

魚類の粘膜免疫と補体

中尾実樹

九州大学大学院農学研究院・生命機能科学部門

Complement system in mucosal immunity of fish

Miki Nakao

Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University

1. はじめに

2021年8月に千里ライフサイエンスセンター(大阪府)で開催された第58回日本補体学会学術集会において、筆者らの発表「コイ体表粘液中に存在する補体成分と粘液における補体活性化」に対して、日本補体学会優秀賞を賜りました。これまで「魚の補体」研究を暖かく励ましてくださいました補体学会の皆様、学会賞選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

粘膜免疫はヒトを含めた哺乳類でも近年ホットな研究領域となっています。一方、空気中よりも比較的高濃度に微生物を含む水中に生息し、外界と接するほぼすべての表面を粘膜組織が占める魚類にとっても、粘膜免疫は感染防御の最前線として極めて重要であると考えられます。この理解は、1970年代から多くの魚類免疫学研究者で共有され、粘液中のIgM^{1,2)}だけでなく、多様なレクチン³⁾、抗菌ペプチド⁴⁾などの構造と機能が研究されてきました。特に2005年に発見された硬骨魚類特有の抗体クラスIgZ/IgTが、粘膜組織における抗寄生虫免疫応答において特に重要な役割を果たす⁵⁻⁷⁾ことが報告されて以来、魚類でも粘膜免疫研究の隆盛期が続いています。

感染防御の最前線としての粘膜免疫を理解するためには、自然免疫・獲得免疫および体液性免疫・細胞性免疫の両視点からの免疫応答の解析が必要です。

我々は、近年、魚類体表における細胞性の免疫応答および補体関連因子の生体防御・恒常性維持機能に着目した研究を進めています。本稿では、受賞演題に関連した、魚類における粘膜免疫研究と補体研究について、その背景と最近の進展について紹介させていただきます。

2. 粘膜におけるT細胞の自然免疫機能

金魚、鯉、鮒などの淡水魚に頻発する病気に白点病があります。白点病は、白点虫と呼ばれる繊毛虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)の感染症です。白点虫が鰓に寄生すると、呼吸困難で魚が死ぬことがあるほか、体表に寄生された魚は痒がって体を岩や網に擦りつけ、それによって生じた傷(擦れ)が新たな病原微生物の体表からの侵入を許してしまいます。白点病はマダイやトラフグなどの海産魚にも発生しますが、海産白点虫は淡水とは別種の繊毛虫(*Cryptocaryon irritans*)です。特に淡水白点虫(*I. multifiliis*)に対する魚の防御には、体表粘液中に分泌されたIgTなどの抗体が重要であるとの報告がありますが⁸⁾、白点虫への魚類の免疫応答には不明な点が多く残っており、白点虫を防御するワクチンは未開発のままです。

そこで筆者の研究室では、*I. multifiliis*に対する局所免疫応答の解析を、ギンブナをモデルとして開始しました。ギンブナは、3系統のクローンとして

維持されており、CD4、CD8、IgM に対するモノクローナル抗体も樹立されているために、ワクチン開発を見据えた獲得免疫応答を詳細に解析できる優れたモデル魚種です⁹⁾。

このようなクローンギンブナの利点を活かす意味で、筆者らはまず、白点虫に対する細胞性免疫応答に着目しました。その結果、腎臓（魚類の造血組織）と鰓から分離した白血球が、白点虫に対して殺傷活性を示すことを見出しました¹⁰⁻¹¹⁾。CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、および CD4/CD8 Double Negative の細胞群に分けると、殺傷活性が最も高いのは CD8⁺ T 細胞で、その活性は、白点虫との接触を必要とし、パーフォリンおよびグランザイム様セリンプロテアーゼによって媒介されることが判明しました（表 1）。特に興味深い点は、この CD8⁺ T 細胞による殺傷活性は、MHC 非拘束的であることです。すなわち、CD8⁺ T 細胞は、T 細胞受容体に依存しない、異物のパターン認識機構を備えていることが示唆されます。

表 1 腎臓、鰓から分離した白血球の白点虫に対する殺傷活性（白点虫の致死率（%））

細胞集団	腎臓	鰓
未分画	48	39
CD4 ⁺ T 細胞	41	55
CD8 ⁺ T 細胞	100	100
CD4/CD8 double negative	11	3

* 文献⁹⁾ より改変

3. CD46 ホモログによる上皮細胞バリアの制御

筆者らは、進化的に原始的な膜型補体制御因子として、ゼブイラフィッシュ、コイおよびギンブナの CD46 ホモログを同定し、Teleost complement regulatory membrane protein (Tecrem) と命名しました。Tecrem は、C3b や C4b の自己細胞への沈着を抑制する補体活性化制御能だけでなく、哺乳類の CD46 で知られるように、T 細胞の増殖・活性化にも関与することがわかりました¹²⁻¹⁴⁾。さらに、哺

乳類の CD46 は腸管上皮細胞株 (Caco-2) にも発現し、Caco-2 の増殖とそれによる創傷治癒反応を制御することが報告され¹⁵⁾、CD46 の恒常性維持機能に注目が集まりました。

筆者らは、コイやギンブナの Tecrem が鰓から樹立された上皮細胞株(それぞれ KF-1、CFS)にも発現することを確認していましたが、これら細胞における Tecrem の役割を、創傷治癒の観点から調べてみました。具体的には、KF-1 や CFS 細胞上の Tecrem を抗 Tecrem モノクローナル抗体で刺激し、これら上皮細胞株による細胞シートの形成に対する影響を解析しました。まず、Gap closure assay によって、Tecrem 刺激が上皮細胞株の増殖を促進することがわかりました。また、上皮細胞が *in vitro* でシートを形成する際に Tecrem を刺激すると、細胞中の Tight junction 構成タンパク質の一つ Zonula occludens 1 (ZO1) の発現が上昇すること、および形成されたシートにおける上皮細胞の密集度が高まることが観察されました¹⁵⁾。これらの結果から、魚類の上皮細胞に発現する CD46 ホモログは、上皮細胞シートの健全性の維持に貢献していることが示唆されます。

4. 体表における補体活性化

魚類において多くの補体成分が肝臓以外にも多様な部位で発現していることが、10 年以上前から報告されてきました¹⁷⁾。我々もコイやゼブラフィッシュをモデルとして、様々な補体成分について mRNA の組織分布を定量的・半定量的 PCR で調べましたが、皮膚で発現する補体成分は C1q, C4, MASP3, B 因子, C5, C7, I 因子, プロパージンなど、比較的限られていることがわかりました（未発表）。したがって、古典経路、第二経路、レクチン経路、溶解経路を構成できるほどの補体成分は皮膚には存在せず、皮膚で産生された補体タンパクは、体表では体液中での補体系の機能とは異なる未知の役割を担うのではないか、という仮説を立てていました。これを検

証する研究計画が幸いにも科研費 挑戦的萌芽研究 (16K14985) の採択を得ることができましたので、実際にコイの体表粘液中にはどんな補体成分が存在するのか、さらに体表粘液中で補体活性化が起こるのかを、タンパク質レベルで検討しました。

近年、いくつかの魚種で体表粘液のプロテオーム解析によって、C3 などの補体成分が検出されていますが^{18,19)}、我々は、これまでに作成・樹立してきた、各種補体成分に対する特異抗体を活用したアプローチを選択しました。

表 2 コイ補体成分 mRNA・タンパク質の体表・皮膚における存在

補体成分	体表粘液		皮膚	
	(タンパク質)	(mRNA)	(タンパク質)	(mRNA)
C1q-A 鎖	±	+		
C4-1	+	+		
C4-2	+	-		
C2	+	-		
MBL	-	-		
C3-H1	+	-		
C3-S	+	-		
C5-I	+	±		
プロパージン	+	+		

*タンパク質はウエスタンブロッティング、mRNA は半定量的・定量的 PCR によって検出した。

まず、コイ粘液中補体成分の存在については、表 2 に示すような補体成分が体表粘液からウエスタンブロッティングで検出されました。この中には、皮膚から mRNA としては検出されない成分も含まれています。これらの補体成分タンパク質が、どこで産生され、どのように体表粘液中に運搬・分泌されたのかは不明ですが、魚類は、タンパク質を上皮細胞シートの基底膜側からアピカル側に通過させる新奇メカニズムを備えているのかもしれませんが。これは大変興味ある研究課題だと思います。

体表粘液中で補体が活性化されるか否かについては、まず、古典経路について検討しました。具体的には、淡水魚に鱗赤病、立鱗病、穴あき病などを引き起こす *Aeromonas hydrophila* と *A. salmonicida* それぞれに対するコイの特異抗体を作成し、これら抗体 (IgM) で感作した菌体をコイ体表粘液とインキュベート後に、菌体に沈着した補体成分のウエスタンブロッティングによる検出を試みました。

表 3 コイ血清・体表粘液とインキュベートした抗体感作・非感作 *A. salmonicida* への補体成分の沈着

補体成分	体表粘液		正常血清	
	感作菌体	非感作菌体	感作菌体	非感作菌体
C1q-A	+	+	+++	+++
C4-1	+	+	++	++
C4-2	+	+	++	++
C3	+	+	+++	++
C5	-	-	++	+

**A. hydrophila* への沈着も同様の傾向を示した。

*C3 は、C3-H1 と C3-S の α 鎖を認識するモノクローナル抗体で検出した。主に iC3b として検出された。

その結果、表 3 に示す補体成分の沈着が認められ、体表粘液中でも古典経路を介して少なくとも C3 までは活性化が進行することが示唆されました。一方、粘液中に検出されていた C5 の菌体への沈着は検出されず、溶解経路の活性化は証明できませんでした。溶解経路活性化の有無 (膜侵襲複合体の形成・非形成) については、抗 C9 や抗 C8 を用いて補強データを得る必要がありますが、溶解経路が働いていないとすれば、体表粘液中における補体のエフェクター機能としては、C3b や iC3b によるオプソニン効果が考えられます。この点は今後、コイの好中球やマクロファージを使って検証する必要があります。もう一点、興味深いのは、本実験では抗体による感作の

有無に関係なく、C1q の沈着が認められたことです。哺乳類の C1q は、Ig 以外にリポ多糖の Lipid A や Pentraxin にも結合することが知られています²⁰⁾。今後、これらの分子を含めて、魚類の体表粘液中で C1q が認識するリガンドの特定を進める必要があります。また、魚類体表粘液中でのレクチン経路や第二経路の活性化についても、現在、検討を進めています。

5. 考察

魚類の白血球には、その原始的な機能を色濃く残した多能性が認められます。たとえば、魚種にもよりますが、凝固系において哺乳類の血小板に相当する役割を果たす有核細胞である栓球や、イムノグロブリン産生を担う B 細胞が、魚類では活発な貪食活性を示します²¹⁻²³⁾。これらの細胞は、各 lineage の祖先形と考えられるマクロファージの機能を依然として保持したまま、血液凝固や抗体産生に向けた機能を分科の途中にあると解釈されます。本稿で紹介した T 細胞による白点虫の MHC 非依存的認識と殺傷活性からは、魚類の T 細胞が兼ね備える原始的な機能を垣間見ることができます。

哺乳類 CD46 の最も代表的なリガンドは C3b と C4b です。魚類においても、Tecrem は C3b や C4b と相互作用することが示唆されています¹¹⁾。本稿で紹介した、Tecrem の上皮細胞に対する恒常性維持機能と体表粘液中で観察された C3 の活性化を総合すると、体表粘液中での古典経路を介した補体活性化は、C3b による異物のオプソニン化に加えて、体表の上皮細胞シートの健全性維持にも貢献している可能性が考えられます(図 1)。今後、粘液中補体の多面的な生体防御能をさらに解析することにより、魚類における感染防御の最前線の分子・細胞メカニズムをさらに深く理解することが可能になると期待されます。

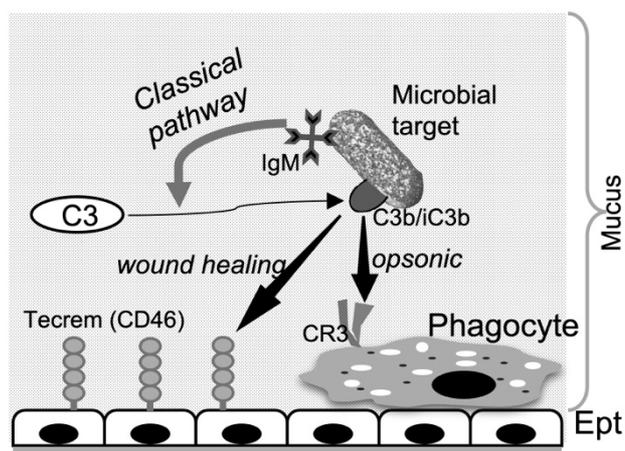


図 1 魚類体表粘液中における補体活性化の役割(推定図) 略号: CR3 (C3 レセプタータイプ 3)、Ept (上皮細胞)

6. おわりに

本寄稿文を個人的な回顧で終えることをご容赦ください。1983 年に指導教員の矢野友紀 助教授(当時)から「卒論テーマを自由に決めて良い」と言われて、私の頭に真っ先に浮かんだテーマは、「魚類の体表粘液中の抗体産生応答にも二次応答があるか?」という疑問でした。折しもその年は、魚の免疫系を新たな研究室のメインテーマに据え、矢野先生を含めてたった 4 人のラボメンバーで免疫学の勉強をゼロから始めたところでした。そんな中、論文の輪読で出会った「ヒラメの血清中および体表粘液中の免疫グロブリン」という 1969 年の論文²⁴⁾に着想を得たのです。さっそく、毎週 1 回コイの腹腔内にヒツジ赤血球を打ちこみ、体表粘液を拭き取っては赤血球凝集活性を測定しました。結局、これを 3 ヶ月繰り返しても、粘液抽出液には一次応答の凝集活性さえ現れず、この卒論テーマはボツとなりました。忸怩たる思いで粘膜抗体の研究を諦め、かたちだけでも卒論をまとめることができるようにとの温情で矢野先生から渡された「コイ血清の補体溶血反応の指摘条件の決定と反応の Kinetics 解析」というテーマに晩秋から取り組み、なんとか 3 月に卒業することができました。これを機に私は粘液のことなどすつ

かり忘れてしまい、補体研究に夢中になり、コイ血清中の補体成分の単離や補体遺伝子の解析に没頭してきたのですが、その後 30 年余りの時を経て、再び体表粘液の研究に吸い寄せられたことを、とても感慨深く感じています。今度こそ、研究がボツにならないように、新たな視点で魚類の粘膜免疫における補体の役割を解明して行きたいと思います。今後とも、補体学会の皆様にはさらにご指導とご鞭撻をいただければ幸いです。

[謝辞]

本稿で紹介した筆者らの研究には、農学研究院水族生化学研究室の杣本智軌准教授、長澤貴宏助教が大きく貢献しました。また、同研究室の助田将樹博士、塩田昂明氏（T 細胞による抗白点虫防御）、Dr. Harsha Prakash、元部詩織氏（Tecrem の恒常性維持機能）、吉迫郁子氏、黒木将武氏（体表粘液中の補体活性化）は、粘り強く実験に取り組み、各プロジェクトで鍵となるデータをとってくれました。

また、本原稿の入稿に際し、「補体」の編集委員長 水野正司先生には格別のご配慮を賜りました。深く御礼申し上げます。

[利益相反]

筆者には本論文内容に関連した開示すべき COI 関係にある企業等はありません。

[文献]

- 1) Bradshaw CM, Richard AS, Sigel MM. IgM antibodies in fish mucus. *Proc Soc Exp Biol Med* 136:1122-1124 (1971)
- 2) Hamuro K, Suetake H, Saha NR, Kikuchi K, Suzuki Y. A teleost polymeric Ig receptor exhibiting two Ig-like domains transports tetrameric IgM into the skin. *J Immunol* 178: 5682-5689 (2007)
- 3) Suzuki Y, Tasumi S, Tsutsui S, Okamoto M, Suetake H. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 136: 723-730 (2003)
- 4) Okella H, Ikiriza H, Ochwo S, Ajayi CO, Ndekezi C, Nkamwesiga J, Kaggwa B, Aber J, Mtewa AG, Koffi TK, Odongo S, Vertommen D, Kato CD and Ogwang PE. Identification of Antimicrobial peptides isolated from the skin mucus of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Front Microbiol* 12: 794631 (2021)
- 5) Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, Steiner LA. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat Immunol* 6: 295-302 (2005)
- 6) Zhang YA, Salinas I, Li J, Parra D, Bjork S, Xu Z, LaPatra SE, Bartholomew J, Sunyer JO. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat Immunol* 11: 827-835 (2010)
- 7) Salinas I, Fernández-Montero Á, Ding Y, Sunyer JO. Mucosal immunoglobulins of teleost fish: A decade of advances. *Dev Comp Immunol* 121: 104079 (2021)
- 8) Buchmann K. Immune response to *Ichthyophthirius multifiliis* and role of IgT. *Parasite Immunol* 42: e12675 (2020)
- 9) 中西照幸. クローンギンブナを用いた免疫学・遺伝学研究. *細胞工学* 11: 569-574 (1992)
- 10) Sakeda M, Shiota K, Kondo M, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T. Innate cell-mediated cytotoxicity of CD8⁺ T cells against the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis* in the ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Dev Comp Immunol* 115: 103886 (2021)

- 11) Shiota K, Sukeda M, Prakash H, Kondo M, Nakanishi T, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T. Local immune responses to two stages of *Ichthyophthirius multifiliis* in ginbuna crucian carp. *Fish Shellfish Immunol* 118: 19-24 (2021)
- 12) Tsujikura M, Nagasawa T, Ichiki S, Nakamura R, Somamoto T, Nakao M. A CD46-like molecule functional in teleost fish represents an ancestral form of membrane-bound regulators of complement activation. *J Immunol* 194: 262-272 (2015)
- 13) Nur I, Harada H, Tsujikura M, Somamoto T, Nakao M. Molecular characterization and expression analysis of three membrane-bound complement regulatory protein isoforms in the ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. *Fish Shellfish Immunol* 35: 1333-1337 (2013)
- 14) Nur I, Abdelkhalek NK, Motobe S, Nakamura R, Tsujikura M, Somamoto T, Nakao M. Functional analysis of membrane-bound complement regulatory protein on T-cell immune response in ginbuna crucian carp. *Mol Immunol* 70: 1-7 (2016)
- 15) Cardone J, Al-Shouli S, Kemper C. A novel role for CD46 in wound repair. *Front Immunol* 2: 28 (2011)
- 16) Prakash H, Motobe S, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M. Homeostatic functions of Tecrem, a CD46-like regulatory protein of complement activation, on epithelial cells in carp fish. *J Mar Sci Eng* 9: 687 (2021)
- 17) Nakao M, Tsujikura M, Ichiki S, Vo TK, Somamoto T. The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. *Dev Comp Immunol* 35: 1296-1308 (2011)
- 18) Cordero H, Brinchmann MF, Cuesta A, Meseguer J, Esteban MA. Skin mucus proteome map of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Proteomics* 15: 4007-4020 (2015)
- 19) Brinchmann MF. Immune relevant molecules identified in the skin mucus of fish using omics technologies. *Mol Biosyst* 12: 2056-2063 (2016)
- 20) Ghai R, Waters P, Roumenina LT, Gadjeva M, Kojouharova MS, Reid KBM, Sim RB, Kishore U. C1q and its growing family. *Immunobiology* 212: 253-266 (2007)
- 21) Nagasawa T, Nakayasu C, Rieger AM, Barreda DR, Somamoto T, Nakao M. Phagocytosis by thrombocytes is a conserved innate immune mechanism in lower vertebrates. *Front Immunol* 5: 445 (2014)
- 22) Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M. Carp thrombocyte phagocytosis requires activation factors secreted from other leukocytes. *Dev Comp Immunol* 52: 107-111 (2015)
- 23) Li J, Barreda DR, Zhang YA, Boshra H, Gelman AE, Lapatra S, Tort L, Sunyer JO. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat Immunol* 7: 1116-1124 (2006)
- 24) Fletcher TC, Grant PT. Immunoglobulins in the serum and mucus of the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Biochem J* 115: 65P (1969)