

## 自己評価報告書

平成23年 3月31日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20780145

研究課題名（和文）“先祖返り”したイルカの造血器官に関する比較免疫学的研究

研究課題名（英文）Comparative immunological study on hematopoietic organ in dolphin

研究代表者

伊藤 琢也（ITOU TAKUYA）

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：20307820

研究分野：比較免疫学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：イルカ、造血、モノクローナル抗体、好中球、好酸球、比較免疫学、造血幹細胞

## 1. 研究計画の概要

(1) イルカの造血幹細胞あるいは造血前駆細胞である未分化白血球を同定するために必要な血液細胞の基本的な分類マーカーとなるモノクローナル抗体を作出する。

(2) 得られたモノクローナル抗体を利用したイルカ血液細胞・造血細胞の分離法を確立する。

(3) イルカ造血幹細胞あるいはそのニッチ細胞を特定するために必要な遺伝子マーカーを単離し、その遺伝子発現解析系を確立する。

(4) 造血器官の候補として予想される臓器における免疫組織学的観察および遺伝子発現解析を行い、イルカにおける造血器官を機能形態学的に同定する。

(5) ヒトやマウスで明らかにされている造血関連因子のオルソログをイルカで単離し、発現細胞の特定、組換え型ケモカインの作出および特異抗体を用いたニッチ細胞の証明を行う。

(6) 組換え型ケモカインを用いた各種血液細胞の遊走を観察することによって、イルカ造血幹細胞の造血巣への定着・ホーミング機序を探る。

以上の研究項目を検討することによって、イルカの造血器官を特定する。

## 2. 研究の進捗状況

(1) 2008年度は、イルカの血液細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体の作出を試みた。イルカ白血球に対する抗体を産生するハイブリドーマを作製し、その中からハンドウイルカ好中球に反応する数種の抗体を得た。得られた抗体のうち、DN1抗体は、ハンドウイルカ好中球のみを認識し、他の顆粒球

である好酸球、また単核球、さらにヒトおよびウシ白血球には反応しなかった。DN1抗体を用いた免疫磁気ビーズ細胞分離法によって、イルカの顆粒球分画から好中球および好酸球を高純度に分離する方法を確立した。本法によって、イルカ血液中の特定細胞群の分離・同定が容易となり、それぞれの細胞機能の探索・評価が可能となった。

(2) 2009年度は、イルカ幼若個体の全身CTスキャンによって、骨格構造の把握および骨髄組織の探索を行い、また前鰭の上腕骨および前腕骨内部を解剖・組織学的に観察した。上腕骨骨頭の海綿骨腔内に陸生哺乳動物の赤色骨髄に類似した組織が組織解剖学的に認められた。同部位から得た組織の塗抹標本には、陸生哺乳動物の骨髄組織と同様な各種の血液前駆細胞が多数観察され、イルカでも骨髄造血が確認された。したがって、イルカ類の前鰭基部が骨髄バイオプシー検査の標的として応用できる可能性が示唆された。

(3) 2010年度は、造血が示唆された骨髄組織の遺伝子発現および骨髄細胞の増殖・分化能を検討した。ハンドウイルカの上腕骨から分離した骨髄単核細胞（BMMC）はヒトやマウスと同様に造血細胞に特異的な遺伝子発現像を示した。CFU assayにより、BMMCは優れた分化・増殖能を有し、3種類のコロニー形成が観察された。これらのコロニーは、その形態学的特徴と遺伝子発現像から、各種血球に分化する造血前駆細胞の増殖によって形成されることが明らかとなった。

以上より、ハンドウイルカのBMMCは、様々な血液細胞に分化する造血前駆細胞を有する造血細胞群であり、イルカ上腕骨の骨髄組織は造血器官であることが証明された。

### 3. 現在までの達成度

- ①当初の計画以上に進展している。  
(理由)

イルカの造血器官については、形態学的観察および機能的証明によって、骨髄であることが解明され、当初の目的の一部が達成された。

### 4. 今後の研究の推進方策

- (1) イルカにおける造血器官が骨髄であること、また造血マーカーとなる遺伝子を同定できたので、今後は骨髄以外の内臓臓器(脾臓、腎臓、肝臓等)における髄外造血の有無について検討を行う。
- (2) 明らかにしたイルカ造血関連因子を発現する細胞の特定、組換え型ケモカインの作出および特異抗体を用いた造血幹細胞ニッチ細胞の証明を行う。
- (3) 展示動物あるいは希少動物であるイルカの造血細胞を末梢血液から単離する方法を開発し、試験管内で増殖させる、また各種血液細胞へ分化させる条件を見いだす。

### 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計3件)

- ① Segawa T, Itou T, Echigoya Y, Suzuki M, Koie H, Sakai T. Molecular cloning and expression of bottlenose dolphin CD34. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 139, 303-307, 2011. 査読有
- ② Itou T, Koie H, Segawa T, Kato M, Yanagisawa M, Ueda K, Kuwano R, Suzuki M, Moritomo T, Sakai T. Bone marrow biopsy from the flipper of a dolphin. *Vet. J.* 185, 216-217, 2010. 査読有
- ③ Kato M, Itou T, Nagatsuka N, Sakai T. Production of monoclonal antibody specific for bottlenose dolphin neutrophils and its application to cell separation. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 14-17, 2009. 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 瀬川太雄、コロニー形成能および分化能の解析によるイルカ骨髄における造血細胞の証明、第152回日本獣医学会学術集会(学会中止、抄録のみ)
- ② 伊藤琢也、イルカ骨髄細胞の分化能および増殖能の解析、日本大学幹細胞フォーラム、2011年1月22日、日本大会館
- ③ 瀬川太雄、ハンドウイルカ CD34 の分子クローニングと発現解析、第150回日本獣医学会学術集会、2010年9月18日、帯広畜産大学
- ④ 伊藤琢也、イルカの造血は骨髄で行われている、日本比較免疫学会第21回学術集会、2009年8月4日、日本大学生物資源科学

部

- ⑤ 伊藤琢也、ハンドウイルカ好中球に対する特異的モノクローナル抗体の作出とそれを用いた血球分離法の確立、第146回日本獣医学会学術集会、2008年9月25日、宮崎大学(シーガイア)

[その他]

国際雑誌での研究内容(雑誌論文②)の紹介(ゲスト論説)

*Vet. J.* 185, 101-102, 2010. Guest Editorial, A new approach to bone biopsy in cetaceans. (by Daniel Martineau)