

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06832

研究課題名(和文) 成長板を発生起点とする骨髄造血ニッチ形成メカニズムの解析

研究課題名(英文) Developmental contribution of growth plate-derived hedgehog signal-responsive cells in bone marrow development

研究代表者

原口 竜摩 (Haraguchi, Ryuma)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00423690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血液の主たる供給源となる造血幹細胞は、骨髄間質の造血幹細胞ニッチにより支持される。それを構成する細胞成分、分子特性及びニッチ機能を担保する分子が同定される一方で、造血ニッチの発生そのものに焦点を当てた研究は大きく立ち遅れている。本研究では、Genetic Lineage Tracing法を用いて成長板軟骨からの作用を受けた特定の細胞系列を可視化・追跡・単離し、それらが造血に資する造血幹細胞ニッチを構成する細胞系列に特化することを、分子特性および細胞機能の両面において実験的に証明する。その研究成果により、骨髄に存在する造血幹細胞ニッチの発生プロセスの全容解明に向けた基盤確立を試みる

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄は、白血病、多発性骨髄腫、再生不良性貧血などの難治性造血器疾患の罹患臓器であるが、これまで造血幹細胞を含む血液細胞を主体とした研究がなされてきた。しかし、近年の造血幹細胞を支持する非血液細胞(ニッチ)の同定により、造血器疾患における造血ニッチの関与が注目され始めている。本研究の遂行により得られた成果は、未だに未知の難治性造血器疾患の発症機序解明や造血ニッチを標的とする新しい視点からの治療法確立などに貢献する可能性があり、学術のみならず社会への波及効果も強く期待される。

研究成果の概要(英文)：Longitudinal bone growth progresses by continuous bone replacement of epiphyseal cartilaginous tissue, known as "growth plate", produced by columnar proliferated- and differentiated-epiphyseal chondrocytes. The endochondral ossification process at the growth plate is governed by paracrine signals secreted from terminally differentiated chondrocytes (hypertrophic chondrocytes), and hedgehog signaling is one of the best known regulatory signaling pathways in this process. To investigate the developmental relationship between longitudinal endochondral bone formation and osteogenic progenitors under the influence of hedgehog signaling at the growth plate, genetic lineage tracing was carried out with the use of Gli1CreERT2 mice line. Our results show an evidence of the developmental contribution of endochondral progenitors under the influence of epiphyseal chondrocyte-derived secretory signals in bone marrow formation.

研究分野：発生生物学

キーワード：成長板 組織系譜解析 ヘッジホッグシグナル 造血ニッチ 骨髄

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成体の大部分の血液細胞を骨髄中の造血幹細胞が供給するが、骨髄内には同様にそれを支持する特殊な微小環境(ニッチ)が存在する(Zang et al., 2003 Nature; Sugiyama et al., 2006 Immunity; Omatsu et al., 2014 Nature)。それらは骨髄間質を構成する非血球系の細胞であり、分子特性、細胞機能およびその機能発現に必須となるニッチ因子が解明されつつあるが、将来骨髄において造血幹細胞ニッチとなる前駆細胞が、発生段階のいかなる細胞系列に属するのか、その発生起源についての研究は未だ立ち遅れた状態にあった。

2. 研究の目的

骨の発生は、出生から成体に至る長い時間軸でダイナミックに進展する。申請者が解析手法の軸とする Genetic Lineage Tracing (GLT)法は、遺伝的に恒久化されたレポーター発現で細胞を識別するため、対象細胞が如何なる変化を起こそうとも、生体内での長期的な追跡が可能である。本研究の目的は、成長板由来の細胞系譜に着目した独自の研究アプローチで造血ニッチの発生基盤の解明を試みることにある。

3. 研究の方法

成長板軟骨から作用を受けた特定の細胞(Hhシグナル受容細胞)が、造血幹細胞ニッチの発生起源であることを、成長板由来の細胞集団に着目したGLT法をベースとする組織系譜解析によって明らかにする。特に、1)成長板由来の細胞に連なる細胞系列が造血ニッチにコミットする際の組織系譜とその細胞特性は？ 2)それらは造血に資する機能を有しているか？ 3)それらを造血ニッチの細胞系列へと選択的に分化させる分子カスケードは？1)~3)の以上3つのポイントを、本研究課題のspecific aimとした実験計画を立案・遂行した。(実験計画1) 成長板由来のHhシグナルを受容した細胞が、骨髄中の造血ニッチの構築に組み込まれる発生経路を、GLT法によって細胞系譜地図を作製し、精査する。(実験計画2) 骨髄に分布する成長板由来の細胞を遺伝的に除去(細胞ノックアウト法)することで、その造血システムにおける重要性を生体レベルで明らかに

する。(実験計画3) 骨髄間質に寄与する細胞系列での遺伝子発現解析を行い、それらをニッチ機能の発現に関わる既知の分子経路と照合・包括的に理解する。

4．研究成果

本研究課題の目的は、成長板軟骨から作用を受けた特定の細胞(Hhシグナル受容細胞)が、造血幹細胞ニッチの発生起源であることを、成長板由来の細胞集団に着目したGLT法をベースとする組織系譜解析によって調べることであった。その結果、成長板由来のHhシグナル受容細胞が骨髄中に長期間存在しうることを、fate mapping analysisにより確認した。また、大部分の標識細胞が、造血系細胞の近傍に局在することも判明した。これらの研究結果の一部を、国際学術雑誌に責任著者として報告した。また、成長板由来のHhシグナル受容細胞において、Hhシグナルの発現修飾を行ったところ、特にHhシグナルが過剰に活性化された状態では、長管骨内で脂肪髄化が亢進することが明らかになった。さらに、成長板由来のHhシグナル受容細胞特異的なジフテリア毒素受容体(DTR)強制発現系を応用した選択的細胞ノックアウト法を遂行し、その結果、Hhシグナルが過剰に活性化された時と同様、長管骨内で脂肪髄化が亢進することがわかった。これらの研究成果の一部を、全国学会(日本骨代謝学会)において報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Haraguchi Ryuma, Kohara Yukihiro, Matsubayashi Kanako, Kitazawa Riko, Kitazawa Sohei	4. 巻 in press
2. 論文標題 New insights into the pathogenesis of diabetic nephropathy: proximal renal tubules are primary target of oxidative stress in diabetic kidney	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta histochemica et cytochemica	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kohara Yukihiro, Haraguchi Ryuma, Kitazawa Riko, Kitazawa Sohei	4. 巻 523
2. 論文標題 Knockdown of Lrp1 in RAW264?cells inhibits osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast interactions in?vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 961 ~ 965
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.01.065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hyuga Taiju, Alcantara Mellissa, Kajioka Daiki, Haraguchi Ryuma, Suzuki Kentaro, Miyagawa Shinichi, Kojima Yoshiyuki, Hayashi Yutaro, Yamada Gen	4. 巻 21
2. 論文標題 Hedgehog Signaling for Urogenital Organogenesis and Prostate Cancer: An Implication for the Epithelial?Mesenchyme Interaction (EMI)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 58 ~ 58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21010058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Haraguchi, Kitazawa, Kohara, Ikedo, Imai, Kitazawa	4. 巻 20
2. 論文標題 Recent Insights into Long Bone Development: Central Role of Hedgehog Signaling Pathway in Regulating Growth Plate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5840 ~ 5840
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20235840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kitazawa Sohei, Haraguchi Ryuma, Kohara Yukihiro, Kitazawa Riko	4. 巻 52
2. 論文標題 Modulation of α 3 Integrin via Transactivation of α 3 Integrin Gene on Murine Bone Marrow Macrophages by 1,25(OH) $_2$ D $_3$, Retinoic Acid and Interleukin-4	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 77 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.19015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kitazawa Riko, Kinto-Shibahara Satomi, Haraguchi Ryuma, Kohara Yukihiro, Kitazawa Sohei	4. 巻 515
2. 論文標題 Activation of protein kinase C accelerates murine osteoclastogenesis partly via transactivation of RANK gene through functional AP-1 responsive element in RANK gene promoter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 268 ~ 274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.05.144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kitazawa S, Haraguchi R, Kitazawa R.	4. 巻 150(1)
2. 論文標題 Morphology-oriented epigenetic research.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 3-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-018-1675-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsushita S, Suzuki K, Murashima A, Kajioka D, Acebedo AR, Miyagawa S, Haraguchi R, Ogino Y, Yamada G.	4. 巻 15
2. 論文標題 Regulation of masculinization: androgen signalling for external genitalia development.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Reviews Urology	6. 最初と最後の頁 358-368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41585-018-0008-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 北澤莊平、木谷彰岐、原口竜摩、北澤理子.	4. 巻 38
2. 論文標題 骨巨細胞腫の病態と治療修飾	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 愛媛医学	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 原口竜摩、松林加那子、北澤理子、北澤莊平
2. 発表標題 近位尿細管に注目したストレプトゾトシン誘導性糖尿病腎の病態組織学的考察
3. 学会等名 第108回 日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原口竜摩、小原幸弘、今井祐記、北澤理子、北澤莊平
2. 発表標題 ヘッジホッグシグナル調節因子Hhipの骨形成過程における役割
3. 学会等名 第37回 日本骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原口竜摩、小原幸弘、松林加那子、北澤理子、北澤莊平
2. 発表標題 ストレプトゾトシン誘導性糖尿病腎における腎尿細管に注目した病理組織学的考察
3. 学会等名 第60回 日本組織細胞化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuma Haraguchi, Riko Kitazawa, Yuuki Imai, Sohei Kitazawa
2. 発表標題 Developmental contribution of growth plate-derived hedgehog signal-responsive cells in growing bone
3. 学会等名 ASBMR 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原口竜摩、北澤理子、北澤荘平
2. 発表標題 成長板に由来するヘッジホッグシグナル受容細胞の骨格発生における役割
3. 学会等名 第107回 日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原口竜摩、北澤理子、今井祐記、北澤荘平
2. 発表標題 成長板を発生起点とするヘッジホッグシグナル受容細胞の骨格形成への関与
3. 学会等名 第36回 日本骨代謝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原口竜摩、北澤理子、北澤荘平
2. 発表標題 ヘッジホッグシグナルを介する成長板を発生起点とした骨格形成の理解
3. 学会等名 第59回 日本組織細胞化学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------