◆トピックス◆

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—

森友忠昭*, 小林 功*, 片倉文彦*, 山口卓哉*

森友忠昭

Demonstration of fish hematopoietic stem/progenitor cells

Tadaaki MORITOMO*, Isao KOBAYASHI*, Fumihiko KATAKURA*,
Takuya YAMAGUCHI*

昭和59年4月 日本大学農獣医学部卒業
平成2年3月 日本大学大学院獣医学研究科博士後期課程修了
平成3年4月 日本大学農獣医学部助手
平成8年4月 日本大学農獣医学部専任講師
平成17年4月～ 日本大学助教授（現在 准教授）魚病学および免疫学を担当

Key words: Ginbuna carp, fish, hematopoietic stem cell, hematopoietic progenitor cell

1. はじめに クローンギンブナとは—

ギンブナは日本に広く生息する魚であるが、実はこのギンブナの中にクローン生殖を行う系統が存在する。この系統には3倍体 ($3n \cong 150$) のメスしか存在せず、単為生殖で子孫を残す。そのため、ある母親から生まれた魚はすべて母親とまったく同じ遺伝形質を持ち、クローンギンブナと呼ばれている。日本には多系統のクローンギンブナが存在するが、その中には卵をキンギョ精子で受精させると、4倍体雑種をつくるものも存在する。この4倍体雑種は3組のギンブナ染色体と1組のキンギョ染色体を持つため、クローンギンブナ（ドナー）の細胞を4倍体雑種（レシピエント）に移植した場合、拒絶反応は起こらず生着する。さらに、染色体数の違い（DNA 含量の違い）を利用して移植後のドナー細胞を容易に識別し、追跡することが可能である（図1）。

2. 再生モデルとしてのクローンギンブナ

我々のグループでは、上記の「ギンブナ移植実

験系」を用いて、再生医療モデルの構築を目指している。ここで言う再生医療とは、人の医療を最終目的とするものである。なぜ、魚がヒトのモデルとなるかということ、以下の理由による。①ヒトは魚からおおよそ4億年前に分派した。そのため遺伝子・臓器・組織などを比較した場合、魚はヒトの祖先形質を持っている。②魚はヒトに比べ再生力が非常に強い。ヒトでは再生が難しい心筋・神経なども魚は容易に再生することが知られている。③魚は体外発生を行うため、発生時に働く遺伝子の動態・局在が良くわかっている。一般に、「再生は発生過程を繰り返す」と言われているが、発生時の情報が多い魚を用いることは、再生研究にとって優位性がある。

3. ギンブナ移植実験系を用いた 魚類造血幹細胞の存在証明

我々は、ギンブナ移植実験系を用いて、まず造血幹細胞の存在証明を行った。すなわち、魚類の主要な造血部位である腎臓の造血細胞（哺乳類の骨髄細胞に相当する）を3倍体（ドナー）から分

*日本大学生物資源科学部獣医学科魚病学研究室 [〒252-8570 神奈川県藤沢市亀井野1866]
Laboratory of Fish Pathology, Department of Veterinary Medicine, Nihon University
[Kameino 1866, Fujisawa, Kanagawa 252-8570, Japan]
Tel: 0466-84-3374 E-mail: moritomo.tadaaki@nihon-u.ac.jp

Reproduction of S3n clone

図1 S3n clone can be reproduced by not only asexual reproduction but also bisexual reproduction. When the eggs from the S3n clone were inseminated with UV-irradiated gold fish sperm, triploid clones were obtained. When the eggs were inseminated with normal gold fish sperm, tetraploid hybrids (S4n) were obtained.

離し、これを4倍体（レシピエント）に移植した。その結果、4倍体血中に3倍体由来のすべての種類の血球が1年以上に亘って観察され、長期造血維持能と多分化能をもった造血幹細胞がギンブナ腎臓中に存在することがわかった¹⁾。次に我々は、造血幹細胞の分離法を検討した。すなわち、幹細胞の持つ色素排出能を利用し、DNA結合色素（Hoechst33342）で3倍体の腎臓造血細胞を染色後、フローサイトメトリーにより難染性分画（SP細胞）を分離した。このSP細胞を4倍体に移植したところ、非常に少ない数で3倍体由来の造血が構築され、SP細胞分画中に造血幹細胞が濃縮されていることがわかった²⁾。このように、魚類においてもSP細胞中に造血幹細胞が濃縮されていることがわかった。そこで、次に遺伝子解析が進んでいるゼブラフィッシュよりSP細胞を分離し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析をおこなった。その結果、*abcg2*や*gata2*などの哺乳類造血幹細胞と同様の遺伝子発現が確認された（図2）^{3) 4)}。

4. 魚類造血細胞培養法の開発と造血前駆細胞の同定

哺乳類では、1個の造血細胞と支持細胞を共培養し、更に適当な造血因子を添加することで、造

図2 Flow cytometric analysis of ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorfii*) hematopoietic cells after Hoechst33342 staining.

血前駆細胞の分化能を調べる方法が確立されている。そこで我々は、魚類の造血関連組織（腎臓・脾臓・胸腺など）から間質由来の細胞株の樹立を試み、いくつかの造血支持能を有する細胞株を得ることに成功した。これらの支持細胞上にギンブナやコイの腎臓造血細胞を播種したところ、造血細胞の活発な増殖が認められ、最長で60日間・20代以上の継代維持が可能であった。また、増殖した細胞の性状を調べたところ、T細胞およびマクロファージ関連遺伝子の発現が認められた。これらのことから、本培養中にはT細胞および

図3 Three different types of colonies were formed from carp single hematopoietic cells, type I, type II and mixed type. Bar=100 μ m (upper panel). The type I colonies were composed of macrophage-like cells. Type II colonies were composed of lymphocyte-like cells. Mixed-type colony cells were composed both of macrophage and lymphocyte-like cells. Bar=20 μ m (lower panel).

マクロファージの増殖環境が再現されていると考えられた⁵⁾。そこで、あらかじめ96穴プレートに支持細胞層を形成させ、これに1個/穴になるように腎臓造血細胞を播種し、更に上記培養の“ならし培地”を加えて培養した。その結果、96穴中0~4穴でコロニーが形成され、これらは、マクロファージ関連遺伝子のみを発現し、貪食能を有するコロニー (I型)、T細胞関連遺伝子を発現するコロニー (II型) および両者のコロニーが混在するコロニー (混合型) が観察された (図3)。以上のことから、I型、II型および混合コロニーを形成する細胞はそれぞれ、マクロファージ前駆細胞、T前駆細胞およびT細胞とマクロファージの共通前駆細胞であると考えられた (投稿中)。現在、さらにエリスロポイエチン、トロンボポイエチン、M-CSFなどの造血因子のリコンビナントタンパクを作成し、この培養系に添加することでさらなる造血前駆細胞の同定に取り組んでいる。

5. おわりに

魚類血球は、赤血球、顆粒球、単球、リンパ球 (T・B細胞) および栓球から構成され、その組

成は哺乳類とほぼ同じであり、血球分化機構も共通点が多いと考えられている。このことは両者の共通祖先ですでに造血機構の基本型が確立されていたことを意味する。実際、上記SP細胞の遺伝子解析においても、哺乳類の造血幹細胞と似た遺伝子発現が認められ、両者を比較することで脊椎動物の造血幹細胞維持機構の解明に役立つものと考えられる。また、近年、河本・桂らによって、新たな血球分化モデル (ミエロイド基本モデル) が提唱されたが⁶⁾、本研究のコロニー形成試験でも、マクロファージとT細胞の両方の細胞へ分化できる細胞の存在が示唆された。今後、ミエロイド基本モデルとの関連性をさらに検討する必要がある。

魚類の造血機構を解明することは、哺乳類を含む脊椎動物の基本的な造血機構の理解につながると考えられる。

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Kobayashi I, Sekiya M, Moritomo T, Ototake M, Nakanishi T: Demonstration of hematopoietic stem cells in ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorffii*) kidney. *Developmental and Comparative Immunology* **30**: 1034-1046, 2006.
- 2) Kobayashi I, Moritomo T, Ototake M, Nakanishi T: Isolation of side population cells from ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorffii*) kidney hematopoietic tissues. *Developmental and Comparative Immunology* **31**: 696-707, 2007.
- 3) Kobayashi I, Saito K, Moritomo T, Araki K, Takizawa F, Nakanishi T: Characterization and localization of side population (SP) cells in zebrafish kidney hematopoietic tissue. *Blood* **111**: 1131, 2008.
- 4) Kobayashi I, Ono H, Moritomo T, Kano K, Nakanishi T, Suda T: Comparative gene expression analysis of zebrafish and mammals identifies common regulators in hematopoietic stem cells. *Blood*, 2009.
- 5) Katakura F, Takizawa F, Yoshida M, Yamaguchi T, Araki K, Tomana M, Nakao M, Moritomo T, Nakanishi T: 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, 2009.
- 6) Kawamoto H, Katsura Y: A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid lymphoid dichotomy. *Trends in Immunology*, 2009.