

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20367

研究課題名(和文)重症貧血マウスに形成された新規造血器官の形態及び機能解析

研究課題名(英文)The morphological and functional study of the newly discovered hematopoietic structure induced in a severely anemic mouse model.

研究代表者

大塚 裕忠(Otsuka, Hirotada)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：30634844

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)：申請者らは骨吸収抑制剤である窒素含有型ビスホスホネート(NBP)を用いた独自の手法で、重症貧血マウスモデルを確立した。同マウスモデルでは、末梢血中に有核赤血球が出現し、腹腔内に新規の赤血球造血構造体が形成されていた。

この未知の造血器官の機能形態学的特徴を解析したところ、盛んに赤血球造血を認めるとともに、造血前駆細胞が確認された。また、造血関連因子の発現も確認された。さらに、末梢血中の造血前駆細胞の動態の解析したところ、NBP投与時から、末梢血中の造血前駆細胞の増加が確認された。この現象にはG-CSFが関与している可能性が示された。本研究では髄外造血の新たな機序解明へとつながる成果を得られた。

研究成果の概要(英文)：Our previous study established a severely anemic mouse model that was treated with a combination of Nitrogen-containing bisphosphonate (NBP) with phenylhydrazine (PHZ), which induced newly discovered hematopoietic organs in the omentum. We characterized the structures and factors related to the formation of these new organs. Some hematopoietic cells, including megakaryocytes, and well-developed sinuses were observed in these structures. Numerous erythroblasts and c-kit-positive hematopoietic progenitor cells (HPCs) were detected, and mRNAs related to hematopoiesis were expressed in these structures. The levels of G-CSF in the serum and HPCs in the peripheral blood were increased in the severely anemic mouse model. These results suggest that the induced hematopoietic structures act as the sites of erythropoiesis and that NBP-induced G-CSF production causes HPC mobilization thus, the newly discovered hematopoietic structure in this study might be formed.

研究分野：組織学、解剖学、発生学

キーワード：新規造血構造体 髄外造血 窒素含有型ビスホスホネート GCSF

1. 研究開始当初の背景

申請者らは骨吸収抑制剤である窒素含有型ビスホスホネート (NBP) を用いた独自の手法で、重症貧血マウスモデルを確立した。同マウスモデルでは、末梢血中に有核赤血球が出現し、腹腔内に新規の赤血球造血構造体が形成されていた。これまで重症貧血動物に新規造血器官の誘導例はなく、マウスにおける類似構造の報告もない。

2. 研究の目的

本研究は、この未知の造血器官の機能形態学的特徴を解明することを目的とし、新規造血内における造血細胞及び支持細胞の局在性を解析する。さらに、末梢血中の造血前駆細胞の動態の解析、腹腔内における造血支持細胞の同定、形成に關与するサイトカインの同定等、造血微小環境を解析し、新規造血構造形成の機序を解明する。これらの結果は、造血の可塑性を提供する重要なデータである。

3. 研究の方法

脾臓摘出を実施したマウスに NBP を投与し、骨髓内における赤血球造血を抑制した後、溶血性貧血誘導剤であるフェニルヒドラジンを投与し、重症貧血を誘導した。これらの処置を行ったマウスについて、血液、大網組織及び腹腔内に形成された新規造血構造体を採取した。血液については、ヘマトクリット値の測定、血清中のサイトカイン測定及び造血前駆細胞数の計測を行い、大網及び新規造血構造については、形態学的解析のための固定あるいは mRNA 抽出を行った。形態学的解析としては、赤芽球系、顆粒球系、造血前駆細胞などのマーカーを用いた免疫組織化学を実施したほか、電子顕微鏡による超微細構造の解析を実施した。また抽出した mRNA については、RT-PCR 法を用いて、造血に關連するサイトカインの発現について解析を行っ

た。

4. 研究成果

この未知の造血器官の機能形態学的特徴を解析したところ、発達した洞様毛細血管と造血細胞、リンパ濾胞様の構造が確認された。観察されたリンパ濾胞様の構造は、B リンパ球によって構成されているのではなく、赤芽球によって構成されており、盛んな赤芽球増殖も確認された。このことは、新規造血構造体が、脾臓等の既存の組織とは異なる形態学的特徴を有していることを示している。さらに、新規造血構造体内では、造血前駆細胞が確認されるとともに、SCF などの造血関連因子の発現も確認された。また、この髓外造血器官の生成機序を明らかにするため、末梢血中の造血前駆細胞の動態の解析したところ、NBP 投与時から、末梢血中の造血前駆細胞の増加が確認された。造血前駆細胞の動態については、血清 G-CSF 濃度の変化と相関性が確認された。

さらに、新規造血構造体形成部位である大網では、貧血を誘導することで、赤芽球コロニーの形成が確認されるようになり、SCD-1 など造血に關連するサイトカインの発現も確認された。

以上の結果から、新規造血構造体は赤血球造血の場を提供する構造物であり、既存の臓器とは異なる構造物であることが示された。これらの形成機序については不明な部分も多いが、NBP 投与に伴う GCSF 濃度の上昇と大網における造血微小環境の適合により、誘導された可能性が考えられた。

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 5 件)

1. Tetsutaro Yamaguchi, Kazuyoshi Hosomichi, Keisuke Yano, Yong-II Kim, Hirofumi Nakaoka, Ryosuke

Kimura, Hirotsada Otsuka, Naoko Nonaka, Shugo Haga, Masahiro Takahashi, Tatsuo Shirota, Yoshiaki Kikkawa, Atsushi Yamada, Ryutaro Kamijo, Soo-Byung Park, Masanori Nakamura, Koutaro Maki, Ituro Inoue. Comprehensive genetic exploration of selective tooth agenesis of mandibular incisors by exome sequencing. Hum Genome Var. February 2017 published (online). 査読有り

2. Zhiqian Yu, Hiroko Saito, Hirotsada Otsuka, Yosuke Shikama, Hiromi Funayama, Mai Sakai, Shigeo Murai, Masanori Nakamura, Takashi Yokochi, Haruhiko Takada, Shunji Sugawara, Yasuo Endo. Pulmonary platelet accumulation induced by catecholamines: its involvement in lipopolysaccharide-induced anaphylaxis-like shock. International Immunopharmacol. 43: 40-52. 2017. 査読有り

3. Hirotsada Otsuka, Hideki Yagi, Yasuo Endo, Satoshi Soeta, Naoko Nonaka, Masanori Nakamura. Nitrogen-containing bisphosphonate induced a newly discovered hematopoietic structure in the omentum of an anemic mouse model by stimulating G-CSF production. Cell & Tissue Res. 367(2): 297-309. 2017. 査読有り

4. Hiroshi Arai, Hirotsada Otsuka, Jiro Takito, Hideki Yagi, Satoshi Inoue, Nobuaki Yanagisawa, Naoko Nonaka, Yasuo Endo, Masanori Nakamura. Effect of minodronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, on collagen-induced arthritis in mice. Cellular Immunol. & Immunotherap. 1: 1-7. 2016 . 査読有り

5. Hirotsada Otsuka, Jiro Takito, Yasuo Endo, Hideki Yagi, Satoshi Soeta, Nobuaki Yanagisawa, Naoko Nonaka, Masanori Nakamura. The expression of embryonic globin mRNA in a severely anemic mouse model induced by treatment with nitrogen-containing bisphosphonate. BMC Hematol. 16: 4-16. 2016. 査読有り

〔学会発表〕(計 2件)

1. 大塚裕忠, 中村雅典. 重症貧血マウスモデルの大網組織における造血関連因子の解析. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3.29, 長崎大学(長崎県・長崎市)

2. 大塚裕忠, 中村雅典. 窒素含有ビスホスホネートを用いた重症貧血マウスモデルにおける新規造血構造誘導機構の解析. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会 2016.3.28, 福島ビックパレット(福島県・郡山市)

〔図書〕(計 1件)

1. 大石元治, 大塚裕忠, 佐々木悠, 鈴木武人, 塚本篤土, 松井利康. 第8章内分泌系, 第10章感覚器系. ビジュアルで学ぶ伴侶動物解剖生理学. 浅利昌男, 大石元治監修. 緑書房, 150-161, 182-194, 2015

〔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:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
大塚裕忠 (Hirotsada Otsuka)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：30634844

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：