

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 | | | |
| 論文名 | Characterization of innate cell-mediated cytotoxicity of CD8 ⁺ 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細胞傷害機構の特性評価) | | | |
| 論文調査委員 | 主査 | 九州大学 | 准教授 | 柚本 智軌 |
| | 副査 | 九州大学 | 教授 | 中尾 実樹 |
| | 副査 | 九州大学 | 准教授 | 沖野 望 |
| | 副査 | 九州大学 | 准教授 | 太田 耕平 |

論文審査の結果の要旨

細胞傷害性 T リンパ球(CTL)は、獲得免疫における細胞性免疫の中心を担う細胞で、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。一方、Natural killer(NK) 細胞は、自然免疫の一翼を担う重要な細胞であり、MHC を介さずに抗原認識し、感染自己細胞のみならず寄生虫や真菌などの病原体そのものを認識することができる。本論文は、魚類 CTL が従来から知られていた獲得免疫系における役割に加え、NK 細胞と同様の機能を備えていることを初めて示したものである。

白点虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)を原因する白点病などの寄生虫感染症は観賞魚や養殖魚の大量斃死をもたらしており、その防疫対策の確立が急務となっているものの、魚類の寄生虫に対する生体防御機構には未だ不明な点が多い。特に寄生虫に対する細胞性免疫の役割は未だ解明されていない。そこで本研究では、白点虫に対する防御を担う魚類の細胞性免疫機構の解明を試みた。

実験魚として、T 細胞の研究に有用であるギンブナ(*Carassius auratus langsdorfi*)を用いた。白点病に感染履歴のないギンブナの腎臓と鰓から磁気細胞分離法(MACS)によって CD8 陽性 CTL、CD4 陽性 T 細胞、その他の白血球を分離し、白点虫とインキュベート後、トリパンブルー色素排除試験によって白点虫の傷害率を算出した。その結果、CTL が他の白血球よりも高い傷害活性を示していた。また、孔径 0.4 μm のメンブレンフィルターによって CTL と白点虫の接触を断つことで、傷害活性が著しく低下したことから、CTL は傷害する際に白点虫と接触する必要があり、この活性が細胞媒介性の傷害活性であることを確かめた。以上から、魚類 CTL は感染による抗原感作がなくても寄生虫に対する細胞傷害活性を示すことが明らかとなった。

次に、CTL が白点虫を殺傷する際に利用する細胞傷害因子の同定を進めた。ギンブナ CTL をパーフォリン依存性経路の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)で処理し、白点虫に対する細胞傷害活性への影響を調べた。その結果、CMA と DCI の両阻害剤により傷害率が減少したことから、ギンブナ CTL はパーフォリンとセリンプロテアーゼであるグランザイムを使用することで寄生虫を殺傷すると考えられた。

さらに、ギンブナ CTL による白点虫の認識機構について検討した。まず、シグナル伝達経路に着目し、JAK1/2 阻害剤であるバリシチニブまたは 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ダサチニブが、CTL の白点虫に対する傷害活性に及ぼす影響を調べた。その結果、本傷害活性はダサチニブでは阻害されず、バリシチニブで有意に阻害されたことから、ギンブナ CTL は JAK/STAT 経路によって活性化されることで、白点虫を殺傷していることが示唆さ

れた。JAK/STAT 経路が関与する硬骨魚類の認識受容体としては、NK 細胞に相当する細胞である非特異的細胞傷害性細胞(Non-specific cytotoxic cell: NCC)の受容体である NCCRP-1 が報告されていたので、ギンブナにおいても NCCRP-1 を白点虫認識受容体の候補とした。ギンブナ CTL が NCCRP-1 を mRNA およびタンパク質レベルで発現していることを RT-PCR と抗ギンブナ NCCRP-1 抗体を用いたウエスタンブロットによって確認した。次に、NCCRP-1 の細胞外領域のアミノ酸配列に相当する 3 種類の合成ペプチドで白点虫を処理した後に CTL による傷害率を測定したところ、抗原認識部位と予測されているペプチドのみで傷害率が有意に低下した。

以上の結果から、ギンブナ 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あり、NCCRP-1 で寄生虫を認識するという哺乳類ではみられない特徴を有していることが示された。

以上のように本論文は、魚類の CTL は哺乳類の CTL と NK 細胞の機能を兼ね備えており、自然免疫と獲得免疫の両免疫系で機能する多能性のエフェクター細胞であることを示したものであり、比較免疫学に重要な知見を付与する優れた業績と認める。従って、本研究者は博士(農学)の学位を得る資格を有するものと認める。