

令和元年6月20日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11022

研究課題名(和文)脾摘重症貧血マウスに誘導される新規造血組織の構造的機能的解析

研究課題名(英文) Histological and functional analysis of new extramedullary hematopoietic organ in splenectomized mouse

研究代表者

中村 雅典 (Nakamura, Masanori)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：50180394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脾摘マウスへの溶血性貧血誘導と窒素含有ビスフォスフォネート(NBP)投与で末梢血中の有核赤血球の出現および体網での血リンパ節様構造の誘導結果から、本現象の詳細について解析を行った。その結果、肝臓、血リンパ節様構造での赤血球造血誘導並びに胎児型赤血球造血の誘導が確認された。また、GCSFの産生向上とその後に血リンパ節様構造の誘導が確認された。以上の結果から、NBP投与はGCSF産生を刺激し、造血幹細胞(HCSPs)の末梢中への誘導と髄外造血を誘導することが新たに解明された。また、末梢中に動員されたHCSPsの定着部位として、本研究では体網が造血微小環境が整った組織である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未知の新規造血器官である血リンパ節様構造の機能形態学的特徴解明と形成過程での腹腔内の造血微小環境変化、末梢血中における造血前駆細胞の動態と骨髄外への定着、造血の開始の解明は、造血異常疾患に対する新規医療開発の道を拓く可能性を有している。また、血液動態の異常がリウマチ性関節炎や歯周疾患における骨破壊に關与している可能性について報告してきたので、本研究で誘導される造血異常の解明や腹腔内リンパ性組織の解析は、血液疾患等に対して新しい機構解明の可能性を提示すると共に、近年歯科領域を含めて問題となっているNBPの機序解明と癌患者等への臨床安全な使用への貢献並びに難治性骨疾患の病態解明の手掛かりとなる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the induction of hemolytic anemia and the treatment of nitrogen-containing bisphosphonate (NBP) induced the appearance of nucleic erythrocytes and the hemal node-like structure in the omentum of splenectomized mice. We found the induction of extramedullary erythropoiesis in the liver and hemal node-like structure, the switch of hemoglobin from adult type to embryonic type, the induction of GCSF well correlated with the induction of hemal node-like structure. These results confirmed that the NBP stimulated the emigration of hematopoietic stem cells from bone marrow to peripheral tissues and the induction of extramedullary hematopoiesis by stimulating GCSF production. The results also suggested that omentum might be one of the suitable microenvironment as the extramedullary hematopoietic site for the emigrated hematopoietic stem cells.

研究分野：解剖学、組織学

キーワード：ビスフォスフォネート 造血 一次造血 髄外造血 hemal node 肝臓 骨髄

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨吸収抑制剤である窒素含有型ビスホスホネート (NBP) は、癌の骨転移予防等を含め、臨床的に広く用いられているが、近年、顎骨壊死等の副作用についても報告がなされており、現在も临床上安全な使用に関する研究が進められている。我々は、NBP が造血系に与える影響について研究を進めており、マウスへの NBP 投与で、造血支持細胞である骨髄マクロファージを駆逐することで骨髄内赤血球造血を抑制し、貧血を伴わずに肝臓での髄外造血を誘導することを発見した [Cellular Immunol. 271:197-204, 2011]。引き続き、髄外造血機構解析のために、脾臓摘出マウスに NBP を投与し骨髄内赤血球造血を抑制した上で、フェニルヒドラジン (PHZ) を投与し溶血性貧血を誘導したところ、PHZ 単独投与による貧血よりも極めて重篤な貧血を誘導した。この際、血清中のエリスロポエチン濃度の異常な上昇と末梢血中に有核赤血球の出現を確認し、骨髄ではストローマを欠損しているにも拘わらず、赤血球造血の亢進が認められた。更に、本実験系で、大網に限局して直径 0.5~2.0mm の暗赤色構造物を発見した。この構造物は、血リンパ節様の被膜に覆われた充実性の器官であるが、骨髄様の造血細胞や巨核球などが確認されたことから、リンパ節や脾臓と異なる全く未知の造血機構を有する新規構造物であることが示された。構造内を占める細胞の多くは TER119 陽性の赤芽球系細胞であることが同定され、さらに細胞増殖マーカー PCNA と局在が一致していた。また、RT-PCR ではヘモグロビンの発現が確認された。これらの結果は、この新規構造物が赤血球造血の場を提供していることを示している。

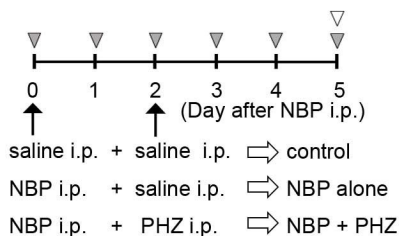
2. 研究の目的

以上の結果から、本研究では、本構造物の構造的機能的解析、造血支持細胞ならびに造血前駆細胞の解析、本構造誘導に関与する造血微小環境ならびに末梢血中造血前駆細胞の解析を中心に研究を遂行する。

この NBP を用いた重症貧血誘導方法は、我々が独自に開発した方法であり、極めて独創性が高い。また、遺伝的に正常なマウスにおいて、末梢血中に有核赤血球が出現したという報告はほとんどなく、この重症貧血モデルの解析は、造血機構に関する新たな基礎データを提供する。

3. 研究の方法

脾摘マウスに Phenylhydrazine (40mg/kg) 投与後、NBP の Alendronate (40 μ g/kg) を投与し、1 週後の肝臓、ならびに Hema I Node 様構造における造血動態について解析を行う。実験スケジュールを下に示す。



- (1) 血リンパ節様構造の形態学的解析: TER119 等の抗体を用いた免疫組織学的解析を行う。
- (2) 骨髄造血、骨髄外造血層における発現ヘモグロビンタイプの解析: 成体ヘモグロビンだけでなく胚子期ヘモグロビンである γ -H1、E γ の発現を RT-PCR で、また、免疫組織化学や in situ hybridization で解明する。
- (3) 正常時および貧血誘導時のマウス腹腔内における造血支持細胞とサイトカインの解析: 正常時及び貧血誘導時から継時的に腹腔内支持細胞や腹腔液を採取して、RT-PCR、ELISA 及びフローサイトメトリーによる解析を実施する。

4. 研究成果

血リンパ節様構造の形態学的解析

暗赤色の未知の構造物が確認された(図1A)。長径0.5-2.0mm程度の構造物であり、脾臓や大網上に誘導された。これまでにこのような構造物の報告はない。周囲組織とは皮膜を隔てて独立しており、内部にはリンパ小節様の構造や発達した洞様毛細血管が確認され、巨核球の存在も確認された(図1B, C)。しかしながら、脾臓に見られるような脾柱や発達した動脈は観察されなかった。また、リンパ小節様の構造を構成している細胞はB細胞ではなく、そのほとんどが赤芽球であった(図1D)。さらに、多くの赤芽球は、細胞増殖マーカー(PCNA)陽性であり、誘導された構造物が赤血球造血の場を提供していることを示していた。一方で、リンパ性器官としての形態的な特徴は確認できず、脾臓とは異なる構造であることが示された。

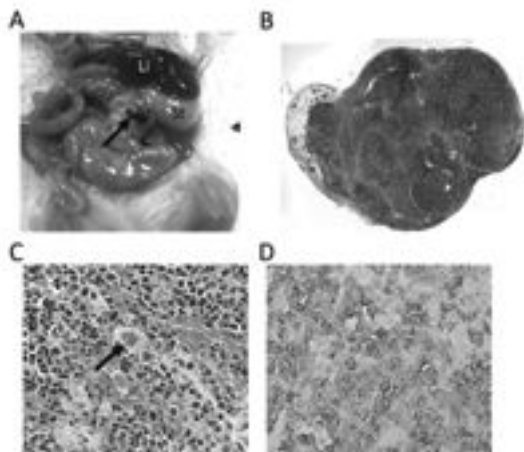


図1。血リンパ節様構造

骨髄造血、骨髄外造血層における発現ヘモグロビンタイプの解析

骨髄、肝臓、血リンパ節様構造全ての造血層において、Hb α -x, Hb β -h1ならびにHb β -yの胎児型ヘモグロビンの発現が成熟型(Hb α , Hb β 1)に加えて認められた。また、*In situ hybridization*の結果から、それら幼弱型赤血球はクラスター形成をしていることが示された。

正常時および貧血誘導時のマウス腹腔内における造血支持細胞とサイトカインの解析

NBP投与時から、経時的に血中GCSF濃度の変化を計測した。その結果、NBP投与1日目から、一過性にGCSFの濃度が上昇していることを確認した(図2A)。さらに、骨髄及び末梢血中のLineageマーカー陰性、c-kit陽性の細胞数(LK細胞)をカウントしたところ、骨髄ではGCSF濃度の上昇と一致してLK細胞が一過性に減少するのに対し、末梢血中では増加が確認された。このことから、NBP投与はGCSF刺激を介して、HSPCsを末梢中に動員し髄外造血を誘導している可能性が示された。

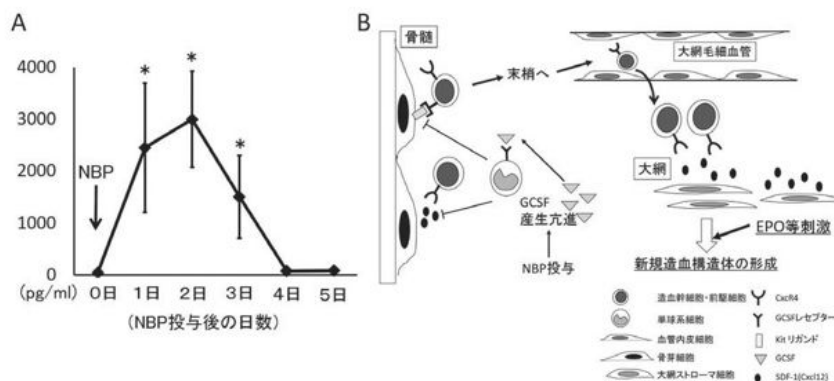


図2。GCSF変化と新規造血構造形成機序

筆者らの研究により、NBP投与はGCSF産生を刺激し、HSPCsを末梢中に誘導することで、

髄外造血を誘導することが新たに解明された。ここで、本項で概説した新規造血構造体の機能と形成機構を考察すると、NBP を投与することで、GCSF 刺激により造 HSPCs が末梢中に動員され、通常であれば脾臓などのすでに造血微小環境が整った器官に定着し、髄外造血を開始する（図 2B）。しかし、本貧血モデルでは、脾臓摘出を行っているために、SDF-1 を発現している組織へと HSPCs が遊走し、milky spot などの微小環境に適合・定着し、赤血球造血が行われるに至ったと考える。これまでに、大網以外の FALC では造血構造体の形成が確認出来ていないため、今後は、大網を含む腹膜構造における微小環境の解析が重要であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Nakamura M. Histological and immunological characteristics of the junctional epithelium. *Jpn J Dent Sci Rev.*54:59-65, 2018. 10.1016/j.jdsr.2017.11.004 査読有り

Takito J, Inoue S, Nakamura M. The sealing zone in osteoclasts: a self-organized structure on the bone. *Int J Mol Sci* 19 (4) 984. (2018) <https://doi.org/10.3390/ijms19040984> 査読有り

Takito J, Otsuka H, Inoue S, Kawashima T, Nakamura M. Symmetrical retrograde actin flow in the actin fusion structure is involved in osteoclast fusion. *Biol Open.* 6:1104-1114, 2017. 10.1242/bio.025460 査読有り

Kawashima T, Takito J, Shimada Y, Sato M, Inoue M, Miyazaki T, Miyata M, Rikitake Y, Takai Y, Nakamura M. Dynamic expression of nectins in enamel organs of mouse incisors. *J Oral Biosci.* 59:172-178, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.job.2017.06.004> 査読有り

Inoue S, Otsuka H, Takito J, Nakamura M. Decisive differences in the bone repair processes of the metaphysis and diaphysis in young mice. *BONE REPORT.* 8:1-8, 2017 10.1016/j.bonr.2017.11.003 査読有り

Otsuka H, Soeta S, Yagi H, Endo Y, Nakamura M. New Experimental Anemic Model by Using a Nitrogen-Containing Bisphosphonate. *Ann Nitr Disord& Ther.* 4:1-5, 2017. 10.26420/annnutrdisordther.2017.1043 査読有り

Takito J, Inoue S, Nakamura M. Emerging role of actin flow in the organization of podosomes in osteoclasts. *Macrophage* 4 e1614 2017 査読有り

Takito J, Kobayashi J, Nakamura M., Ohizumi Y, Nonomura Y: Unfolding of the myosin head by purealin in glycerol. *Anat Sci Int.* 93:197-202, 2018. 10.1007/s12565-017-0389-7 査読有り

Narita K, Oda, Mayahara M, Umehara K, Umerahara M, Imamura E, Kataoka R, Kimura H, Nakamura M. Pilot Study of Bone Augmentation in Rat Calvaria Using Silicone Molds with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2-containing Atelocollagen Sponge. *Showa Univ J Med Sci* 29:425-433 (2017) 査読有り

大塚裕忠、中村雅典 新規造血構造の機能形態学的特性（特集 脾臓研究の最前線）細胞 49 巻 4 号 47-51、2017. 査読無し

〔学会発表〕(計 17 件)

大塚裕忠，角山優輔，遠藤康男，大津浩，中村雅典，添田聡．ヒスタミン欠損マウスにおける造血・リンパ性器官の形態学的研究（第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2019

年3月 新潟)

藤川芳織、福島美和子、井上 知、中村雅典：マウス下顎頭軟骨発生過程における FGF 受容体の発現に関する研究 (第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2019 年 3 月 新潟)

福島美和子、藤川芳織、井上 知、中村雅典：象牙芽細胞におけるエクソソーム関連タンパク質の発現と局在 (第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2019 年 3 月 新潟)

井上知、藤川芳織、福島美和子、中村雅典：骨修復過程における卵巣摘出の影響は骨幹端と骨幹部で異なる (第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2019 年 3 月 新潟)

井上知、藤川芳織、大塚裕忠、中村雅典：2 つの異なる扁平骨における骨修復過程の解析 (第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018 年 3 月 東京)

藤川 芳織、井上 知、瀧戸 次郎、大塚 裕忠、中村 雅典：マウス創傷治癒過程における局所的マクロファージ除去の影響 (第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018 年 3 月 東京)

井上知、藤川芳織、福島美和子、中村雅典：卵巣摘出マウスにおける長骨骨幹端治癒過程の解析 (昭和大学歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 30 年度シンポジウム 2018 年 3 月 東京)

井上知、中村雅典：骨折治癒過程における組織学的動態～骨折はどのようにして治るのか～ (第 26 回日本柔道整復接骨医学会学術大会 基礎医学研究分科フォーラム 2017 年 11 月 大阪)

井上知、大塚裕忠、中村雅典：肩甲骨および頭蓋骨における骨修復過程の比較 (第 105 回日本解剖学会関東支部学術集会 2017 年 11 月 東京)

S Inoue, H Otsuka, M Nakamura: Difference between bone repair process in scapula and calvaria (65th Annual Meeting of the Japanese Association for Dental Research 2017 年 11 月 東京)

Kaoru Fujikawa, Shunichi Shibata, Masanori Nakamura: Expression patterns of Syndecan family in the developing fetal mouse mandible and condylar cartilage (65th Annual Meeting of the Japanese Association for Dental Research 2017 年 11 月 東京)

井上知、大塚裕忠、中村雅典：Healing process of the metaphyseal region in long bone (第 59 回歯科基礎医学会学術大会 長野 2017 年 9 月)

大塚裕忠、中村雅典：新規造血構造体形成時における大網組織造血微小環境の解析 (第 29 回日本比較免疫学会 札幌市 2017 年 9 月)

井上知、中村雅典：長骨骨幹端における骨修復過程 (第 59 回公益社団法人 全国柔道整復学校協会 教員研修会 岡山 2017 年 8 月)

平山 聞一、塩飽 由香利、宮武 尚央、土屋 香織、中村 雅典、高橋 哲、鈴木 治：ラット頸骨欠損部へ埋入したリン酸オクタカルシウムの初期組織反応及び細胞遊走性の評価 (第 37 回日本骨形態計測学会学術集会 大阪 2017 年 6 月)

Masanori Nakamura: Histological identification of cells directly participating calcified tissue resorption and destruction (Experimental Biology 2017 2017 年 4 月 Chicago)

S Inoue, M Nakamura: Metaphysis repair process differ from the diaphysis (Experimental Biology 2017 2017 年 4 月 Chicago)

〔図書〕(計 2 件)

磯川桂太郎・下田信治・山本仁 (編)、わかば出版、カラーアトラス口腔組織発生学<第

4 版> 2016. 135 ページ。

道健一・今井智子・高橋浩二・山下夕香里（編）言語聴覚士のための臨床歯科医学・口腔外科学-器質性構音障害- 第2版 2016。p23-28。 .

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：野中直子

ローマ字氏名：NONAKA Naoko

所属研究機関名：昭和大学

部局名：歯学部

職名：准教授

研究者番号（8 桁）: 20307052

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。