチ Interleukin-12 の遺伝子単離および機能解析」

#### (序論)

IL-12 は 35kDa のタンパク質(IL-12p35)と 40kDa のタンパク質(IL-12p40)のヘテロ二量体である IL-12p70 として機能するサイトカインである。マクロファージ、樹状細胞またはナチュラルキラー細胞より産生され、ナイーブヘルパーT細胞から 1型ヘルパーT細胞(Th1)への分化を促進する。活性化された Th1 は Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )を産生し、マクロファージや細胞障害性 T細胞を活性化させることで細胞性免疫を誘導する。魚類では様々な種で IL-12 が同定されており、これまでに 2 種類の IL-12p35 (p35a および p35b)と 3 種類の IL-12p40 (p40a、p40b および p40c)の存在が明らかになっている。しかしその機能については不明である。本章ではカンパチより 2 種類の IL-12p35 および 3 種類の IL-12p40 を単離し、それらの組み合わせである 6 種類の IL-12 組換え体 (rIL-12p35a/p40a、p35a/p40b、p35a/p40c、p35b/p40a、p35b/p40b および p35a/p40c)を用いて、カンパチにおける IL-12 の機能を明らかにした。

#### (材料および方法)

大西洋スズキ *Dicentrarchus labrax*、チャイロマルハタ *Epinephelus coioides*、オヒョウ

*Hippoglossus hippoglossus*、トラフグ *Takifugu rubripes* およびナイルティラピア *Oreochromis niloticus* の各 IL-12 アイソタイプの配列を参考に縮重プライマーを作製し、Rapid Amplification of cDNA End (RACE) 法を用いて 5 種類のカンパチ IL-12 (*p35a*、*p35b*、*p40a*、*p40b* および *p40c*) の全長配列を明らかにした。次いで得られた演繹アミノ酸配列を用いて多重配列比較および系統樹解析を行った。その後、リアルタイム PCR 用のプライマーを設計し、ノカルジア症原因細菌 *Nocardia seriolae* の生菌(LC) および死菌 (FKC) 添加時のカンパチ白血球における IL-12 アイソタイプの発現を調べた。次に、2 種類の IL-12<sub>p35</sub> と 3 種類の IL-12<sub>p40</sub> を互いに GS リンカーで結合し、昆虫細胞発現用ベクター pMIB に組み込み 6 種類の発現用コンストラクトを作製した。作製したプラスミドを昆虫細胞 High Five に遺伝子導入し、タンパク質の産生をウエスタンブロット法で確認した。その後、陰イオン交換クロマトグラフィーおよび Ni-NTA カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーで精製した。続いて精製した 6 種類のタンパク質を、細胞性免疫を誘導できない *N. seriolae* の FKC とともにカンパチの頭腎白血球に添加し、細胞性免疫誘導の指標として IFN- $\gamma$ 、抑制の指標として Interleukin-10 (IL-10) の遺伝子発現を調べた。さらにそれら 6 種類の rIL-12 を混合し、従来の FKC ワクチンに添加することで、細胞性免疫誘導型アジュバントとしての効果を検討した。

#### (結果および考察)

カンパチの IL-12<sub>p35a</sub> は 1,064 bp より構成され、211 アミノ酸残基をコードしており、IL-12<sub>p35b</sub> は 1,154 bp より構成され、204 アミノ酸残基をコードしていた。また得られた cDNA より演繹されるアミノ酸配列は p35a、p35b とともに立体構造の構成に必要なシステインや p40 との結合領域が他魚種やほ乳類と比較してよく保存されていた。さらに IL-12<sub>p40a</sub> は 1,370 bp より構成され 350 アミノ酸残基を、IL-12<sub>p40b</sub> は 1,420 bp より構成され 320 アミノ酸残基を、IL-12<sub>p40c</sub> は 1,718 bp より構成され 308 アミノ酸残基をそれぞれコードしており、いずれもシステインの保存が見られた。一方、IL-12<sub>p40b</sub> では p35 との結合領域の欠損が見られた。また LC および FKC 添加時の IL-12 アイソタイプの発現を調べた結果、LC 添加時には IL-12<sub>p35a</sub>、*p35b*、*p40a*、*p40b* および IFN- $\gamma$  の発現上昇が見られた一方で、FKC 添加時にはこれら遺伝子の発現上昇は見られず、IL-12<sub>p40c</sub> および IL-10 の発現上昇が見られた。また 6 種類の rIL-12 と *N. seriolae* の FKC を同時にカンパチ白血球に添加した結果、rIL-12<sub>p35a/p40a</sub>、*p35a/p40c*、*p35b/p40a* および *p35b/p40c* 添加時に IFN- $\gamma$  の上昇が見られた。一方、すべてのアイソタイプ添加時に IL-10 の抑制が見られた。これらの結果から、カンパチの IL-12 アイソタイプはすべて、細胞性免疫の誘導に関与している可能性が示された。さらに 6 種類の rIL-12 を混合し従来の FKC ワクチンに添加して接種したところ、攻撃試験後の生残率が 0% から 88% まで上昇した。このことから、rIL-12 は細胞性免疫誘導型アジュバントとして利用可能であることが示唆された。

## 「第 2 章：カンパチの Interleukin-12 発現調節機構の解明」

### (序論)

第 1 章の研究により、カンパチの IL-12 は細胞性免疫の誘導に関与していることが明らかになり、その組換えタンパク質は細胞性免疫誘導型アジュバントとしてワクチンに応用可能であることが示された。一方で組換えタンパク質の実用化は費用や技術の面から困難

---

であり、魚体内で効率よく IL-12 を産生させる方法を検討する必要があると考えられた。ほ乳類の IL-12 産生細胞は通常、恒常的に IL-12p35 を産生する。一方で IL-12p40 は外部からの刺激に応じて産生され、細胞内でこれら分子が結合することで機能的な IL-12p70 として産生される。IL-12p40 のプロモーター領域には多数の転写因子結合領域が存在しており、それら転写因子の活性化により IL-12p40 の産生は制御されている。魚類では、大西洋スズキやトラフグで IL-12 のプロモーター解析が行われており、IL-12p35 のプロモーター領域にはほ乳類で見られるような転写因子結合領域の集合が見られることが分かっている。そのため魚類の IL-12 は、ほ乳類と異なる調節機構により制御されていることが予想される。そこで本章では、カンパチの IL-12p35 の発現機構に着目し、IL-12p35 の発現が *N. seriolae* の LC では誘導される一方で FKC では誘導されない、その違いを明らかにすることでカンパチにおける IL-12 産生機構の解明を試みた。

#### (材料と方法)

プロモーターアッセイにより *IL-12p35a* の発現に関与する転写因子の特定を試みた。大西洋スズキやフグの知見を参考にカンパチの *IL-12p35a* より上流約 1000 bp をクローニングし、転写因子結合領域から *IL-12p35a* の発現に必要な転写因子を予想した。さらにそれら認識配列を欠損させたプロモーターコレクションを作製し、プロモーターアッセイ用のベクター pGL4.10 に組み込んだ。次いで各プラスミドとコントロールプラスミドをキンギョの線維芽細胞 GAKS に遺伝子導入し、6h 後にリポポリサッカライド (LPS)、ギンブナの IFN- $\gamma$ 1-1 組換え体 (rgIFN- $\gamma$ 1-1) およびその両方を添加した際の発光を比較した。さらに、LC および FKC 添加時のカンパチ白血球における転写因子の発現を調べ、*IL-12p35a* の発現傾向と比較した。次に、カンパチ白血球の貪食が転写因子および *IL-12p35a* の発現に与える影響を調べた。カンパチにおける IL-12 産生細胞と予想される顆粒球をセルソーターにより単離し、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D を添加することで貪食を抑制した。6h 後に LC を添加し、*IL-12p35a* の発現と転写因子の発現が貪食の抑制により変化するか調べた。さらに貪食後の LC の細胞内寄生による *IL-12p35a* 発現への影響を調べるため、細胞内寄生能を欠損させた exported-repetitive protein (erp) -like gene 欠損 *N. seriolae* を顆粒球に添加し、*IL-12p35a* 発現および転写因子の発現を LC 添加時と比較した。

#### (結果および考察)

プロモーターアッセイの結果、カンパチ *IL-12p35a* の発現には *Interferon-regulatory factor-1 (IRF-1)* の発現が必要であることが示唆された。さらに発現解析の結果、LC 刺激時の *IL-12p35a* の発現上昇と比例して、*Activator protein-1 (AP-1)* および *IRF-1* の発現が上昇したことから、*IRF-1* および *AP-1* が *IL-12p35a* の発現に関与している可能性が示された。次いで、これら転写因子 (*IRF-1* および *AP-1*) と *IL-12p35a* の発現がカンパチ顆粒球の貪食により誘導されるか調べたところ、貪食を抑制した試験区ではこれら分子の発現が抑制されていた。このことから、*IL-12p35a* の発現には顆粒球による生菌の貪食が必要であることが明らかになった。一方で、LC および FKC ともに貪食されていることが分かり、貪食後の細胞内寄生が *IL-12p35a* の発現に影響を及ぼしていることが予想された。そこで細胞内寄生を欠損させた *erp-L(-) N. seriolae* を用いて解析を行ったところ、*erp-L(-)* は LC および FKC と同様に貪食されたにも関わらず、貪食した細胞の *IL-12p35a* および転写因子の発現は上昇していないことが明らかとなった。そのため、*erp-L* を欠損させることにより生じた

---

菌体の変化、特に *erp-L* が保持している細胞壁の糖脂質層が宿主の *IL-12p35a* の発現に影響を与えていることが示唆された。

### 「第3章：細菌由来糖脂質の細胞性免疫誘導アジュバントとしての有効性評価」

#### (序論)

第1章および第2章の研究により、魚類の細胞性免疫誘導には *IL-12* が重要な役割を担っており、さらに菌体由来の糖脂質成分が魚類の *IL-12* 産生を誘導している可能性があることが明らかになった。本細菌 (*N. seriolae*) と同じく、細胞内寄生細菌である結核原因細菌 *Mycobacterium tuberculosis* は細胞の最外周部にミコール酸と遊離糖脂質であるトレハロースジミコレート (TDM) を保持している。TDM は宿主の自然免疫および細胞性免疫を誘導するが、その一方で肉芽腫の形成を誘導することが知られている。一方、このような菌体由来の糖脂質に対する免疫応答の知見は魚類では報告がない。しかし糖脂質により誘導される免疫応答の一つである肉芽腫の形成がノカルジア感染魚にみられることから、菌体の糖脂質に対する何らかの免疫応答が存在していることが予想される。そこで本研究では、免疫ツールが豊富に存在するギンブナ *Carassius auratus langsdorfii* を用いて、*Mycobacterium sp.*由来の糖脂質をアジュバントとして用いたときの免疫応答を調べた。さらに養殖魚への応用が可能であるか検討するため、*N. seriolae* 由来の糖脂質をカンパチにワクチネーションした時のノカルジア症に対するワクチン有効性を評価した。

#### (材料および方法)

クロロホルム/メタノール=2:1 溶液を用いて *Mycobacterium sp.*より総脂質を抽出後、アセトンを用いて糖脂質のみを濃縮した。薄層クロマトグラフィー (TLC) により濃縮した糖脂質を展開後、オルシノール硫酸を用いて染色をおこなった。次いでフォスファチジルコリンと濃縮した糖脂質を混合したリポソームを調整し、*Mycobacterium sp.*の FKC にアジュバントとして添加することでワクチンを作製した。クローンギンブナに①PBS、② *Mycobacterium* FKC、③FKC+リポソームおよび④FKC+リポソーム+糖脂質を腹腔内に接種後、1、2、7 日後に自然免疫の指標として Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、細胞性免疫の指標として IFN- $\gamma$ 、IL-12、液性免疫の指標として Interleukin-4/13 (IL-4/13) および凝集抗体価の測定を行った。さらに接種から 28 日後、各試験区から単離した細胞に *Mycobacterium sp.*のライセートを添加し、24h 後の IFN- $\gamma$  の発現を調べることで、遅延型過敏反応を調べた。次いで、菌体由来の糖脂質がワクチンアジュバントとして効果を示すか検討するため、*N. seriolae* から抽出した糖脂質を *N. seriolae* FKC に添加したものをカンパチに接種し、攻撃試験後の生残率を調べた。

#### (結果および考察)

TLC による解析の結果、*Mycobacterium sp.*には 2 種類の糖脂質が含まれていることが明らかになり、*Rf* 値から TDM とその前駆体であるトレハロースモノミコレート (TMM) であることが予想された。次に、遺伝子発現解析を行った結果、糖脂質を添加した FKC を接種したギンブナでは他の試験区と比較して、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  および IL-12 の有意な発現上昇が見られた。一方で液性免疫関連遺伝子 IL-4/13 の発現に変化は見られなかった。さらに凝集抗体価を調べたところ、FKC 接種区で最も高い値がみられ、糖脂質の添加によりその上昇が抑制された。また、28 日後に遅延型過敏反応を調べたところ、他試験区と比較

---

して糖脂質を接種した試験区では有意な *IFN- $\gamma$*  の発現上昇が見られた。このことから、*Mycobacterium* sp.由来の糖脂質は宿主の細胞性免疫を誘導することが予想され、アジュバントとして利用できることが示唆された。次いで、*N. seriolae* から抽出した糖脂質を接種したカンパチを用いて攻撃試験を行ったところ、FKC の単体接種では攻撃試験後の生残率が 24%であったのに対し、糖脂質を添加した FKC を接種した試験区では生残率が 54%であった。この結果から、菌体由来の糖脂質はカンパチのノカルジア症に対するワクチンアジュバントとして応用可能であることが示唆された。

### 総合考察

養殖魚に発生する細胞内寄生細菌感染症、特にノカルジア症およびミコプラズマ症は発生から 50 年以上経過しているにも関わらず、未だ有効な予防法が確立されていない。本研究では、このような疾病に対する防除策として、細胞性免疫を誘導可能なアジュバントを探索し、実用可能なワクチンの作製に初めて成功した。しかしながら依然として課題も残されている。特に休眠期に移行した原因菌による再発を防ぐことは、ワクチン開発を行う上で重要な課題となることが予想される。今後はこのような視点から新たな細胞性免疫誘導型ワクチンの開発を行うことが必要であると考えられる。