

博士論文概要

論文題目

ツメガエルおよびマウスにおける
赤血球造血の低温環境応答

Erythropoietic response to low-temperature
environments in frogs and mice

申請者

前川	峻
Shun	Maekawa

生命理工学専攻 分子生理学研究

2011年 12月

赤血球は、動物の生命活動に必須となる酸素を全身に運搬する機能を担う。血管を循環する末梢赤血球の数は、個体毎に恒常的に調節されている。医科学の領域では、赤血球産生の仕組み（赤血球造血）は古くから研究され、モデル生物としてではマウスを中心に膨大な知見が集積されてきた。近年、全ゲノム遺伝子の解析が進んだ小型魚類ゼブラフィッシュでも、造血研究が取り組まれている。しかし脊椎生物全般を俯瞰して、造血系の普遍性や多様性を議論するためには未解明の課題は多い。その一つは、生物が生息する環境、特に環境温度に対する血球産生応答の機序である。体温調節の面から、脊椎動物は内温動物と外温動物に大別される。内温動物（鳥類、哺乳類）は体温を一定に保つ調節系を備え、低温環境では、神経系・内分泌系の調節機構が作動して熱損失を減少させ、熱産生を増加させて体温を維持する。外温動物（魚類、両生類、爬虫類）は、体温調節系を備えておらず、熱源を環境から得る。このため低温環境に曝露されると受動的に体温が低下する。環境温度の低下に応答して末梢赤血球数が変動する事例は、内温動物、外温動物のそれぞれで複数報告されている。しかしいずれも現象の観察にとどまり、生体応答の詳細や機序は不明である。以上を踏まえ、本研究は、外温動物としてアフリカツメガエル（*Xenopus laevis*, 以下ツメガエル）を、また内温動物としてマウス（*Mus musculus*）を対象にして、低温刺激による末梢赤血球数変動の機序解明に向けて、赤血球造血の変動に関して実験血液学的な解析を進め、これに伴う生理生化学的な応答に関して詳細に検討した。

第1章では、脊椎動物における造血に関する知見を概説している。特に哺乳類、両生類、魚類などの赤血球造血の共通点や相違点を詳細に論じている。また環境ストレス、特に、温度刺激に対する動物の受容応答等について概説している。これらの知見を踏まえ、低温環境下、末梢血球数および赤血球造血の変動の機序に関わる可能性をもつ要素を論じ、本研究の位置づけと仮説の提示をしている。

第2章では、外温動物ツメガエルにおける低温曝露後の末梢血球数変動について示している。ツメガエルを低温環境（5°C）に曝露すると、1日以内に末梢血中の赤血球、白血球、栓球の全血球の数は減少し、すなわち汎血球減少症を呈し、低温暴露の間は低値を維持した。その後、常温飼育（22°C）に戻すと、各血球数は正常値にまで可逆的に回復した。低温環境における末梢血球数減少が循環血漿量の増加に起因する可能性を調べるため、常温、低温でそれぞれ5日間飼育したツメガエルの循環血漿量をエバンスブルー法で測定した。その結果、両群において循環血漿量の有意差は認められず、低温曝露後の血球数減少が循環血漿量増加に起因するものではない、と結論した。

第3章では、低温曝露後1日以内の赤血球数減少の原因として、赤血球代謝回転の亢進、すなわち赤血球寿命の短縮に起因する可能性について検討している。まず、未報告であった正常の成体ツメガエルの赤血球寿命、すなわち赤血球代謝回転速度の基準値を測定した。循環赤血球の膜蛋白質を *in vivo* でビオチン標識

し、循環赤血球中に検出されるビオチン標識赤血球数の割合をフローサイトメトリー法により長期間にわたって経時測定した。回帰分析の結果、ツメガエルの赤血球寿命は 220 ± 12 日と決定した。この値を循環全赤血球数（40 億個）で除し、全循環赤血球数に占める 1 日あたりの新生赤血球数は、0.45%（2 千万個）であると算定した。一方、低温曝露後 1 日以内に赤血球数はこの定常時の値をはるかに超えて約 30%も減少する。よって低温曝露直後に観察される赤血球数減少は、赤血球破壊亢進が一因であると仮説を立てた。哺乳類における赤血球代謝過程は、詳細にわかっている。寿命をむかえた老化赤血球が肝臓や脾臓内のマクロファージに貪食されると、赤血球内のヘモグロビン蛋白質はヘム分解代謝経路を経て、最終的にビリルビンに転換される。この代謝過程で、ヘム分解酵素（HMOX1）とビリベルジン還元酵素（BLVRA）が伴に機能するため、貪食マクロファージの HMOX1 および BLVRA の遺伝子発現が上昇するとの報告がある。そこで低温曝露前後のツメガエルより、肝臓と脾臓の RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法で HMOX1 と BLVRA の mRNA 発現量の変動を比較した。その結果、低温曝露後の個体では、肝臓と脾臓で両遺伝子の mRNA 発現量が上昇していた。またヘム分解産物として生じた鉄は、フェリチン鉄として細胞内に貯蔵される。肝臓と脾臓の薄切片のフェリチン鉄をプルシアンブルーで染色して調べたところ、低温曝露後のツメガエルの肝臓でフェリチン鉄の増加を確認した。以上より、低温曝露直後における赤血球数の急性的な減少は、肝臓で惹起される赤血球破壊亢進が一因であると結論した。

第 4 章では、低温曝露直後のツメガエルにおける赤血球造血能の変化について示している。末梢赤血球数の低下の要因の一つに赤血球造血機能の低下が考えられたため、赤血球産生因子エリスロポエチン（EPO）の主な発現臓器である肺と肝臓の EPO mRNA の発現量を解析した。その結果、低温曝露後 1 日目の肺で EPO mRNA 発現量は定常時に比べ約 20 倍増加し、赤血球造血巣である肝臓でも上昇傾向が見られた。そこで肝臓における赤血球系細胞に特異的に発現する転写因子 GATA1A や、EPO 受容体の mRNA 発現量を解析したところ、両者とも低温曝露後に上昇していた。また肝臓組織切片上で成熟赤血球の分布を調べたところ、低温曝露後 1 日目には成熟赤血球数が減少したが、その後増加し、低温期にありながら定常状態よりも多数の成熟赤血球が肝臓に出現するに至った。これらの結果より、低温曝露直後に見られる赤血球減少の急性期には、赤血球造血能は低温によって抑制されることなくむしろ亢進する。その後低温環境が持続すると、新生された赤血球は未知の機序により肝臓内に貯留し、末梢赤血球数は低値を維持すると考えられた。この仮説を実験的に証明するために、溶血剤フェニルヒドラジン（PHZ）投与による溶血性貧血モデルを用いた。PHZ 投与後、ツメガエルの末梢赤血球数は徐々に減少し、8 日目には極小値となるが、その後回復する。回復期には、肝臓での赤血球前駆細胞数の増加と、末梢血中に未熟な赤血球が多数

放出される。しかしこの貧血回復期に個体を低温に曝露すると、予測どおりに肝臓内に多数の新生赤血球が貯留され、末梢には未熟な新生赤血球がほとんど観察されなかった。以上より、低温曝露下での赤血球数低値維持は、新生赤血球の肝臓内貯留が一因であると結論した。

第5章では、内温動物マウスにおいて、低温曝露後の末梢赤血球数変動について記している。先行研究により、低温に順化したラットやニワトリは、外温動物と異なり末梢赤血球数が増加することが報告されている。そこでマウスを低温環境（5°C）にマウスを曝露し、末梢血球数を経時測定した。低温曝露7日目には新生赤血球数の指標となる網状赤血球数に有意な増加があり、14日目より末梢の成熟赤血球数は徐々に増加を認め、その後56日目まで高値を維持した。白血球数と血小板数には低温曝露後一過的な減少が見られたが、その後正常時と同程度に回復した。以上より、内温動物マウスでも低温環境に応答した末梢赤血球数の増多が示され、赤血球造血能の亢進の可能性が示された。

第6章では、低温曝露マウスにおける赤血球造血能の解析結果を示している。マウスにおいて脾臓は髄外造血の場でもあり、同時に老化血球破壊の場でもある。低温曝露後のマウスの脾臓重量の変動を調べたところ、5日目に脾腫が極大となり、定常時と比較して約2倍であった。そこで主要造血巣である骨髄や、髄外造血が刺激された脾臓内の細胞性状を明らかにするために、分化段階の異なる赤血球前駆細胞を分別し、計数化することにした。マウス赤血球膜表面に特異的に発現するTer119と、細胞増殖期に赤血球前駆細胞膜表面に発現するトランスフェリン受容体（CD71）を分化マーカーに選び、それぞれを認識する蛍光標識抗体で細胞を染色後、フローサイトメトリーで解析した。本法によって、赤芽球へ分化の途上にある赤血球前駆細胞を4つの集団に分離可能であった。低温曝露後5日目のマウス脾臓では、前赤芽球細胞（Ter119弱陽性、CD71強陽性）の数は定常時の約2.5倍に増加していた。また主要造血巣である骨髄においても、前赤芽球数の増加傾向が見られた。これらの結果は、低温曝露後にマウス末梢血で増加する赤血球は、特に赤血球造血が亢進した脾臓に由来することが判明した。定量的RT-PCR法によりEPOの主要産生臓器である腎臓のEPO mRNAの発現量の変動を調べたところ、低温曝露後に増加傾向を示し、4日目には定常時よりも約20倍増加していた。以上の結果から、マウスが低温に暴露されると、腎臓でEPO発現が上昇し赤血球造血が亢進し、その結果、末梢赤血球数が増加すると結論した。

最終章では、本研究の統括と今後の展望が示されている。本研究は、造血制御解析の新たな動物モデルを確立した。造血系の温度応答を外温動物、内温動物のそれぞれで調べ、低温環境に応答した末梢赤血球数変動に至る質的かつ量的な赤血球造血の応答の存在が明らかとなった。本研究で獲得した詳細な知見は、造血制御の環境応答を担う未知の機序解明につながるものであり、実験血液学領域にだけでなく、広く基礎生物学に貢献する。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 前川 峻 印

(2012年12月 現在)

種 類 別	題名, 発表・発行掲載誌名, 発表・発行年月, 連名者 (申請者含む)
論文 ○	<p>1. Enhanced erythropoiesis in mice exposed to low environmental temperature. <u>Shun Maekawa</u>, Hitomi Iemura, and Takashi Kato. J. Exp. Biol. (掲載決定).</p> <p>○ 2. Hepatic confinement of newly-produced erythrocytes caused by low-temperature exposure in <i>Xenopus laevis</i>. J. Exp. Biol. 2012. 215, 3087-3095. <u>Shun Maekawa</u>, Hitomi Iemura, Yuko Kuramochi, Nami Nogawa-Kosaka, Hironori Nishikawa, Takehito Okui, Youichi Aizawa, and Takashi Kato.</p> <p>3. Identification of erythroid progenitors induced by erythropoietic activity in <i>Xenopus laevis</i>. J. Exp. Biol. 2011, 15(214):921-927. Nami Nogawa-Kosaka, Tatsuhisa Sugai, Kazumichi Nagasawa, Yuta Tanizaki, Mizue Meguro, Youichi Aizawa, <u>Shun Maekawa</u>, Motoyasu Adachi, Ryota Kuroki, and Takashi Kato.</p>
講演	<p>1. 赤血球造血の低温環境応答, 第 13 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム(東京), 2012 年 6 月, 前川峻, 家村仁美, 加藤尚志.</p> <p>2. Expression of erythropoietin and its receptor and implication of renal erythropoiesis in adult medaka fish. The 1st Strategic Meeting for Medaka Research. Nagoya, Nov. 2011, <u>Shun Maekawa</u>, Ayumi Hirano, and Takashi Kato.</p> <p>3. メダカ成体におけるエリスロポエチン受容体発現赤血球前駆細胞の組織分布, 第 82 回日本動物学会(旭川), 2011 年 9 月, <u>前川峻</u>, 平野歩美, 加藤尚志.</p> <p>4. メダカのエリスロポエチン遺伝子の組織発現と貧血応答, 第 82 回日本動物学会(旭川) 2011 年 9 月, 平野歩美, <u>前川峻</u>, 加藤尚志.</p> <p>5. Successful isolation of vascular endothelial cells in order to study endothelium specific regulation of the rat Ductus arteriosus. 日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム(金沢), 2011 年 5 月, Norika Liu, Tomohiro Yokota, <u>Shun Maekawa</u>, Utako Yokoyama, Takashi Kato, and Susumu Minamisawa.</p> <p>6. ツメガエルにおける赤血球産生の低温応答, 第 35 回日本比較内分泌学会(静岡) 2010 年 11 月, <u>前川峻</u>, 家村仁美, 永澤和道, 神保杏林, 加藤尚志.</p> <p>7. 低温曝露アフリカツメガエルにおける白血球数の減少, 第 35 回日本比較内分泌学会(静岡) 2010 年 11 月, 小野寺秀和, <u>前川峻</u>, 恩田信洋, 一杉芽美, 石田溪介, 家村仁美, 加藤友啓, 前野貢, 加藤尚志.</p> <p>8. メダカ腎臓における血球系細胞の性質と貧血応答, 第 35 回日本比較内分泌学会(静岡), 2010 年 11 月, 平野歩美 <u>前川峻</u>, 加藤尚志.</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名, 発表・発行掲載誌名, 発表・発行年月, 連名者（申請者含む）
講演 (続き)	<p>9. アフリカツメガエル赤血球産生におけるエリスロポエチンの作用動態, 第 35 回日本比較内分泌学会(静岡), 2010 年 11 月, 別府実穂, 永澤和道, 目黒瑞枝, <u>前川峻</u>, 遠藤信康, 小坂(野川)菜美, 加藤尚志.</p> <p>10. ツメガエルの血中に存在する赤血球産生活性の抗エリスロポエチン抗体による中和, 第 35 回日本比較内分泌学会(静岡), 2010 年 11 月, 永澤和道, 須貝龍久, 谷崎祐太, <u>前川峻</u>, 別府実穂, 小坂(野川)菜美, 加藤尚志.</p> <p>11. アフリカツメガエル造血器における細胞接着因子 ESAM の発現, 第 35 回日本比較内分泌学会(静岡)2010 年 11 月, 真野陽介, 奥井武仁, 小濱聖佳, <u>前川峻</u>, 木下紗也香, 谷崎祐太, 田原彩香, 加藤尚志.</p> <p>12. 抗エリスロポエチン受容体抗体が認識するツメガエル赤血球前駆細胞の性質, 第 35 回日本比較内分泌学会(静岡), 2010 年 11 月, 神保杏林, 栗城遥, 永澤和道, <u>前川峻</u>, 渡会浩志, 加藤尚志.</p> <p>13. 低温曝露ツメガエルにおける肝臓での赤血球破壊とヘム分解酵素発現量の増大, 第 81 回日本動物学会(東京)2010 年 9 月, <u>前川峻</u>, 家村仁美, 倉持裕子, 小坂(野川)菜美, 會沢洋一, 加藤尚志.</p> <p>14. αIIbβ3 インテグリン複合体様分子を発現する動物血球細胞の組織分布, 第 62 回 日本動物学会関東支部大会(筑波), 2010 年 3 月, 山内志毅, <u>前川峻</u>, 家村仁美, 木下紗也香, 石田貴子, 加藤尚志.</p> <p>15. Splenomegaly with erythroblast expansion during erythropoietic stress caused by ambient low-temperature in mice. 51th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, Louisiana, USA. Dec, 2009, <u>Shun Maekawa</u>, Hitomi Iemura, Hiroshi Miyazaki, Takashi Kato.</p> <p>16. <i>Xenopus laevis</i> exposed to low temperature suppress proliferation of hepatic erythrocyte progenitors. 38th International Society of Experimental Hematology. Athens, Greece, Sep, 2009. Hitomi Iemura, <u>Shun Maekawa</u>, Yuko Kuramochi, Nami Nogawa-Kosaka, Youichi Aizawa, and Takashi Kato.</p> <p>17. 低温環境のマウスにおける末梢血球数変動と赤血球産生の亢進, 第 71 回日本血液学会(京都)2009 年 10 月, <u>前川峻</u>, 家村仁美, 加藤尚志.</p> <p>18. Increased red blood cell numbers in mice exposed to environmental low-temperature. 38th International Society of Experimental Hematology. Athens, Greece, Sep, 2009. <u>Shun Maekawa</u>, Hitomi Iemura, and Takashi Kato.</p> <p>19. 低温環境におけるアフリカツメガエルの慢性貧血とその生理機序の検討, 第 70 回日本血液学会(京都)2008 年 10 月, <u>前川峻</u>, 倉持裕子, 小坂(野川)菜美, 家村仁美, 西川裕展, 會沢洋一, 加藤尚志.</p> <p>20. 低温曝露で誘導されるアフリカツメガエル末梢赤血球数減少の機序, 第 71 回日本血液学会学術集会(京都)2009 年 10 月, 家村仁美, <u>前川峻</u>, 倉持裕子, 小坂(野川)菜美, 會沢洋一, 加藤尚志.</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名, 発表・発行掲載誌名, 発表・発行年月, 連名者（申請者含む）
講演 (続き)	<p>21. A new animal model for anemia induced by environmental low-temperature. 48th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, USA., Dec 2008, <u>Shun Maekawa</u>, Hitomi Iemura, Yuko Kuramochi, Nami Kosaka-Nogawa, Hironori Nishikawa, Youichi Aizawa, Takashi Kato.</p> <p>22. Chronic anemia induced by low-temperature is caused by impaired erythrocyte traffic from liver to peripheri in African crowed frog, <i>Xenopus laevis</i>. 37th International Society for Hematology. Boston, July, 2008. <u>Shun Maekawa</u>, Yuko Kuramochi, Hitomi Iemura, Nami Nogawa-Kosaka, Hironori Nishikawa, Youichi Aizawa, and Takashi Kato. (<u><i>The Best Poster Award</i></u>)</p> <p>23. A new anemic model for African crowed frog, <i>Xenopus laevis</i> induced by low-temperature. 37th International Society for Hematology. Boston, July, 2008. Hitomi Iemura, Yuko Kuramochi, <u>Shun Maekawa</u>, Nami Nogawa-Kosaka, Youichi Aizawa , and Takashi Kato. (<u><i>The Best Poster Award</i></u>)</p> <p>24. アフリカツメガエル赤血球寿命の測定. 第 60 回日本動物学会関東支部大会(東大駒場), 2008 年 3 月, 家村仁美, 倉持裕子, <u>前川峻</u>, 小坂(野川)菜美, 會沢洋一, 加藤尚志.</p>
講演 (招聘)	<p>1. 核酸染色による新しい FCM 技術への取り組み, 第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会企画ワークショップ 4「新しい FCM/FACS 技術への挑戦」(京都)2011 年 6 月, 永井豊, 近藤弘, 久保寛嗣, 塩山高広, 鈴木あかね, 木下沙也香, <u>前川峻</u>, 加藤尚志.</p> <p>2. 両生類造血に学ぶ～アフリカツメガエル血球産生のダイナミクス～, 日本比較免疫学会第 21 回学術集会(神奈川), 2009 年 8 月, シンポジウム「リンパ球の起源と分化」, 小坂(野川)菜美, <u>前川峻</u>, 永澤和道, 家村仁美, 奥井武仁, 加藤尚志.</p>
講演 (その他)	<p>1. フローサイトメトリー法による血球解析:抗体の作出と蛍光核酸染色の応用, 第 4 回早稲田大学・東京女子医科大学 TWIns ジョイントシンポジウム「医理工融合研究の新展開」, 早稲田大学先端生命医科学センター, 2011 年 3 月, 永澤和道, 神保杏林, 木下紗也香, 谷崎祐太, 田原彩香, 恩田信洋, 栗城遥, 清瀬大貴, <u>前川峻</u>, 渡会浩志, 永井豊, 加藤尚志.</p> <p>2. A New Animal Model of Experimental Hematology Low Temperature Exposure Induces Pancytopenia in <i>Xenopus laevis</i>, 第 3 回 東京女子医科大学・早稲田大学 TWIns ジョイントシンポジウム「医理工融合研究の実践」, 2010 年 1 月, <u>Shun Maekawa</u>, Hitomi Iemura, Takashi Kato.</p> <p>3. New insight into experimental hematology; a hematopoietic response of African clawed frog exposed to environmental low-temperature. The 1st International Symposium on Biomedical Science and Engineering, Waseda University, July 2009, <u>Shun Maekawa</u>, Hitomi Iemura, Yuko Kuramochi, Nami Kosaka-Nogawa, Youichi Aizawa, Takashi Kato.</p> <p>4. 造血の分子制御機構:アフリカツメガエル肝臓における血球産生, 早稲田大学 ハイテク・リサーチ・センター整備事業 第 1 回成果報告シンポジウム「早稲田大学が目指す新しい医・理・工学融合研究の展開」, 2009 年 8 月, 奥井武仁, 永澤和道, 目黒瑞枝, 吉岡祐亮, <u>前川峻</u>, 小坂(野川)菜美, 上田しのぶ, 加藤尚志.</p>