

令和 元年 5 月 26 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17089

研究課題名(和文)重症貧血マウスモデルにおける新規造血構造体誘導機構の解明

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)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：30634844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：窒素含有型ビスホスホネート(NBP)とフェニルヒドラジン(PHZ)を脾臓摘出マウスに投与したところ、マウスは重篤な貧血を呈し、血清EPO濃度の上昇が認められた。骨髄において、NBP投与1日後から造血前駆細胞が一過性に減少し、これと一致して造血前駆細胞の末梢組織動員に関係するサイトカインであるG-CSFの血清濃度の上昇が認められた。

NBPIはG-CSF産生を刺激し、末梢血中への造血前駆細胞動員を増加することで、髄外造血を誘導することが示唆された。さらに本モデルでは、末梢中へ動員された前駆細胞が大網組織に定着・増殖することで、新規の造血器官を形成したと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、窒素含有型ビスホスホネートによる髄外造血誘導の機序を一部解明することが出来た。このことは、これまでに報告されている窒素含有型ビスホスホネートの副作用の解明や予防へつなげる可能性があり、基礎研究のみならず、臨床における適用上の可能性をしめすものである。また、大網については、不明な点が多く、本研究において、造血微小環境を有している可能性やそれ以外のサイトカイン類の発現も示したことは、機能解明へつなげることが可能である。

研究成果の概要(英文)：The treatment with a combination of NBP with phenylhydrazine (PHZ) induced severely anemia in mouse in association with serum EPO increase. The levels of G-CSF in the serum and HPCs in bone marrow decrease in same time whereas the peripheral blood were increased in the severely anemic mouse model. TER119-positive nucleated cells were observed in the capillary of omentum in severely anemic mice. These results suggest that the induced hematopoietic structures act as the sites of erythropoiesis and that NBP-induced G-CSF production causes HPCs mobilization, thus the newly discovered hematopoietic structure in this study might be formed.

研究分野：組織学

キーワード：新規造血構造体 G-CSF Histidine decarboxylase 窒素含有型ビスホスホネート

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨吸収抑制剤である窒素含有型ビスホスホネート (NBP) は、癌の骨転移予防等を含め、臨床的に広く用いられている。しかしながら、近年歯科領域における顎骨壊死やリウマチ性関節炎を重篤化させる可能性も示唆されている。

申請者らは、NBP が造血系に与える影響について研究を進めており、NBP が造血支持細胞である骨髄マクロファージを駆逐することで、骨髄内赤血球造血を抑制することを発見した。脾臓摘出マウスに NBP を投与し骨髄内赤血球造血を抑制した上で、フェニルヒドラジン (PHZ) を投与し溶血性貧血を誘導することで、PHZ 単独投与による貧血よりも極めて重篤な貧血を呈するマウスモデルの確立に成功した。さらに本貧血モデルにおいて、腹腔内に直径 0.5~2.0mm の新規構造物を発見した。この構造物について組織学的解析を実施した結果、被膜に覆われた充実性の器官であり、骨髄様の造血細胞や巨核球などが確認された。これらの形態学的特徴は、リンパ節や脾臓と異なっており、マウスにおいて全く未知の新規造血構造物である。

2. 研究の目的

申請者らの重症貧血モデルで出現したような新規造血構造体については、これまでに報告がなく、本構造体の形態学的解析及び形成過程と形成における微小環境の解明を目的とした。

3. 研究の方法

新規造血構造誘導機構の解析を中心に重症貧血マウスにおける新規造血構造の経時的な形態学的変化の解析として重症貧血誘導時から、新規造血構造体好発組織である大網を採取し免疫染色や透過型電子顕微鏡による解析を実施した。さらに新規造血構造誘導におけるサイトカイン発現の解析のために、継時的に大網を組織し、発現するサイトカインについて、mRNA レベルでの解析を実施した。

4. 研究成果

1) 重症貧血マウスモデルにおける造血前駆細胞動態の解析

窒素含有型ビスホスホネート (NBP) とフェニルヒドラジン (PHZ) を脾臓摘出マウスに投与したところ、マウスは重篤な貧血を呈し、血清 EPO 濃度の上昇が認められた。骨髄において、NBP 投与 1 日後から造血前駆細胞が一過性に減少し、これと一致して造血前駆細胞の末梢組織動員に関係するサイトカインである GCSF の血清濃度の上昇が認められた。また、大網の毛細血管内において、TER119 の有核細胞が血管内に確認された。

2) 新規造血構造体形成における微小環境の解析

本研究の重症貧血マウスモデルにおいて、腹腔内に新規造血構造体が形成されることはすでに報告しているが、その形成部位は主として大網である。申請者は重症貧血マウスの大網から RNA を抽出し、コントロール群の大網 RNA と発現サイトカインについて比較した。その結果、重症貧血マウスモデルの大網では、SCF, IL3, GCSF や Histidine decarboxylase などの造血に関係するサイトカイン類の上昇が確認された。また、造血前駆細胞の定着に関係する SDF1 の発現が恒常的に確認出来た。

以上の結果から、NBP は GCSF 産生を刺激し、末梢血中への造血前駆細胞動員を増加することで、髄外造血を誘導することが示唆された。さらに本モデルでは、末梢中へ動員された前駆細胞が大網組織に定着・増殖することで、新規の造血器官を形成したと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6件)

1) Inoue S, Otsuka H, Takito J, Nakamura M. Decisive differences in the bone repair processes of the metaphysis and diaphysis in young mice. Bone Rep. 8, 1-8, 2017. (査読: 有)

2) Takito J, Otsuka H, Inoue S, Kawashima T, Nakamura M. Symmetrical retrograde actin flow in the actin fusion structure is involved in osteoclast fusion. Biol Open. 6, 1104-1114, 2017. (査読: 有)

3) 大塚裕忠, 中村雅典. 新規造血構造の機能形態学的特性. 月刊「細胞」. 49(4); 47-51, 2017. (査読: 有)

4) Hirotsuda Otsuka, Sosta Satoshi, Hideki Yagi, Yasuo Endo, Masanori Nakamura. New experimental anemic model by using a nitrogen containing bisphosphonate. Annals of Nutritional Disorders & Therapy, 4(2); 1-5, 2017. (査読: 有)

5) Tetsutaro Yamaguchi, Kazuyoshi Hosomichi, Keisuke Yano, Yong-Il Kim, Hirofumi Nakaoka, Ryosuke Kimura, Hirotsuda 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. Human Genome Variation, February 2017 published (online). (査読:有)

6) 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 Immunopharmacology, 43: 40-52, 2017. (査読:有)

〔学会発表〕(計 8件)

1) 大塚裕忠, 角山優輔, 遠藤康男, 大津浩, 中村雅典, 添田聡. ヒスタミン欠損マウスにおける造血・リンパ性器官の形態学的研究. 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2019

2) 大塚裕忠. 室素含有型ビスホスホネートを用いた重症貧血マウスモデルの確立及び同モデルにおける造血動態の解析. 第347回昭和大学学士会招待講演. 2018

3) 藤川芳織, 井上知, 滝戸次郎, 大塚裕忠, 中村雅典. マウス創傷治癒過程における局所的マクロファージ除去の影響. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2018

4) 井上知, 藤川芳織, 大塚裕忠, 中村雅典. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2018

5) 大塚裕忠, 添田聡, 大津浩, 中村雅典, 尼崎肇. 大塚裕忠, 添田聡, 大津浩, 中村雅典, 尼崎肇. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2018

6) 井上知, 大塚裕忠, 中村雅典. 肩甲骨および頭蓋骨における骨修復過程の比較. 第105回日本解剖学会関東支部学術集会. 2017

7) S Inoue, H Otsuka, M Nakamura. Difference between bone repair process in scapula and calvaria. 65th Annual Meeting of the Japanese Association for Dental Research. 2017

8) 大塚裕忠, 中村雅典. 新規造血構造体形成時における大網組織造血微小環境の解析. 第29回日本比較免疫学会. 2017.

〔図書〕(計 0件)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中村雅典

ローマ字氏名：Masanori Nakamura

研究協力者氏名：八木秀樹

ローマ字氏名：Yagi Hideki

研究協力者氏名：遠藤康男

ローマ字氏名：Endo Yasuo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。