

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659811

研究課題名(和文)造血系疾患の治療を目指した歯髄、骨髄の神経堤及び中胚葉由来間葉の造血支持能の研究

研究課題名(英文) Analysis of ability to support hematopoiesis of mesoderm-derived or neural crest-derived mesenchymal cells in dental pulp and bone marrow

研究代表者

山崎 英俊 (YAMAZAKI, HIDETOSHI)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00283987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：中胚葉或いは神経堤由来細胞を蛍光標識し、かつジフテリアトキシン受容体(DTR)を発現し、DT投与により中胚葉或は神経堤由来細胞を欠損させることの出来るマウスを用いて、神経堤或は中胚葉に由来する細胞を欠損させると胸腺及び骨髄の造血に異常が見られる事を明らかにした。神経堤由来細胞は間葉のみならず、自律神経や副腎髄質にも寄与し、神経堤欠損マウスでは、血中のアドレナリンやノルアドレナリンが減少し、これが造血異常の原因である可能性が示唆された。新生仔マウス歯髄間葉が骨髄間葉同様にB細胞や破骨細胞の分化支持能を持つ事を見いだしたが、胎仔歯髄には胎仔骨髄同様の造血器官形成能や造血支持能は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：By using Cre-LoxP mediated transgenic mice that have NC- or mesoderm-specific Cre expression and Cre-activated YFP reporter and Diphtheria Toxin (DT) Receptor, NC- or mesoderm-derived cells were depleted by the administration of DT. The consequence of DT-mediated depletion of these cells on B and T lymphopoiesis was examined by flowcytometry. Severe reduction of the number of B and T cell progenitors in the BM and thymus was observed by the depletion. As NC cells contributed to sympathetic neurons, to investigate the affect of sympathetic neurons in DT-administrated mice, concentrations of catechorammin were measured in plasma, and those of noradrenalin and adrenalin were significantly reduced. These results suggest that NC-derived mesenchyme and sympathetic neurons are involved in B and T lymphopoiesis. Although dental mesenchyme supported B lymphopoiesis and osteoclastogenesis as well as bone marrow, embryonic tooth mesenchyme had little hematopoietic supporting capacity.

研究分野：幹細胞発生学

キーワード：神経堤細胞 中胚葉 ジフテリアトキシン 歯髄 造血支持能 胸腺 骨髄

## 1. 研究開始当初の背景

神経堤細胞は、脊椎動物の胚発生初期に神経管背側部より発生する細胞集団で、特に頭部神経堤細胞は間葉系細胞への分化能も有する。これまで間葉系細胞は中胚葉及び神経堤細胞に由来し、特に頭部間葉は主に神経堤に、体幹部間葉は、主に中胚葉に由来すると考えられていたが不明な点が多い。我々は、神経堤細胞及び中胚葉由来細胞を特異的に蛍光標識することで、歯や胸腺や骨髄を始めとする様々な器官の間葉細胞が神経堤及び中胚葉に由来することを明らかにした (Int Immunol, Yamazaki, 2005; Stem cells. Yamazaki, 2007; PLoS One, Komada, 2012)。歯髄、骨髄の間葉系幹細胞の性質を持つ細胞が神経堤に由来することから、歯髄の細胞の造血支持能を検討したところ、骨髄間葉細胞同様に、各種造血関連遺伝子を発現し、造血幹細胞から歯髄の間葉細胞を用いて、B細胞や破骨細胞を分化誘導できることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

我々は、これまで中胚葉或いは神経堤由来細胞を蛍光標識出来るマウスを用いて、胎仔から成体に至るまでの長い間、これらの細胞が歯や胸腺、骨髄の間葉細胞及び間葉系幹細胞に深く寄与している事を明らかにした。しかし、造血器官における両間葉の役割は殆どわかっていない。そこで、胎仔から成体に至るまで片方の間葉細胞を蛍光標識、かつ欠損させることの出来る系を、試験管内或は生体内で用いる事で、これらの間葉細胞の造血に関わる機能を明らかにしたいというのが本研究の目的である。

また、これまでに歯の神経堤由来間葉細胞と造血幹細胞を共培養することでB細胞と破骨細胞の誘導に成功した。従って、骨髄と歯髄の間葉細胞の相違点を明らかにすることで、骨髄に代わる歯髄を用いた造血系疾患の治療の可能性を探るといのも本研究の目的となる。

## 3. 研究の方法

### (1) 間葉細胞と造血支持能について

中胚葉及び神経堤由来細胞に特異的に蛍光蛋白 YFP とジフテリアトキシン (DT) 受容体を発現させたマウスに DT を投与することで、特異的に中胚葉及び神経堤由来細胞を欠損させる。これらのマウスの骨髄、胸腺等より血液細胞や間葉細胞を回収し、間葉細胞が一種類になった場合の造血器官への影響をリンパ球や骨髄幹細胞数を指標に切片及びフローサイトメトリーにて解析する。

DT 投与により特異的に片方の間葉細胞を

欠損できるマウスの骨髄細胞を用いて、試験管内で DT の存在下で骨髄から B 細胞及び骨髄球系 (マクロファージ系) 細胞への分化への影響をフローサイトメトリーにて解析する。

中胚葉或いは神経堤由来細胞を特異的に標識及び欠損させることのできるマウスの胎仔胸腺及び骨髄の器官培養法を用いて解析する。実際は、胎生 13 日、14 日の胸腺及び胎仔大腿骨を単離し、試験管内で DT 存在下或は非存在下で器官培養を行ない、T 細胞および B 細胞への分化への影響を調べる。

中胚葉或いは神経堤由来細胞を特異的に標識及び欠損させることのできるマウスの胎仔胸腺及び骨髄の腎皮膜下移植による造血能の検討。胎生 13 日、14 日の胸腺及び胎仔大腿骨を単離し、別マウスの腎皮膜下に移植し、DT を投与することで胸腺及び骨髄の間葉細胞にのみ影響を与える事で T 細胞および B 細胞への分化への影響を調べる。

神経堤細胞は末梢神経の自律神経や副腎髄質に寄与するので、神経堤欠損マウスでのカテコラミンを測定し、またカテコラミン欠損モデルマウスを作製し、造血への影響を調べる。

(2) 中胚葉或いは神経堤由来細胞を標識できるマウスの歯髄及び骨髄の間葉系細胞のみを単離し、コラーゲンゲル等と一緒に腎皮膜下に移植することで、歯髄及び骨髄の間葉で造血器官形成能や造血支持能があるかを検討する。

## 4. 研究成果

(1) 中胚葉或いは神経堤由来細胞を特異的に標識及び欠損させることのできるマウスを用いた in vivo での両間葉細胞の造血での役割解明

中胚葉或いは神経堤由来細胞の片方を欠損させると骨髄の B 細胞及び胸腺の T 細胞の分化異常が認められた。しかし、骨髄球系及び造血幹細胞には影響を認めなかった。

特に中胚葉系細胞は、間葉のみならず血液細胞にも寄与しているので、放射線照射にて、造血細胞を入れ替え、間葉細胞のみの欠損による造血支持能への影響を検討したところ、確かに中胚葉由来間葉細胞の欠損により B、T 細胞の分化異常が誘導された。さらに、これらのマウスの骨髄細胞を単離し、試験管内にて DT 存在下で片方の間葉を欠損させて、B 細胞、骨髄球系細胞への影響を調べたが、同様の異常は認められなかった。

DT 投与マウスの胸腺では、アポトーシスが更進し、また胸腺、骨髄ともに血管腔の拡張が認められたことから、DT 投与による炎症性サイトカインの誘導が考えられた。そこで、DT 投与マウスから血漿を単離し、静脈内接種したが、炎症や同様の異常は誘導できなかった。

これらの生体でみられた現象が、全身的な影響か、局所における間葉の欠損の直接的な影響かを調べるために、胸腺及び大腿骨を単離し、正常マウスに移植し、DT 投与により移植骨髄或は胸腺のみで片方の間葉細胞がない状況を作製し、造血細胞の分化異常について検討した。しかし、同様の B、T 細胞異常は認められなかった。また、胎仔胸腺や骨髄を単離し、DT の存在下、或は非存在下で器官培養を行い、両間葉細胞の胸腺や骨髄の発生への影響について調べたが、明らかな異常は認められなかった。以上から、胸腺及び骨髄間葉の局所の欠損だけではこれらの現象は説明できないと考えられた。

神経堤細胞は、自律神経、副腎髄質にも寄与しているので、神経堤欠損マウスで血中カテコラミンを測定したところ、アドレナリン、ノルアドレナリンの著しい減少が認められた。また、神経毒である 6-OHDA 投与により血中アドレナリン、ノルアドレナリンが減少することが確認でき、確かに B、T 細胞の分化異常が認められた。また骨髄の間葉細胞や造血支持細胞株上にアドレナリン受容体の発現を認めた事から、これらの現象はアドレナリンと間葉細胞或は造血支持細胞上のアドレナリン受容体を介したシグナルが関わっている可能性が示唆された。

(2) 骨髄と歯髄の間葉細胞の比較として造血支持能について検討  
これまで新生仔マウスの歯髄間葉と造血幹細胞を培養した所、骨髄間葉同様に B 細胞や破骨細胞の分化を支持する事がわかった。歯髄間葉では骨髄同様に造血関連遺伝子 (Stem cell factor (SCF)、IL-7, SDF1 等) が発現していた。そこで、胎生 12 および 13 日の骨髄及び歯髄、顔面の神経堤由来細胞を単離し、生体内での骨髄形成能・造血支持能を検討した。胎仔骨髄には確かに造血支持能は認められたが、歯髄間葉のみでは明らかな造血支持能及び骨髄形成能は認めなかった。

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 3 件)

Common developmental pathway for primitive erythrocytes and multipotent hematopoietic progenitors in early mouse development. Yamane Toshiyuki, Washino Aya, and Yamazaki Hidetoshi (査読有) Stem cell reports. 1(6):590-603. (2013)  
doi:0.1016/j.stemcr.2013.10.008

Earliest hematopoietic progenitors at embryonic day 9 preferentially generates B-1 B cells rather than follicular B or marginal zone B cells. Ito Chie, Yamazaki Hidetoshi, Yamane Toshiyuki (査読有) Biochem Biophys Res Commun. 437(2):307-313. (2013)  
doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.073

Origins and properties of dental, thymic and bone marrow mesenchymal cells and their stem cells. Komada Yukiya, Yamane Toshiyuki, Kadota Daiji, Isonokana, Takakura nobuyuki, Hayashi shinichi, Yamazaki Hidetoshi. (査読有) PLoS One 7(11). e46436 (2012)  
doi:10.1371/journal.pone.0046436

[学会発表](計 12 件)

Cellular and genetics cues to multipotency during ontogeny 山根利之、山崎英俊 第 43 回日本免疫学会総会学術集会 2014 年 12 月 10-12 日 京都国際会議場 (京都)

Roles of neural crest-derived cells in the mouse bone marrows and thymic hemato-lymphopoiesis 角熊直樹、山根利之、山崎英俊 第 43 回日本免疫学会総会学術集会 2014 年 12 月 10-12 日 京都国際会議場 (京都)

神経堤及び中胚葉由来細胞の分化能と胸腺や骨髄での両細胞の役割 山崎英俊 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 (招待講演) 2014 年 9 月 25-27 日 福岡国際会議場 (福岡)

神経堤由来間葉細胞と歯、胸腺、骨髄の器官形成 山崎英俊 第 61 回日本実験動物学会 (招待講演) 2014 年 5 月 17 日札幌コンベンションセンター (札幌)

多能性造血細胞の分化能の変遷 山根利之 第 65 回日本細胞生物学会 (招待講演) 2013 年 6 月 19-21 日名古屋国際会議場 (名古屋)

Contribution of neural crest- and mesoderm-derived mesenchymal cells to the bone marrow hemato-lymphopoiesis 角熊直樹、山根利之、山崎英俊 第 65 回日本細胞生物学会 2013 年 6 月 19-21 日 名古屋国際会議場 (名古屋)

発生初期の多能性造血細胞は造血幹細胞と異なる B リンパ球サブセット分化傾向を持つ 山根利之、山崎英俊 第 65 回日本細胞生物学会 2013 年 6 月 19-21 日 名古屋国際会議場 (名古屋)

Contribution of neural crest-derived cells and mesodermal cells to the mouse bone-marrow and thymic-hemato-lymphopoiesis 角熊直樹、松本千晶、山根利之、山崎英俊 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012 年 12 月 5-7 日 京都国際会議場 (京都)

Contribution of neural crest and mesodermal cells to the bone-marrow and thymic-hematopoiesis 角熊直樹、松本千晶、山根利之、山崎英俊 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 19-21 日 京都国際会議場 (京都)

Cell fate regulation of the common primitive-definitive hematopoietic progenitors. 山根利之、鷲野亜矢、山崎英俊 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 19 日 京都国際会議場 (京都)

神経堤或は中胚葉由来間葉細胞の欠損による造血細胞の異常とストレス反応 松本千晶、角熊直樹、山根利之、山崎英俊 第 81 回 東海動物実験研究会 2012 年 7 月 21 日 三重大学 (津市)

マウス ES 細胞からの神経堤細胞の誘導 栗谷健志、山根利之、山崎英俊 第 81 回 東海動物実験研究会 2012 年 7 月 21 日 三重大学 (津市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.medic.mie-u.ac.jp/physiol\\_regener/](http://www.medic.mie-u.ac.jp/physiol_regener/)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山崎 英俊 (YAMAZAKI HIDETOSHI)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：00283987

##### (2) 研究分担者

山根 利之 (YAMANE TOSHIYUKI)  
三重大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：30452220

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：