

令和元年5月31日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18752

研究課題名(和文) 魚類造血の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of hematopoiesis in teleost fish

研究代表者

片倉 文彦 (KATAKURA, Fumihiko)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：10756597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：魚類造血の分子機構の解明を目的として、コイにおける全ての血球系列の造血を制御する因子の同定を試み、それらの役割を明らかにした。TPOは栓球前駆細胞のコロニー形成を促す栓球造血因子であることを示した。コイから4種類のG-CSFパラログ分子を同定し、それらは単球および好中球の造血因子として働くもの、好中球特異的に造血・遊走・活性酸素産生能などを亢進させる因子として働くものなど機能分担されていることを明らかにした。さらにコイ好塩基球の造血を促す新規サイトカインを同定するとともに、Kit ligandやCSF-1, IL-7, Notch ligandなどの相同分子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類の全ての血球系列の造血を制御するサイトカインの同定に成功した。本研究の進展により、魚類の生理・免疫機構が包括的に明らかにされ、魚類養殖において問題となる感染症の制御にむけた診断法や予防法などの開発の基盤となることが期待される。また魚類は哺乳類との共通祖先形質を多く残しており造血研究モデルとして有用であると考えられ、系統発生的視点から脊椎動物の造血システムの普遍性と多様性を理解することにつながる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate molecular mechanisms of hematopoiesis in teleost fish, we tried to identify and characterize various hematopoietic growth factors regulating development of all blood cell lineages in common carp. Carp TPO was revealed to be a thrombopoietic cytokine that promotes thrombocytic colony-formation from kidney cells. We found four paralogs of carp G-CSF that have different functions regarding development, trafficking and activation of neutrophils. We further identified a novel cytokine that promotes development of basophils in carp. Homologs of Kit ligand, CSF-1, IL-7 and Notch ligands were cloned from carp.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：魚類 造血因子 造血幹/前駆細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血研究は生体の恒常性維持や免疫応答を担う細胞の成り立ちやそれらのシステムを支える幹細胞の維持機構を明らかにすることであり、病原体感染時の免疫応答の理解に留まらず、癌の発生機序や病態理解、さらには再生医療の開発に向けて極めて重要なテーマである。魚類は腎臓が主な造血部位であり、骨髄を主な造血部位とする哺乳類とは相違点があるものの、基本的な血球組成は同様である。研究代表者らは、哺乳類で赤血球造血因子として知られる EPO の相同分子をコイやキンギョから同定し、EPO が魚類腎臓細胞に作用して赤血球造血を制御することを示した。これらの知見は、魚類が哺乳類と類似の造血機構を具えており、造血研究のモデルとして有用であることを示唆している。また魚類は貪食細胞などが担う自然免疫と T・B 細胞を介した獲得免疫の両者をもつ最下等の生物である。これら魚類免疫細胞の産生機構の全体像を明らかにすることは、魚類感染症対策の開発のための基盤となるだけでなく、哺乳類の造血研究に系統発生的視点を与えることが期待される。

2. 研究の目的

造血幹細胞から全ての成熟血球に至る魚類造血機構の全体像を把握するため、造血幹細胞の増幅や造血幹細胞から全血球系列の細胞への分化誘導が可能な培養系を開発し、魚類造血の詳細な分子機構を明らかにすることを目的とした。コイは造血因子の役割を解析可能な細胞培養系が構築されている上、ドラフトゲノムが解読済みである。そこで本研究では、全ての血球系列の前駆細胞の増殖・分化を制御する造血因子や支持細胞株の同定を試み、それら単独または協同での機能の解明を目指した。造血システムの源である造血幹細胞の自己複製と分化の制御機構解明にむけて、造血幹細胞培養法の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) 種々の造血因子の同定と機能解析

種々の血球系列特異的な造血因子 (幹細胞因子 Kit ligand、巨核球/血小板造血因子 TPO、好中球造血因子 G-CSF、単球造血因子 CSF-1、好酸球/好塩基球造血因子 IL-5、リンパ球造血因子 IL-7 など) や T 細胞分化に必須とされる Notch シグナルのリガンド (Delta-1 および Delta-4) の相同遺伝子をゲノムシニエー解析などによりコイゲノムより予測し、RT-PCR により増幅後、cDNA 塩基配列を決定した。続いて当該遺伝子の組換えタンパク質をそれぞれ作製し、細胞増殖活性・分化誘導能・コロニー形成刺激能などのコイの造血細胞に対する機能を細胞培養系により評価した。

(2) 造血支持細胞株の樹立

コイの主な造血器官であり B 細胞分化の場と考えられる腎臓や T 細胞産生の場である胸腺などから間質細胞株を樹立した。これらの細胞株の上で腎臓や胸腺の細胞を共培養することにより、当該細胞株が造血幹細胞の維持や造血前駆細胞の増殖・分化などを支持するかを検討した。

(3) 造血幹細胞同定法の開発

造血幹細胞の微小環境 (造血幹細胞ニッチ) を構成する細胞や分子の同定を目指し、魚類造血幹細胞の新規同定法の開発を試みた。すなわち幹細胞表面に対し特異的に結合するとされるレクチンが魚類造血幹細胞に対し親和性を示すかを Flow cytometry にて解析した。

4. 研究成果

(1) 種々の造血因子の同定と機能解析

コイ TPO は細胞外に分泌されないバリエーションをもち、産生量の調節機構が存在することが示唆されたものの、分泌型 TPO は腎臓中の栓球 (哺乳類の血小板に相当する細胞) 前駆細胞のコロニー形成を促す栓球造血因子であることを示した。

コイにおける G-CSF 相同分子は進化の過程で生じたゲノム重複に起因して 4 種類存在することを見出し、それらは A 型 G-CSF (G-CSFa1 および G-CSFa2) と B 型 G-CSF (G-CSFb1 および G-CSFb2) に分類されることを示した。すなわち、A 型 G-CSF は定常状態の魚において高発現しており、好中球や単球の恒常的な産生に関わる造血因子であることを示した。B 型 G-CSF は lipopolysaccharide 刺激によりマクロファージから産生され、好中球の産生、遊走、活性酸素産生能亢進などを誘導する好中球造血因子・遊走因子・活性化因子であることが明らかとなった。

哺乳類において IL-5 は IL-3 や GM-CSF と β 鎖受容体を共有するサイトカインであるが、これまで真骨魚類においてはそれらリガンドの相同分子は見つかっていなかった。本研究において、コイ β 鎖受容体のリガンドと考えられる遺伝子を同定し、当該分子の組換えタンパク質がコイの好塩基球や単球の前駆細胞の増殖、コロニー形成などを促すことを見出した。

コイにおける Kit ligand の 2 種類の相同分子 (Kitla および Kitlb) やそれらの受容体 (kita および kitb) を同定し、組換え Kitla が EPO や TPO などの他の血球系列特異的造血因子と協同して幅広い血球系列の造血前駆細胞の増殖・分化や生存維持に関与することを明らかにした。

コイにおける CSF-1 相同分子 (CSF-1a および CSF-1b) IL-7 相同分子 (IL-7a および IL-7b)

Notch ligand 相同分子 (DLL1 および DLL4) などを同定した。

(2) 造血支持細胞株の樹立

コイの腎臓や胸腺などから線維芽細胞様の細胞株を計 7 種以上樹立した。それら細胞株上でコイ腎臓造血細胞を共培養した結果、いずれの細胞株上においても T 細胞系が選択的に増殖を示した。この結果は非自己の細胞との共培養による免疫反応に起因する細胞増殖であることが考えられた。

(3) 造血幹細胞同定法の開発

ある幹細胞特異的レクチンが魚類腎臓の約 0.1% の細胞に結合することを示した。そこで当該レクチン結合性腎臓細胞を分取したところ、リンパ球様の細胞や顆粒球様の細胞が含まれており、当該レクチンは魚類造血幹細胞を同定・純化するには不適であると考えられた。すなわち、本研究では新たな造血幹細胞の同定法の開発には至らなかった。

本研究を通して魚類における造血幹細胞の新規同定法の開発や幹細胞ニッチの役割解明には至らなかったものの、全ての血球系列の細胞分化に重要な造血因子を同定することに成功し、今後の魚類造血研究の基盤となる成果が得られた。本研究の更なる進展によって、脊椎動物の造血機構の普遍性と多様性が明らかとなり、魚類感染症の制御法の開発のみならず系統発生学的視点から哺乳類の造血システムの深い理解へとつながることが期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Katakura F, Nishiya K, Wentzel AS, Hino E, Miyamae J, Okano M, Wiegertjes GF, Moritomo T. 2019. Paralogs of common carp granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) have different functions regarding development, trafficking and activation of neutrophils. *Front Immunol*, 10: 255 査読有 DOI: 10.3389/fimmu.2019.00255

Katakura F, Sugie Y, Hayashi K, Nishiya K, Miyamae J, Okano M, Nakanishi T, Moritomo T, 2018. Thrombopoietin (TPO) induces thrombocytic colony formation of kidney cells synergistically with kit ligand A and a non-secretory TPO variant exists in common carp. *Dev Comp Immunol*, 84, 327-336 査読有 DOI: 10.1016/j.dci.2018.03.005

Miyamae J, Suzuki S, Katakura F, 他 7 名 2018. Identification of novel polymorphisms and two distinct haplotype structures in dog leukocyte antigen class I genes: *DLA-88*, *DLA-12* and *DLA-64*. *Immunogenetics*, 70(4), 237-255 査読有 DOI: 10.1007/s00251-017-1031-5

Kobayashi I, Katakura F, Moritomo T, 2016. Isolation and characterization of hematopoietic stem cells in teleost fish. *Dev Comp Immunol*, 58, 86-94 査読有 DOI: 10.1016/j.dci.2016.01.003

[学会発表] (計 10 件)

Chia-Jung Chang, 舩廣善和, 難波亜紀, 間野伸宏, 片倉文彦, 森友忠昭. Using cell penetrating peptide for intracellular delivery of *Edwardsiella tarda* OmpA and study the immune response in *Carassius auratus langsdorfii* and *Carassius auratus*. 日本魚病学会春季大会 (東京大学, 2019 年 3 月 2 日)

西谷広平, 片倉文彦, 宮前二郎, 岡野雅春, 森友忠昭. コイ Kit ligand a は造血前駆細胞の増殖・維持を促す. 日本比較免疫学会第 30 回学術集会 (日本大学, 2018 年 8 月 20 日)

澤田真衣, 西谷広平, 岡野雅春, 宮前二郎, Johannes M Dijkstra, 片倉文彦, 森友忠昭. コイ interleukin-5 様分子の同定および機能解析. 日本比較免疫学会第 30 回学術集会 (日本大学, 2018 年 8 月 20 日)

Katakura F, Nishiya K, Wentzel AS, Hino E, Miyamae J, Okano M, Wiegertjes GF, Moritomo T. Paralogs of carp granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) have different functions with regard to development, trafficking and activation of neutrophils. 14th Congress of the International Society of Developmental & Comparative Immunology (Santa Fe, NM, USA, June 17-21, 2018)

Nishiya K, Katakura F, Miyamae J, Okano M, Moritomo T. Identification of neutrophilic progenitors using a colony assay system in the presence of recombinant carp granulocyte colony-stimulating factor paralogs. 14th Congress of the International Society of Developmental & Comparative Immunology (Santa Fe, NM, USA, June 17-21, 2018)

西谷広平, 日野エリカ, 宮前二郎, 岡野雅春, 片倉文彦, 森友忠昭. コイ顆粒球コロニー刺激因子 GCSF の造血活性の検討. 日本動物学会 第 88 回 富山大会 (富山県民会館, 2017 年 9 月)

片倉文彦, 西谷広平, 日野エリカ, Annelieke Wentzel, 宮前二郎, 岡野雅春, Geert

Wiegertjes, 森友忠昭 . コイ顆粒球コロニー刺激因子は好中球の造血および遊走を促す . 日本比較免疫学会第 29 回学術集会 (北海道大学, 2017 年 8 月)

片倉文彦, 西谷広平, 日野エリカ, 宮前二郎, 森友忠昭 . 種々の造血因子を用いたコロニー形成培養法によるコイ造血前駆細胞の同定 . 第 159 回日本獣医学会学術集会 (日本大学, 2016 年 9 月)

岡野雅春, 宮前二郎, 片倉文彦, 森長真一, 森友忠昭 . コイ T 細胞レセプター (TCR) $\alpha\delta$ 遺伝子構成のゲノム解析 . 第 159 回日本獣医学会学術集会 (日本大学, 2016 年 9 月)

Katakura E, Hino E, Nishiya K, Miyamae J, Moritomo T. Identification and functional characterization of two granulocyte colony-stimulating factors of common carp. 2nd International Conference of Fish & Shellfish Immunology (Portland, Maine, USA, June 26, 2016)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。