

# Characterization of innate cell-mediated cytotoxicity of CD8+ T cells against parasites in teleost fish

助田, 将樹

<https://hdl.handle.net/2324/4475196>

---

出版情報：九州大学, 2020, 博士（農学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



氏 名 : 助田 将樹

論文題名 : Characterization of innate cell-mediated cytotoxicity of CD8<sup>+</sup> T cells against parasites in teleost fish  
(硬骨魚類の CD8 陽性 T 細胞の寄生虫に対する自然細胞傷害性の特性評価)

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

魚類における細胞傷害性 T 細胞(CTL)は、哺乳類と同様に獲得免疫において重要な免疫細胞であり、細菌やウイルス等の様々な病原体に感染した宿主細胞を認識・殺傷する能力を有する。事前に抗原感作された CTL は病原体に感染した自己細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)と抗原ペプチドの複合体を T 細胞受容体(TCR)によって認識することが知られている。しかし、近年、抗原感作されていない魚類 CTL が TCR を介さずに宿主細胞外の細菌を直接殺傷することが報告されており、魚類 CTL が自然免疫においても重要な働きを持つ可能性が提示されている。

寄生原虫 *Ichthyophthirius multifiliis* を原因する白点病などの寄生虫感染症は観賞魚産業や養殖産業において魚の大量斃死をもたらしているもの、魚類の寄生虫に対する生体防御機構は未だ不明な点が多い。特に魚類 CTL が寄生虫に対してどのような役割を持つかは未だ解明されていない。そこで本研究では、魚類 CTL が自然免疫様の傷害活性を寄生虫に対して示すかを調査すると共に、その細胞傷害機構の解明に取り組んだ。

本研究では、淡水魚であるギンブナ (*Carassius auratus langsdorfii*)と淡水性寄生原虫である *I. multifiliis* を用いた。ギンブナの腎臓と鰓から磁気細胞分離法(MACS)を用いて CD8 陽性 CTL を分離し、*I. multifiliis* を 96-well plate 内で混合した後にトリパンブルー染色によって死亡した *I. multifiliis* の個体数を測定し、CTL の寄生虫に対する細胞傷害活性を評価した。その後、その細胞傷害機構を解明するため、CTL と *I. multifiliis* の間に双方が通過することが出来ない孔径 0.4 μm のメンブレンフィルターを設置した際の *I. multifiliis* の死亡数を測定することで、CTL が寄生虫を殺傷するには接触する必要があるのかを調査した。次に CTL が *I. multifiliis* を殺傷する際に使用している細胞傷害因子を探索した。CTL をパーフォリン阻害剤コンカナマイシン A (CMA)またはセリンプロテアーゼ阻害剤 3,4-ジクロロイソクマリン(DCI)で処理することで、*I. multifiliis* に対する細胞傷害活性に影響を及ぼすのかを調べた。更に CTL が *I. multifiliis* の認識に使用している受容体を探索した。アメリカナマズの非特異的細胞傷害性細胞(Non-specific cytotoxic cell: NCC)が寄生虫に対する傷害活性を有することが報告されていることから、Non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1)がギンブナ CTLs による *I. multifiliis* の認識に関与しているのではないかと考えた。まず、NCCRP-1 がギンブナ CTLs に mRNA レベルで発現していることを RT-PCR で確認した。過去の研究により NCCRP-1 を介した NCC の活性化には、細胞内の非受容体型チロシンキナーゼの一つであるヤヌスキナーゼ 2 (JAK2)を介した JAK/STAT 経路が関与していると考えられている。よって CTL を JAK1/2 阻害剤である Baricitinib または TCR を介した細胞の活性化に関与する Src ファミリーキナーゼの阻害剤である Dasatinib での処理による、*I. multifiliis* に対する細胞傷害活性への影響から、どちらの受容体が寄生虫の殺傷に関与しているかを検討した。その後、ギンブナ NCCRP-1 のアミノ酸配列から抗原性の高いペプチドを免疫原として、抗ギンブナ NCCRP1 ウサギ抗体を作製した。これまでに T 細胞で NCCRP-1 が発現しているのを示した証拠

は無い。よってウェスタンブロット解析により、CTLが NCCRP-1 をタンパク質レベルで発現しているかを調べた。次にギンブナ NCCRP-1 のアミノ酸配列から抗原認識部位と考えられる配列を推測しその部位を含む 3 種類のペプチドを合成し、*I. multifiliis* を合成ペプチドで処理した後に CTL と接触させた際の *I. multifiliis* の死亡率から、CTL における寄生虫の認識に NCCRP-1 が関与しているかを評価した。

単離した CTL は *I. multifiliis* に対する高い傷害活性を示した。また、CTL と *I. multifiliis* の接触を阻害すると *I. multifiliis* に対する傷害率が大きく減少したことから、CTL は直接寄生虫を認識し、接触することで寄生虫を殺傷することが示された。CMA と DCI を用いた試験では、両阻害剤により *I. multifiliis* の死亡率が減少したことから、パーフォリンとセリンプロテアーゼを使用することで寄生虫を殺傷すると考えられる。Baricitinib で処理すると CTL の *I. multifiliis* に対する傷害率が有意に減少した。ウェスタンブロット解析により、CTL は NCCRP-1 を発現しているのを確認した。合成ペプチドを用いた阻害試験では、3 種類の合成ペプチドのうち抗原認識部位と推定したペプチドのみで *I. multifiliis* の死亡率が減少した。よってギンブナ CTL の寄生虫に対する細胞傷害機構に NCCRP-1 が関与していることが示された。以上から、CTL は、魚類の寄生原虫に対する防御機構において重要な細胞であり、NCCRP-1 で寄生虫を認識して、複数の細胞傷害因子によって殺傷するという哺乳類ではみられない新規の細胞傷害メカニズムを有していることが考えられる。