

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790202

研究課題名(和文) 骨髄脂肪変性における間葉系細胞の役割

研究課題名(英文) The role for mesenchmal cells in adipose degeneraion of bone marrow

研究代表者

原田 智紀 (HARADA, Tomonori)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：00424721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円、(間接経費) 480,000円

研究成果の概要(和文)： SAMP6マウスの骨髄では、加齢に伴い間葉系細胞である脂肪前駆細胞の増加と線維芽細胞前駆細胞の減少による脂肪化が観察された。同時にB細胞造血が低下したことから、間葉系細胞分化が造血に重要であることが明らかになった。

生理的に脂肪化が起こらないC57BL/6マウスの骨髄を脂肪化させるために低酸素環境にて飼育し、その環境評価のために造血を観察したところ、低酸素期間を通して赤血球数が増加していた。初期には赤血球造血を促進するEPOが増加し赤血球産生が亢進していたが、3週目以降は「無効造血」といわれる赤血球の自己死の割合を減少させ、赤血球増加を維持していることが新規知見として判明した。

研究成果の概要(英文)： In the bone marrow (BM) of SAMP6, an increase of adipocyte progenitor cells and a decrease of fibroblast progenitor cells resulted in adipose degeneration with aging. Since B lymphopoiesis simultaneously decreased, the age related change in the differential capacity of mesenchymal cells affect hematopoiesis.

C57BL/6 mouse which shows no physiological adipogenesis in BM, were bred under hypoxic environment to accelerate adipogenesis in the BM. To evaluate the environment, hematological parameters were observed. The number of red blood cells (RBC) rapidly increased and remained high thereafter. A stimulator of erythropoiesis such as EPO promptly increased, which facilitated RBC production. Then, apoptosis in immature RBC named "ineffective erythropoiesis" was prevented, which resulted in maintaining high number of RBCs in chronic phase. These mechanisms are new knowledge of this study.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：細胞・組織 組織学 造血発生学 骨髄 脂肪組織 低酸素 無効造血

1. 研究開始当初の背景

- (1)長管骨の骨髓は、若年者では造血が活発に行われる赤色髄であるが、中年以降では造血が行われない黄色髄(脂肪髄)に変化している。
- (2)この脂肪髄化は、生理的現象と考えられる一方、造血障害の原因となっており、難治性造血器疾患である再生不良性貧血の一部において、病態として脂肪髄化を示すことが知られている。脂肪髄化と造血機能は深く関係しているため、脂肪髄発生機序の解明は重要な課題とされている。
- (3)脂肪髄化の機序の一つとして動脈硬化が挙げられている。動脈硬化を来たせば、骨髓内はそれまで以上に低酸素環境になると考えられるため、実験動物の飼育環境を低酸素とすることで脂肪髄化が誘導される可能性が考えられる。

2. 研究の目的

- (1)この脂肪髄化においては、本来骨髓間葉系幹細胞(BMSC)が有する骨、軟骨、筋、脂肪などの種々の細胞への分化能が失われ、脂肪細胞のみに分化するようになった結果と推察されるため、加齢に伴うBMSCの分化能の変化、結果として形成される脂肪髄における造血能の変化について明らかにする。
- (2)脂肪髄化を誘導する方法として低酸素飼育を行う。

3. 研究の方法

- (1)マウスを用いて実験を行う。老化促進モデルマウス(Senescence-accelerated mice: SAM)の系統の内、30週齢頃から造血能の低下を認めるSAMP1マウスおよび骨粗鬆症のモデル動物でもあり通常飼育にて脂肪髄化が認められるSAMP6を用い、加齢に伴う生理的な間葉系細胞の前駆細胞数の増減を観察する。
- (2)人工的に脂肪髄化を促進するために低酸素環境下の飼育実験を行う。本実験ではマウスC57BL/6を用い、低酸素環境の造血を観察する。

4. 研究成果

- (1)骨髓の脂肪細胞前駆細胞(CFU-Ad)数は10週齢マウスと比べ、加齢マウス(35週齢以上)においてSAMP1のみならずSAMP6でも増加していた。線維芽細胞前駆細胞(CFU-F)数はSAMP1では加齢に伴い増加、SAMP6では減少を認めた。骨芽細胞前駆細胞(CFU-Ob)数はSAMP1において加齢に伴う増加を認めしたが、SAMP6では若齢マウスでも検出困難であった。造血前駆細胞においては、SAMP6の加齢マウスではB細胞前駆細胞(CFU-preB)の減少を認めた。これ

らの結果、SAMP6ではCFU-F数が減少しCFU-Ad数が増加することで脂肪変性を起こしている可能性が示唆され、間葉系細胞分化が骨髓造血に重要な役割を担っていることを明らかにした。

- (2)低酸素飼育実験において、マウスC57BL/6の造血能を確認したところ、低酸素状態が続く間多血状態を維持していることを20週に亘り観察した(図1)。

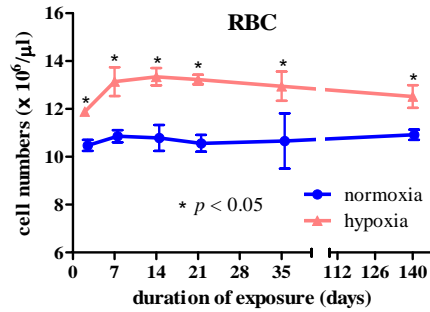


図1 低酸素飼育による赤血球数の増加

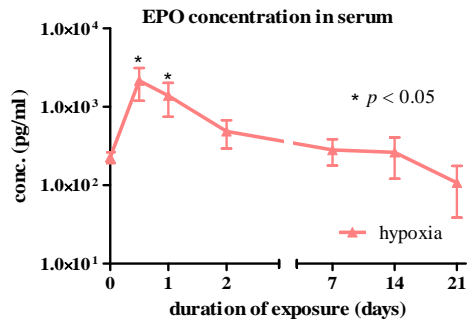


図2 低酸素飼育による血清EPO濃度

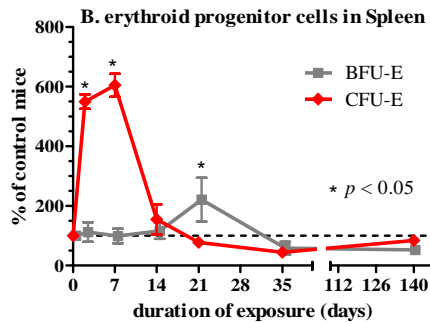
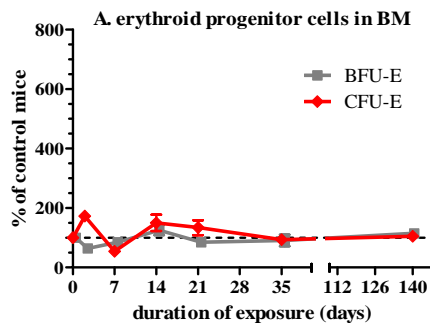


図3 低酸素飼育による骨髓(上)および脾臓(下)における赤血球系造血前駆細胞数の変化

低酸素では赤血球造血を促進するホルモンであるエリスロポエチン (EPO) の産生が亢進することが知られているため、血清 EPO 濃度を測定したところ、低酸素飼育 12 時間で高値を示したが、2 日目には飼育前と同程度の濃度まで低下していた (図 2)。

骨髄では、赤血球系造血前駆細胞数の顕著な増加を認めなかったが (図 3 上)、脾臓では低酸素飼育 2 日目および 7 日目に後期赤芽球系前駆細胞 (CFU-E) が約 6 倍にも増加した (図 3 下)。CFU-E は EPO によく反応するため、この増加は血清 EPO 濃度の増加によるものと思われる。その後も骨髄では赤血球系造血前駆細胞数の顕著な増加はなく、脾臓ではむしろ低下しており、20 週に亘り多血を維持するには、前駆細胞数の増加によらない別の機構があると推察された。

生体では、新たに造られる赤血球は全てが成熟し、身体で使われる訳ではなく、一部はアポトーシスに陥ることが知られており、この現象は無効造血とよばれている。この無効造血の割合を観察するために、赤血球系マーカーの TER119 およびアポトーシスのマーカーである Annexin V にて骨髄及び脾臓細胞を染色し、フローサイトメーターにて測定した。TER119 陽性細胞は低酸素飼育に伴い骨髄でも脾臓でも増加し、3 週目には 1 週目よりも減少したものの通常飼育よりも増加したままであり、以降も 20 週まで増加した状態を維持していた (図 4 上)。この TER119 陽性細胞における Annexin V 陽性細胞の割合、すなわち無効造血の割合は、TER119 陽性細胞が急増した 1 週目では増加したが、3 週目に著しく低下し、以後低下したままであった (図 4 下)。この低下の程度は通常飼育のコントロールマウスと比べると脾臓よりも骨髄で顕著であった。

無効造血は、常に余裕のある数の赤血球を途中まで産生し、生体にとって必要な数だけを残すシステムであり、その余裕のために出血などの非常時に成熟した赤血球を短時間で作り出すことを可能にしている。同時に最終的に有効に機能しない赤血球を循環させないようにし、さらに循環する赤血球数の過剰により血液の粘性が上がることを防ぐシステムでもある。低酸素飼育開始初期には EPO 産生が一過性に高まり、それにより特に脾臓において赤血球造血が亢進したが、この赤血球数が急増するときには無効造血の割合も増加し、異常血球の出現および血液粘性度の過度の上昇を防いだものと考えられた。しかし 3 週目以降においては、生体は造血亢進状態を持続することなく多血を維持するために、特に骨髄において無効造血を減らす

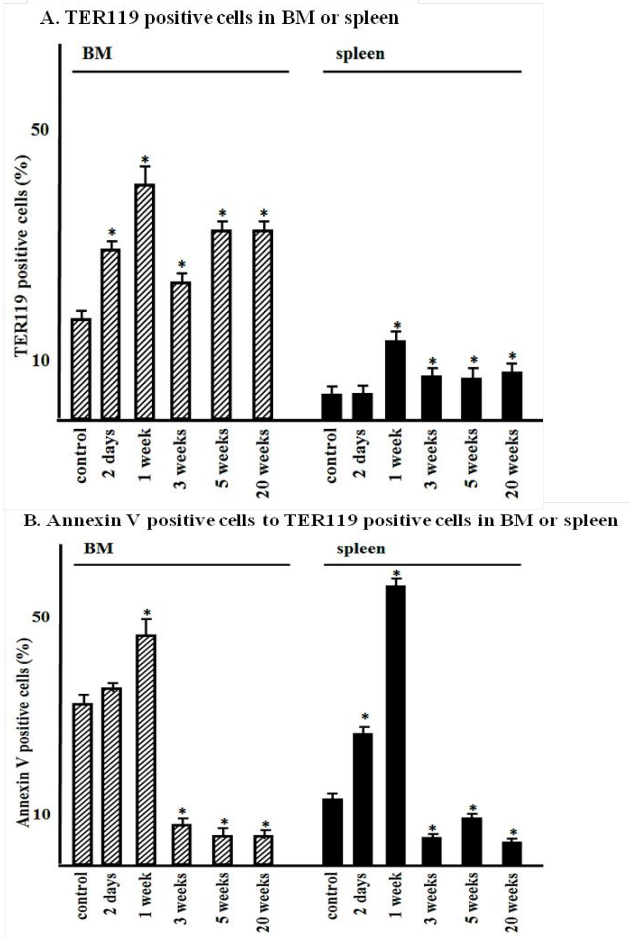


図 4 低酸素飼育による骨髄および脾臓における TER119 陽性細胞の割合 (上) と TER119 陽性細胞における Annexin V 陽性細胞の割合 (下)

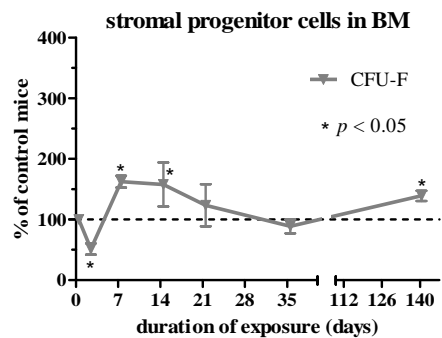


図 5 低酸素飼育による骨髄 CFU-F の変動

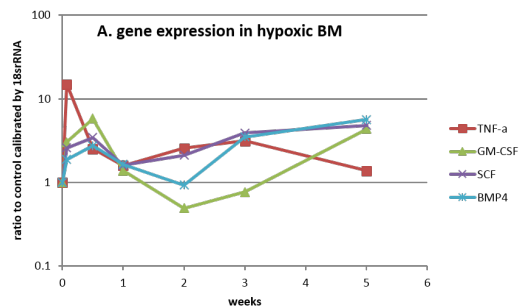


図 6 低酸素飼育による骨髄における各種サイトカインの mRNA 発現

ことが本研究により新規知見として判明した。

ところで、赤血球系以外の造血前駆細胞数の変動も観察したが、顆粒球 マクロファージ前駆細胞、B 細胞前駆細胞、肥満細胞前駆細胞の数に有意な変動は認められなかった。しかしながら、間葉系細胞の前駆細胞である骨髄の CFU-F において有意な変動を認めた。CFU-F は 2 日目に低下し、1 週目には増加し、5 週目にコントロールと同程度まで低下した後、20 週目では再び増加していた (図 5)。造血は血球系細胞と血球系細胞を支持する間質の細胞とで行われるため、この CFU-F の変動は低酸素飼育による無効造血の割合の変動と関係していると考えられた。

そのため、さらに骨髄細胞から RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて赤血球造血抑制因子とされる TNF- α 、および促進因子とされる GM-CSF、SCF、BMP-4 の各遺伝子の mRNA の相対定量を行った (図 5)。低酸素飼育開始後 12 時間から 2 日目に各遺伝子発現は増加し、1 週目ではコントロールレベルまで低下した。その後 SCF と BMP-4 は無効造血の割合が減少した 3 週目には増加しており、5 週目も増加した状態を維持していたため、無効造血の減少に SCF や BMP-4 が寄与している可能性が考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Tomonori HARADA, Isao TSUBOI, Yukio HIRABAYASHI, Kazuhiro KOSAKU, Michiko NAITO, Hiroyuki HARA, Tohru INOUE, Shin AIZAWA. Decreased “ineffective erythropoiesis” preserves polycythemia in mice under long-term hypoxia. *Clinical and Experimental Medicine*, 2014(in press). 査読有

岡村 浩人、平林 幸生、原田 智紀、古作 和寛、壺井 功、相澤 信。長期低酸素環境下におけるマウスモデルを用いた造血機構の検討。日大医学雑誌 72(5) ,2013 , p.266-273. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

原田 智紀、壺井 功、内藤 美智子、古作 和寛、原 弘之、井上 達、相澤 信。低酸素環境下飼育マウスの造血制御機構について。第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 3月 29日 2014年。栃木

Tomonori HARADA, Hiroto OKAMURA, Isao TSUBOI, Yukio HIRABAYASHI, Kazuhiro KOSAKU, Hiroyuki HARA,

Tohru INOUE, Shin AIZAWA. The decrease of ineffective erythropoiesis preserves polycythemia in mice with long-term hypoxic condition. The world congress of the international society for the mountain medicine, Nov. 3-6, 2012. 台北 (台湾) .

〔その他〕

ホームページ等

<http://anat2.med.nihon-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

原田 智紀 (HARADA, Tomonori)

日本大学・医学部・助手

研究者番号 : 00424721