

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592777

研究課題名(和文)成体内における一次造血機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of primary hematopoiesis in the adult mice

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脾摘マウスに窒素含有ビスフォスフォネート(NBP)とフェニルヒドラジン(PHZ)投与により、肝臓での髄外造血、末梢血への有核赤血球の出現、さらには腹腔内大網部位でのHemal Node様構造の出現という現象を得た。ヘモグロビンの遺伝子解析の結果、NMPとPHZの投与により、骨髄、肝臓、Hemal Node様構造内で成人型の赤血球造血に加え、胎児型の赤血球造血が誘導されていることが明らかとなった。これまで、遺伝子異常での一次造血の報告はなされているが、本研究のような遺伝子異常のないモデルでの一次造血誘導はこれまで報告されておらず、造血機構への新しい知見を示すものである。

研究成果の概要(英文)：The treatment with nitrogen-containing bisphosphonate (NBP) and phenylhydrazine (PHZ) into mice enhanced the extramedullary hematopoiesis in the liver and induced the appearance of nuclear erythrocytes in the peripheral blood and hemal node like structure in the abdominal cavity. The gene analysis of hemoglobin showed the appearance of primary hematopoiesis in the bone marrow, liver and hemal node like structure in addition to the secondary hematopoiesis. Our results first indicated the switch from the secondary to primary hematopoiesis in normal genomic animal model.

研究分野：解剖学、組織学

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

1. 研究開始当初の背景

個体発生における血液細胞の産生は一次造血により開始される。一次造血において最初に形成される血液細胞は赤血球が主体であるが、成体型の二次造血で作られる赤血球とは異なり、大型で成熟しても有核である。また、グロビン遺伝子も成体型と異なり、 $\beta H1$, ζ , ϵ を発現している。

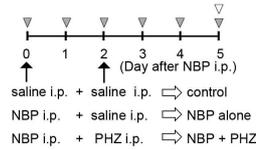
我々はこれまでの研究において、強力な骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネートの中で側鎖に窒素を有する窒素含有ビスフォスフォネート(NBP)の Maus への投与で、(1)骨髄での赤血球造血の消失(赤血球造血のストローマ細胞である骨髄常在性マクロファージの消失)、(2)脾臓における赤血球造血の亢進を見いだした(Nakamura et al. 1999)。この所見を基に、脾臓摘出マウスを用いて同様に NBP 投与したところ、正常 Maus と同様に骨髄からの赤血球造血が消失し、脾臓において髄外造血が誘導される所見を得た(Otsuka et al. 2011)。また、その赤血球造血は主として類洞内で営まれており、クッパー細胞が赤血球造血の支持細胞として機能していることも見いだした。また、産生される赤血球は末梢血において無核であることから、成体型の赤血球造血が脾臓で営まれていることも明らかとなった。

2. 研究の目的

以上の所見をもとに、予備実験として脾臓摘出マウスに Phenylhydrazine を投与し溶血性貧血を誘導後、NBP を投与したところ、Maus 腹膜に高頻度に Hemal Node 様構造が誘導されることを見いだした。更に、末梢血中に有核の赤血球が認められることも明らかとなった。これまでに我々が得た結果、すなわち、(1)脾臓における髄外造血(主に赤血球造血)の誘導、(2)末梢血内での有核赤血球の出現、(3)Hemal Node 様構造の出現という3点について詳細に解析を進める。

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 週後の脾臓、ならびに Hemal 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)末梢血の解析

ヘマトクリット値の解析：溶血性貧血誘導と髄外造血誘導にともなうヘマトクリット値の変動について解析を行う。

末梢血の解析：末梢血中の血球分画について、主に Flow Cytometry を用いて解析を行う。

(2)脾臓における髄外造血巣の解析

免疫組織学的解析：各種単クローン抗体(TER-119, Gr-1, B220, 2C11, F4/80, ER-TR20 等)を用いて染色を行い、髄外造血巣での造血動態を解析する。

グロビン遺伝子プロファイルの解析：一次造血で使用されるグロビン遺伝子である $\beta H1$, ζ , ϵ の発現の有無について RT-PCR を用いて解析を行う。

造血関連転写因子の解析：GATA1、GATA2 や一次造血に深く関与する Erythroid Krüppel-like factor 等の造血関連発現を RT-PCR を用いて解析を行う。

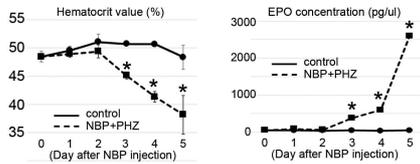
(3) Hemal Node 様構造の組織学的解析。

(4) Hemal Node 様構造における造血因子、グロビン遺伝子プロファイル、造血関連転写因の解析

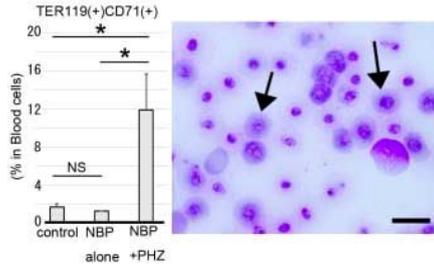
4. 研究成果

末梢血の解析

NBP 投与群に PHZ を投与すると、ヘマトクリット値の有意な減少ならびに時期が一致したエリスロポエチンの有意な上昇が認められた。

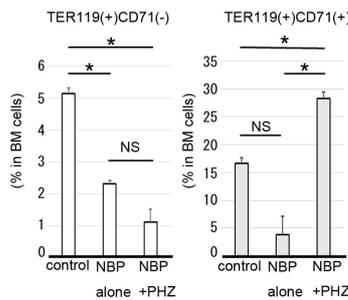


また、末梢血中に有意に TER119(+)
CD71(+)
の幼弱な赤血球が出現し、ギムザ染色の結果、
有核赤血球であることが示された。



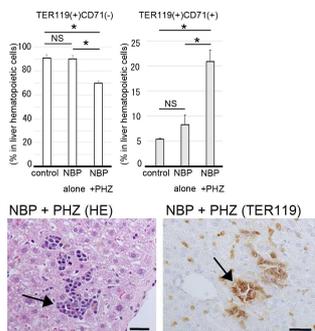
骨髄解析

骨髄ではこれまでの報告通り、NBP 単独投
与で成熟赤血球 TER119(+)
CD71(-)の減少が
みられ。PHZ 併用でも同様であったが、
TER119(+)
CD71(+)
幼弱赤血球は PHZ 併用で有
意な増加結果を得た。



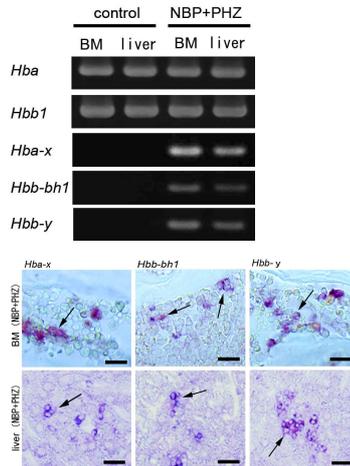
肝臓解析

肝臓では、PHZ 併用で有意な成熟赤血球
TER119(+)
CD71(-)の減少が
みられた。また、
著しい TER119(+)
CD71(+)
幼弱赤血球の増加
を得た。組織学的、免疫組織学的解析の結果、
これらの細胞は sinusoid 中でクラスター形
成していることが確認された。

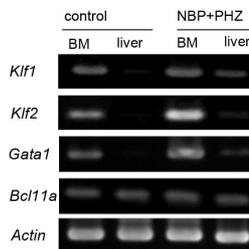


ヘモグロビン解析

上記の解析結果で示されているように、
NBP と PHZ の併用により、幼弱型の赤血球が
多数誘導された。それらの赤血球が成人型の
ヘモグロビンあるいは胎児型ヘモグロビ
ンのどちらを発現しているかの解析を行った、
その結果、NBP と PHZ の投与により、Hba-x,
Hbb-bh1 ならびに Hbb-y の胎児型ヘモグロ
ビンの発現が成熟型 (Hba, Hbb1) 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。



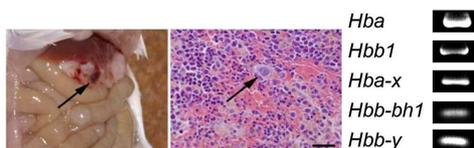
胎児型ヘモグロビン発現に GATA1、
GATA2 や一次造血に深く関与する
Erythroid Krüppel-like factor (KLF) 等の
造血関連発現が関与していることからその
解析を行った。その結果、胎児型ヘモグロ
ビン発現に関与する KLF-1, GATA-1 の発現増
強が認められた。



Hemal node 様構造解析

NBP と PHZ の投与で腹腔内に赤褐色の Hemal
node 様構造が誘導された。組織学的解析で、
巨核球の出現があることから、脾臓同様に活
発な赤血球を含む造血が営まれていること

が示された。RT-PCRの結果から、本構造内でも胎児型赤血球造血が起こっておりことが示された。



遺伝子異常のない正常動物で二次造血から一次造血へのスイッチを示す報告はこれまでになされていない。本研究結果がその転換を示す最初のものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)

Otsuka H, Takito J, Endo Y, Yagi H, Soeta S, Nonaka N, Nakamura M: The expression of embryonic globin mRNA in a severely anemic mouse model induced by treatment with nitrogen-containing bisphosphonate. BMC Hematol 査読有 16:4, 2016. doi: 10.1186/s12878-016-0041-0.

Kubono Y, Mayahara M, Otsuka H, Kataoka R, Takagi Y, Asari J, Nonaka N, Inoue M, Nakamura M. Analysis of periapical alveolar bone resorption after the removal of interdental wire ligation. Ped Dent J 査読有 25:1-7, 2015. doi:10.1016/j.pdj.2014.12.002

Takito J, Otsuka H, Yanagisawa N, Arai H, Shiga M, Inoue M, Nonaka N, Nakamura M. Regulation of Osteoclast Multinucleation by the Actin Cytoskeleton Signaling Network. J Cell Physiol. 査読有 230:395-405, 2015. doi: 10.1002/jcp.24723.

Kawano M, Nakamura M et al. (26人中23番): NKG2D+ IFN- γ + CD8+ T cells are responsible for palladium allergy. PLOS ONE 査読有 9: e86810, 2014 doi: 10.1371/journal.pone.0086810.

Taketomi Y, Nakamura M et al. (33人中9番目): Mast cell maturation is driven via a group III

phospholipase A2-prostaglandin D2-DP1 receptor paracrine axis. Nat Immunol 査読有 14: 554-563, 2013. doi: 10.1038/ni.2586.

Nakajima K, Nakamura M et al. (8人中8番目): Composition of the blood supply in the sublingual and submandibular spaces and its relationship to the lateral lingual foramen of the mandible. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 査読有117(1) e32-e38, 2014. doi: 10.1016/j.oooo.2012.03.032.

Hidaka M, Nakamura M et al.: Involvement of intestinal intraepithelial lymphocytes in turnover of intestinal epithelial cells -Morphological and functional alterations due to daily administration of FK506. Cell Immunol 査読有276:124-133, 2012. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.10.007.

Nonaka N, Farr SA et al.(7人中5番目) Intranasal administration of PACAP: Uptake by brain and regional brain targeting with cyclodextrins. Peptide 査読有 36: 168-175, 2012. doi: 10.1016/j.peptides.2012.05.021.

Takito J, Nakamura M: precursors linked via the zipper-like structure or the filopodium during the secondary fusion of osteoclasts. Communicative & Integrative Biology 査読有 5: 450-454, 2012. doi: 10.4161/cib.20980.

Tsukamoto Y, Usui M et al. (7人中7番目): The role of the junctional epithelium in periodontal innate defense and homeostasis. J Periodont Res 査読有 47: 750-757, 2012. doi:10.1111/j.1600-0765.2012.01490.x.

Takito J, Nakamura M et al.: The transient appearance of zipper-like actin superstructures during the fusion of osteoclasts. J Cell Sci 査読有 125:662-672, 2012. doi: 10.1242/jcs.090886.

Ikeda-Isogai M, Ohtsuka T, Baba K, Nonaka N, Nakamura M: Calcified tissue formation of subcutaneously transplanted mouse dental pulp. Acta Histochem 査読有 114:55-61, 2012. doi: 10.1016/j.acthis.2011.02.007.

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 野中直子, 中村雅典: 十全大補湯による加齢マウス唾液腺におけるリンパ球浸潤抑制効果 (第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 福島 2016 年 3 月)
2. 井上知、大塚裕忠、瀧戸次郎、柳澤伸彰、野中直子、中村雅典: 長骨骨幹部および骨幹端における骨修復機構の比較. (第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 福島 2016 年 3 月)
3. 新井宏、大塚裕忠、瀧戸次郎、井上知、柳澤伸彰、野中直子、中村雅典: ミノドロネート投与によるコラーゲン誘導型関節炎モデルへの影響. (第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 福島 2016 年 3 月)
4. 瀧戸二郎、中村雅典: 破骨細胞に見られるアクチン超構造体の静的構造 (第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 福島 2016 年 3 月)
5. Arai H, Otsuka H, Takito J, Inoue S, Yanagisawa N, Nonaka N, Nakamura M: Effect of Minodronate on collagen-induced arthritis model mice. (APICA Singapore, 2016 年 3 月)
6. Nonaka N, Nakamura M: The suppressant effect of lymphocyte infiltration by Juzentaihoto in the aging mouse salivary glands. (GSA2015 Annual Scientific Meeting, Orlando, FL 2015 年 11 月)
7. Takito J, Nakamura M: The anatomy of the zipper-like structure. (63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Fukuoka, 2015 年 10 月)
8. 野中直子, 中村雅典: 加齢マウス唾液腺におけるリンパ球浸潤と十全大補湯によるその抑制効果 (第 15 回日本抗加齢医学会総会 福岡 2015 年 5 月)
9. Nonaka N, Nakamura M: Change of PACAP receptor expressing cells during the development of granular duct in male mouse submandibular glands. (Experimental Biology 2015 Boston , USA 2015 年 3 月)
10. Inoue S, Arai H, Otsuka H, Nakamura M: The effect of Minodronate on Murine Hematopoiesis. (120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan March 21-23, 2015, Kobe, Japan)
11. Arai H, Otsuka H, Takito J, Inoue S, Nonaka N, Nakamura M: Effect of Nitrogen-containing bisphosphonates on collagen-induced arthritis model mice. (120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan March 21-23, 2015, Kobe, Japan)
12. 瀧戸二郎、中村雅典: エンドサイトーシスと細胞融合に関するアクチン再構築系の分離 (第 120 回日本解剖学会総会 2015 年 3 月 21 日-23 日 神戸)
13. 野中直子、中島 功、片岡竜太、中村雅典: 人体解剖学実習におけるグループダイナミクス評価の検討 その 3. (第 32 回日本歯科医学教育学会学術大会, 小倉 2014 年 7 月)
14. 柳澤伸彰, 大塚裕忠, 瀧戸次郎, 野中直子, 中島 功, 中村雅典: 顔面部皮膚領域における抗原提示細胞の局在 (第 19 回日本顔学会大会 (フォーラム顔学 2014) 東京 2014 年 10 月)
15. Nonaka N, Nakamura M: Histological and immunohistochemical comparison of mouse salivary glands in aging. (91th International Association for Dental Research (IADR) 2013, Seattle, March 2013)
16. 大塚裕忠, 中村雅典: 成体マウスにおける胚子ヘモグロビンの再発現について. (第 188 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 高松, 2013 年 3 月)
17. 瀧戸 二郎, 中村雅典: 破骨細胞融合時

に出現する細胞間アクチン超構造体。(第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 高松, 2013 年 3 月)

18. 野中直子, 中町智哉, 塩田清二, 中村雅典: 加齢に伴うマウス唾液腺における構造機能変化の比較検討。(第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 高松, 2013 年 3 月)

19. Otsuka H, Nakamura M: Simultaneous detection of primitive and definitive erythropoiesis in adult mice. (第 41 回日本免疫学会総会・学術集会, 神戸 2012 年 12 月)

20. Matoba Y, Nonaka N, Imamura E, Nakamura M: Immunohistochemical localization of PACAP and VIP receptors in major salivary glands and the effect of them on saliva secretion in mice. (10th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgeons (ACOMS), Bali-Indonesia, November 2012)

21. Otsuka H, Nakamura M: Induction of hemal node like structures in mice.

(14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry Poster Program 8, August, 2012)

22. 野中直子, 中村雅典: 加齢に伴うマウス唾液腺における PACAP レセプター局在の解析。(第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会 郡山, 2012 年 9 月)

23. 野中直子, 中島 功, 中村雅典, 片岡竜太: 人体解剖学実習におけるグループダイナミクス評価の検討 その 1(第 31 回日本歯科医学教育学会総会, 2012, 7 月, 岡山)

24. Nonaka N, Nakamura M: Immunohistochemical localization of PACAP and VIP receptors in major salivary glands and the effect of PACAP on saliva secretion in mice. American Association of Anatomists (AAA) (Annual Meeting at Experimental Biology 2012, San Diego, April 2012)

[図書](計 5 件)

Nakamura M, Otsuka H, Yagi H, Yasuo

Endo: The Functional Diversity of Kupffer Cells. Handbook of Macrophage: Life Cycle, Functions and Diseases. NOVA science publishers, 329-344, 2013

Nakamura M, Otsuka H, Nonaka N, Yanagisawa N, Yagi H, Endo Y: Extramedullary erythropoiesis in anemia. The New Frontiers in Research for Oral Cancer. MARUZEN PLANET, 117-127, 2013

磯川桂太郎・稲井哲一郎・中村雅典・山本仁・渡邊弘樹 著 組織学・口腔組織学<第 4 版> わかば出版 433 頁 2014

今村栄作、中村雅典: 歯科小手術のための局所解剖。 歯科小手術スキルアップ 今村栄作、山田浩之(編集) 日本歯科評論 168 頁 2014

近藤信太郎・中村雅典・松野昌展・影山幾男・吉村建・野中直子 歯の解剖学 <第 1 版> わかば出版 172 頁 2015

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

野中 直子 (NONAKA Naoko)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号: 20307052

(3) 連携研究者

()

研究者番号: