

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650106

研究課題名(和文) 赤血球の変化は哺乳類の出現に關与するか？

研究課題名(英文) Enucleation of red blood cells was essential for the emergence of mammals(?)

研究代表者

松田 良一 (Matsuda, Ryoichi)

東京大学・総合文化研究科・教授

研究者番号：90165837

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)：脊椎動物の赤血球は哺乳類を除き、有核である。哺乳類の場合は赤血球分化の最終段階で脱核し、無核の細胞のみが抹消血を流れる。この無核赤血球が有核のものに比べてどのような違いがあるのか。それが、哺乳類の出現に關係していないか。この問いに答えるべく、有核と無核の赤血球の物性を原子間力顕微鏡(AFM)により検討した。その結果、無核の赤血球は有核のそれに比べ、ヤング率が低く、やわらかいに対し、有核赤血球は核の部分のヤング率が有意に高く、硬いことが分かった。しかし、有核赤血球も核から離れた部位では無核赤血球と同様、低いヤング率を示し、柔らかいことが分かった。従って、核の有無は赤血球の物性に大きく影響する。

研究成果の概要(英文)：The enucleation of red blood cells (RBCs) is a unique biological characteristic of mammals. However, the biological significance of enucleated RBCs remains unclear. We hypothesized that mammalian RBCs are enucleated in the final stage of erythropoiesis to create RBCs with the ability to pass through fine capillaries. Mammals require a network of dense capillaries with small diameters to ensure sufficient oxygen, nutrient, and heat exchange in tissues, and to maintain high metabolic organs, such as the brain and placenta. Results: Measurement of cell rigidity by AFM revealed that mouse RBCs were markedly less rigid than nucleated chicken and *Xenopus* RBCs, particularly in nuclear regions. We concluded that enucleated RBCs are more suitable than nucleated RBCs for passing through finer capillaries. Thus, the enucleation of RBCs may have been a key step in the development of the mammalian brain and placenta by providing these organs with a high rate of gas and nutrient exchange.

研究分野：発生生物学

キーワード：赤血球 細胞物性 原子間力顕微鏡 有核赤血球 無核赤血球

1. 研究開始当初の背景

哺乳類がいかにして誕生したのか？これは未解明の大問題である。哺乳類は1億5千万年前から6千5百万年前の白亜紀の間に出現したといわれている。哺乳類と鳥類は温血動物であるが哺乳類は高度な中枢神経系と胎生という大きな特徴を持つ。これが、寒冷化が進んだ時代に絶滅の危機を乗り越え、繁殖を保障する上で大きなメリットになったと考えられる。しかし、その高機能な脳と胎生をもたらした生物学的メカニズムの説明は全くない。一方、哺乳類の赤血球は核が無く、小さな円盤状であるが、他の脊椎動物の赤血球は有核で、大型な楕円形である。私は、哺乳類のさわだった特徴である赤血球の無核化と小型化とそれに伴う柔軟性の増加が大きな役割を果たしたと考えた。

2. 研究の目的

赤血球の無核化と小型化、柔軟性の増加は、より細い毛細血管内の通過を可能にし、より細い毛細血管が機能することで、中枢神経系など基礎代謝が活発な組織に酸素と栄養物を送り、老廃物の除去能や脳の冷却効率が増したこと、さらに、胎盤の形成を可能にしたからである。

3. 研究の方法

(1) 各種動物における赤血球の大きさ
各種動物における赤血球の大きさをデータブック「数値でみる生物学」(Flindt, R.著 シュプリングァー・ジャパン 2006年刊)と理科年表から、その長径と短径をプロットした。

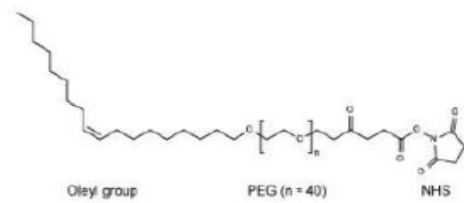
(2) マウスとニワトリの赤血球の $4\mu\text{m}$ と $7\mu\text{m}$ の流路通過能
エムシー社のマイクロ流路を用いて、マウスとニワトリの赤血球の $4\mu\text{m}$ と $7\mu\text{m}$ の流路通過能を調べた。

(3) 原子間力顕微鏡 (AFM) による赤血球物性の解析

生理食塩水中で赤血球をスライドガラス表面への固着

赤血球は浮遊性の細胞であるため、AFM で物性を測定するためには赤血球をスライドガラスなどの硬い基質の表面に固定する必要がある。当初、私は半乾きの状態にしてスライドガラスの表面に固着させて測定していたが、それでは液体中の赤血球の物性とは異なるため、正しい測定とは言い難い。そこで、紆余曲折の末、文献 Shimizu, Yら 2012) に従い、牛血清アルブミン (BSA) をコートしたスライドガラス上にさらに Biocompatible Anchor for Membrane (BAM; Sunbright OE-020CS) をコートした (図3)。

図1



BAM; Sunbright OE-020CS の分子構造。文献より。

BAM は長鎖構造をもち、その左側にオレイル基、右側には NHS エステル基を有する。

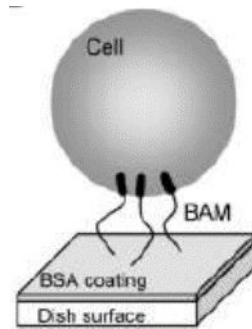


図2 BAM-BSA を介して細胞の基質への固定化。文献より。

BAM のオレイル基は赤血球膜に結合し、BAM の NHS エステル基が基質にコートしてある BSA の アミノ基に結合する。

これに適当に生理食塩水にて希釈したヘパリン血液を滴下し、ガラス表面に沈降させた。BAM のオレイル基は赤血球膜に結合し、BAM の NHS エステル基が BSA の アミノ基に結合することで、赤血球をスライドガラス上に液体条件下で固着させることに成功した。これにより、赤血球の基質への固定は半乾燥による方法より、より生理的な状態でその形状、硬さの測定が可能となった。

AFM による赤血球各部位のヤング率の測定

AFM は JPK 社の Nano Wizard AFM system (JPK Instruments) with Mode of Force Modulation Microscopy (FMM) を用いて、Quantitative imaging を行った。ヤング率は Force 曲線から Hertz Model から求めた。AFM 像は NanoWizard3 ultra (JPK Instruments AG, Berlin, Germany) と BL-AC40TS (Olympus, Tokyo, Japan) により構築した。Sader 法により、JPK SPM ソフトウェアを用いて、プローブの弾性率とカンチレバーの感度を算出した。

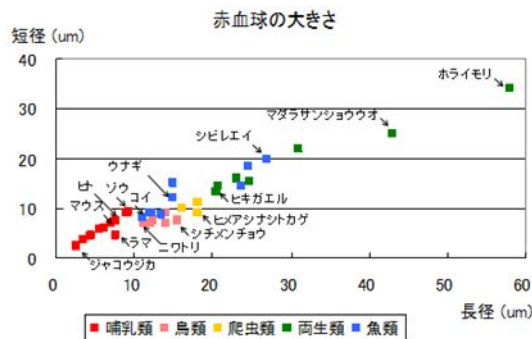
(4) 血液細胞の培養系における幹細胞化
ヘパリン採血したニワトリとマウスの血液を用い、RPMI1640 と DMEM (高グルコース) の 1:1 混合液に 10% になるように胎児牛血清

を加えた培養液で培養した。培養皿はゲラチンコートしたものをを用いた。これらの細胞を3週間以上にわたり培養を行い、10%ホルマリン in PBS を用い、室温 30 分間の固定後、0.5%トリトン X-100 in PBS でさらに 20 分間、処理してから幹細胞マーカーである Oct-4 の発現を蛍光抗体法により検討した。また、培養した細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて Oct-4 と Nanog の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 各種動物における赤血球の大きさ
各種生物データブックを用い、縦軸を赤血球の短径、横軸を長径としてプロットすると赤血球は両生類のものが一番大きく、哺乳類が一番小さいことが示された(図3)。

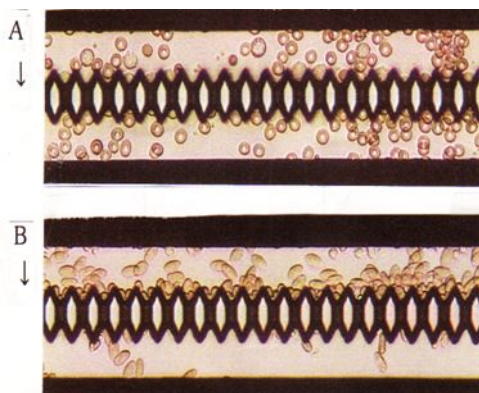
図3.



異なった動物における赤血球の形状の差違。

(2) マウスとニワトリの赤血球の 4 μ m と 7 μ m の流路通過能
7 μ m では差がなかったが、4 μ m ではマウス赤血球は問題なく通過できたのに対し、ニワトリの赤血球は流路通過が困難であった(図4)。これらの結果はマウスの赤血球はニワトリのそれより小さく柔軟で、より狭い毛細血管網の通過能が高いことを裏付けるものである。

図4.



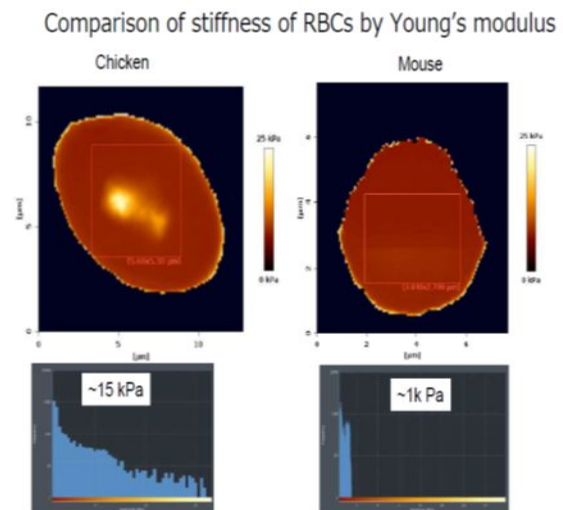
マウスとニワトリ赤血球を 4 μ m 幅のマイク

ロ流路に流した際の様子。
マウス(A)の赤血球は流路を通過できるが、ニワトリ(B)の赤血球は通過できず、流路の入り口にとどまり、明らかにマイクロ流路通過能がマウスのそれより低いことが分かった。

(3) AFM による赤血球各部位のヤング率の測定

有核であるニワトリの赤血球と無核のマウスの赤血球をスライドガラス表面に BAM 法により液滴中で固着させた。これは半乾燥法やポリ L-リジン法に比べ、容易かつ再現性も高く、AFM の水中サンプル固定法として極めて優れていることが分かった。ヤング率は有核の場合は、核の上領域が一番硬く(淡黄色で表示 ヤング率が高いことに注目)、周辺領域は柔らかい(茶色で表示)ことが分かった(図5)。

図5.



AFM によるニワトリとマウスの赤血球の形状と場所ごとの硬さ(ヤング率)の分布。

ニワトリ赤血球(左側上下)の中央部に見られる淡黄部分は赤血球の核の位置に相当する。核領域は硬く、細胞質領域は柔らかいことがわかる。マウスの赤血球(右側上下)は場所を問わず、やわらかいことを示している。

(4) 血液細胞の培養と幹細胞マーカーの出現。

種々の培養液による血液細胞に対する培養液の最適化を試みた。その結果、RPMI1640 と DMEM (高グルコース) の 1:1 混合液に 10% になるように胎児牛血清を加えた培養液が、血液細胞から最も多くの有核細胞を培養皿に付着させ、増殖させるのに有効であることが分かった。この培養液を用い、ゲラチンコートした培養皿でニワトリとマウスの血液細胞を培養し、その幹細胞化について検討した。

この培養液は、本研究で最適化することに

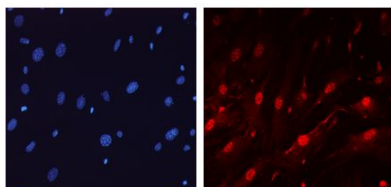
成功した。通常、血液細胞の培養に適した RPMI-1640 は細胞を培養基質に接着させないが、それに基質接着性の細胞の培養に適した DMEM を交ぜることで、両者の利点を生かしながら、血液細胞を基質に接着させて培養できる画期的な培養液となった。

培養血液細胞における幹細胞マーカーの発現。

この培養液でニワトリとマウスの血液細胞を 2 - 3 週間培養すると培養基質に接着する有核細胞が多数出現した。これらを幹細胞マーカーである Oct-4 に対する抗体で免疫染色したところ、図 6 に示すように培養条件下で基質に接着した有核細胞のほとんどが Oct-4 陽性であることが分かった。同様にニワトリの血液細胞を培養すると Oct-4 陽性の細胞が多数出現した (data not shown)。

図 6.

マウス 血液細胞 Oct-4



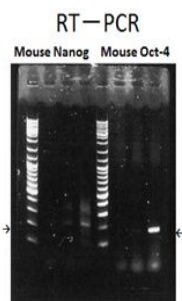
マウス血液由来細胞を培養して得た接着細胞の抗 Oct-4 抗体による免疫蛍光抗体法による染色像。左は Hoechst 33248 による核 DNA の染色像。

多くの細胞は Oct-4 陽性で転写因子 Oct-4 の核局在を示した。

RT-PCR 法による Oct-4 と Nanog の発現の検討。

さらに、Oct-4 と Nanog について調べた。下の写真は RT-PCR 産物のアガロースゲル電気泳動像 (図 7) を示す。

図 7.



RT-PCR 法による培養赤血球における幹細胞マーカー遺伝子の発現の検討。

尚、プライマーの塩基配列は以下の通り。

マウス Oct4EcoRIS

FW:ATGAATTCTGCTGGACACCTGGCTTC

RV:ATGAATTCTTAACCCCAAAGCTCCAG

マウス Nanog

FW:GTCTCGAGATGAGTGTGGGTCTTCC

RV:ATGCGGCCGCTCATATTTACCTGGT

ゲル両脇の矢印は Nanog (左) と Oct-4 (右) の PCR 産物の泳動位置を示す。RT-PCR の結果、マウスの血液細胞を培養すると幹細胞マーカーである Oct-4 (右) と Nanog (左) をコードした mRNA を発現することが分かる。

血液細胞の中で幹細胞マーカーを発現する細胞が多数現れることは、組織損傷を受けた部位で血液から幹細胞が供給される可能性を示している。今後、この細胞が組織修復や再生に寄与しているかを調べていく。これは、本研究から示された大きな成果の一つであると考えている。

<引用文献>

Mio R. and Phillips R. Cell Biology by the Numbers. Garland Science (2016)

Shimizu Y., Kihara T., Haghparast S.M.A., Yube S. and Miyake J. (2012) PloS one 7(3):e34305 (2012)

理科年表(2003) 丸善

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Shima A., and Matsuda R. (2015) Low culture temperature inhibits myogenic differentiation through mitochondrial activity. Zool. Sci. 32:129-134.

Wagatsuma A, Shiozuka M, Takayama Y, Hoshino T, Mabuchi K, and Matsuda R. (2015) Effects of ageing on expression of the muscle-specific E3 ubiquitin ligases and Akt-dependent regulation of Foxo transcription factors in skeletal muscle. Mol Cell Biochem. 2015 Nov 20. [Epub ahead of print] PMID:26590085

Ohashi, K., Nagata, Y., Wada, E., Zammit, P.S., Shiozuka, M., and Matsuda, R. Zinc promotes proliferation and activation of myogenic cells via the PI3K/Akt and ERK signaling cascade. Exp. Cell Res., 333:228-237(2015)

Kodaka Y. Tanaka K. Kitajima K.

Tanegashima K., Matsuda R., and Hara T. (2014) LIM homeobox transcription factor Lhx2 inhibits skeletal muscle differentiation in part via transcriptional activation of Msx1 and Msx2. *Exp. Cell Res.*331: 309-319.

Nagata Y, Ohashi K, Wada E, Yuasa Y, Shiozuka M, Nonomura Y, and Matsuda R. Sphingosine-1-phosphate mediates epidermal growth factor-induced muscle satellite cell activation! *Exp. Cell Res.*, 326: 112-124 (2014)

Wada E, Yoshida M, Kojima Y, Nonaka I, Ohashi K, Nagata Y, Shiozuka M, Date M, Higashi T, Nishino I, and Matsuda R. Dietary phosphorus overload aggravates the phenotype of the dystrophin-deficient mdx mouse. *Am. J. Pathol.*, 11: 3094-3104 (2014)

Polikanov YS, Szal T, Jiang F, Gupta P, Matsuda R., Shiozuka M, Steitz T, Vázquez-Laslop N, and Mankin AS Negamycin interferes with decoding and translocation by simultaneous interaction with rRNA and tRNA. *Mol. Cell*, 50: 1-10 (2014)

〔学会発表〕(計1件)

Enucleation of red blood cells may correlate to finer capillaries in mammalian tissues.

Matsuda R., Obataya I., Maeda Y., Mori M., Varhama K. and Takeuchi S. Annual meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego (2015)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松田 良一 (Matsuda Ryoichi)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：90165837