

研究課題

無毒性 AhR リガンド用いた魚類の Th17/Treg 細胞の分化誘導と 細菌感染に対する感受性への影響評価

鹿児島大学 山崎雅俊

1. 研究目的

哺乳類において、環境化学物質が芳香族炭化水素受容体 (AhR) を介して Th サブセットの分化・誘導に影響し、アレルギー性皮膚炎の増悪化や常在細菌や病原体に対する感受性に影響しているという報告がある (Furue *et al.*, 2019, Araújo *et al.*, 2021)。一方、魚類において環境汚染物質と AhR への結合性や化学物質の代謝などは研究されているが、AhR 活性化を介したヘルパーT 細胞 (Th) バランスの不均衡に至るメカニズムや病原体感受性に与える影響などの研究は行われていない。

これまでの我々の研究では、各ヘルパーT 細胞サブセット、特に炎症性の免疫応答に関わる Th17 と抗炎症性の免疫応答に関わる制御性 T 細胞 (Treg) を誘導するため、多環芳香族炭化水素 (PAH) である Benzo[a]pyrene (BaP) や C 重油の水溶性画分の曝露により、その応答を観察してきた。22 年度 LaMer 共同研究では、BaP を腹腔内接種したヒメダカでは、体表面に激しい炎症応答が観察された。また、23 年度 LaMer 共同研究では、C 重油の水溶性画分の短期曝露により濃度依存的に抗炎症性の免疫応答が起こることが確認された。一方、これらの試験で用いた BaP や C 重油の水溶性画分は内分泌攪乱や催奇形性などの免疫毒性以外の毒性を有しており、AhR のみを介した免疫毒性の有無を確認することができない。そこで本年度は非毒性の AhR リガンドである 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) や 2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester などにより、Th17 や Treg など Th サブセットが誘導されるかを検証した。また、次年度以降に使用する予定であるエドワジエラ症感染モデルについて、申請者が保有している *Edwardsiella piscicida* のヒラメ由来株に対してコイが感受性を示すかの確認も行った。

2. 研究方法

2.1. 試験魚

本研究で用いるコイ (*Cyprinus carpio*) は、山口県下関市にある国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産大学校 安本信哉氏から当歳魚を供与して頂いた。馴致のため、コイを実験室内の 200 L ポリカーバネート製タンク内に 100 尾ずつ収容し、24-25°C で飼育・馴致した。

2.2. AhR アゴニスト

本研究では、哺乳類で AhR を介した Treg の誘導が確認されている 2-(1H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester (ITE) を供試した。一方、ITE は複数の構造異性体が存在し、Th サブセットの誘導性が異なることが哺乳類研究で報告されている (参考文献)。そこで、本研究では、2 種類の構造異性体 A (セレックバイオテクノロジー社) 及び構造異性体 B (Sigma-Aldrich 社) の 2 種類を供試し、試験を行った (Fig.1)。

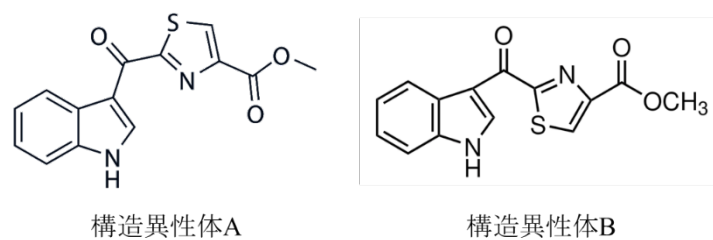


Fig.1. ITE の構造異性体の構造式

2.3. ITE の腹腔内接種と PHA-P による免疫刺激

ITE を 10 mg/mL となるように DMSO に溶解し、1 mg/mL となるようにコーンオイルに溶解した。コイ (10.8±1.8 g) の左体側より 100g/10gBW となるように左体側より腹腔内接種した。また、免疫刺激剤として 0.5 mg/mL のフォトヘマグルチニン-P (PHA-P) を右体側より腹腔内接種した。具体的な感作スケジュールを Fig.に示した。

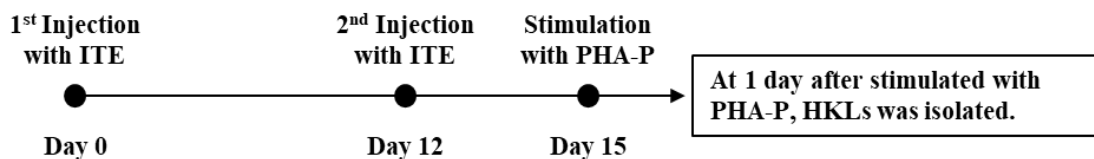


Fig. 2. ITE の腹腔内接種と PHA-P による免疫刺激スケジュール

2.4. 頭腎白血球における免疫関連遺伝子の発現解析

PHA-P 刺激後、1 日目に頭腎白血球を Yamasaki らの記述の通り単離した (Yamasaki *et al.*, 2015)。頭腎白血球 (HKLs) は ISOGEN (ニッポン・ジーン) で溶解し冷凍保存した。Total RNA の抽出とゲノム DNA の除去は、ISOGEN 及び DNase1 (ニッポンジーン社) の取扱説明書に従い行った。逆転写反応は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて、

その取扱説明書に従って逆転写を行い、cDNA を合成し、リアルタイム PCR の鋳型とした。リアルタイム PCR は、LightCycler®96 システム（ロシュ社）で使用了。リアルタイム PCR の反応は、適切に希釈した cDNA を 5 µL、SYBR Green qPCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific 社）を 10 µL、そして各々の対象遺伝子について 200 nM のプライマーセットを含む 20 µL の混合物中で行った。リアルタイム PCR は初期段階 95°C で 3 分間、次いで 95°C で 10 秒間、60°C で 10 秒間を 50 サイクルで増幅した。発現レベルは比較 CT 法で算出した。発現解析は、*IL-10a*、*TGFβ*、*IL-17A/F1*、*TNFα*、*IFNγ* 遺伝子を対象とした。

2.5. 病原性回復のための魚体通過

ヒラメ病魚から分離された病原性株である *Edwardsiella piscicida* FPC498 株を供試した。感染方法は、仲山氏が確立させているコイに対するエドワジエラ症感染モデルを参考に実施した。菌体を TSA 培地で継代した後、25 °C で 48 時間培養後に使用した。培養した *E. piscicida* FPC498 株を湿菌重量 1 mg/ml となるように PBS を用いて調製した。なお、細菌培養や菌液調製は愛媛大学沿岸環境科学研究センター内にある無菌培養室を利用した。

コイに対して調製した菌液を 100 g 魚体重あたり 1 ml となるように左体側より腹腔内接種し、25°C で飼育した。死亡した試験魚は、症状等を観察後、解剖し腎臓及び肝臓から菌分離を行った。なお、魚体通過は、愛媛大学沿岸環境科学研究センター内にある仲山氏が管理している感染試験施設を利用した。

3. 研究成果

3.1. 免疫関連遺伝子の発現解析

遺伝子発現解析の結果を Fig. 3 に示した。構造異性体 A 接種区では、*TGF β*、*IL-17A/F-1*、*TNFα* で有意に発現が上昇していた。特に PHA 刺激した区で顕著に発現の増加が見られた。PHA は T 細胞、特にヘルパー T 細胞を主とする CD4 陽性細胞をより強く活性化することが知られている。このことから、構造異性体 A は、ヘルパー T 細胞サブセットの中の Th17 が誘導・活性化すると考えられる。一方、PHA 刺激無しの構造異性体 A 接種区において *TGFβ* の有意な遺伝子発現が確認され、*IL-17A/F1* も対照区と比較し高い発現が見られたことから、PHA 刺激無しの状態では、AhR を介して誘導されると考えられる Th17 と Treg の両方を誘導すると考えられる。哺乳類の研究において、一般的には ITE は Treg を誘導するが、濃度や接種のタイミングなどの違いで Th17 も誘導することが知られており（Ehrlich *et al.*, 2018）、本研究で試験した構造異性体 A の濃度では、Th17 及び Treg の両方を誘導するが、T 細胞を活性化すると Th17 が優先的に活性化すると考えられる。また、Th1 が産生する *IFNγ* は、PHA 刺激した場合、有意な発

現低下が見られた。このことことから、ITE 接種後の PHA 刺激によって、他の Th サブセットよりも Th17 が優先していると考えられる。

構造異性体 B のみを接種した試験区においては、対照区と比較して有意な発現上昇を示したサイトカイン遺伝子は観察されなかった。一方、PHA 刺激をした場合に TGF β 及び IL-17A/F1 の強い発現が見られた。このことから、構造異性体 B は、構造異性体 A 接種時と同様に Th17 と Treg の両方を誘導していると考えられるが、構造異性体 B では PHA 刺激時に TGF β の発現が見られており、この点が構造異性体 A とは異なっていた。さらに興味深いことに、PHA 刺激時に構造異性体 A が IL-17A/F1 と TNF α の発現が見られていたのに対して、構造異性体 B では TNF α の発現は確認できず、IL-17A/F1 のみ発現が上昇していた。このことから、構造異性体 A と B では、誘導されている Th17 細胞のサイトカインパターンが異なると予測される。

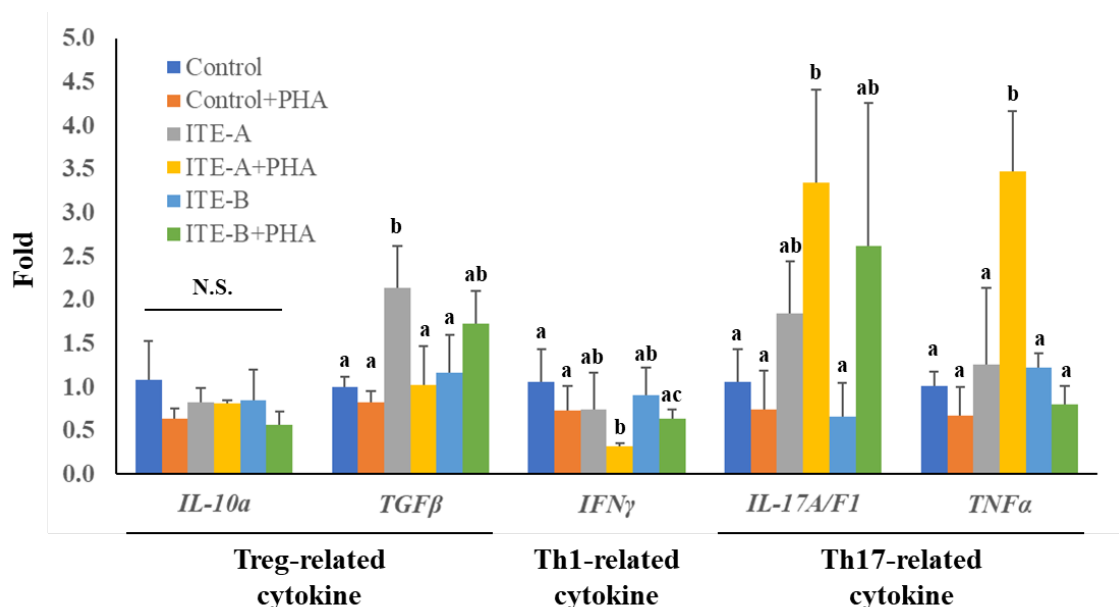


Fig.3. ITE 接種魚における各遺伝子の発現比較

3.2. Th17/Treg バランスの検証

発現解析結果を用いて、各試験区でどの Th サブセットが優位となっているかを検証した。その結果、構造異性体 A を接種し、PHA 刺激した試験区のみで、Th17 が Treg に対して、優占して誘導されていることと考えられた。

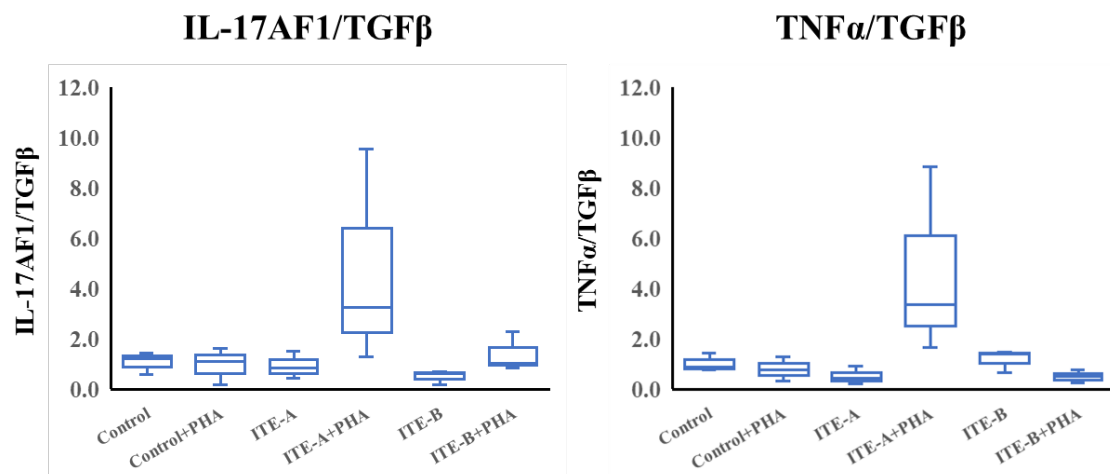


Fig. 4. Th17/Treg バランスの検証

3.3. コイの *E. piscicida* に対する感受性の確認と病原性回復

申請者が保有している *E. piscicida* FPC498 株がコイに対して病原性を有しているか確認するため、仲山氏が確立させたエドワジエラ症感染モデルを参考に感染試験を行った。その結果、エドワジエラ症の典型的な症状である腹水の貯留や腹部や肛門の発赤などが観察され、標的組織である腎臓、脾臓、及び肝臓より *E. piscicida* が単離された。以上の結果より、*E. piscicida* FPC498 株はコイに対して病原性を有することが確認された。

4. 今後の課題

これまで LaMer 共同研究によって AhR を介した Th17/Treg 誘導に関する知見が増やすことができた。そこで来年度は、夏に開催される比較免疫学会での学会発表を目指し、情報の整理を行っていく予定である。一方、これまで Th17/Treg 誘導に関して得られた情報は、組織や白血球に対する解析であったため、これが CD4 陽性 Th によるものなのかを確認する必要がある。そのため、抗 CD4 抗体を用いて白血球から磁気ビーズ単離法などで Th 単離後、その発現するサイトカインパターンを確認する必要があると考えられる。また、病原性を確認したエドワジエラ症を用いて、これらの Th バランスの偏りが感染症に対する感受性に与える影響についても検討する必要がある。