

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 2 年 6 月 1 2 日現在

機関番号：33303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06204・19K21308

研究課題名（和文）メラノコルチンシステムの赤血球造血および骨髄形成機構における in vivo 解析

研究課題名（英文）In vivo analysis of the role of the melanocortin system in erythropoiesis and myelopoiesis

研究代表者

増田 なつみ（MASUDA, Natsumi）

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：80823286

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：メラノコルチン受容体5（MC5R）欠損マウスを用いて、副腎皮質刺激ホルモンを代表とするメラノコルチンの赤血球造血における役割を検討した。成獣ノックアウトマウスおよび野生型マウス雌雄の末梢赤血球数および形態学的解析を行った。また、脾臓、肝臓、骨髄の臓器重量と組織学的解析を行った。その結果、ノックアウトマウスと野生型マウスの間に明らかな違いは認められなかった。造血能を比較する目的で、瀉血モデルを作成して同様の検討を行った。しかし、貧血状態のノックアウトマウスと野生型マウスの間に有意な差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の核となるメラノコルチンによる赤芽球の分化・成熟調節機構は、所属研究室にて発見された（Simamura et al, 2012）。本研究課題は、これを発展させる研究と位置付けられる。本研究により得られる成果は、胎生期における脱核をともなう血球分化、造血機構の解明につながる。さらに、胎児造血に対する母体のエピジェネティックな調節機構の存在およびその破綻に起因する造血障害の発生機序を説明しうるモデルが提案される。加えて、iPS細胞等を用いた安全かつ安定的な人工誘導赤血球を大量生産するための技術開発につながる研究と位置付けられる。

研究成果の概要（英文）：The role of melanocortin, represented by adrenocorticotrophic hormone, in erythropoiesis was studied in melanocortin receptor 5 (MC5R)-deficient mice. The number, diameter and morphology of erythrocytes and the weight and histology of hematopoietic organs were analyzed. The results showed no obvious differences between knockout and wild-type mice. For the purpose of comparing the hematopoietic capacity, a phlebotomy model was created and similar studies were performed. However, there was no significant difference between anemic knockout and wild-type mice.

研究分野：発生学

キーワード：赤血球 赤芽球 造血 メラノコルチン メラノコルチン受容体 副腎皮質刺激ホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞から分化した赤芽球には副腎皮質ホルモン (ACTH) およびその誘導体の受容体であるメラノコルチンレセプター (MCR) が発現しており、下流のシグナルを調節することで赤芽球分化に広く関与することが所属研究室のヒト臍帯血由来造血幹細胞を用いた *in vitro* 系で明らかにされている (Simamura et al. Plos One 2015; 図 1)。

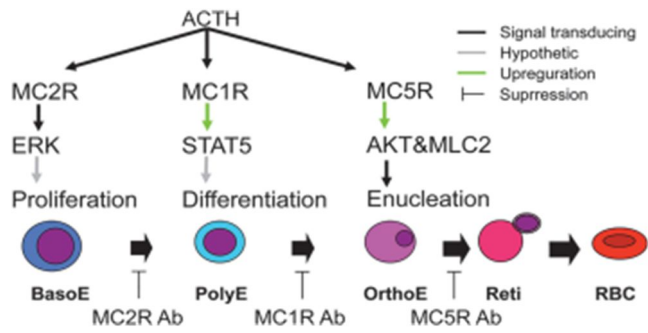


図 1 メラノコルチン系を介した赤芽球の分化
(Simamura et al. Plos One 2015)

MCR は MC1R から 5R の 5 種類が存在する。特に、MC5R は脱核を伴う最終分化において重要であり、ACTH およびその誘導体のシグナルを受容し、下流で AKT および細胞骨格蛋白質である myosin light chain 2 (MLC2) が脱核を促進する。さらに、分化過程で MC1R および MC2R が発現し、ACTH およびその誘導体の刺激を受けて下流のシグナルを調節することが明らかにされている。しかしながら、ヒト臍帯血由来造血幹細胞を用いた *in vitro* 実験系で見出された赤芽球成熟分化における ACTH の作用が、生体においても生理的に機能しているかは不明である。さらに、成獣マウスにおいて骨髄では血清中よりも ACTH 濃度が高いことが明らかにされているが (Simamura et al. Plos One 2015) 骨髄における ACTH の供給源については不明である。

2. 研究の目的

メラノコルチンの赤芽球の分化誘導作用は、ヒト臍帯血由来造血幹細胞を用いた培養系での解析によって得られたものであり、生体の赤血球造血における役割については不明である。本研究では、メラノコルチンシステムが、生体での赤血球造血においても生理的に機能しているかを検証することを目的として、以下の項目について検討を行った。

3. 研究の方法

(1)メラノコルチ 5R 欠損マウスにおける赤血球造血の解析

生体内における MC5R の赤芽球分化に関する役割を調べるため、雄雌のヘテロおよびホモ接合型 MC5R ノックアウトマウスを用い、赤血球数、赤血球の直径、赤血球の形態、造血器官の組織重量 (脾臓、肝臓) および形態 (骨髄、脾臓、肝臓) について野生型マウスと比較した。血球の形態の比較にはメイグムザ染色した血液塗抹標本を、造血組織の比較には HE 染色した標本を用いた。血球の直径や面積の計測には ImageJ を用いた。

(2)瀉血モデルを用いた赤血球造血能の比較

MC5R ノックアウトマウスの造血能力に関して調べるため、2 日間頸静脈から瀉血を行ない、赤血球数が回復した 5 日後のマウスについて同項目を調べた。

4. 研究成果

(1)メラノコルチ 5R 欠損マウスにおける赤血球造血の解析

・赤血球数および赤血球の直径: 野生型、ヘテロ接合型およびホモ接合型マウスで変わらなかった。

・赤血球の形態（図 2 に従って分類）： いずれの遺伝子型のマウスも正常赤血球が 95% 以上であった。その他の形態の赤血球の割合は個体差が大きく、各群間で差はみられなかった。

・臓器重量：肝臓重量は、各群間で有意差はみられなかった。脾臓重量は、ヘテロ接合型でやや小さい傾向が見られたが、各群間で有意差はみられなかった。

・組織学的解析：肝臓では、いずれの遺伝子型のマウスにおいても髄外造血巣様の構造がみられたが、

群間での明らかな差異はみられなかった。脾臓では、赤脾髄、白脾髄、髄外造血巣の面積について間断連続切片を用いて調べ、分裂細胞数を計測したが、個体差が大きく、各群間で有意差はみられなかった。骨髓では、いずれの遺伝子型のマウスも赤芽球は正形成であり、造血幹細胞数や各種血球の数についても各群間で有意な差は見られなかった。

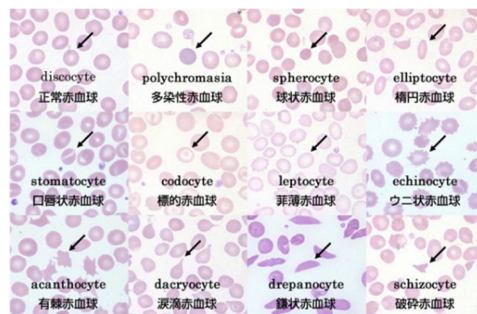


図 2 赤血球の形態
(日本血液検査学会 HP)

(2) 瀉血モデルを用いた赤血球造血能の比較

瀉血後、赤血球数が回復した時期に、上記と同様の検査項目について解析を行ったが、各群間で有意差はみられなかった。

(3) 結果の総括と今後の展開

以上の結果から、今回の研究では、マウス生体におけるメラノコルチンシステムの役割を確認することが出来なかった。先行研究の培養系で見出された結果との乖離について、更に検討が必要である。MC5R ノックアウトマウスで造血系に障害が生じなかった理由として、ヒトとマウスの種差に起因する可能性、また MC1R や MC2R 等の他の MCR が MC5R の機能を補償した可能性が考えられた。研究期間中に、MC2R ノックアウトマウスの系統を確立することが出来たので、今後、MC5R・MC2R のダブルノックアウトマウスを用いた解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂田ひろみ, 内芝舞実, 島田ひろき, 塚田剛史, 狩山信生, 増田なつみ, 有川智博, 東海林博樹, 八田稔久
2. 発表標題 迅速骨染色法(RAP-B法)の開発とその応用
3. 学会等名 第78回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八田稔久, 松原孝宜, 塚田剛史, 増田なつみ, 島田ひろき, 坂田ひろみ
2. 発表標題 脳組織のハイコンテンツアナリシス
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚田剛史, 王 賀, 増田なつみ, 島田ひろき, 坂田ひろみ, 東海林博樹, 八田稔久
2. 発表標題 EGFP 発現マウスを利用した母体ウイルス感染モデルにおける胎盤TLR3 シグナル亢進部位の検討
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚田剛史, 王 賀, 増田なつみ, 島田ひろき, 坂田ひろみ, 東海林博樹, 八田稔久
2. 発表標題 母体ウイルス感染モデルにおける胎盤での免疫応答部位の探索
3. 学会等名 第54回北陸生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1．発表者名 塚田剛史，小田紘久，増田なつみ，坂田ひろみ，森 建策，八田稔久
2．発表標題 組織標本における核膜染色を併用した細胞数カウントの有用性
3．学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4．発表年 2019年

1．発表者名 坂田ひろみ，内芝舞実，島田ひろき，塚田剛史，狩山信生，増田なつみ，有川智博，東海林博樹，八田稔久
2．発表標題 迅速骨染色法（RAP-B法）によるマウス・ラット胎児の全身骨格標本の作製
3．学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4．発表年 2019年

1．発表者名 坂田ひろみ，内芝舞実，狩山信生，島田ひろき，塚田剛史，増田なつみ，三谷真弓，東海林博樹，八田稔久
2．発表標題 マウスおよびラットの迅速骨染色法（RAP-B）（A rapid and nondestructive tissue clearing system optimized for whole-mount bone staining in mice and rats）
3．学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4．発表年 2019年

1．発表者名 Sakata-Haga H, Uchishiba M, Tsukada T, Shimada H, Masuda N, Hatta T
2．発表標題 Application of a rapid and nondestructive tissue clearing system for immunohistochemistry
3．学会等名 第 59 回日本先天異常学会学術集会
4．発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----