

研究課題名

鯨類における多能性幹細胞研究の基盤構築

共同研究者

中郡 翔太郎（岐阜大学 大学院連合獣医学研究科 帯広畜産大学配置）

落合 真理（愛媛大学 沿岸環境科学研究センター）

古林 与志安（帯広畜産大学 基礎獣医学研究部門）

岩田 久人（愛媛大学 沿岸環境科学研究センター）

研究目的

鯨類はしばしば「カリスマ的動物」と形容され、一般市民の関心を大きく引く動物群である。また、ハクジラ類は海洋生態系の高次に位置する長寿動物であることから、環境変動や海洋汚染の指標として用いられている。近年、人間活動に起因する環境汚染が進行しており、それに伴う海棲哺乳類への悪影響が懸念されている。実際に、環境汚染物質の高蓄積によるシャチの繁殖障害（Jepson et al. *Sci Rep.* 2016;6:18573）などの報告例も増加していることから、これら動物群に対する保護の意識が一層高まっている。特に欧米では、野生の鯨類を捕獲・飼育することに対して批判的な意見が多く、国内でも 2015 年に追い込み漁などによる野生個体の入手が禁止された。そのため、現在飼育している個体を対象とした獣医療の質と飼育福祉の向上は早急に望まれる課題であり、とりわけ、疾病・怪我の新たな治療法開発が求められている。そこで申請者らは、ヒトの再生医療分野で注目を集め始めている multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞（Wakao et al. *PNAS.* 2011;108:9875–80）に着目した。

多能性幹細胞の一つである Muse 細胞は、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）のように無限増殖が可能であり、あらゆる細胞や組織に分化できるが（Dezawa. *Cell Transplant.* 2016;25:849–61）、皮膚や骨髄などの間葉系組織に元来存在する細胞であるという点で iPS 細胞とは異なっている。実験動物では胚から胚性幹細胞（ES 細胞）も作成されているが、鯨類の胚を採

取することは困難であるため、体細胞から単離できる Muse 細胞は野生動物を対象とした研究により適していると考えられる。Muse 細胞の最大の特徴は、iPS 細胞のような遺伝子導入の操作が不要であることで、生体組織から幹細胞を単離し直接利用できる点にある。例えば、脳梗塞モデルのラットに Muse 細胞を静脈投与した研究では、損傷組織の修復や脳梗塞で失われた運動・知覚機能の回復が認められる (Kuroda et al. *PNAS*. 2010;107:8639–43)。さらに、Muse 細胞は腫瘍性も非常に低く、テロメラーゼ活性が低いことや、マウスへの投与試験では奇形腫の形成が認められないこと (Wakao et al. *PNAS*. 2011;108:9875–80) も確認されている。本研究の目的は、様々なポテンシャルを秘める Muse 細胞に対し、病理組織学的に細胞の同定・分布確認を行う一方、鯨類細胞の培養手法を確立し、鯨類における多能性幹細胞研究の基盤を構築することである。

研究内容

申請者らが現在までに集積してきた鯨類のストランディング（座礁・漂着・混獲）個体の試料を用い、研究を行った。具体的には、Muse 細胞が多能性幹細胞マーカーである stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) と間葉系幹細胞マーカーである CD105 の二重陽性細胞として単離されることから、免疫組織化学染色により鯨類組織中の Muse 細胞の特定を行った。また、種々の臓器において免疫組織化学染色を施し、各組織中の Muse 細胞数を確認することで、どの組織から細胞を採取すれば最も効率良く間葉系幹細胞の培養を行えるかを検討する計画であった。一方、細胞培養系では、組織学的な解析結果により Muse 細胞が同定されれば、Muse 細胞の単離およびキャラクタリゼーションを試みる予定であった。その他、新たなストランディング個体の調査も行い、試料採集を行った。

研究成果

Muse 細胞同定のため、ネズミイルカおよびミンククジラ（ハクジラ・ヒゲクジラ 1 種ずつ）の肝臓、脾臓、腎臓、生殖腺組織を用い、SSEA-3 (rabbit polyclonal; Bioss) と CD105 (mouse monoclonal, clone N1-3A1; Ancell)

抗体を用いた免疫組織化学染色を実施した。両抗体ともに抗原の賦活化条件が厳しく、染色の条件検討に時間がかかったが、賦活化には Target Retrieval Solution (Dako) を用いた熱処理が最適であることがわかり、以降の染色はこの方法を用いた。

上記組織の中で、SSEA-3 の発現は生殖腺で最も高度に認められた。卵巣組織中では、卵胞上皮細胞が陽性に染まり、その他、間質に介在する細胞もごく稀に陽性を呈した (図 1)。肝臓、脾臓および腎臓では、陽性細胞が孤在性にみられたものの、陽性細胞の集簇は認められなかった。

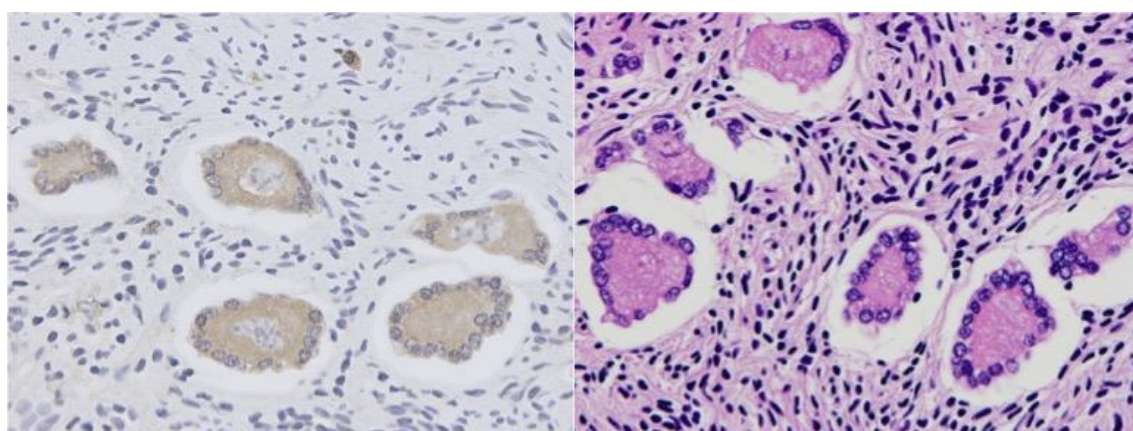


図 1. ネズミイルカの卵巣における抗 SSEA-3 抗体を用いた免疫組織化学染色結果 (左) および類似領域のヘマトキシリン・エオジン染色像 (右)。卵胞上皮における褐色の陽性像に加え、孤在性の陽性細胞も認められる。

一方、CD105 抗体においても、その発現は卵巣で最も高度であった。興味深いことに、他の臓器の正常部分ではさほど陽性像は認められなかったものの、肝吸虫に感染したネズミイルカの組織では、反応性に増生した胆管上皮領域において、陽性細胞が散在性に認められた (図 2)。これら細胞は形態的にリンパ球やマクロファージなどの炎症細胞ではなく、何かしらの未分化細胞であることが考えられた。しかしながら、SSEA-3 および CD105 両抗体を用いた二重免疫組織化学染色および蛍光二重免疫組織化学染色を行ったが、両抗体に染まる細胞はいずれの種・臓器においても認められず、Muse 細胞の定義に合う細胞の同定は本年度の研究ではできなかった。よって、Muse 細胞の培養系に進むことは叶わず、単離などの検

討を加えることもできていない。

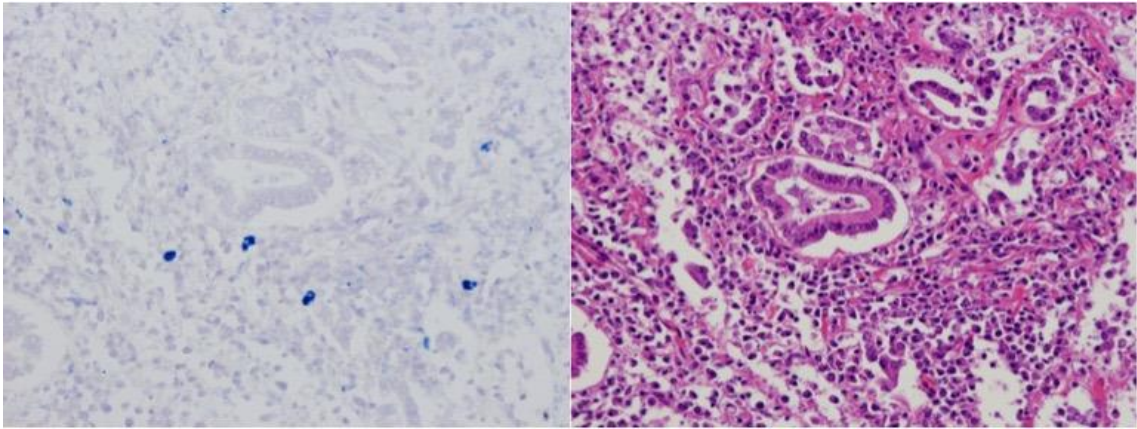


図 2. 肝吸虫感染ネズミイルカの肝臓胆管上皮における抗 CD105 抗体を用いた免疫組織化学染色結果（左）および同領域の連続切片を用いたヘマトキシリン・エオジン染色像（右）。増生胆管上皮の間、粘膜固有層領域において、青色の陽性細胞が散在する。

2018 年度はストランディング鯨類の調査を 27 個体において行い、そのうち 26 個体で病理組織検査を実施した（1 例は高度な腐敗により病理組織検査に適さなかった）。26 個体のうち、オウギハクジラ、ハブスオウギハクジラおよびスジイルカ、それぞれ 1 頭ずつの回収を LaMer 助成により行った。特筆すべき病理解剖・組織所見は以下の通りである。

－ オウギハクジラ（SNH18045、メス、421.5 cm、幼獣）

腐敗の程度により、細部の組織変化は捉えきれなかったが、観察範囲内において著変は認められず、死因は特定できなかった。しかし、本個体は漂着例がさほど多くない、オウギハクジラ若齢個体であり、生物学的に貴重なデータを得ることができた。

－ ハブスオウギハクジラ（SNH18034、メス、510.0 cm、成獣）

ハブスオウギハクジラは洋上での観察例がほとんどなく、世界的にみた漂着例も非常に少ない鯨種であるが、近年、北海道での漂着が続いている。2015 年から 2017 年の間にオスの成獣 1 頭と幼獣 1 頭、およびメスの新生子 2 頭の計 4 頭が打ち上がり、本年度はメスの成獣 2 頭が立て続けに漂着した。そのうちの 1 頭、SNH18034 では、本種

において非常に珍しい肝吸虫の寄生が認められ、吸虫は形態および遺伝子解析の結果から、*Oschmarinella macrorchis* と同定された。ハブブスオウギハクジラにおける肝吸虫の寄生は世界的にみても今まで1例しか報告されておらず（2017年度 LaMer 助成による成果）、本事例は本種における肝吸虫の病態を解明するための重要な症例となった。

－ スジイルカ（SNH18038、オス、212.5 cm、亜成獣）

従来、北海道沿岸におけるスジイルカの漂着は珍しいとされ、2003年から2017年の間の15年間には5頭の記録しか残っていない。しかし、本年度は5頭が立て続けに座礁・漂着し、病理組織検査が行えた3頭では、いずれも行動異常に関与すると言われている中枢神経疾患が認められた。そのうちの1頭、SNH18038では、髄膜に血管病変を伴う単核炎症細胞浸潤が認められ、分子生物学的解析では、脊髄組織から *Brucella ceti* が検出されたため、病理組織および分子生物の結果から、ブルセラ脳症と診断した。

成果発表

特になし。

今後の問題点

本年度の研究において、鯨類組織で Muse 細胞の定義に合う細胞は残念ながら確認できなかった。その原因として、使用した抗体は染色性こそ認められたものの交差性が限定し、鯨類組織に対して最適でなかった可能性が考えられるため、本年度の結果から結論を出すことは難しいと考える。今後も使用抗体を変更し、検討を加えていきたい。

一方、スジイルカ SNH18038 で認められたブルセラ脳症に関しては、さらなる解析が必要である。鯨類における中枢神経系の疾患は行動異常に関与すると言われ、ストランディングの重要な要因の一つである。様々な鯨類の中でも、スジイルカがブルセラ脳症を高率に発症する理由については明らかにできていないが、過去のスジイルカを対象とした研究報告によると、本種は比較的高濃度で汚染物質を蓄積することが知られており、今後

はブルセラ脳症の罹患・発症と汚染物質の蓄積との関連性を検討したい。