

サイトカインによる魚類免疫細胞の制御機構に関する研究

The cytokine regulation of immune cells in fish

宮崎大学農学工学総合研究科

生物機能応用科学専攻

是永 大樹

2013

目次

諸言	…1
第 1 章	
トラフグ単球におけるサイトカイン遺伝子の発現プロファイル	…2
1. 諸論	…2
2. 実験方法	…6
2-1. 供試魚	
2.2. 末梢血白血球 (PBLs) からの単球の単離	
2.3. 形態観察・フローサイトメトリーおよび 細胞マーカー遺伝子解析	
2.4. 免疫刺激時におけるトラフグ単球	
2.4.1. LPS, polyI:C および IMQ の <i>in vitro</i> 刺激	
2.4.2. 単球/マクロファージの細胞集団解析	
2.4.3. FCM を用いた貪食活性の測定	
2.4.4. Multiplex RT-PCR を用いたサイトカイン遺伝子の発現解析	
2.5. 統計学的解析	
3. 結果	…12
3.1. トラフグ単球の単離	
3.2. TLR アゴニストで刺激したトラフグ単球の活性	
3.2.1. 形態変化の観察	
3.2.3. 貪食活性	
3.3. 活性化単球におけるサイトカイン遺伝子の発現解析	
3.3.1. 炎症性 (<i>IL-1β</i> , <i>IL-6</i> , <i>IL-17AF-3</i> , <i>IL-18</i> , <i>IFN-γ</i> , <i>TNF-α</i> , <i>TNF-N</i>) と抗炎症 症 (<i>IL-10</i>) サイトカイン遺伝子の発現	
3.3.2. 制御性サイトカイン (<i>TGF-β1</i>) 遺伝子の発現	
3.3.3. 抗ウイルス性サイトカイン (<i>I-IFN</i>) の遺伝子発現	
3.3.4. 単球増殖因子 (<i>CSF-1b</i>) の遺伝子発現	

4. 考察	…23
4.1. トラフグ単球の単離	
4.2. TLR アゴニスト刺激によるトラフグ単球の活性化	
4.2.1. 形態変化	
4.2.2. 貪食活性	
4.3. 活性化単球におけるサイトカイン遺伝子の発現	
4.3.1. 炎症性・抗炎症性サイトカイン遺伝子の発現	
4.3.2. 制御性サイトカインの発現解析	
4.3.3. 抗ウイルス性サイトカインの発現解析	
4.3.4. 単球増殖因子の発現動態	
5. 小括	…32
第2章	
トラフグにおける Th17 サイトカインの分離・同定	…33
1. 諸論	…33
2. 実験方法	…36
2.1. <i>IL-17</i> ファミリー遺伝子の分離及び cDNA クローニング	
2.2. シンテニーおよび遺伝子構造解析	
2.3. 相同性および系統解析	
2.4. トラフグ <i>IL-17</i> ファミリー遺伝子における各組織発現解析	
2.5. 免疫賦活剤による <i>in vitro</i> 刺激	
2.6. 発現遺伝子の半定量解析	
3. 結果	…41
3.1. トラフグ <i>IL-17</i> ファミリーのクローニング	
3.2. アライメント解析および相同性解析	
3.3. <i>IL-17</i> ファミリーのゲノム構造解析	

3.4. <i>IL-17</i> ファミリーのシンテニー解析	
3.5. <i>IL-17</i> ファミリーの系統樹解析	
3.6. <i>IL-17</i> ファミリーの発現解析	
3.6.1. トラフグの各組織における <i>IL-17</i> ファミリーの発現	
3.6.2. 免疫賦活剤刺激によるトラフグの頭腎における <i>IL-17</i> ファミリーの発現 動態	
4. 考察	…56
5. 小括	…61
第3章	
サイトカインによるトラフグ $CD4^{+}T$ 細胞の制御機構	…62
1. 諸論	…62
2. 実験方法	…65
2.1. 供試魚	
2.2. 抗トラフグ $CD4$ 抗体 (anti- <i>Fugu</i> $CD4$ Ab) の作製および特異性の確認	
2.2.1. 抗体の作製およびアフィニティー精製	
2.2.2. 抗トラフグ $CD4$ 抗体 (anti- <i>Fugu</i> $CD4$ Ab) の特異性の確認	
2.3. 磁気細胞分取法 (MACS) によるトラフグ $CD4^{+}T$ 細胞の分取	
2.3.1. トラフグ PBLs からの T 細胞の純化	
2.3.2. MACS 法によるトラフグ $CD4^{+}T$ 細胞の分取	
2.4. トラフグ $CD4^{+}T$ 細胞におけるサイトカイン遺伝子の発現解析	
2.4.1. <i>in vitro</i> 免疫刺激	
2.4.2. マルチプレックス RT-PCR	
2.5. サイトカインによる Th 細胞分化誘導の検討	
2.5.1. 抗トラフグサイトカイン抗体の作製	

2.5.2. 大腸菌タンパク合成系による組換えサイトカインの作製	
2.5.3. 細胞内サイトカイン染色	
2.6. 統計学的解析	
3. 結果	…79
3.1. anti- <i>Fugu</i> CD4 Ab の特異性の確認	
3.2. トラフグ末梢血からの T 細胞の純化	
3.3. 分取したトラフグ CD ⁺ 細胞の特性	
3.4. マルチプレックス RT-PCR を用いたトラフグ CD ⁺ 細胞のサイトカイン遺伝子解析	
3.5. 抗トラフグサイトカイン抗体の特異性の確認	
3.6. 組換えサイトカインの作製	
3.7. CD4 ⁺ リンパ球における細胞内サイトカイン染色	
4. 考察	…98
5. 小括	…107
総括	…108
謝辞	…110
参考文献	…111

諸言

現在、ヒトやマウスを含め様々な動物の全ゲノム情報が明らかにされ、免疫応答に関与する遺伝子群の機能に関する研究が世界中で盛んに行われている。魚類においてもゼブラフィッシュやトラフグなどのゲノム情報が公開され、魚類免疫学の解明に利用されている。中でも魚類のサイトカインは数多くの研究者によって分離・同定されている。サイトカインは、主に免疫担当細胞より産生され、近傍または産生細胞自身に作用し、その後の免疫応答を誘起する。そのため、機能の解析を行うためには細胞レベルでの研究が不可欠となる。これまで、魚類におけるサイトカインの機能解析は、初代培養細胞を用いたものがほとんどで、少数細胞集団の産生するサイトカインの影響は無視されてきた。たとえ少数でも非常に高濃度のサイトカインを産生する細胞が存在した場合、それがその細胞集団全体のサイトカイン産生と誤認されるという可能性も考えられる。このように、魚類ではどのような細胞がどのサイトカインを産生しているか詳しく解析できておらず、哺乳類と比べると魚類の免疫細胞に関する研究は遅れている。しかしながら、近年になりフローサイトメーターのソーティング技術や磁気細胞分離法により魚類からも免疫関連細胞が分取されるようになった。分取した細胞の特性は、主に遺伝子レベルでの免疫関連因子の発現動態からの活性を予測しているため、魚類の免疫機能を十分に理解できるレベルには至っていない。

そこで本研究では、魚類免疫機構の解明を目的とし、トラフグ (*Takifugu rubripes*) を用いて魚類の免疫細胞とサイトカインによる免疫制御機構について検討した。

まず、第1章においては、抗原提示能を持つ単球の活性化や分化の制御機構をサイトカイン遺伝子の発現動態から解析した。次に、抗原提示細胞より抗原情報を受け取る

CD4⁺T 細胞 [ヘルパーT(Th)細胞]に関する解析を行った。これまで魚類のサイトカイン研究によって Th1 および Th2 サイトカインの存在は明らかにされているが、Th17 サイトカインの存在は不明であったため、第2章として Th17 サイトカインである IL-17 遺伝子の分離・同定を行った。さらに、研究対象であるトラフグにおいて各 Th サブセットが産生するサイトカインが揃ったことから、第3章では魚類 CD4⁺T 細胞が免疫刺激下でどのような発現動態を示すのかを解析し、さらにサイトカインによる分化制御についても検討した。

第1章 トラフグ単球におけるサイトカイン遺伝子の 発現プロファイル

1. 諸論

単球は、B細胞・樹状細胞とともにウイルスや細菌に感染した細胞、腫瘍細胞を攻撃する細胞性免疫、抗原に対する抗体を産生して抗原を排除する体液性免疫といった、免疫反応を開始させることのできる抗原提示細胞（APC）である（Tsukamoto et al., 2005）。哺乳類の免疫システムにおいて、抗原提示細胞は、ヘルパーT（Th）細胞への抗原提示および産生するサイトカインによる活性化/分化は自然免疫と獲得免疫の橋渡しを担う重要な免疫細胞である。魚類の単球においても、共刺激分子である B7 が発現しており、MHC クラス II および B7 を介して T 細胞に、共刺激と抗原提示による免疫制御を担っていることが報告されている（Sugamata et al., 2009b）。抗原提示細胞の中でマクロファージと樹状細胞は細胞膜上に Toll 様レセプター（TLR）を発現しており、微生物や毒性物質が生体内に侵入すると、病原体に関連した特有の分子パターン（PAMPs）を認識する（Ozinsky et al., 2000）。TLRs は侵入した病原体に対する最初の防衛に関与するが、炎症反応の惹起や、免疫細胞の活性化においても重要な役割を果たしている。ほとんどの哺乳類で 10~15 種類の TLRs が確認されており、ヒトでは 10 種類（TLR1~TLR10）、マウスでは 12 種類（TLR1~TLR9, TLR11~TLR13）が報告されている（Takano et al., 2010）。マクロファージと樹状細胞は、PAMPs の TLR 認識を介して活性化し、細胞内シグナル伝達経路を介して転写因子である NF- κ B を活性化し、様々なサイトカインを誘導する。

魚類において単球/マクロファージの機能面に迫った論文は多数報告されている。例えば、魚類の単球/マクロファージは免疫賦活剤の作用もしくは病原体感染によって食活性が増加されることが知られている (Sakai et al., 2001)。さらに、キングョ (*Carassius auratus*) においてコロニー刺激因子 (CSF-1; colony-stimulating factor) によるこれら細胞の活性化・分化・増殖の報告がされている (Grayfer et al., 2009)。トラフグにおいては T 細胞を制御する B7 補助因子 (B7-H1/DC, B7-H3 および B7-H4) の発現によって抗原提示細胞として働くことが Sugamata らによって示されている (Sugamata et al., 2009b)。さらにゼブラフィッシュの抗原提示細胞に関する研究では魚類においてはじめて樹状細胞の存在を明らかにしている (Wittamer et al., 2011)。これら抗原提示細胞で発現する TLR のホモログは魚類においても発見されており、また魚類特有の TLRs がトラフグ (TLR21–TLR23) およびゼブラフィッシュ (TLR19–TLR22) で同定されている (Palti, 2011)。

2004 年のヒトゲノム解読完了後、様々な生物のゲノムに関しても公開されてきた。その中でもヒトに続き 2 番目にゲノム配列が公開されたのはトラフグであった (Savan and Sakai, 2006a)。トラフグのゲノムサイズは約 400Mb で、脊椎動物の中でも非常に小さいことが分かっている。ヒトのゲノムサイズ (約 3000Mb) の約 1/8 であるが、遺伝子の数はヒトとほぼ同じであると考えられる。つまり、ヒトゲノムに比べ非翻訳領域が少なく、遺伝子密度が高い生物といえる。そのため、ゲノミクスなどでの遺伝子解析を容易にすることから比較ゲノムの分野などで解析が進められてきた。フグゲノムを用いた免疫関連因子の同定も活発に行われている。中でも免疫関連細胞の伝達物質であるサイトカインは特に研究が進められている。異なる生物種間の染色体

上での遺伝子の位置（シンテニー）を利用したシンテニー解析やホモロジー解析により、これまでにインターロイキン (Secombes et al., 2011)、腫瘍壊死因子 (TNF) (Savan et al., 2005)、インターフェロン (Kitao et al., 2009)、ケモカイン (Alejo and Tafalla, 2011)、コロニー刺激因子 (CSF) (Hanington et al., 2009)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) (Daniels and Secombes, 1999)などのホモログ遺伝子が分離・同定されている。また、魚類特有のサイトカインも複数見つかった。しかしながら、魚類における単球を含む抗原提示細胞の分化・増殖およびヘルパーT 細胞の活性化に関わるサイトカインの研究はほとんど行われていない。本章では、我々の研究室で構築したマルチプレックス RT-PCR システム (Kono et al., 2013)を用いて、TLR アゴニスト刺激により分化・成熟したトラフグ単球におけるサイトカイン遺伝子の網羅的発現解析を行った。

2. 方法

2.1. 供試魚

宮崎県内の松本水産より購入した体重 200g のトラフグ (*Takifugu rubripes*) を用いて実験を行った。試験魚は予備飼育期間および試験期間中を通して 150 L 循環式水槽を用い水温 20°C で飼育し、市販のドライペレット (Sango, Higashimaru Co., Ltd., Kagoshima, Japan) を魚体重 1%の割合で 1 日 1 回給餌した。

2.2. 末梢血白血球 (PBLs) からの単球の分離

トラフグの単球における解析を行うにあたり、PBLs より単球を分離した。まず、末梢血は注射針 (27 ゲージ針および 5 ml ヘパリン加シリンジ) を用いて尾静脈から採取した。採血は犠牲なしに行い、苦痛も最小限にとどめる努力を行った。採取した末梢血はハンクス平衡塩 (HBSS) で 4 倍希釈した。PBLs の分離には Percoll 密度勾配遠心法を用いて行った。1.065 および 1.050 の濃度勾配溶液を Percoll Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) および 1.5 M NaCl を用いて作製し、希釈した末梢血を 1,500 rpm、50 分の遠心分離を行った。PBLs の分離後、3 回 HBSS で細胞を洗浄し、RPMI1640 培地に懸濁した。懸濁した PBLs を血清処理 (トラフグ全血より血清を分離後、不活化処理した血清を使用) した培養フラスコに 1 時間静置することによって、PBLs 中に含まれる単球や顆粒球などの付着性白血球をフラスコに付着させた。1 時間後、リンパ球リッチの遊離細胞画分を丁寧に回収したのち、4、5 回 RPMI1640 培地で激しく洗浄することで、単球よりも付着能が弱い顆粒球を取り除いた。このフラスコに 5% FCS、1% Streptomycin/Penicillin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を含む RPMI1640 培地を

加えて、25°Cで3時間静置し、フラスコから剥がれた細胞を回収し単球集団とした。

2.3. 形態観察・フローサイトメトリーおよび細胞マーカー遺伝子解析

単離した PBLs、リンパ球および単球をサイトスピンにより細胞塗抹し、メイグリュンワルド・ギムザ染色により細胞の形態を顕微鏡観察 (x400) した。細胞塗抹には StatSpin Cytofuge 2 (StatSpin Technologies, Norwood, MA, USA) を顕微鏡観察は Axiovert 40CFL (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いた。

単離した各細胞集団は EPICS XL (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いたフローサイトメトリー (FCM) によって解析した。ゲート設定は前方散乱光 (forward scatter:FS) と側方散乱光 (side scatter : SS) による 2 パラメータードットプロットを用いて行った。PBLs を FS-SS のパラメーター上でリンパ球、単球および顆粒球の 3 集団をそれぞれゲーティングし、単離したリンパ球、単球の細胞集団を解析した。得られたフローサイトメトリーデータは FlowJo ソフトウェア (Tree Star, Inc., San Carlos, CA, USA) を用いて解析した。

PBLs、リンパ球、単球から Total RNA を精製し、逆転写反応により cDNA を作製した。各サンプルの全 RNA 抽出は、Korenaga (2011) に準じて行った。Total RNA を供試し、ReverTra Ace (Toyobo, Japan) を用い、プロトコールにしたがって cDNA を合成した。細胞マーカーの発現解析に用いたプライマーの配列は Table 1-1 に示した。

Table 1-1. Primers designed for expression analysis of marker genes in this study.		
Name	Sequence (5'--3')	Length (mer)
<i>CSF1R1</i> Fw	TTTACCGACACCGCGGGATT	20
<i>CSF1R1</i> Rv	GCCGCTGTCACTTCTAATGTA	20
<i>CSF1R2</i> Fw	GGCATGAACGTGACTGTTGA	20
<i>CSF1R2</i> Rv	CATGGTACCCAAGGTGACTT	20
<i>CD4</i> Fw	AAGCCTCAGAGGGAACAGAA	20
<i>CD4</i> Rv	GAAGAACGTGGTCGATACGA	20
<i>CD4rel</i> Fw	GGAAGCAGATGCAGGAATGT	20
<i>CD4rel</i> Rv	GCCTGTGACTCTGATATCCA	20
<i>CD8a</i> Fw	CCCAGGTGGACATTCATTGT	20
<i>CD8a</i> Rv	TTGTTGCCTCGGCGTCGTT	20
<i>TCRα</i> Fw	AGCGCATGTCTGGCCACAGGTTTCA	25
<i>TCRα</i> Rv	GACTGATACGCAGACGAAGAGTCATCAGG	29
<i>TCRβ</i> Fw	TCCTCCAGAGAGTGTCCGAA	20
<i>TCRβ</i> Rv	TGCAGCTTCCAGGCCAGAAA	20
<i>TCRγ</i> Fw	CAGGGCTGGTTGTCATAGAA	20
<i>TCRγ</i> Rv	GCATCTGAGACGACGAGTCT	20
<i>TCRδ</i> Fw	TCAGCAGCAGAGAAGGAGAA	20
<i>TCRδ</i> Rv	ACTCAGGACTGTCCGATCTT	20
<i>CD3ε</i> Fw	CCAACCGATTAGAGCGAATCAGAGGC	26
<i>CD3ε</i> Rv	CCTGATTCCTTCCCGGATCCAGC	23
<i>IgL</i> Fw	GAAGGTAGAAGGGAAGACAAGCGTCCC	27
<i>IgL</i> Rv	CTTTCACATAGCAGGACAGGGCGAC	25
<i>IgM</i> Fw	CTGGGACTGGAAACATGGTCACTCTCGG	28
<i>IgM</i> Rv	GCAACACTGTACAGGGTTCATCCGCGG	28
<i>MHC I</i> Fw	CATCCTCTGCTGCGTCGTCGG	21
<i>MHC I</i> Rv	TCACCGGACTGGTGGGAGCA	20
<i>MHC II</i> Fw	CAGCTGCCACGCTACAGGCTT	21
<i>MHC II</i> Rv	GACCCCAGGCTTCCCCCAGTT	21

2.4. 免疫刺激時におけるトラフグ単球

2.4.1. LPS, polyI:C および IMQ の *in vitro* 刺激

PBLs からの単球の純化は上記の 2.2 節で説明している。単球の細胞数は 1×10^6 cells/ml に調整し、リポポリサッカロイド (LPS; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) , ポリイノシンポリシチジン酸 (polyI:C; Sigma-Aldrich; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) もしくはイミキモッド (IMQ; Wako, Osaka, Japan; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で 0, 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 120 時間の *in vitro* 刺激を行った。コントロールとしては HBSS を使用して同様に実験を行った。刺激区の刺激温度は 25 °C で培地は 5 % FCS と 1% Streptomycin/Penicillin を含む RPMI 1640 培地 (Invitrogen) を用いた。

2.4.2. 単球/マクロファージの細胞集団解析

上記 2.4.1 で刺激した単球を 1, 3 および 5 日目に 500 μl の 1x HBSS で懸濁し、FS-SS のパラメーターでドットプロット解析を行った。ゲート設定は刺激によって変化した細胞集団で新たに行った。

2.4.3. FCM を用いた食食活性の測定

刺激後 5 日目における単球 (2.4.1 参照) の食食活性を FCM により解析した。食食には直径 1 μm の蛍光ラテックスビーズ (Polysciences, Warrington, PA, USA) を用いた。単球 1 細胞あたりおよそ 30 個になる比率で 25°C, 2 時間作用した。1x HBSS で洗浄後、蛍光ビーズを取り込んだ細胞は 25nm (FL1) の蛍光を検出するように調節した FCM によって評価した。ネガティブゲートの設定はビーズを作用させていない単球細胞で

行った。

2.4.4. Multiplex RT-PCR を用いたサイトカイン遺伝子の発現解析

サイトカイン遺伝子の発現解析は、刺激後 1、4、8、12、24、48 時間目の単球を用いた (2.4.1 参照)。Multiplex RT-PCR 反応は各遺伝子の Fw プライマーおよび Rv プライマーが 100 μ l 中に Fw プライマーが 200 nM、Rv プライマーが 500 nM になるように混合した Fw Plex プライマー、Rv Plex プライマーを作製し、Multiplex RT-PCR 反応に用いた。Multiplex RT-PCR 反応は GenomeLabTM GeXP Start Kit (Beckman Coulter) を用いて行った。

作製した RNA 溶液 5 μ l に DNase/RNase Free H₂O 7.8 μ l、RT Buffer 5 \times 4 μ l、Rv Plex プライマー 2 μ l、Reverse Transcriptase 1 μ l、KAN^r RNA with RI 0.2 μ l 加えて 48°C で 1 分間、42°C で 1 時間、95°C で 5 分間の逆転写反応を行い、cDNA を作製した。その後、25 mM MgCl₂ 4 μ l、PCR Buffer 5 \times 4 μ l、Fw Plex プライマー 2 μ l、ThermoStart DNA Polymerase 0.7 μ l、cDNA 溶液 9.3 μ l、を混合し、95°C で 10 分間のプレヒーティング後、1 サイクルが 94°C で 30 秒、55°C で 30 秒、68°C で 1 分間の PCR 反応を 45 サイクル行い、PCR 産物を得た。RT 反応および PCR 反応はサーマルサイクラー C1000TM Thermal Cycler を用いて行った。PCR 後、kit 中のサンプルローディングソリューション 38.5 μ l、サイズスタンダード 400 0.5 μ l に 1 μ l の PCR 産物を加え、CEQ サンプルプレートに移し、各サンプルに kit 中の mineral oil を 1 滴ずつ添加し、CEQ8000 CEQ Genetic Analysis System (Beckman Coulter) へサンプルプレートをセットし、泳動温度 50°C、泳動電圧 6.0kV、泳動時間 35 分間にてキャピラリー電気泳動を行った。泳動後、得られた結果

を CEQ8000 ソフトウェア中のフラグメント解析および GenomeLab™ GeXP Quant Tool (Beckman Coulter) により、Multiplex RT-PCR 反応の結果を得た。

2.5. 統計学的解析

統計学的有意差は刺激したサンプルおよび未刺激のサンプル間での比較で行った。結果は平均値±標準偏差で示し、統計学的解析は Student *t* 検定を用いて行い、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ を統計学的有意差とした。

3. 結果

3.1. トラフグ単球の単離

単球の接着性を利用して PBLs からの単離を行った。トラフグ末梢血からの単球単離の過程で、それぞれの細胞をメイグリュンワルド・ギムザ染色し、顕微鏡観察した結果、PBLs はリンパ球、単球、顆粒球などのヘテロな細胞集団であり、単離したリンパ球、単球はそれぞれの細胞集団が高純度で他の細胞集団の混在はみられなかった。単球は他の細胞と比べて大きく、多くの液胞を持ち、細胞質、核ともに様々な形態であることが確認されたが、細胞表面に突起構造がみられる樹状細胞様の形態は確認されなかった。リンパ球は、単球などの他の細胞と比べても細胞の大きさおよび細胞質が小さかった。トラフグ PBLs の FS-SS の 2 パラメータヒストグラム解析からリンパ球、単球、顆粒球の 3 つの細胞集団にゲートを設定した。単離したリンパ球および単球はそれぞれリンパ球ゲートおよび単球ゲートに高い割合で確認された (Fig. 1-1)。

PBLs から単離した単球の細胞特性を解析するために細胞マーカー遺伝子発現解析を行った。細胞マーカーは T 細胞マーカー; CD3 ϵ 、CD4、CD4rel、CD8、TCR α 、TCR β 、B 細胞マーカー; IgL、IgM、単球マーカー; CSF1R1、CSF1R2、MHCII をそれぞれ対象にした。また、すべての白血球細胞に発現する MHCI も解析を行った。PBLs では T 細胞、B 細胞、単球マーカー遺伝子をすべて発現していた。単離した単球は、CSF1R1、CSF1R2 および MHCII の単球マーカーを発現していたのに対し、B 細胞および T 細胞マーカーの遺伝子を発現していなかった (Fig. 1-2)。

3.2. TLR アゴニストで刺激したトラフグ単球の活性

3.2.1. 形態変化の観察

LPS、polyI:C および IMQ で *in vitro* 刺激した単球の細胞形態の変化を FCM によって解析した。その結果、刺激後 1 および 3 日目では顕著な変化が見られないものの、刺激後 5 日目においてすべての TLR アゴニストによる刺激によって新たな細胞集団が確認された。FCM のゲーティング設定は刺激前の primary な状態の単球の細胞集団を Gate A、刺激後の新たな細胞集団を Gate B とした。LPS、poly I:C および IMQ 刺激後 5 日目で、Gate B の細胞集団の全体に占める割合は 23.9%、36.4% および 33.6% となった。また、Gate B の細胞集団は Gate A よりも内部構造が複雑であることが FS-SS のヒストグラム上で確認された (Fig. 1-3)。

3.2.3. 貪食活性

TLR アゴニスト刺激後 5 日目での 2 つの細胞集団 (Gate A; 単球および Gate B; 活性化単球/マクロファージ) における貪食活性を測定した。Gate A においてコントロールでは 10.2% の貪食活性を示した。一方、LPS、poly I:C および IMQ 刺激による貪食活性はそれぞれ 18.1%、16.8% および 16.9% となった。Gate B にゲーティングされるコントロールでは細胞はほとんど確認されなかった。TLR アゴニスト刺激後、Gate B の細胞集団における貪食活性は Gate A に比べ顕著に高かった (Fig. 1-4, 1-5)。

3.3. 活性化単球におけるサイトカイン遺伝子の発現解析

TLR アゴニストで刺激した単球におけるサイトカイン遺伝子の発現は Multiplex

RT-PCR 法を用いて解析した (Fig. 1-6)。

3.3.1. 炎症性 (*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-17AF-3*、*IL-18*、*IFN- γ* 、*TNF- α* 、*TNF-N*) および抗炎症 (*IL-10*) サイトカイン遺伝子の発現

LPS 刺激後、単球において *IL-1 β* (1~12 時間後) および *IL-6* (4~12 時間後) 遺伝子の発現量が著しく増加した。一方、polyI:C および IMQ 刺激ではコントロールと比較して発現量の有意な増加はほとんど見られなかった。*IL-17AF-3* は LPS 刺激後 1~12 時間目で、polyI:C 刺激後 1 時間目で、IMQ 刺激後 24 時間目で *IL-1 β* 、*IL-6* 遺伝子よりも高い発現量を示した。*IL-18* 遺伝子は、全ての TLR アゴニストの刺激後 1 時間目にコントロールと比較して有意な発現量の増加が認められ、それ以降は、徐々に発現量が減少した。*IFN- γ* 遺伝子も *IL-18* 遺伝子と同様に TLR アゴニスト刺激によって増加することが確認された。その傾向は、特に刺激後 1~12 時間目において顕著であった。LPS、polyI:C および IMQ 刺激後 1 時間目において *TNF- α* 遺伝子は最も高い発現量の増加を示し、それ以降は継時的な発現量の減少が確認された。また、各刺激時間においてコントロールよりも *TNF- α* 遺伝子の発現量は高く、TLR アゴニスト刺激区間での発現パターンは類似していた。魚類特有の TNF である *TNF-N* 遺伝子はどの刺激区においても有意な発現量の増加は認められなかった。

抗炎症性サイトカインである *IL-10* 遺伝子は、PS 刺激後 8 および 12 時間目において発現量の増加を示したが、polyI:C および IMQ 刺激では発現量に顕著な増加はみられなかった。

3.3.2. 制御性サイトカイン (*TGF-β1*) 遺伝子の発現

TGF-β1 遺伝子は、polyI:C 刺激後 1 時間目で発現量の増加を示した。しかしながら、他の TLR アゴニスト刺激では発現量の変化に有意な差は認められなかった。

3.3.3. 抗ウイルス性サイトカイン (*I-IFN*) の遺伝子発現

TLR アゴニストの刺激による *I-IFN* 遺伝子の発現量はコントロールと比較して有意な発現量の増加を示さなかった。

3.3.4. 単球増殖因子 (*CSF-1b*) の遺伝子発現

CSF-1b 遺伝子の発現量は全ての TLR アゴニスト刺激によってコントロールと比べ有意に増加した。IMQ 刺激は、コントロールと比較して 80 倍以上の発現量の増加を示し、刺激した TLR アゴニストの中で最も強い増強効果を示した。また、IMQ 刺激後 1 時間目以降、徐々に発現量は減少していき、48 時間目にはコントロールと比較して 2.6 倍の発現量となった。

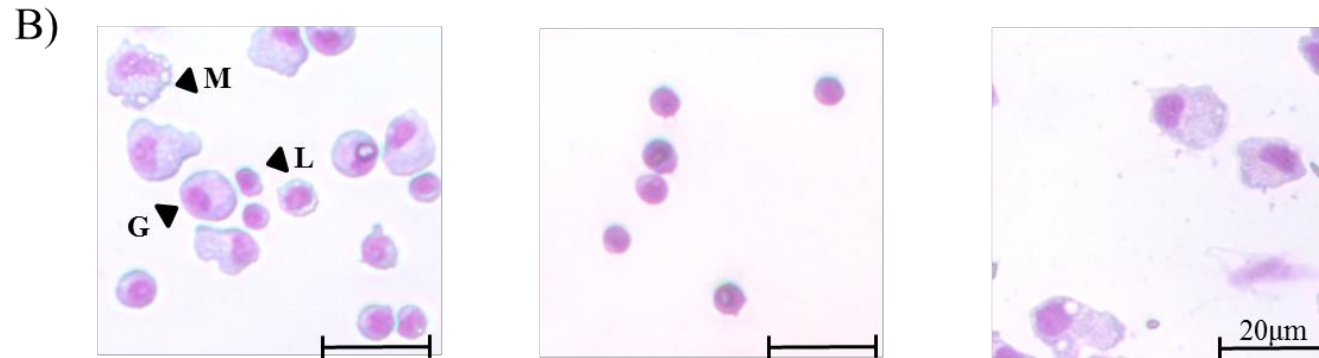
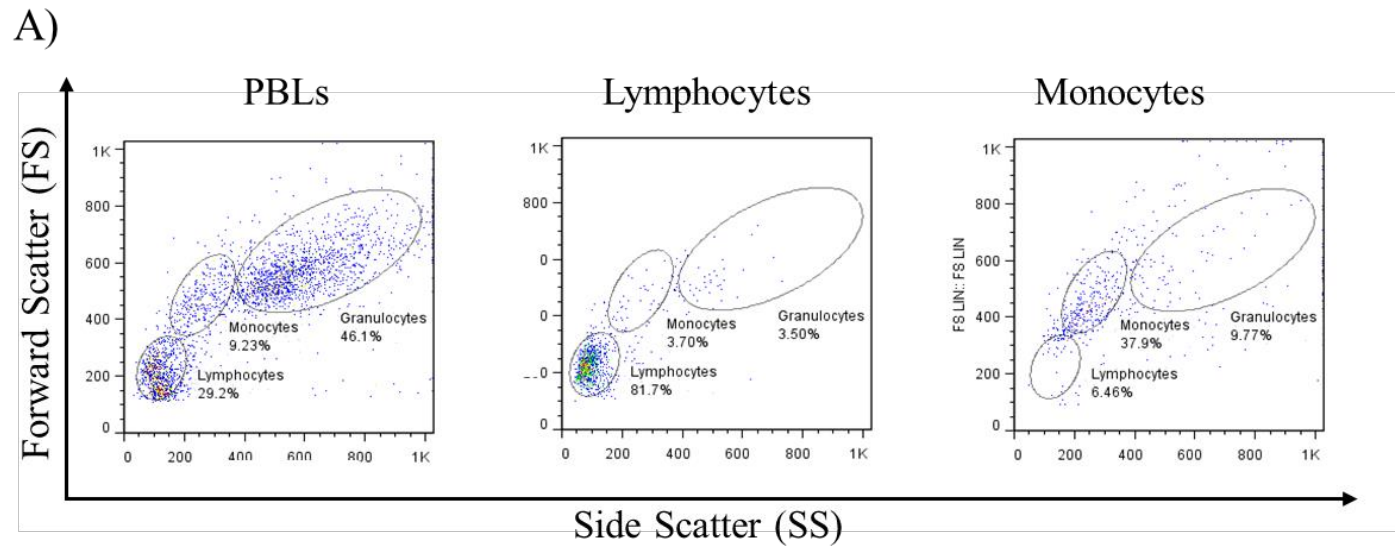


Fig. 1-1. Discrimination of *Fugu* PBLs, lymphocytes and monocytes. A) The morphology of purified cells was examined microscopically after May-Grünwald-Giemsa staining. G, L and M indicate granulocytes, lymphocytes and monocytes, respectively. B) Scattergram of the flow cytometric profile of purified cells. Different cell subpopulations were identified on the basis of their size and complexity, and cellular debris was excluded. Three populations (granulocytes, monocytes and lymphocytes) in PBLs were isolated by analytical gates. The lymphocyte and monocyte populations were mostly pure, and contamination with other populations was low.

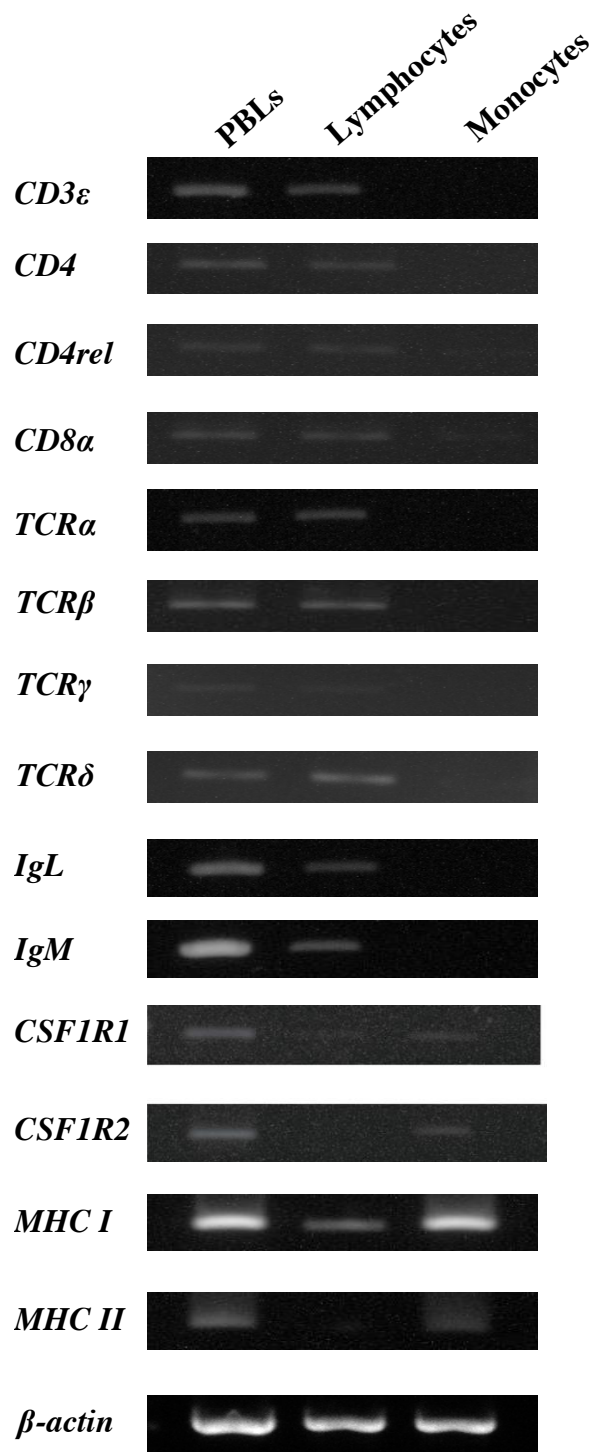


Fig. 1-2. Expression analysis of cell marker genes in *Fugu* PBLs, lymphocytes and monocytes. RT-PCR was performed using primers specific for monocyte markers; *CSF1R1*, *-2*, *MHC I*, *MHC II*, a B-cell markers; *IgL*, *IgM* and T-cell markers; *CD3ε*, *CD4*, *CD4rel*, *CD8α*, *TCRα*, *TCRβ*, *TCRγ* and *TCRδ*.

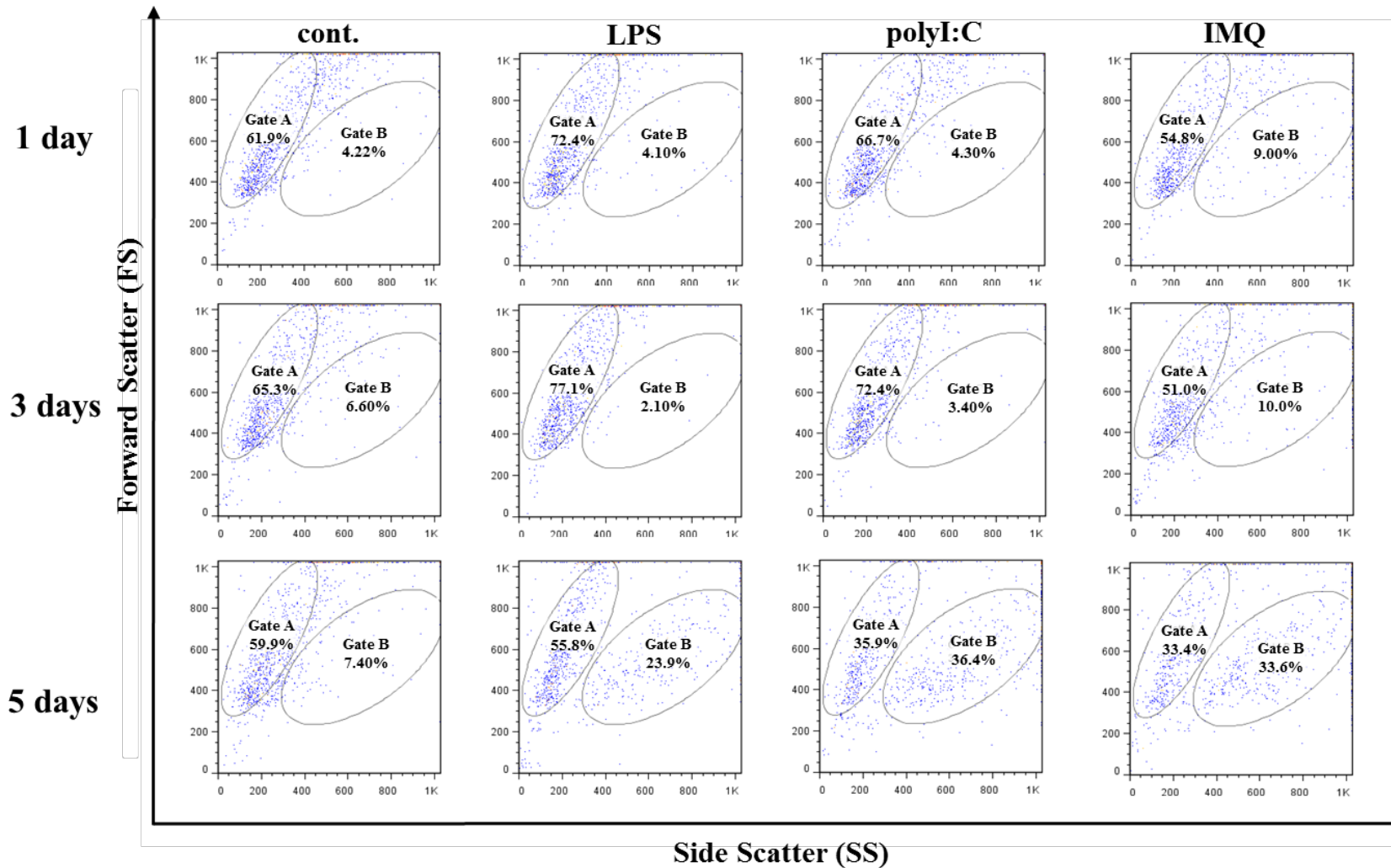


Fig. 1-3. FCM characterization of *Fugu* monocyte populations after *in vitro* stimulation with TLR agonists (LPS, polyI:C or IMQ). Forward scatter (FS) vs. side scatter (SS) density plot showing two cell populations at 5 days after the immunostimulation. The gate A and B were set for defining distinct monocyte populations.

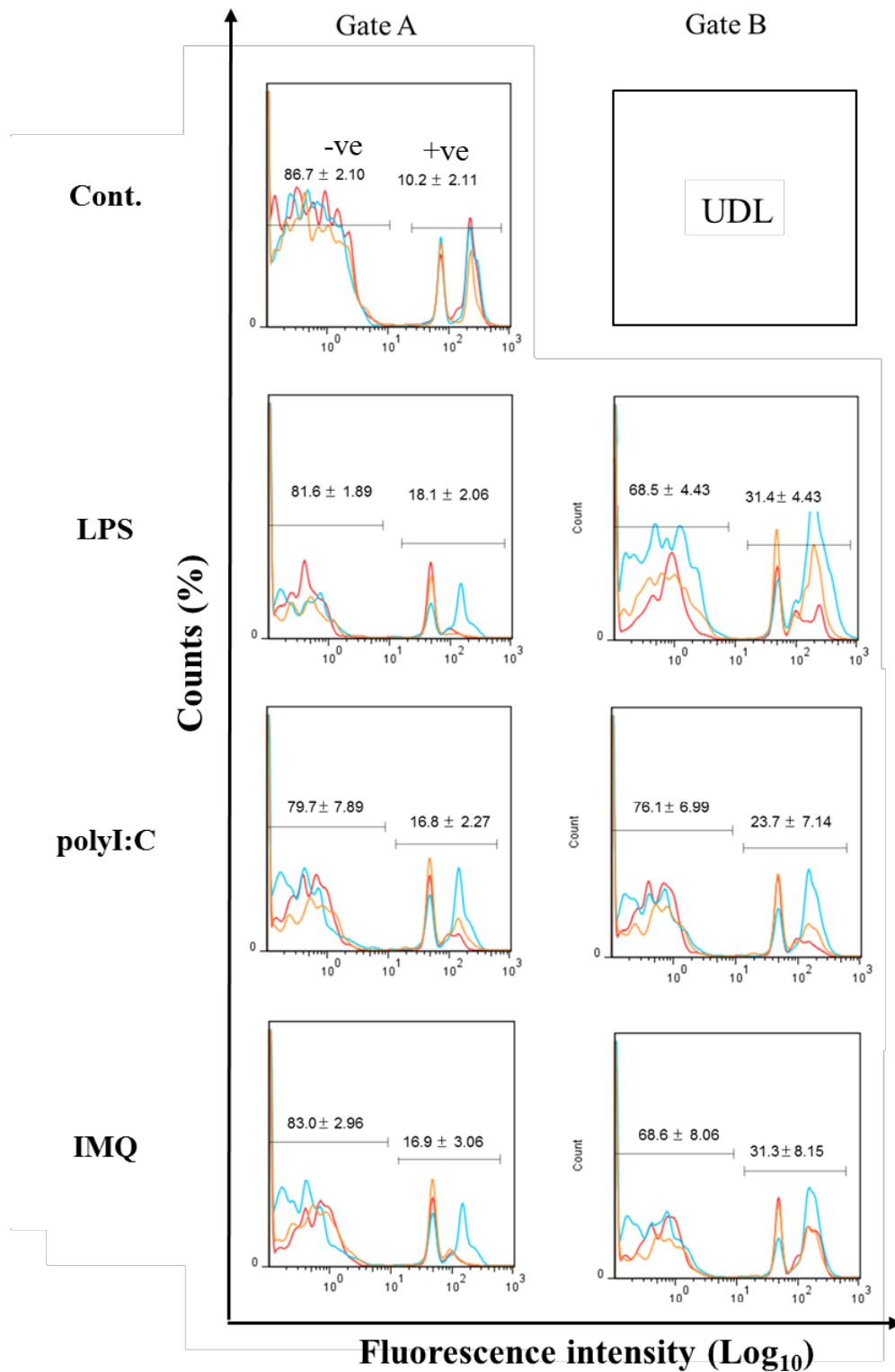


Fig. 1-4. Fluorescence histograms of cell number (y-axis) versus fluorescence intensity (FL1) (x-axis) representative of phagocytic activity of *Fugu* monocytes at 5 days post-stimulation. Values are mean ± S.D. in three fish.

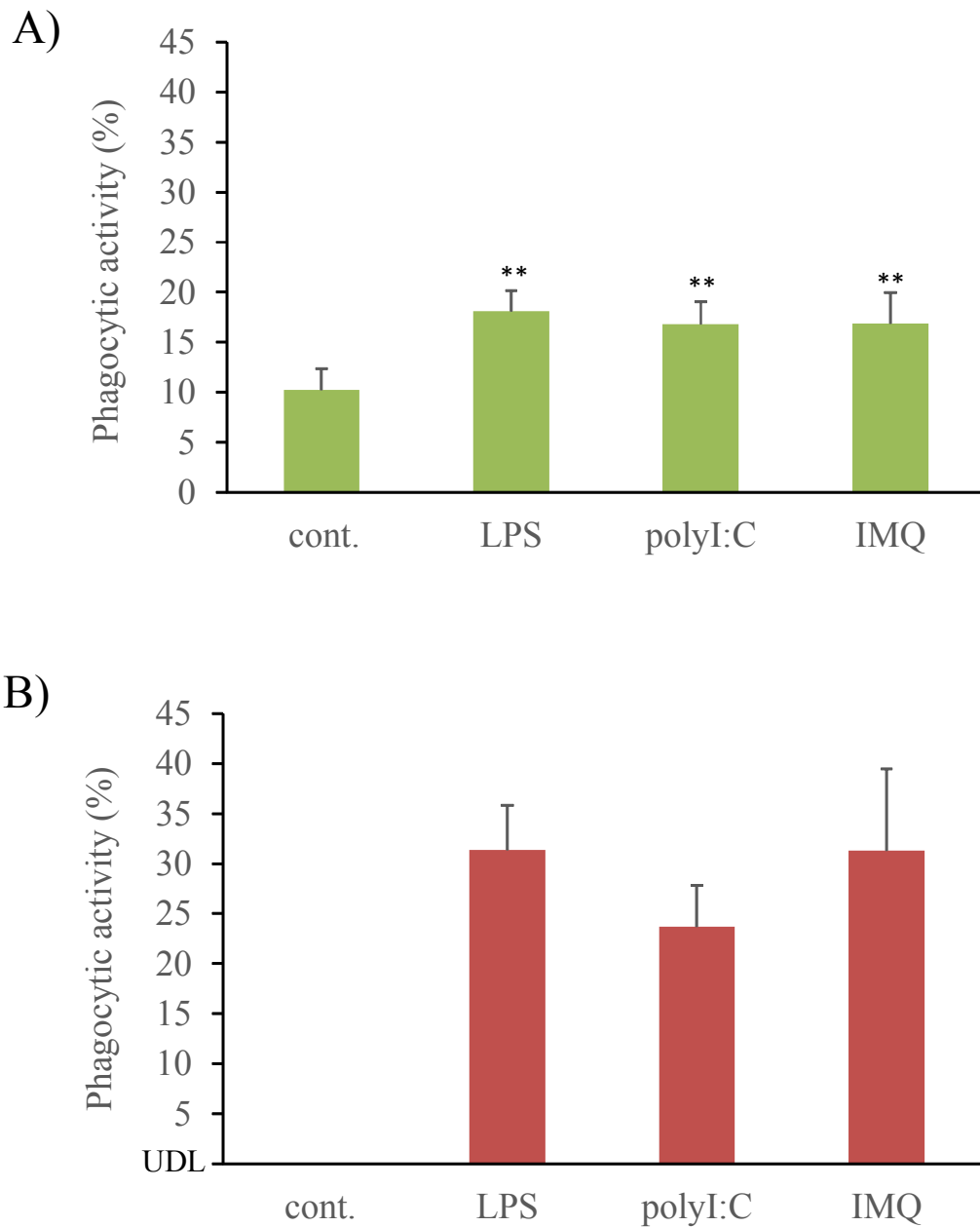


Fig. 1-5. Phagocytic activity of *Fugu* monocytes at 5 days after stimulation with TLR agonists. Phagocytic activity indicates the percentage of monocytes which phagocytosed yellow-green fluorescent latex beads detected using FCM. A) gate A and B) gate B (see Figure 3). Asterisk indicates significantly higher value compared with control (*P < 0.05; **P < 0.01). Values are mean \pm S.D. in 3 fish.

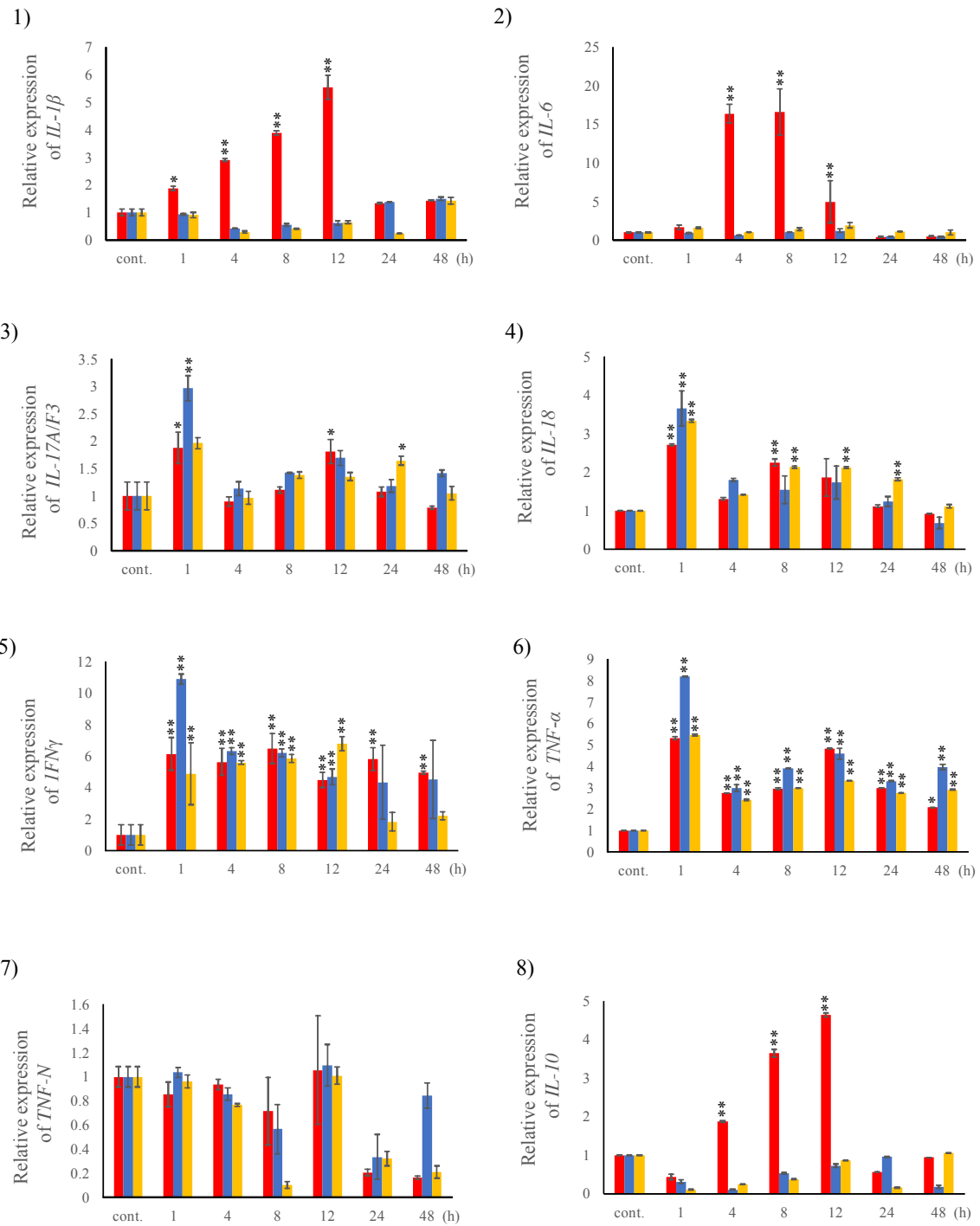


Fig. 1-6. continued

(continued)

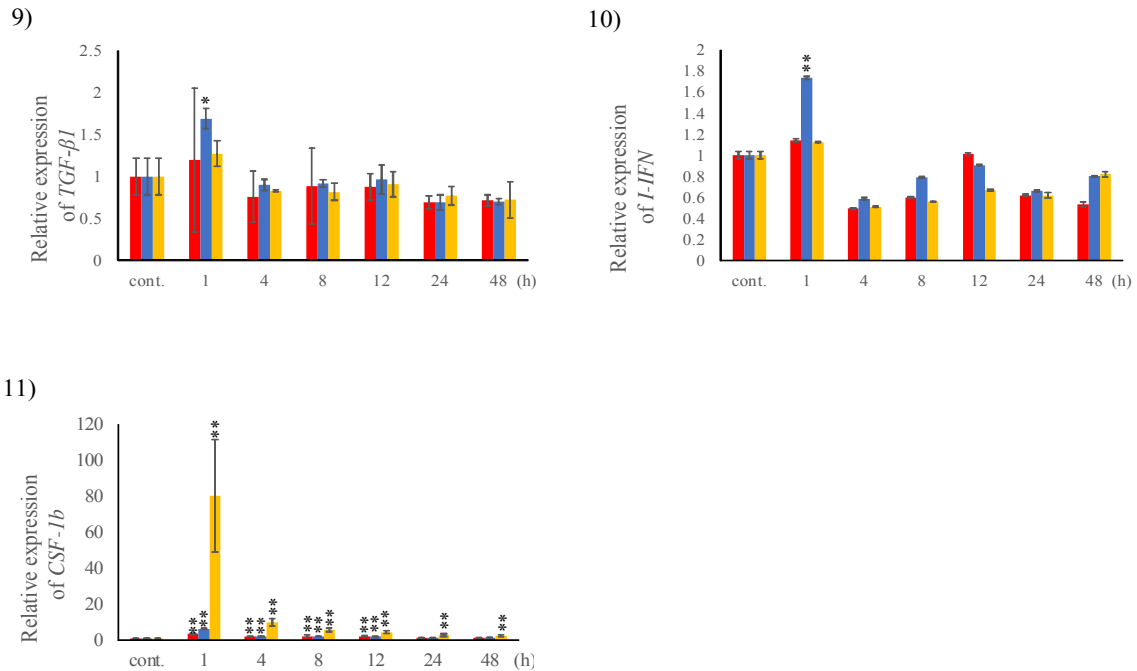


Fig. 1-6. Expression analysis of *Fugu* cytokine genes in monocytes under immunostimulatory conditions. RNA was isolated from monocytes incubated with 20 μ g/ml LPS, 20 μ g/ml polyI:C or 20 μ g/ml IMQ for 0 (cont.), 1, 4, 8, 12, 24 and 48 h. *Fugu* cytokine mRNA transcripts were determined by multiplex RT-PCR and normalized to the respective β -actin mRNA. The analysed genes were as follows: 1) *IL-1 β* , 2) *IL-6*, 3) *IL-17A/F3*, 4) *IL-18*, 5) *IFN γ* , 6) *TNF- α* , 7) *TNF-N*, 8) *IL-10*, 9) *TGF- β 1*, 10) *I-IFN* and 11) *CSF-1b*. Data are presented as mean \pm S.D. of triplicate samples. *P < 0.05; **P < 0.01 as compared to the control (up-regulation). The relative expression level is expressed as arbitrary units where one unit is equal to the average expression level of each cytokine gene in monocytes from unstimulated PBLs. Red, blue and yellow bars indicate LPS, polyI:C and IMQ-stimulations, respectively.

4. 考察

本章の研究では、魚類単球における活性化およびサイトカイン遺伝子の解析を行った。魚類における単球/マクロファージとサイトカインの関連性はカナダの研究者グループによって研究されてきた。キンギョの単球に組換え CSF-1 を作用させると *IL-1 β* 、*IL-8*、*IL-10*、*IL-12*、*IFN- γ* 、*TNF- α* などのサイトカイン遺伝子の発現の誘導を行い、抗細菌反応を協同させることを明らかにしている (Grayfer et al., 2009)。これら研究結果からカナダの研究グループはキンギョのマクロファージの活性化因子として CSF1 は中心的な分子であるとしている (Hanington et al., 2009)。しかしながら、上記に挙げたサイトカイン以外のサイトカインの発現動態と免疫活性とサイトカインの関連性は魚類においてはまだ明らかにされていない。そこで、本研究では TLR アゴニスト刺激によって活性化・分化させた単球におけるサイトカイン遺伝子の発現を解析した。

4.1. トラフグ単球の単離

本研究においてトラフグの末梢血より単離した単球は単球マーカーのみを発現していた。これまでも哺乳類において用いられている単球マーカーおよびリンパ球マーカーが魚類においても細胞の特性を判別するために用いられてきた (Sugamata et al., 2009b; Yamaguchi et al., 2011a)。本研究で用いたマーカー遺伝子は純化した単球またはリンパ球に特異的に発現していることが他の論文でも報告されている (Kono and Korenaga, 2013; Odaka et al., 2011)。形態観察および FCM 解析もトラフグの PBLs で行われており、これら結果と比較しても本実験においてトラフグの末梢血からの単球の純化に成功したことを確認した。

4.2. TLR アゴニスト刺激によるトラフグ単球の活性化

4.2.1. 形態変化

キンギョの頭腎由来のマクロファージは、リコンビナント CSF1 もしくは MAF、TLR アゴニストである LPS などの刺激による形態変化に FCM を用いて解析されており、免疫刺激によって新たに細胞集団が出現する (Hanington et al., 2009; Neumann et al., 1998; Rieger et al., 2010)。これら結果から頭腎由来の前駆細胞である単球から活性化型の単球/マクロファージに変化することが明らかになっている。本実験において、FCM 解析により TLR アゴニストの刺激によって活性化型の単球の細胞集団を示した。この結果はトラフグの単球における活性化・分化がコイ科の魚と類似していることを示唆している。しかしながら、この段階において観察した新たな単球集団が活性化型であるかどうかを決定することができなかった。そのため、刺激後 5 日目における単球の貪食活性を測定した。

4.2.2. 貪食活性

本実験において LPS、polyI:C および IMQ 刺激によって単球の活性化・分化が示唆された。MAF もしくは LPS 刺激によって成熟したキンギョの単球における貪食活性は活性化前の単球に比べ高い貪食活性を示す (Rieger et al., 2010)。このように魚類は哺乳類と同様な単球の活性化機構があるように考えられるが、哺乳類と魚類において単球の活性化に関わるシステムは異なる点がある。中でも、LPS を認識する TLR4 は大きく異なる。魚類において TLR4 のホモログ遺伝子はゼブラフィッシュや主に中国

に生息する希少ミノウなどのコイ科でのみしか発見されていない (Sepulcre et al., 2009)。さらに、哺乳類の TLR4 とは異なりゼブラフィッシュの TLR4 は MyD88 依存のシグナル経路をネガティブに制御することが報告されており、TLR4 によって認識される経路は魚類においては損なわれていることが示唆されている (Sepulcre et al., 2009)。それゆえ、トラフグ単球は TLR4 でなく他のレセプター分子を介して LPS を認識し、活性化したことが考えられた。哺乳類において RNA ウイルス由来の 2 本鎖 RNA (dsRNA; polyI:C のアナログでもある) を認識する TLR3 や、抗ウイルス作用を持つ合成低分子である IMQ を認識する TLR7 はそれぞれトラフグにおいても同定されている (Oshiumi et al., 2003)。魚類免疫の分野において polyI:C および IMQ は抗ウイルス反応のメディエーターとして用いられてきたが、これら TLR アゴニストによる単球/マクロファージの活性化に関する報告はこれまでにない (Remels et al., 1990)。マウスのマクロファージにおいて、polyI:C によって活性化し、腫瘍細胞の融解を誘起させる (De Meyer et al., 2012)。また、IMQ によって炎症性サイトカインと NF- κ B の産生を誘導し、オートファジーを活性化することも報告されている。今回の実験の結果から、免疫刺激後、TLR シグナル経路もしくは LPS に関しては他のシグナル経路によってオートクリン・パラクリン的なサイトカインの産生を行い、単球が活性化したことが示唆された。それゆえ、刺激後の初期段階でのサイトカイン遺伝子の発現解析を行った。

4.3. 活性化単球におけるサイトカイン遺伝子の発現

4.3.1. 炎症性・抗炎症性サイトカイン遺伝子の発現

ニジマスの頭腎マクロファージにおける *IL-6* の発現は LPS および polyI:C によって増加する (Costa et al., 2011)。さらに、ニジマスの脾臓由来のマクロファージ様の細胞株である RTS-11 細胞において *IL-1 β* の発現は LPS による刺激で増加することが報告されている (Brubacher et al., 2000a)。また、マクロファージ活性化因子あるいは LPS による活性化はキンギョのマクロファージの食能を上げることが知られている (Grayfer et al., 2010)。また、本研究より得られた結果よりトラフグの末梢血由来の単球は LPS による刺激によって *IL-1 β* および *IL-6* 遺伝子の発現を顕著に増加した。これらのことから、TLR アゴニストである LPS は魚類単球/マクロファージの活性化・分化における炎症性反応の強力な誘導因子であることが示唆された。

哺乳類において、*IL-17A* および *IL-17F* はマクロファージおよび Th17 細胞によって産生され、抗細菌・抗カビの免疫反応を制御することが知られている (Korenaga et al., 2010b)。これら *IL-17* サイトカインは、腸管免疫の制御にも重要な働きを示す。次章で述べるように魚類において、2 つもしくは 3 つの *IL-17A* もしくは F のホモログが存在することが同定されており、*IL-17A/F1~3* の遺伝子は LPS で刺激した頭腎において高い発現を示した (Kono et al., 2011)。しかしながら、*IL-17* を産生する細胞の同定およびさらなる機能の解析に関しては魚類免疫においては分かっていない。本実験において炎症性の誘導因子である LPS 刺激だけでなく、抗ウイルス反応を示す polyI:C および IMQ の刺激によってトラフグ単球における *IL-17* の発現は増加した。これら結果は、*IL-17A/F* は魚類の単球において発現し、抗細菌反応だけでなく抗ウイルス反応に

も関与することが示唆された。

IL-18 は IL-1 ファミリーの 1 つでマクロファージ、角化細胞、骨芽細胞、樹状細胞などの多くの種類の細胞において産生され、多彩な生理活性を示すことが哺乳類において分かっている (Arend et al., 2008)。ニジマスの脾臓由来の細胞株である RTS-11 細胞では *IL-18* 遺伝子の発現は LPS および polyI:C 刺激によってほとんど変化しないが、繊維芽細胞様の RTG-2 細胞では IL-18 は発現量が増加することが報告されている (Zou et al., 2004b)。さらに、トラフグの頭腎細胞において *IL-18* 遺伝子の発現は LPS、polyI:C、IMQ の刺激によって増加しない (Kono et al., 2013)。これらのデータは魚類の単球/マクロファージは IL-18 の主な産生細胞ではないことを示唆するものである。

IFN- γ は、主に Th1 および NK 細胞によって産生され、Th1 反応（細胞内病原体に対する免疫応答）を促進し、またマクロファージと細胞傷害性 T 細胞（CTL）の活性化に関与する (Boehm et al., 1997)。魚類において、組換え IFN- γ が単球の貪食活性を増加させ、マクロファージの *iNOS* 遺伝子の発現を誘起し、活性酸素の産生を増加させることが報告されている (Grayfer et al., 2010)。さらに、免疫刺激によって多くの魚種の IFN- γ 遺伝子の発現量が増加する (Castro et al., 2010; Svingerud et al., 2012)。本実験の結果はトラフグの単球は TLR 経路を介して IFN- γ 遺伝子を発現し、さらにオートクリン的な刺激によって貪食能を活性化することが考えられた。また、TLR アゴニストで刺激した単球においてヘルパー T 細胞を活性化する IFN- γ 遺伝子の発現量の増加がみられたことから、単球由来のサイトカインによるヘルパー T 細胞の活性化が魚類においても存在することが示唆された。

LPS が多くの魚種において *TNF- α* 遺伝子の発現を増加させることはよく知られてい

る (Goetz et al., 2004)。カワマス (*Salvelinus fontinalis*) の頭腎細胞で、LPS の *in vitro* 刺激後、*TNF- α* 遺伝子の発現量は増加し、マクロファージに分化することが確認された (MacKenzie et al., 2003)。キンギョのマクロファージにおいて組換え CSF1 刺激によって *TNF- α* 遺伝子の発現は増加し、単球/マクロファージの前駆細胞の分化や増殖を促進した (Grayfer et al., 2009)。これらの報告からトラフグ単球は抗細菌もしくは抗ウイルス反応を誘起する TLR アゴニスト刺激によって活性化され、*TNF- α* 遺伝子の発現量が増加したことが示唆された。

TNF-N は 2005 年にトラフグおよびゼブラフィッシュで発見された魚類特有の TNF ファミリーの一つである (Savan et al., 2005)。TNF-N の機能は現在のところ明らかにされていないが、炎症制御に関わることがニジマスの研究で報告されている (Kono et al., 2006)。ニジマスの RTS-11 細胞において *TNF-N* 遺伝子は LPS または polyI:C の刺激によってほとんど変動しない (Kono et al., 2006)。しかしながら、polyI:C と IMQ における刺激において *TNF-N* の発現が増加することがトラフグの頭腎細胞における発現解析から明らかになっている (Kono et al., 2013)。これらのことから免疫反応における TNF-N 産生細胞は単球/マクロファージでなくリンパ球や顆粒球などの他の細胞集団であることが示唆された。

IL-10 遺伝子の発現は組換え CSF1 作用後のキンギョのマクロファージにおいて増加することが報告されている (Grayfer et al., 2009)。トラフグの頭腎細胞においても、*IL-10* 遺伝子の発現は LPS 刺激後 48 時間目に増加する (Kono et al., 2013)。これらのことからトラフグ単球は哺乳類と同様に *IL-10* により炎症の制御を行い、その制御は強い炎症が起こった際に誘起されることが示唆された。

4.3.2. 制御性サイトカインの発現解析

単球/マクロファージにおける TGF- β 1 の機能は分化の段階によって異なる。哺乳類では TGF- β 1 は単球の遊走および接着性を誘導するが、臓器由来のマクロファージでは炎症性サイトカインの産生を抑制する働きがある (Letterio and Roberts, 1998)。マウスにおいては、TGF- β 1 は免疫細胞に対して細胞の種類あるいは実験の条件に応じて活性化することあれば抑制に転じることもある。このことは魚においても知られており、ニジマスにおいてはマクロファージにおける活性酸素能の増加は、TGF- β 1 の刺激によって活性化するが、活性化したマクロファージに対しては抑制的にはたらく (Brubacher et al., 2000b)。本研究では、polyI:C 刺激によってわずかに TGF- β 1 遺伝子の発現量が増加したが、LPS および IMQ の刺激では有意な増加は見られなかった。同様の TLR アゴニストで刺激したトラフグ頭腎における TGF- β 1 の発現においても、polyI:C 刺激によってわずかに増加することが確認された (Kono et al., 2013)。本研究および先行研究での polyI:C 刺激による TGF- β 1 の発現を解釈することは困難であるが、刺激した TLR アゴニストの種類によって発現動態が異なることから、魚類の単球は免疫状態に応じて TGF- β 1 の産生を制御していることが考えられた。

4.3.3. 抗ウイルス性サイトカインの発現解析

哺乳類において、polyI:C (TLR3 アゴニスト) および IMQ (TLR7 アゴニスト) は強力な抗ウイルス反応の誘導因子として知られている (Haller et al., 2006)。サケ科魚類において polyI:C および IMQ は *I-IFN* と *ISGs* (インターフェロン活性化遺伝子群) 遺

伝子の発現量を増加することが報告されており、これは哺乳類と同様に TLR 経路を介した活性化が起こっているものと示唆されている (Haller et al., 2006)。ニジマスの RTS-11 細胞ではウイルス性出血性敗血症ウイルス (VHSV) の感染によって *I-IFN* 遺伝子の発現量が増加することが報告されている (Tafalla et al., 2008)。大西洋サケの食細胞の細胞株である TO 細胞では、伝染性サケ貧血ウイルス (ISAV) もしくは polyI:C の刺激によって *I-IFN* 遺伝子および他のインターフェン誘導遺伝子の発現量が増加する (Pettersen et al., 2008)。しかしながら、魚類におけるウイルスの食作用による排除メカニズムはほとんど解明されていない。本実験では、polyI:C 刺激後でコントロールと比較して有意な差が出たがその増加は 1 時間目だけであり、またそれ以降の刺激時間では顕著な増加がみられなかったことから polyI:C 刺激では、トラフグの単球において *I-IFN* の産生を強く誘起するものではないと考えられる。

4.3.4. 単球増殖因子の発現動態

CSF-1 はキングョにおいてマクロファージの成長因子として中心的な分子であり、炎症誘発性の遺伝子の発現を誘起し、さらに抗菌性反応を増大させることが報告されている (Hanington et al., 2009)。ニジマスにおいては 2 つのタイプ (I 型と II 型) の CSF-1 が存在することが分かっている (Grayfer et al., 2009)。本研究では I 型の *CSF-1b* の解析を行った。I 型と II 型ではエクソン/イントロンの構造が異なっている (Wang et al., 2008)。I 型と II 型は脾臓と頭腎においてそれぞれ高い発現を示し、さらに哺乳類における CSF の誘導因子である PMA 刺激によって *I 型 CSF* 遺伝子の発現は減少することが示されている (Liu and Wu, 1992)。また、マクロファージの成長に加えて、ニジマス

の I 型 CSF はケモカインレセプターの *CXCR3* の発現を増加させる。このことから、*CXCR3* はマクロファージの遊走に関わる機能を持っていることが示唆されている。本研究では I 型の *CSF-1b* 遺伝子の解析を行った。TLR アゴニストの各刺激によって単球の貪食活性はどれも増加しており、活性化したことが示唆されている。刺激後に検討したサイトカイン遺伝子の中では最も顕著な増加がみられた。このことから、サイトカインの中でも特に *CSF-1b* は単球の分化・増殖に重要な役割を担っていることが考えられた。

5. 小括

これまでにサイトカインによる魚類の単球/マクロファージの機能制御に関する研究はコイ科やサケ科の数種だけであった。また、免疫刺激下における単球/マクロファージの網羅的なサイトカイン遺伝子の発現動態の解析は行われていなかった。それゆえ本研究ではトラフグの単球を対象に炎症性、抗炎症性、免疫抑制、抗ウイルスおよび成長制御にかかわるサイトカインの発現プロファイルを行った。

本研究によって、[1] トラフグの単球は TLR アゴニスト刺激によって活性化・分化することが示唆された。[2] 活性化・分化し、形態的に変化がみられた単球の細胞集団は未刺激の単球集団に比べ高い貪食活性を示した。[3] CSF-1b や IFN- γ のようなサイトカインはトラフグ単球における活性化に重要であり、[4] また炎症性サイトカイン遺伝子は、刺激する TLR アゴニストの種類によって異なる発現動態を示した。特に NF- κ B シグナルを制御し、単球を活性化する *IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-18*、*TNF- α* などのサイトカイン遺伝子の発現増加は TLR シグナル経路の活性化の可能性を示唆した。

以上のことから本実験から得られた結果はトラフグの単球は LPS、polyI:C および IMQ に対する TLR もしくは他の認識レセプターを有しており、サイトカインを介しての抗菌および抗ウイルス反応を制御していることが示唆された。また、TLR アゴニスト刺激によってヘルパーT 細胞の活性化を促進する IFN- γ 遺伝子の発現増加がみられたことから、抗原提示細胞として働き、またサイトカインによる免疫細胞間の制御機構の存在が示唆された。

第2章 トラフグにおける Th17 サイトカイン遺伝子の 分離・同定

1. 諸論

近年、炎症誘導性サイトカインとして知られている Interleukin-17A (IL-17A) が注目されている。IL-17A は 1995 年にマウス末梢血中の活性化 CD4 陽性 T リンパ球より始めて同定された (Rouvier et al., 1993)。当初は、cytotoxic T-lymphocyte-associated antigens (CTLAs) ファミリーのサブタイプであると考えられ、CTLA-8 とよばれていた。IL-17 ファミリーには IL-17A の他に IL-17B、C、D、E (IL-25) および F までが存在する (Moseley et al., 2003)。IL-17 ファミリーは 153~202 アミノ酸残基からなり、それぞれが IL-17A に 20~50%の相同性がある。IL-17A と IL-17F は相同性が高く、ヘテロダイマーを形成するなど構造上のにも機能的にも類似点が多いことが示唆されている (Benchetrit et al., 2002)。IL-17A の作用には、IL-6 や TNF- α といった炎症性サイトカインの発現誘導や上皮細胞からのケモカイン発現上昇を介した炎症局所への好中球の浸潤の誘導、骨髄細胞からの顆粒球形成誘導能などが知られている (Fig. 2-1) (Benderdour et al., 2002; Gaffen, 2004)。とりわけ関節炎、多発性硬化症、大腸炎などのマウス自己免疫疾患モデルで重要な役割を果たしていることが明らかになったことから、IL-17A は近年大きく注目されるようになった (Hata et al., 2002; Kolls and Linden, 2004)。また、IL-17 を産生するヘルパーT (Th17) 細胞は、細胞性免疫を担う Th1 型細胞やアレルギーなどの免疫応答に関与する Th2 細胞、あるいは免疫応答を抑制する Th3 細胞のどれにも当てはまらないユニークな T 細胞サブセットであることが解明さ

れている (Mesquita Jr et al., 2009; Schulz et al., 2008)。それに加えて、T 細胞受容体 (TCR) $\gamma\delta$ 型 T 細胞や均一なナチュラルキラー (NK) T 細胞などの非典型的 T 細胞からの産生も認められている (Oboki et al., 2008; Steinman)。従来からの Th1/Th2 細胞のバランスでは説明できなかった自己免疫疾患やアレルギー性疾患の発症抑制に IL-17 が関与することが近年明らかになっている (Oboki et al., 2008)。一方、感染症に対する防御免疫にもこの IL-17 が関与することがわかっている (Gaffen, 2009)。したがって、IL-17 は単に炎症誘導のみでなく、多彩な機能を発揮するサイトカインとして一づける必要があると考えられている。現在までに、IL-17 ファミリーと結合するレセプターも分離されている (IL-17RA, RB, RC, RD, RE) (Gaffen, 2009; Moseley et al., 2003)。これら IL-17 レセプターは、既存のレセプターには確認されない機能性ドメインが存在しており、リガンドとの結合およびシグナル伝達の研究が行われている (Shen et al., 2009)。魚類では、ゼブラフィッシュで初めて分離された (Gunimaladevi et al., 2006)。以後、ニジマス (Wang et al.) やサケ (Kumari et al., 2009)、無鰭類のヤツメウナギ (Tsutsui et al., 2007) などから分離されているが、まだ発見されていない IL-17 ファミリーのサブタイプもあることからさらなる研究が必要とされている。

そこで本研究では、トラフグを実験対象に、バイオインフォマティクスの技術を用いて IL-17 ファミリーの構造解析を試み、クローニング、半定量解析、発現解析を行った。また、他の魚類より分離・同定した新規 IL-17 ファミリーについては、利用可能なデータベースを用いて様々な生物種で探索した。

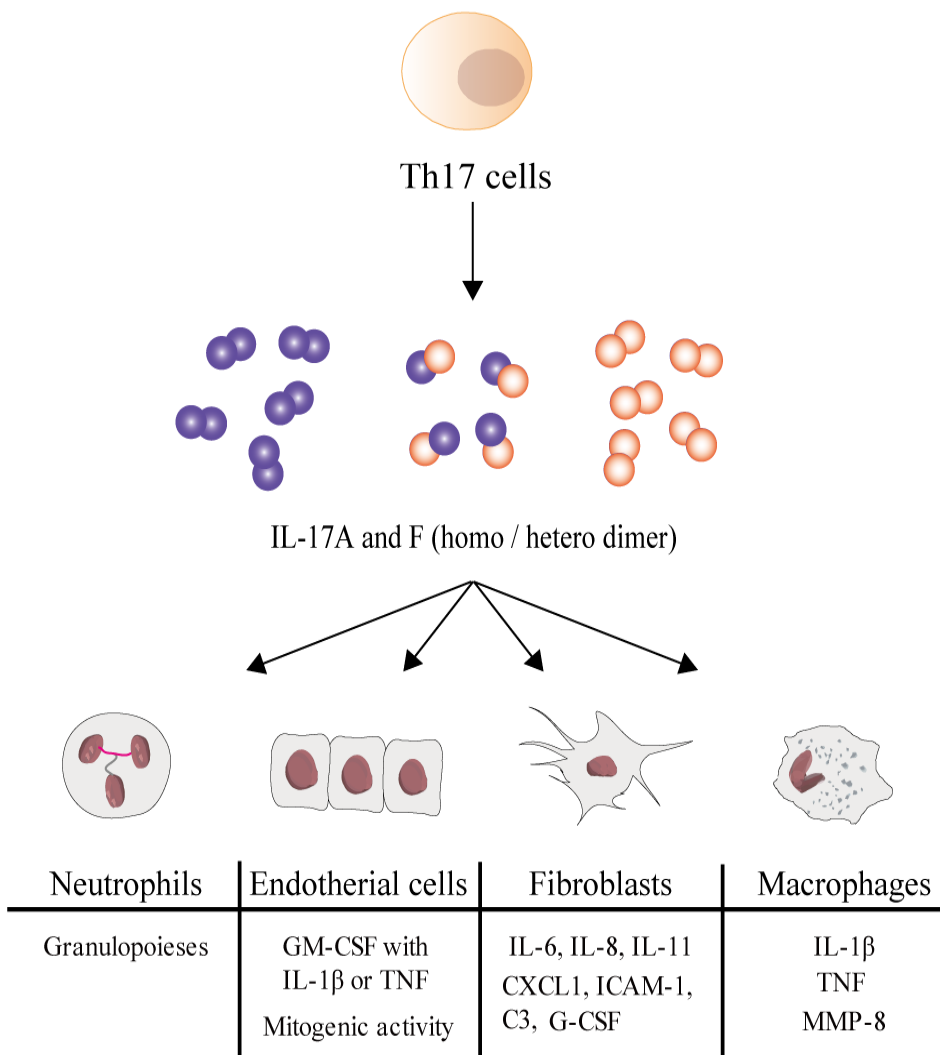


Fig. 2-1. T helper 17 (Th17) cells are a subset of CD4⁺ T cells defined by their ability to produce the cytokines IL-17A and IL-17F. IL-17A and IL-17F form not only homo-dimers but also hetero-dimers. These molecules promote the expression and production of various molecules like cytokine in various types of cell, neutrophils, endothelial cells, fibroblasts and macrophage.

2. 実験方法

2.1. *IL-17* ファミリー遺伝子の分離及び cDNA クローニング

トラフグゲノムデータベース (http://www.ensembl.org/TakiFugu_rubripes/Info/Index) より *IL-17* ファミリー遺伝子を検索した。哺乳類および魚類の既知の *IL-17* ファミリー遺伝子を用いて、BlastX (Altschul et al., 1990)により他の魚類の染色体上の位置 (コンティグ) を同定した。このコンティグより、*IL-17* ファミリー遺伝子をコードするエキソンおよびイントロンの構造を Genscan software [<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>] (Burge and Karlin, 1998)および softberry software (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) を用いて決定した。

また、無脊椎動物であるホヤやウニ、無鰭類であるヤツメウナギ、硬骨魚類であるゼブラフィッシュやスティックルバックなどにおいても分離されていない *IL-17* ファミリーがないか解析した。

宮崎県内の水産会社より購入した平均魚体 100 g のトラフグ (*Takifugu rubripes*) を用いた。それぞれの供試魚から摘出した各組織 (腸、脳、頭腎、心臓、皮膚、鰓、肝臓、脾臓、筋肉) をマイクロチューブに入れ、Total RNA を抽出し、cDNA を合成した。方法は第 1 章の 2.3 に記載している通りに行った。クローニングに使用した特異プライマーの配列、サイズは Table 2-1 に示した。

2.2. シンテニーおよび遺伝子構造解析

同定したトラフグ、メダカの *IL-17* ファミリー遺伝子座および他の生物の既知の *IL-17* ファミリー遺伝子座の類似性の比較を Blast、FASTA、Genscan などを用いて行った。また、エキソンとイントロンの構造の比較も行った。

2.3. 相同性および系統解析

BLAST Program (<http://blast.genome.jp/>) を用い、Genbank 上のデータベースと比較を行った(Altschul et al., 1990)。さらに得られた配列を基に相同性解析および系統解析を行った。アミノ酸配列の相同性 (%) は、BioEdit software (ver. 5.09) を用い clustal W プログラムによって解析を行った(Thompson et al., 1994)。系統樹は、MEGA ソフトウェアを用い、近隣結合法によって作製した(Page, 1996; Saitou and Nei, 1987)。また、シグナルペプチドの予測は、Signal P プログラム (バージョン 2.0.b2) を使用して、予測した(Nielsen et al., 1997)。

系統解析に用いた既知の IL-17 ファミリーのアクセッションナンバーは、以下の通りである。The accession numbers of the IL-17 family member sequences are as follows:
human IL-17A, NM_002190; human IL-17B, NM_014443; human IL-17C, NM_013278;
human IL-17D, NM_138284; human IL-17E, NM_022789; human IL-17F, NM_052872;
mouse IL-17A, NM_010552; mouse IL-17B, NM_019508; mouse IL-17C, NM_145834;
mouse IL-17D, NM_145837; mouse IL-17E, NM_080729; mouse IL-17F, NM_145856; rat
IL-17C, XM_001078615; rat IL-17F, NM_001015011; zebrafish IL-17A/F-1,
NM_001020787; zebrafish IL-17A/F-2, NM_001020798; zebrafish
IL-17A/F-3, NM_001020790; zebrafish IL-17C, NM_001020788; zebrafish IL-17D,
NM_001020789; cattle IL-17A, NM_001008412; chicken IL-17A, XM_426223; chicken
IL-17B, XM_425192; chicken IL-17F, NM_204460; lamprey IL-17, AB303391; oyster IL-17,
EF190193; trout IL-17A, AJ580842; trout IL-17C1, FM955453; trout IL-17C2, FM955454;
trout IL-17D, NM_001124399; catfish IL-17C, FD250752; frog IL-17B, NM_001006698;

frog IL-17D, NM_001114247; horce IL-17A, NM_001143792; horse IL-17E, XM_001918325; cow IL-17E, XM_605190; dog IL-17A, NM_001165878; dog IL-17C, XM_846163.

2.4. トラフグ *IL-17A/F* 遺伝子の各組織における発現解析

トラフグから脳、腸、頭腎、皮膚、心臓、肝臓、脾臓、鰓、筋肉の各組織を摘出し、mRNA 精製、cDNA の作製を行った。発現解析に用いた特異的なプライマーに Table 2-1 に示す。

2.5. 免疫賦活剤による *in vitro* 刺激

3尾のフグ（魚体重約 10 g）から摘出した頭腎組織をマイクロチューブにプールした。次に、スパチュラ、ステンレスメッシュを用いてそれらの頭腎組織をすりつぶし、そこへ 5% FBS、1% Streptomycin/Penicillin を含む RPMI 培地を 8 ml 加え、細胞浮遊液とした。得られた細胞浮遊液を 1×10^7 cells/ml に調整し、最終濃度が 10 μ g/ml の LPS (Sigma-Aldrich, USA)、PHA (Wako)、poly I:C (Sigma-Aldrich,)、Imiquimod (Lkt Laboratories, St. Paul, MN, USA) の 4 種類の免疫賦活剤をそれぞれ含む RPMI 培地を加え、穏やかに懸濁させた後、1ml ずつ分注した。それらを 22° C で静置し、1、3、6、9、12、24、48 時間で経時的に刺激した。刺激後、4° C、1500 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を除去した。また、もう 1 本の細胞浮遊液はコントロールとして 4° C、1500 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を除去した。cDNA の作製は、2-1-2 と同様である。

2.6. 発現遺伝子の半定量解析

RT-PCR を行ったのち、半定量解析時の PCR サイクル（プラトーに達していない状

態) を決定するために、*β-actin* および *IL-17* ファミリー遺伝子について、25~35 でサイクルをきざみながら PCR を行った。それぞれの PCR 産物を 3.0 %アガロースゲルで電気泳動し、適切なサイクル数を決定した。ファミリー決定したサイクル数で、*IL-17* ファミリー遺伝子および *β-actin* 遺伝子それぞれを特異的なプライマーを用い PCR を行った。PCR は下記反応溶液を作製し、免疫グロブリン遺伝子では 94°C で 1 分間のプレヒート後、94°C で 45 秒間の熱変性、58°C で 45 秒間のアニーリング、72°C で 45 秒間の伸長反応を 30 サイクル行い、ファイナルエクステンションを 72°C で 2 分を行った。*β-actin* では 94°C で 1 分のプレヒート後、94°C で 45 秒間の熱変性、60°C で 45 秒間のアニーリング、72°C で 45 秒間の伸長反応を 26 サイクル行い、ファイナルエクステンションを 72°C で 2 分を行った。サーマルサイクラーは C1000™ Thermal Cycler (BioRad, USA) を用いた。なお、使用した特異プライマーの配列等は Table. 2-1 に示した。

Table 2-1. List of primers used in this study

Primers	Sequence (5'-3')	Length	Information regarding primers
Adaptor oligo(dT)	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(dT) ₁₇	37	Cloning (3'-RACE)
Oligo(dG)	GGGGGGIGGGIIGGGIIG	18	Cloning (5'-RACE)
TrIL-17A/F1 F1	CCTCTACAGCTCGATCCAAA	20	Cloning (3'-RACE) and expression
TrIL-17A/F1 R1	ACTCCAGACGGAAGTGGTAA	20	Cloning (5'-RACE) and expression
TrIL-17A/F2 F1	GGCTCTGCTGATCAGTTGCA	20	Cloning (3'-RACE) and expression
TrIL-17A/F2 R1	TGGTCGGGATGCGGTTCTT	19	Cloning (5'-RACE) and expression
TrIL-17A/F3 F1	ATGCAGGTGGTGTCTGGGAA	19	Cloning (3'-RACE) and expression
TrIL-17A/F3 R1	TTCCTCAGAAGAACCTGTGTAT	22	Cloning (5'-RACE) and expression
Trβ-actin Fw.	ATCGTTGGTCGCCCCAGGCACC	22	Expression
Trβ-actin Rv.	CTCCTTGATGTCAGCACGATTTC	23	Expression

3. 結果

3.1. トラフグ *IL-17A/F* のクローニング

ゼブラフィッシュやヒトなどの既知の *IL-17A/F* のタイプを鋳型とし、トラフグのゲノムデータベースから BLASTX プログラムにより解析を行った。その結果、フグの *IL-17* ファミリーを含む 2 つの scaffold (Scaffold_1 および-143) を同定した。これらの scaffold から、3 つの *IL-17A/F* 様の遺伝子を同定した。本研究では、これら 7 つの *IL-17* ファミリーを解析の結果から *Fugu IL-17A/F-1*、*IL-17A/F-2* および *IL-17A/F-3* と命名した。Scaffold_1 には、*Fugu IL-17A/F-1* および *IL-17A/F-2* が位置していた。他の *Fugu IL-17* ファミリーはそれぞれ別の scaffold 上に位置していた。PCR 法および RACE 法により得た 3 つの *Fugu IL-17A/F* の塩基配列は DDBJ に登録した (AB522594、AB522595、AB522596) (Fig. 2-2)。

Fugu IL-17A/F-1 遺伝子は 124bp の 5' UTR、483bp の open reading frame (ORF) と 418 bp の 3'-UTR から構成されていた。また、3' UTR には、polyadenylation signal (AATAAA) と 7 つの mRNA instability motifs (ATTTA) があることが確認された。*Fugu IL-17A/F-2* 遺伝子について、cDNA は、435bp の ORF から構成されていた。さらに、UTR 領域では、5' UTR は 49bp、3'-UTR では 235bp であった。*Fugu IL-17A/F-3* の cDNA は 468bp の ORF、174bp の 5' UTR、140bp の 3'-UTR から成り立っていた。一つの polyadenylation signal と 7 つの mRNA instability motifs が *Fugu IL-17A/F-3* の 3' UTR で同じく確認された。cDNA の塩基配列からトラフグの *IL-17* ファミリーのアミノ酸残基は、*Fugu IL17A/F-1*、*A/F-2*、*A/F-3* がそれぞれ 160aa (アミノ酸残基)、144aa、158aa、であることが推測された。また、signal P を用いた解析結果から、トラフグの *IL-17* ファミリーのシグナルペプチドは、それぞれ 25、24、19aa であることが推測された。

3.2. アライメント解析および相同性解析

脊椎動物で既知のIL-17ファミリーとのアライメント解析の結果、魚類においても立体構造の形成に重要なシステインがよく保存されていた (Fig. 2-2,)。しかしながら、*Fugu IL-17A/F-2*に関してはこのシステインが2個欠損していた。

3.3. IL-17 ファミリーのゲノム構造解析

トラフグの *IL-17A/F* 遺伝子は、*IL-17A/F-3* を除き 3 つのエキソンと 4 つのイントロンより構成されていた。また、トラフグの *IL-17A/F-3* は、4 つのエキソンと 5 つのイントロンより構成されていた (Fig. 2-3)。

3.4. IL-17 ファミリーのシンテニー解析

哺乳類において *IL-17A* および *-F* は、同一染色体上に隣り合って位置している。魚類においてもフグ、メダカ、ゼブラフィッシュが隣り合って位置していた。また、フグの *IL-17A/F-1* および *A/F-2* が位置する scaffold 上に *ZNF395*、*TFIIA* および *XABI* 遺伝子が位置していた。これら遺伝子は、メダカ、ゼブラフィッシュ、ヒトの *IL-17A/F* の周辺によく保存されていた (Fig. 2-4)。

3.5. IL-17 ファミリーの系統樹解析

分離同定した遺伝子の系統解析は、哺乳類、鳥類、硬骨魚類、無鰭類および無脊椎動物において既知の *IL-17* ファミリーおよびトラフグより同定した他の *IL-17* ファミリーを含めて、近隣結合法によって行った (Fig. 2-5)。系統解析により、魚類の *IL-17* ファミリーは、既知のホモログとクラスターを形成することが確認された。無鰭類で

あるヤツメウナギの IL-17 は、IL-17D と明確なクラスターを形成しなかった。

3.6. トラフグの各組織における *IL-17* ファミリーの発現

フグの各組織における *IL-17* 遺伝子の発現解析の結果、*IL-17A/F-3* はほぼすべての組織において発現していることが確認されたが、他の *IL-17* ファミリーは組織によってはまったく発現していないものがあった (Fig. 2-6)。

3.7. 免疫賦活剤刺激によるトラフグの頭腎における *IL-17* ファミリーの発現動態

LPS、poly I:C または PHA を *in vitro* 刺激後の頭腎における *IL-17* ファミリー遺伝子の発現動態の結果、刺激後 4~8 時間などの短時間で発現が上がることが確認された。また、各ファミリーでは免疫賦活剤の種類によって発現動態が異なることが確認された (Fig. 2-7)。


```

--signal peptide--
#
Fugu IL17A/F1 ----MGHSKATMTVGMGLAVMMVAALAAALPRPGGHLKRKSVKANKKSPAVMETVPLQLDPKNLVVTQNI RPLE---NVSISPWTYNISR DAS-LFPPLAE 92
Fugu IL17A/F2 ----.VLRSCSVVALLISCSALWGFSSHSSR.K-----PPPP..KCDAM.AFSSQTS.S.---SEGAGA-IHSR.L...RWRSTTVKNRIPTT.W. 81
Fugu IL17A/F3 ----MQVV.GTLLLL.L..LLHAARN--VKSRQ-----Q.RPKGRRLR.EI..SVWPELSSMTAPSLA-.R.L.....TG.SEE.RFPRWIYS 81
Medaka IL17A/F1 ----MF.ATSFCKE.GRGQKAPL..MMM-----MMRMM.TEAAAV.KASK...L...SA..P.RI...Q---.....T.S.S.L.M.A.S. 87
Medaka IL-17A/F2 ----.ELPHTSICIL.VICCSLR-FSSCSDEG-----VLHP-.DCNV.LQFSSEIFS.---SRGNGN-IHQ R.M...RWRSTTVRHRIPST.W. 79
Medaka IL-17A/F3 ----MLLVLR.LLLL.L.SLEHAKKSQTFPARL-----QGPKYR.LKVS...SVM PQFYVSTSNLA-.S.L.....RENYNS.R.PK SIS. 83
Zebrafish IL17A/F1 ----MS.ALNLRFL.V.C..GLVLISFGAEG--ASVRS DQ.NKNSH.EADHSYR.V..AEFKAS.NP.H.IN---D.....MFTHNE.LYPTSI.. 90
Zebrafish IL17A/F2 ----.FLNFFSAKYL.V.LGCALARLTI.QQE-----QNRLCDTALTISN.FNGSQSEDKGNGS-IH.R.L.A.NWIPKFSPHRIPQVIF. 81
Zebrafish IL17A/F3 MRLSRVFRVLLLLFLMLLLDAALSENRTKRKRC SGV.KCTS.GC..RCQRK.AWVI.N-SAWDNIMSDT.S--P-DR.L.....TT.V.E.RIPSTIS. 96
Trout IL17A ----.ELKSN-VSKYL VCCVSM LGLTMAKG-----MKVTKERCN..LIIPS.FYKIPT ESEGN GN-IHTR.L...WKSTTVENRIPQTMW. 84
Human IL17A ----.TPG.TSLVSL.L--LSLE.IVK.GIT-IPRNP GPCPNSED.NFPRT--MVN.NIH.RNTNT.PKRSSDYY.R.T...NLHRNE.PERYPSVIW. 91
Human IL17F -MTVKT LHGPA.VKYL.LSILGL.F.SE.AA.KIPKVGHTFFQKPE.CPPVPGGSMK..IGIINEN.RVSM SRNIESR.T...N.TVTW.PNRYPEVVQ 99

#
Fugu IL17A/F1 ARCLFRGCLD-SEGQE--DQSLESKPIMRQVLLLRKVSSEEGAGHS-----YHFRLESRLVAVGCTCIRPVLHHQ 160
Fugu IL17A/F2 .E.TS.FSSGPRL-GQPEVHN.N.V..YQNI.V.TRQNN S-----HCYTASFQ.....SV.ATIS.S- 144
Fugu IL17A/F3 .Q..TAS..SLRGE G.--AA..AA..YYPT.V.HR.PKQRK.NKKKGRSSREK.E.Q.RTAV.S...V..T.IPQ. 158
Medaka IL17A/F1 ...L...N-L..K--L...R...H...V..R.R--A...-----DYH...I...VK...QVQ. 152
Medaka IL-17A/F2 .E.DSIF.SNPTS-GQPK.Y..N.V..YQNI.V.NH.KGS-----HCYTASYH.....VWARSNQT- 142
Medaka IL-17A/F3 .E.QTS..I--RD.V.--DA..A...QY.I.V.YR.QKQSV.KKKKKSR-K.D.M.GTQVIT...V..S.ITQ. 157
Zebrafish IL17A/F1 .K.SLT...--ID.V.--V.DY...YT.IMV..RIR---.EKPN-----S.K..YKTI...V..Y.EQL- 153
Zebrafish IL17A/F2 .Q.SSEY.I LPTG----V.KR.N.V..YQDI.V.KQEMERK-----KC..AMFEK.I...V.AKTS--- 140
Zebrafish IL17A/F3 .K.EK...T-KD.E.--LG...Q..YY.INI..R.KKKNST-----F.ALK..TKK.S...VL.I..PQN 162
Trout IL17A .E.SSMY.VYPTNRSQYMYRQN.V..YQ..VV.YTSATR-----KCYSASFLS.....AWARTT--- 146
Human IL17A .K.RHL..IN-AD.NV--YHMN.V..QOEI.V..REPPHCPN-----S...KI..S...VT.I.H.VA 155
Human IL17F .Q.RNL..IN-AQ.K.--I.MN.V..QOET.VV.RKHQGCSV-----S.Q..KV..T...VT..IH.V. 163

```

Fig. 2-2. Alignment of the deduced amino acid sequence of *Fugu IL-17* family genes with other known *IL-17* family genes. Sequence comparison of IL-17A and F among *Fugu*, medaka, zebrafish, rainbow trout and human. The dots (.) indicating identity and dashes (-) introduced for optimal alignment are restricted to the individual groups. The predicted signal peptide is highlighted. Cysteine residues important in forming disulfide bonds are boxed and connected with line. The conserved serines are indicated by hash (#)

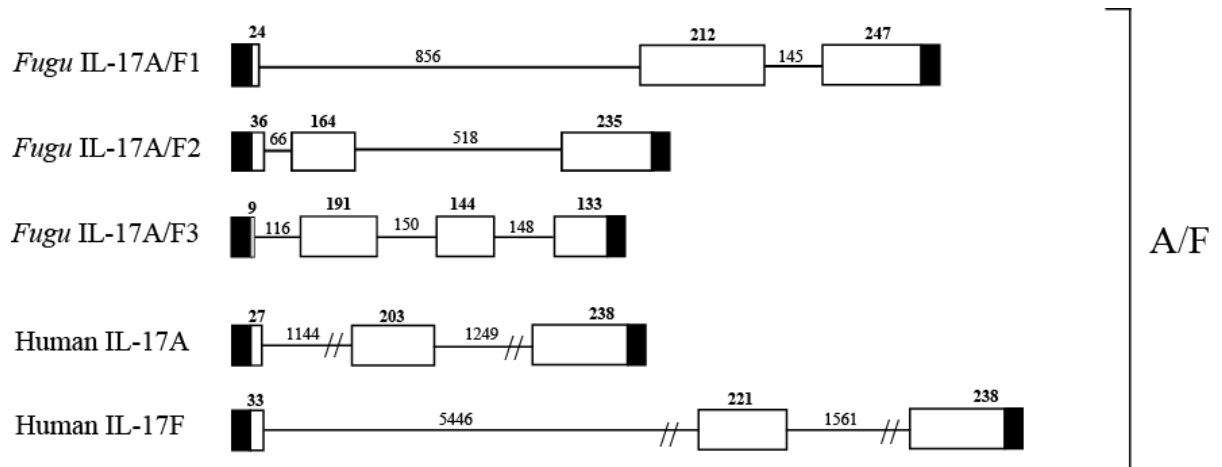


Fig. 2-3. Comparison of the intron/exon sizes between human *IL-17* A/F genes (introns are reduced) and the *Fugu IL-17A/F* genes. The thin line represents the introns and the open boxes indicate the exons of the respective genes. Closed boxes indicate UTR regions. The gene organisation of human *IL-17* genes were obtained from NCBI Human Genome Resources (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human>) .

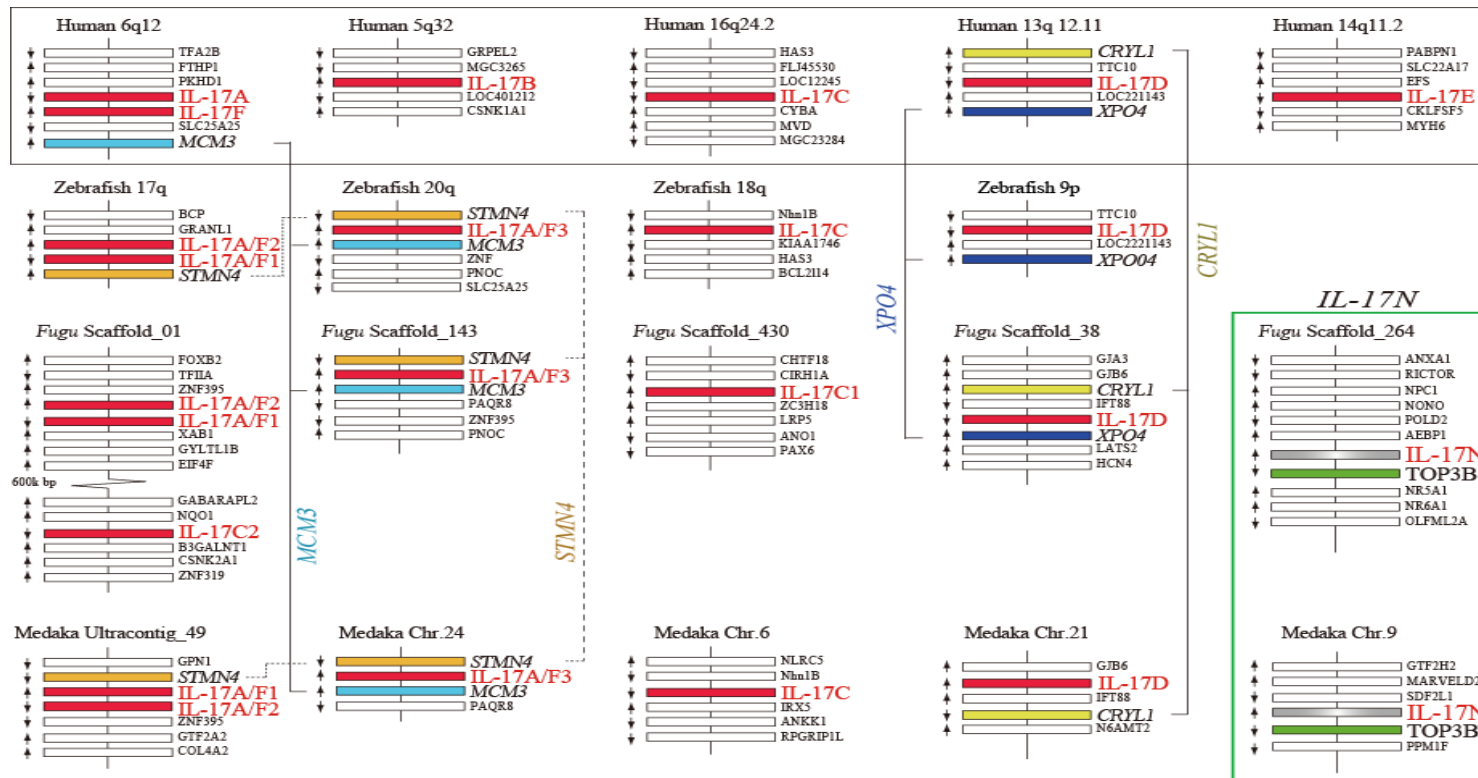


Fig. 2-4. Schematic representation of synteny between zebrafish, *Fugu* and human IL-17 family genes. Chromosome numbers on which human *IL-17* family genes are localized: *IL-17A/F* (6p12) , *IL-17B* (5q24) , *IL-17C* (16q24) , *IL-17D* (13q11) , and *IL-17E* (14q11) zebrafish *IL-17* family genes are located: *IL-17A/F-1* and *-2* (17q) , *IL-17A/F-3* (20q) , *IL-17C* (18q) and *IL-17D* (9q) ; *Fugu IL-17 family* genes are located: *IL-17A/F-1*, *2* and *C2* (scaffold_01), *IL-17A/F-3* (scaffold_143), *IL-17C1* (scaffold_430), *IL-17D* (scaffold_38) and *IL-17N* (scaffold_264) . Arrows indicate the transcriptional orientation.

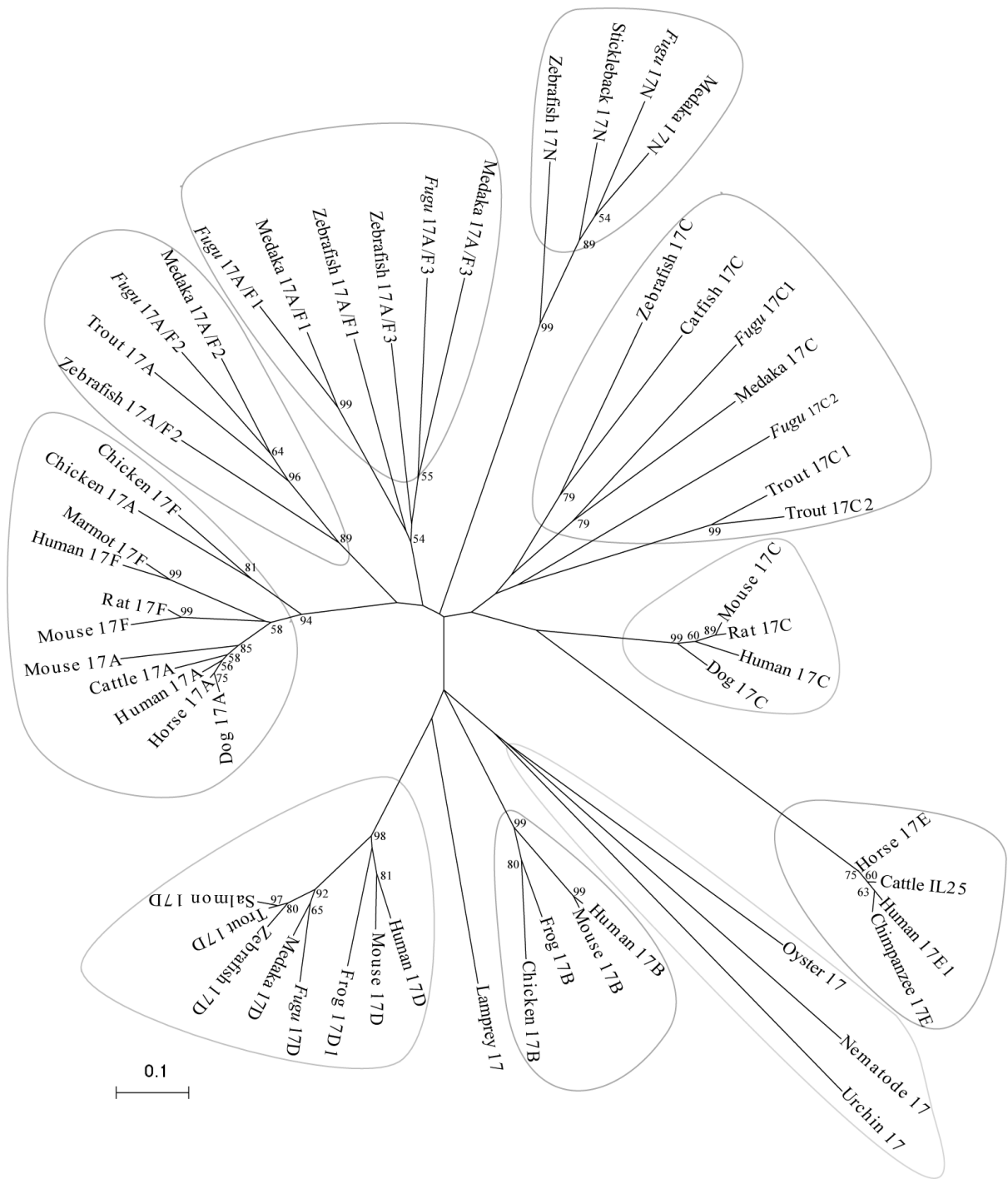


Fig. 2-5. Phylogenetic analysis of fish *IL-17* with other known *IL-17* family members. This tree was constructed by the neighbor-joining method using the ClustalX v1.81. The numbers indicate the bootstrap confidence values obtained for each node after 1000 replications. Only confidence probability values >50% are listed.

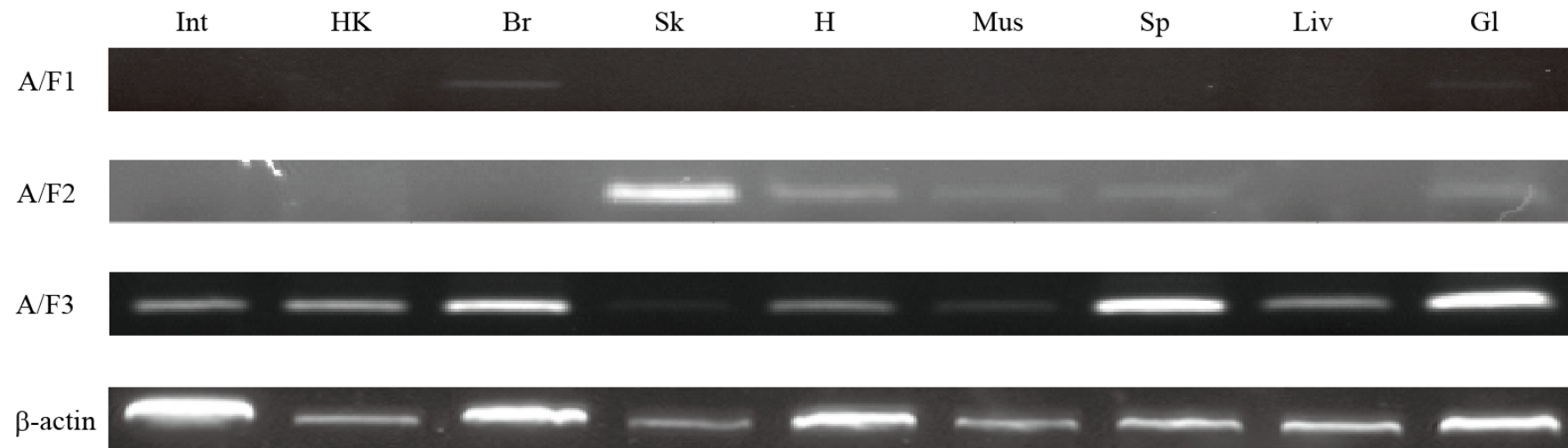


Fig. 2-6. Expression analysis of the *Fugu IL-17 family* genes. RT-PCR was performed using primers specific for *Fugu β -actin* and *IL-17 family* genes with cDNA from a variety of tissues from a healthy fish (Int, intestine; HK, head kidney; Br, brain; Sk, skin; Hrt, heart; Mus, muscle; Sp, spleen; Liv, liver; Gl, gill) .

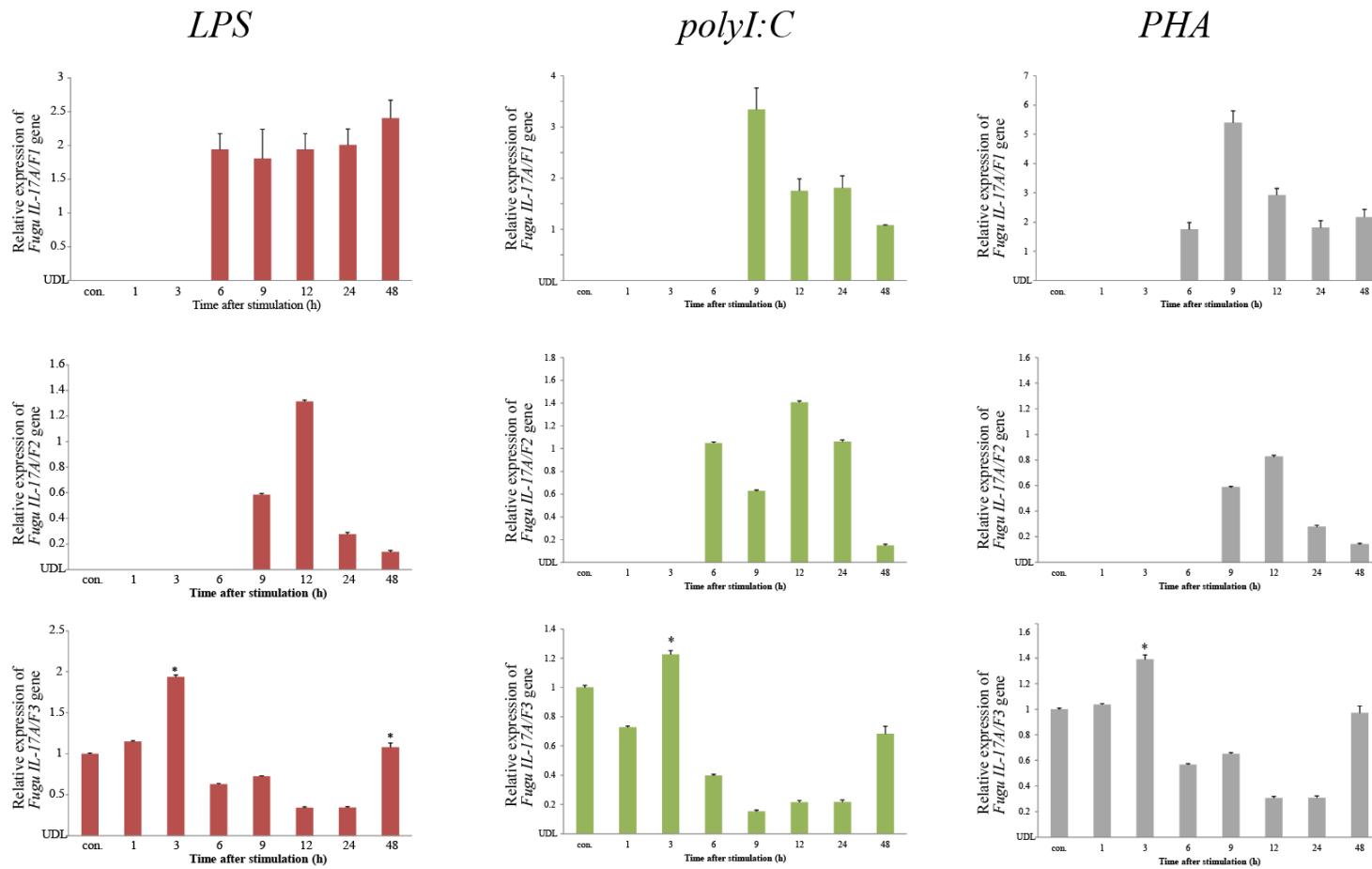


Fig. 2-7. Quantitative PCR analysis of the *Fugu IL-17* family genes in head kidney cells *in vitro* stimulated with LPS, polyI:C or PHA. PCR was performed using primers specific for the *Fugu* β -actin and *IL-17* family gene with cDNA synthesized from head kidney cells incubated with 10 μ g/mL of LPS, polyI:C or PHA for 0 (control), 1, 3, 6, 9, 12, 24 or 48 h. Data are presented as mean \pm SD of triplicate samples. * = $P < 0.01$ compared to the control.

4. 考察

哺乳類において、6つの IL-17 ファミリーメンバー (IL-17A-F) が同定されている。その中でも Th17 細胞が産生する IL-17A と IL-17F に関する研究が進められている (Weaver et al., 2007)。魚類においては、IL-17A、C、D、F のホモログはゼブラフィッシュ、ニジマスなどから分離・同定されているものの、IL-17B および IL-17E に相同性のある分子は見つかっていない (Gunimaladevi et al., 2006)。本研究において、トラフグから3つの IL-17A/F (*Fugu IL-17A/F-1*、*IL-17A/F-2* および *IL-17A/F-3*) の分離・同定を行った。構造解析の結果からメダカおよびトラフグの IL-17 ファミリーは魚類を含む他の脊椎動物で既知のオースログと類似点が多数あった。トラフグにおいて *IL-17A/F-1* および-3 の 3' UTR 領域で mRNA インスタビリティーモチーフ (ATTTA) が確認された。このモチーフは TNF- α のような炎症メディエーターをコードする遺伝子に典型的に存在する (Savan and Sakai, 2006b)。また、ヒトやマウスの IL-17 ファミリーにも存在することが確認されている (Yao et al., 1995)。このことから、フグの *IL-17A/F-1* および-3 は、炎症反応に関わっていることが示唆された。

アライメント解析からトラフグ IL-17A/F に重要な特性が種間で保存されていることが明らかになった。それぞれの IL-17A/F メンバーにおいて C 末端領域は、他の脊椎動物および無脊椎動物の IL-17 で高い保存性を示している。しかしながら、N 末領域においては生物間での高い保存性はあまり見られない。トラフグおよびメダカにおいても C 末端領域での高い保存性および N 末端領域での低い保存性が確認された。また、トラフグ *IL-17A/F-1* および-3 は、典型的な 4 つのシステインも他の生物の IL-17 ファミリーと同様によく確認された。ヒトにおいて、これら 4 つのシステインは、2 つ

のジスルフィド結合に関わっており、立体構造の形成に重要な働きを示すことが分かっている (Witowski et al., 2004)。しかしながら、トラフグの IL-17A/F-2 はこの 4 つのシステインのうち、2 番目のシステイン (in human IL-17A Cys99) および 4 番目のシステイン (in human IL-17A Cys146) が欠損していた。魚類において既知の IL-17 ファミリーを含めてこの 4 つのシステインは、すべてのメンバー間で保存されている。そのため、*Fugu* IL-17A/F-2 は他のファミリーとは異なった構造を取ることが考えられ、機能面での相違点もあると考えられる。唯一、*Fugu* IL-17A/F-2 だけ欠損している理由は現段階では不明であるが、まだ同定されていない他の生物種の IL-17 ファミリーは多く、さらなる解析を行うことでこの欠損の意味が見出せる可能性がある。さらに、2 つのセリン残基 (in human IL-17F Ser80 and Ser120) も高次構造の形成に重要であることがヒトの IL-17F で報告されている (Hymowitz et al., 2001)。また、このセリンはヒトの IL-17 ファミリー間ですべて保存されている。また、トラフグおよびメダカの IL-17 ファミリーにおいても、このセリン残基はよく保存されていた。これらの結果から、トラフグおよびメダカの IL-17 ファミリーは、ヒトなどの高等脊椎動物と類似した高次構造を形成し、ヒトの IL-17 ファミリーと類似したレセプター結合および活性を示すことが示唆された。ヒトにおいて、IL-17A および IL-17F のホモダイマーまたはヘテロダイマーは IL-17 レセプターである IL-17RA-RC の複合体に結合する (Lubberts et al., 2005)。しかしながら、魚類の IL-17 ファミリーの高次構造に関する解析はほとんど行われていない。IL-17 ファミリーの高次構造の形成やタンパク質レベルでのリガンドとレセプターの相互作用などの研究により魚類の IL-17 ファミリー間での構造および機能の違いに関しての知見を得られると考えられる。

ゲノム構造の解析から、トラフグの *IL-17A/F* のタイプはヒトやゼブラフィッシュと類似した構造を形成していた。エクソン数およびイントロン数は、トラフグの *IL-17* ファミリーはヒトのオーソログと類似していた。このことから、進化の過程でゲノム構造はよく保存されていると考えられる。また、*IL-1 β* (Zou et al., 2004a)、*IL-10* (Dumoutier et al., 2000)などの魚類サイトカイン遺伝子においても、ヒトのオーソログとゲノム構造が類似していると報告されている。しかしながら、*IL-17A/F-3* に関してはヒトのオーソログと異なり、他の生物種のオーソログでいえば1番目のエクソンが2つに分かれた4エクソン、3イントロンの構造であった。また、ゼブラフィッシュの *IL-17A/F-3* は、ヒト同様に3エクソン、4イントロンの構造である。このことから、魚類間でもゲノム上での再編成があると考えられる。

魚類および他脊椎動物のゲノム間の構造類似性（シンテニー）の解析はいくつものサイトカインの同定に用いられてきた。本研究においても同定したトラフグの *IL-17* ファミリーのシンテニー解析を行った。ヒトの *IL-17A* および *-F* は、6番染色体上に隣り合って存在しており、*IL-17A* または *-F* は遺伝子重複によって生じたとされている (Aggarwal and Gurney, 2002)。ヒト以外にも高等脊椎動物の *IL-17A* および *-F* は隣り合っていることが分かっている。魚類においてもゼブラフィッシュで *IL-17A/F-1* および *A/F-2* が隣り合っていることが報告されている (Schulz et al., 2008)。本研究で同定したトラフグおよびメダカの *IL-17A/F-1* および *IL-17A/F-2* も隣り合って存在していた。魚類間での *IL-17A/F-3* は、ゼブラフィッシュ同様にトラフグおよびメダカにおいても *IL-17A/F-1* および *IL-17A/F-2* とは異なった染色体上に位置していた。また、*minichromosome maintenance deficient 3 (MCM3)* 遺伝子がヒト *IL-17F* および魚類

IL-17A/F-3 の上流にそれぞれ位置していた。*stathmin-like 4* (*STMN4*) 遺伝子に関して、ゼブラフィッシュおよびメダカの *IL-17A/F-1*、*A/F-2* および *IL-17A/F-3* の染色体上にそれぞれ存在していた。これらのことから、魚類において *IL-17A/F-1*、*-2*、*-3* は祖先分子からゲノム重複や染色体再編成によって生じた分子であることが示唆された。

系統樹は、ゲノムデータベースおよび cDNA クローニングによって分離した魚類の IL-17 ファミリーおよび既知の IL-17 ファミリーを用いた。魚類 IL-17A/F のタイプが哺乳類や鳥類のオースログと同じクラスターを形成した。魚類では IL-17A/F は 2 つのタイプに分かれた。1 つは、ニジマス *IL-17A* を含む *A/F-2* のタイプ、もう 1 つは、*IL-17A/F-1* と *IL-17A/F-3* のタイプである。これらの遺伝子は同一遺伝子から発生したと考えられているが、異なった生理機能を持つかどうか魚類においてはさらなる機能解析が必要である。

トラフグの各組織における *IL-17A/F* 遺伝子の発現動態は異なっていた。ヒトやマウスなどの哺乳類でも各組織での発現動態はかなり異なっていることが報告されている。ゼブラフィッシュや大西洋サケなどでも組織間での発現量はかなり異なっている。また、トラフグとメダカ間での *IL-17A/F* の発現動態も異なっていることが確認された (data not shown)。さらに、ゼブラフィッシュとも *IL-17A/F* の発現動態は異なっていた。これらの結果から、魚類の *IL-17A/F* は、各メンバーで機能が異なっており、魚種間では、機能が異なることが示唆された。

サイトカイン遺伝子は、多くの場合、外界からのシグナル、たとえば抗原刺激による細胞の活性化により誘導的に発現する。どのような種類のサイトカイン遺伝子をどれくらいの量、どのようなパターンで発現するかは、その細胞群の免疫応答における

役割を決定するため、本研究では LPS、poly I:C および PHA で *in vitro* 刺激を行った。刺激後の発現量これら結果は、IL-17 ファミリーが炎症に関与していることを示唆するものである。特に、*IL-17A/F-1* および *IL-17A/F-2* は、刺激前ではほとんど発現していないことから、炎症に関する反応が他のタイプと比べ強いと考えられている。また、無脊椎動物であるオイスターから同定された *IL-17* (*oyster IL-17*) は、LPS 刺激で増加することが確認されている (Roberts et al., 2008)。さらにゼブラフィッシュや大西洋サケから同定された *IL-17* ファミリーも LPS 刺激後に短時間で発現が増加している (Gunimaladevi et al., 2006; Kumari et al., 2009)。トラフグの *IL-17* ファミリー間で発現が増加する時間が異なっていた。これら結果は、免疫応答に違いがあることを示唆するものである。polyI:C 刺激後の発現動態も急激に増加しているものがあつた。ウイルス感染に関しても重要な働きを示すことが示唆された。PHA 刺激は、poly I:C や LPS 刺激に比べると発現量の増加が顕著ではなかった。PHA 刺激は、他のタイプに比べ、*IL-17A/F* のタイプでは、発現量は顕著に増加した。PHA は、T 細胞に対して刺激を行うことが報告されている (Lin et al., 2006)。このことから、魚類においても *IL-17A/F* のタイプは哺乳類同様に Th17 サイトカインであることが示唆された。

5. 小括

魚類ゲノムデータベースの解析を用いて、トラフグより5つのサブタイプ (IL-17A, F, C, D, N) を同定した。また、他の脊椎動物のデータベースの解析から、IL-17N は魚類においてのみ存在するタイプである可能性が示唆された。IL-17 遺伝子の組織における発現は、腎臓や脾臓などのリンパ組織だけでなく、脳などを含む様々な臓器において確認された。また、各 IL-17 遺伝子の発現パターンは、魚種間で大きく異なることが確認された。さらに、トラフグ IL-17 遺伝子の発現量は、LPS や poly I:C 刺激によって顕著に増加することが確認された。また、各サブタイプの発現パターンは、免疫刺激によってそれぞれ異なっていた。以上の結果より、IL-17 は、免疫反応に重要な働きをする分子であると考えられた。さらに、各サブタイプの機能は、それぞれ異なっていることが示唆された。また、A/F のタイプが3種類、C が2種類、さらに IL-17N が存在することから、魚類の IL-17 は哺乳類と比べ機能が多様化している可能性が示唆された。

第3章 サイトカインによるトラフグ CD4⁺T 細胞の制御機構

1. 緒論

脊椎動物は微生物やウイルスなどの異物から自己を守るために、高度な防御機構を備えている。その機能は大きく自然免疫系と獲得免疫系の2つに分けられる。自然免疫は昆虫などの無脊椎動物にも共通に有する非特異的防御機構であり、皮膚や粘膜のような物理的障壁、単球/マクロファージや好中球のような食細胞、抗原提示細胞としても働く樹状細胞、リンパ球の一種であるNK細胞などによって担われている (Alisa et al., 2008)。一方、獲得免疫は特異的防御機構であり、抗原に特異的な抗体 (免疫グロブリン) を産生し、異物排除を担うB細胞と、抗原特異的に攻撃する細胞障害性 (cytotoxic) T (CTL) 細胞およびこれらの獲得免疫系を制御するヘルパーT (Th) 細胞に大別される。Th細胞による免疫反応は α および β 鎖、あるいは、 γ および δ 鎖で構成されるT細胞レセプター (TCR) およびTCRのco-receptorであるCD4分子を介して抗原提示細胞上のMHCクラスII分子上に提示された抗原を認識する (Laurent et al., 2010)。抗原を認識したTh細胞は、抗原提示細胞およびTh細胞自身が産生するサイトカインによって活性化し、様々な機能を発揮する。活性化したTh細胞はそれぞれ特異的に産生するサイトカインの種類に応じてTh1、Th2、Th17およびTregなどのサブセットに分類される (Rendon and Choudhry, 2012; Serrano Hernandez, 2009)。各サブセットは、互いにバランスを取りながら免疫反応を担っている。近年ではこれら4種類のサブセット以外にもTh3、Th9、Th22、Tr1、TfhといったTh細胞が同定されており、これら新しいサブセットの発見は、これまでの免疫に関与するサイトカインの働きに

対する概念を大きく変えている (Soroosh and Doherty, 2009)。哺乳類における Th 細胞の研究は盛んであるが、哺乳類以外の特に下等脊椎動物における研究は CD4 に対する抗体がほとんど作製されていないために進んでいない現状にある (Laing and Hansen, 2011)。現在までのとこと、魚類においては、抗 CD4 抗体を用いた CD4⁺細胞の分取に関する研究は 2 例しか報告がない (Toda et al., 2011; Wen et al., 2010)。

硬骨魚類において、CD4 は、CD4 (CD4-1) と CD4REL (CD4L あるいは CD4-2) の 2 つのタイプが知られており、トラフグ (*Takifugu rubripes*) (Suetake et al., 2004)、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) (Laing et al., 2006)、コイ (*Cyprinus carpio*) (Sun et al., 2007)、ナマズ (*Ictalurus punctatus*) (Edholm et al., 2007)、ヨーロピアンシーバス (*Dicentrarchus labrax*) (Buonocore et al., 2008)などの多くの魚種から同定されている。哺乳類の CD4 は細胞外、トランスメンブレンおよび細胞質ドメインの大きく 3 つのドメインから成り立っている (Horejsi, 2003; Yu et al., 2002)。さらに細胞外ドメインは 4 つの免疫グロブリン (Ig) 様ドメインから構成されている。細胞質ドメインには T 細胞の活性化に重要なチロシンキナーゼ p56lck と会合する結合部位が存在する。哺乳類と同様に、魚類の CD4 においても 4 つの Ig 様ドメインを持つ細胞外領域を持つことが予測されているが、CD4REL に関しては 2 つもしくは 3 つの Ig 様ドメインが存在することが示唆されている (Laing et al., 2006)。細胞外領域の構造は異なるが、p56lck との結合サイトが CD4、CD4REL とともに保存されている (Laing and Hansen, 2011)。p56lck は TCR シグナル伝達の開始にとって重要であり、魚類の 2 つの CD4 分子についても、哺乳類同様の機能を有しているものと示唆されている (Buonocore et al., 2008; Sun et al., 2007)。いくつかの魚種における CD4 遺伝子の発現解析からも、魚類の CD4⁺

細胞は哺乳類と同様の機能を有していることが示唆されている (Nonaka et al., 2008; Wen et al., 2006)。また、P56lck 以外のチロシンキナーゼである fyn は CD3 と会合し、Th 細胞の活性化に重要であるが、魚類の CD3 においても結合部位が保存されている (Overgard et al., 2009)。これら報告は魚類 Th 細胞の機能においても哺乳類同様であることを示唆している。魚類 CD4⁺細胞を分取したミドリフグにおける報告では、CD4REL⁺細胞の Treg 様の機能の可能性があることを示している (Wen et al., 2010)。また、Toda らはギンブナにおける CD4⁺細胞は哺乳類同様の Th 細胞であることを示唆している (Toda et al., 2011)。しかしながら、魚類における CD4⁺T 細胞サブセットによって産生されるサイトカインの発現動態に関しての知見はほとんどなく、サイトカインによる分化誘導などの解析も行われていない。前章において Th17 が産生するサイトカイン ; IL-17A/F のタイプが分離・同定された。このことからすでに同定されているサイトカインを含めて、研究対象であるトラフグのヘルパーT 細胞の機能解析を行う上で必要なサイトカインが揃うことができた。

そこで本章では、まずトラフグの CD4 に対する抗体を作製し、Th 細胞の分取を試みた。次に、それぞれの Th サブセットが産生するサイトカイン遺伝子の免疫刺激後の発現動態をマルチプレックス RT-PCR アッセイによって明らかにした。さらに、哺乳類における Th1/Th2 に着目し、分化誘導に関わるサイトカインの組換え体を作用させ、Th 細胞のサイトカイン産生パターンを解析し、魚類における Th 細胞の分化誘導機構について解析を行った。

2. 実験方法

2.1. 供試魚

宮崎の松本水産から購入した平均魚体重 600 g のトラフグ (*Takifugu rubripes*) を用いた。トラフグの飼育は第 1 章と同様に行った。

2.2. 抗トラフグ CD4 抗体 (*anti-Fugu CD4 Ab*) の作製および特異性の確認

2.2.1. 抗体の作製およびアフィニティー精製

トラフグの CD4 に対して特異的な抗体を作製するために、特徴的なペプチド配列を認識するペプチド抗体を用いることにした。まず、トラフグ CD4 (NP_001072091) の細胞膜外領域でエピトープとして最適なペプチド配列;NKVIKHENWDTALSD を合成し、キャリアタンパク質としてスカシ貝ヘモシアニン (KLH) をコンジュゲートした。次に、ウサギにコンジュゲートした合成ペプチドを複数回注射した。最初の注射から 49 日後に採血し抗血清を集めた。ペプチドの合成からと抗血清の作製は (株) オペロン (Tokyo, Japan) に依頼した。

抗血清の反応性および特異性を上げるために抗原ペプチドを固定化したアフィニティーカラムを用いて精製を行った。まず、アフィニティーカラムの作製は 1.0 g の CNBr-activated Sepharose 4B (GE Healthcare) を遠心管に秤量し、1 mM の HCl を 50 ml 加え膨潤させた。樹種をカラムに移しかえ、150 ml の 1 mM HCl および 10 ml のカップリングバッファー (0.1 M NaHCO₃, pH 8.3) で洗浄した。次にカップリングバッファーで溶解した合成ペプチド (5 mg) と樹脂懸濁液をすばやく混和した。室温で 2 時間反応後、カップリングバッファーで洗浄した。0.2 M グリシン (pH 8.0) でブロック

ング後に、ペプチド-樹脂懸濁液をカラムに充填し、カップリングバッファー、溶出バッファー、カップリングバッファーの順で洗浄し、最後に PBS 3ml でカラムを洗浄し、4 °C で保存した。

作製したアフィニティーカラムを 0.05% NaN₃-PBS で平衡化したのち、上記で作製した抗血清をカラムに繰り返し 3 回加えた。0.05% NaN₃-PBS で洗浄後、溶出バッファー (3 M MgCl₂) を加え、溶出液を回収した。溶出抗体は、0.1% アジ化ナトリウム-PBS に透析、および濃縮を行った。作製した抗体を抗トラフグ CD4 抗体 (anti-*Fugu* CD4 Ab) と表記する。

2.2.2. 抗トラフグ CD4 抗体 (anti-*Fugu* CD4 Ab) の特異性の確認

作製した抗トラフグ CD4 の反応性・特異性を I.合成したペプチドに対する抗体の反応性 (Enzyme-linked immuno-sorbent assay: ELISA 法)、II. トラフグの CD4 を発現させた動物細胞に対する抗体の反応性の確認 (蛍光顕微鏡観察・FCM・Western Blotting 解析)、III.トラフグの PBLs のライセートに対する抗体の反応性の確認 (Western Blotting 解析) の 3 項目の実験を行った。

I. ELISA 法

Anti-*Fugu* CD4 Ab の合成ペプチドとの反応性を ELISA 法で確認した。まず、Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Wako) を PBS に 0.2%濃度となるように加え、ELISA 法に用いる洗浄液を調製した。同様に 0.05%濃度となるように加え、希釈液を調製した。合成ペプチドを PBS で 5 µg/ml の濃度に調整し、コーティングプレ

ート ; Immunoplate Maxisorp F96 (NalgeNunc International, Rochester, NY, USA) の各ウェルに 100 μ l ずつ加え、4°C で一晩静置した。ウェル内の溶液を除去し、調製した洗浄液で 2 回の洗浄後、一次抗体となる anti-*Fugu* CD4 Ab を希釈液で 1,000~128,00 倍希釈したものを各ウェルに 100 μ l ずつ加え、室温で静置した。2 時間後、3 回の洗浄を行い、二次抗体となる (HRP) –conjugated goat anti-rabbit IgG を希釈液で 5,000 倍希釈したものを各ウェルに 100 μ l ずつ加え、25°C で 2 時間静置した。ウェル内の溶液を除去し、3 回の洗浄を行い、0.4 mg/ml に調整した発色液 (o-Phenylene-diamine dihydrochloride substrate; SIGMA-ALDRICH) を各ウェルに 100 μ l ずつ加え、25°C で 20 分静置した後、ウェル内の溶液を捨て、2M H₂SO₄(Wako)を各ウェルに 100 μ l ずつ加え、発色反応を止めた。吸光度 (O.D.) は、Multiskan FC microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)を用いて 405 nm の波長で測定した。

II. トラフグの CD4 を発現させた動物細胞に対する反応性の確認

トラフグ cDNA を鋳型に、CD4 の開始コドンから終止コドンまでのプライマー (Fw primer; 5'-ATGACCTTCGTCAGCAGACA-3', Rv primer; 5'-CGTCCTGTAGAAGCCTTTAG-3') を作製し、PCR で増幅した。PCR 産物のクローニングを行い、得られたプラスミド DNA を鋳型に N 末端に Kozak 配列 (CCACC) と XhoI の制限酵素サイトを、C 末端に NotI の制限酵素サイトを持つ cDNA を PCR により作製し、制限酵素処理を行った。安定株の樹立のために遺伝子導入細胞においてプラスミドが細胞分裂後の娘細胞に分配される Episomal 型ベクターである pEBMulti-vector (Wako) を用いた。マルチクローニングサイトを XhoI および NotI

の制限酵素サイトに上記の DNA を組み込み、クローニング後、シーケンス解析により適切にインサートの配列を確認した。

トラフグ CD4 を発現させる動物細胞はチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いた。まず、CHO 細胞が約 70%コンフルエントの細胞密度になるまで培養した。培養には 10% FBS (GIBCO, GrandIsland, NY, USA)、1% penicillin-streptomycin (GIBCO) 添加 α -MEM 培地 (Invitrogen,) を用いて、37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で行った。CHO 細胞への導入は X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Hoffmann-La Roche Inc., Basle, Switzerland) を用いた。1.0×10⁶ cells/ml に調整した CHO 細胞に 5 μ g の構築した CD4-pEB-multi vector を導入し、0.5 ng/ml の G418 (Invitrogen) を含む培養液を用いて導入遺伝子を発現する細胞を選択した。

G418 による選択後、1.0×10⁶ cells/ml に *Fugu* CD4⁺-CHO 細胞を調整し、anti-*Fugu* CD4Ab (1:500 dilution) を加え、4°C、30 分間の反応を行った。PBS で 2 回洗浄後、1% BSA を含む PBS で 500 倍希釈した anti-rabbit IgG (PE) Ab で 4°C、30 分間反応し、PBS で 2 回洗浄した後に 100 μ l の PBS に懸濁した。この懸濁液をセルストレーナー (40 μ m) に通し、StatSpin Cytofuge 2 (StatSpin Technologies) を用いて 2 分間 1,000rpm の条件で細胞塗抹を行なった。塗抹したスライドに PBS で 300 nM に調整した DAPI 溶液 (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich) を載せ、1 分間反応させ核染色を行った。続いて、PBS で 2 回洗浄した後、封入液とマニキュアを用いてスライドガラスに固定した。作製したスライドは蛍光顕微鏡 (Axiovert 40CFL; Carl Zeiss) で観察した。

また、前述の抗体反応を行った *Fugu* CD4⁺-CHO 細胞をフローサイトメーター

(EPICS XL flow cytometer; Beckman Coulter) で解析した。ネガティブコントロールとして、ウサギの免疫前の通常血清および二次抗体として anti-rabbit IgG (PE) Ab (Abcam, Cambridge, MA, USA) を用いた。励起光としてアルゴンレーザーの 488 nm の波長を使い、FL1 (530nm) フィルターで検出した。1 サンプルにつき 10,000 cells の測定を行った。得られた FCM データは、Flowjo (TreeStar, Inc., San Carlos, CA, USA) および Expo32 (Beckman Coulter) で解析を行った。

III. ウェスタンブロッティングによる *Anti-Fugu CD4 Ab* の反応性の確認

III-1. 昆虫無細胞系タンパク合成系による組換え CD4 の作製

トラフグの組換え CD4 は昆虫無細胞系合成キット (Transdirect insect cell; Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて作製した。まず、目的タンパク質の精製のために C 末端にアフィニティータグである FLAG-tag (Sigma-Aldrich) およびスペーサー配列 (G8, グリシン 8 残基) を Transdirect insect cell 専用の発現ベクターである pTD1 に導入し、pTD1-G8-FLAG-strep の作製を行った。トラフグ CD4 の cDNA を作製したベクターに組み込み、発現プラスミドを構築した。効率的な転写のために、構築した発現プラスミドを鋳型に、PCR (Fw primer; GCAGATTGTA CTGAGAGTG, Rv primer; GGAAACAGCTATGACCATG) を行い mRNA 合成用鋳型の調整を行った。mRNA の合成は、T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System (Promega, Madison, WI, USA) を用いた。反応液は、調整した鋳型 DNA 5 μ g、2 \times Buffer 50 μ l、T7 Polymerase 10 μ l を加え、RNase Free Water で全量 100 μ l とし、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応した。mRNA の精製はゲルろ過による塩・未反応 NTP の除去とエタノール沈殿による濃縮を目的に行

った。本実験のゲルろ過による塩・未反応 NTP の除去は NICK Colum (GE Healthcare) を用いた。精製した mRNA 溶液はエタノール沈殿により濃縮を行い、滅菌水で mRNA 濃度を 2 mg/ml に調製した。翻訳反応は mRNA 160 μ g、4 mM Methionine 5 μ l、Insect Cell Extract 250 μ l、Reaction Buffer 150 μ l、Triton X 5 μ l (1% W/U) 、RNase inhibitor 10 μ l (40U) さらに目的タンパク質の検出のために FluoroTectGreen_{Lys} *in vitro* Translation Labeling System (Promega) を加え、滅菌水で全量 800 μ l に調整し、25°C、5 時間で行った。作製したサンプル 10 μ l をチューブに入れ、等量のサンプルバッファーを加え混和した。95°C、5 分間インキュベートした後、氷上で 2 分間清置した。15% に SDS ゲル (precast e-PAGEL gel; ATTO, Tokyo, Japan) にサンプルをアプライし、Tris/Glycine/SDS Buffer (Biorad, USA) 中で、200 V で 1 時間電気泳動した。泳動後、Typhoon FLA 9000 laser scanner (GE Healthcare) を用いて目的のタンパクが合成されているかの確認を行った。作製した組換えトラフグ CD4 は-20°C で保存した。

III-2. 細胞ライセートの調整

Fugu CD4⁺-CHO 細胞 (1×10^7 cells) および *Fugu* PBLs (1×10^7 cells) に RIPA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 0.1% SDS, 1% aprotinin, 1 \times Protease Inhibitor Cocktail;Sigma-Aldrich, USA) を加え、氷上で 5 分間反応させた。ライセートは 10,000 \times g、15 分間の遠心後に上澄みを回収し、-20°C で保存した。

III-3. Western blotting による特異性の確認

作製した組換えトラフグ CD4、*Fugu* CD4⁺-CHO 細胞および PBLs のライセートを SDS-PAGE loading buffer (Bio-Rad) に懸濁し、95°C、5 分間インキュベートした後、氷で 2 分間放置した。15% precast-PAGE gel (ATTO) にサンプルをアプライし、Tri/Glycine/SDS Buffer (Bio-Rad) 中で、200V で 1 時間電気泳動した。泳動後、Ready Gel Blotting Sandwiches immune-Blot PVDF with Filter Papers (Biorad, USA) と SDS-PAGE を行ったゲルを Fiber Pad (Biorad, USA) で挟み、Tri/Glycine Buffer (Bio-Rad) 中で、30 V で 1 時間電圧をかけてメンブレンへの転写を行った。Western blotting は WesternBreeze (Invitrogen)を用いて行った。まず、転写したメンブレンに Blocking solution を反応させ、メンブレンにタンパクを固定させた。次に、一次抗体として anti-Fugu CD4 Ab (1:1,000 dilution) または Anti-FLAG ® M2 Agarose from mouse (1:2,000 dilution) をメンブレンに加え、さらに Western Breeze (Invitrogen) 付属の rabbit もしくは mouse 由来の二次抗体を反応させた。最後に Chromogenic substrate を加えて、バンドの検出を行った。

2.3. 磁気細胞分取法 (MACS) によるトラフグ CD4⁺T 細胞の分取

2.3.1. トラフグ PBLs からの T 細胞の純化

トラフグ末梢血からのリンパ球および単球までの純化は第二章と同様の方法で行った。トラフグ 3 匹から個体別にリンパ球を純化した後に、B 細胞はナイロンファイバーと付着性が高いことを利用して B 細胞および T 細胞の精製を行った。リンパ球をナイロンファイバー (Polysciences, Warrington, PA, USA) を充填したカラムにリンパ球を注ぎ、1 時間室温で静置した後、非付着細胞画分を回収し、これを T 細胞とした。

PBLs、単球、リンパ球、T細胞の細胞特性を解析するために以下の実験を行った。1. メイグリュンワルド・ギムザ染色およびFCM解析による細胞形態観察、2. 各白血球集団のCD4⁺細胞のFCM解析および蛍光顕微鏡観察、3. 単球、B細胞、T細胞マーカー遺伝子 (Table 3-1) による発現解析。

2.3.2. MACS 法によるトラフグ CD4⁺T 細胞の分取

PBLsより純化したT細胞を90 µlのMACSバッファー (2 mM EDTA、0.5% BSA、0.01% アジ化ナトリウム PBS) で 1.0×10^7 cells/mlに調製し、Anti-Fugu CD4 Ab (1:1,000 diluted)を加えて4°Cで10分間、一次抗体反応を行った。その後、遠心分離により (室温、1500 rpm、10分間)細胞をペレット化して上清を吸引除去後、MACSバッファーで再浮遊させる洗浄操作を2回行った。次に180 µlのMACSバッファーに浮遊させた後、磁性を持ったMACSビーズが連結したGoat Anti-rabbit IgG溶液 (Miltenyi Biotec)を20 µl加えて4°Cで30分間、二次抗体反応を行った。その後、遠心による洗浄操作 (室温、1500 rpm、10分間)を2回行った。MS Separation Columns (Miltenyi Biotec)を磁石が搭載されたMidiMACS Separation Unit (Miltenyi Biotec)をセットして3 mlのMACSバッファーを通すことにより、カラム内を平衡化した。上記の細胞浮遊液を40 µmのセルストレーナーに通して、カラムにアプライした。全懸濁液が流れ落ちたのを確認した後、洗浄のためにMACSバッファーを9 mlを通した。抗体に結合せず、流れ落ちた細胞をMACS negative細胞画分とした。

Table 3-1. Primers designed for expression analysis of marker genes in this study.

Name	Sequence (5'--3')	Length (mer)
<i>CSF1R1</i> Fw	TTTACCGACACCGCGGGATT	20
<i>CSF1R1</i> Rv	GCCGCTGTCACTTCTAATGTA	20
<i>CSF1R2</i> Fw	GGCATGAACGTGACTGTTGA	20
<i>CSF1R2</i> Rv	CATGGTACCCAAGGTGACTT	20
<i>CD4</i> Fw	AAGCCTCAGAGGGAACAGAA	20
<i>CD4</i> Rv	GAAGAACGTGGTTCGATACGA	20
<i>CD4REL</i> Fw	GGAAGCAGATGCAGGAATGT	20
<i>CD4REL</i> Rv	GCCTGTGACTCTGATATCCA	20
<i>CD8α</i> Fw	CCCAGGTGGACATTCATTGT	20
<i>CD8α</i> Rv	TTGTTGCCCTCGGCGTCGTTT	20
<i>TCRα</i> Fw	AGCGCATGTCTGGCCACAGGTTTCA	25
<i>TCRα</i> Rv	GACTGATACGCAGACGAAGAGTCATCAGG	29
<i>TCRβ</i> Fw	TCCTCCAGAGAGTGTCGCAA	20
<i>TCRβ</i> Rv	TGCAGCTTCCAGGCCAGAAA	20
<i>TCRγ</i> Fw	CAGGGCTGGTTGTCATAGAA	20
<i>TCRγ</i> Rv	GCATCTGAGACGACGAGTCT	20
<i>TCRδ</i> Fw	TCAGCAGCAGAGAAGGAGAA	20
<i>TCRδ</i> Rv	ACTCAGGACTGTCGGATCTT	20
<i>CD3ε</i> Fw	CCAACCGATTAGAGCGAATCAGAGGC	26
<i>CD3ε</i> Rv	CCTGATTCCTTCCCGGATCCAGC	23
<i>CD28</i> Fw	GAAGGTAGAAGGGAAGACAAGCGTCCC	27
<i>CD28</i> Rv	CTTTCACATAGCAGGACAGGGCGAC	25
<i>CD154</i> Fw	CTGGGACTGGAAACATGGTCACTCTCGG	28
<i>CD154</i> Rv	GCAACACTGTACAGGGTTCCATCCGCGG	28
<i>IgL</i> Fw	GAAGGTAGAAGGGAAGACAAGCGTCCC	27
<i>IgL</i> Rv	CTTTCACATAGCAGGACAGGGCGAC	25
<i>IgM</i> Fw	CTGGGACTGGAAACATGGTCACTCTCGG	28
<i>IgM</i> Rv	GCAACACTGTACAGGGTTCCATCCGCGG	28
<i>T-bet</i> Fw	CCGTGACAATTACGACACGC	20
<i>T-bet</i> Rv	GAGAGGTAGCCTTGGGGGTA	20
<i>GATA3</i> Fw	CAACCGACCTCTGACCATGA	20
<i>GATA3</i> Rv	CCATGCTGTCCTGGGACTTT	20
<i>FoxP3</i> Fw	GTGGAAGGTCCAACAGGACA	20
<i>FoxP3</i> Rv	CGGAATCTGACTGCTGGTCT	20

その後、カラムを MidiMACS Separation Unit より取り外し、カラム上部に約 5 ml の MACS バッファーを加えてプランジャーを押し込むことによりカラム内の抗体に結合した磁気標識陽性細胞を流し落とし、これを MACS positive 細胞画分とした。

分取した細胞が CD4⁺細胞であることを確認するために FCM 解析、蛍光顕微鏡観察および細胞マーカー遺伝子解析を行った。細胞マーカー遺伝子解析にはリアルタイム PCR を用いた。1 サンプルあたり THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) 10 μ l、Fw プライマー(5 pmol/ μ l) 1.5 μ l、Rv プライマー(5 pmol/ μ l) 1.5 μ l、Nuclease Free Water 6 μ l、cDNA Template 1 μ l を混合し、96 Well Plate に 20 μ l ずつ分注した。反応時間は 95 $^{\circ}$ C で 1 分間保持した後、95 $^{\circ}$ C で 15 秒間のアニーリング、60 $^{\circ}$ C で 1 分間の伸長反応を 1 サイクルとして、50 サイクル行った後、融解曲線解析のために、95 $^{\circ}$ C で 15 秒間、60 $^{\circ}$ C で 1 分間、95 $^{\circ}$ C で 15 秒間、60 $^{\circ}$ C で 15 秒間の反応を行った。尚、用いたプライマー(オペロンバイオテクノロジー, Japan)は Table 3-1.に記載する。リアルタイム PCR による結果は、 $\Delta\Delta$ Ct 法を用いた相対定量で行った。

2.4. トラフグ CD4⁺T 細胞におけるサイトカイン遺伝子の発現解析

2.4.1. *in vitro* 免疫刺激

トラフグ PBLs を 1×10^7 cells/ml に調整し、lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich; 20 μ g/ml) , polyinosinic:polycytidylic acid (polyI:C; Sigma-Aldrich; 20 μ g/ml) もしくは ConcanavalinA (ConA; 20 μ g/ml) で 5% FBS、1% streptomycin/penicillin (Invitrogen) 添加した RPMI 1640 培地 (Invitrogen) で継時的 (0、6、12、24 時間) に刺激を行った。HBSS を加え、同条件で培養条件したものをコントロールとした。刺激は、3 個体

別々で刺激した。刺激後、上記の方法で PBLs からの CD4⁺T 細胞の分取を行った。

2.4.2. マルチプレックス RT-PCR

本実験では、Th 細胞が産生するサイトカインおよび Th 細胞の分化制御に関係があるサイトカインを標的に発現解析を行った。Th1 サイトカインとして *IFN- γ* 、*IL-2* および *TNF- α* 、Th2 サイトカインとして *IL-4/13A* および *IL-4/13B*、Th17 サイトカインとして *IL-17A/F-3*、Treg サイトカインとして *TGF- β 1* および *IL-10* をターゲットサイトカイン遺伝子とした。サイトカイン遺伝子の解析は我々のグループが構築したマルチプレックス RT-PCR アッセイを用いた。上記の刺激後の CD4⁺T 細胞の RNA 抽出からのマルチプレックス RT-PCR の方法は、第 1 章の単球のサイトカインの発現解析と同様に行った。アッセイは 3 個体それぞれで行い、得られた結果をプールした。

2.5. サイトカインによる Th 細胞分化誘導の検討

2.5.1. 抗トラフグサイトカイン抗体の作製

トラフグの *IFN- γ* および *IL-4/13A* に対して特異的な抗体を作製するために、特徴的なペプチド配列を認識するペプチド抗体を用いることにした。抗体の作製および精製方法については抗トラフグ CD4 抗体と同様に行った。また、検出のために作製した抗体に蛍光標識を行った。抗トラフグ *IFN- γ* 抗体 (anti-*Fugu IFN- γ* Ab) には PE 標識を、抗トラフグ *IL-4/13A* 抗体 (anti-*Fugu IL-4/13A* Ab) には PC5 標識を Abcam 社の Antibody conjugation kits (Abcam, USA) を用いてそれぞれ行った。

2.5.2. 大腸菌タンパク合成系による組換えサイトカインの作製

大腸菌の有するコールドショック遺伝子 *cspA* のプロモーターを利用した *pcold* ベクターI (Takara, Japan) を用いてタンパク合成を行った。*cspA* プロモーターの下流には転写を厳密に制御するための *lac* オペレーターが挿入されている。IPTG で *lac operator* による制御を解除させ、低温にさらすことにより *cspA* プロモーター顆粒の転写が誘導される。本ベクターを用いて低温で発現誘導することにより、宿主大腸菌由来タンパクの合成は抑制され、目的タンパクを高効率で得ることができる。

本研究で用いたターゲット遺伝子を含む発現ベクターは以下の通りに作製した。まず、トラフグの *IFN- γ* および *IL-4/13A* 遺伝子のシグナルペプチド配列を除去したN末端配列から終止コドンまでの目的配列を挟むように特異的プライマーを設計し、さらにそれぞれ5'末端に制限酵素サイト (*Bam*HI, *Hind*III) を付加した。PCR反応後、*pGEM* T easy vector (Promega, USA) にクローニング後、制限酵素消化により目的配列を切り出した。次に、制限酵素消化した *pcold* ベクターの *Bam*HI, *Hind*III サイトの間に上述の切り出した *IFN- γ* および *IL-4/13A* 遺伝子をサブクローニングして発現用ベクターの作製を行った。構築した発現プラスミドをタンパク合成用の *Chaperone Competent cells* BL21 (Takara, Japan) にトランスフォーメーションした。また、アンピシリンおよびクロラムフェニコールを含む選択培地プレートを用いて形質転換体を選択した。100 μ g/mL アンピシリンを含む LB 培地に形質転換体を植菌し、37°Cで振とう培養を行った。培養液の濁度 (O.D; 600 nm) が 0.4~0.5 になるまで菌を増殖させ、その後、培養液を 15°Cに急速冷却を行った。さらに、最終濃度 0.5mM となるようにタンパク発現物質、IPTG を加え、15°Cで 24 時間振とう培養した。培養後、菌を集めて超音波破碎

し、SDS-PAGE によって目的タンパク質の発現を確認した。発現の確認後、可溶画分を Ni-NTA Agarose (Invitrogen) カラム (3 ml) にかけた。溶菌バッファーおよび 10 mM イミダゾール液 (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH8), 10 mM イミダゾール) で洗浄後、50 mM、100 mM、200 mM および 500 mM イミダゾールの溶離液 (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH8)) で溶出し、0.5 ml ずつを分画した。次に SDS-PAGE で精製されていることを確認したフラクションを Detoxi-Gel Endotoxin Removal Gel (Thermo) を用いてエンドトキンの除去を行った。また、タンパク質の濃度を Bradford 法 (Bio-rad) により測定した。

2.5.3. 細胞内サイトカイン染色

24 穴プレート (Nunc) に、PBLs (1×10^7 cells/ml) と 100 ng/ml の組換え IFN- γ または IL-4/13A を混合し、3 時間反応後、10 μ g/ml の Breferrdin A (Sigma) を加え、さらに 5 時間反応させた。その後、3ml の HBSS で 2 回洗浄して、遠心後、上清を除去し、FITC をコンジュゲートした anti-*Fugu* CD4 Ab と 4°C で 30 分間反応した。その後、3ml の HBSS で 2 回洗浄し、3.6% ホルマリン/PBS で固定を行った。次に 3ml の HBSS で 2 回洗浄し、上清を除去した後に、intraprep kit (Beckman) を用いて細胞膜透過処理を行った。まず、intraprep reagent1 を 100 μ l 加え、細胞を強くピペッティングした後、遮光下、室温で 15 分間反応した。続いて、3ml の HBSS で 2 回洗浄して intraprep reagent2 を 100 μ l 加え、細胞をゆっくりとピペッティングした後、遮光下、室温で 5 分間反応した。3ml の HBSS で 2 回洗浄後、上清を除去し、HBSS で 90 μ l で懸濁後、作製した anti-*Fugu* IFN- γ Ab および anti-*Fugu* IL-4/13A Ab を最終濃度が 1/1000 希釈になる

ように 10 μ l 加え、染色を行った。3ml の HBSS で 2 回洗浄し、上清を除去後、500 μ l の HBSS に懸濁し、FCM 解析を行った。まず、FS-SS の 2 パラメーターでリンパ球画分中をゲーティングし、リンパ球中の CD4⁺細胞について再度ゲーティングを行った。次にリンパ球中の CD4⁺細胞について IFN- γ および IL-4/13A の産生パターンを FCM 解析によって測定した。コントロールは HBSS を細胞に作用させ、同様に細胞内染色の処理を行った。アッセイは CD4⁺ リンパ球細胞、5000 個を用いた。また、3 個体それぞれに測定し、結果をプールした。

2.6. 統計学的解析

統計学的有意差は刺激したサンプルおよびコントロールのサンプル間での比較で行った。結果は平均値 \pm 標準偏差で示し、統計学的解析は Student t 検定を用いて行い、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ を統計学的有意差とした。

3. 結果

3.1. anti-*Fugu* CD4 Ab の特異性の確認

合成トラフグ CD4 ペプチドに対する免疫前ウサギ血清および anti-*Fugu* CD4 Ab の抗体価を ELISA にて測定した。その結果、免疫前ウサギ血清では反応しなかったが、anti-*Fugu* CD4 Ab では 16,000 倍希釈でも高い抗体価 (O.D. 3.0 at 492nm) を示した。

ウェスタンブロット解析では、FLAG タグ付き組換えトラフグ CD4 に対して抗 FLAG 抗体、anti-*Fugu* CD4 Ab とともに強いバンドが確認された。バンドのサイズはトラフグ CD4 の予測される分子量 (約 50 kDa) であった。また、*Fugu* CD4⁺-CHO 細胞 およびトラフグ PBLs のライセートに対しても anti-*Fugu* CD4 Ab により同じサイズ付近でバンドが確認されたが、弱い検出であった (Fig. 3-1)。

anti-*Fugu* CD4 Ab による *Fugu* CD4⁺-CHO 細胞の免疫蛍光染色では、細胞膜上に蛍光が確認され、コントロールでは反応を示さなかった。さらに、FCM 解析の結果、*Fugu* CD4⁺-CHO 細胞では、anti-*Fugu* CD4 Ab との反応後、82.6±2.5%の陽性反応を示したが、未導入の CHO 細胞では 0.9±0.2%の陽性反応であった (Fig. 3-2)。

3.2. トラフグ末梢血からの T 細胞の純化

効率的な CD4⁺細胞の分取のために、密度勾配遠心法および各白血球細胞集団の特性を利用した末梢血からの T 細胞の純化を行った。メイグリュンワルド・ギムザ染色による各純化過程の白血球細胞の染色を行った。PBLs、純化した単球およびリンパ球の結果については第二章と同様であるため割愛する。また、純化した T 細胞は、リンパ球集団との形態的な違いは観察できなかった。各純化過程における白血球集団の FCM

解析の結果についても第 1 章で得られた実験結果と類似していた。FS-SS の 2 パラメーターのヒストグラム上でも純化したリンパ球と T 細胞の違いはみられなかった (Fig. 3-3)。各トラフグ白血球細胞の免疫蛍光染色では、リンパ球の細胞表面上で anti-*Fugu* CD4 Ab が反応していることが確認されたが、単球においては反応を示さなかった。FCM 解析の結果、PBLs、単球、リンパ球に対して anti-*Fugu* CD4 Ab は $4.4 \pm 1.6\%$ 、 $0.5 \pm 0.3\%$ 、 $27.1 \pm 2.1\%$ の陽性反応をそれぞれ示した。さらに、純化した T 細胞では $39.7 \pm 4.3\%$ の高い陽性を示した。またコントロールとして用いたウサギ通常血清は各細胞区において anti-*Fugu* CD4 Ab の反応は示さなかった (Fig. 3-4)。

PBLs からの各純化細胞集団の特性をさらに解析するために細胞マーカー遺伝子の解析を RT-PCR を用いて行った。その結果、純化した単球は、単球マーカー遺伝子；*CSF1R1* and *CSF1R2* および T マーカー遺伝子；*TCR γ* を発現した。しかしながら、純化したリンパ球は単球マーカーを発現していなかった。純化 T 細胞では *CD4*、*CD4REL*、*CD8 α* 、*CD3 ϵ* 、*TCR α* 、*TCR β* 、*TCR γ* および *TCR δ* の T 細胞マーカーを発現していたのに対し、B 細胞マーカーの *IgL* および *IgM* 遺伝子の発現は見られなかった (Fig. 3-5)。

3.3. 分取したトラフグ CD⁺細胞の特性

純化した T 細胞からの CD⁺細胞の分取を MACS 法によって行った。磁気で分離した MACS-positive もしくは MACS-negative の細胞集団に対し anti-*Fugu* CD4 Ab を反応させたところ、蛍光顕微鏡観察から MACS-positive 細胞は高い反応性を示すことが確認された。FCM 解析から MACS-positive 細胞および MACS-negative 細胞は anti-*Fugu* CD4 Ab とそれぞれ $95.6 \pm 3.1\%$ および $2.1\% \pm 1.1\%$ の反応性を示した (Fig. 3-6)。さら

にリンパ球の細胞マーカー遺伝子解析を行った。MACS-positive 細胞は MACS-negative 細胞に比べ *CD4* および *CD4REL* 遺伝子の発現量が高かった。哺乳類において活性化 $CD4^+$ T 細胞のマーカーである *CD154* 遺伝子においても MACS-positive 細胞の方が高い発現量を示した。T 細胞マーカーである *CD28* 遺伝子は MACS-positive 細胞および MACS-negative 細胞で顕著な差は認められなかった。*CD8 α* 遺伝子は MACS-negative 細胞で検出されたが、MACS-positive 細胞では検出限界以下 (UDL) であった。Th 細胞の転写因子として哺乳類において知られている *T-bet*、*GATA-3* および *Foxp3* 遺伝子は MACS-positive 細胞の方が高い発現量を示した (Fig. 3-7)。

3.4. マルチプレックス RT-PCR を用いたトラフグ $CD4^+$ 細胞のサイトカイン遺伝子解析

トラフグ PBLs より分取し $CD4^+$ 細胞のフェノタイプを明らかにするために免疫刺激を行い、サイトカイン遺伝子の網羅的発現解析を行った (Fig. 3-8)。

哺乳類において Th1 サイトカインである *IL-2*、*IFN- γ* および *TNF- α* 遺伝子は、LPS、polyI:C または ConA 刺激によりコントロールと比べ有意な発現量の増加を示した。polyI:C で 12 時間刺激を行ったトラフグ $CD4^+$ 細胞において *IFN- γ* 遺伝子はコントロールと比べ約 180 倍の発現量が増加した。LPS 刺激区においては *IFN- γ* 遺伝子は 5 倍以上の発現量の増加を示した。また、ConA 刺激区においては刺激後 12 時間目において最も高い発現量を示した。*IL-2* 遺伝子の発現量はコントロールと比べ LPS 刺激後 12 時間目と 24 時間目において有意な増加を示した。しかしながら、*IL-2* 遺伝子は polyI:C 刺激 12 時間目と 24 時間目においてコントロールと比較して有意な差は認められなかった。*IL-2* 遺伝子は ConA 刺激 6 時間目においてコントロールと比べ約 4 倍の発現量

の増加を示した。有意な *TNF- α* 遺伝子の発現量は LPS 刺激後 12 時間目において確認された。polyI:C 刺激 6 時間目において *TNF- α* 遺伝子は 36 倍まで増加した。ConA 刺激は *TNF- α* 遺伝子を 6 時間後にコントロールと比べ 4.6 倍に増加させた。

Th2 サイトカインとして知られている *IL-4/13A* および *IL-4/13B* 遺伝子は LPS もしくは polyI:C 刺激ではコントロールと比べ有意な発現量の増加を示さず、むしろ発現量の減少が確認された。LPS および polyI:C 刺激の 6、12、24 時間の各経時列すべてで *IL-4/13A* の発現量はコントロールと比べ顕著な現象を示した。一方、ConA 刺激によって *IL-4/13A* および *IL-4/13B* 遺伝子はそれぞれ 6 時間後に 2.2 倍、12 時間後に 4.6 倍で Th1 サイトカインに比べるとわずかな発現量が増加を示した。

Th17 サイトカインである *IL-17A/F-3* 遺伝子は LPS 刺激後 6 時間目でコントロールと比べ約 10 倍の発現量を示した。polyI:C 刺激後 6 時間目でコントロールと比べ約 15 倍の発現量になった後は 12 時間、24 時間と徐々に発現量は減少していった。ConA 刺激によって 6 時間目にコントロールと比べ 6.2 倍の発現量になった。

Th1、Th2 および Th17 に加えて、Treg が産生する *TGF- β 1* および *IL-10* の遺伝子発現を解析した。 *TGF- β* 遺伝子は、polyI:C 刺激 6 時間目に発現量は増加した。また、ConA 刺激によって 6 時間目から徐々に増加して 24 時間目に最も高い発現量になった。LPS 刺激では 12 時間目と 24 時間目にコントロールと比べ 10 倍以上の発現量の増加を示した。Th2 が産生するサイトカインでもある *IL-10* 遺伝子は LPS 刺激により徐々に増加して 24 時間目に最も高い発現量になった。polyI:C 刺激によってコントロールと比べほとんどの時系列において発現量は減少した。最も高い *IL-10* 遺伝子の発現量は ConA 刺激後 6 時間目に見られ、その後は徐々に減少していった。

3.5. 抗トラフグサイトカイン抗体の特異性の確認

本研究において作製した抗トラフグサイトカイン抗体 (anti-*Fugu* IFN- γ Ab および anti-*Fugu* IL-4/13A Ab) の反応性を組換えサイトカインを抗原とした ELISA 法を用いてそれぞれ確認した。その結果、作製した抗体は高い反応性を示した。また、組換えサイトカインを抗原にウエスタンブロッティングを行ったところ、予測されるサイズにバンドが見られた (data not shown)。これら結果より、タンパク質レベルでの反応性には問題がないことが確認された (Fig. 3-9)。更に、トラフグの生体中のサイトカインに実際に特異的に反応するかどうかをウエスタンブロッティングによって確認したところ、IFN- γ および IL-4/13A の予測されるサイズにバンドが確認された。このことから、トラフグの IFN- γ 、IL-4/13A に特異的に反応することが確認された。

3.6. 組換えサイトカインの作製

大腸菌タンパク質合成系を用いて IFN- γ 、IL-4/13A の組換え体の作製を行った。His-tag 精製後に SDS-PAGE したところ、ヒスチジン融合タンパク質が精製したことを確認した (Fig. 3-10)。また、抗ヒスチジン抗体または本研究で作製した抗サイトカイン抗体でウエスタンブロッティングしたところ、それぞれ精製後の組換えサイトカインに対して高い反応性を示した (data not shown)。さらにエンドトキシン除去後にキットを用いて濃度を測定したところ、どの組換えサイトカインについても 0.05 EU/ml 以下となり、哺乳類における基準値以下となった。

3.7. CD4⁺リンパ球における細胞内サイトカイン染色

CD4⁺リンパ球中のサイトカイン産生を細胞内染色によって測定した結果、コントロールでは IFN- γ 単独産生細胞 (Single positive; SP)、IL-4/13A SP、IFN- γ ・IL-4/13A 両産生細胞 (double positive; DP) がそれぞれ 5%以下を示したのに対し、組換え IFN- γ 産生後では IFN- γ SP が $33.3 \pm 5.6\%$ に増加した。一方、IL-4/13A SP、IFN- γ ・IL-4/13A DP はそれぞれ $1.6 \pm 0.5\%$ 、 $3.4 \pm 1.4\%$ を示し、コントロールと比較して顕著な変化は見られなかった。組換え IL-4/13A 刺激後では IL-4/13A SP が $19.0 \pm 3.3\%$ の顕著な増加を示し、IFN- γ SP についても $9.5 \pm 5.6\%$ とコントロールと比較して増加することを示した。また、IFN- γ ・IL-4/13A DP については $4.7 \pm 4.5\%$ となり、顕著な変化を示さなかった (Fig. 3-11)。

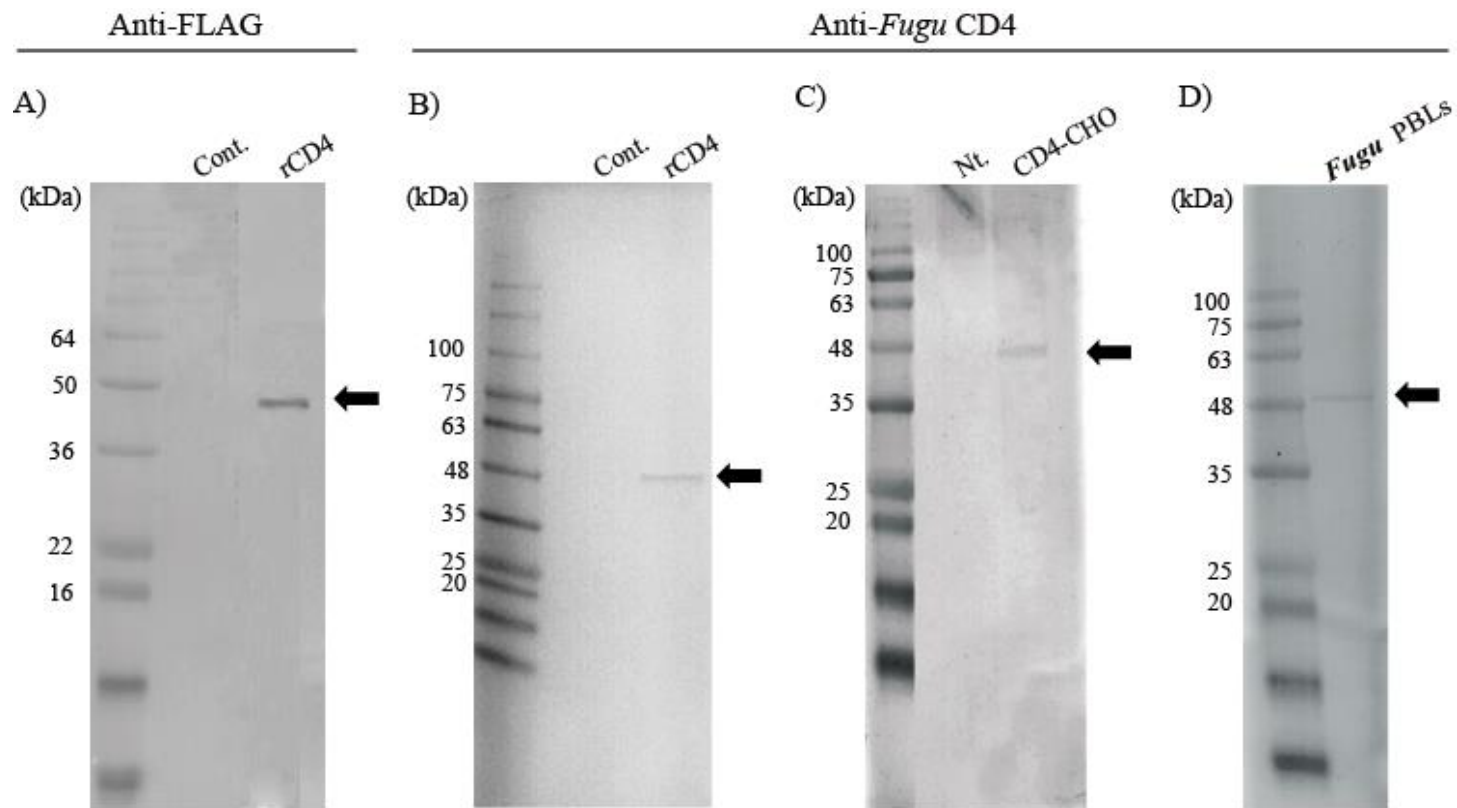


Fig. 3-1. The confirmation of antibody specificity using Western blotting. The recombinant CD4 was detected with A) anti-FLAG Ab and B) anti-*Fugu* CD4 Ab. C) *Fugu* CD4-CHO cells and D) *Fugu* PBLs lysates were detected with anti-*Fugu* CD4 Ab. The position of molecular weight markers is indicated to the left of each Western blot. The arrow indicates the predicted size of *Fugu* CD4 protein. Cont, translated with control plasmid. Nt, the lysate of non-transfected CHO.

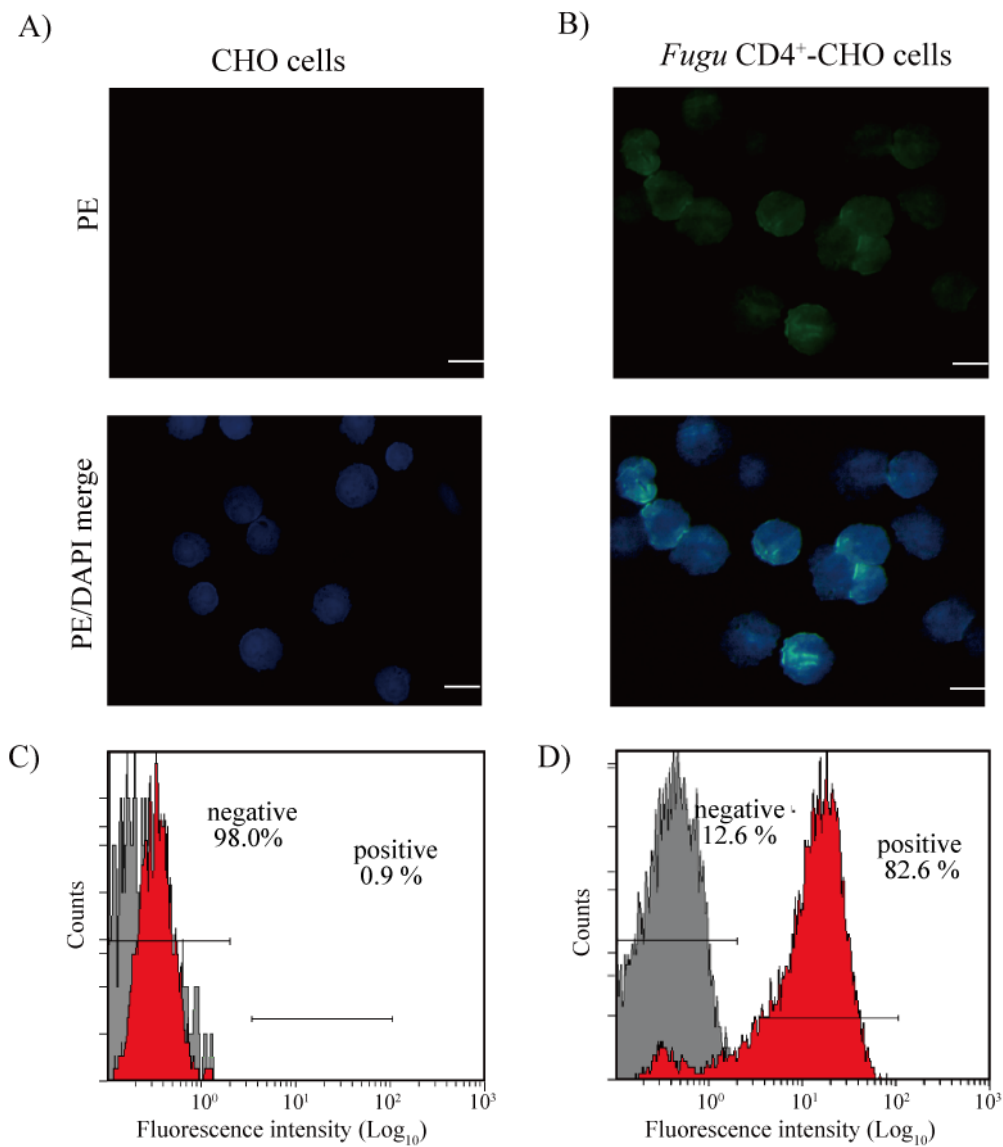


Fig. 3-2. Reactivity of anti-Fugu CD4 Ab to Fugu CD4⁺-CHO cells. Immunofluorescence of A) control CHO cells and B) Fugu CD4⁺-CHO cells. Cells were incubated with anti-Fugu CD4 Ab as primary Ab and goat anti-rabbit IgG (PE) as secondary Ab and DAPI to mark cell nuclei. Scale bar equals 20 μ m. Stained cells C) control CHO cells and D) Fugu CD4⁺-CHO cells were also analyzed by flow cytometry. The setting of negative gate was used with the only secondary antibody reaction to the cells analysis (gray peak).

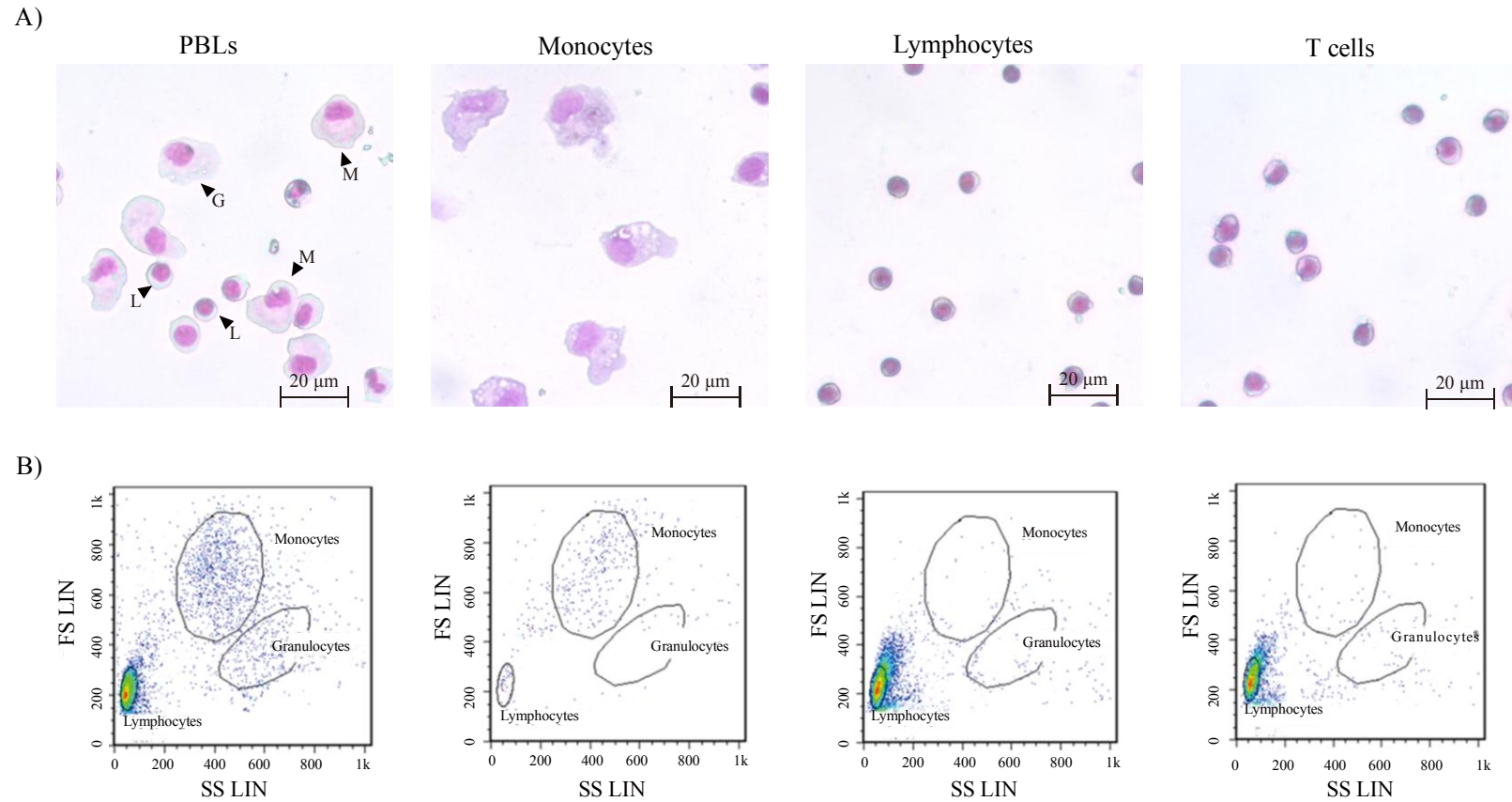


Fig. 3-3. Discrimination of *Fugu* PBLs, monocytes, lymphocytes and T cells. A) The morphology of purified cells was examined by microscope after May-Grünwald-Giemsa staining. G, L and M indicate granulocytes, lymphocytes and monocytes, respectively.

B) Scattergram of the flow cytometric profile of purified cells. Different cell subpopulations were identified on the basis of their size and complexity, and cellular debris was excluded. Three populations (granulocytes, monocytes and lymphocytes) in PBLs were isolated by analytical gates. The monocyte, lymphocyte and T cell populations were mostly pure, and contamination with other populations was low.

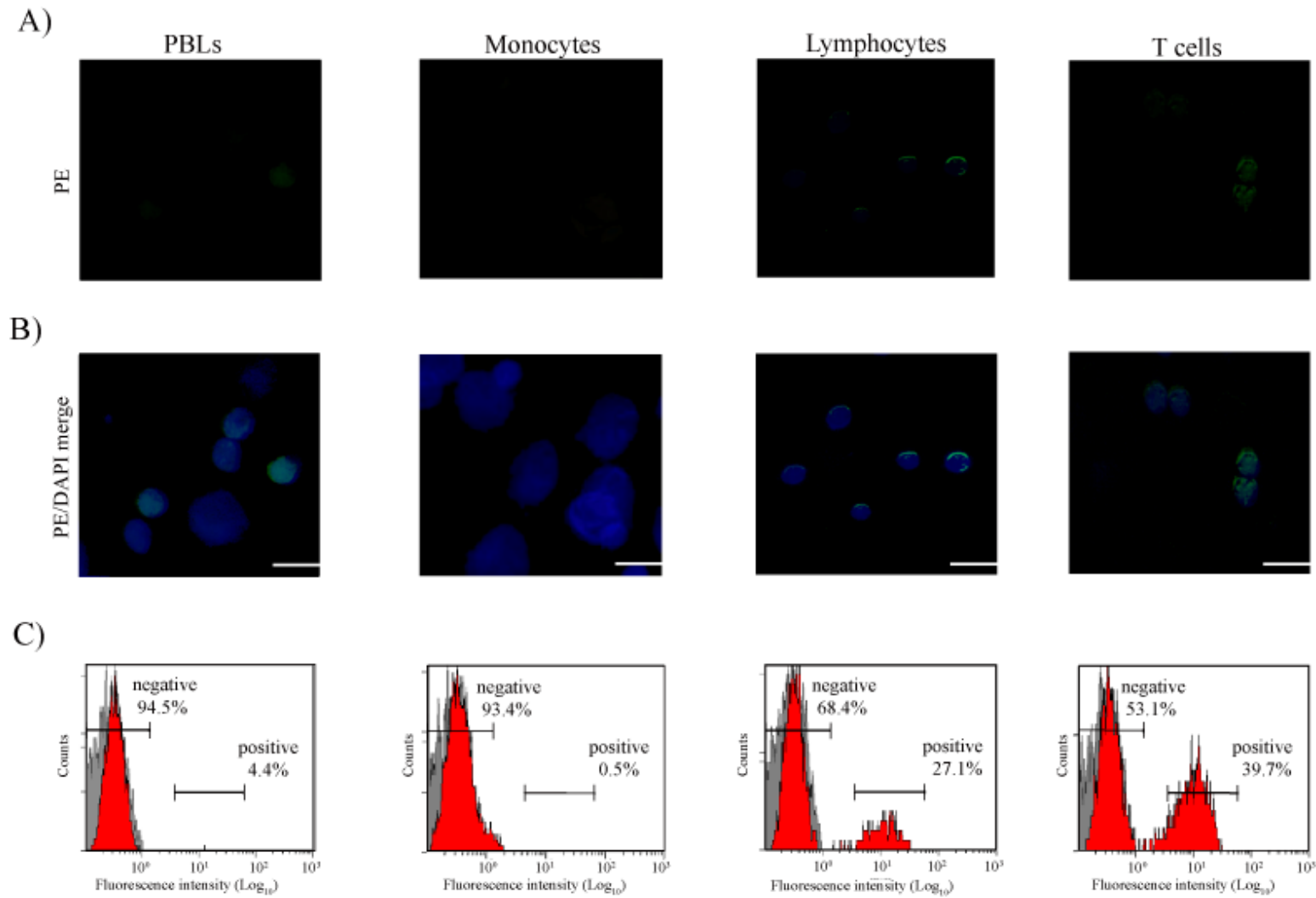


Fig. 3-4. Immunofluorescence stains of *Fugu* CD4⁺ cells in PBLs, monocytes, lymphocytes and T cells. A), B) Cells were reacted with anti-*Fugu* CD4 Ab as primary Ab and goat anti-rabbit IgG (PE) as secondary Ab and DAPI to mark cell nuclei. Scale bar equals 20 μ m. C) Cells stained with anti-*Fugu* CD4 Ab were also analyzed by flow cytometry.

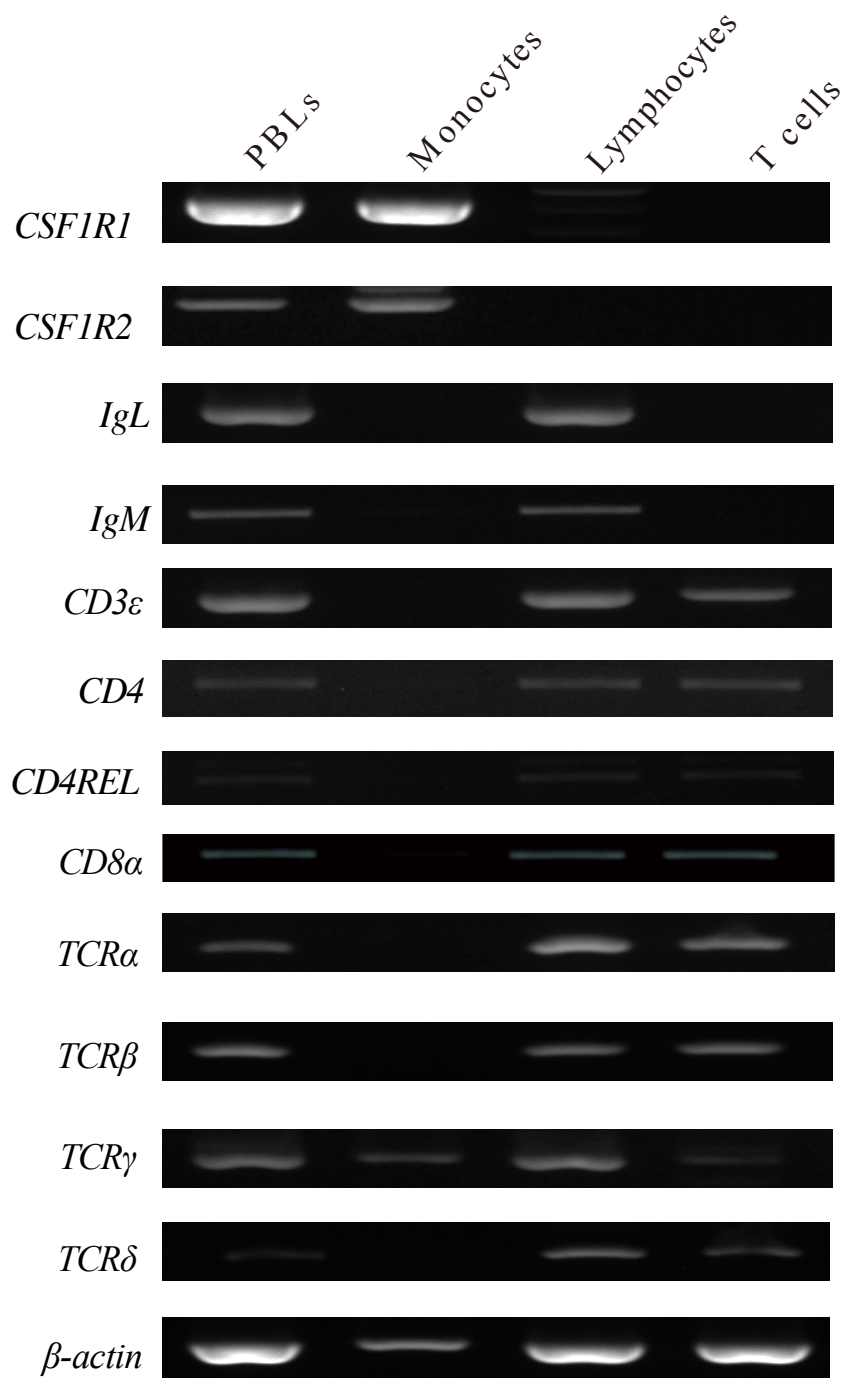
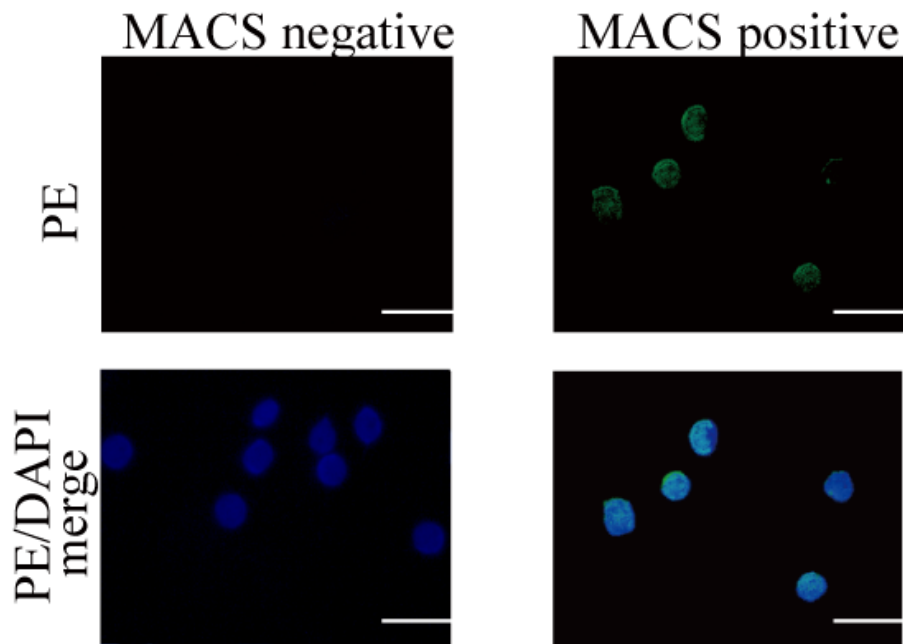


Fig. 3-5. Expression of cell marker genes in *Fugu* PBLs, monocytes, lymphocytes and T cells. The cell marker genes used were a monocyte marker, *CSF1R1*, -2, a B-cell marker, *IgL*, *IgM* and T-cell markers, *CD3ε*, *CD4*, *CD4REL*, *CD8α*, *TCRα*, *TCRβ*, *TCRγ* and *TCRδ*.

A)



B)

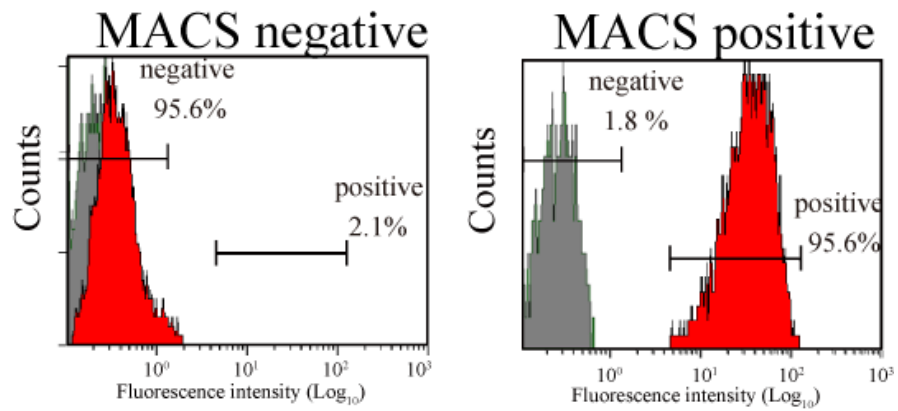


Fig. 3-6. The confirmation of CD4^+ cells sorting from *Fugu* PBLs by MACS. MACS negative refers to flow through with unlabelled cells. MACS positive refers to elution of positively selected cells. A) Immunofluorescence stains of CD4^+ cells. B) FCM analysis of CD4^+ cells.

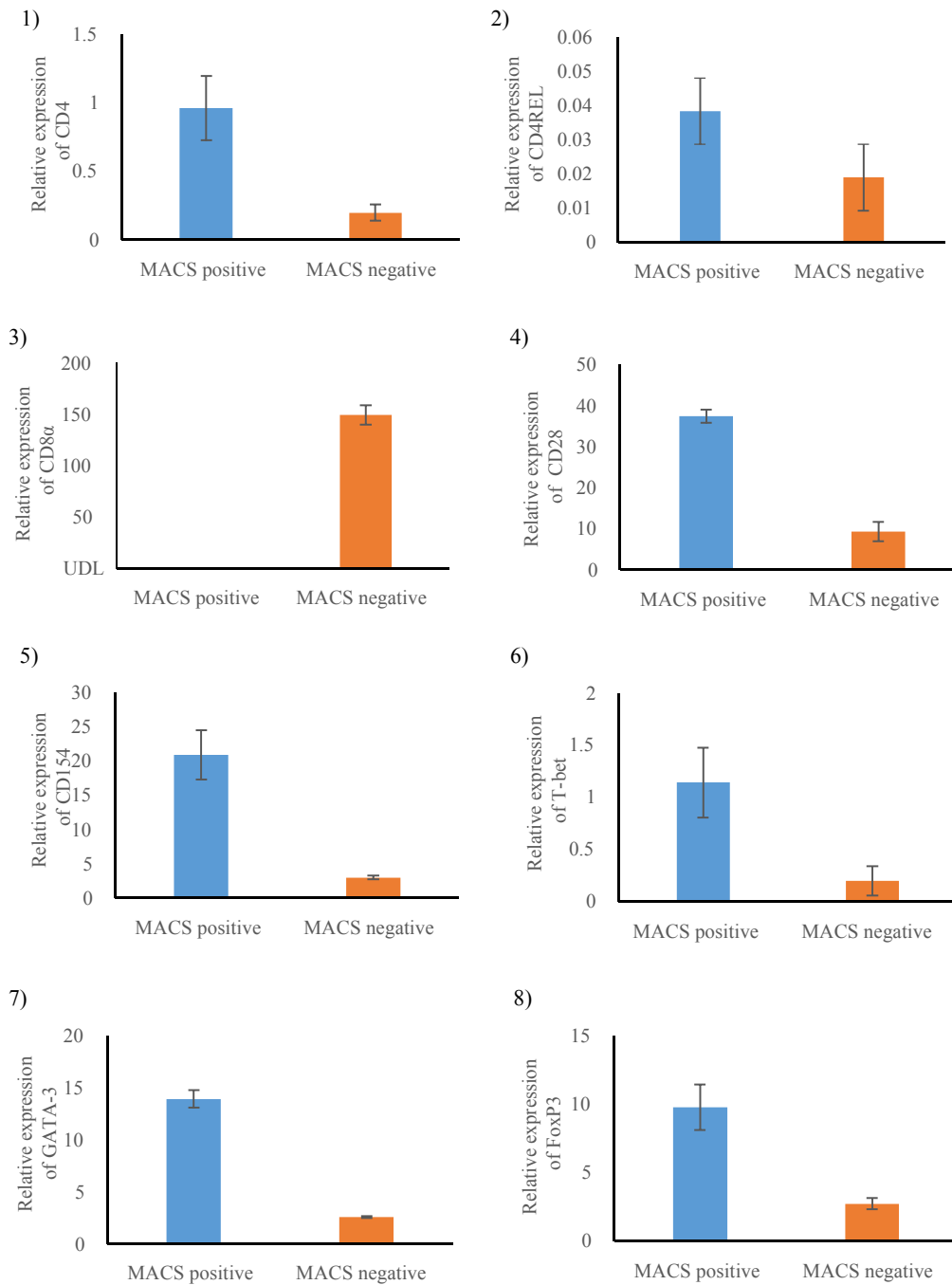


Fig. 3-7. Relative expression levels analyzed by real-time PCR. The comparative threshold cycle (Ct) method was used to determine relative transcript levels, using β -actin as a housekeeping control. The analysed genes were as follows: 1) *CD4*, 2) *CDREL*, 3) *CD8 α* , 4) *CD28*, 5) *CD 154*, 6) *T-bet*, 7) *GATA-3* and 8) *FoxP3*. Data are presented as mean \pm S.D. of triplicate samples.

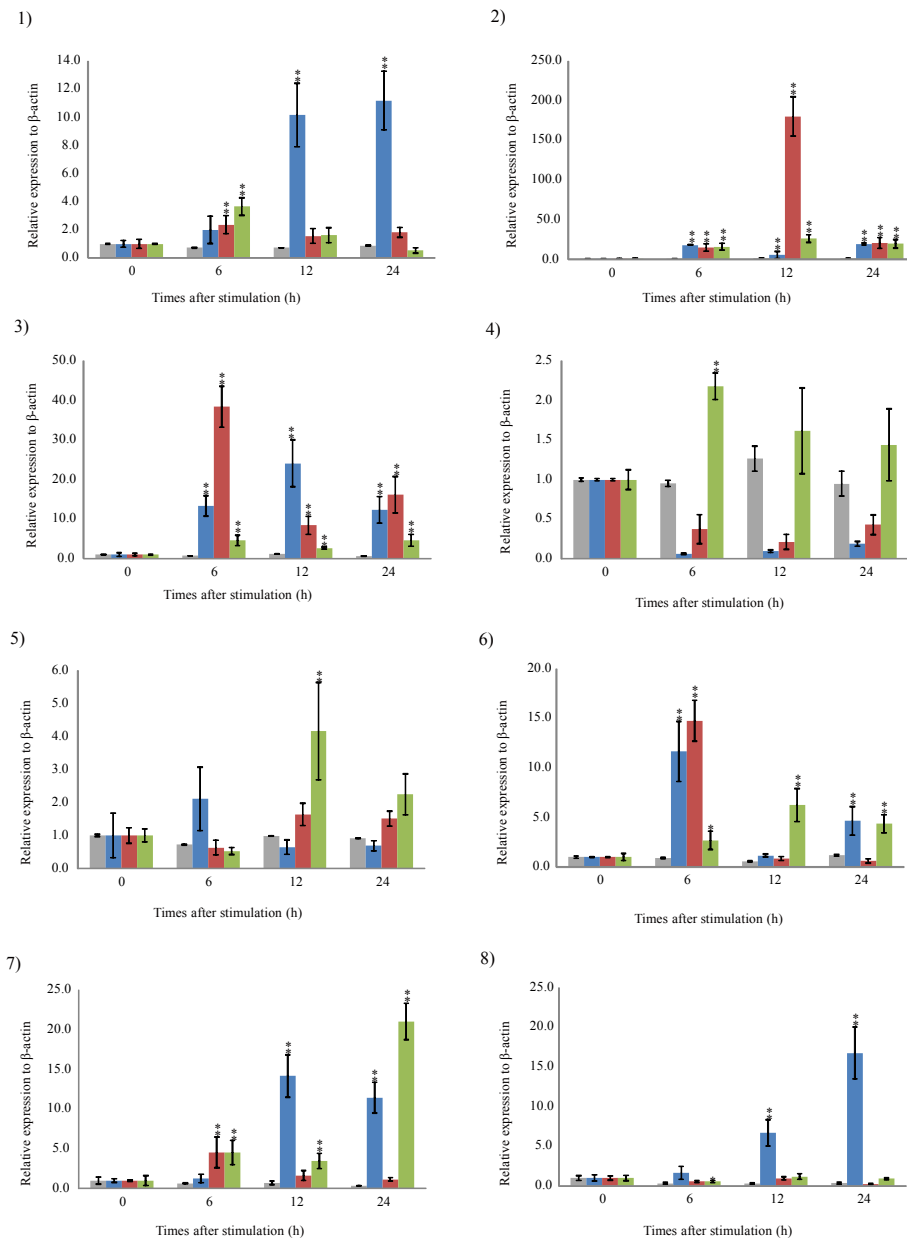


Fig. 3-8. Expression analysis of *Fugu* cytokine genes in CD4⁺ cells sorted from PBLs under immunostimulatory conditions. RNA isolated from CD4⁺ cells incubated with 20 μg/ml LPS, 20 μg/ml polyI:C or 20 μg/ml ConA for 0 (cont.), 6, 12 and 24 h. *Fugu* cytokine mRNA transcripts were determined by multiplex RT-PCR and standardized to the respective β-actin mRNA. The analysed genes were as follows: 1) *IL-2*, 2) *IFN-γ*, 3) *TNF-α*, 4) *IL-4/13A*, 5) *IL-4/13B*, 6) *IL-17A/F-3*, 7) *TGF-β1* and 8) *IL-10*. Data are presented as mean ± S.D. of triplicate samples. **P* < 0.01 as compared to the control (up-regulation). The relative expression level is expressed as arbitrary units where one unit is equal to the average expression level of each cytokine gene in CD4⁺ cells from unstimulated PBLs. Gray, Blue, red and green bars indicate HBSS, LPS, polyI:C and ConA-stimulations, respectively.

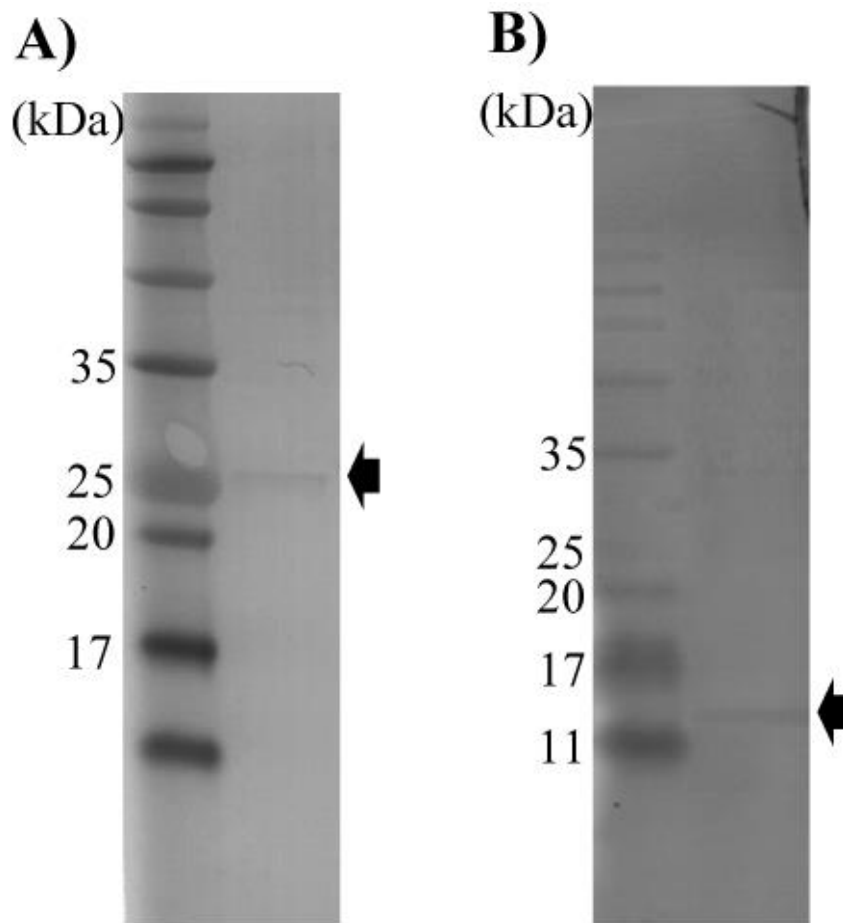


Fig. 3-9. The confirmation of specificity for anti-*Fugu* cytokines antibody using Western blotting. *Fugu* cytokines protein in PBLs lysate were detected with A) anti-*Fugu* IFN- γ Ab, B) anti-*Fugu* IL-4/13A Ab. The position of molecular weight markers is indicated to the left of each Western blot. The arrow indicates the predicted size of *Fugu* cytokines protein.

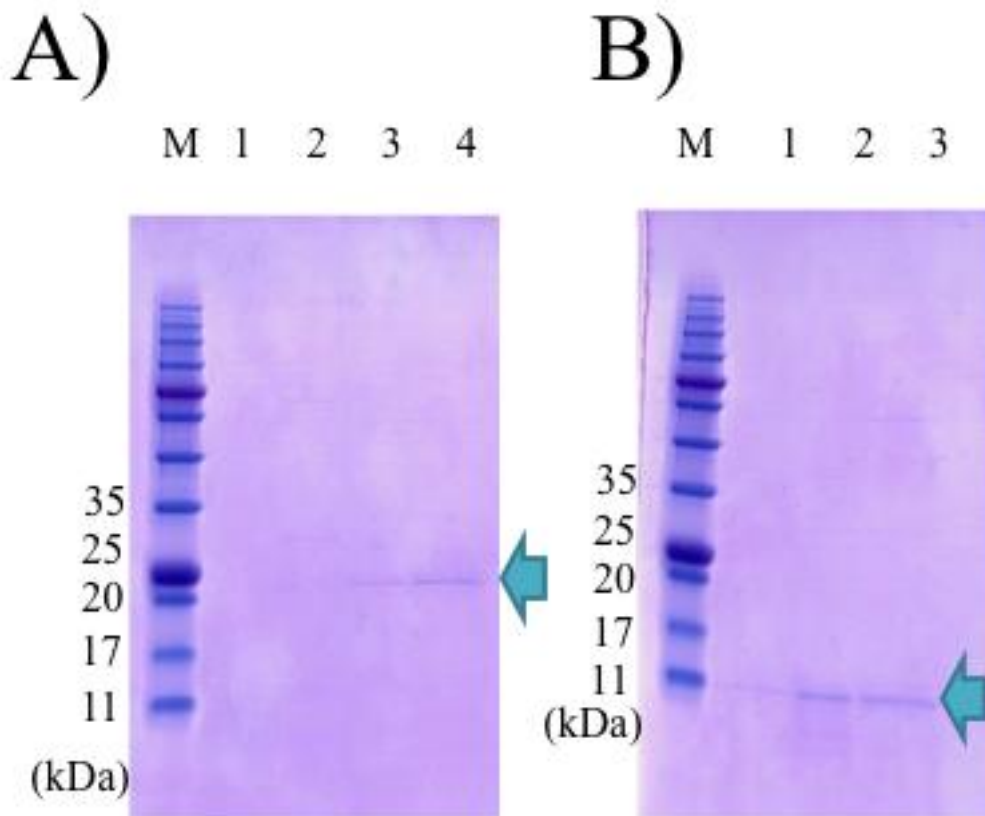


Fig. 3-10. SDS-PAGE analysis of recombinant Fugu cytokines (IFN- γ , IL-4/13A). A) recombinat *Fugu* IFN- γ . The samples in each gel wer as follows: M; protein marker. Precipitate and supernatant of sonicated broken rosetta2 transformed with pcold I-IFN- γ (lane 1-4). Total reaction mixture (lane 1), and affinity-purified proteins with 50 mM, 200 mM and 500 mM imidazole (lane 2, 3, and 4). A) recombinat *Fugu* IL-4/13A. The samples in each gel wer as follows: M; protein marker. Precipitate and supernatant of sonicated broken rosetta2 transformed with pcold I-IL-4/13A (lane 1-3). Total reaction mixture (lane 1), and affinity-purified proteins with 200 mM and 500 mM imidazole (lane 2 and 3). Purified protein is indicated by arrow, respectively.

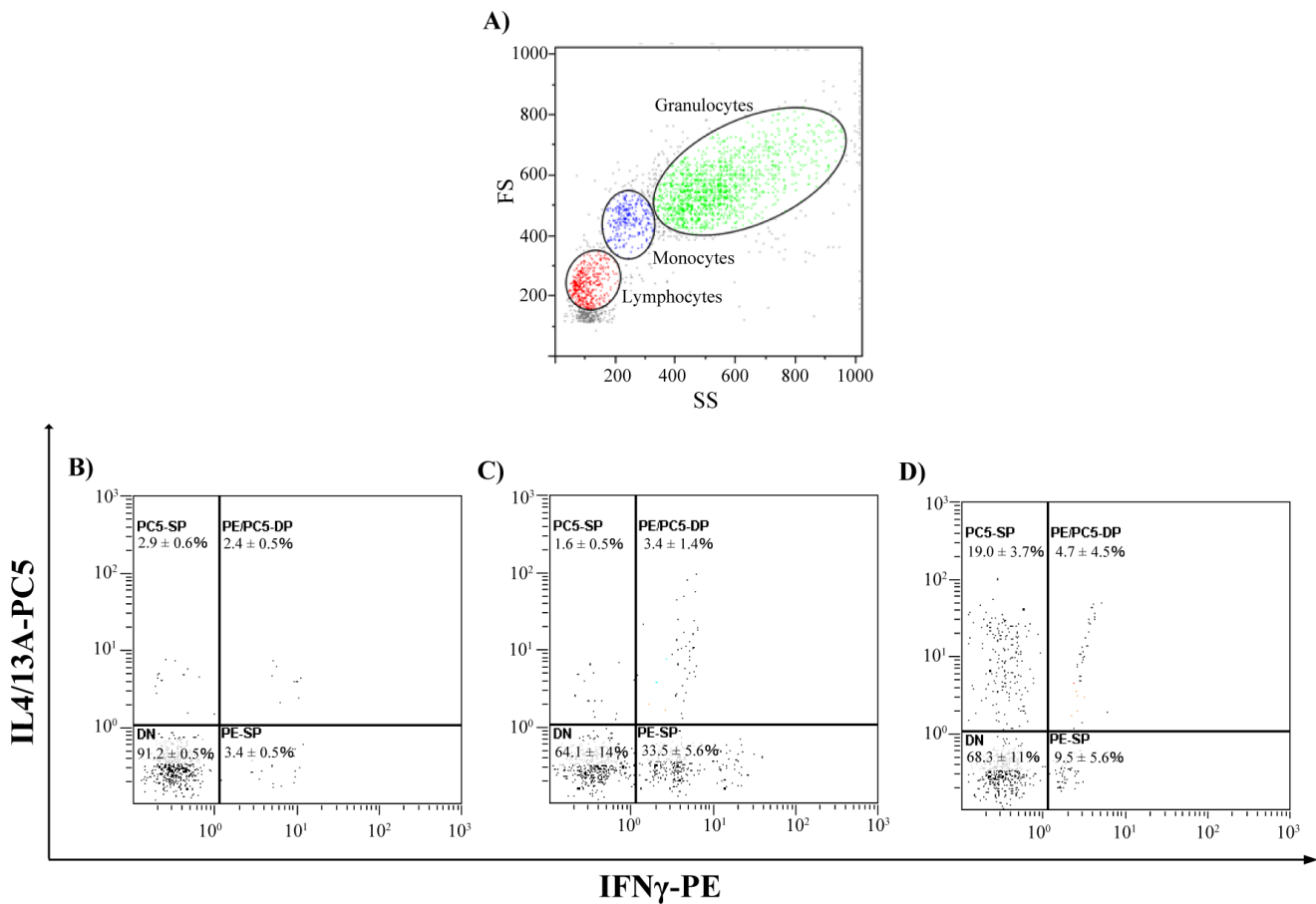


Fig. 3-11. Intracellular staining of gated CD4⁺ lymphocytes for IFN- γ and IL-4/13A expression. A) scattergram of the flow cytometric profile of PBLs. Different cell subpopulations were identified on the basis of their size and complexity, and cellular debris was excluded. Three populations (granulocytes, monocytes and lymphocytes) in PBLs were isolated by analytical gates. PBLs were purified by density-gradient centrifugation, treated with HBSS (cont.), recombinant IFN- γ or recombinant IL-4/13A for 8 hours, and Brefeldin A was added at 3 h for intracellular cytokine staining. A representative gating strategy is indicated starting at the lymphocyte gate in FS/SS dot plot. Within this gate singlet was selected. From the singlet gate, the fraction of CD4 positive cells was determined. Within the CD4⁺ lymphocytes gate, IFN- γ and IL-4 positive cells were detected in B) HBSS (cont.), C) recIFN- γ and D) recIL-4/13 treatment. Percentages in each quadrant are indicated on the histogram. The data shown are mean \pm S.D. from three individual experiment.

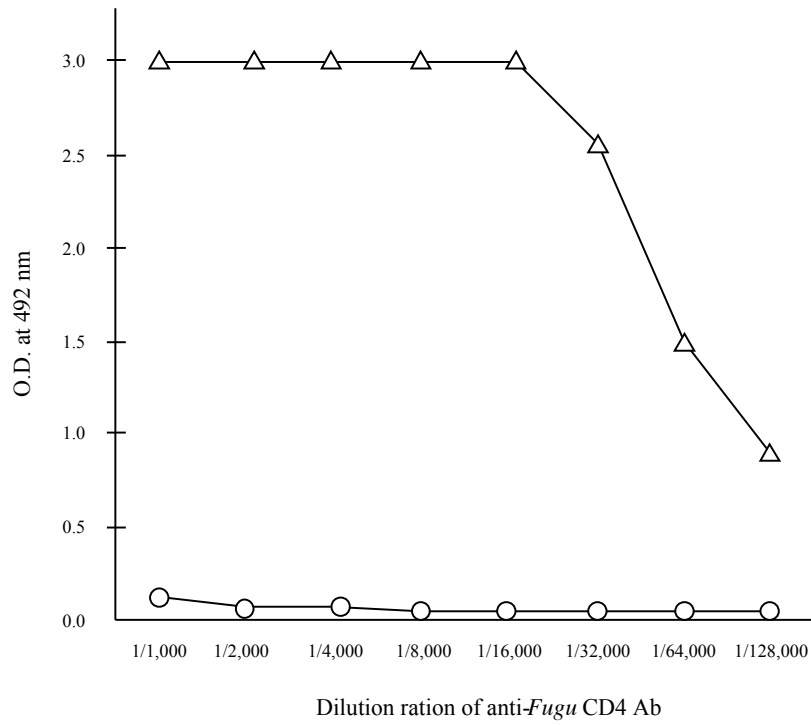


Fig. 3-S1. Reactivity of anti-*Fugu* CD4 Ab against synthesized CD4 peptide in ELISA. Triangle \triangle) and circle \circ) indicate anti-*Fugu* CD4 Ab and rabbit normal serum used as a control, respectively.

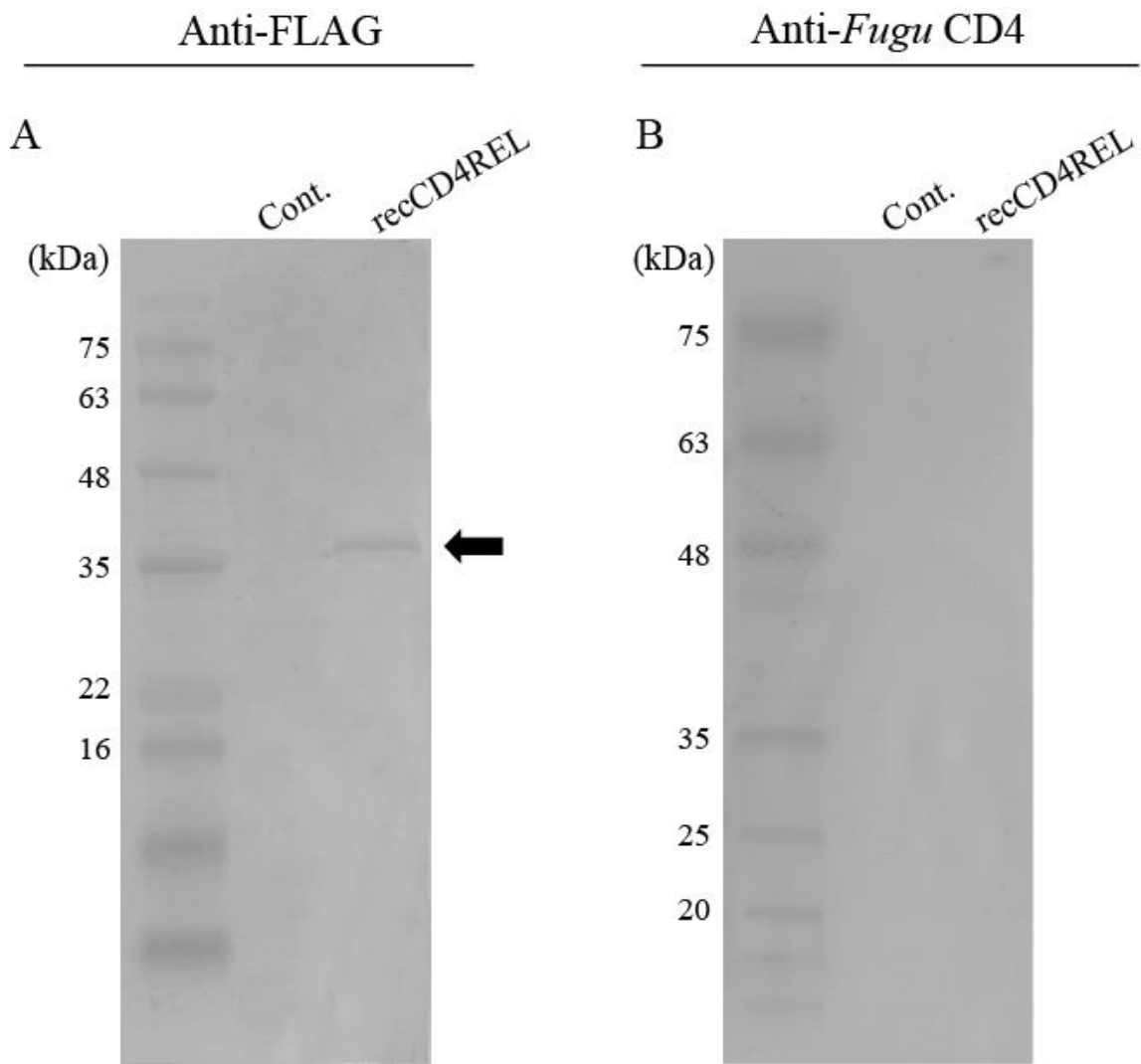


Fig. 3-2S. The confirmation of antibody specificity using Western blotting. The recombinant *Fugu* CD4REL, FLAG-tagged was detected with A) anti-FLAG Ab, but not B) anti-*Fugu* CD4 Ab. The position of molecular weight markers is indicated to the left of each Western blot. The arrow indicates the predicted size of *Fugu* CD4REL protein.

4. 考察

本章は、トラフグ CD4 に特異的に反応する抗体の作製、さらにその抗体を用いたトラフグ PBLs からの CD4⁺細胞の分取および サイトカイン遺伝子による CD4⁺細胞の特性について述べている。近年、T 細胞に特異的な細胞表面マーカーの同定およびその特性評価は魚類においても数多く報告されているが、これら細胞表面マーカーに対する抗体の作製に関してはほとんど行われていない (Laing and Hansen, 2011)。本研究で作製した anti-*Fugu* CD4 Ab は、昆虫無細胞合成系で作製した組換えトラフグ CD4 に対し予測される CD4 の分子量サイズにて反応を示した。また、トラフグ CD4 を強制発現させた *Fugu* CD4⁺-CHO 細胞およびリトラフグ PBLs のライセートに関しても同様の結果を示した。さらに、FCM 解析においても *Fugu* CD4⁺-CHO 細胞への anti-*Fugu* CD4 Ab の高い反応性が確認された。これまでに魚類 T 細胞や B 細胞を認識するための抗細胞マーカー抗体がいくつか作製されてきた。その中で、抗トラフグ CD8 抗体は PBLs ライセート由来の CD8 タンパク質と反応性を示し、細胞膜上に発現していることが確認された (Araki et al., 2008)。また、ギンブナの CD4 を認識する 6D1 抗体は FCM 解析および蛍光顕微鏡観察で CD4 の検出に成功しているが、PBLs ライセートを抗原として用いたウェスタンブロッティングでは反応性の確認はできなかった (Toda et al., 2011)。ミドリフグの CD4 に対する抗体も FCM 解析により脾臓および頭腎細胞中の CD4 細胞を検出している (Wen et al., 2010)。これら魚類における報告では作製した細胞表面タンパク質に対する抗体はサンプルの状態（生細胞、固定化細胞あるいは細胞ライセート）によって反応性が異なることを示唆している。トラフグの純化した各白血球集団に対しては、anti-*Fugu* CD4 Ab の反応性は異なっていた。単球に対しては反応性が極めて低く、抗体反応のリンパ球集

団との交差性は認められなかった。しかしながら、哺乳類においては単球においても CD4 は発現し、CD4⁺単球は抗原提示能が CD4⁻単球に比べ高いことが明らかになっている。本研究では単球に発現する CD4 分子に対して詳細な解析をしていないが、第 1 章で述べた単球の活性化とともに CD4 の分子に焦点を置くことで新たな知見が得られる可能性もあると考えられる。以上のことから本研究では作製した抗体はトラフグ CD4 に対して特異性および反応性が高いことが示唆された。

効率的な CD4⁺細胞の分取のためにトラフグ PBLs からの T 細胞の純化を試みた。単球、リンパ球、T 細胞の細胞マーカーや FCM の 2 パラメーター解析などは魚類においてもいくつか報告されており (Sugamata et al., 2009a; Yamaguchi et al., 2011b)、哺乳類の各白血球集団はそれぞれ哺乳類と類似した特性を持っていることが明らかになっている。本研究で得られた結果はこれまでの報告と類似しており、PBLs からの T 細胞の純化に成功していることが確認できた。anti-*Fugu* CD4 Ab は PBLs 中の 4.4%が CD4⁺細胞として検出されたが、Toda らはギンブナの PBLs 中に 14%の CD4⁺細胞が含まれることを報告している (Toda et al., 2011)。哺乳類において細胞表面抗原 (CD) は細胞の活性化によって発現が大きく異なることが知られている。魚類においても遺伝子の発現レベルで CD4 の発現動態が免疫刺激によって変化することが知られている。本研究においても T 細胞マイトジェンを作用した後に、FCM 解析を行ったところ細胞膜上の CD4 の発現が増加したことを示唆するデータを得た (data not shown)。以上のことから、これら CD4⁺細胞の含まれる割合は抗体の反応性の他に魚種、免疫状態の違いによるものが影響するものと考えられた。

純化した T 細胞から CD4 が細胞膜状に発現している細胞を磁気細胞分取法によって分

取した。CD4、CD28、CD154 遺伝子は、MACS-positive および-negative 細胞ともに発現がみられた。これはいくつかの CD4⁺細胞は MACS カラムに保持されずに溶出されたことを示している。また、CD8 α 遺伝子は MACS-negative 細胞のみに発現がみられた、MACS-positive 細胞中の CD8⁺細胞の混入がないことが示唆された。MACS-positive 細胞は、CD4⁺細胞が高い割合で含まれていることが FCM 解析および蛍光顕微鏡観察によって認められた。これら結果は、磁気標識によって高い純度で CD4⁺T 細胞を分取できたことを示唆するものである。

分取した CD4⁺T 細胞は CD4、CD4REL 遺伝子の 2 つの CD4 遺伝子を発現していた。分取に用いた抗体の抗原認識部位は CD4REL には存在しない。また、組換え CD4REL およびに対してトラフグ PBLs 中の CD4REL (予測サイズ; 約 34kDa) の反応も示さないことを確認している。そのため、分取した CD4⁺T 細胞は CD4、CD4REL がともに発現しているダブルポジティブ (DP) 細胞あるいは CD4 が単独で発現しているシングルポジティブ (SP) 細胞で出ることが考えられた。これまでにナマズの IgM⁺B 細胞では CD4 遺伝子はで発現せず、CD4REL 遺伝子は発現する (Edholm et al., 2007)が、ニジマスの sIgM⁺リンパ球ではともに CD4、CD4REL 遺伝子が発現しない (Laing et al., 2006)。また、ニジマスの T 細胞において CD4、CD4REL 遺伝子がともに発現していることが報告されている (Toda et al., 2011)。Wen らは CD4⁺細胞よりも CD4REL⁺細胞のほうが MHC-II および IL-16 と高い結合能を示し、さらに反応性も高いことを示している (Wen et al., 2010)。これらの報告から、魚類の T 細胞は CD4、CD4REL のそれぞれの SP 細胞および CD4、CD4REL の DP 細胞を有しているという仮説を立てた。しかしながら、現在までに CD4⁺細胞のサブセットの同定およびその機能解析については限られたデータしかない。また、

魚類のこれら CD4⁺細胞が哺乳類と同様にエフェクター化機構を持っているかどうかは明らかになっていない。そのため、哺乳類においてそれぞれのエフェクター細胞に特異的な転写因子の発現解析を行った。

トラフグの CD4⁺T 細胞は Th1、Th2、Treg 細胞のマスター転写因子である *T-bet*、*GATA-3*、*Foxp3* をそれぞれ発現していた。Takizawa らは *T-bet* 遺伝子は IgM⁺リンパ球よりも IgM⁺リンパ球 で高い発現を示すことを報告している (Takizawa et al., 2008)。これら結果は *T-bet* は魚類においても Th1 免疫反応を制御する上で重要な役割を果たしていることを示している。また、サケの *GATA-3* は Th2 サイトカインである *IL-4/13A* 遺伝子とともに胸腺、皮膚およびエラで発現することが認められている (Takizawa et al., 2011)。さらに、ミドリフグの CD4-2⁺CD25-like⁺細胞において *FoxP3* 遺伝子が発現していたが、CD4-2⁺CD25-like⁻細胞では検出されなかった (Wen et al., 2010)。これらは魚類の *T-bet*、*GATA-3* および *Foxp3* が Th サブセットの活性化の制御に関わっていることを示すデータである。以上のことから、分取したトラフグの CD4⁺T 細胞には Th 細胞および Treg 細胞が混在していることが示唆された。

エフェクター化した CD4⁺T 細胞（ヘルパーT; Th 細胞）は、病原体の種類に応じて特異的な免疫応答を示す Th1、Th2、Th17、Treg といったサブセットに分類される (Stummvoll et al., 2008)。それぞれのサブセットは産生するサイトカインが異なっており、病原体排除だけでなくサブセットのバランスの制御にも関わっている (Zenewicz et al., 2009)。本研究では、魚類の CD4⁺T 細胞が哺乳類における Th 特異的なサイトカインを発現しているかを明らかにするために、PBLs から分取した CD4⁺T 細胞を LPS、polyI:C、ConA で刺激しサイトカインの発現動態を解析した。哺乳類では LPS もしくは polyI:C で

刺激した APC は CD4⁺T 細胞の Th1 サイトカインの産生を誘起することが報告されている (Wang et al., 2012)。本研究では B 細胞、単球などが含まれた PBLs が LPS によって刺激され、これら抗原提示細胞が CD4⁺T 細胞における特に *IFN- γ* や *TNF α* といった Th1 サイトカインの発現を誘導したことが考えられた。さらに、トラフグの *IL-4/13A* および *IL-4/13B* 遺伝子の発現が polyI:C、LPS 刺激によって減少した。一方、*IFN- γ* のような Th1 サイトカインの発現量は増加した。哺乳類においては、Th1 から Th2 サイトカインへの発現動態の移行は polyI:C 刺激によって引き起こされることが報告されている (Kuo et al., 2011)。さらに、LPS は Th1 免疫反応が誘起されることによって Th1/Th2 バランスが傾き、Th2 免疫反応を抑制することが知られている。ニジマスにおいて *IFN- γ* が polyI:C の刺激によって発現がみられたのに対し、*IL-4/13A* は polyI:C に対して感応性が低いデータを示した (Takizawa et al., 2011)。加えて、T 細胞リッチなトラフグ PBLs において組換え B7 の刺激後に *IL-4/13A* および *IL-4/13B* の発現量が増加した。これらの本研究で得られた結果および他の先行研究から哺乳類と同様に Th1 優位な免疫状態は Th0 から Th2 への分化を阻害することが魚類においても示唆された。

哺乳類において Th17 が産生する IL-17A または IL-17F は、魚類において複数のホモログが分離・同定している。また、本研究では第 2 章で述べたように *IL-17A/F-3* 遺伝子が LPS 刺激により顕著な発現動態を示したことから、本研究では Th17 サイトカインとして解析した。本研究において *IL-17A/F-3* 遺伝子は、LPS および polyI:C 刺激した CD4⁺T 細胞において初期段階で増加した。哺乳類において IL-17 は炎症反応の重要なメディエーターとして Th17 から産生することが示されている。魚類においてはトラフグの *IL-17A/-3* は、HK 由来の細胞において LPS 刺激後に発現が上昇する (Korenaga et al.,

2010a)。ヤツメウナギにおいて T 細胞用のリンパ球である VLRA リンパ球が LPS 刺激後に IL-17 遺伝子の発現を増加することが報告されている (Guo et al., 2009)。これらのことから *IL-17A/F-3* 遺伝子の発現の増加は LPS 刺激による Th17 反応を示したことを示唆するものである。

哺乳類において制御性 T 細胞(Regulatory T Cell: Treg)は、他の Th サブセットの働きを抑制することで、生体の免疫系を負の制御を行っている (Ozdemir et al., 2009)。Treg が産生する抑制性サイトカインである TGF- β 1、IL-10 は、T 細胞の活性化や増殖を直接阻害し、また樹状細胞などの抗原提示細胞に働きかけることで間接的にも抑制する (Zhang et al., 2009)。Treg 細胞を誘導したりすることで、急性のみならず慢性の炎症も抑制することが知られている。一方、TGF- β 1 とともに IL-6 などの炎症性サイトカイン刺激がナイーブ Th (Th0) 細胞に作用すると上述の Th17 に分化誘導する事が知られている。本研究では TGF- β 1 および IL-10 を対象に Treg サイトカインの働きを検討した。LPS 刺激後に *TGF- β 1* および *IL-10* 遺伝子の発現は増加したが、polyI:C 刺激では有意な増加は見られなかった。魚類においても、炎症反応後に *TGF- β 1* および *IL-10* が増加するフィードバックの現象が認められている (Castro et al., 2011; Kono et al., 2012)。本研究から他の炎症性サイトカインと比べても刺激後の発現増加のタイミングが遅い事からも CD4⁺T 細胞の抑制応答の可能性が考えられる。これらのことから、炎症反応のインデューサーである LPS 刺激によって Treg が抑制性のサイトカインを発現したことが示唆された。しかしながら、哺乳類の先行研究から IL-10 は Treg だけでなく Th2 や新規の Th サブセットである Th9 からも産生されることが報告されている (Soroosh and Doherty, 2009)。さらなる解析のためには、IL-10 産生 CD4⁺T 細胞のフェノタイプを明らかにするためには特異

的な細胞抗原マーカーの決定と、それらマーカーに対する抗体の作製および細胞分取が必要であることが考えられる。これら研究は魚類免疫の抑制性制御に新たな知見を与えることが示唆される。

ConA は非特異的に T 細胞を活性化させる植物由来レクチンである。さらに ConA の作用は LPS や polyI:C などとは異なり、Th 細胞の活性化を非特異的に引き起こし、様々な Th サイトカインの産生を増加させる (Pouw et al., 2010)。本研究では ConA 作用後に対象とした Th1、Th2、Th17、Treg サイトカインすべての発現が CD4⁺T 細胞において上昇することが認められた。これらの結果は魚類の CD4⁺T 細胞が哺乳類に見られるような経路によって非特異的に産生が誘起されることを示唆するものである。

また、本研究では Th 細胞のさらなる免疫特性の検討のためにサイトカインの遺伝子レベルでの解析だけでなく、タンパク質・細胞レベルでの解析を行った。これまでも Th 細胞の細胞表面マーカーである CD4 および産生するサイトカインが魚類における免疫においても重要であることが遺伝子の発現レベルでの研究から考えられてきた (Laing and Hansen, 2011)。しかしながら、上記でも示したエフェクター化した Th 細胞の機能的な分類や分化誘導機構の解明には遺伝子レベルの研究では不十分である。サイトカインは、分泌性のタンパク質であり、産生された局所に置いて標的細胞を刺激するという機能が生理的に重要である。したがって、ELISA 法などを用いて Th 細胞培養や血清中のサイトカインを検出するのではなく、各細胞から分泌されるサイトカインの種類を測定する方法が、Th 細胞の機能面での理解を深める上で必要である。細胞内染色によって哺乳類における Th 細胞の研究は飛躍的に前進している (Caraher et al., 2000)。細胞内染色法とは細胞を抗原もしくはマイトジェンとともに培養することで、活性化された

サイトカインを産生する細胞をタンパク質・細胞レベル検出する測定系である。このアッセイ系はサイトカインと CD4 や CD3 などの細胞表面マーカーを多重染色することで、エフェクター化した Th サブセットごとのサイトカイン産生細胞の割合を解析することができる。近年ではマルチカラーを検出できる FCM が主流であり、複数のサイトカインの検出が同時に可能である。

MHC からの抗原提示を受ける前の Th 細胞はナイーブ T 細胞 (Th0 細胞) と呼ばれ、外来抗原の刺激を受けることにより、それぞれ特異的なサイトカインを産生するエフェクター化 Th 細胞へと分化する。本研究では魚類における分化誘導機構の検討のために Th1 および Th2 に着目した解析を行った。哺乳類において Th1 へと分化を誘導する IFN- γ の組換えサイトカインで刺激を行ったところ、CD4⁺リンパ球における IFN- γ SP は増加したが、IL-4/13A SP および IFN- γ ・IL-4/13A DP については変化が見られなかった。魚類においても哺乳類と同様に Th1 細胞、Th2 細胞はお互いが産生するサイトカインによって相互に分化が抑制される拮抗的な関係性を取り、免疫のバランスをとっていることが考えられている (Laing and Hansen, 2011)。本研究に多いても LPS、polyI:C で *in vitro* 刺激した CD4⁺T 細胞で Th1 系のサイトカイン遺伝子の増加が確認されたが、本研究では Th2 系のサイトカイン遺伝子の発現量が減少した。細胞内染色を用いたタンパク質レベルの検出ではコントロールと比べ産生の低下が見られなかったことから、本研究では遺伝子およびタンパク質レベルでの検出に相関が見られなかった。今後はより詳細な刺激や検出のタイミングを検討する必要がある。また、組換え IL-4/13A で刺激を行ったところ、IL-4/13A SP の産生量の増加だけでなく、IFN- γ ・IL-4/13A DP のコントロールと比較しての増加がみられた。本研究では魚類における Th1、Th2 系サイトカインのうちそれ

どれ一つのタイプのみでの検出しか行っていない。特に IFN- γ rel は魚類特有のタイプであり、哺乳類には見られない Th 細胞の働きを担っている可能性も考えられる。

5. 小括

密度勾配遠心法、細胞の接着特性の利用、磁気細胞分取法などを用いた種々の手法により、トラフグの末梢血からの CD4⁺T 細胞の分取を行った。マルチプレックス RT-PCR によってサイトカイン遺伝子の発現動態を解析した。その結果、哺乳類において各 Th サブセットに特異的に産生するサイトカインの発現が認められた。本研究で得られた結果は、魚類においても Th サブセットが存在し、免疫の方向付けが Th サイトカインによって制御されていることを示唆するものであった。これらは魚類の CD4⁺T 細胞にもサイトカイン動態があり、それらが相互に作用していることを示唆する初めてのデータである。さらなる魚類 CD4⁺T 細胞の解析のためには、病原体感染した魚から分取したものあるいは *in vitro* 免疫刺激した CD4REL⁺細胞を含む CD4⁺細胞におけるサイトカインの遺伝子およびタンパク質のレベルでの発現プロファイルを解析する必要がある。また、サイトカインによる Th 細胞の分化誘導も魚類において存在することが細胞内染色の結果から示唆された。

総括

本論文では魚類におけるサイトカインによる免疫担当細胞の制御機構を検討したものである。

抗原提示能を持つ単球の活性化や分化の制御機構をサイトカイン遺伝子の発現動態から検討した。トラフグの末梢血より単球を分離し、形態観察、フローサイトメトリー (FCM) 解析および細胞マーカーの発現解析を行った。分離が確認された単球に対し免疫誘導物質 (LPS、polyI:C、IMQ) で刺激した結果、新たな細胞集団が FCM 解析によって検出された。この細胞集団は、刺激前の単球集団と比べ高い貪食活性を示した。さらに、単球の活性化/Th 細胞の分化誘導に重要な *CSF-1b*、*IFN- γ* および *TNF- α* などのサイトカイン遺伝子の発現増加が認められた。

次に APC より抗原情報を受け取る $CD4^+$ T 細胞の解析を行った。これまで魚類のサイトカイン研究によって Th1 および Th2 サイトカインの存在は明らかにされているが、Th17 サイトカインの存在は不明であったため、Th17 サイトカインである IL-17 の分離・同定を行った。その結果、トラフグには 7 つの *IL-17* ファミリー遺伝子が存在することが確認され、各サブセットが産生すると考えられるサイトカインが魚類においても明らかとなった。次に、サイトカインが $CD4^+$ T 細胞の分化制御に関与するかを検討した。トラフグの CD4 に対する抗体を作製し、 $CD4^+$ 細胞の分取を試みた。次いで、免疫刺激時におけるサイトカイン遺伝子の発現動態を解析したところ、刺激ごとにそれらの発現動態は異なっていた。また、トラフグの組換え *IFN- γ* および *IL-4/13A* を作製し、 $CD4^+$ T 細胞に作用させたところ、哺乳類と同様に Th1 および Th2 サイトカインの産生がそれぞれ増加した。これらの結果は、魚類においても特異的なサイトカインを産生する $CD4^+$ T 細胞が存在し、さらにサイトカインによる分化制御機構を有していることを示唆した。

以上、本論文は免疫刺激によって魚類の単球が活性化し、 $CD4^+$ T 細胞の分化を誘導す

るサイトカインの発現も確認された。さらに組換えサイトカインによって CD4⁺細胞の分化が誘導された。これらの結果より、哺乳類と同様に魚類免疫担当細胞においてもサイトカインによる複雑な制御機構が形成されていることが推察された。

謝辞

本研究は宮崎大学応用生物科学科食品機能化学講座において、酒井正博教授の御指導の下で卒業研究として行なわれました。指導教官である酒井正博教授には研究の基本方針等の御指導を頂きました。やりがいのある研究テーマや研究環境を頂き、心より感謝しています。

宮崎大学 IR 推進機構 河野智哉特任助教には実験以外にも、非常に多くのご指導を頂きました。また、独創的なアイデアを聞くことで、実験を行う際に必要な工夫する力を養うことが出来たと思います。心より御礼申し上げます。

最後に、いかなるときにも温かく励まし、経済的にも支えてくれた家族には心より感謝いたします。

参考文献

- Aggarwal, S., Gurney, A.L., 2002. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* 71, 1-8.
- Alejo, A., Tafalla, C., 2011. Chemokines in teleost fish species. *Dev Comp Immunol* 35, 1215-1222.
- Alisa, A., Boswell, S., Pathan, A.A., Ayaru, L., Williams, R., Behboudi, S., 2008. Human CD4(+) T cells recognize an epitope within alpha-fetoprotein sequence and develop into TGF-beta-producing CD4(+) T cells. *J Immunol* 180, 5109-5117.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215, 403-410.
- Araki, K., Akatsu, K., Suetake, H., Kikuchi, K., Suzuki, Y., 2008. Characterization of CD8+ leukocytes in fugu (*Takifugu rubripes*) with antiserum against fugu CD8alpha. *Dev Comp Immunol* 32, 850-858.
- Arend, W.P., Palmer, G., Gabay, C., 2008. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* 223, 20-38.
- Benchetrit, F., Ciree, A., Vives, V., Warnier, G., Gey, A., Sautes-Fridman, C., Fossiez, F., Haicheur, N., Fridman, W.H., Tartour, E., 2002. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 99, 2114-2121.
- Benderdour, M., Tardif, G., Pelletier, J.P., Di Battista, J.A., Reboul, P., Ranger, P., Martel-Pelletier, J., 2002. Interleukin 17 (IL-17) induces collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes via AP-1 dependent activation: differential activation of AP-1 members by IL-17 and IL-1beta. *J Rheumatol* 29, 1262-1272.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C., 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 749-795.
- Brubacher, J.L., Secombes, C.J., Zou, J., Bols, N.C., 2000. Constitutive and LPS-induced gene expression in a macrophage-like cell line from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev*

Comp Immunol 24, 565-574.

Buonocore, F., Randelli, E., Casani, D., Guerra, L., Picchietti, S., Costantini, S., Facchiano, A.M., Zou, J., Secombes, C.J., Scapigliati, G., 2008. A CD4 homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): molecular characterization and structural analysis. *Molecular immunology* 45, 3168-3177.

Burge, C.B., Karlin, S., 1998. Finding the genes in genomic DNA. *Curr Opin Struct Biol* 8, 346-354.

Castro, R., Martin, S.A., Zou, J., Secombes, C.J., 2010. Establishment of an IFN-gamma specific reporter cell line in fish. *Fish & shellfish immunology* 28, 312-319.

Castro, R., Zou, J., Secombes, C.J., Martin, S.A., 2011. Cortisol modulates the induction of inflammatory gene expression in a rainbow trout macrophage cell line. *Fish Shellfish Immunol* 30, 215-223.

Costa, M.M., Maehr, T., Diaz-Rosales, P., Secombes, C.J., Wang, T., 2011. Bioactivity studies of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6: effects on macrophage growth and antimicrobial peptide gene expression. *Mol Immunol* 48, 1903-1916.

Daniels, G.D., Secombes, C.J., 1999. Genomic organisation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* TGF-beta. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 139-147.

De Meyer, I., Martinet, W., Schrijvers, D.M., Timmermans, J.P., Bult, H., De Meyer, G.R., 2012. Toll-like receptor 7 stimulation by imiquimod induces macrophage autophagy and inflammation in atherosclerotic plaques. *Basic Res Cardiol* 107, 269.

Dumoutier, L., Louahed, J., Renauld, J.C., 2000. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol* 164, 1814-1819.

Edholm, E.S., Stafford, J.L., Quiniou, S.M., Waldbieser, G., Miller, N.W., Bengten, E., Wilson, M., 2007. Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, CD4-like molecules. *Dev Comp Immunol* 31, 172-187.

Gaffen, S.L., 2004. Biology of recently discovered cytokines: interleukin-17--a unique inflammatory cytokine with roles in bone biology and arthritis. *Arthritis Res Ther* 6, 240-247.

Gaffen, S.L., 2009. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 9, 556-567.

Goetz, F.W., Planas, J.V., MacKenzie, S., 2004. Tumor necrosis factors. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 487-497.

Grayfer, L., Garcia, E.G., Belosevic, M., 2010. Comparison of macrophage antimicrobial responses induced by type II interferons of the goldfish (*Carassius auratus* L.). *J Biol Chem* 285, 23537-23547.

Grayfer, L., Hanington, P.C., Belosevic, M., 2009. Macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) induces pro-inflammatory gene expression and enhances antimicrobial responses of goldfish (*Carassius auratus* L.) macrophages. *Fish Shellfish Immunol* 26, 406-413.

Gunimaladevi, I., Savan, R., Sakai, M., 2006. Identification, cloning and characterization of interleukin-17 and its family from zebrafish. *Fish Shellfish Immunol* 21, 393-403.

Guo, P., Hirano, M., Herrin, B.R., Li, J., Yu, C., Sadlonova, A., Cooper, M.D., 2009. Dual nature of the adaptive immune system in lampreys. *Nature* 459, 796-801.

Haller, O., Kochs, G., Weber, F., 2006. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344, 119-130.

Hanington, P.C., Hitchen, S.J., Beamish, L.A., Belosevic, M., 2009. Macrophage colony stimulating factor (CSF-1) is a central growth factor of goldfish macrophages. *Fish Shellfish Immunol* 26, 1-9.

Hata, K., Andoh, A., Shimada, M., Fujino, S., Bamba, S., Araki, Y., Okuno, T., Fujiyama, Y., Bamba, T., 2002. IL-17 stimulates inflammatory responses via NF-kappaB and MAP kinase pathways in human colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282, G1035-1044.

Horejsi, V., 2003. The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation. *Immunol Rev* 191, 148-164.

Hymowitz, S.G., Filvaroff, E.H., Yin, J.P., Lee, J., Cai, L., Risser, P., Maruoka, M., Mao, W., Foster, J., Kelley, R.F., Pan, G., Gurney, A.L., de Vos, A.M., Starovasnik, M.A., 2001. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *Embo J* 20, 5332-5341.

Kitao, Y., Kono, T., Korenaga, H., Iizasa, T., Nakamura, K., Savan, R., Sakai, M., 2009. Characterization and expression analysis of type I interferon in common carp *Cyprinus carpio* L. *Mol Immunol* 46, 2548-2556.

Kolls, J.K., Linden, A., 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21, 467-476.

Kono, T., Korenaga, H., 2013. Cytokine gene expression in CD4 positive cells of the Japanese pufferfish, *Takifugu rubripes*. *PLoS ONE*.

Kono, T., Korenaga, H., Sakai, M., 2011. Genomics of fish IL-17 ligand and receptors: a review. *Fish Shellfish Immunol* 31, 635-643.

Kono, T., Takayama, H., Nagamine, R., Korenaga, H., Sakai, M., 2013. Establishment of a multiplex RT-PCR assay for the rapid detection of fish cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 151, 90-101.

Kono, T., Zou, J., Bird, S., Savan, R., Sakai, M., Secombes, C.J., 2006. Identification and expression analysis of lymphotoxin-beta like homologues in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Mol Immunol* 43, 1390-1401.

Korenaga, H., Kono, T., Sakai, M., 2010. Isolation of seven IL-17 family genes from the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Fish Shellfish Immunol* 28, 809-818.

Kumari, J., Larsen, A.N., Bogwald, J., Dalmo, R.A., 2009. Interleukin-17D in Atlantic salmon (*Salmo salar*): molecular characterization, 3D modelling and promoter analysis. *Fish Shellfish Immunol* 27, 647-659.

Kuo, C.H., Ko, Y.C., Yang, S.N., Chu, Y.T., Wang, W.L., Huang, S.K., Chen, H.N., Wei, W.J., Jong, Y.J., Hung, C.H., 2011. Effects of PGI2 analogues on Th1- and Th2-related chemokines in monocytes via epigenetic regulation. *J Mol Med (Berl)* 89, 29-41.

Laing, K.J., Hansen, J.D., 2011. Fish T cells: recent advances through genomics. *Dev Comp Immunol* 35, 1282-1295.

Laing, K.J., Zou, J.J., Purcell, M.K., Phillips, R., Secombes, C.J., Hansen, J.D., 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.

Laurent, C., Fazilleau, N., Brousset, P., 2010. A novel subset of T-helper cells: follicular T-helper cells and their markers. *Haematologica* 95, 356-358.

Letterio, J.J., Roberts, A.B., 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 137-161.

Lin, H.F., Shao, J.Z., Xiang, L.X., Wang, H.J., 2006. Molecular cloning, characterization and expression analysis of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) NF45 (ILF2) cDNA, a subunit of the nuclear factor of activated T-cells (NF-AT). *Fish Shellfish Immunol* 21, 385-392.

Liu, M.Y., Wu, M.C., 1992. Induction of human monocyte cell line U937 differentiation and CSF-1 production by phorbol ester. *Exp Hematol* 20, 974-979.

Lubberts, E., Koenders, M.I., van den Berg, W.B., 2005. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 7, 29-37.

MacKenzie, S., Planas, J.V., Goetz, F.W., 2003. LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and in vitro differentiated macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 393-400.

Mesquita Jr, D., Cruvinel, W.M., Camara, N.O., Kallas, E.G., Andrade, L.E., 2009. Autoimmune diseases in the TH17 era. *Braz J Med Biol Res* 42, 476-486.

Moseley, T.A., Haudenschild, D.R., Rose, L., Reddi, A.H., 2003. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 14, 155-174.

Neumann, N.F., Barreda, D., Belosevic, M., 1998. Production of a macrophage growth factor(s) by a goldfish macrophage cell line and macrophages derived from goldfish kidney leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 22, 417-432.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., vonHeijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10, 1-6.

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*. *Fisheries Science* 74, 341-346.

Oboki, K., Ohno, T., Saito, H., Nakae, S., 2008. Th17 and allergy. *Allergol Int* 57, 121-134.

Odaka, T., Tsutsui, S., Sugamata, R., Suetake, H., Miyadai, T., Suzuki, Y., Watanabe, T.,

Nakamura, O., 2011. The plasmablast-like leukocyte in the kidney of fugu (*Takifugu rubripes*). *Fish Shellfish Immunol* 30, 682-690.

Oshiumi, H., Tsujita, T., Shida, K., Matsumoto, M., Ikeo, K., Seya, T., 2003. Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. *Immunogenetics* 54, 791-800.

Overgard, A.C., Hordvik, I., Nerland, A.H., Eikeland, G., Patel, S., 2009. Cloning and expression analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) CD3 genes. *Fish Shellfish Immunol* 27, 707-713.

Ozdemir, C., Akdis, M., Akdis, C.A., 2009. T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation. *Clin Exp Allergy* 39, 626-639.

Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., Aderem, A., 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13766-13771.

Page, R.D., 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357-358.

Palti, Y., 2011. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1263-1272.

Pettersen, E.F., Ingerslev, H.C., Stavang, V., Egenberg, M., Wergeland, H.I., 2008. A highly

phagocytic cell line TO from Atlantic salmon is CD83 positive and M-CSFR negative, indicating a dendritic-like cell type. *Fish Shellfish Immunol* 25, 809-819.

Pouw, N., Treffers-Westerlaken, E., Mondino, A., Lamers, C., Debets, R., 2010. TCR gene-engineered T cell: limited T cell activation and combined use of IL-15 and IL-21 ensure minimal differentiation and maximal antigen-specificity. *Molecular immunology* 47, 1411-1420.

Remels, L., Fransen, L., Huygen, K., De Baetselier, P., 1990. Poly I:C activated macrophages are tumoricidal for TNF-alpha-resistant 3LL tumor cells. *J Immunol* 144, 4477-4486.

Rendon, J.L., Choudhry, M.A., 2012. Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis. *J Leukoc Biol* 92, 529-538.

Rieger, A.M., Hall, B.E., Barreda, D.R., 2010. Macrophage activation differentially modulates particle binding, phagocytosis and downstream antimicrobial mechanisms. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 1144-1159.

Roberts, S., Gueguen, Y., de Lorgeril, J., Goetz, F., 2008. Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure. *Dev Comp Immunol* 32, 1099-1104.

Rouvier, E., Luciani, M.F., Mattei, M.G., Denizot, F., Golstein, P., 1993. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol* 150, 5445-5456.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4, 406-425.

Sakai, M., Taniguchi, K., Mamoto, K., Ogawa, H., Tabata, M., 2001. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Dis.* 24, 433-438.

Savan, R., Kono, T., Igawa, D., Sakai, M., 2005. A novel tumor necrosis factor (TNF) gene present in tandem with the TNF-alpha gene on the same chromosome in teleosts. *Immunogenetics* 57, 140-150.

Savan, R., Sakai, M., 2006. Genomics of fish cytokines. *Comp Biochem Physiol Part D*

Genomics Proteomics 1, 89-101.

Schulz, S.M., Kohler, G., Holscher, C., Iwakura, Y., Alber, G., 2008. IL-17A is produced by Th17, $\gamma\delta$ T cells and other CD4- lymphocytes during infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance. *Int Immunol* 20, 1129-1138.

Secombes, C.J., Wang, T., Bird, S., 2011. The interleukins of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1336-1345.

Sepulcre, M.P., Alcaraz-Perez, F., Lopez-Munoz, A., Roca, F.J., Meseguer, J., Cayuela, M.L., Mulero, V., 2009. Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF- κ B activation. *J Immunol* 182, 1836-1845.

Serrano Hernandez, A., 2009. Helper (TH1, TH2, TH17) and regulatory cells (Treg, TH3, NKT) in rheumatoid arthritis. *Reumatol Clin* 5S1, 1-5.

Shen, F., Li, N., Gade, P., Kalvakolanu, D.V., Weibley, T., Doble, B., Woodgett, J.R., Wood, T.D., Gaffen, S.L., 2009. IL-17 Receptor Signaling Inhibits C/EBP β by Sequential Phosphorylation of the Regulatory 2 Domain. *Sci. Signal.* 2, ra8-.

Soroosh, P., Doherty, T.A., 2009. Th9 and allergic disease. *Immunology* 127, 450-458.

Steinman, L., A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage.

Stummvoll, G.H., DiPaolo, R.J., Huter, E.N., Davidson, T.S., Glass, D., Ward, J.M., Shevach, E.M., 2008. Th1, Th2, and Th17 effector T cell-induced autoimmune gastritis differs in pathological pattern and in susceptibility to suppression by regulatory T cells. *J Immunol* 181, 1908-1916.

Suetake, H., Araki, K., Suzuki, Y., 2004. Cloning, expression, and characterization of fugu CD4, the first ectothermic animal CD4. *Immunogenetics* 56, 368-374.

Sugamata, R., Suetake, H., Kikuchi, K., Suzuki, Y., 2009. Teleost B7 expressed on monocytes regulates T cell responses. *Journal of immunology* 182, 6799-6806.

Sun, X.F., Shang, N., Hu, W., Wang, Y.P., Guo, Q.L., 2007. Molecular cloning and characterization of carp (*Cyprinus carpio* L.) CD8beta and CD4-like genes. *Fish Shellfish Immunol* 23, 1242-1255.

Svingerud, T., Solstad, T., Sun, B., Nyrud, M.L., Kileng, O., Greiner-Tollersrud, L., Robertsen, B., 2012. Atlantic salmon type I IFN subtypes show differences in antiviral activity and cell-dependent expression: evidence for high IFN β /IFN γ -producing cells in fish lymphoid tissues. *Journal of immunology* 189, 5912-5923.

Tafalla, C., Sanchez, E., Lorenzen, N., DeWitte-Orr, S.J., Bols, N.C., 2008. Effects of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte cell line RTS-11. *Mol Immunol* 45, 1439-1448.

Takano, T., Hwang, S.D., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., Sano, M., 2010. Evidence of molecular toll-like receptor mechanisms in teleosts. *Fish Pathol.* 45, 1-16.

Takizawa, F., Araki, K., Kobayashi, I., Moritomo, T., Ototake, M., Nakanishi, T., 2008. Molecular cloning and expression analysis of T-bet in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorffii*). *Molecular immunology* 45, 127-136.

Takizawa, F., Koppang, E.O., Ohtani, M., Nakanishi, T., Hashimoto, K., Fischer, U., Dijkstra, J.M., 2011. Constitutive high expression of interleukin-4/13A and GATA-3 in gill and skin of salmonid fishes suggests that these tissues form Th2-skewed immune environments. *Molecular immunology* 48, 1360-1368.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

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.

Tsukamoto, K., Hayashi, S., Matsuo, M.Y., Nonaka, M.I., Kondo, M., Shima, A., Asakawa, S., Shimizu, N., Nonaka, M., 2005. Unprecedented intraspecific diversity of the MHC class I region

of a teleost medaka, *Oryzias latipes*. *Immunogenetics* 57, 420-431.

Tsutsui, S., Nakamura, O., Watanabe, T., 2007. Lamprey (*Lethenteron japonicum*) IL-17 upregulated by LPS-stimulation in the skin cells. *Immunogenetics* 59, 873-882.

Wang, T., Hanington, P.C., Belosevic, M., Secombes, C.J., 2008. Two macrophage colony-stimulating factor genes exist in fish that differ in gene organization and are differentially expressed. *J Immunol* 181, 3310-3322.

Wang, T., Martin, S.A., Secombes, C.J., Two interleukin-17C-like genes exist in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* that are differentially expressed and modulated. *Dev Comp Immunol* 34, 491-500.

Wang, Z., Sokolovska, A., Seymour, R., Sundberg, J.P., Hogenesch, H., 2012. SHARPIN is essential for cytokine production, NF-kappaB signaling, and induction of Th1 differentiation by dendritic cells. *PLoS One* 7, e31809.

Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Harrington, L.E., 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual review of immunology* 25, 821-852.

Wen, Y., Fang, W., Xiang, L.X., Pan, R.L., Shao, J.Z., 2010. Identification of Treg-like cells in *Tetraodon*: insight into the origin of regulatory T subsets during early vertebrate evolution. *Cell Mol Life Sci* 68, 2615-2626.

Wen, Y., Shao, J.Z., Xiang, L.X., Fang, W., 2006. Cloning, characterization and expression analysis of two *Tetraodon nigroviridis* interleukin-16 isoform genes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 144, 159-166.

Witowski, J., Ksiazek, K., Jorres, A., 2004. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 61, 567-579.

Wittamer, V., Bertrand, J.Y., Gutschow, P.W., Traver, D., 2011. Characterization of the mononuclear phagocyte system in zebrafish. *Blood* 117, 7126-7135.

Yamaguchi, T., Katakura, F., Shitanda, S., Niida, Y., Toda, H., Ohtani, M., Yabu, T., Suetake, H., Moritomo, T., Nakanishi, T., 2011a. Clonal growth of carp (*Cyprinus carpio*) T cells in vitro.

Dev. Comp. Immunol. 35, 193-202.

Yamaguchi, T., Katakura, F., Shitanda, S., Niida, Y., Toda, H., Ohtani, M., Yabu, T., Suetake, H., Moritomo, T., Nakanishi, T., 2011b. Clonal growth of carp (*Cyprinus carpio*) T cells in vitro. Dev Comp Immunol 35, 193-202.

Yao, Z., Fanslow, W.C., Seldin, M.F., Rousseau, A.M., Painter, S.L., Comeau, M.R., Cohen, J.I., Spriggs, M.K., 1995. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. Immunity 3, 811-821.

Yu, Y., Rabinowitz, R., Steinitz, M., Schlesinger, M., 2002. Correlation between the expression of CD4 and the level of CD4 mRNA in human B-cell lines. Cell Immunol 215, 78-86.

Zenewicz, L.A., Antov, A., Flavell, R.A., 2009. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. Trends Mol Med 15, 199-207.

Zhang, N., Schroppel, B., Lal, G., Jakubzick, C., Mao, X., Chen, D., Yin, N., Jessberger, R., Ochando, J.C., Ding, Y., Bromberg, J.S., 2009. Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. Immunity 30, 458-469.

Zou, J., Bird, S., Truckle, J., Bols, N., Horne, M., Secombes, C., 2004. Identification and expression analysis of an IL-18 homologue and its alternatively spliced form in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Eur J Biochem 271, 1913-1923.