

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08383

研究課題名(和文)造血システムを支える骨髄生理的酸素環境形成・維持機構とその意義の解明

研究課題名(英文) The mechanisms of regulation of oxygen concentration to maintain hematopoiesis in bone marrow

研究代表者

森川 隆之 (Morikawa, Takayuki)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：80465012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞(HSC)周囲の酸素環境はその幹細胞性において重要な因子のひとつであることが知られているが、HSCの存在する骨髄の酸素分圧の実態と、その形成・維持におけるメカニズムの全容は明らかでない。そこで本研究課題ではまず骨髄の生理的低酸素環境を明らかにするため骨髄酸素分圧を生体イメージングにより可視化し、骨髄で産生される血管作動性因子である一酸化窒素が骨髄局所の酸素分圧を制御していることを示す知見を得た。さらにこの酸素分圧調節機構のHSCの遊走能の維持における役割について精査し、一酸化窒素を介した骨髄の酸素環境の制御システムが造血を支える一因子となりうる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血組織である骨髄から末梢血へのHSCの遊走は感染時の生体防御などにおいて重要な役割を果たしているほか、末梢血造血幹細胞移植では移植するHSCが十分量得られるか否かを左右する重要な要素のひとつと考えられる。この遊走の機序に関して本研究では骨髄の酸素環境の制御系がHSCの遊走能に大きく関与することを新たに示した点などにおいて学術的意義を持つと考えられる。また、本研究結果から得られた知見をもとに骨髄の酸素環境及びHSCの遊走能への人為的な介入を実現させることで、年々増加の傾向がみられる末梢血幹細胞移植が適応となる造血器疾患等の治療成績向上の一助になるなどの社会的意義に結びつく可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：While adequate oxygen concentration around hematopoietic stem cells (HSCs) is one of the important factors for maintaining HSC stemness, it is unclear how local oxygen concentration could be maintained in bone marrow. To reveal the regulatory mechanism of oxygen levels, we used intravital oxygen imaging technology and showed that the nitric oxide signaling pathway maintains the local oxygen concentration of bone marrow. Furthermore, we found that HSC motility depends on NO-mediated oxygen concentration in the bone marrow.

研究分野：生体イメージング

キーワード：造血幹細胞

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1970年代に始まった我が国での造血幹細胞移植は近年では5000件を超えて年々増加傾向にあり、中でも末梢血幹細胞移植は比較的低侵襲であることなどから多くの造血器腫瘍の患者がその恩恵に預かっている。この末梢血幹細胞移植の成功のカギとなるのが造血幹細胞 (HSC) 採取にあたっての HSC の動員、すなわち骨髄から末梢血への HSC の遊走である。また定常状態においても造血組織である骨髄から抹消への HSC の遊走は見られるが、細菌感染時にはこれがさらに増加し、生体防御の重要な一翼を担っていると考えられている。このような細胞の遊走では個々の細胞内でのミオシンのリン酸化などに ATP が必要とされるが、酸素濃度が低いとされる骨髄で如何に ATP 産生のための十分な酸素が HSC に供給されているかは明らかではない。そこで当研究課題では、マウス骨髄の酸素レベルを可視化する生体イメージングの技術を開発することで、生理的低酸素と称される骨髄において一定の酸素レベルが保たれ、HSC の遊走能が維持されるメカニズムの解明を目指した。

2. 研究の目的

骨髄の血管は大きく動脈、細動脈、類洞血管に分類することができる。予備的検討の結果から血管収縮を担う血管平滑筋が周囲を取りまく骨髄の動脈の血管内皮細胞に血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) が強発現していることを示唆する知見を得ていた。このことは eNOS から産生される血管拡張因子である一酸化窒素 (NO) が骨髄の動脈を拡張させていることで骨髄全体の血流が維持されている可能性を示唆する。そこで当研究課題では骨髄の血流を維持し、酸素分圧を保つ因子の候補として NO に着目し、NO による骨髄の生理的低酸素環境の制御機構と、その HSC の血管外遊走に関わる役割について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

骨髄における酸素環境がどのように保持され HSC の動態に影響を及ぼしているかを探るため、(1) 骨髄の酸素分布、(2) 骨髄の酸素濃度の調節機構、(3) 酸素濃度調節機構の HSC の遊走における役割、の3つの点について検証を行った。

(1) 骨髄の酸素レベルの検証：細胞膜透過性りん光プローブ BTPDMI を静脈内投与した麻酔下のマウスの頭蓋骨骨髄の酸素分圧を多光子励起 PLIM システムを使いイメージングした。システムは主に多光子レーザー顕微鏡部分 (FVMPE-RS, Olympus) と PLIM 部分 (DCS-120, Becker & Hickl) で構成され、4チャンネルの蛍光画像と PLIM 画像を同一視野でライブイメージングできるようにカスタムメイドで構築した。イメージングの対象となる骨髄組織は骨表面から数十から100 μm を超える深部であるため、生体組織の透過性に優れ組織侵襲の少ない長波長域のレーザーによる多光子励起でプローブを励起させた。励起されたりん光プローブが発するりん光は周囲の酸素分子と衝突により消光するため、励起から消光までの時間は酸素濃度依存性である。このりん光寿命を顕微鏡画像のピクセル単位でマッピングすることで酸素濃度の高低を示す画像を得た。酸素分圧の定量イメージングのため、BTPDMI を取り込ませた骨髄の初代培養細胞の培地中の酸素濃度をモニタリングしながら窒素バブリングによって変化させたときのりん光寿命の測定値と酸素濃度の相関をとることで検量線を作成した。得られた骨髄の酸素分圧イメージに蛍光画像から得られる骨髄の HSC、細動脈、類洞血管、骨といった細胞及び組織画像を組み込む画像処理により、骨髄内の細胞分布や組織構造の上に酸素濃度をマッピングした画像を出力させた。HSC の可視化には HSC に特異的に発現する遺伝子 Evi1 をレポーターとして緑色蛍光蛋白質 GFP を発現させた Evi1-IRES-GFP マウスを用いた。細動脈は血管系では細動脈に優位に発現の見られる Sca-1 に対する蛍光標識抗体を、静脈系である類洞血管は類洞の内皮細胞特異的に取り込まれる acetyl low density lipoprotein (AcLDL) を蛍光標識して静脈内投与することでそれぞれ可視化した。骨組織は骨に含まれるコラーゲンを多光子励起することで得られる second harmonic generation のシグナルを捉えることでこれを可視化した。

(2) 骨髄の酸素濃度の調節機構の解明：先行研究の結果から骨髄の動脈には血管の拡張収縮を担う血管平滑筋が付随しており、その血管内皮細胞には eNOS が強く発現していることが示唆されている。この骨髄の NOS から産生されていることが予想される NO が恒常的に骨髄の動脈を拡張させているかを探るため、NOS 阻害剤 L-NAME を骨髄局所に投与したときの動脈の血管径の変化を多光子レーザー顕微鏡で捉え、次いで L-NAME に加えて NO ドナーのニトロプルシドを投与し骨髄動脈径の回復が見られるか確認した。また、この時動脈の下流にある類洞血管の血流量の変化を類洞血管径と赤血球速度から算出した。さらに eNOS 遺伝子欠損 (eNOS KO) マウスの動脈径、類洞血管血流量を野生型マウスと比較することで、eNOS から産生される NO が骨髄の血流を保つことを示す証左を得た。次に骨髄の酸素分圧の維持に NO が寄与しているか否かを検証するため、L-NAME で頭蓋骨骨髄の NOS を阻害した時の頭蓋骨骨髄の酸素分圧イメージングを行った。L-NAME 投与前後での頭蓋骨骨髄の酸素分圧マップを重ね合わせることで、画像の1ピクセルごとの酸素分圧の変化を捉えることが可能であるため、細動脈、類洞血管、骨組織といった部位ごとの NO 産生阻害による酸素分圧の変化を画像化した。

(3) 骨髄の酸素濃度調節機構のHSCの遊走における役割：まず定常状態でのEvi1-IRES-GFPマウスの頭蓋骨骨髄のHSCの挙動を3次元でトラッキングした。HSCの動きの場の基準点は骨髄空間中の血管、骨の位置に設定するために、血管を蛍光色素TRITC標識の500 kDa デキストランを静脈内投与して蛍光血管造影を行い、SHGで示す骨組織のシグナルと組み合わせることで血管、骨の位置を示し、これら骨髄の構造物を基準としてHSCがどのようにこの空間の中を動くか2時間にわたって3次元空間上に示した。これら3次元イメージから得られた情報から、定常状態でのHSCの観察時間内での平均速度、最高速度、直線移動距離を算出した。またL-NAME投与時、L-NAMEとSNP投与時のHSCの動きをPBS投与群と比較することでNOがHSCの遊走に及ぼす役割を検証した。さらにNO産生阻害によるHSCの挙動の変化が、酸素分圧の増減に起因しているか否かを検証するため、L-NAME投与に加えてマウスに100%酸素を吸入させ、HSCの挙動がL-NAME投与以前のレベルに回復するか検証した。酸素濃度低下によるHSCの細胞運動の変化の検証には、*in vitro*でのトラッキングアッセイを用いた。全身の細胞にGFPを発現させたUbc-GFPマウスの骨髄のHSCをセルソーターで分取後、ラミニンコート96 wellプレートに播種し、酸素分圧可変チャンパーを実装した共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Cell insight, ThermoFisher) で培養中の酸素分圧を変化させたときのHSCの挙動を追った。酸素分圧の設定は酸素分圧生体イメージングで得られた定常状態とNO産生阻害時の骨髄中の酸素分圧の値に設定し両者を比較した。

4. 研究成果

まず定常状態の骨髄の血流におけるNOの役割を明らかにするため、NOS阻害剤L-NAMEを麻酔下のマウスの頭蓋骨骨髄に局所投与した時の血流変化を多光子レーザー顕微鏡を用いて検証した。その結果、骨髄の動脈の血管はNOSの阻害によって収縮し、またその下流の類洞血管の血流量が減少した。そこで骨髄におけるeNOSの血流維持における役割をより詳細に検討するため、eNOS KOマウスの頭蓋骨骨髄の血流を野生型マウスと比較したところ、野生型マウスと比べeNOS KOマウスの頭蓋骨骨髄の動脈径は小さく、類洞血管の血流は低下していた。さらにeNOS KOマウスの頭蓋骨骨髄にNOドナーとしてニトロプルシドを局所投与したところ、動脈径は野生型マウスとほぼ同等まで拡張し、また類洞血管の血流も改善を見せた。次にNOの骨髄の酸素環境維持における役割を検証するため、PLIMを使った麻酔下のマウス骨髄の定量的酸素濃度イメージングシステムを用いてNOS阻害時の酸素濃度を測定したところ、阻害前と比較してNOS阻害時の骨髄酸素濃度が低下した。これらの結果から骨髄のeNOSは骨髄の動脈を拡張させることでその下流の類洞血管の血流を保ち、酸素環境の維持に貢献していることが示唆された。さらにNOのHSCの骨髄内動態に及ぼす影響を精査するため、NO産生阻害剤L-NAME投与時のHSCの挙動を精査したところ、コントロール群と比較してL-NAME投与群はHSCの速度、移動距離ともに半減していた。またこのL-NAME投与によるHSCの挙動の低下は、100%酸素吸入によりコントロール群と同レベルまで回復した。さらに酸素濃度低下によるHSCの細胞運動能の変化を検証するため、培養中の酸素分圧が高い環境と低い環境とでHSCの挙動を比較したところ、HSCの平均速度は1%から3%の酸素濃度において酸素濃度依存的に変化した。これらの結果からHSCの骨髄における遊走能はNOがもたらす生理的酸素環境によって保たれている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujita Shinya, Morikawa Takayuki, Tamaki Shinpei, Sezaki Maiko, Takizawa Hitoshi, Okamoto Shinichiro, Kataoka Keisuke, Takubo Keiyo	4. 巻 112-113
2. 論文標題 Quantitative Analysis of Sympathetic and Nociceptive Innervation Across Bone Marrow Regions in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 44 ~ 59.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2022.07.297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sorimachi Yuriko, Karigane Daiki, Ootomo Yukako, Kobayashi Hiroshi, Morikawa Takayuki, Otsu Kinya, Kubota Yoshiaki, Okamoto Shinichiro, Goda Nobuhito, Takubo Keiyo	4. 巻 296
2. 論文標題 p38 plays differential roles in hematopoietic stem cell activity dependent on aging contexts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100563 ~ 100563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100563	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takayuki Morikawa and Keiyo Takubo
2. 発表標題 Intravital imaging and manipulation of bone marrow vasculature and intracellular oxygenation
3. 学会等名 The International Society for Experimental Hematology 50th Annual Scientific Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takayuki Morikawa and Keiyo Takubo
2. 発表標題 Nitric oxide-dependent vasodilation maintains the physiological oxygen levels in bone marrow and allows local crawling of hematopoietic stem cells
3. 学会等名 The International Society for Experimental Hematology 50th Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takayuki Morikawa, Shinya Fujita and Keiyo Takubo
2. 発表標題 PHYSIOLOGICAL HYPOXIA MAINTAINED BY NITRIC OXIDE SIGNALING REGULATES LOCAL CRAWLING OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research / The Japanese Society for Regenerative Medicine 2021 Tokyo International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------