

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

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

研究成果の概要（和文）：ハンドウイルカの好中球にのみ特異的に反応するモノクローナル抗体を作出し、同モノクローナル抗体がイルカ血液細胞の高純度分離に有用であることを明らかにした。ハンドウイルカにおいて造血細胞に特異的に発現している CD34 分子の遺伝子クローニングを行った。なおイルカの骨髄において CD34 mRNA が強く発現していた。イルカの上腕骨の骨頭に存在する骨髄において造血が行われていることを形態学的に証明した。

研究成果の概要（英文）：The monoclonal antibody (DN1), which specifically reacts with the bottlenose dolphin neutrophils, was produced. The DN1 was useful for high-purity isolation of the dolphin granulocytes. The CD34, which specifically develops in the hematopoietic cells, were molecularly cloned in the bottlenose dolphin. The CD34 mRNA was strongly expressed in the bone marrow of the dolphin. Morphological observation has shown that the humerus is a source of hematopoietic tissue in dolphin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、造血細胞

## 1. 研究開始当初の背景

水棲哺乳類であるイルカにおける造血器官の存在場所は明確にされておらず、造血器官の形成および造血機序も不明である。

## 2. 研究の目的

本研究は、イルカ血液細胞の供給源である造血幹細胞および造血細胞の存在場所の探索、またそれらの定着器官の特定を目的とする。

## 3. 研究の方法

(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) 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する。

(3) モノクローナル抗体を利用したイルカ血液細胞・造血細胞の分類法および造血幹細胞マーカー遺伝子の発現解析系を確立する。

(4) 諸臓器・器官における造血マーカーの発現解析を行い、イルカにおける造血器官を機能形態学的に同定する。

## 4. 研究成果

(1) ハンドウイルカの血球をラットに免疫してイルカ血液細胞の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。すなわち、これまでほとんど抗体が作成されていないイルカの顆粒球に対するモノクローナル抗体を得るためにハンドウイルカの末梢血液より密度勾配遠心分離法によって 95%以上の純度を有する顆粒球を分離した。イルカ

の顆粒球に対する数種のモノクローナル抗体が作製され、フローサイトメトリーを用いてその中からハンドウイルカ好中球に対して特異的に反応する抗体をスクリーニングした。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、また単核球であるリンパ球および単球、さらにヒトおよびウシ白血球のいずれにも反応しない特異抗体であることが明らかとなった(雑誌論文③;学会発表⑤)。作出したハンドウイルカ好中球特異抗体 DN1 を用いた免疫磁気ビーズ細胞分離法によって、ハンドウイルカの顆粒球分画から好中球および好酸球を 95%以上の高純度で分離する方法を見いだした。

これまでイルカ白血球の高純度分離法は確立されていなかったため、本法を応用することによって、水棲哺乳動物の血液細胞および特定細胞群の分離・同定が容易となり、血液細胞のそれぞれの機能や分化段階をより詳細に探索・同定することが可能となった。今後は本 DN1 抗体の反応性について、他種のイルカ血液細胞を用いて検討を行う予定である。

(2) 数種のイルカの死体を用いて骨格構造および骨髄組織の観察を中心に CT スキャンを用いた画像診断、肉眼解剖学および組織学的検討を行った。死後凍結されたハンドウイルカ幼若個体の全身 CT スキャンによって、骨格構造の全体把握および骨髄組織の探索を行い、またシワハイルカおよびコビレゴンドウの前鰭に存在する上腕骨および前腕骨内部を解剖・組織学的に観察した。その結果、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肉眼解剖学および組織学的に認められた。骨髄バイオプシー穿刺針を用いた同部位へのコア穿刺によ

って得られた塗沫標本には、陸生哺乳動物の骨髄組織に存在するものと同様な造血細胞群、すなわち巨核球、骨髄球、赤芽球、幼若単核球などの血液前駆細胞が多数観察され、イルカ類においても骨髄造血が行われていることが確認された（雑誌論文②；学会発表④）。

海棲哺乳類における骨髄バイオプシーのための穿刺術は、後肢や骨盤が存在しないというその解剖学的特性によって発展していなかった。これまでわずかに報告があったイルカへの骨髄バイオプシー穿刺術は、臨床経験的に透過 X 線を用いて体幹深部の脊椎骨へアプローチする非常に困難かつ医原性出血などの危険を伴う手法であったため、実用的ではなかった。本研究で明らかにした「骨髄バイオプシー検査の標的」としてのイルカ上腕骨骨頭部位は、イルカ類の前鰭基部にあたり脊椎骨と比べて外部からの穿刺のアプローチが容易である。したがって、今後はイルカやマナティなどの鰭脚類において血液疾患を診断する上での新しい骨髄バイオプシー法の可能性を提供することができた。本成果は、発表論文としてだけでなく、同論文掲載誌においてゲスト論説として獣医臨床学的に有用なものとして評価された（その他、国際雑誌における研究内容のゲスト論説）。骨髄バイオプシーは、多くの血液疾患の原因究明において不可欠な検査であり、特に飼育下において原因不明の血液異常疾患が多いイルカ類ではその実践的活用が望まれている。今後は本骨髄バイオプシー法の臨床応用に取り組むことによって、イルカ類の造血機序および血液疾患の解明に貢献したい。

(3) CD34 は、多能性造血幹細胞、血液前駆細胞および血管内皮細胞表面上に発現する 1 回膜貫通型糖タンパク質である。したがっ

て、ヒトをはじめとする多くの哺乳動物において、CD34 は未分化造血細胞の主要マーカーとして造血（幹）細胞の分離などに応用されている。一方、イルカにおいて未分化造血細胞のマーカーとなる分子の報告はない。本研究では、イルカ CD34 の分子クローニングと血液細胞におけるその遺伝子発現像を解析した。ハンドウイルカの上腕骨の骨髄から抽出した全 RNA をサンプルとして、RT-PCR および RACE 法によってイルカ CD34 cDNA の翻訳領域を決定した。また、骨髄単核細胞 (BMMC)、全白血球 (WBC)、多形核白血球 (PMN)、末梢血単核球 (PBMC) における CD34 mRNA の発現を調べた。その結果、イルカ CD34 cDNA とそのバリエーションをクローニングできた。イルカ CD34 cDNA の翻訳領域は 1,152bp であり、383 アミノ酸残基をコードしていた。バリエーションは、イルカ CD34 cDNA の 966bp と 967bp の間に選択的スプライシングによるストップコドンを含む 154bp の配列が挿入され、翻訳領域は 981bp であり、326 アミノ酸残基をコードしていた。イルカ CD34 mRNA の発現を比較したところ、BMMC において最も強い発現が、WBC と PBMC では弱い発現が認められた。これらの結果は、分化した末梢血白血球と比べて、BMMC は未分化な CD34 陽性細胞が豊富で、WBC と PBMC にはそれらが極少数存在していると解釈できた（雑誌論文①；学会発表③）。以上より、イルカ CD34 はイルカの未分化造血細胞のマーカーとなりうることが示唆された。

本研究によってハンドウイルカの CD34 分子が同定され、陸棲哺乳動物と同様の発現や機能を有することが示唆された。今後は同分子に対する特異抗体の作出を行い、その抗体を用いた CD34 陽性細胞の分離法を開発してイルカの造血（幹）細胞の分離を試みる予定である。

(4) イルカにおいて造血が行われていることが示唆された上腕骨の骨頭部より骨髓組織を取り出して、それらに含まれる骨髓細胞の遺伝子発現の特徴を解析した。さらに同部位から分離した骨髓細胞が培養下で増殖能をよび分化能を有するかを確認することによって血液細胞へと分化・増殖する造血細胞の存在を機能的側面から検討した。ハンドウイルカの上腕骨から血液単核球の分離と同様の密度勾配遠心分離法によって骨髓単核細胞 (BMMC) を分離することができた。イルカ 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、造血細胞群であることが示唆された。造血細胞の増殖能を評価する CFU assay により、BMMC は優れた分化・増殖能を有することが明らかにされ、その形態から 3 種類のコロニー形成が確認された。3 種類のコロニーは、コロニー構成細胞の形態学的特徴とその遺伝子発現像から、好中球、単球/マクロファージ、巨核球および好酸球に分化する造血前駆細胞の増殖によって形成されており、BMMC は少なくとも 3 種類の造血前駆細胞を含むことが明らかになった。

以上より、ハンドウイルカの BMMC は、末梢血液に存在する様々な血液細胞に分化しうる造血前駆細胞を有する造血細胞群であり、イルカの上腕骨の骨髓組織は造血器官であることが明らかとなった (学会発表①; 学会発表②)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[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髓における造血細胞の証明、第 152 回日本獣医学会学術集会 (東日本大震災の為中止)

② 伊藤琢也、イルカ骨髓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、日本大学会館

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、イルカの造血は骨髓で行われている、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]

ホームページ等

国際雑誌における研究内容(雑誌論文②)の  
ゲスト論説

Vet. J. 185, 101-102, 2010. Guest

Editorial. By Daniel Martineau

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.12.026>

A new approach to bone biopsy in cetaceans

In this issue of *The Veterinary Journal*, Itou et al. (2010) report a convenient method to sample bone marrow in cetaceans. This is a welcome addition to the veterinary armamentarium, because up to now veterinarians have been reluctant to carry out this procedure in cetaceans. Because the iliac crest and femur, the sampling sites used in terrestrial mammals, are absent in cetaceans, bone marrow is usually obtained from vertebrae, a site prone to iatrogenic damage. With the new proposed approach, practitioners have an additional diagnostic tool when confronted with the most common indications for bone marrow biopsy in cetaceans, such as anemia with no evidence of regeneration, regenerative anemia unresponsive to treatment, or, more rarely, an abnormal leukogram raising suspicions of leukemia/lymphoma.

If biopsies of bone marrow are carried out more often, a better knowledge of the changes associated with physiological states such as aging will be gained. Bone marrow biopsy will also help to elucidate the etiology of new intriguing clinical

conditions. For instance, anemia with various degrees of splenic and hepatic hemosiderosis is occasionally seen in cetaceans kept in aquaria. Some of these cases are probably due to chronic bacterial infections (D. Martineau, personal observation; G. Bossart, personal communication). Other cases of anemia with hemosiderosis might be caused by chronic inflammatory states induced by bacteria newly described in cetaceans, such as *Bartonella henselae* and *Brucella ceti*, whose pathogenicity remains obscure ([González-Barrientos et al., 2009] and [Maggi et al., 2008]). These intracellular bacteria are phylogenetically close and are both potential zoonotic agents (Wattam et al., 2009). They are known to infect bone marrow in terrestrial mammals and humans (Franco et al., 2007). In people, *B. henselae* is thought to infect and persist in erythrocytic progenitors within the bone marrow (Greub and Raoult, 2002; Florin et al., 2008). Whether *Brucella* spp. or *Bartonella* spp. infect the bone marrow has not been determined in cetaceans.

Biopsy of bone marrow could also be useful in marine ecotoxicology to define the biological significance (e.g. toxicity) of environmental contaminants. Worldwide, free-ranging cetaceans are contaminated and variously intoxicated by polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons, which are known immunosuppressive and/or carcinogenic compounds ([Martineau et al., 1987], [Martineau et al., 1988], [Marsili et al.,

2001] and [Wells et al., 2005]). Bone marrow is one of the target organs for these contaminants ([Thurmond et al., 1999] and [Galván et al., 2006]). New contaminants such as perfluorinated compounds, polybrominated diphenylether and their derivatives may also have an effect on the bone marrow (Yamamoto et al., 2006).

Bone marrow stromal cells (BMSC) have been recently employed in the exciting new fields of cell and gene therapy. In human and veterinary medicine, BMSCs have been used as work horses for the expression of therapeutic proteins because they can be conveniently sampled in large numbers from the bone marrow of patients. For instance, autologous BMSCs genetically engineered to produce human, murine or canine erythropoietin have been sampled, engineered in vitro with the EPO gene from the corresponding species, and expanded in vitro. Subsequently, the EPO-engineered BMSCs have been implanted subcutaneously in a commercially available matrix in mice and dogs. The production and release of EPO has elevated hematocrit in these animals for weeks and even months. In addition, BMSC can differentiate in cardiomyocytes, myoblasts, osteoblasts, endothelial cells and other cell types. BMSCs are also able to induce neovascularisation. For these reasons, they have been used to repair necrotic cardiac muscle, and large bone defects in experimental 'regenerative' medicine (Fontaine et al., 2004; reviewed in Eliopoulos et al., 2008). Consequently, easy access to cetacean bone marrow (and

consequently to BMSCs) could open the way to cell therapy in cetaceans.

## References

Itou et al., 2010, Bone marrow biopsy from the flipper of a dolphin. The Veterinary Journal, 185 (2010), pp. 216-217.

他省略

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：