

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12日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580236

研究課題名（和文） 魚類造血機構の解明

研究課題名（英文） Investigation of Fish hematopoiesis

研究代表者

森友 忠昭（MORITOMO TADAAKI）

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：20239677

研究成果の概要（和文）：魚類造血機構の解明

コイ造血細胞を支持細胞と共培養すると長期に亘る CD4 陽性 T 細胞の選択的な増殖が見られ、さらにクローン化 T 細胞株の樹立に成功した。また、コイ造血細胞を半固形培地中でリコンビナント-エリスロポイエチン、 тромбоポイエチン、Stem Cell Factor 存在下で培養すると、赤血球または栓球系前駆細胞の増殖が見られた。

研究成果の概要（英文）：Investigation of Fish hematopoiesis

Co-cultivation of carp hematopoietic cells with supporting cell layer resulted in selective proliferation of CD4 single positive T cells. Using this culture system, several helper T cell-like clones were established. Carp hematopoietic cells were also cultured in semi-solid media in the presence of recombinant erythropoietin, thrombopoietin and stem cell factor. Cells colonies derived from progenitors of erythrocyte and thrombocytes were formed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：魚病

1. 研究開始当初の背景

造血は、一つの「造血幹細胞」が「造血前駆細胞」の段階を経て、多種類の「成熟血球」へ分化・増殖する複雑な過程である。魚類は哺乳類と同等の血球組成を有するが、造血に関する知見は少ない。

2. 研究の目的

魚類の造血幹/前駆細胞の増殖・分化が可能な培養系を開発する。

3. 研究の方法

申請者らが新たに作製した、コイ造血関連組織等由来の支持細胞株を用いて、魚類（コイ）造血細胞の培養を行った。また、コイのエリスロポイエチン（EPO）・トロンボポイエチン（TPO）・Stem cell factor (Kit Ligand, KitL)などのリコンビナントタンパク質を作製し、上記培養や“半固形培地を用いたコロニー形成法”に加え、魚類造血幹/前駆細胞の同定および造血因子を試みた。

4. 研究成果

魚類ヘルパーT 細胞様株の樹立：コイおよび近縁種のギンブナ由来の各種組織から細胞株を樹立し、これらを用いてコイ腎臓造血細胞との共培養を試みた。その結果、本培養環境ではCD4陽性のT細胞（ヘルパーT様細胞，Th-like 細胞）が選択的に増殖し、長期に亘る継代維持（20代以上，60日間以上）が可能であった。そこで、これらTh-like細胞をクローニングし、いくつかのクローン株を樹立した。その結果、主にt-bet・IFN γ を発現するTh1様クローン株とgata3・IL4/13を発現するTh2様クローン株の2種類が認められ、魚類においてもTh1およびTh2などのTh細胞亜集団による、免疫制御機構が存在することがわかった。

魚類造血前駆細胞および造血因子の同定：コイEPO，TPOおよびKitLなどのリコンビナントタンパク質を作製し、半固形培地（メチルセルロース）を用いたコイ造血細胞の培養に添加したところ、EPOまたはTPO存在下で、それぞれ赤血球または栓球関連遺伝子を発現するコロニー形成が認められ、これらは各血球の前駆細胞に由来するものと考えられた。また、これらの培養にKitLを共添加したところ、コロニー形成数の増加および大型化が認められ、KitLはこれら血球分化におけるより幼若な前駆細胞に働くものと考えられた。

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 8 件)

- ① Segawa, T., Itou, T., Suzuki, M., Moritomo, T., Nakanishi, T., and Sakai, T. (2011). Hematopoietic cell populations in dolphin bone marrow: Analysis of colony formation and differentiation. Results in Immunology 1, 1-5. (査読有)
- ② 森友忠昭, 小林功, 片倉文彦, and 山口卓哉 (2010). クローンギンブナの再生医学研究への応用—魚類の造血幹/前駆細胞の同定—. 日本血栓止血学会誌 21, 42-44. (査読有)
- ③ Yamaguchi, T., Katakura, F., Shitanda, S., Niida, Y., Toda, H., Ohtani, M., Yabu, T., Suetake, H., Moritomo, T., and Nakanishi, T. (2010). Clonal growth of carp (*Cyprinus carpio*) T cells in vitro. Developmental &

Comparative Immunology 35, 193-202.
(査読有)

- ④ Itou, T., Koie, H., Segawa, T., Kato, M., Yanagisawa, M., Ueda, K., Kuwano, R., Suzuki, M., Moritomo, T., and Sakai, T. (2010). Bone marrow biopsy from the flipper of a dolphin. The Veterinary Journal 185, 216-217. (査読有)
- ⑤ Katakura, F., Yamaguchi, T., Yoshida, M., Moritomo, T., and Nakanishi, T. (2010). Demonstration of T cell and macrophage progenitors in carp (Cyprinus carpio) kidney hematopoietic tissues. Development of clonal assay system for carp hematopoietic cells. Developmental & Comparative Immunology 34, 685-689. (査読有)
- ⑥ Kobayashi, I., Ono, H., Moritomo, T., Kano, K., Nakanishi, T., and Suda, T. (2010). Comparative gene expression analysis of zebrafish and mammals identifies common regulators in hematopoietic stem cells. Blood 115, e1-e9. (査読有)
- ⑦ Katakura, F., Takizawa, F., Yoshida, M., Yamaguchi, T., Araki, K., Tomana, M., Nakao, M., Moritomo, T., and Nakanishi, T. (2009). Co-culture of carp (Cyprinus carpio) kidney haematopoietic cells with feeder cells resulting in long-term proliferation of T-cell lineages. Veterinary immunology and immunopathology 131, 127-136. (査読有)
- ⑧ 小林功・森友忠昭 (2009). 魚類におけ

る造血幹細胞の同定. 血液・腫瘍科 58, 449 - 454. (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

- ① 杉江勇二・片倉文彦・藪 健史・加藤尚志・森友忠昭・中西照幸, コイ 栓球造血における TPO と kitla の作用 (平成 24 年度日本水産学会春季大会, 2012/03/29, 東京海洋大学)
- ② 山口卓哉・片倉文彦・Johannes Martinus Dijkstra・森友忠昭・中西照幸, コイ Th2 様細胞のクローン性増殖 (平成 24 年度日本水産学会春季大会, 2012/03/29, 東京海洋大学)
- ③ 宮田俊輔・山口卓哉・片倉文彦・柴崎康宏・藪 健史・森友忠昭・中西照幸, コイ IL-4/13B の B 細胞培養に対する効果 (平成 24 年度日本水産学会春季大会, 2012/03/29, 東京海洋大学)
- ④ Tadaaki Moritomo, Clonal growth of Carp (Cyprinus carpio) helper T cells - Identification of Th2-like cells - (2012 Taiwan - Japan Symposium on Emerging Trends in Aquatic Animal Immunity and Aquaculture Biotechnology, 2012/02/22, National Cheng Kung University)
- ⑤ 林 潔高・片倉 文彦・藪 健史・森友 忠昭・中西 照幸, コイ TPO の遺伝子クローニングおよび性状解析 (第 23 回 日本比較免疫学会, 2011/08/21, 海洋開発研究機構)
- ⑥ 尻無浜由希・片倉文彦・藪健史・森友忠昭・中西照幸, 魚類の造血機構解明を目的としたコイ kit ligand A の機能解析 (第 23 回 日本比較免疫学会, 2011/08/21, 海洋開発研究機構)
- ⑦ 山口卓哉・片倉文彦・森友忠昭・中西照

- 幸, In vitro におけるコイ CD4+T 細胞のクローン性増殖 (日本生体防御学会, 2011/06/29, 那覇市ぶんかテンプス館)
- ⑧ 森友忠昭, 魚類の造血幹/前駆細胞の分離と同定 (日本大学幹細胞研究フォーラム, 2011/01/22, 日本大学会館)
- ⑨ Takuya Yamaguchi, Fumihiko Katakura, Tadaaki Moritomo, Clonal growth of carp (*Cyprinus carpio*) CD4 single-positive $\alpha\beta$ T cells in vitro (Sixth International Symposium on Aquatic Animal Health, Tampa, Florida, USA, 2010/09/05)
- ⑩ 仁井田祥光・片倉文彦・山口卓哉・森友忠昭・中西照幸, コイ末梢血白血球の培養における B リンパ球の増殖, 九州大学西新プラザ第会議室, 2010/08/02)
- ⑪ 森友忠昭・伊佐拓也・大野早苗, クロニンゲンブナを用いたエピジェネティクス研究モデルの構築, 日本大学先端バイオフォーラム, 日本大学会館, 2010/02/23)
- ⑫ 山口卓哉、片倉文彦、四反田聡、吉田美幸、森友忠昭、中西照幸, コイ造血細胞の培養-増殖した T 細胞のクローン性と分化段階の解析-(日本比較免疫学会, 日本大学生物資源科学部, 2009/08/03)
- ⑬ 森友忠昭・関谷麻優子・小林 功・片倉文彦・吉田美幸・山口卓哉・高野晃一, 魚類の造血幹/前駆細胞の分離と同定 (日本比較免疫学会, 日本大学生物資源科学部, 2009/08/03)
- ⑭ T. Yamaguchi, F. Katakura, M. Yoshida, M. Ohtani, T. Moritomo and T. Nakanishi, LONG-TERM PROLIFERATION OF COMMON CARP (*Cyprinus carpio*) CD4+ $\alpha\beta$ T-CELLS IN CULTURE (11th International Society of

Developmental and Comparative Immunology, Prague, Czech Republic, 2009/06/27)

- ⑮ F. Katakura, M. Yoshida, T. Yamaguchi, T. Moritomo, and T. Nakanishi, DEVELOPMENT OF THE SINGLE-CELL COLONY-FORMING ASSAY SYSTEM: CHARACTERIZATION OF CARP (*CYPRINUS CARPIO*) KIDNEY HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS (11th International Society of Developmental and Comparative Immunology, Prague, Czech Republic, 2009/06/27)

[図書] (計 1 件)

児玉 洋・川本恵子・森友忠昭・和田新平、緑書房、魚病学、150 頁中 20 頁担当、2012 (3 月)

[その他]

ホームページ等

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~moritomo/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森友 忠昭 (MORITOMO TADAAKI)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号 : 20239677