

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32650

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670657

研究課題名(和文) 骨髄の造血幹細胞ニッチ獲得機構の進化的解析による骨・造血相互作用の探索

研究課題名(英文) Evolutional investigation of the hematopoietic niches in bone marrow

研究代表者

山口 朗 (Yamaguchi, Akira)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00142430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本申請者は、カエルの骨髄では造血系細胞が骨表面に限局しているために、骨芽細胞性ニッチは構築されているが、血管性ニッチが構築されていないと考えた。そのため、本研究では進化の過程における骨芽細胞性ニッチの獲得機構を解析することを目的として研究を行い、以下の結果を得た。

1) アフリカツメガエル成体大腿骨では骨表面に限局して造血系細胞がみられた。2) 骨再生過程でも申請骨表面に沿って造血系細胞がみられた。3) 大腿骨皮質骨にはハバース管がなく、骨内外の血管の交通は極めて少なかった。4) アフリカツメガエルに5F-Uを投与して、骨表面の造血系細胞の動態を解析中。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic organs differed among aquatic and land animals. In mammals, there are two niches to maintain hematopoiesis in bone marrow, osteoblastic niche on bone surface and vascular niche around sinusoid vessels in bone marrow. We found that hematopoiesis is localized on the only bone surface in xenopus, suggesting that only osteoblast niche is developed in xenopus. These results prompted us to explore development of osteoblastic niche during vertebrate evolution. In the present study, we revealed the following findings. 1) Hematopoietic cell localized on only the bone surface of bone marrow. 2) During bone regeneration, hematopoiesis also occurred newly formed bone surface. 3) There are no definite Haversian canals in cortical bone, indication blood vessels communication between inside and outside of bone marrow i.e. very poor in Xenopus. 4) We are now investigating the changes in distribution of hematopoietic cells on bone surface after inject of 5-FU in Xenopus.

研究分野：骨・軟骨代謝学、造血学

キーワード：造血 骨芽細胞ニッチ アフリカツメガエル 進化

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の造血器官は進化の過程で大きな変遷を遂げてきた。水生動物である魚類の造血は腎臓・脾臓で行われ、両生類では脾臓・肝臓・腎臓・骨髄などが造血器官となる。そして、陸生動物である爬虫類では脾臓・骨髄が、鳥類では骨髄が主な造血器官となる。哺乳類では、マウスは骨髄以外に脾臓でも普通に造血が営まれているが、ヒトでは通常、造血は骨髄のみで行われている(病的には脾臓、肝臓で髄外造血が起る)。このように、脊椎動物の進化の過程では、上陸に伴って骨髄での造血を獲得し、我々ヒトの造血は骨髄に特化してきたと考えられる。

近年、骨髄で造血幹細胞を維持するための微小環境(造血幹細胞ニッチ)の研究が急速に進展している。造血幹細胞ニッチとして、骨表面で骨芽細胞を中心として構成される骨芽細胞性ニッチと骨髄内の類洞血管の内皮細胞を中心とした血管性ニッチが知られている。これらのニッチにより、骨髄では骨表面と骨髄腔で造血幹細胞が維持されている。そして、これらのニッチの大きな違いは、骨芽細胞性ニッチは血管性ニッチに比べて酸素濃度が低いことである。そのため、骨芽細胞性ニッチでは低酸素状態によりG0期の造血幹細胞が骨芽細胞表面で維持されているが、血管性ニッチでは高酸素状態により造血幹細胞の細胞周期が活性化されやすい。つまり、G0期の造血幹細胞は骨表面の骨芽細胞性ニッチから血管性ニッチに移動して増殖し、分化した細胞が内皮細胞をくぐり抜けて末梢血に入ると考えられている。しかし、このような巧みな造血幹細胞維持機構が脊椎動物の進化のどの段階で獲得されたのかは明らかにされていない。ヒトの骨・造血相互作用を理解するには、このような進化的な背景を基盤とした研究も有用であろう。

我々は、脊椎動物の進化における骨の形態と機能の変遷を解析する過程で、カエルの骨髄では、造血系細胞が骨表面に局在しており、骨から離れた部では脂肪組織で構成されていることに着目した(図1参照)。この現象は骨髄形成直後のオタマジャクシでもみられたので、カエルの骨髄では造血幹細胞の骨芽細胞性ニッチは獲得されているが、血管性ニッチが構築されていないのではないかと考え、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、脊椎動物の進化における造血幹細胞ニッチの獲得機構の一端を明らかにすることが学術的な特色・独創的な点である。本研究で原始的かつ根源的な骨芽細胞性造血ニッチのメカニズムを明らかにすることにより、それらを基盤としてヒトの正常骨髄における造血維持や造血系疾患の発症・病態と骨との関わりを新たな観点から探ることが可能となる。具体的には以下の点を明らかにすることを目的とする。

- ・ 魚類、カエル、マウス、ヒトの骨芽細胞様細胞の造血幹細胞支持能を明らかにする。
- ・ カエルの骨髄では骨芽細胞性ニッチが構築されているが、血管性ニッチが十分に構築できていないことを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、脊椎動物における造血幹細胞の骨芽細胞性ニッチと血管性ニッチの獲得機構を解析する。骨芽細胞性ニッチの解析：ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエルなどの骨より骨芽細胞様細胞を採取後、各動物の脾臓から採取した造血系細胞と共培養し、造血幹細胞の動態を解析する。アフリカツメガエルにPTHや5-FUを投与した場合や骨再生過程における骨表面の造血系細胞の動態を解析する。血管性ニッチの解析：血管を同定

する蛍光試薬 AngioSense と骨を同定する OsteoSense をアフリカツメガエルに投与して、骨と血管系の関連を解析する。アフリカツメガエルの脾臓より採取した血管系細胞を骨髄に、骨髄から採取した骨芽細胞を脾臓に移植し、これらの細胞周囲の造血系細胞の動態を解析する。以下に具体的な方法を記す。

- ・ 使用する動物：魚類（ゼブラフィッシュとキンギョ）、両生類（アフリカツメガエル）、哺乳類（マウス）。これらの動物から骨芽細胞様細胞を採取して、造血幹細胞維持機構（骨細胞性ニッチ）を有しているかを解析する。
- ・ ゼブラフィッシュの骨組織より骨芽細胞様細胞を採取する（Gen Comp Endocrinol. 172:107-114,2011 に準じて行う）。アフリカツメガエルでは、長管骨を摘出後、骨髄を flash-out し、骨表面の骨芽細胞様細胞を酵素消化法で採取する。マウスでは成長マウス骨髄から採取した骨芽細胞様細胞を用いる。
- ・ 上記動物の骨芽細胞様細胞培養系及び器官培養系に造血系細胞を添加して、in vitro のコロニー形成を解析して造血幹細胞維持機能を確認する。造血系細胞は、全ての動物の脾臓から採取する
- ・ マウスでは副甲状腺ホルモン(PTH)の投与により、骨芽細胞の PTH/PTHrP 受容体が活性化され、それらの細胞の Notch1 シグナルのリガンドである Jagged1 の発現が上昇し、造血幹細胞の数が増加することが報告されている（Nature 425:841-846,2003）。そのため、本研究ではアフリカツメガエルに human PTH(1-34)を投与し、大腿骨骨表面の造血細胞の動態を解析する。
- ・ マウスでは骨芽細胞性ニッチで維持されている造血幹細胞は静止期であることが報告されている。そのため、本研究ではアフリカツメガエルに BrdU を投与し、

骨表面の造血系細胞の細胞周期を解析する。また、マウスに抗がん剤 5-fluoro-uracil (5-FU)を投与すると、5-FU 耐性で Tie2 陽性の造血幹細胞が骨表面に局在することが報告されている(Cell 118:149-161,2004)ので、アフリカツメガエルに 5-FU を投与して、骨表面の造血系細胞の動態を解析する。

4. 研究成果

- 1) 魚類では骨髄がなく、腎臓、脾臓で造血が認められた。
- 2) アフリカツメガエル成体大腿骨では骨表面に限局して造血系細胞がみられた。脾臓、肝臓、腎臓でも造血が認められた。
- 3) ゼブラフィッシュからの骨芽細胞様細胞の採取を試みたが、効率良く細胞を採取するのが困難であった。アフリカツメガエルの大腿骨骨髄をフラッシュアウトし、骨髄に関して細胞の培養を行った。マウス骨髄からも同様に骨髄間質細胞の培養を行った。
- 4) アフリカツメガエル、マウス骨髄間質細胞に脾臓からの造血系細胞を添加して、共培養を行ったが、in vitro での造血系細胞の増殖に成功しなかった。
- 5) アフリカツメガエル大腿骨骨幹部に直径 2mm の円形骨欠損を作成し、経時的に同部を解析すると、骨再生過程でも申請骨表面に沿って造血系細胞がみられた。
- 6) ラットに PTH を間欠的に投与すると骨髄内の osterix 陽性の骨原性細胞の増加が認められた。
- 7) 大腿骨皮質骨にはハバース管がなく、骨内外の血管の交通は極めて少なかった。
- 8) アフリカツメガエルに 5F-U を投与して、骨表面の造血系細胞の動態を解析中。

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)

1. Ogura K, Iimura T, Makino Y, Sugie-Oya A, Shimomura A, Takao-Kawabata R, Ishizuya T, Moriyama K, Yamaguchi A: Parathyroid hormone facilitates osteogenesis differently in cancellous and cortical bones. *Bone Reports* 5:7-14,2016
2. 山口 朗: 種々の脊椎動物における骨細胞 / 骨細管系の形態学、**日本整形外科学会雑誌** 88:860-863, 2014
3. 山口 朗: 水性と陸生の脊椎動物の骨格の形態と機能から学ぶ骨代謝、*Olive: Osteo Lipid Vascular & Endocrinology*, 6:4-5,2016

〔学会発表〕(計2件)

1. 山口 朗: 脊椎動物の進化における骨格形成の変遷、第57回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム「象牙質の進化を探る」、2015年9月11日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟)
2. Yamaguchi A: Osteonetrork: its maintenance and destruction. Keynote speaker, The 19th Scientific Congress and Dental Exhibition of National Hospital of Odonto-Stomatology, Ho Chi Min City, Vietnam, 2015 May 15

〔図書〕(計0件)

〔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

山口 朗 (YAMAGUCHI, Akira)

東京歯科大学口腔科学研究センター客員教授

研究者番号: 00142430

(2) 連携研究者

飯村 忠浩 (IIMURA Tadahiro)

愛媛大学プロテオサイエンスセンター教授

研究者番号: 20282775

(3) 連携研究者

坂本 啓 (SAKAMOTO Kei)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔病理学分野講師

研究者番号: 00302886