

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890237

研究課題名(和文) 成体マウスにおける胚子ヘモグロビン再発現機構の解析

研究課題名(英文) The study of embryonic hemoglobin re-expression in adult mice.

研究代表者

大塚 裕忠 (Otsuka, Hirotada)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：30634844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の発生過程においては由来の異なる2つの造血系が存在し、それぞれ異なるヘモグロビンを発現することが知られている。しかしながら、成体ではこれら2つの造血系が同時に存在することはない。我々は、成体マウスにおいて重症貧血を誘導することで、胚子ヘモグロビンを再発現する実験系を確立し、肝臓において胚子ヘモグロビンと赤芽球系マーカーを同時に発現している細胞を確認した。また末梢血において胚子タイプと成体タイプのヘモグロビンが同時に存在していることが確認できた。さらに、これらのヘモグロビン発現制御因子の発現も確認した。これらの結果は、ヘモグロビン発現機構解析のための新たな情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Mammal hematopoiesis occurs two distinct waves, known as a primitive and definitive; and to express the hemoglobin of different types are known. However, there is no possibility that the hematopoietic system of these two simultaneous presence in the adult. We established an experimental system to re-express the embryonic hemoglobin in adult mice by inducing the critical anemia treated with nitrogen containing bisphosphonate and phenylhydrazine, and we detected the cell, expressing at the same time the erythroid marker and embryonic hemoglobin in the liver. We also confirmed that the hemoglobin subunits of adult and embryo types were simultaneously present in the peripheral blood. In addition, it was possible to confirm the factors, which regulates the expression and switching of hemoglobin. These results support that understanding the mechanism of hemoglobin expression and switching during development.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：胚子ヘモグロビン 重症貧血 ヘモグロビン発現制御因子 窒素含有型ビスホスホネート

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の赤血球造血は、胚発生の卵黄嚢に由来する一次造血と、造血幹細胞に由来し、胎子肝臓及び骨髄で行われる二次造血の2つが存在し、それぞれ異なるタイプのヘモグロビンを発現している。しかしながら、出生後に胚子型のヘモグロビンが発現することはない。

我々は、重篤な貧血を誘導したマウスにおいて、末梢血中に一次造血で見られるような有核の赤血球が出現するとともに、肝臓では胚子ヘモグロビン mRNA の発現を確認した。

このことから、本実験系では成体でも一次造血が起こっている可能性があると考え、本研究を進めるに至った。

2. 研究の目的

(1) 胚子ヘモグロビン再発現細胞の起源と造血微小環境の確認

胚子ヘモグロビンを発現している細胞について、卵黄嚢由来細胞か、あるいはその他の細胞であるかを確認するために、特異的マーカーを用いて形態学的手法を主に解析を行う。また、本研究における造血幹細胞または前駆細胞が必要とする微小環境についても、骨髄における二次造血との比較を含めて解析を行う。

(2) 胚子ヘモグロビンのタンパクレベルでの発現解析

胚子ヘモグロビンの発現について、一部組織で mRNA レベルでの発現を確認しているに過ぎないため、特異抗体を用いた形態学的解析、二次元電気泳動やフローサイトメーターを用いて、機能的なタンパクレベルでの発現を確認する。

(3) 成体における胚子ヘモグロビン再発現制御の解析及び個体発生時と比較

本実験系における造血細胞について、以下のことを確認する。

胚子ヘモグロビン発現に関する KLF ファミリー等転写因子の発現解析

転写因子と制御部位の結合等について、個体発生における胚子ヘモグロビン発現機構との同異について確認する。

3. 研究の方法

(1) 胚子ヘモグロビン発現細胞及び発現機序の解析

成体における一次造血細胞の同定

脾臓摘出マウスに溶血性貧血誘導剤であるフェニルヒドラジン投与後、窒素含有型ビスホスホネートを投与することで骨髄内赤血球造血を抑制し、重症貧血を誘導したマウスから骨髄及び肝臓を採取し、免疫組織化学による一次造血マーカーや二次造血マーカーを発現する細胞を検出する。また mRNA を抽出し、RT-PCR により胚子ヘモグロビンやその他のマーカーの発現について確認する。さ

らに、組織切片上で *insitu* ハイブリダイゼーションを実施し、免疫組織化学の結果と照合することで、胚子ヘモグロビン mRNA を発現している細胞について同定を行う。また、フローサイトメトリーを用いて、発生時の一次造血細胞と形態的特徴の比較を実施する。

胚子ヘモグロビタンパクの発現解析

本実験系マウスの末梢血において、胚子ヘモグロビンが機能的なタンパク 4 量体として存在しているかを確認するために、末梢血中のヘモグロビンについて解析を実施する。末梢血を採取し、赤血球を分離、洗浄、溶血後、ヘモグロビンを抽出する。これを二次元電気泳動法あるいは、非変性ゲルを用いた電気泳動法により、対照群と泳動パターンを比較する。また、現時点で胚子ヘモグロビンに対する有効な市販抗体がないために、作製した抗体をもちいて、造血巣における免疫組織化学や末梢血及び造血細胞においてウエスタンブロット法を用いて、タンパクの発現を確認する。

胚子ヘモグロビン発現機序の解析

本実験系において、通常の赤血球造血と同様な因子が発現し、機能しているかを比較検討するために、造血巣から採取した mRNA について胚子及び成体ヘモグロビンの発現制御に関する転写因子や低酸素状態で赤血球造血を促進する因子等について、RT-PCR による解析を行う。また、転写因子については、転写制御部位への結合が重要であるため、クロマチン免疫沈降法をもちいて実際の転写活性について解析を行う。

(2) 胚子ヘモグロビン発現のための微小環境及び構成支持細胞の解析

造血においては、幹細胞維持・分化のための微小環境と支持細胞が必要である。本研究において、一次造血を行っている細胞が同定された場合に、この細胞が造血を行うために必須な外的な接着因子や支持細胞などが、個体発生時の一次造血と同じか、あるいは成体二次造血の環境を利用して一次造血前駆細胞が造血をおこなっているかの解析を免疫組織化学や *insitu* ハイブリダイゼーションを用いて解析を行う。

(3) 本実験系における一次造血誘導因子の特定

造血においては、様々な内的あるいは外的因子が必須であるが、一次造血と二次造血では、これらに相違がみられる。本研究で確認された一次造血を行う細胞を分離後、造血用メチルセルロース培地にて培養を実施する。この培養系に対し、過去に報告されているサイトカインなどの造血関連因子に対する中和抗体あるいはアンチセンス RNA を培地内に混入することで、増殖や分化の変化あるいはヘモグロビンの発現変化を解析する。

4. 研究成果

本研究では、成体マウスに重症貧血を誘導することで、胚子ヘモグロビンを再発現することを確認し、胚子ヘモグロビン発現細胞について形態学的観察を中心に解析を実施したところ、以下の成果を上げることが成功した。

(1) 造血巣における胚子ヘモグロビン発現細胞及び末梢中における胚子ヘモグロビンの確認

重症貧血を誘導したマウスでは、骨髄及び肝臓の髄外造血巣において胚子ヘモグロビンの mRNA 発現が確認された。組織切片上で、胚子ヘモグロビン mRNA の染色を実施したところ、これらの mRNA を発現する細胞のコロニーが確認され、この細胞集団では赤芽球マーカーである TER119 や CD71 を同時に発現していることが確認された。また、フローサイトメトリーを用いた解析結果では、赤芽球マーカー TER119 陽性細胞の集団において CD71 の発現及び細胞サイズの解析を実施したところ、胚子期一次造血で見られる細胞と類似した特徴の細胞が確認された。

さらに、末梢血中における胚子ヘモグロビンを確認するために実施した二次元電気泳動では、対照群でみられた成体ヘモグロビンに加え、実験群では成体ヘモグロビンとは等電点の異なるスポットも得られたことから、成体ヘモグロビンと胚子ヘモグロビンが同時に存在していることが確認された。フローサイトメトリーを用いた解析では、末梢血中においても一時造血細胞と類似した形態の細胞が確認できた。

(2) 胚子ヘモグロビン発現調節因子の確認

肝臓及び骨髄から採取した細胞の mRNA について RT-PCR を実施した結果、ヘモグロビン発現の転写調節を行っている KLF1 や KLF2、赤血球造血とヘモグロビン転写調節に関連する GATA1 などの因子の発現が確認できた。さらに、これらのタンパク質に対する抗体を用いて、胚子ヘモグロビンプロモーター領域における結合を確認したところ、対照群と比較して、有意な上昇が認められた。

(3) 血リンパ節様構造の形成誘導及び解析

今回、重症貧血を誘導したマウスの造血巣を確認してきたが、腹腔内において正常では見られない暗赤色の構造物が確認されたため、実験計画にはないが関連性を考えて解析を実施した。

その結果、この構造内はリンパ節様のリンパ濾胞を有していたが、脾臓様に洞様毛細血管が発達しており、TER119 陽性の赤芽球が多く認められた。この構造から mRNA を抽出し、RT-PCR を実施した結果、赤血球造血に関する

因子の発現に加え、胚子ヘモグロビンの発現も確認できた。

本研究の期間中に上記の成果が得られたことは、個体発生時のヘモグロビンスイッチングに対する理解やヘモグロビン異常疾患治療への手がかりとなる可能性を含んでおり、非常に有意義であると考えられる。しかしながら、発現調節因子が直接的に今回の現象に関連しているかを調べるためには、培養系を用いた実験などを行う必要があると考えられる。また、血リンパ節様構造を含めた造血巣における支持細胞の解析も今後の課題であると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

大塚裕忠、中村雅典 Definitive and primitive erythropoiesis can simultaneously occur in the adult mice. 第 41 回日本免疫学会総会・全国学術集会 2012. 12.5-7 神戸国際会議場

大塚裕忠、中村雅典 成体マウスにおける胚子ヘモグロビン再発現について 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2013.3.28-30 かがわ国際会議場

大塚裕忠、中村雅典 マウスに形成誘導された血リンパ節様構造における形態学的解析 医学生物学電子顕微鏡技術学会第 29 回学術講演会 2013.6.7-9 神奈川歯科大学

大塚裕忠、中村雅典 重症貧血マウスにおける胚子ヘモグロビン再発現の解析 日本比較免疫学会第 25 回学術集会 2013.8.26-28 岡山理科大学

〔図書〕(計 2 件)

Masanori Nakamura, Hirotsada Otsuka, Hideki Yagi, Yasuo Endo. The functional diversity of Kupffer cells. Handbook of Macrophage. NOVA Science Publishers 2012, 329-334

Masanori Nakamura, Hirotsada Otsuka, Hideki Yagi, Yasuo Endo. Extramedullary erythropoiesis in anemia. The New Frontiers in Research for Oral Cancer. MARUZEN PLANET 2012, 117-127

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 裕忠 (OTSKA, Hitotada)
昭和大学 歯学部口腔解剖学講座
研究者番号：3 0 6 3 4 8 4 4

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：