

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591408

研究課題名(和文)サーカディアンリズムによる造血制御システムの解明

研究課題名(英文)Analysis of hematopoietic regulation system by circadian rhythm

研究代表者

高久 智生(Tomoiku, Takaku)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20408256

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)：本研究においては、中枢および末梢神経組織に豊富なNeuron specific beta3 Tublin抗体を用いてマウス骨髄内神経組織の可視化を行い成功した。しかし、組織の密度は血管に比して予測よりも極度に少なく、神経ネットワークを形成するには十分では無いと考えられた。また、2および3アドレナリンを介した造血細胞/血液細胞への交感神経支配の影響を検証を行った結果、ほぼ全ての血球細胞が定常状態ではアドレナリンに対するレセプターを発現しておらず、刺激薬による刺激を行った後に解析を行うも、刺激前と同様にレセプターの発現を認めず、アドレナリンの影響下にはない事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Hematopoiesis thought to receive the control by the sympathetic nerve network, we employed 3D imaging method for analyze this interaction. Central and peripheral nerve tissues were stained with neuron specific beta3 tublin antibody and succeeded to reveal the structure thought to be the nervous system in mouse bone marrow. However, there was extremely less density of a depicted organization than a prediction, and it was not enough quantity to form a nerve network although a part of nerve fiber ran parallel to blood vessel. Next, we investigate the influence of beta 2 and beta 3 adrenalin on HSCs and blood cells, which released from sympathetic nerve. Flow cytometry analysis showed almost all blood cells did not express receptor for adrenalin by the steady state. Furthermore, we investigated about the possibility of each adrenalin receptor express in the activated state after the stimulation, there were no expression of the receptor.

研究分野：Hematopoietic niche

キーワード：Hematopoietic niche Circadian rhythm Neuron niche

1. 研究開始当初の背景

サーカディアンリズムとは、24 時間周期で変動する生理現象を示しており、“概ね一日” という意味である。サーカディアンリズムにより、生物は生態を維持する為に必要とされる生理学的ニーズをあらかじめ予測し、かつその生理機能を調節している。この事は、細菌から高等生物に至るまで脈々と引き継がれており、環境適応という面において非常に大きな利点となっている。例えば、光刺激は網膜により検知され、睡眠、ホルモン分泌、細胞周期、そして免疫機構に至るまで様々な影響を及ぼし、サーカディアンリズムを日中のサイクルに変える。サーカディアンリズム自体は、*Bmal1, Clock, Npas2* などの clock genes と呼ばれる遺伝子群によって司られ、それらの遺伝子群が一つのフィードバックループを形成、そのループはおよそ 24 時間周期で完結する (Reppert SM, et al. Nature 2002; 418:935-941)。それぞれの遺伝子発現は、リン酸化、ユビキチン化やクロマチンリモデリング等の様々な転写、翻訳機構により制御されており、生態リズムを統制している視神経交差上核 (supra chiasmatic nucleus, 以下 SCN と記す) とは関係なく、末梢組織のオシレーターと呼ばれる感知組織と階層的かつ直接的につながっている。そして、実際の分布としては、生態内のほとんどの細胞が clock genes を発現しており、遺伝子のおよそ 10% が clock-control genes で構成されていると考えられている (Cuninkova, et al. Ann N Y Acad Sci 2008; 1129:358-370)。

これらの clock genes の発現は HSCs を含む骨髄細胞でも確認されているが、実際の造血への影響は未だ明らかになっておらず、骨の中に存在し外界よりは隔絶された環境に有るにもかかわらず、造血臓器である骨髄は上記の様々な機構によりこの影響下からは逃れられていない可能性が高く、実際にサーカディアンリズムの変動が DNA の合成とコロ

ニー形成能に影響するであろう事は human および mouse いずれにおいても報告されている (Smaaland R, et al. Blood 1992; 79:2281-2287)。特に Human では、正午過ぎの時間帯 (暗所から明るい環境への移行後 5~6 時間後) のコロニー形成能および DNA 合成が最も活発であることから、これらがサーカディアンリズムに一致している可能性が高い事が報告されており、この時間帯に採取された骨髄中の CD34 陽性細胞数は低値時と比して 6 倍も高値である (Abrahamsen JF, et al. Eur J Haematol 1998; 60:7-15)。また、自律神経の一種である交感神経は、血中および尿中のアドレナリンを伝達物質としその日内変動により活性が変化することから、交感神経はサーカディアンリズムによる制御機構の一部である (Linsell CR, et al. J Clin Endocrinol Metab 1985; 60:1210-1215) と考えられている。これらの報告を総合すると、骨髄中の HSCs の遊走、増殖、分化の制御システムにおける、交感神経伝達物質のアドレナリンを介したサーカディアンリズムによる調節機構の存在が推定される。しかし、これらのシステムの存在はあくまでも間接的な事象より推定されたことであり、現状では骨髄内の神経組織自体およびこのメカニズムの存在を直接的な方法を用い証明する試みは未だ行われていない。そこで本研究では造血における神経組織の役割とそのメカニズムの可視化をマウスモデルを用いて試みた。

2. 研究の目的

骨髄における造血は、血流中の可溶性ファクターおよび自律神経によって厳格に制御されており、その生理学的作用過程は決して一様ではなく、むしろ日内変動により非常に多彩である。また近年、造血幹細胞 (Hematopoietic stem cells、以下 HSCs と記す) の遊走、増殖、分化において、生態学的な体内時計が関与している事が報告され

ている (Ferrer SM, et al. Nature 2008; 452:442-447)。そこで、本研究では骨髄内の神経組織の走行、および生態内のサーカディアンリズムを司る交感神経に注目し、3 アドレナリン受容体を介したHSCsの制御機構を、共焦点顕微鏡およびソフトウェアを用いて解析した。

3. 研究の方法

第1段階として、中枢および末梢神経組織に豊富な Neuron specific beta3 Tublin に対する抗体を用い骨髄内の神経組織の可視化を試る。次に12時間ごとに繰り返す明所と暗所での飼育することで mouse に明暗の規則的なリズムを作り、生体内のサーカディアンリズムをCFU-Csにより確認、CFU-Cs高値時の mouse の胸骨を採取。得られた標本をWhole mouse で幹細胞を含む細胞群として c Kit、SDF-1 に対する抗体を用い蛍光標識、c Kit 陽性/SDF-1 陰性細胞および c Kit 陽性/SDF-1 陽性細胞と神経組織との距離をImarisソフトウェアにより計測し、得られた細胞の距離情報を統計学的に解析する。

12時間ごとの規則的な明暗のリズムを、逆転させ“時差ぼけ mouse”を作成、サーカディアンリズムの変調をCFU-Csにより確認し、神経組織、SDF-1抗体、c Kit抗体、により蛍光染色し、上記同様にImarisソフトウェアにより骨髄の3次元構造を再構築すると同時にc Kit 陽性/SDF-1 陰性細胞およびc Kit 陽性/SDF-1 陽性細胞と神経組織との距離を計測、リズム正常 mouse と比較することにより変調による影響を比較検討する。

以上の結果から、骨髄内の神経組織の走行を解明し、サーカディアンリズムが幹細胞の遊走や増殖に関与することを証明することで、幹細胞採取のタイミングなどの最適化の可能性を追求した。

4. 研究成果

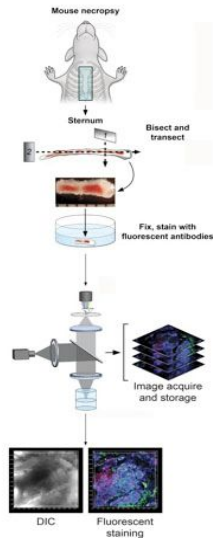
骨髄における造血は、血流中の可溶性ファクターおよび自律神経によって厳格に制御されており、その生理学的作用過程は決して一様

ではなく、むしろ日内変動により非常に多彩である。サーカディアンリズムとは24時間周期で変動する生理現象を示しており、生物は生態を維持する為に必要とされる生理学的ニーズをあらかじめ予測しかつその生理機能を調節していることから、本研究では骨髄内の神経組織の走行、および生態内のサーカディアンリズムを司る交感神経に注目し、アドレナリン受容体を介した造血幹細胞の制御機構を、共焦点顕微鏡およびその他の手法を用いて解析する事を目的とした。造血は神経組織、特に交感神経による影響を受けていると考えられること、現時点では骨髄内の神経組織分布に関する報告はない事から、第1段階として、

中枢および末梢神経組織に豊富なNeuron specific beta3 Tublinに対する抗体を購入し、マウス骨髄内の神経組織の可視化を行い、神経組織と思われる構造物の染色に成功した。しかし、描出された神経組織の密度は血管に比して予測よりも極度に少なく、一部は血管に平行して走行していると考えられるものの、神経ネットワーク網を形成するには十分な量では無いと考えられた。また、2および3アドレナリンを介した造血細胞/血液細胞への交感神経支配の影響を検証するため、それぞれのレセプターに対する抗体を購入しフローサイトメトリーを用いて検証を行った結果、ほぼ全ての血球細胞が定常状態ではアドレナリンに対するレセプターを発現しておらず、免疫染色でも同様の結果であった。さらに、活性化状態における各アドレナリンレセプター発現の可能性について検証する目的で、

刺激薬による刺激を行った後にフローサイトメトリーによって解析を行ったところ、刺激前と同様にレセプターの発現を認めなかった。

以上の結果から、これまでの進展に伴い、骨髄での神経組織の密度は低いと考えられること。また、何らかの血球細胞はサーカディアンリズムの影響を受けると考えられるものの定常状態では2/3アドレナリンのいずれのレセプターを発現していないことが明らかとなった。



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1件)

Morikawa D, Nojiri H, Saita Y, Kobayashi K, Watanabe K, Ozawa Y, Koike M, Asou Y, Takaku T, Kaneko K, Shimizu T. (11名、9番目)(査読有) Cytoplasmic reactive oxygen species and SOD1 regulate bone mass during mechanical unloading. J Bone Miner Res. Nov;28(11):2368-80, 2013

〔学会発表〕(計0件)

〔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：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 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

高久智生 (TAKAKU, Tomoiku)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20408256

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：