

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580267

研究課題名(和文) CD34を用いたイルカ造血幹細胞の単離同定および造血器官の特定

研究課題名(英文) Identification of hematopoietic stem cells and hematopoietic organ in dolphin using CD34

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：イルカにおける造血器官の特定および造血幹細胞の濃縮単離法を検討した。イルカの造血幹細胞分離のためにイルカのCD34遺伝子を同定し、組換え型イルカCD34蛋白質およびその特異抗体を作製した。本抗体を用いた免疫組織化学染色によって、イルカにおけるCD34の体内分布を明らかにするとともに、骨髄が“血球への分化能を有したCD34陽性細胞である造血幹細胞”を含む造血器官であることを証明し、骨髄および末梢血から造血幹細胞の濃縮単離法を確立できた。

研究成果の概要(英文)： Identification of the hematopoietic organ and isolation method of the hematopoietic stem cells were examined in dolphin. To isolate hematopoietic cells, dolphin CD34 gene was identified, and recombinant dolphin CD34 protein and its specific antibody were produced. While the distribution of CD34 in a dolphin was immunohistochemically determined using this antibody, it proved that bone marrow is a hematopoietic organ containing the CD34 positive hematopoietic stem cells which have the differentiation potency to the blood cell. Separation and concentration method of the hematopoietic stem cells from bone marrow and peripheral blood was established in dolphin.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：イルカ CD34 分離 造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

水棲哺乳類であるイルカにおいては造血器官の特定および造血幹細胞の単離法は確立されていない。また、CD34 は造血幹細胞および血管内皮細胞に発現する膜貫通型の糖蛋白質で、生理学的な役割は十分解明されていないが、ヒトや多くの哺乳動物種の造血幹細胞や内皮細胞マーカーとして広く用いられている。このような CD34 に関する研究は陸生哺乳類においては数多く報告されてきたが、海生哺乳類においてはほとんどない。

2. 研究の目的

研究代表者らがこれまでに性状を明らかにしたイルカ CD34 を用いて、骨髄から造血幹細胞を高純度に分離する方法を確立する。また、イルカ CD34 特異抗体を作製し、それを用いてイルカ体内における造血器官を特定する。さらに、その存在が示唆される血液中の造血幹細胞の濃縮・単離法を検討する。

3. 研究の方法

(1)イルカにおける造血幹細胞の単離に先立ち、造血幹細胞の同定および機能評価を行った。研究代表者らが以前に確立した採取方法を用いてイルカの上腕骨から得た骨髄単核細胞 (BMMC) の軟寒天培養法を行い、BMMC に含まれることが予想される造血幹細胞の分化能および増殖能について検討した。

(2)イルカ末梢血からの CD34 陽性細胞の効率的な濃縮および分離法について免疫磁気細胞分離法 (MACS 法) を用いて検討し、フローサイトメトリーによって評価した。

(3)イルカの体内における CD34 の発現および分布を明らかにするために、各臓器の CD34 mRNA 発現量を RT-PCR により、また CD34 蛋白質の組織分布および局在を免疫組織化学染色法によって調べた。

4. 研究成果

(1)造血幹細胞を特徴付ける遺伝子の発現を解析したところ、有力な候補として CD34 遺伝子が同定され、CD34 mRNA がバリエーションを有して存在していて、さらに骨髄で活発に発現していることが明らかとなった。イルカ BMMC は、密度勾配遠心法で末梢血から分離した単核細胞 (PBMC) や多形核白血球 (PMN) と比較して、特に CD34 遺伝子が高発現しているなど、造血幹細胞に特有な遺伝子発現像を示した (図 1)。

コロニー形成アッセイによって、イルカ BMMC は活発な増殖能力を有すると共に、好中球、単球/マクロファージ、好酸球、および巨核球などの血液前駆細胞や血球などへ分化する能力を有することが明らかとなった

(図 2)。一方、BMMC より数は少ないが PBMC にも CD34 陽性の造血幹細胞が含まれることが示唆された。

以上のことからイルカの骨髄または末梢血から CD34 陽性細胞を濃縮することによって、イルカの造血幹細胞を効率的に単離できることが確認できた。

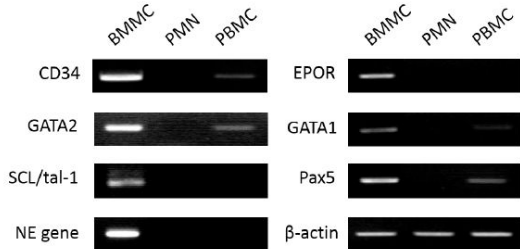


図 1 RT-PCR による BMMC, PMN および PBMC の造血細胞マーカー遺伝子発現像

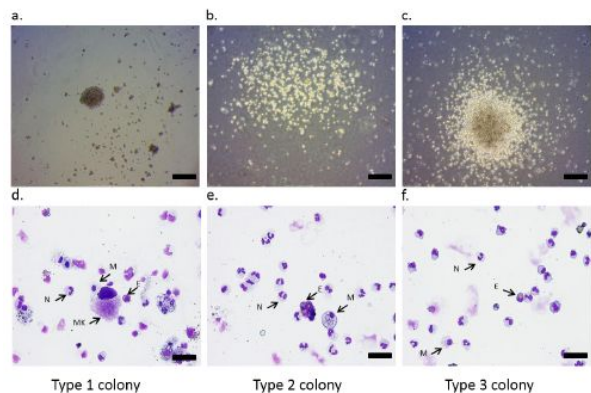


図 2 軟寒天培養下でイルカ BMMC より形成された 3 種類のコロニーの形態およびその構成細胞の組成。a~c; 倒立顕微鏡下での観察像。d~f; 各コロニーの塗沫標本 (メイグリユンワルド・ギムザ染色)。d では単球・マクロファージ様細胞, 好中球様細胞, 好酸球様細胞, 巨核球様細胞が認められた。e では単球・マクロファージ様細胞, 好中球様細胞, 好酸球様細胞が認められた。f では単球・マクロファージ様細胞, 好中球様細胞, 好酸球様細胞が認められた。

(2)同定されたイルカ CD34 の組換え型蛋白質を作製し、それに対する特異抗体を作製できたので、イルカ造血幹細胞マーカーの候補である CD34 分子の細胞表面上における発現を利用して BMMC および PBMC からの CD34 陽性細胞 (造血幹細胞) の濃縮法を検討した。イルカの末梢血から分離した単核球細胞 (PBMC) 分画より、作製した抗イルカ CD34

特異抗体を用いた MACS 法によって得られた CD34 陽性細胞分画（ポジティブフラクション）をフローサイトメトリーによって評価したところ、全細胞カウント数に対する CD34 陽性細胞の割合は、PBMC で 1.8 %、ネガティブフラクションで 1.7 %であったのに対し、ポジティブフラクションでは全体の 12.3 %と、約 7 倍に濃縮されていた（図 3）。またサイトスピン標本に免疫組織化学染色法を施したところポジティブフラクションでは、ネガティブフラクションと比較して CD34 強陽性細胞の割合が増加していることが確認できた。

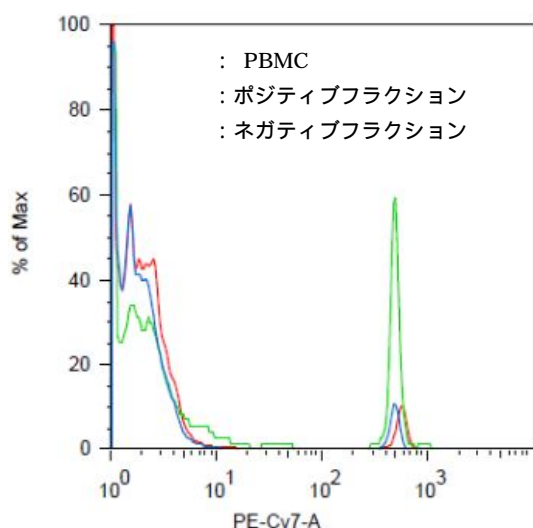


図 3 PBMC および分離処理後の CD34 陽性細胞のフローサイトメトリー解析

またサイトスピン標本に免疫組織化学染色法を施したところネガティブフラクションと比較してポジティブフラクションでは褐色に染色された CD34 陽性細胞の割合が増加していることが確認でき、さらにメイ・グリュンワルド・ギムザ染色標本では、ポジティブフラクションにおいて未分化で幼若と思われる細胞が PBMC とネガティブフラクションと比較して多く認められた。このように、本研究で作製した特異抗体を用いてイルカ末梢血から CD34 陽性細胞を濃縮して分離する方法を確立した。これまで Hymery ら (2011) の研究グループがヒト CD34 抗体を用いてイルカ CD34 陽性細胞の分離報告をしているが、特異的な陽性反応を捉えているとはいえない。今後、本法で分離されたイルカ CD34 陽性細胞の増殖能測定および機能解析が期待できる。またイルカの体内において CD34 の発現がどのように分布するか、解析する予定である。

(3)イルカ CD34 mRNA は、肺、腎臓、脾臓、骨髄および胸腺の順に高発現が認められた。CD34 は造血幹細胞以外にも血管内皮細胞で

強く発現する。肺をはじめとする上記組織には毛細血管が豊富に分布しているため、高値を示したと考えられた。抗イルカ CD34 抗体を用いた免疫組織化学染色では、骨髄で陽性像が確認された（図 4）。その他、腎臓の尿細管および集合管、胸腺および肺胞周囲の内壁が明瞭な陽性反応を示し、造血細胞および血管内皮細胞における CD34 蛋白質発現が確認された。

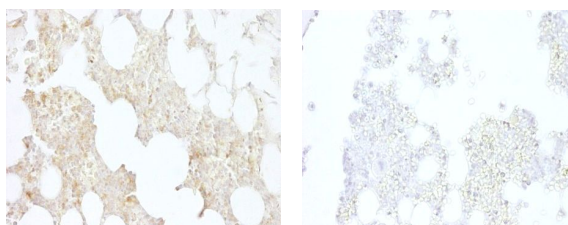


図 4 イルカの骨髄の免疫組織化学染色 左；CD34 陽性像 右；陰性対照

以上、本研究課題であった、イルカの造血幹細胞分離のためにイルカの CD34 遺伝子を同定し、組換え型イルカ CD34 蛋白質およびその特異抗体を作製した。本抗体を利用して、イルカの体内における CD34 の分布を明らかにするとともに、骨髄が血球への分化能を有した CD34 陽性細胞である造血幹細胞を含む造血器官であることを証明し、骨髄および末梢血から造血幹細胞の濃縮単離する手法を確立できた。

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 7 件)

Segawa T, Karatani N, Itou T, Suzuki M, Sakai T. Cloning and characterization of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) interleukin-10. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 154(1-2):62-67. 2013. 査読有

DOI: 10.1016/j.vetimm.2013.04.009.

Segawa T, Otsuka T, Itou T, Suzuki M, Karatani N, Sakai T. Characterization of the circulating serum amyloid A in bottlenose dolphins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152(3-4):218-224. 2013. 査読有

DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.12.006.

Segawa T, Amatsuji H, Suzuki K, Suzuki M, Yanagisawa M, Itou T, Sakai T, Nakanishi T. Molecular characterization and validation of commercially available methods for haptoglobin

measurement in bottlenose dolphin. Results Immunol. 3:57-63. 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.rinim.2013.05.003.
Segawa T, Ito T, Suzuki M, Moritomo T, Nakanishi T, Sakai T. Hematopoietic cell populations in dolphin bone marrow: Analysis of colony formation and differentiation. Results Immunol. 1(1):1-5. 2011. 査読有
DOI: 10.1016/j.rinim.2011.05.004.

鯉江 洋 (KOIE HIROSHI)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：20267040

[学会発表](計11件)

伊藤琢也、抽出作業を省いた簡易・迅速なウイルス遺伝子検出法の開発、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月21日、岐阜大学

伊藤琢也、イルカにおけるハプトグロビン簡易測定法の評価、第19回日本野生動物医学会大会、2013年8月30日、京都大学

伊藤琢也、新規ハンドウイルカ血清アミロイドA様遺伝子の分離と発現解析、第19回日本野生動物医学会大会、2013年8月30日、京都大学

伊藤琢也、全身循環するイルカの serum amyloid A(SAA) isoform の特性、第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月16日、岩手大学

伊藤琢也、ハンドウイルカ IL-10 の発現解析及びラクトフェリンによるその調節、第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月16日、岩手大学

伊藤琢也、ハンドウイルカ Interleukin-10 の分子特性、第18回日本野生動物医学会大会、2012年8月25日、北里大学

伊藤琢也、ハンドウイルカハプトグロビン (HP) の分子クローニングおよびブタ Hp ELISA キットによる測定の試み、第18回日本野生動物医学会大会、2012年8月25日、北里大学

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

(3) 連携研究者

鈴木 美和 (SUZUKI MIWA)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：70409069