

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

魚類における免疫学的不妊化技術の開発に向けた研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 公開日: 2024-06-10 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高瀬, 研志 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/2000190

博士学位論文要約
Summary of Dissertation

専攻 Major	応用生命科学専攻	氏名 Name	高瀬 研志
論文題目 Title	魚類における免疫学的不妊化技術の開発に向けた研究		

世界人口の増加に伴い、食糧不足問題が深刻化している。そのため、重要な食糧源である水産物を持続的に生産することが可能となる養殖業の重要性は極めて高い。この養殖業の生産効率を低下させる要因のひとつに性成熟ともなう魚の成長不振がある。すでに染色体操作やゲノム編集技術を駆使した不妊化手法は考案されているものの、汎用性の面では依然として改良の余地がある。これらとは異なる不妊化手法のひとつに、対象動物自身の獲得免疫系により自身の性成熟を抑制させる免疫学的不妊化技術がある。本研究では、水産養殖の世界に新たな不妊化技術を導入することを目的として、魚類に対する免疫学的不妊化技術の開発に向けた基礎的研究を実施した。

初めに、魚類においては性成熟関連ホルモンを標的とした免疫では効果的な性成熟抑制を誘導できないことが明らかになっているため、対象魚を生殖腺そのもので免疫し、生殖腺組織を傷害できないか検討した。まず、精巣、および卵巣の混合破砕液をフロイント・コンプリート・アジュバント (FCA) で乳化した抗原液 (20 mg/mL) を作製し、これで未成熟ニジマス *Oncorhynchus mykiss* を免疫した。ネガティブコントロール区として、FCA で乳化した筋肉破砕液で免疫した区、および生理食塩水 (PBS) のみで免疫した区の2試験区を用意した。免疫から22日後、血漿と生殖腺をサンプリングし、血中抗体価の解析および組織観察を行った。生殖腺+FCA区および筋肉+FCA区の抗体価はPBS区に比べ、生殖腺破砕液に対して有意に高い抗体価を示したものの、生殖腺免疫区と筋肉免疫区の間で有意な差は検出されなかった。また、特に高い抗体価を示した個体について組織学的解析を行ったものの、明らかな傷害作用は確認されなかった。したがって、本手法により生殖腺を傷害し、不妊化を引き起こすことは困難であると考えられた。より自己抗原性が強くなるとされる成熟段階の進んだ生殖腺で免疫した場合の効果についてもいずれ検討する必要がある。

次に、卵や精子の元となる生殖細胞を直接免疫学的に排除することが可能であるか解析することを目的として、ニジマス生殖細胞に特異的に結合するマウスモノクローナル抗体 (以降 Anti-GC mAbs) をニジマス腹腔に接種し、その影響を解析した。まず、Anti-GC mAbs 溶液をオイルアジュバントである Montanid ISA 763A VG で乳化した抗原 (500 µg/mL) を用意し、50 µL 分を未成熟ニジマス腹腔に接種した。ネガティブコントロール区の実験魚には PBS をオイルアジュバントで乳化した抗原を接種した。さらに、1回目の接種から23日目、30日目、および37日目に、乳化していない抗体溶液を追加で腹腔接種した。40日目に血漿と生殖腺をサンプリングし、Anti-GC mAbs に対するニジマス血中抗体価の変化と、Anti-GC mAbs が生殖細胞に与えた影響を解析した。解析の結果、ニジマス血中抗体価は上昇傾向を示したものの、統計的な有意差は検出されなかった。また、特に高い抗体価を示した個体について生殖細胞を標的とした免疫染色を実施した。その結果、高抗体価の個体においても生殖細胞に対する明らかな傷害作用は確認されなかった。

この結果を踏まえ、腹腔接種した Anti-GC mAbs が生殖細胞に到達しているのか解析した。まず、受精後20日目のニジマス仔魚腹腔に Alexa488 で標識した 0.5~1.0 µL の Anti-GC mAbs (215 µg/mL、21.5 µg/mL) を接種し、28日後に接種個体の生殖腺を顕微鏡下で観察した。観察の結果、一部のニジ

マス生殖細胞に抗体が結合している様子が確認された。さらに、76 日後にふたたび生殖腺を観察した結果、生殖腺後端部に Alexa488 陽性の生殖細胞が残留している様子が確認された。一方で、受精後 102 日目の個体に 25 μ L の Anti-GC mAbs (21.5 μ g/mL) を接種したところ、精巣において明らかな陽性シグナルは確認されなかった。しかしながら、卵巣においては卵巣薄板と平行に並ぶ様な配置で陽性細胞が確認され、これは免疫染色時に確認された陽性シグナルの配置の傾向と似ていた。以上の結果から、抗体は生殖腺内に格納された生殖細胞に到達できなくなるが、卵巣の場合は成熟の過程でふたたび生殖腺内部が腹腔内に開け、抗体と生殖細胞が接触できる可能性が示唆された。

最後に、抗体の低分子化により生殖腺間膜を突破することを目的として、Anti-GC mAbs の一本鎖可変領域断片 (scFv) の作製に向けた基礎的研究に取り組んだ。まず、Anti-GC mAbs を産生するハイブリドーマ株から RNA を抽出し、市販の 5'-RACE PCR キットを用いて cDNA 合成、および抗体可変領域断片の増幅を行った。得られた配列について、Blastx による相同性検索や IMGT/V-QUEST による可変領域内ドメイン解析を行い、目的の抗体可変領域配列であると判断した。これらの重鎖・軽鎖可変領域断片をオーバーラップ PCR により結合し、pColdII DNA ベクターにクローニングした。大腸菌 BL21 株を本ベクターで形質転換し、振とう培養により可溶性の組換えタンパク質を産生させた。ヒスチジンタグにより精製した後、得られた組換え抗体でニジマス精巣組織切片を免疫染色に供し、生殖細胞に対する特異性を解析した。しかしながら、本抗体の生殖細胞に対する特異性は確認されなかった。今後は、発現系に真核細胞を用いることで、本来の特異性が発揮されるのか解析する必要がある。

以上の結果から、現段階では免疫学的不妊化技術を魚類に応用することは困難であることが明らかとなった。今後、より特異的に始原生殖細胞を認識可能な scFv の開発や、抗体薬剤複合体技術を活用したより直接的かつ確実な標的細胞除去技術を応用した新たな不妊化技術の開発が求められる。