

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**

2012年12月

前川 峻

Shun MAEKAWA

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**

2012年12月

早稲田大学 先進理工学研究科
生命理工学専攻 分子生理学研究室

前川 峻

Shun MAEKAWA

目次

【略語一覧】・・・4

【図表一覧】・・・7

【第一章】 緒言・・・9

- 1-1. 哺乳類の造血制御と造血因子
- 1-2. 哺乳類の赤血球産生
- 1-3. 脊椎動物の造血制御
- 1-4. 動物の環境温度応答
- 1-5. 造血の環境温度応答
- 1-6. 本研究のねらい

【第二章】 ツメガエル低温曝露後の循環血球数変動・・・30

- 2-1. 序論
- 2-2. 材料および方法
 - 2-2-1. 動物
 - 2-2-2. 採血と血算
 - 2-2-3. 循環血漿量の測定
- 2-3. 結果
 - 2-3-1. 低温曝露ツメガエルにおける循環血球数の変動
 - 2-3-1. 低温曝露ツメガエルにおける循環血漿量の変動
- 2-4. 考察

【第三章】 ツメガエル低温環境曝露後の赤血球破壊亢進・・・37

- 3-1. 序論
- 3-2. 材料および方法
 - 3-2-1. 動物
 - 3-2-2. *in vivo* ランダムビオチン標識法による赤血球寿命の測定
 - 3-2-3. qRT-PCR 法によるヘム代謝酵素 mRNA の発現量
 - 3-2-4. Perls' prussian blue 染色法による臓器内フェリチン鉄の検出
- 3-3. 結果
 - 3-3-1. 定常時ツメガエルの赤血球寿命
 - 3-3-2. 低温曝露ツメガエルにおける赤血球代謝酵素群の遺伝子発現量
 - 3-3-3. 低温曝露ツメガエルの肝臓・脾臓におけるフェリチン鉄の検出

3-4. 考察

【第四章】 ツメガエル低温環境曝露後の赤血球造血能の解析・・・46

4-1. 序論

4-2. 材料および方法

4-2-1. 動物と循環血解析

4-2-2. qRT-PCR 法による造血因子遺伝子発現の定量解析

4-2-3. 肝臓組織切片の作製と赤血球の分布観察

4-2-4. 免疫染色法による BrdU 陽性細胞の検出

4-3. 結果

4-3-1. 赤血球造血因子の遺伝子発現量解析と肝臓における赤血球分布

4-3-2. 赤血球造血亢進時における低温曝露の影響

4-3-3. 低温曝露後の新生赤血球の体内動態

4-4. 考察

【第五章】 マウス低温環境曝露後の循環血球数変動・・・58

5-1. 序論

5-2. 材料および方法

5-2-1. 動物

5-2-2. 循環血球数計数

5-2-3. 網状赤血球数の計数

5-3. 結果

5-4. 考察

【第六章】 マウス低温環境曝露後の赤血球造血能の解析・・・62

6-1. 序論

6-2. 材料および方法

6-2-1. 動物

6-2-2. 脾臓組織切片と免疫組織染色

6-2-3. フローサイトメトリーによる各赤芽球分化段階の計数

6-2-4. 赤芽球コロニーアッセイ法による CFU-E 数の計数

6-2-5. EPO および低酸素応答因子の qRT-PCR 解析

6-3. 結果

6-3-1. 低温曝露後脾臓の組織形態

6-3-2. 低温曝露後の造血巣中の赤芽球系細胞の分布

6-3-3. 低温曝露後の造血巣中のコロニーアッセイ法による CFU-E 数の

検討

6-3-4. 低温曝露後の EPO および低酸素応答遺伝子発現量の測定

6-4. 考察

【第七章】 統括と展望・・・75

【謝辞】・・・85

【引用・参考文献】・・・87

【研究業績】・・・108

【略語一覧】

α-MEM	α-Minimum Essential Medium
APC	Allophycocyanin (アロフィコシアニン)
ATP	Adenosine Triphosphate (アデノシン三リン酸)
BFU-E	Burst forming unit-erythro (赤芽球バースト形成細胞)
BLVRA	Biliverdin reductase A (ビリベルジン還元酵素 A)
BSA	Bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)
BrdU	Bromodeoxyuridine (臭素化デオキシウリジン)
CD	Cluster of differentiation (表面抗原分類)
cDNA	Complementary DNA (相補的 DNA)
CFU-E	Colony forming unit-erythroid (赤芽球コロニー形成細胞)
DAB	3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochlorid (ジアミノベンジジン)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
DNA	Deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines (ダルベッコリン酸バッファー)
EDTA-Na	Sodium ethylenediamine tetra-acetic acid (エチレンジアミン四酢酸ナトリウム)
EPO	Erythropoietin (エリスロポエチン)
EPOR	Erythropoietin receptor (エリスロポエチン受容体)
FCS	Fetal bovine serum (ウシ胎児血清)
FITC	Fluorescein isothiocyana (フルオレセインイソチオシアネート)
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor (顆粒球コロニー刺激因子)
GFP	Green fluorescent protein (緑色蛍光蛋白質)
GLUT1	Glucose transporter 1 (グルコース輸送体 1)

GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)
HCT	Hematocrit(ヘマトクリット)
HE	Hematoxylin and eosin stain(ヘマトキシリン・エオジン染色)
HIF	Hypoxia inducible factor(低酸素誘導因子)
HGB	Hemoglobin(ヘモグロビン)
HMOX1	Heme oxygenase 1(ヘム分解酵素 1)
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HRE	Hypoxia response element(低酸素応答領域)
HRP	Horseradish peroxidase (ホースラディッシュペルオキシダーゼ)
IGF-1	Insulin-like growth factor 1(インスリン様成長因子 1)
IL	Interleukin(インターロイキン)
LDHA	Lactate dehydrogenase A(乳酸脱水素酵素 A)
MCH	Mean corpuscular hemoglobin(平均赤血球色素量)
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration (平均赤血球色素濃度)
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor (マクロファージコロニー刺激因子)
MCV	Mean cell volume(平均赤血球容積)
mRNA	messenger RNA(伝令 RNA)
NBRP	National bioresource project (ナショナルバイオリソースプロジェクト)
NGS	Normal goat serum(標準ヤギ血清)
PHZ	Phenylhydrazine(フェニルヒドラジン)
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1(ホスホグリセリン酸キナーゼ 1)
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)
RNA	Ribonucleic acid(リボ核酸)

RPI	Peticulocyte production index (網状赤血球産生指数)
RPL13A	Ribosomal protein L13a
SCF	Stem cell factor(幹細胞因子)
siRNA	small interfering RNA
T ₃	3,5,3-triiodothyronine(トリヨードチロニン)
TBC	Thrombocyte(栓球)
TBS	Tris-Buffered Saline(トリス緩衝生理食塩水)
TPO	Thrombopoietin(スロンボポエチン)
TR	Thyroid hormone receptor(甲状腺ホルモン受容体)
VEGF	Vascular endothelial growth factor (血管内皮細胞増殖因子)
VHL	Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (フォンヒッペル・リンダウ腫瘍抑制タンパク質)
WBC	White blood cell(白血球)

本博士論文における遺伝子の表記については、ツメガエルは Xenbase の表記法を、マウスは Mouse Genome Informatics (MGI)の表記法に従った。

Xenbase (<http://www.xenbase.org/gene/static/geneNomenclature.jsp>)

MGI (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>)

【図表一覧】

第一章

- 図 1-1 哺乳類の血球分化系譜と造血因子
- 図 1-2 ヒトにおける赤血球造血と赤血球代謝の概要図
- 図 1-3 肝臓での HIF による EPO 遺伝子の転写調節制御
- 表 1-1 各動物における造血巣と造血因子遺伝子の報告
- 図 1-4 アフリカツメガエル肝臓における赤血球産生
- 図 1-5 発生過程におけるヒト造血巣の移動
- 図 1-6 マグロ赤筋における奇網構造
- 図 1-7 ラット尾部移植による尾骨髄造血能の維持
- 表 1-2 造血の季節・環境温度応答

第二章

- 図 2-1 長期低温曝露による循環血球数の変動
- 図 2-2 5°C の低温曝露後の循環血球数の変動
- 表 2-1 5°C の低温曝露後の赤血球恒数
- 図 2-3 循環血漿量の測定

第三章

- 表 3-1 動物の赤血球寿命と測定法
- 表 3-2 ヘム代謝酵素の発現解析に用いたプライマー一覧
- 図 3-1 哺乳類における赤血球代謝経路
- 図 3-2 *in vivo* ビオチン化法によるツメガエルの赤血球寿命測定
- 図 3-3 低温曝露後の *hmox1* と *blvra* の発現量変動
- 図 3-4 Perls' prussian blue 染色法による組織フェリチン鉄の検出
- 表 3-3 動物の循環赤血球数と赤血球代謝回転速度の比較

第四章

- 表 4-1 赤血球造血関連因子の発現解析に用いたプライマー一覧
- 図 4-1 低温曝露後の *epo* の発現量変動
- 図 4-2 低温曝露後肝臓での赤血球前駆細胞特異的に発現する遺伝子の発現量変動
- 図 4-3 低温曝露後肝臓での赤血球系細胞の分布
- 図 4-4 PHZ 誘導貧血の回復期に対する低温曝露の影響
- 図 4-5 低温曝露後循環血中の赤芽球数

- 図 4-6 低温曝露後肝臓中の赤血球系細胞の分布
- 図 4-7 BrdU を用いた *in vivo* 細胞分化増殖試験の概略図
- 図 4-8 肝臓および末梢血における BrdU 陽性細胞の検出
- 図 4-9 ヒトの鉄体内動態

第五章

- 図 5-1 低温曝露マウスの循環血球数の変動
- 表 5-1 低温曝露マウスの赤血球恒数の変動

第六章

- 表 6-1 マウス qRT-PCR に用いたプライマー一覧
- 図 6-1 低温曝露マウス脾臓の形態
- 図 6-2 低温曝露マウス脾臓の組織切片像
- 図 6-3 低温曝露マウス脾臓中の赤血球系細胞の分布
- 図 6-4 フローサイトメトリー法による造血巣中の赤芽球系細胞分画
- 図 6-5 低温曝露マウス造血巣中の各赤芽球数の分布変動
- 図 6-6 低温曝露マウス造血巣中の CFU-E 数の変動
- 図 6-7 低温曝露後腎臓での EPO および HIF-1 α の遺伝子発現量
- 図 6-8 低温曝露後腎臓での HIF 応答遺伝子の発現解析

第七章

- 図 7-1 低温曝露ツメガエルにおける赤血球造血応答の模式図
- 図 7-2 低温曝露マウスにおける赤血球造血応答の模式図

【第一章】 緒言

1-1. 哺乳類の造血制御と造血因子

血液を循環する血球は酸素運搬を担う赤血球, 止血血栓を担う栓球(哺乳類では血小板), 免疫応答を担う白血球に大別される。哺乳類においては, これら血球は骨髄で産生され, 自己複製能と多分化能を有する造血幹細胞に由来する。成熟過程における造血前駆細胞は, 特定の分化段階に作用する造血因子(サイトカイン)の受容体を発現しており, 各血球へと成熟する(総説 Metcalf, 2008)。エリスロポエチン(Erythropoietin; EPO)は赤血球造血, 顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte colony stimulating factor; G-CSF)は顆粒球造血, スロンボポエチン(Thrombopoietin; TPO)は栓球造血において, それぞれ中心的な役割を担う。一方で, 多系譜の血球前駆細胞に働く造血因子も存在し, IL-3やGM-CSFなどが挙げられる(図1-1)。造血因子による造血制御は大きく3つに分類される。1)産生された造血因子が, 血液循環によって造血巣中の造血前駆細胞に働く内分泌作用で, EPOやTPOなどが該当する。2)造血巣中の細胞で産生された造血因子が, 造血前駆細胞に働く傍分泌作用で, 各種ILなど多くの造血因子が該当する。3)造血因子と受容体がそれぞれ細胞表面に発現し, 細胞接着による情報伝達作用で, SCFなどが該当し, 特に造血幹細胞を維持する組織・細胞環境は造血微小環境(ニッチェ)と呼ばれる。また近年では, 上述した3つの内, 複数の作用機序を担う造血因子も報告されている。例えば, TPOは主に肝臓で産生・分泌されるが, 造血幹細胞の静止期の維持には, 骨髄中の骨芽細胞が産生するTPOが重要であり, 2)の傍分泌作用を受けることが報告されている(Yoshihara *et al.*, 2007)。

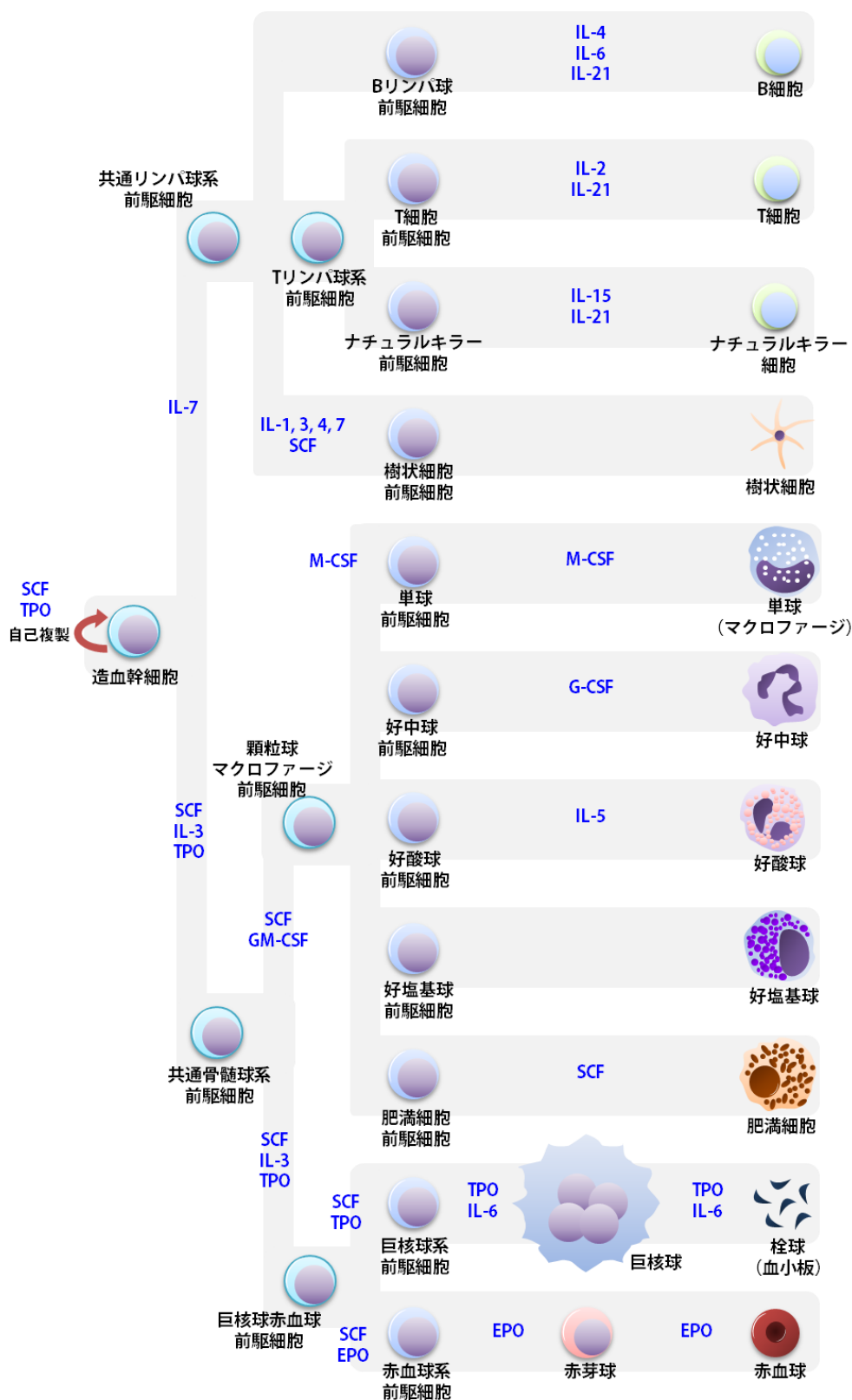


図 1-1 哺乳類の血球分化系譜と造血因子

William hematology / editors, Kaushansky *et al.*, 8th ed より改変引用。

血液学は臨床との結びつきが強く、EPO や G-CSF については遺伝子組換え体が、貧血などの疾患の治療薬としてすでに実用化されている。また TPO については、1995 年以降に遺伝子組み換え TPO 製剤の臨床開発が始まったが、1999 年に TPO を投与された健常人において、TPO に対する自己抗体産生による重篤な血小板低下の症例報告が相次いだため、2000 年以降に臨床開発が中止された。その後、新たな TPO 受容体作動薬として、エルトロンボパグとロミプロスチムが開発され、2010 年と 2011 年にそれぞれ我が国において承認され、難治性慢性特発性血小板減少性紫斑病などの血小板減少症における治療薬となっている(総説 Kuter, 2007; 池田編, 2012, トロンボポエチン受容体作動薬のすべて)。

哺乳類においては図 1-1 で示したように、血球分化系譜が詳細にわかっている。しかし造血幹細胞や造血前駆細胞は、形態観察による鑑別が困難である。この問題解決には、次にあげる 2 つの実験手法の確立が貢献している。一つは *in vitro* コロニーアッセイ法である。1966 年に、オーストラリア(Bradley and Metcalf, 1966)とイスラエル(Pluznik and Sachs, 1966)それぞれの研究グループから同時に報告され、寒天を用いた半固形培地培地中で、一個の細胞から顆粒球系とマクロファージ系で構成されるコロニーが形成されることを示した。この後、純度の高い造血因子の組換え体の使用が可能となるなど、コロニーアッセイ法の改良が進むとともに、血球の分化過程に関する研究が飛躍的に進んだ。もう一つは血球表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーによる細胞単離技術である。1982 年に第一回国際ヒト白血球分化抗原ワークショップ (Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens)がパリで開催され、ヒト造血細胞に対するモノクローナル抗体を分類し、それぞれに CD(Cluster of differentiation)番号が記され

た。現在では、CD 抗体の種類が 350 にも及ぶ(Zola *et al.*, 2007)。蛍光標識を施した CD 抗体を用いて、血球を蛍光標識し、フローサイトメトリーによって解析することで、特定の分化段階の血球を分取することが可能である。本技術開発により、造血幹細胞の分離に関する研究が加速した。その先駆的研究は、1984 年に Visser らが報告した(Visser *et al.*, 1984)。その後、より高純度な造血幹細胞を分取法確立に関する研究が国内外で進んだ。現在では、マウスにおいて CD34 陰性、c-kit 陽性、Sca-1 陽性、各種分化抗原(Lineage)マーカー陰性(CD34⁻KSL)に、最も未分化な造血幹細胞が存在することが判明している(Osawa *et al.*, 1996)。さらに近年、CD34⁻KSL 画分を CD150 の発現強度の違いにより、造血幹細胞集団の中でさらに自己複製能や、造血幹細胞移植後の造血再構築能などが異なる集団を分離することが可能となっており、造血幹細胞の中でも階層性が存在することが示唆されている(Morita *et al.*, 2010)。

1-2. 哺乳類の赤血球産生

赤血球造血は赤血球造血因子 EPO により制御されている(総説 Krantz, 1991)。ヒト EPO は分子量約 6 万の糖蛋白ホルモンであり、成長ホルモンやプロラクチンなどと伴に I 型サイトカインファミリーに属する。ヒト EPO は主に腎臓で産生・分泌され、骨髄中に存在する EPO 受容体(EPO receptor; EPOR)を発現する赤血球前駆細胞に作用する(Dame *et al.*, 1998)。もっとも未熟な赤血球系譜の細胞は赤芽球バースト形成細胞(burst forming unit-erythroid, BFU-E)であり、後に赤芽球コロニー形成細胞(colony forming unit-erythroid, CFU-E)、次いで前赤芽球へと分化する。これら赤血球前駆細胞は EPO への感受性が高く、EPO の刺激により好塩基性赤芽球、多染性

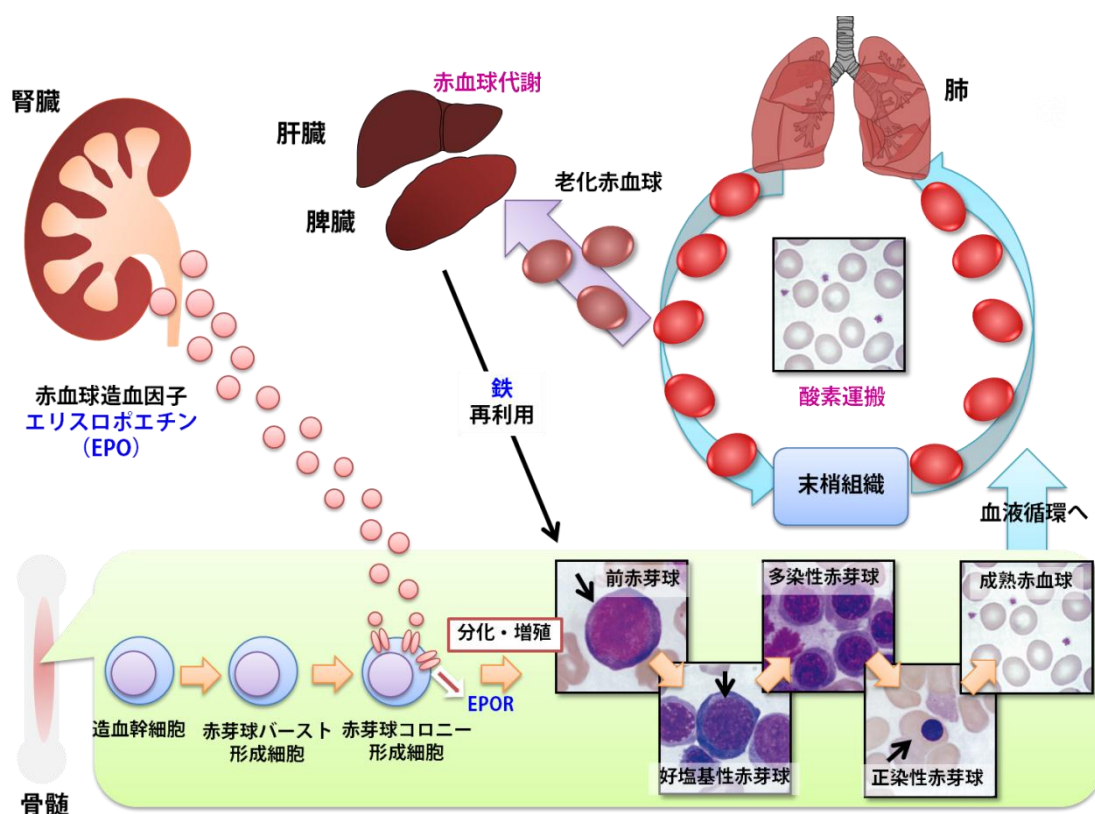


図 1-2 ヒトにおける赤血球造血と赤血球代謝の概要図

骨髄中に存在する赤血球前駆細胞は、EPOR 受容体を発現しており、腎臓から分泌される EPO によって刺激を受ける。EPO 刺激により、分化と増殖を繰り返す、最終的に成熟赤血球となり、循環血中へ放出される。循環過程で損傷・老化した赤血球は、脾臓や肝臓で代謝される。代謝過程で得られた鉄は、赤血球造血時のヘモグロビン合成にて再利用される(血球の写真は三輪, 渡邊著 血液細胞アトラスより引用)。

赤芽球, 正染性赤芽球への順次分化する。正染性赤芽球は, その後脱核し, 産生されて間もない赤血球は, 残存する核酸を保持していることから網状赤血球と呼ばれる。最終的に産生された赤血球は循環血中へと放出される(図 1-2) (Gregory and Eaves, 1977, 1978; Sawada *et al.*, 1987; Broudy *et al.*, 1991)。赤芽球系細胞は, 形態観察による鑑別も可能だが, マウスにおいてはフローサイトメトリーを用いて造血巣中の各分化段階の赤芽球数を定量的に捉えることも可能となっている。Socolovskyらは, 赤血球膜特異的抗原抗体 Ter119とトランスフェリン受容体抗体 CD71 で血球細胞に蛍光二重染色を施し, 蛍光強度の

違いにより赤芽球を 4 つの分化段階に分取可能であると報告している (Socolovsky *et al.*, 2001)。

ヒト体内では約 20 兆個の赤血球が絶えず循環しているが、その内 1 日に約 2000 億個が造られ、同時に約 2000 億個が破壊されている。赤血球には寿命があり、ヒト赤血球の寿命は約 120 日である (Finch *et al.*, 1949)。循環過程で、損傷または老化した赤血球は主に脾臓で補足され、マクロファージによって貪食される。貪食された赤血球に含有するヘモグロビンはヘムに分解され、その後鉄とビリルビンへと代謝される。ビリルビンは循環血中に放出され、肝実質細胞内で分解される。鉄は、フェリチンと結合し、フェリチン鉄としてマクロファージ内で一時貯蔵される。その後、血中に放出される際に、トランスフェリンと結合し、主に赤血球のヘモグロビンを合成するために再利用される (図 1-2)。

循環赤血球数は EPO 遺伝子発現量によって調節されており、低酸素誘導因子群 (Hypoxia inducible factors: HIFs) が中心的役割を担う。HIF-1 α は通常の酸素分圧化では、プロリン水酸化酵素により HIF-1 α のプロリンが水酸

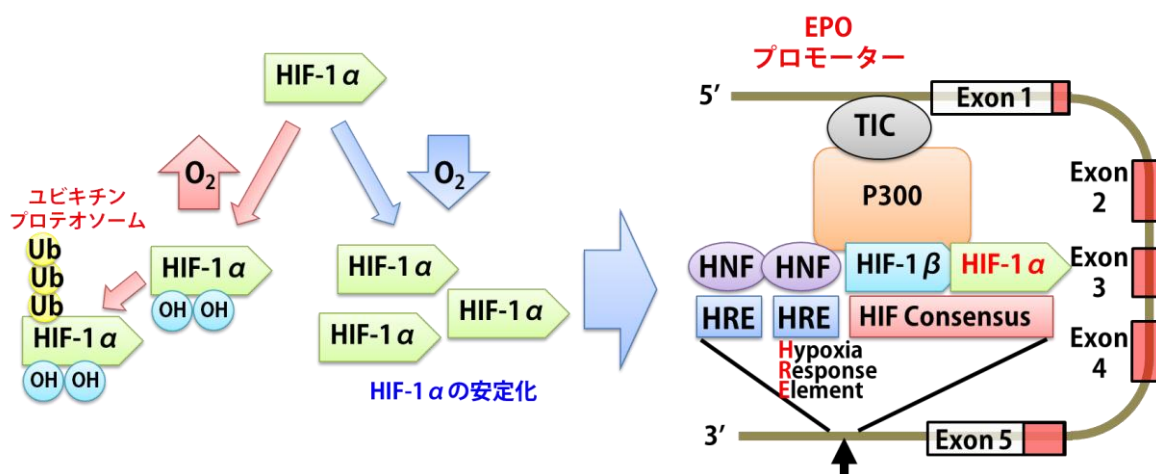


図 1-3 肝臓での HIF による EPO 遺伝子の転写調節制御

低酸素下で、安定化した HIF-1 α は HIF-1 β とヘテロ二量体を形成し、EPO 遺伝子下流の HRE に結合することで、EPO 遺伝子の転写が促進する (Bunn *et al.*, 1998 より改変引用)。

化され、次いでVHL(Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein)を介したユビキチン化プロテオソームにより恒常的に分解されている。組織内酸素分圧が低下すると、HIF-1 α はユビキチン化が起こらず、細胞内に安定的に存在できるようになり、HIF-1 β とヘテロ二量体を形成し、核内へ移行する。EPO 遺伝子の近傍 3'下流には低酸素応答領域(Hypoxia response element, HRE)と呼ばれるエンハンサー領域が存在し、HIFs が結合することで、EPO 遺伝子の転写を促進する(図 1-2)(総説 Wang and Semenza, 1995; Bunn *et al.*, 1998)。しかし、上述の知見は肝臓由来の細胞株で研究されてものであり、腎臓における EPO 遺伝子発現制御機構ならびに腎臓 EPO 産生細胞の同定には至っていなかった。近年、トランスジェニックマウスを用いた研究により腎臓 EPO 産生細胞が同定された。EPO 遺伝子の翻訳領域に緑色蛍光蛋白質(green fluorescent protein, GFP)を組み込んだ遺伝子ベクターを取り込ませたマウスの解析によって、腎臓 EPO 産生細胞は神経性の間質細胞であることが明らかとなった(Obara *et al.*, 2008)。また興味深いことに、EPO 遺伝子 3'エンハンサー領域の HRE を欠失させたマウスでは、肝臓での EPO 遺伝子発現は誘導できないが、腎臓での EPO 遺伝子発現は誘導できることを見出した(Suzuki *et al.*, 2011)。つまり EPO 遺伝子 3'エンハンサー領域の HRE は腎臓 EPO 産生・分泌には必須でないことが示された。一方で、腎臓 EPO 産生細胞株が近年樹立され、siRNA 法を用いて HIF-1 α および HIF-2 α の機能を低下させると、EPO 遺伝子の発現および分泌が低下するという報告もある(Frede *et al.*, 2011)。上述した報告を統合すると、腎臓 EPO 遺伝子発現は HIFs に依存的ではあるが、HIFs が直接 EPO 遺伝子の転写を制御しないと考えられる。しかしながら、決定的な証拠は未だ得られていない。

1-3. 脊椎動物の赤血球造血制御

酸素運搬を担う赤血球は一部を除いて(南極に生息するアイスフィッシュとコウリウオ科の幼生)脊椎動物に共通して存在する(Schmidt-Nielsen, 1997)。しかしながら血球形態は、哺乳類とそれ以外で大きく異なる。哺乳類の赤血球は無核球体であるのに対し、哺乳類以外の赤血球は有核で紡錘系をしており、比較的大型である。1950年代より様々な動物で、形態学的な観察により造血巣の特定がなされている。鳥類と爬虫類は哺乳類と同様に骨髓造血を主体とするのに対し、両生類と魚類の造血器官は種によって脾臓、腎臓、肝臓など多岐にわたり、同じ魚類でも腎臓または脾臓(もしくはその両方)と種によって多様である(表 1-1)。さらに鳥類では、B 細胞の分化・増殖を担う組織として腸管に付属したファブリキウス嚢という鳥類固有な組織も存在する(総説 Ratcliffe, 2006)。表 1-1 のように脊椎動物の造血巣を俯瞰すると、個体発生とともに造血巣は腎臓、脾臓、肝臓に移行し、陸生動物になると骨髓造血をもつと推測される。

表 1-1 各動物の成体における造血巣と造血因子遺伝子の報告

動物 (学名)	造血器官	解析手法・文献	主要造血因子の遺伝子同定	
魚類	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>)	胸腺：T細胞 腎臓：赤血球, 栓球, 骨髓球, B細胞	総説 Chen and Zon, 2009	EPO (Chu <i>et al.</i> , 2007; Paffett-Lugassy <i>et al.</i> , 2007) M-CSF(Wang <i>et al.</i> , 2008) G-CSF(Liongue <i>et al.</i> , 2009) SCF (Hultman <i>et al.</i> , 2007) IL-4(Ohtani <i>et al.</i> , 2008) IL-15(Gunimaladevi <i>et al.</i> , 2007)
	ブラントラウト (<i>Salmo trutta</i>)	脾臓：赤血球, 白血球 腎臓：赤血球, 白血球	細胞形態観察 (Catton, 1951)	
	ヨーロピアンパーチ (<i>Perca fluviatilis</i>)	脾臓：赤血球, 白血球	細胞形態観察 (Catton, 1951)	
	ローチ (<i>Rutilus rutilus</i>)	腎臓：赤血球, 白血球	細胞形態観察 (Catton, 1951)	
	ギンブナ (<i>Carassius auratus langsdorfii</i>)	腎臓：造血幹細胞存在	造血幹細胞移植 (Kobayashi <i>et al.</i> , 2006; Kobayashi <i>et al.</i> , 2008)	
	トラフグ (<i>Takifugu rubripes</i>)			EPO(Chou <i>et al.</i> , 2004) G-CSF(Santos <i>et al.</i> , 2006) IL-2(Bird <i>et al.</i> , 2005a) IL-6(Bird <i>et al.</i> , 2005b) IL-7(Kono <i>et al.</i> , 2008) IL-15(Bei <i>et al.</i> , 2006) IL-21(Bird <i>et al.</i> , 2005a) IL-1 β (Fujiki <i>et al.</i> , 2000; Engelsma <i>et al.</i> , 2003) M17; IL-6 subfamily cytokines (Fujiki <i>et al.</i> , 2003)
	コイ (<i>Cyprinus carpio</i>)	腎臓：赤血球, 白血球, 栓球	細胞形態観察 (Kondera, 2011)	
両生類	ウシガエル (<i>Lithobates catesbeianus</i>)	腎臓：赤血球, 白血球 栓球 骨髓：赤血球, 白血球, 栓球	組織形態観察 免疫組織化学 (de Abreu Manso <i>et al.</i> , 2009)	
	アフリカツメガエル (<i>Xenopus laevis</i>)	肝臓：赤血球	免疫組織化学 赤芽球コロニー試験 (Nogawa-Kosaka <i>et al.</i> , 2011)	EPO(Nogawa-Kosaka <i>et al.</i> , 2010) SCF(Martin and Harland, 2004) IL-1 β (Zou <i>et al.</i> , 2000)
	キタクシイモリ (<i>Triturus cristatus</i>)	脾臓：赤血球 心臓：赤血球	細胞形態観察 (Garavini and Scandellari, 1974) PHZ による貧血誘導 (Frangioni and Borgioli, 1988)	
	エゾサンショウウオ (<i>Hynobius retardatus</i>)	脾臓：赤血球 (幼生期は脾臓・腎 臓・肝臓)	β グロビン遺伝子の in situ hybridization (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2000)	
	イベリアトゲイモリ (<i>Pleurodeles waltl</i>)	胸腺：(血球系譜不明) 脾臓：(血球系譜不明)	転写因子 Ikaros 遺伝子の 発現解析 (Boudarra <i>et al.</i> , 2002)	

表 1-1 つづき

	動物 (学名)	造血器官	解析手法・文献	主要造血因子の遺伝子同定
爬虫類	ニシキガメ (<i>Chrysemys picta</i>)	脾臓：赤血球 腎臓：赤血球 骨髄：赤血球	貧血回復期・低酸素時の Fe ⁵⁹ の臓器毎取り込み量測定 (Meints <i>et al.</i> , 1975)	
	ヨーロッパヌマガメ (<i>Emys orbicularis</i>)	肝臓：好中球 骨髄：赤血球	細胞形態観察 (Vasse and Beaupain, 1981)	
	カネヘビ (<i>Lacerta hispanica</i>)	骨髄：赤血球	電子顕微鏡観察 (Zapata <i>et al.</i> , 1981)	
	ボアコンストリクタ (<i>Boa constrictor</i>)	骨髄：赤血球	細胞形態観察 (Dabrowski <i>et al.</i> , 2007)	
	コーンスネーク (<i>Elaphe guttata</i>)	骨髄：赤血球	細胞形態観察 (Dabrowski <i>et al.</i> , 2007)	
	イエヘビ (<i>Lamprophis fuliginosus</i>)	骨髄：赤血球	細胞形態観察 (Dabrowski <i>et al.</i> , 2007)	
	アララカ (<i>Bothrops jararaca</i>)	骨髄：赤血球 脾臓：赤血球	細胞形態観察 (Dabrowski <i>et al.</i> , 2007)	
鳥類	ニワトリ (<i>Gallus gallus</i>)	骨髄：赤血球, 栓球 ファブリキウス嚢： B細胞	・ <i>in vitro</i> コロニー試験 (Dodge and Moscovici, 1973) ・ 造血因子添加による <i>in vitro</i> 血球細胞の増殖・分化誘導 (Schroeder <i>et al.</i> , 1993; Bartunek <i>et al.</i> , 2008)	TPO (Bartunek <i>et al.</i> , 2008) M-CSF (Garceau <i>et al.</i> , 2010) G-CSF (Santos <i>et al.</i> , 2006) GM-CSF (Avery <i>et al.</i> , 2004) SCF (Zhou <i>et al.</i> , 1993) IL-1 β (Weining <i>et al.</i> , 1998) IL-2 (Sundick and Gill-Dixon, 1997) IL-3 (Avery <i>et al.</i> , 2004) IL-4 (Avery <i>et al.</i> , 2004) IL-6 (Schneider <i>et al.</i> , 2001) IL-15 (Choi <i>et al.</i> , 1999) IL-21 (Rothwell <i>et al.</i> , 2012)
哺乳類	マウス (<i>Mus musculus</i>)	骨髄：赤血球, 栓球, 骨髄球, B細胞 胸腺：T細胞 (一部脾臓でも造血 がおこる)	総説 Orkin and Zon, 2008	EPO (Shoemaker and Mitscock, 1986) TPO (Lok <i>et al.</i> , 1994) M-CSF (DeLamar <i>et al.</i> , 1987) G-CSF (Tsuchiya <i>et al.</i> , 1986) GM-CSF (Gough <i>et al.</i> , 1984) SCF (Zsebo <i>et al.</i> , 1990) IL-1 α, β (Pennica <i>et al.</i> , 1985; Gray <i>et al.</i> , 1986) IL-2 (Fuse <i>et al.</i> , 1984) IL-3 (Fung <i>et al.</i> , 1984) IL-4 (Lee <i>et al.</i> , 1986) IL-5 (Kinashi <i>et al.</i> , 1986) IL-6 (Van Snick <i>et al.</i> , 1988) IL-7 (Namen <i>et al.</i> , 1988) IL-9 (Van Snick <i>et al.</i> , 1989) IL-11 (Morris <i>et al.</i> , 1996) IL-15 (Anderson <i>et al.</i> , 1995) IL-21 (Dumoutier <i>et al.</i> , 2000a)

表 1-1 つづき

動物 (学名)	造血器官	解析手法・文献	主要造血因子の遺伝子同定
哺乳類 ヒト (<i>Homo sapiens</i>)	骨髄：赤血球, 粒球, 白血球 胸腺：T細胞	William hematology / editors, Kaushansky et al., 8th ed.	EPO (Jacobs et al., 1985; Lin et al., 1985) TPO (Bartley et al., 1994; de Sauvage et al., 1994; Sohma et al., 1994; Kato et al., 1995) M-CSF (Kawasaki et al., 1985) G-CSF (Nagata et al., 1986) GM-CSF (Wong et al., 1985) SCF (Anderson et al., 1990; Williams et al., 1990) IL-1 α, β (Auron et al., 1984; March et al., 1985) IL-2 (Taniguchi et al., 1983) IL-3 (Yang et al., 1986) IL-4 (Yokota et al., 1986) IL-5 (Azuma et al., 1986) IL-6 (Yasukawa et al., 1987) IL-7 (Goodwin et al., 1989) IL-9 (Yang et al., 1989) IL-11 (Kawashima et al., 1991) IL-15 (Grabstein et al., 1994) IL-21 (Dumoutier et al., 2000b)

また 2000 年代に入ると、様々な動物のゲノムが解読されたことを背景に、造血因子の遺伝子が同定され始めた。2004 年に、哺乳類以外の動物では初めてとなる EPO 遺伝子が、トラフグ (*Fugu rubripes*) で同定された (Chou et al., 2004)。トラフグ EPO 遺伝子の主な発現臓器は心臓であり、哺乳類の主な発現臓器である腎臓と異なる。また *in vitro* の発現解析により、EPO 遺伝子は低酸素によって発現の上昇が確認されなかった。次いで、ゼブラフィッシュで EPO 遺伝子の同定が、ほぼ同時期に 2 つのグループから報告された (Chu et al., 2007; Paffett-Lugassy et al., 2007)。Paffett-Lugassy らの報告によると、ゼブラフィッシュ EPO の主要な発現臓器は心臓であり、低酸素環境に曝露しても EPO の発現量が正常時の 2 倍程度にしか増加しない。また會沢や小坂らによって、無尾両生類アフリマツメガエル (*Xenopus laevis*; 以下ツメガエル) の

EPO および EPOR が同定された(Aizawa *et al.*, 2005; Nogawa-Kosaka *et al.*, 2010)。成体ツメガエルの赤血球造血巣は肝臓であり, 主な EPO 産生臓器は肺, ついで肝臓である。また哺乳類 EPO の *in vivo* 活性発揮には *N*-結合型糖鎖の存在が重要であるが, ツメガエル EPO には *N*-結合型糖鎖が存在せず, ツメガエル EPO の血中半減期は極めて短いものであると予想される。EPO 主要産生臓器が肝臓であり, 赤血球前駆細胞も肝臓に存在することから, EPO による赤血球造血は肝臓内の傍分泌によって制御されるという仮説を提唱するに至った(図 1-4)(Nogawa-Kosaka *et al.*, 2010; Nogawa-Kosaka *et al.*, 2011)。

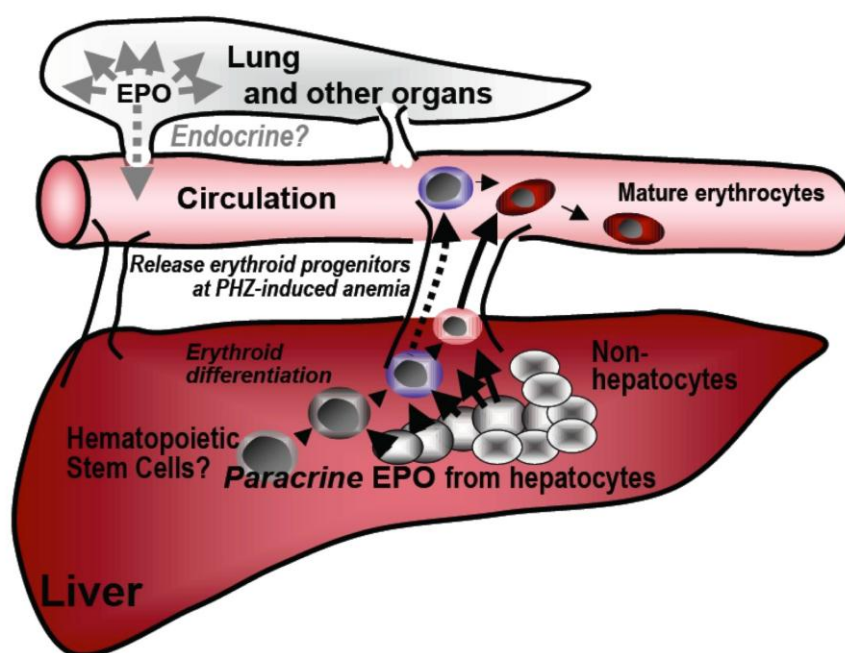


図 1-4 アフリカツメガエル肝臓における赤血球産生

アフリカツメガエルの成体では, 赤血球造血因子EPOは肝臓の肝実質細胞で発現する。また肝臓にEPOR発現赤血球前駆細胞が存在する。よってEPO-EPOR系による赤血球造血は傍分泌性に調節を受けると考えられる(Nogawa-Kosaka *et al.*, 2010 より改変引用)。

以上のように、動物によって造血器官が異なり、EPO と EPOR による赤血球造血の種固有な機序の存在が明らかになりつつある。種普遍的または固有な造血制御については未解明な課題が多い。例えば、血球系譜・血球形態の違いと、造血因子調節の関連が挙げられる。哺乳類において IL-5 は好酸球造血において中心的役割を担う。一方、ニワトリにおいては IL-5 が偽遺伝子となっていることが報告されている(Avery *et al.*, 2004)。加えてニワトリでは、好中球は強い好酸性を示し、異好性白血球(偽好酸球)と呼ばれている(Caxton-Martins and Daimon, 1976)。IL-5 の偽遺伝子化と異好性白血球の因果関係は不明であるが、進化の過程で造血因子遺伝子の付加または欠失によって、種間での血球系譜・血球形態の違いが生じた可能性がある。

また動物による造血巣の違いも、課題として挙げられる。骨髄造血を行う動物では骨芽細胞が造血幹細胞を維持する微小環境として重要ではあるが、肝臓、脾臓、腎臓を造血巣とする動物では骨芽細胞の代わりに、他の細胞が微小環境を担うと想像されるが、詳細は不明である。本課題は、発生過程で造血巣が移行する哺乳類造血にも通じる。ヒトの胎生期において、卵黄嚢で造血が始まる(一次造血)。その後、胚体内の肝臓や脾臓で二次造血が始まり、卵黄嚢での造血は消失する。そして、骨髄での造血に徐々に移行変わっていき、出生時には造血の場は完全に骨髄となり、そこで一生にわたり血球を供給することとなる(図1-5)。発生過程における造血巣、例えば胎肝での造血微小環境に関する研究で

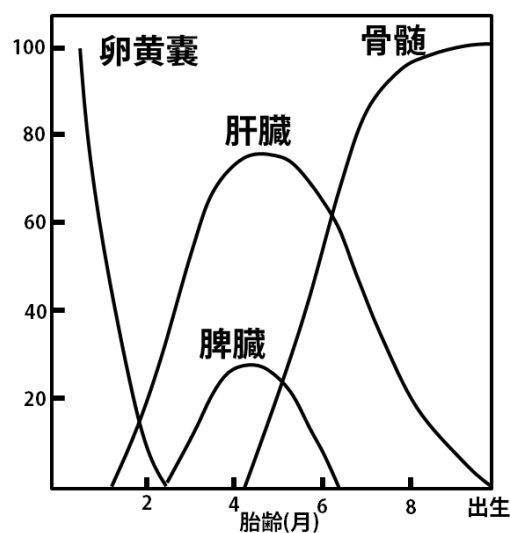


図 1-5 発生過程におけるヒト造血巣の移動
縦軸は造血の程度の相対値を示す(浅野ら
監修, 三輪血液病学より改変引用)。

は、近年胎肝の間質細胞が SCF を発現しており、造血幹細胞を維持していることが明らかにされたが(Chou and Lodish, 2010)、接着因子など他の因子の関与については不明な点が多い。胎肝造血さらには脾臓、腎臓、肝臓を造血巣とする成体動物における造血至適環境がどのような分子基盤で構築されているのかが、脊椎動物造血制御の共通の課題である。

さらに環境変化に対して循環血球数ならびに造血がどのように応答するかについても不明な点が多い。例えば、赤血球造血は、赤血球が酸素運搬の役割を担うという観点から、低酸素環境や高山地帯での解析例は存在するが、他の環境変化についての解析例は乏しい。環境温度変化もその一つである。

1-4. 動物の環境温度応答

脊椎動物は環境温度変化応答の仕組みから、外温動物(魚類, 両生類, 爬虫類)と内温動物(鳥類, 哺乳類)に大別される*。大きな違いは、外温動物は熱源が環境温度に依存するのに対し、内温動物は環境温度によらず常に一定の体温を保つ体温調節系を備えている点である。

外温動物は低温環境下に曝されると、体温が低下し、基礎代謝量、代謝消費量が減少、結果活動性が低下する(総説 Salt, 1949)。一方、内温動物は低温環境下に曝露されると、まず脳内視索前野が温度感受器として作動する。その後、ふるえによって筋肉を収縮して、熱産生を促進する。また皮膚血管系を

*本論文では外温・内温動物を、環境温度変化に対する応答性を分類する用語として使用するが、すべての動物を分類できる正確な用語ではない。例えば魚類マグロは、一部筋肉の温度を水温より高く保つ機能を備え、低水温下でも速く泳ぐことを可能にしている(Carey and Teal, 1966, 後述)。よってマグロのような動物を、体温が外気温に依存する「外温動物」に分類することはできない。同様の用語で冷血・温血も存在するが、これも不正確である。熱帯地方に生息する魚や砂漠に生息するトカゲなどは、哺乳類。鳥類よりも高い体温を示すことがあり、これらを「冷血」と分類することは正確ではないと考えられる。

収縮することで、体内の熱放出を抑制する。さらに交感神経から分泌されるノルエピネフリン(ノルアドレナリン)や脳下垂体-甲状腺系から分泌される甲状腺ホルモンによって、末梢組織・褐色脂肪・筋肉などで酸素消費量増大に伴い、ATP合成量が増加する。さらにATP分解酵素発現量も増加し、結果としてATP分解量も増加する。このようにATP合成および分解促進によって熱が生じ、体温上昇につながる。以上のように、内温動物では神経系・内分泌系・循環器系など様々な調節系を働かせることで、低温環境下でも活動することが可能である(総説 Gordon, 1990)。

さらに、生息する環境にあわせて低温環境へ適応する独特な仕組みを備えている動物も存在する。北極や南極に生息するホッキョクグマ(*Thalarctos maritimus*)は、高い断熱性を示す厚い皮下脂肪層を備えており、低い外気温化や氷水中内でも体温を維持し、活動することができる(Oritsland, 1970)。またマグロは、低水温でも速く泳ぐために、赤筋を高い温度に維持するため独特な熱交換器を有している。筋肉に血液を供給する血管は、動脈が逆方向に流れる静脈と密に絡み合い、よりをかけたような構造(奇網)を取っている。鰓から流れる動脈血は水と同じ温度であるが、奇網により筋肉からの静脈血から熱を受け取る。結果、マグロは泳いでいる水温よりも15°Cほど温かく筋肉の温度を保つことができる。筋肉を高い温度に保つことで筋出力(単時間当たりの筋収縮数)を増加させ、水温に依存することなく速く泳ぐことが可能となる(図 1-6)(Carey and Teal, 1966)。

このように動物は、環境の温度変化に対して、個々が生きている状況に合わせて、様々な調節系を働かせることで適応する。環境温度変化に応じた調節系の一つ一つを見出していくことは、生理学において非常に意義が高く、さらに種間で応答の仕組みを比較することで、一般生理学の原理を理解することがで

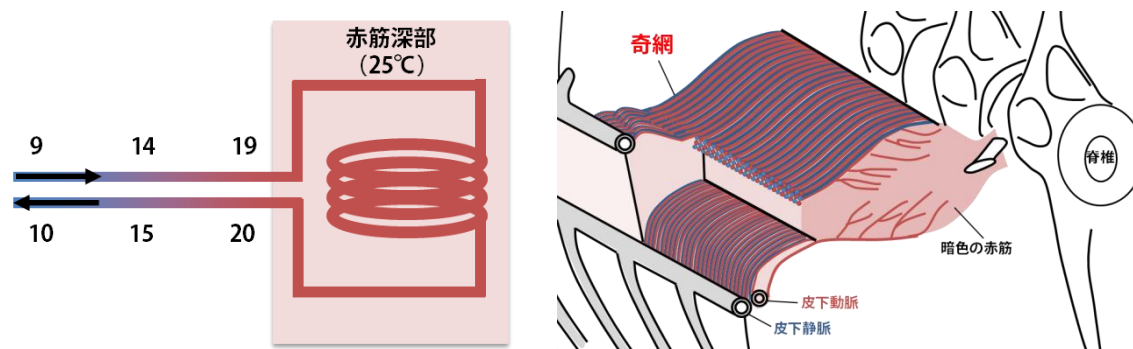


図1-6 マグロ赤筋における奇網構造

左は対向流熱交換器のモデル。動脈と静脈が隣接することで、熱が流出する静脈から流入する動脈へと伝道される。結果、動脈からくる低い温度は赤筋深部まで伝わらず、赤筋深部は水温よりも高い温度を保つことが可能である。右はマグロにおける奇網構造の概略図。動脈と静脈が密に隣接している様子がわかる(Carey and Teal, 1966より改変引用)。

きる。1-1~5 で述べたように、造血系は脊椎動物共通の基幹系であり、個体の恒常性維持には不可欠である。特に赤血球造血系は、酸素を組織へ運搬する上で、体内の酸素環境(酸素消費量の変動など)にあわせて厳密に制御されている。よって動物個体の代謝変動が著しく起こる低温環境下に対し、赤血球造血系が何らかの応答をし、低温環境への適応するための一つの調節系として働いているのではないかと考えた。

1-5. 造血の環境温度応答

実際に、古くから造血系と環境温度の接点は報告されている 1962 年に Cline と Waldmann は、ヒョウガエル(*Rana pipiens*)を 5°C の環境下に曝露すると、HCT 値が減少することを見出した(Cline and Waldmann, 1962)。また鉄同位体 Fe^{59} を用いた解析では、低温飼育群の循環赤血球数の Fe^{59} の取り込みが、常温飼育群と比較し減少することを見出し、赤血球造血機能の低下が一因であると結論している(Cline and Waldmann, 1962)。またココノオビアルマジロ(*Dasypus novemcinctus*)においては、甲羅の皮骨髄内で造血が行

われているが、環境温度変化が低下する冬期において、皮骨髄内の造血細胞数が低下することが報告されている(Weiss and Wislocki, 1956)。さらにTavassoliらは興味深い現象を見出した(Tavassoli *et al.*, 1979)。出生直後のラット尾骨髄では、造血が行われている。しかし間もなく、尾骨髄の造血組織が脂肪組織に置き換わり、最終的に造血が行われなくなる。そこで出生直後のラット尾の先端部を、外界温度よりも高い腹腔内に移植する実験が行われた。成体に成長後の剖検結果、腹腔内に移植された尾骨髄では造血能が保持されていた。アルマジロおよびラットの報告から、内温動物においても環境温度に応答した造血機序が存在し、且つ造血器官そのものが環境温度変化に応答する仕組みを有することが示唆された。

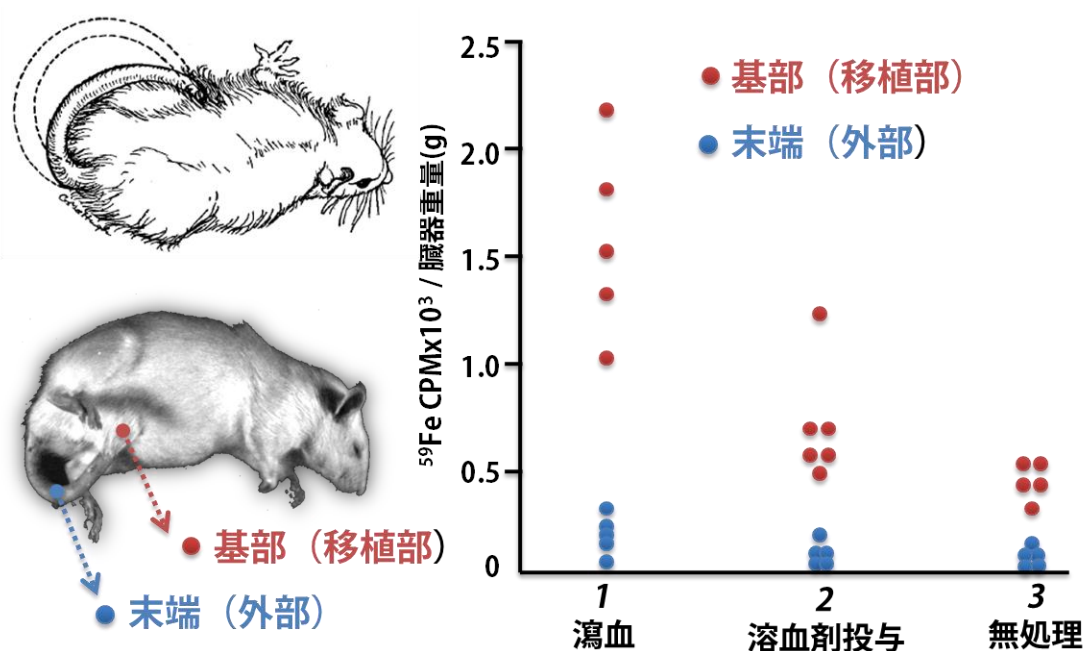


図1-7 ラット尾部移植による尾骨髄造血能の維持

(右)出生直後のラット尾の先端部を、外界温度よりも高い腹腔内に移植する。成体に成長後の、移植部と末端部における Fe^{59} の取り込み量を測定することで、造血能を定量的に評価した。結果、腹腔内に移植された尾骨髄では造血能が保持されていた(左)(Tavassoli *et al.*, 1979より改変引用)。

低温曝露や季節変動に伴う循環血球数の減少が複数報告されている(表1-2)。冬期のヨーロッパノサマガエル(*Rana esculenta*)では、循環赤血球数とヘモグロビン値が減少する(Sinha, 1983)。またゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)では、低温環境下で赤血球造血関連因子遺伝子の発現が低下すると報告されている(Kulkeaw *et al.*, 2010)。一方、内温動物のラット(*Rattus norvegicus*)を5°Cの低温環境化に順化させると、循環赤血球数は増加し、白血球数と血小板数は減少する(Deveci *et al.*, 2001)。5°Cで短日処理し、冬眠を誘導したハムスター(*Mesocricetus auratus*)では循環血小板数が減少するが、赤血球数と白血球数には変化が見られない(Deveci *et al.*, 2001)。以上のように低温環境および季節変化に伴う循環血球数、造血変動は報告されているが、個々独立した現象の観察にとどまっている。すなわち、低温環境に曝された後、一個体内で造血機序がどのように変動して(例えば、造血前駆細胞数や血球代謝速度の変化など)、循環血球数の増減に至るかは不明である。

また体温低下に伴う貧血あるいは汎血球減少症の症例も報告されている(Sadikali and Owor, 1974; O'Brien *et al.*, 1982; Daly and Rosenfarb, 1991; Lo *et al.*, 2002; Collins and Danzl, 2006)。しかしながら低体温症における循環血球数減少の機序は、未だ明らかにされていない。研究が進んでいない原因として、慢性低体温症動物モデルの作出が技術的に困難である点あげられる。マウスを低体温にする場合、麻酔や薬剤投与(ベザンフィブラート; bezafibrate)などが用いられるが、内因性の熱産生機序の働きにより、体温低下は一過的である。低体温症に伴う様々な生理応答を明らかにするためには、薬剤に依存しない動物モデル作出が必須である。この課題に対して我々は、低温曝露により低体温となる外温動物を用いて造血能の影響を調べることで、低体温時における血球減少症の原因を解明できると考えた。

表 1-2 造血の季節・環境温度応答に関する報告

(青枠は外温動物, 赤枠は内温動物)


環境要因	動物(学名)	解析 (温度・季節)	末梢血所見	造血系解析所見	文献
季節変動	ココノオビアルマジロ (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	冬期	—	皮骨内の 血球細胞数の減少	Weiss and Wislocki, 1956
	ヨーロッパノサマガエル (<i>Rana esculenta</i>)	冬期	RBC,HGB 低下	—	Sinha, 1983
	ヨーロッパバイソン (<i>Bison bonasus</i>)	夏季	赤血球径の増大	—	Gill, 1989
	ヨーロッパヤマカガシ (<i>Natrix natrix</i>)	冬期	RBC,HGB,HCT 低下	—	Wojtaszek, 1992
	バンドウイルカ (<i>Tursiops truncatus</i>)	冬期	RBC,HGB,HCT 低下	—	Hall et al., 2007
低温曝露	ニシキガメ (<i>Chrysemys picta</i>)	2°C	HCT 低下	—	Musacchia and Sievers, 1956
	ヒョウガエル (<i>Rana pipiens</i>)	5°C	HCT 低下	・赤血球寿命の延長 ・末梢赤血球への Fe ⁵⁹ 取り込み量低下	Cline and Waldmann, 1962
	カニンガムイワトカゲ (<i>Egernia cunninghami</i>)	8°C	HCT,HGB 低下	—	Maclean et al., 1975
	ヨコバイガラガラヘビ (<i>Crotalus cerastes</i>)	20°C	RBC,HGB,HCT 上昇	—	Macmahon and Hamer, 1975
	インデアンレッドキャット (<i>Heteropneustes fossilis</i>)	18°C	RBC,HGB,HCT, WBC 低下	—	Pandey, 1977
	ウシガエル (<i>Rana catesbeiana</i>)	5°C	RBC,WBC,TBC 低下	—	Wang and Herman, 1996
	ラット (<i>Rattus norvegicus</i>)	5°C	RBC,HGB,HCT 上昇	—	Deveci et al., 2001
	ニワトリ (<i>Gallus domesticus</i>)	10°C	HGB,HCT 上昇	—	Blahova et al., 2007
	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>)	17°C	—	赤血球造血関連因子 遺伝子の発現量低下	Kulkeaw et al., 2010
その他	ヨーロッパハムスター (<i>Cricetus cricetus</i>)	冬眠	WBC,TBC 低下	—	Reznik et al., 1975
	ラット (<i>Rattus norvegicus</i>)	尾部を 腹腔内へ移植	—	尾部造血が移植部で 維持される	Tavassoli et al., 1979
	ゴールデンハムスター (<i>Mesocricetus auratus</i>)	冬眠	TBC 低下	—	Deveci et al., 2001

1-6. 本研究のねらい

低温環境に応答する仕組みは外温動物と内温動物で異なる。特に、動物の活動性ならびに組織酸素消費量については先に違いを示した。赤血球造血は体内酸素恒常性を維持する機能を担っているため、低温環境に応答する制

御機構が、外温・内温動物で異なると予想される。実際、循環赤血球数の変動については、内温動物(ラット, ニワトリ)では赤血球数が増加する傾向が、外温動物では赤血球数が減少する傾向がそれぞれ観察されている。本研究を遂行するに当たり、適切なモデル動物を選別する必要がある(表 1-3)。外温動物の中で最も造血研究が盛んであるのが、ゼブラフィッシュである。しかし、ゼブラフィッシュは熱帯魚であるため、個体の低温環境に応答する生理機序を解析するモデル動物としては適切ではない。一方で、様々な環境に適応しやすい小型魚類として、メダカが注目されている。メダカはゼブラフィッシュと異なり近交系が存在し、基礎生物学研究所が中心となるナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)により、様々な系統魚並びに遺伝子資源の提供が可能となっている。しかしながら、小型魚であるため、連続採血が困難であり一個体の循環血球数の継時的な変動を追うことが難しい。一方、我々が造血研究を進めているツメガエルは体が比較的大きく、連続採血が容易であるため、低温曝露後の循環血球数の変動を追うことが可能である。内温動物では、齧歯類マウス(*Mus*

表 1-3 モデル動物の比較

	外温動物			内温動物	
	ゼブラ フィッシュ (<i>Danio rerio</i>)	メダカ (<i>Oryzias latipes</i>)	アフリカ ツメガエル (<i>Xenopus laevis</i>)	マウス (<i>Mus musculus</i>)	ラット (<i>Rattus norvegicus</i>)
					
実験血液学の知見	多数	少数	少数	多数	多数
循環血液量 (連続採血)	3 μ L (\times)	3 μ L (\times)	4 mL (\circ)	1 mL (\circ)	10 mL (\circ)
血球鑑別 単離法	あり (トランスジェニック)	なし	一部あり (抗体)	あり (抗体)	一部あり (抗体)
ゲノム	2007年公開 (ドラフト)	2007年公開 (ドラフト)	2012年公開 (ドラフト)	2002年解読	2004年解読
低温飼育	不可能	可能	可能	可能	可能

musculus) が血液学研究のモデル動物として発展し、ラットと比較して実験血液学的解析手法が確立されている。以上より本研究では、低温曝露の赤血球数造血の変動を詳細に解析し、循環赤血球数変動に至るまでの過程を外温動物ツメガエルおよび内温動物マウスを用いて明らかにこととした。

【第二章】 ツメガエル低温曝露後の循環血球数変動

2-1. 序論

倉持らは(Kuramochi *et al.*, 2006), ツメガエルを 10°C の環境下で 153 日間飼育し, その間循環血球数の変動を解析した。その結果, 10°C の環境下に移行後, 循環赤血球数が徐々に減少し, 49 日目には初期値の約 70%となった。さらにその後, 低値を維持した。白血球および栓球数も同様の減少を示し, ツメガエルは低温環境下で慢性的な汎血球減少症を呈することを見出した(図 2-1)。生理機序の解析を着手する上で, 長期間の実験モデルでは困難である。そこでまず, 生理機序モデルに適した短期低温曝露の実験系を立ち上げることとした。著者が行った予備実験の結果から, 5°C の低温環境に曝露することで, 1 日という短期間で血球数が減少することがわかった。そこで, 低温曝露後の循環血球数の変動を継時的に観察し, 後の造血解析を行うための実験モデルを確立することとした。また低温から常温再び移行することで, 血球数が回復するか否かも検討することとした。一方で, 循環血球数の変動が血漿量の変動に依存する可能性も挙げられる。血液の成分は大きく血球成分と血漿成分に分けられる。低温曝露後, 血漿量が増加し, 血球成分が希釈された結果, 循環血球数が見かけ上減少することも考えられる, そこで, 低温曝露前後のツメガエルの循環血漿量を測定し, 比較することで循環血球数の変動と循環血漿量の因果関係を明らかにすることとした。

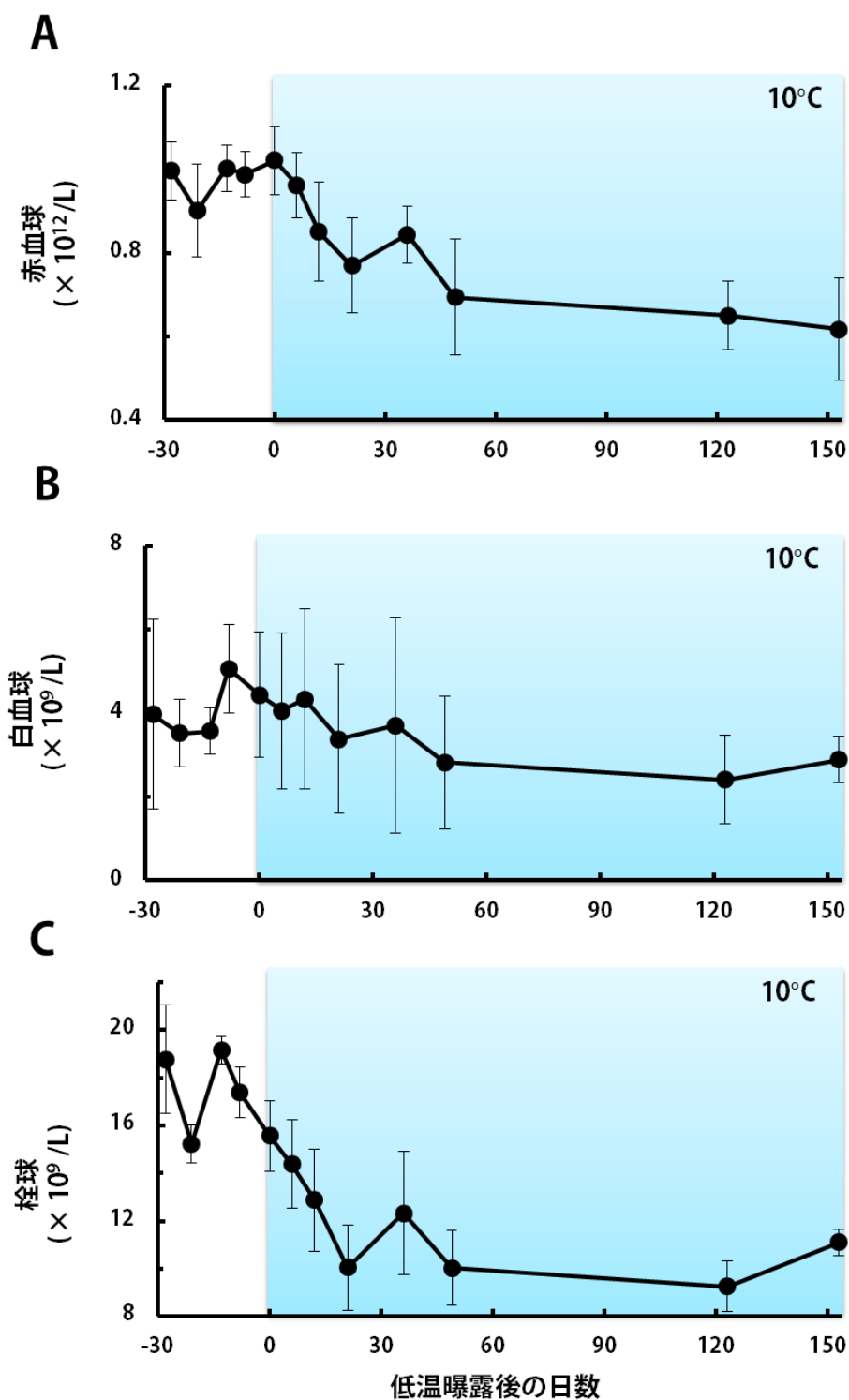


図2-1 長期低温曝露による循環血球数の変動

10°Cの環境下で150日間以上、継時的に飼育し、循環血球数を計数した。赤血球(A)、白血球(B)、栓球数(C)いずれも慢性的な減少傾向が見られた(Maekawa *et al.*, *J Exp Biol*, 2012. より改変引用)。

2-2. 材料および方法

2-2-1. 動物

成体の雄のツメガエル(体重 30-40 g)を, Aquatic Animal Supply(埼玉県三郷市)より購入し, 実験開始まで 22°C(常温)の水温化で飼育した。低温飼育時は1匹のツメガエルにつき, 1 Lの水槽で飼育し, 5°Cに設定した個別動物飼育装置(日本医化器械製作所)内に計5匹移動した。そのまま5日間飼育し, その後, 再び22°Cの環境に戻した。

2-2-2. 採血と血算

0.5M EDTA 溶液(同仁化学)で通液したヘマトクリット管(ドラモンド)に注射針 27G(テルモ)を接続したものを, ツメガエルに心穿刺することで血液を50-100 μ L 採取した。また採取した血液は EDTA-2Na 溶液と混和させた。血算は Shaw の希釈液(Hadji-Azimi *et al.*, 1987)で適宜希釈し, 血球計算版を用いて, 赤血球, 白血球, 栓球数を測定した。ヘモグロビン量は自動血球計算機(Sysmex, F-820)を用いて測定した。また血液を充填したヘマトクリット管を15ml 遠心チューブに入れ, 2400 g で 5 分間遠心した。遠心後, 血球部分と血漿部分の長さからヘマトクリット値を算出した。さらに MCV(平均赤血球容積), MCH(平均赤血球ヘモグロビン量), MCHC(平均赤血球ヘモグロビン濃度)を得られた赤血球数, ヘモグロビン値, ヘマトクリット値からそれぞれ算出した。

2-2-3. 循環血漿量の測定

循環血漿量の測定はエバンスブルー溶液希釈法を用いた。10 mg/ml に調整したエバンスブルー溶液(和光純薬)を0.1 mL心投与した。投与1時間後に EDTA-2Na 加血を採取し, 300 g で遠心後, 血漿成分を回収した。エバンス

ブルー溶液の希釈系列(0-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)と 620 nm の吸光度を用いて、血漿中のエバンスブルー濃度を測定した。投与前後のエバンスブルーの希釈率をもとに、循環血漿量を決定した。

2-3. 結果

2-3-1. 低温曝露ツメガエルにおける循環血球数の変動

ツメガエルを 5 日間 5°C で飼育し、その後再び 22°C に戻した。この間、血液を経時的に採取し、血算の結果を図 2-2 に示した。循環赤血球数は低温曝露後 1 日目に、0 日目と比較して約 30%減少した。その後、循環赤血球数は 5 日目まで低値を維持し、22°C に戻すと 0 日目とほぼ同程度まで回復した。白血球数は低温飼育後、著しく減少し、3 日後には初期値の約 40%となった。また 22°C の常温飼育に戻すと回復傾向を見せたが、初期値よりも高い値を示した。栓球数は、低温飼育 3 日および 5 日後に、初期値の約 20%にまで減少した。その後、22°C に戻すと、9 日目には初期値にまで回復した。

さらに低温曝露後の赤血球恒数の変動を表 2-1 に示した。低温曝露後 5 日目に RBC の減少と共に、HGB と HCT の有意な低下が見られた。また常温飼育に戻すことで、HGB と HCT の回復傾向が見られた。MCV, MCH, MCHC については低温曝露前後で有意な増減は観察されなかった。

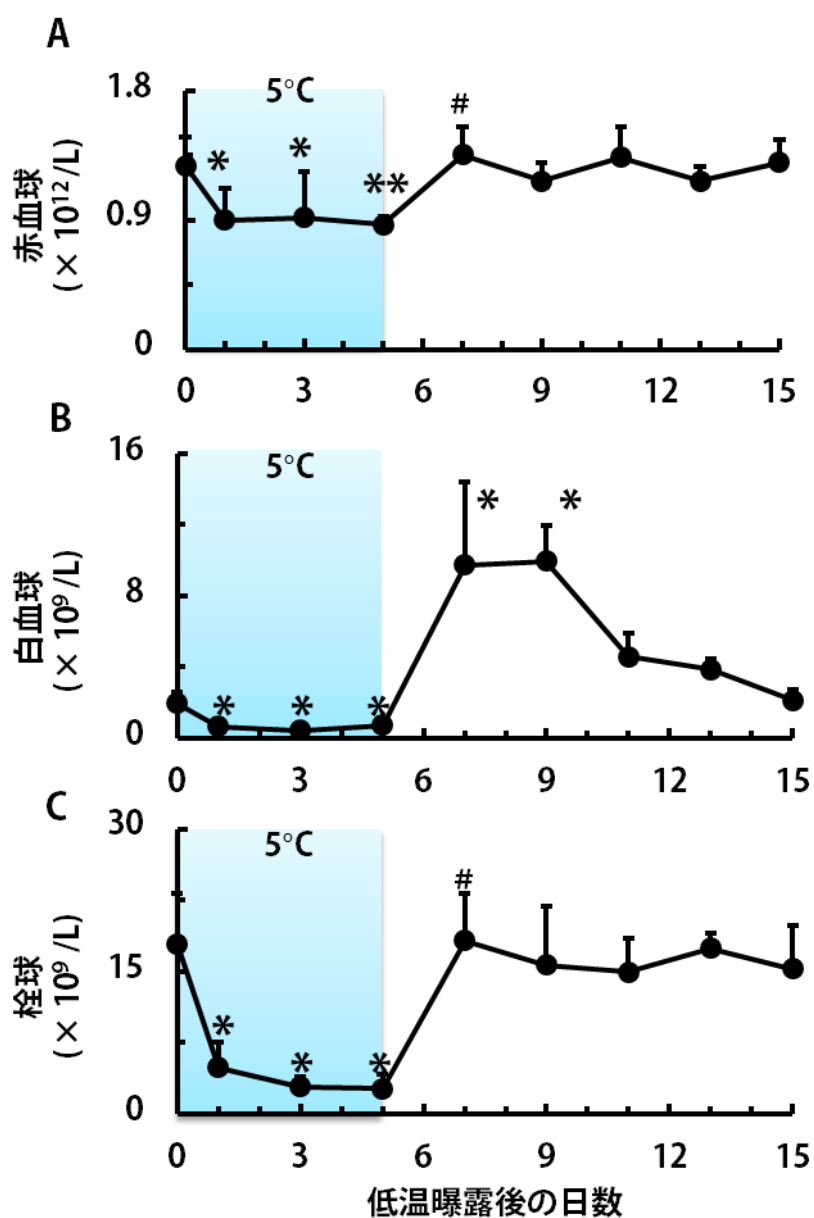


図2-2 5°Cの低温曝露後の循環血球数の変動

5°Cの低温曝露後5日目に再び常温に戻し、この間継時的に循環血球数の変動を解析した。赤血球 (A), 白血球 (B) 栓球 (C)。*0日目と比較し $p < 0.05$, **0日目と比較し $p < 0.01$, #5日目と比較し $p < 0.05$ をそれぞれ示す(Maekawa *et al.*, J Exp Biol, 2012. より改変引用)。

表 2-1 5°C の低温曝露後の赤血球恒数

日数	RBC ($\times 10^{12}/L$)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
0日目	0.96 \pm 0.08	15.2 \pm 1.7	22.0 \pm 4.1	231.0 \pm 48.7	159.6 \pm 0.08	70.9 \pm 14.9
5日目	0.46 \pm 0.09**	7.0 \pm 2.6*	14.9 \pm 2.3*	333.1 \pm 93.3	150.4 \pm 36.9	49.1 \pm 22.0
7日目	0.87 \pm 0.24#	11.1 \pm 3.2	18.9 \pm 6.0	222.1 \pm 57.3	127.8 \pm 0.08	63.1 \pm 27.6

*0日目と比較し $p < 0.05$, **0日目と比較し $p < 0.01$, #5日目と比較し $p < 0.05$ をそれぞれ示す(原出典:Maekawa *et al.*, J Exp Biol, 2012)。

2-3-1. 低温曝露ツメガエルにおける循環血漿量の変動

低温曝露後の循環血球数の減少が、循環血漿量の変動に依存するか否かを検証する必要がある。常温(22°C)と低温でそれぞれ5日間飼育したツメガエルを対象にエバンスブルー溶液希釈法による循環血漿量の測定を行った(図 2-3)。その結果、常温飼育群では75.3 ($\mu\text{L/g B.W.}$)に対し、低温飼育群では73.9 ($\mu\text{L/g B.W.}$)と顕著な違いは見られなかった。

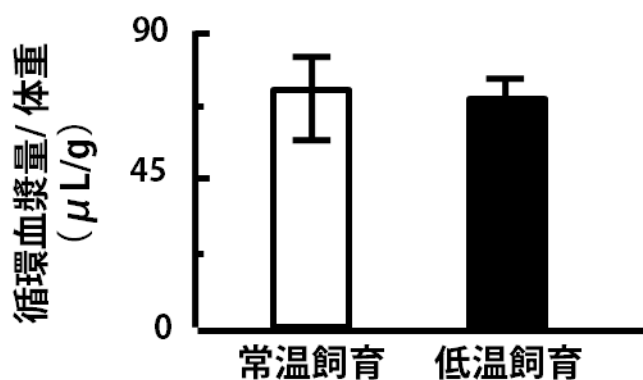


図2-3 循環血漿量の測定

常温および低温でそれぞれ5日間飼育したのち、エバンスブルー法にて循環血漿量を測定した。常温と低温で循環血漿量に違いは見られなかった。

2-4. 考察

ツメガエルを 5°C の環境下で飼育することで、汎血球減少症となることを見出した。常温・低温でそれぞれ 5 日間飼育し、それぞれの循環血漿量を比較したが、変化は見られなかった。したがって循環血球数の減少は、循環血漿量の増加によらないことが明らかとなった。すべての血球が減少したことから、各血球系譜の造血能の変動でだけではなく、低温曝露によって共通前駆細胞さらには造血幹細胞の分化・増殖にも影響が及んだと考えられる。また低温飼育から常温飼育に戻すことで可逆的に回復することが明らかとなった。本結果から、造血機序が低温に応答して、循環血球数を調節することが示唆され、環境の温度変化に応じて、循環血球数を調節することがツメガエルにとって重要な機序であると考えられる。赤血球数の変動に着目すると、低温曝露後 1 日以内に減少する急性期と、低温曝露の間、低値を維持する慢性期に分けられる。そこで、第三章では、急性期の赤血球減少について特に赤血球代謝速度の変化に着目して解析を行った。第四章では慢性期の赤血球数低値維持について赤血球造血能や造血巣中の赤血球系細胞の分布解析を行った。

【第三章】 ツメガエル低温環境曝露後の赤血球破壊亢進

3-1. 序論

本研究では低温曝露後の血球数減少について特に赤血球数減少症に至る赤血球造血の変動について解析を行った。造血機序の解析に先立ち、定常時のツメガエルにおける赤血球代謝回転速度、赤血球寿命を把握する必要がある。ヒトの赤血球寿命は約 120 日であり(Finch *et al.*, 1949), 全循環赤血球数 20 兆個の内, 1 日に約 2000 億の赤血球が造られ, 同時に約 2000 億個の赤血球が破壊される。その他いくつかの動物について赤血球寿命は報告されている。マウスは 40 日(Van Putten, 1958), ウサギは 55 日(Suzuki and Dale, 1987), ニワトリは 30 日(Rodnan *et al.*, 1957), ヒョウガエルは 200 日(Cline and Waldmann, 1962), そしてギンブナは 270 日(Fischer *et al.*, 1998)である(表 3-1)。このように動物種によって赤血球寿命は異なる。ツメガエルの赤血球寿命に関してはこれまで報告がない。本研究では, 放射同位体実験を必要とせず, フローサイトメトリーによる標識血球を定量的に解析できる, *in vivo* ビオチン標識法により血球寿命を測定することとした。

表 3-1 動物の赤血球寿命と測定法

動物種	寿命 (日)	測定手法	文献
ヒト	120	標識 Fe 代謝	Finch <i>et al.</i> , 1949
マウス	40	DFP ³² 標識	Van Putten, 1958
ニワトリ	30	Na ₂ Cr ⁵¹ O ₄ 標識	Gerald <i>et al.</i> , 1957
ウサギ	55	ビオチン標識 (<i>ex vivo</i>)	Suzuki <i>et al.</i> , 1987
ヒョウガエル	200	DFP ³² 標識	Cline <i>et al.</i> , 1962
ギンブナ	270	PKH 26-GL 標識	Fischer <i>et al.</i> , 1998

加えて低温曝露後の急性的な赤血球減少の原因について、赤血球代謝（赤血球破壊）亢進によるものかを検証した。赤血球代謝に関する知見は哺乳類で得られている。血液循環中の老化赤血球または損傷赤血球は、脾臓や肝臓内の貪食細胞に貪食される。その後、ヘモグロビンからヘムに代謝される。ヘムはヘム分解酵素（HMOX1）およびビリベルジン還元酵素（BLVRA）の作用によりビリルビンまで代謝される（図 3-1）。赤血球の貪食過程において、*Hmox1* や *Blvra* の mRNA 発現量の増大が報告されている(Knutson *et al.*, 2003)。加えて Scavenger receptor class B, type I 遺伝子欠損マウスにおいては、赤血球寿命低下に伴い、正常マウスと比較して赤血球代謝速度が亢進するが、肝臓や脾臓での *Hmox1* や *Blvra* の mRNA 発現量が増加している(Meurs *et al.*, 2005)。またツメガエル肝臓および脾臓において、赤血球が貪食を受けた赤血球の様子が観察されている(Chegini *et al.*, 1979)。これら知見を踏まえ、低温曝露後ツメガエルの急性的な赤血球減少は、赤血球破壊亢進が一因であるかを検証するため、赤血球代謝に関わる酵素群の遺伝子発現量

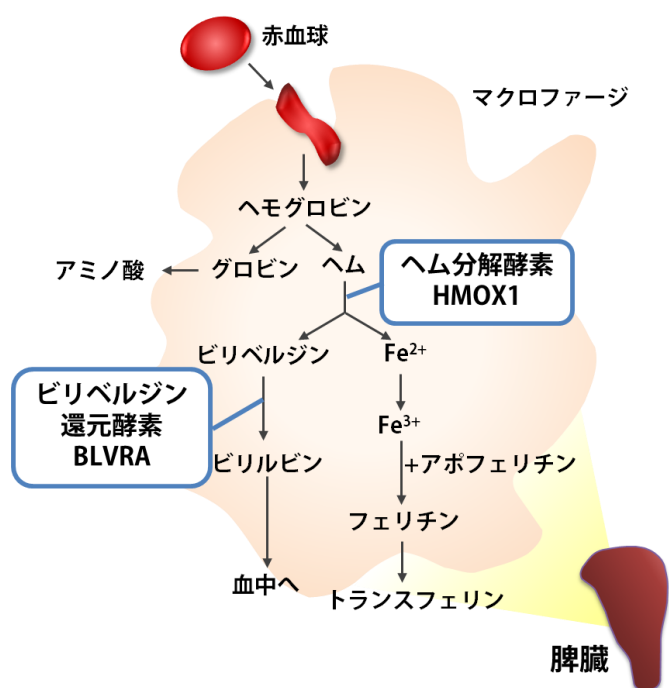


図 3-1 哺乳類における赤血球代謝経路

血液循環中の老化赤血球または損傷赤血球は、主に脾臓の貪食細胞に貪食される。その後、ヘモグロビンからヘムに代謝される。ヘムはヘム分解酵素（HMOX1）およびビリベルジン還元酵素（BLVRA）の作用によりビリルビンまで代謝される。ビリルビンはその後血中に放出される。鉄はアポフェリチンと結合し、フェリチン鉄として貪食細胞内に貯蔵される。新生赤血球産生時などに、トランスフェリンと結合し、血中に放出される（浅野ら監修，三輪血液病学より改変引用）。

や分解産物の臓器内分布の解析を行うこととした。

3-2. 材料および方法

3-2-1. 動物

2-2-1 と同様に、ツメガエルを常温および低温で飼育し、実験に用いた。

3-2-2. *in vivo* ランダムビオチン標識法による赤血球寿命の測定

蛋白質ビオチン化剤 Sulfo-NHS-LC-Biotin (PIERCE) を用いて、循環赤血球数を標識した。100 μL の活性化ビオチン溶液 (5 mg/mL) をツメガエルに計 4 回心投与した (計 2 mg / 個体)。投与後週に一度、心穿刺により血液を 20-30 μL 採取した。採取血液の内 1 μL を 500 μL の 2% ウシ胎仔血清 (Fetal calf serum; FCS) 含有 7/9 \times ダルベッコ改変リン酸緩衝液 (diluted Dulbecco's modified phosphate buffered saline; dDPBS) に加えて、転倒懸濁し、遠心分離 (300 g, 5 分間) することで洗浄した。これを 3 回繰り返す。血漿成分を除いた。遠心分離後、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整したアロフィコシアニン標識ストレプトアビジン (streptavidin-allophycocyanin (APC) conjugates, BD pharmingen) によって 1 時間、4 $^{\circ}\text{C}$ 、遮光下で反応させた。反応後 500 μL の 2% FCS 含有 dDPBS を加え、遠心分離 (300 g, 5 分間) することで洗浄した。これを 3 回繰り返す。未反応 APC 標識ストレプトアビジンを除いた。沈殿した血球を 500 μL の 2% FCS 含有 dDPBS で懸濁し、フローサイトメーター FC500-MPL (Beckman coulter) でビオチン標識血球の割合を算出した。赤血球寿命の値は 1 次直線による回帰解析で算出した。

3-2-3. qRT-PCR 法によるヘム代謝酵素 mRNA の発現量

小坂らの報告に基づいて行った(Nogawa-Kosaka *et al.*, 2010)。低温曝露 0, 12 および 24 時間後のツメガエルから肝臓および脾臓を採取し, TRIzol (Invitrogen)によって RNA を抽出した。1 μg の全 RNA を Revetra Ace (TOYOBO)を用いた逆転写反応により cDNA を合成した。各 cDNA についてリアルタイム定量的 PCR 法を Step One Plus (Applied Biosystems)により行った。*rpl13a* を内部標準として *hmox1* および *blvra* の発現量を相対定量した。各遺伝子を検出するのに用いたプライマー配列は表 3-2 のとおりである。

表 3-2 ヘム代謝酵素の発現解析に用いたプライマー一覧

遺伝子名	プライマー	配列 (5'→3')
<i>rpl13a</i>	Forward	GGCAACTTCTACCGCAACAA
	Reverse	GTCATAGGGAGGTGGGATTCC
<i>hmox1</i>	Forward	AGGATATTGGAAGAGGCCAAAAC
	Reverse	TCTTGGGTCCTCTGCTTCGT
<i>blvra</i>	Forward	TGAAGAAGGAAGTACAGGGCAAA
	Reverse	AATGCCACTAAACGATGGGAAT

3-2-4. Perls' prussian blue 染色法による臓器内フェリチン鉄の検出

低温曝露後 0 および 24 時間後のツメガエルから肝臓と脾臓を採取し, 5 mm 角程度に細断後, 10%ホルマリン含有 DPBS に浸し, 4°C で一晚浸透固定した。その後エタノール系列による脱水およびキシレンによって透徹し, パラフィンブロックを作製した。マイクロームにて厚さ 5 μm の薄切片を作製した。切片はキシレンによる脱パラフィンおよびエタノール系列によって再水和させた。そして切片を 5% フェロシアンカリウム(和光純薬)と 5% 塩酸(和光純薬)混合液に 5 分間浸すことで, フェリチン鉄を検出し, 光学顕微鏡(BX51; オリンパス)で観察した。

3-3. 結果

3-3-1. 定常時ツメガエルの赤血球寿命

ツメガエルの赤血球寿命を *in vivo* ランダムビオチン標識法にて算定した。週に一度採血し、ビオチン化血球がほぼ消失するまで追跡したところ、ビオチン標識後 229 日目ではほとんど検出されなくなった(図 3-2)。これをグラフ上にプロットしたところ、一次直線による回帰解析が可能であった。そこで 5 個体について、回帰解析により寿命を算出したところ、ツメガエル赤血球寿命は平均 220 日(±12 日)と決定した。また成体ツメガエル(40 g)の全循環赤血球数は約 40 億個であり、これを赤血球寿命 220 日で除すことで、1 日に造られる赤血球数および 1 日に壊される赤血球数は 2 千万個(0.45%)であると算定した。この値はヒト(2000 億個)やマウス(1 億個)と比較して、かなり低い値であり、ツメガエル赤血球代謝回転速度は哺乳類と比較して遅いことが明らかとなった。

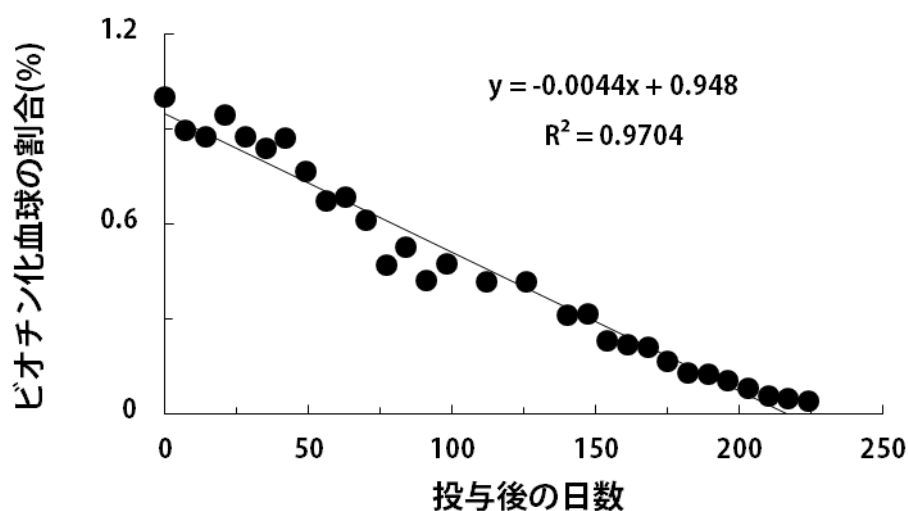


図 3-2 *in vivo* ビオチン化法によるツメガエルの赤血球寿命測定

ツメガエルにEZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin溶液を心投与した。週に一度血液を採取し、streptavidin-APCによりビオチン化血球の割合をフローサイトメトリーにて検出した。

(Maekawa *et al.*, J Exp Biol, 2012. より改変引用)

3-3-2. 低温曝露ツメガエルにおける赤血球代謝酵素群の遺伝子発現量

低温曝露後ツメガエルの肝臓における *hmox1* の mRNA 発現量は 12 時間後に 0 時間後と比較して約 10 倍に増加しており, その後 24 時間後には減少していた。また *blvra* の mRNA 発現量は低温曝露後に増加傾向を示し, 24 時間後には 0 時間後と比較して約 35 倍にまで上昇した。一方脾臓では両遺伝子の mRNA 量は 24 時間後に増加傾向が見られた。よって低温曝露後に肝臓および脾臓において赤血球代謝に関わる酵素群の発現量が増加していることが明らかとなった。

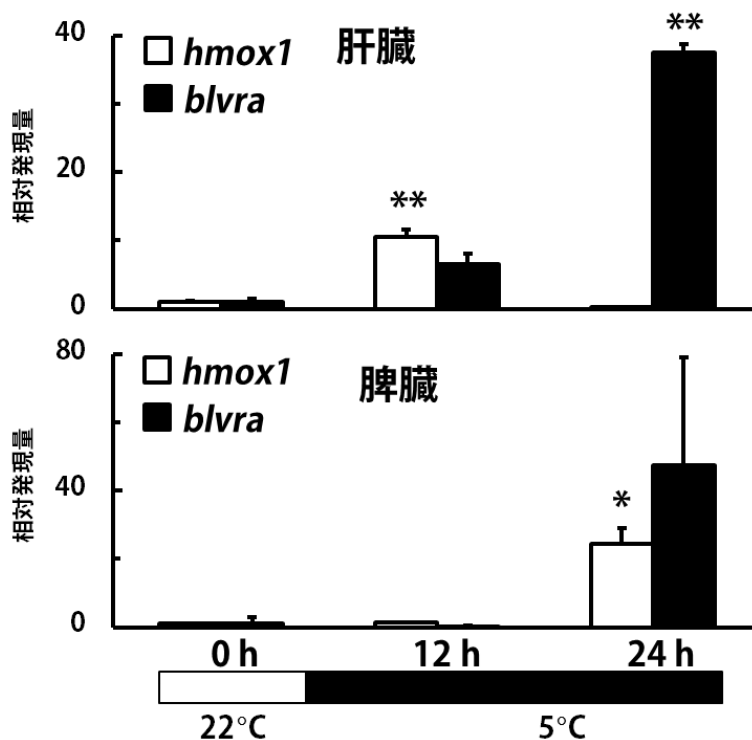


図 3-3 低温曝露後の *hmox1* と *blvra* の発現量変動

肝臓(左)では, *hmox1*の発現量が低温曝露後0.5日目に上昇, *blvra*は1日目に上昇した。また脾臓(右)においては低温曝露後1日目に, *hmox1*と*blvra*の発現量増大が見られた。*0 hと比較し $p < 0.05$, **0 hと比較して時の $p < 0.01$ をそれぞれ示す(原出典: Maekawa *et al.*, J Exp Biol, 2012)。

3-3-3. 低温曝露ツメガエルの肝臓・脾臓におけるフェリチン鉄の検出

ヘムの分解産物である2価鉄は、その後3価鉄へ酸化され、アポフェリチンと結合して、フェリチン鉄として貪食細胞内に保持される。低温曝露後に赤血球破壊が亢進しているのであれば、このフェリチン鉄量が増加していることが考えられる。そこで組織切片上で、Perls' prussian blue 染色法によってフェリチン鉄を検出した。その結果、低温曝露後24時間後の肝臓でフェリチン鉄の増加が確認された。一方脾臓では明らかな増加は確認できなかった。以上の結果から、低温曝露後に肝臓内で赤血球破壊が亢進し、分解産物である鉄が、肝臓内に保持されることが示された。よって低温曝露後1日で急性的に赤血球数が減少する一因は、肝臓での赤血球破壊亢進によることが明らかとなった。

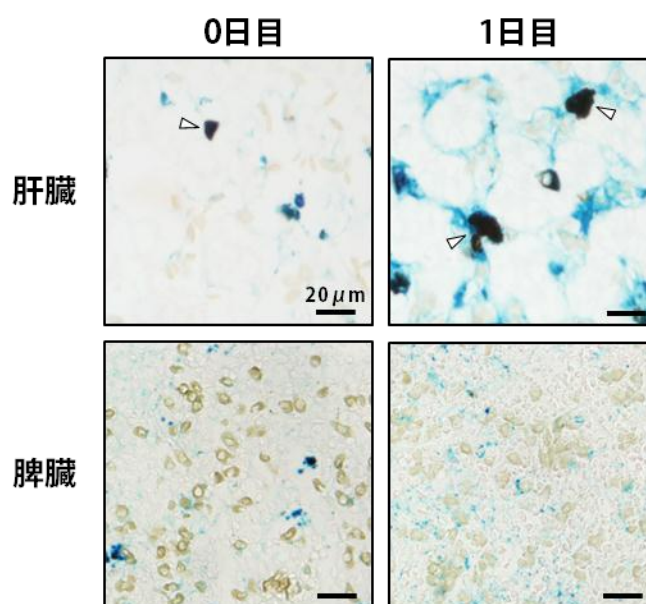


図 3-4 Perls' prussian blue 染色法による組織フェリチン鉄の検出

肝臓(上)では、低温曝露一日目の肝臓において、フェリチン鉄の増加が見られた。脾臓においては、低温曝露前後で顕著な違いは観察されなかった。矢頭は色素含有細胞を示す(原出典:Maekawa *et al.*, J Exp Biol, 2012)。

3-4. 考察

本研究により、定常時の成体ツメガエルの赤血球寿命が 220 日であると決定し、1 日に造られる赤血球数および破壊される赤血球数が全体の 0.45% (2 千万個) であると算定した (表 3-2)。ツメガエルの赤血球寿命は、マウスの 22 日 (Van Putten, 1958)、ウサギの 55 日 (Suzuki and Dale, 1987)、ニワトリの 30 日 (Rodnan *et al.*, 1957) と比較して、非常に長い。一方、ヒョウガエルは 200 日 (Cline and Waldmann, 1962)、ギンブナは 270 日 (Fischer *et al.*, 1998) と比較的近い値となった。赤血球寿命の動物間での違いについては、有核および無核の違い、血球の大きさ、個体の大きさなど諸説あるものの、詳細は明らかとなっていない。

低温曝露後 1 日で赤血球数は約 30% が減少する。この値は定常時ツメガエルの 1 日に代謝される赤血球の割合 0.45% と比較して高いものである。したがって、低温曝露後に赤血球代謝が亢進したと考えた。実際に肝臓での *hmox1* や *blvra* の遺伝子発現量は低温曝露後に増加しており (図 3-2)、分解産物である鉄の増大も確認された (図 3-3)。よって我々は、低温曝露後 1 日で

表 3-3 動物の循環赤血球数と赤血球代謝回転速度の比較

	ヒト	マウス	ツメガエル
循環血液量	5 L / 60 kg	2 mL / 20 g	4 mL / 40 g
循環赤血球数	25兆個	200億個	40億個
赤血球寿命	120日	22日	220日
1日に造られる赤血球数	2000億個	1億個	2千万個
1日に壊される赤血球数			
1日に造られる赤血球数/kg BW	30億個	50億個	5億個
1日に壊される赤血球数/kg BW			
1日に造られる赤血球の割合	0.8%	4.5%	0.45%
1日に壊される赤血球の割合			

肝臓での赤血球破壊が亢進することで急性的に赤血球数が減少に至ると結論した。脾臓においても *hmox1* や *blvra* の mRNA 発現量増大が確認され、赤血球破壊亢進が促進していると考えられる。しかしながら、脾臓の組織重量は肝臓の約 1/47 程度 (脾臓:0.35 mg/g B.W., 肝臓:16.4 mg/g B.W.) であることから、低温曝露後の主たる赤血球破壊の場は肝臓であると考えられる。

低温曝露後の急性的な赤血球数減少は、体内酸素消費量の減少によるものと考えられる。低温曝露後のヒキガエル (*Bufo americanus*) では呼吸量が約 1/20 に減少することも知られている (Hutchison *et al.*, 1968)。したがって、低温曝露後の赤血球数減少は、組織への酸素供給量を少なくし、組織内の酸素環境を適切に保つために重要であると示唆される。

【第四章】 ツメガエル低温環境曝露後の赤血球機能の解析

4-1. 序論

低温曝露後少なくとも 5 日間は、赤血球数が低値を維持する。赤血球数の変動が見られないのであれば、新生赤血球の供給すなわち赤血球造血能が低下していると考えられる。実際、低温曝露ヒョウガエルやゼブラフィッシュにおいては赤血球造血能の低下が示唆されている(Cline and Waldmann, 1962; Kulkeaw *et al.*, 2010)。成体ツメガエルにおける赤血球造血については、当研究室で解析が進んでおり、赤血球造血因子 EPO とその受容体(EPOR)を中心とした解析から、肺や肝臓で発現する EPO が肝臓内に存在する EPOR 発現赤血球前駆細胞に作用することで、赤血球造血が行われる(Aizawa *et al.*, 2005; Nogawa-Kosaka *et al.*, 2010; Nogawa-Kosaka *et al.*, 2011)。低温曝露によって赤血球造血機序の低下しているのであれば、EPO や赤血球造血関連因子の遺伝子発現量が低下すると考えられる。さらに造血巣である肝臓内の赤血球の分布にも変動が見られると予想した。そこで低温曝露後の造血因子の遺伝子発現解析と、組織学的手法による肝臓内赤血球の分布を観察した。加えてツメガエル赤血球造血亢進モデルを作出し、亢進時に低温曝露することで赤血球造血に対する影響を検討した。

4-2. 材料および方法

4-2-1. 動物と循環血解析

ツメガエルの購入、飼育および循環血球数測定については 2-2-1 と同様に行った。赤血球亢進モデル作出では、ツメガエル個体にフェニルヒドラジン(PHZ; シグマアルドリッチ)を 25 mg/kg B.W. 腹腔内投与した。*in vivo*での細胞

増殖試験の際には、チミジン類似物ブロモデオキシウリジン(Bromodeoxyuridine BrdU; WAKO) を dDPBS に溶解し、腹腔内投与した(150mg/kg body weight)。

4-2-2. qRT-PCR 法による造血因子遺伝子発現の定量解析

低温曝露 0, 1, 3 および 5 日後のツメガエルから肝臓および肺を採取し、3-2-3 と同様の手法で qRT-PCR を行った。*rpl13a* を内部標準として、*epo*, *epor*, *gata-1a* の発現量を相対定量した。各遺伝子を検出するのに用いたプライマー配列は以下のとおりである。

表 4-1 赤血球造血関連因子の発現解析に用いたプライマー一覧

遺伝子名	プライマー	配列 (5'→3')
<i>rpl13a</i>	Forward	GGCAACTTCTACCGCAACAA
	Reverse	GTCATAGGGAGGTGGGATTCC
<i>epo</i>	Forward	GCACCATCCTCTTCACTTCAC
	Reverse	CTTCACACTAACGAGCAACATTG
<i>epor</i>	Forward	TGAAGAAGGAAGTACAGGGCAAA
	Reverse	CACTCTGTTGTTTGCCTTACTG
<i>gata-1a</i>	Forward	CCAAAGAAACGCCTGATTGT
	Reverse	TCTCCACTTGCATTCCGTC

4-2-3. 肝臓組織切片の作製と赤血球の分布観察

ツメガエルから肝臓を採取し、5 mm 角程度に細断後、10%ホルマリン含有 DPBS に浸し、4°C で一晩浸透固定した。その後エタノール系列による脱水およびキシレンによって透徹し、パラフィンブロックを作製した。マイクロームにて厚さ 5 μm の薄切片を作製した。切片はキシレンによる脱パラフィンおよびエタノール系列によって再水和させた。組織標本に σ dianisidine 染色とヘマトキシリン-エオシン染色を施し、光学顕微鏡で観察した。

4-2-4. 免疫染色法による BrdU 陽性細胞の検出

ツメガエルから肝臓を採取し、5 mm 角程度に細断後、10%ホルマリン含有 DPBS に浸し、4°C で一晩浸透固定した。その後エタノール系列による脱水およびキシレンによって透徹し、パラフィンブロックを作製した。マイクロームにて厚さ 5 μm の薄切片を作製した。切片はキシレンによる脱パラフィンおよびエタノール系列によって再水和させた。次に切片を、0.01M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) に浸し、電子レンジで 10 分間加熱し、DNA 鎖を変性させた。5%NGS で 60 分の反応により非特異結合を阻害したのち、マウス抗 BrdU 抗体 (Dako) により 4°C で終夜反応させた。この後、各反応の間は dTBS で 5 分間の洗浄を 3 回繰り返し行った。洗浄後、0.5%NGS で希釈したヤギ抗マウス IgG 抗体-ビオチン複合体を 90 分反応させた。続いて、0.5%NGS で希釈した Streptavidin HRP conjugated (Biorad) を 60 分反応させた。最後に、ジアミノベンジジン (3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride: DAB, DAKO) で発色させ、光学顕微鏡で観察した。

末梢血は遠心塗末標本を作製した。標本をホルマリン-アセトン溶液 (0.5M リン酸緩衝液, 10%ホルマリン, 60%アセトン) で 30 秒反応させ、細胞を固定した。続いて、標本を 0.01M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) に浸し、電子レンジで 10 分間加熱し、DNA 鎖を変性させた。5%NGS で 60 分の反応により非特異結合を阻害したのち、マウス抗 BrdU 抗体 (Dako) により 4°C で終夜反応させた。この後、各反応の間は dTBS で 15 分洗浄を行った。洗浄後、0.5%NGS で希釈したヤギ抗マウス IgG 抗体-ビオチン複合体を 90 分反応させた。続いて 0.5%NGS で希釈した Streptavidin Alexa488 conjugated (Invitrogen) を 60 分反応させた。最後に DAPI (Dojindo Laboratories) で核染色し、蛍光顕微鏡 (Nikon eclipse E600) にて観察した。

4-3. 結果

4-3-1. 赤血球造血因子遺伝子発現量解析と肝臓における赤血球分布

低温曝露後のツメガエルにおける臓器内赤血球造血因子の遺伝子発現量を qRT-PCR 法により解析した。EPO の mRNA 発現量は、低温曝露後 1 日目の肺で約 20 倍増大していた。また肝臓についても、低温曝露後に増加する傾向が見られた(図 4-1)。

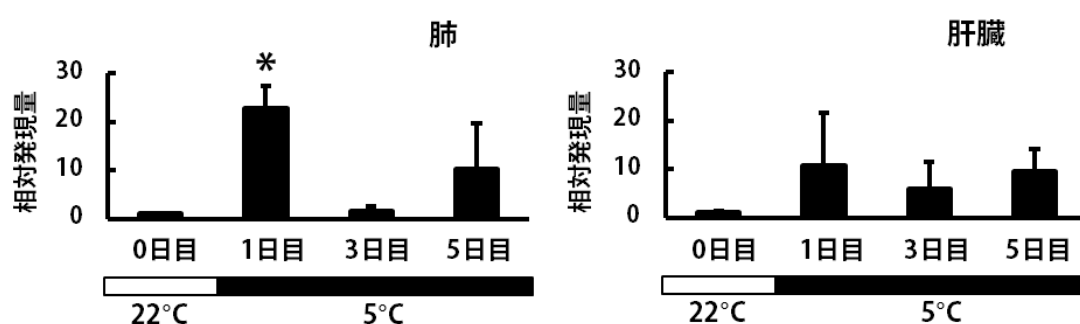


図 4-1 低温曝露後の *epo* の発現量変動

肺(左)では、低温曝露後1日目に顕著な発現量増大が見られた。また肝臓(右)においても増加傾向が見られた。*0日目と比較し $p < 0.05$ を示す(原出典:Maekawa *et al.*, J Exp Biol, 2012)。

また赤血球前駆細胞で高発現する *epor* や *gata-1a* の遺伝子発現量も肝臓で増加傾向を示し、それぞれ低温曝露後 1 日目、3 日目に極大値を示した(図 4-2)。これら遺伝子発現量の増大は、低温曝露後の *epo* の発現量上昇に起因すると考えられる。また肝臓内の赤血球の分布を、ヘモグロビンを染色する σ -dianisidine 染色により観察した。低温曝露後 1 日目には赤血球数が低温曝露前と比較し、減少していた。その後、3 および 5 日目と赤血球数の増加が確認された。特に 5 日目には、正常時と比較し多数の成熟赤血球が存在していた(図 4-3)。当初の予想に反し、低温曝露後に *epo* mRNA 発現量増加に伴う、肝臓での赤血球造血能が亢進していることが明らかとなった。しかしこの間、

循環赤血球数は低値を維持したままであることから(第二章参照), 新生赤血球は肝臓内に貯留し, 血液循環への移行が低温環境下では抑制されていることが示唆された。

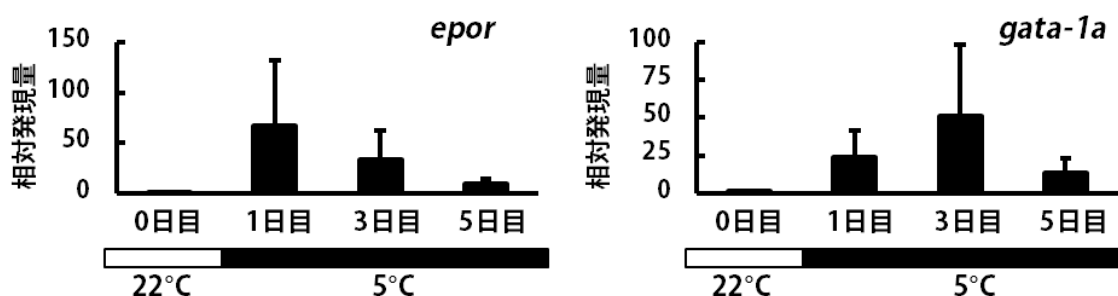


図 4-2 低温曝露後肝臓での赤血球前駆細胞特異的に発現する遺伝子の発現量変動 *epor*および*gata-1a*の肝臓における発現量は, 一過的に増加する傾向が見られた。これら発現量の増大は, *epo*の発現・分泌量増加に起因するものと考えられる(原出典: Maekawa *et al.*, J Exp Biol, 2012)。

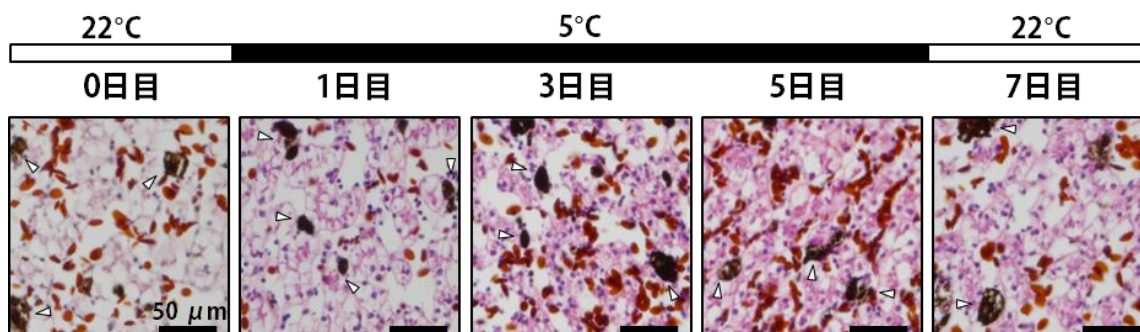


図 4-3 低温曝露後肝臓での赤血球系細胞の分布

α -dianisidine 染色によって赤血球系細胞の肝臓内分布を観察した。低温曝露後1日目には, 肝臓内の赤血球系細胞数が減少する。これは低温曝露後に肝臓内で赤血球代謝が亢進する結果と一致する(第3章参照)。その後, 赤血球数の増大が見られ, 5日目には0日目と比較して, 赤血球数増加が顕著となった。また低温から再び常温に戻して2日目(低温曝露から7日目)には, 赤血球数が減少した(原出典:Maekawa *et al.*, J Exp Biol, 2012)。

4-3-2. 赤血球造血亢進時における低温曝露の影響

4-3-1の結果から、低温環境下でも赤血球造血能亢進が見られたが、新生赤血球が血液循環に放出されないことが示唆された。そこで赤血球造血亢進時のツメガエルを低温曝露し、同様の現象が見られるかを実験的に検証した。ツメガエルに PHZ を投与することで、貧血誘導することが可能であり、その後赤血球造血亢進に伴い循環赤血球数が可逆的に回復することが報告されている (Aizawa *et al.*, 2005)。なお貧血からの回復期には、循環血中に赤芽球が多数放出される。この貧血回復期に低温曝露することにより、循環赤血球数の回復や赤芽球の放出が抑制されると仮説を立てた。さらに肝臓では新生赤血球が多数肝臓内に貯留されていると考えた。そこで PHZ 投与後 7 日目から低温環境に曝露し、継時的に循環赤血球を計数したところ、低温曝露によって赤血球数の回復が抑制された(図 4-4)。

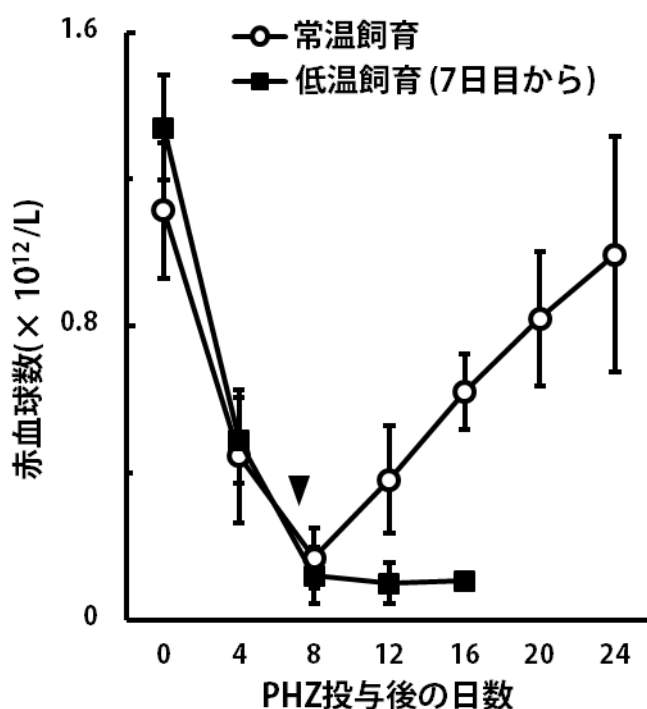


図 4-4 PHZ 誘導貧血の回復期に対する低温曝露の影響

PHZ 投与後の循環赤血球数の変動。常温飼育群では PHZ により徐々に循環赤血球数が減少し、投与後 8 日目に極小値となる。その後、循環赤血球数は可逆的に回復する。回復期の直前である、PHZ 投与後 7 日目に低温に曝露することで、循環赤血球数の回復は抑制された。なお低温飼育群は 16 日目以降、すべての個体が死亡した ($n=6$) (原出典: Maekawa *et al.*, *J Exp Biol*, 2012)。

また貧血回復期に循環血中に放出される未熟赤血球(赤芽球)数, PHZ 投与後 8 日目と 12 日目に計数したところ, 低温飼育群では赤芽球がほとんど観察されなかった(図 4-5)。またこの時の肝臓の組織切片を作製し, σ -dianisidine 染色により, 赤血球の分布を観察したところ, PHZ 投与後 8 日目(低温曝露後 1 日目)では赤血球がほとんど観察されなかったが, PHZ 投与後 12 日目(低温曝露後 5 日目)には多数の赤血球が存在していた(図 4-6)。

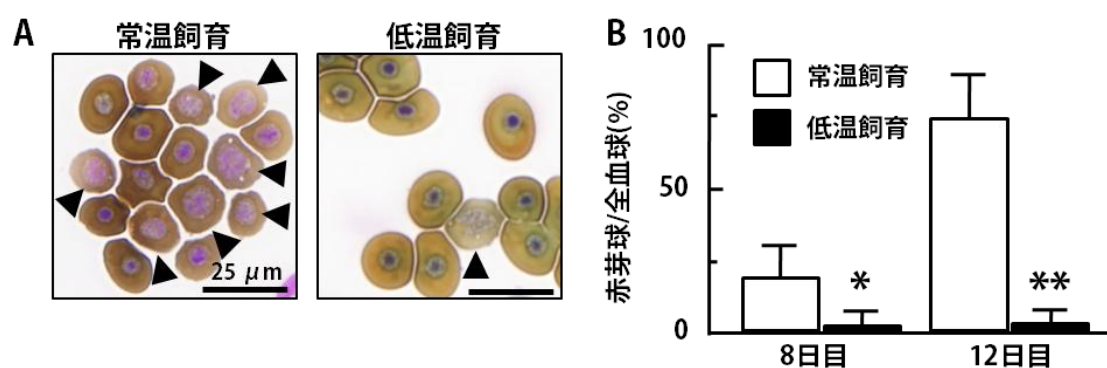


図 4-5 低温曝露後循環血中の赤芽球数

末梢血球の遠心塗末標本を作製し, σ -dianisidine 染色とギムザ染色によって, 赤芽球を形態的に鑑別した。(A)細胞質面積に対する核面積の割合が大きいもので, σ -dianisidine 弱陽性の細胞が赤芽球(▲)。(B)末梢前血球に占める赤芽球の割合を計数した。結果, 低温曝露群では赤芽球数が有意に減少していた。(n=3, *p < .05 vs 常温飼育群, **p < .01 vs 常温飼育群(原出典:Maekawa *et al.*, J Exp Biol, 2012)。

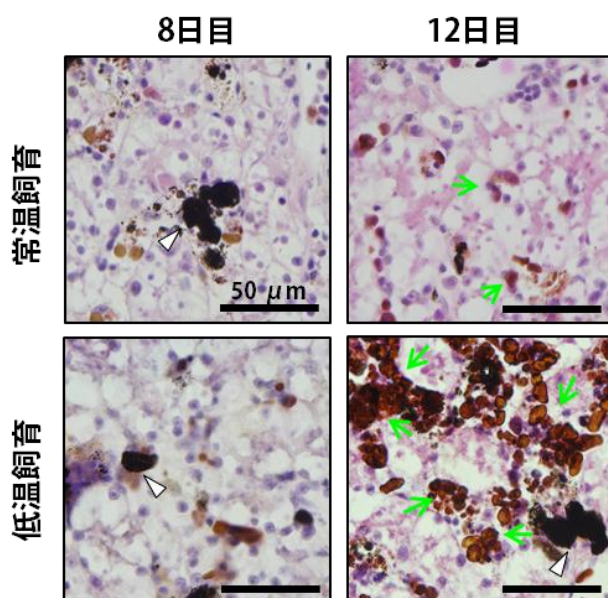


図 4-6 低温曝露後肝臓中の赤血球系細胞の分布

肝臓の組織切片を作製し, σ -dianisidine 染色により赤血球系細胞の分布を観察した。PHZ 投与後 8 日目の肝臓中には赤血球系細胞は検出できなかった。一方, 12 日目の肝臓においては, 低温飼育群で多数の赤血球系細胞が検出された(緑矢印)。△は色素細胞を示す(原出典: Maekawa *et al.*, J Exp Biol, 2012)。

以上の結果から、低温曝露により貧血からの回復が抑制されたことが示された。さらに、肝臓中の組織学的解析所見から、肝臓中には多数の赤血球が貯留されていることが分かった。

4-3-3. 低温曝露後の新生赤血球の体内動態

これまでの結果から、低温環境において産生された新生赤血球は、肝臓内に貯留され、循環血中に放出されないのではないかと仮説が立った。本仮説を実験的に証明するため、低温曝露後の新生赤血球の体内動態を、BrdU を用いた *in vivo* 細胞増殖試験を行うことにより検証した。BrdU は様々な種類の細胞(神経細胞や造血細胞など)における増殖試験に広く用いられている。また増殖能の検定だけでなく、分化増殖後の細胞の挙動も追うことができる。ツメガエルの赤血球は哺乳類と違い有核であるため、BrdU は増殖・分化した赤血球の体内動態追尾に有用である。本実験では4-3-2のPHZ投与による赤血球造血亢進モデルを用いた。PHZ投与後7日目にBrdUを腹腔内投与し、その後低温飼育群については5°Cの環境下に曝露した。PHZ投与後12日目に、常温、低温飼育群ともに剖検し、末梢血と肝臓を採取し、BrdU陽性細胞を免疫染色法により検出した(図4-7)。これにより低温飼育期間内に分化・増殖した

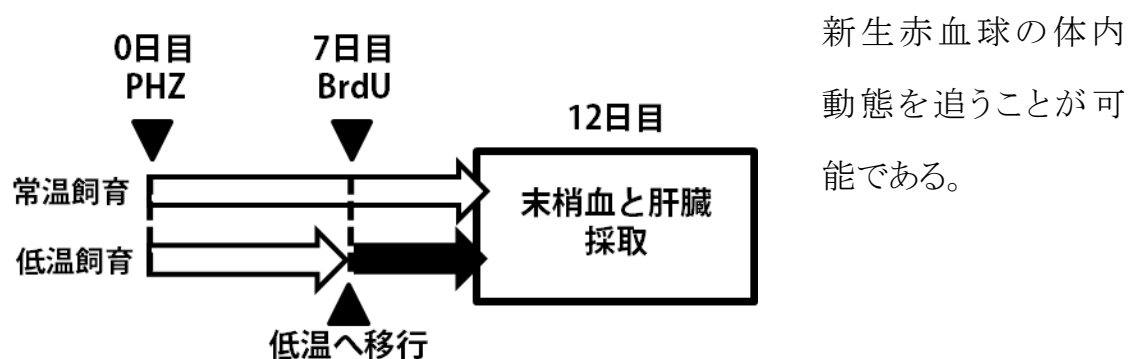


図 4-7 BrdU を用いた *in vivo* 細胞分化増殖試験の概略図
(原出典:Maekawa *et al.*, J Exp Biol, 2012)

実験の結果、肝臓内には BrdU 陽性な新生赤血球が室温、低温飼育群ともに検出され、単位面積当たりの BrdU 陽性細胞数は同程度であった(図 4-8)。一方、末梢血中では室温飼育群では多数の BrdU 陽性細胞が検出できたが、低温飼育群ではほとんど観察されなかった(図 4-8)。以上より、低温環境下でも肝臓で赤血球前駆細胞が分化・増殖し、新生赤血球が産生されるが、肝臓から血液循環への移行が抑制されるために、循環赤血球数が低値を維持することが明らかとなった。

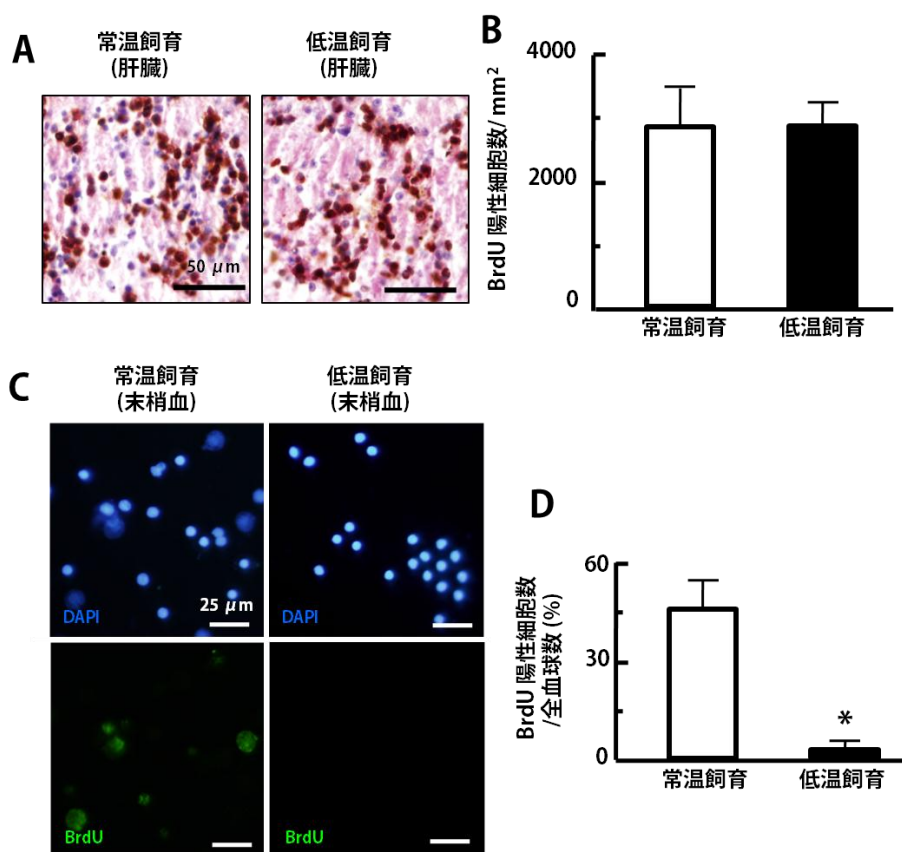


図 4-8 肝臓および末梢血における BrdU 陽性細胞の検出

肝臓中の BrdU 陽性細胞 (茶色)。(B) 単位面積当たりの BrdU 陽性細胞数の比較。常温および低温飼育ともに BrdU 陽性細胞数に有意な差は認められなかった。(C) 末梢血中の BrdU 陽性細胞の検出。上は DAPI による各染色 (全血球が染色される) で、下は BrdU 陽性細胞。(D) 末梢全血球数あたりの BrdU 陽性細胞数。低温飼育群では常温飼育群と比較し、BrdU 陽性細胞の割合が有意に減少した。*は常温飼育群と比較して $p < 0.01$ を示す (原出典: Maekawa *et al.*, J Exp Biol, 2012)。

4-4. 考察

当初、ヒョウガエルやゼブラフィッシュにおける先行研究(Cline and Waldmann, 1962; Kulkeaw *et al.*, 2010)で、低温環境下では赤血球造血能が低下することが示唆されている。これら報告を受け、ツメガエルでも低温曝露後に赤血球造血能が低下すると仮説を立てた。しかしながら、低温曝露後 1 日目には肺および肝臓で *epo* 遺伝子発現量が増大し、肝臓内での赤血球造血が亢進していた。一方、低温曝露下では赤血球数が低値を維持しており、新生赤血球が肝臓中に多数観察されたことを合わせると、低温曝露後のツメガエルは、一過的に赤血球造血を亢進させるが、新生赤血球を肝臓内に貯留させるとの結論を得た。同様に、PHZ 投与による溶血性貧血からの回復期に低温曝露しても、新生赤血球が肝臓内から循環血中には放出されず、循環赤血球数の回復が抑制された。本結果はツメガエルにおいて、造血巣内での赤血球系細胞の分化・増殖は、低温環境の影響を受けないことを示す。PHZ 投与後 16 日目に低温飼育群は 6 匹すべての個体が死亡した。これは低温曝露と貧血、2 つの状態が重なり、個体にとって重篤となったためであると考えられる。

Cline と Waldmann は放射性同位体鉄 (Fe^{59}) を用いて、低温順化させたヒョウガエルにおける、赤血球への鉄取り込み量を測定した (Cline and Waldmann, 1962)。結果、赤血球の F^{59} 含有量は低温順化群のカエルでは、常温群と比較し減少していたため、赤血球造血機能が低下していると結論が出された。しかしながら、検出した赤血球は循環血中から採取されたものである。造血巣中の F^{59} 含有赤血球については解析していないが、我々の結果から、低温順化ヒョウガエル造血巣中に F^{59} 含有赤血球が貯留されていたと予想される。

では何故、低温曝露後に *epo* 遺伝子の発現量が増大し、赤血球を肝臓内に

貯留したのだろうか？ 可能性としては以下の 2 つが挙げられる。まず低温曝露直後の赤血球破壊亢進に伴う貯蔵鉄の増加に応答して、赤血球造血を亢進させたと考えられる。哺乳類生体内における鉄代謝は閉鎖系であり、鉄を排出する機構を持ち合わせていない。したがって、遺伝性ないし二次性(長期・大量輸血や鉄過剰摂取)の鉄過剰症においては、肝臓の肝実質細胞内で高度な鉄の沈着、ヘモクロマトーシスを発症する。肝実質細胞内に鉄が過剰沈着した場合は、細胞内に遊離の鉄イオンが生じやすく、細胞障害(細胞壊死、線維化など)が起こりやすい(浅野ら監修, 三輪血液病学)。低温曝露後のツメガエル肝臓においても、ヘモジデリン鉄の増加が観察された(図 3-3)。よって低温曝露後の赤血球造血亢進は、肝臓内ヘモジデリン鉄を減少させ、ヘモグロビン鉄として貯蔵することで、肝細胞障害を防ぐためであると考えられる。実際にヘモクロマトーシスを発症した患者では、血中ヘモグロビン量, MCH, MCV が比較的高い値を示すことが報告されている(Barton *et al.*, 2000)。

もう一つの可能性として、5 日間の低温飼育から再び常温飼育に戻すと、循環赤血球数がわずか 2 日で初期にまで回復する結果から(図 2-2)、低温から常温の環境に再び戻るときに、赤血球数を迅速に循環血に放出するために、肝臓内に新生赤血球を貯蔵することが考えられる。赤血球の分化・増殖は、厳密に制御される機序である。小坂(野川)らの報告では、ツメガエル肝臓由来血球細胞を EPO 添加半固形培地にて 2 日間培養することで、CFU-E コロニーが観察された(Nogawa-Kosaka *et al.*, 2011)。これらはさらに数日を経て、成熟赤血球になると考えられる。したがって、低温環境から常温環境に戻った時に、赤血球造血を亢進させるよりも、先立って赤血球を肝臓内に貯留することで、幅広い環境温度変化に適応するツメガエルにとって重要な機序であると考えられる。

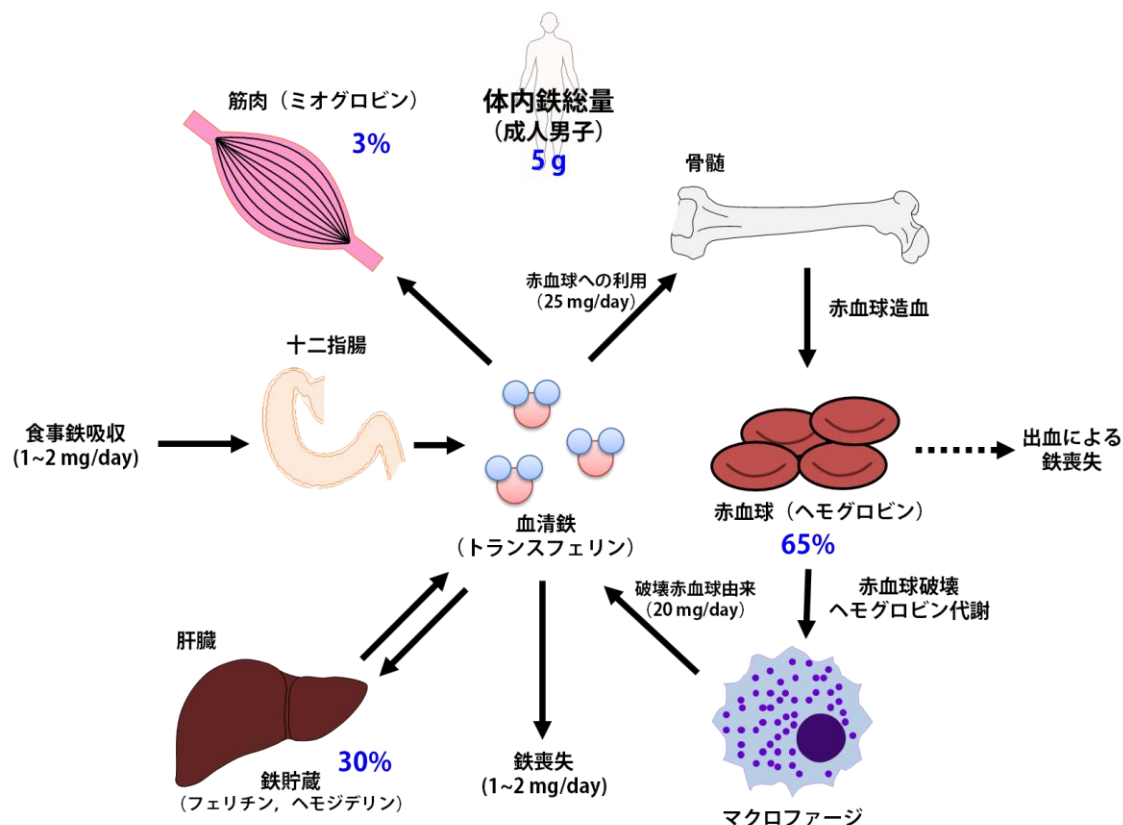


図 4-9 ヒトの鉄体内動態

体内の鉄の総量は成人男子で約5 gであり，その内3.25 g (65%)は赤血球に含まれるヘモグロビン鉄として，0.15 g (3%)は筋肉のミオグロビン鉄として，残り1.6 g (30%)は貯蔵鉄として主に肝臓でフェリチンやヘモジデリンとして存在する。生体内の鉄代謝は閉鎖系で制御されている。鉄利用のほとんどは，赤血球代謝後のヘモグロビン鉄の再利用によってまかなわれ，一部は食事から吸収鉄，肝臓などの臓器貯蔵鉄に依存する。成体には鉄を排出する機構は存在せず，鉄を含む腸管や皮膚粘膜細胞の剥離，脱落により1日約1~2 mgの鉄が損失するに過ぎない。よって，1日に必要とする鉄摂取量は約1~2 mgである(浅野ら監修，三輪血液病学より改変引用)。

【第五章】 マウス低温環境曝露後の循環血球数変動

5-1. 序論

内温動物ではこれまでにラットとニワトリで、低温環境下における赤血球数の増加が報告されている。ラットの報告によると、低温曝露 8 週目において、網状赤血球数が室温飼育群と比べ、減少していたため赤血球造血能への影響ではなく、赤血球寿命が上昇し、赤血球破壊が抑制されているために、赤血球数が増加したと結論している(Deveci *et al.*, 2001)。しかしながら、赤血球造血能ならびに赤血球代謝制御の詳細は明らかとなっていない。また循環血球計数も低温曝露後から継時的に行ったものではなかった。よって低温曝露後に赤血球数増加に至る原因については未解明である。そこで本研究では、まずマウスを低温環境に曝露し、週に一度継時的に循環血球数を計数した。さらに新生赤血球の指標となる網状赤血球数についても合わせて計数することで、赤血球造血の変動も追うこととした。なお本研究では、低温環境下での体温調節における赤血球造血の役割を明らかにすることを目的とするため、低温曝露後も体温を維持することが報告されているマウス C57BL/6 を用いることとした(Guerra *et al.*, 1998)。

5-2. 材料および方法

5-2-1. 動物

C67BL/6 マウス雄(6-7 週齢:日本クレア)を実験開始まで 22°C(常温)で 1 ケージにつき 3 匹を飼育した。低温飼育時は 5°C に設定した個別動物飼育装置(日本医化器械製作所)内にケージごと移動し、飼育した。餌と水は常時取れるようにした。

5-2-2. 循環血球数計数

低温曝露後週に1度, 眼窩より EDTA-2Na 加血を採取した。循環血球数ならびに赤血球パラメーターは自動血球計算機 (Sysmex, F-820) を用いて測定した。

5-2-3. 網状赤血球数の計数

100 ng/mL に調整したチアゾールオレンジ溶液 (シグマアルドリッチ; 2 mM EDTA-2Na 含有 DPBS) 200 μ L に血液 1 μ L を加え, 遮光下において 30 分間室温で反応させる。反応後, フローサイトメーター FC500-MPL (Beckman coulter) で網状赤血球数を計数した。

5-3. 結果

マウスを 5°C の環境下で 56 日間飼育し, 週に一度, 継時的に循環血球数を計数した。ヘマトクリット値およびヘモグロビン値は低温曝露後に 14 日目には上昇した。その後, 35 日目まで高値を維持し, 42 日目にはさらに上昇した (図 5-1)。また赤血球数についても同様の傾向が見られ, MCV や MCH も低温曝露 14 日目に増加していた (表 5-1)。新生赤血球の指標である網状赤血球数は, 低温曝露 7 日目に一過的に増加し, その後減少し, 初期値と同程度の値を示した。低温曝露後 42 日目に再び中程度の増加が見られた。循環血小板数や白血球数は低温曝露後に一過的な減少が見られたが, その後回復し, 定常時と同程度の値を維持した。

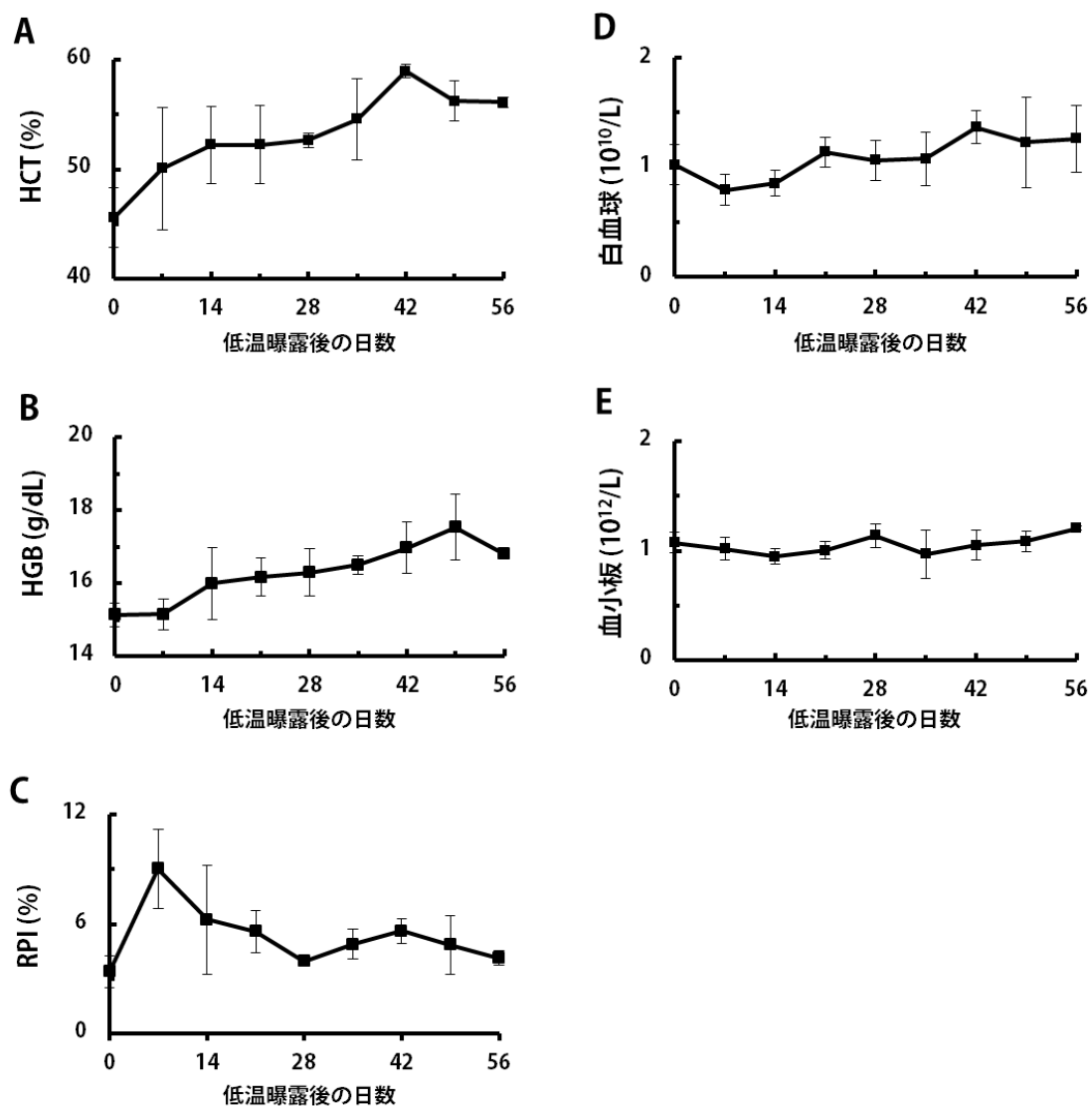


図 5-1 低温曝露マウスの循環血球数の変動

マウスを5°Cの環境下で56日間飼育し、週に一度採血し、血球数を測定した。HCT(A)とHGB(B)は低温曝露後14日目に上昇し、その後高値を維持した。加えて42日目以降に、さらに上昇する傾向が見られた。新生赤血球の指標であるRPI値は低温曝露後7日目に、増加し、その後28日目には初期値まで減少した。また42日目に一過的な増加傾向が見られた。白血球(D)と血小板(E)は低温曝露後7~14日目に減少傾向が見られたが、その後初期値にまで回復した(原出典:Maekawa *et al.*, J Exp Biol)。

表 5-1 低温曝露マウスの赤血球恒数の変動

日数	RBC ($\times 10^{12}/L$)	HGB (gd/L)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
0日目	9.76 \pm 0.51	15.1 \pm 0.3	45.6 \pm 2.7	46.8 \pm 3.1	15.5 \pm 0.7	33.3 \pm 1.6
14日目	9.90 \pm 0.69	16.0 \pm 0.9*	52.2 \pm 3.5**	52.9 \pm 3.2*	16.2 \pm 0.5*	30.7 \pm 1.5*
42日目	10.7 \pm 0.19*	17.0 \pm 0.7*	59.0 \pm 0.6**	54.3 \pm 2.9*	16.4 \pm 0.6*	30.3 \pm 2.7*

*0日目と比較し $p < 0.05$, **0日目と比較し $p < 0.01$ (原出典:Maekawa et al., J Exp Biol)。

5-4. 考察

本章では低温下においても体温を維持できるマウス C57BL/6 系統をモデルとして、内温動物の低温環境下における循環血球数の変動を解析した。マウスを 5°C の低温環境曝露後 14 日目に HCT, HGB, 赤血球数の増加が観察された。またこれら値は、低温曝露後 56 日目まで高値を維持した。ラットを 8 週間低温環境に順化した報告でも、同様に赤血球数の増加が観察されている。一方、白血球や血小板数は低温曝露後 7 日目に一過的に減少傾向が見られたが、その後初期値まで回復した。これら結果は、8 週間低温順化したラットでは、白血球数および血小板数が低下している報告と異なるものであり、白血球ならびに栓球造血においては、低温応答性がマウスとラットで異なることが示唆される。また低温曝露後 7 日目には、新生赤血球の指標である網状赤血球数の増加も観察された。よって、低温曝露後 14 日目までの循環赤血球数の増加は、赤血球造血亢進に起因すると仮説を立て、次章にて検証を行った。

【第六章】 マウス低温環境曝露後の赤血球造血能の解析

6-1. 序論

マウスを低温曝露して 14 日目に、循環赤血球数の増加が見られた。さらに新生赤血球産生の指標となる循環血中の網状赤血球数も低温曝露 7 日目に一過的な上昇が観察された。これら結果から、低温曝露後 14 日以内に赤血球造血が亢進すると仮説を立てた。本章では、低温曝露後の造血巣の組織形態ならびに赤血球前駆細胞の質的・量的変動を詳細に解析することで、循環赤血球数上昇に至るまでの赤血球造血の変動を明らかにすることとした。

6-2. 材料および方法

6-2-1. 動物

実験に使用したマウスと飼育方法は、5-2-1 と同様に行った。

6-2-2. 脾臓組織切片と免疫組織染色

マウスから肝臓を採取し、5 mm 角程度に細断後、10%ホルマリン含有 DPBS に浸し、4°C で一晩浸透固定した。その後エタノール系列による脱水およびキシレンによって透徹し、パラフィンブロックを作製した。マイクロームにて厚さ 5 μm の薄切片を作製した。切片はキシレンによる脱パラフィンおよびエタノール系列によって再水和させた。次に 5%NGS で 60 分の反応により非特異結合を阻害したのち、ラット抗 Ter119-ビオチン複合体 (BD Pharmingen) により 4°C で終夜反応させた。TBS による洗浄後、0.5%NGS で希釈した Streptavidin HRP conjugated (Biorad) を 60 分反応させた。最後に、ジアミノベンジジン (3,3'-Diaminobenzidine,tetrahydrochloride:DAB, DAKO) で

発色させ、光学顕微鏡で観察した。

6-2-3. フローサイトメトリーによる各赤芽球分化段階の計数

脾臓および骨髄からそれぞれ細胞を 2% FCS, 2mM EDTA 含有 DPBS で懸濁した。その後, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した Ter119 抗体ビオチン複合体 (BD Pharmingen) と CD71 抗体 FITC 複合体 (Biolegend, CA, USA) で 20 分, 4°C, 遮光下で反応後, 続けてアロフィコシアニン標識ストレプトアビジン (BD pharmingen) によって 20 分, 4°C, 遮光下で反応させた。反応後 500 μL の 2% FCS 含有 DPBS を加え, 遠心分離 (300 g, 5 分間) することで洗浄した。洗浄後, フローサイトメーター FC500-MPL (Beckman coulter) で各赤芽球の分化段階を計数した。なお赤芽球分画にあたっては, らの報告を基におこなった (Socolovsky *et al.*, 2001)。

6-2-4. 赤芽球コロニーアッセイ法による CFU-E 数の計数

脾臓および骨髄由来の細胞を溶血剤 (red blood cell lysing buffer; シグマアルドリッチ) 処理し, 赤血球を除去した。有核血球細胞を, 0.9% メチルセルロース (信越化学), Bio-Rex MSZ 501(D) Resin (Bio-Rad) にて脱イオン処理した 1% BSA (和光純薬), 20% FCS (シグマアルドリッチ), 1×10^{-4} M 2-メルカプトエタノール, 1 U/mL ヒト組換え EPO (Epoetin alfa; 協和発酵キリン) 含有 α -MEM (Gibco, Invitrogen) に懸濁した。本懸濁液を 35 mm プレートに播種し, 37°C, 5% CO₂ に設定したインキュベーター内で培養した。CFU-E コロニーの形成は, 培養開始後 60 時間後に観察した。

6-2-5. *Epo* および低酸素応答因子の qRT-PCR 解析

低温曝露 0~5 日目のマウスから腎臓を採取し, TRIzol (Invitrogen) によって RNA を抽出した。1 μ g の全 RNA を Revetra Ace (TOYOBO) を用いた逆転写反応により cDNA を合成した。各 cDNA についてリアルタイム定量的 PCR 法を Step One Plus (Applied Biosystems) により行った。*Hprt1* を内部標準として各遺伝子の発現量を相対定量した。各遺伝子を検出するのに用いたプライマー配列は表 6-1 に示した。

表 6-1 マウス qRT-PCR に用いたプライマー一覧

遺伝子名	プライマー	配列 (5'→3')
<i>Hprt1</i>	Forward	TGCTGCTTTTACTCTCCTTGCTAC
	Reverse	TCTTCCACCTCCATTCTTTTCC
<i>Epo</i>	Forward	TGTTGTTGGATATGCCCTTG
	Reverse	GCGCTCATCTTAGGCTTTGT
<i>Hif1α</i>	Forward	CAGAATGGAACGGAGCAAAAG
	Reverse	GCTGTGGTAATCCACTCTCATCC
<i>Glut1</i>	Forward	ACATGGAACCACCGCTACG
	Reverse	AGTTCCGCTGCCAAAG
<i>Ldha</i>	Forward	AATGAAGGACTTGGCGGATG
	Reverse	GATGTTTACGTTTCGCTGGA
<i>Pgk1</i>	Forward	GGAAGCGGGTCGTGATGA
	Reverse	GCCTTGATCCTTTGGTTGTTTG
<i>Vegf</i>	Forward	GTACCCCGACGAGATAGAGT
	Reverse	ATGATCTGCATGGTGATGTTG

6-3. 結果

6-3-1. 低温曝露後脾臓の組織形態

マウスなどの齧歯類では、低酸素曝露、貧血からの回復期、EPOの *in vivo* 投与によって脾造血が盛んになり、赤血球前駆細胞数の増多に伴う、脾腫も観察される(Hara and Ogawa, 1977; Kam *et al.*, 1999)。そこでまず、低温曝露後マウス脾臓の形態を観察することとした。低温曝露後の5日目の脾臓は、0日目と比較し脾腫を呈していた(図 6-1)。また体重あたりの脾臓重量を測定した結果、低温曝露後5日目の脾臓重量は初期値と比較し、約2倍に増加していた。その後、脾臓重量は減少し、14日目には初期値と同程度となった。

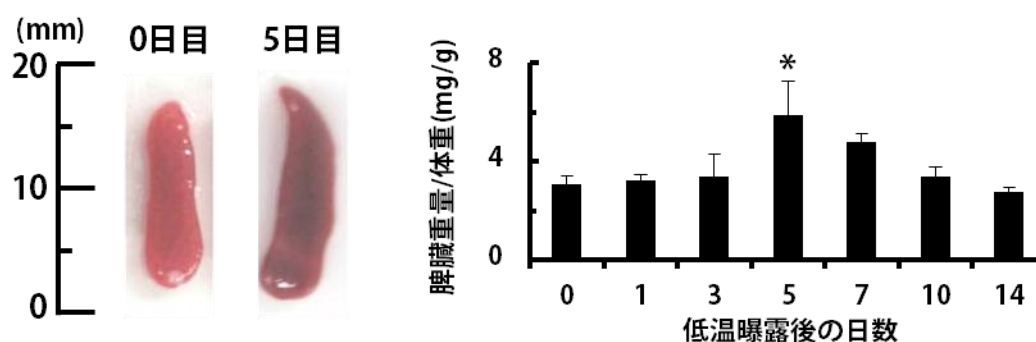


図 6-1 低温曝露マウス脾臓の形態

低温曝露後5日目のマウス脾臓は曝露前と比較し、肥大していた。また組織重量を測定した結果、低温曝露5日目の脾臓は、初期値の約2倍程度まで増加していた。その後、脾臓重量は徐々に低下し、14日目には初期値と同程度となった。*0日目と比較し $p < 0.05$ を示す(原出典:Maekawa *et al.*, *J Exp Biol*)。

続いて、脾腫が観察された低温曝露後5日目の脾臓の組織切片を作製し、赤血球系細胞認識抗体 Ter119を用いて免疫染色を行った。その結果、0日目と比較し、Ter119細胞数の増加傾向が観察された(図 6-2)。

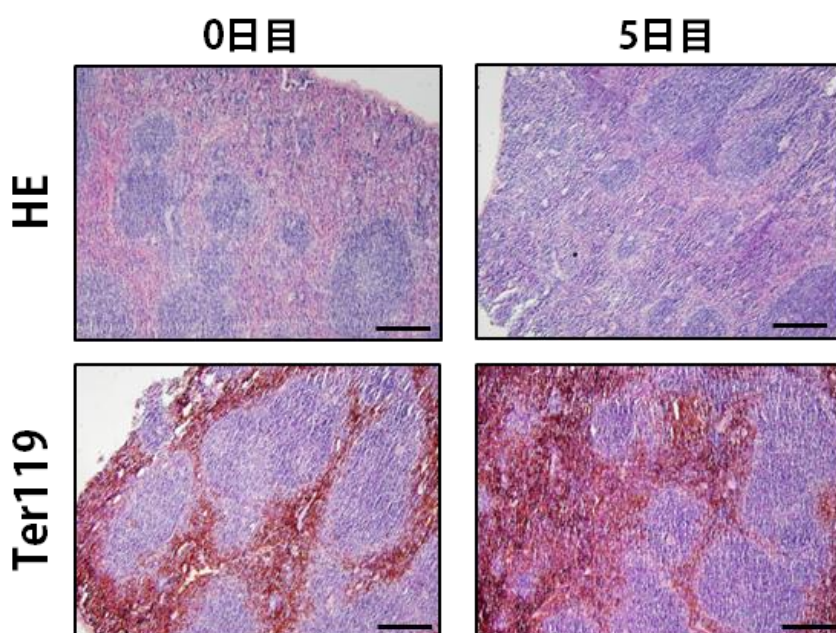


図 6-2 低温曝露マウス脾臓の組織切片像

低温曝露後5日目のマウス脾臓の組織切片像。上はHE染色，下は赤血球系細胞認識抗体Ter119による免疫染色像。低温曝露後5日目の脾臓は，0日目と比較してTer119抗体陽性の領域が広がっている。(原出典:Maekawa *et al.*, *J Exp Biol*)。

定量的なデータを取得するため，脾臓から細胞懸濁液を調整し，Ter119 抗体により赤血球系細胞を傾向標識し，フローサイトメリー解析を行った。結果，Ter119 陽性細胞数は初期値の何倍となり，その後減少し，14 日目には初期値に戻った(図 6-3)。以上より，低温曝露後に観察された脾腫は，赤血球系細胞数の増加によるものであると結論した。

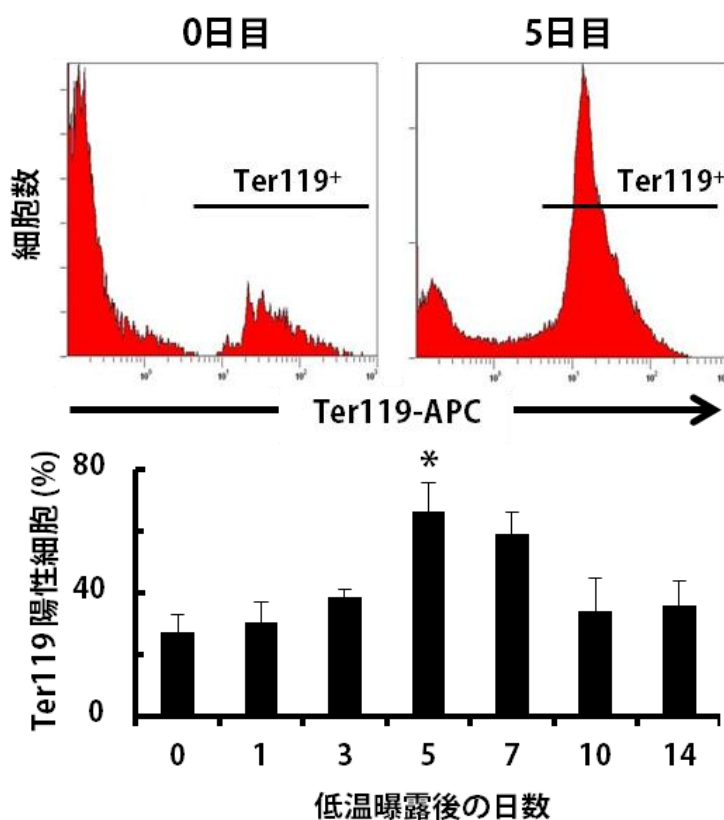


図 6-3 低温曝露マウス脾臓中の赤血球系細胞の分布

低温曝露後5日目のマウス脾臓におけるTer119陽性赤血球系細胞数の変動低温曝露後5日目の脾臓中の赤血球系細胞数が、初期値と比較し約2倍に増加した。その後は徐々に減少した。*は0日目と比較し $p < 0.05$ を示す(原出典:Maekawa *et al.*, J Exp Biol)。

6-3-2. 低温曝露後の造血巣中の赤芽球系細胞の分布

先の実験で低温曝露後の脾臓中において赤血球系細胞数の増加が見られた。より詳細に、分化段階毎の赤芽球を計数するため、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、最も未熟な赤芽球である前赤芽球(CD71 強陽性, Ter119 弱陽性)から

好塩基性赤芽球 (CD71 強陽性, Ter119 陽性), 多染性赤芽球 (CD71 弱陽性, Ter119 陽性), 正染性赤芽球 (CD71 陰性, Ter119 陽性) の 4 つの集団に分離可能であった (図 6-4)。

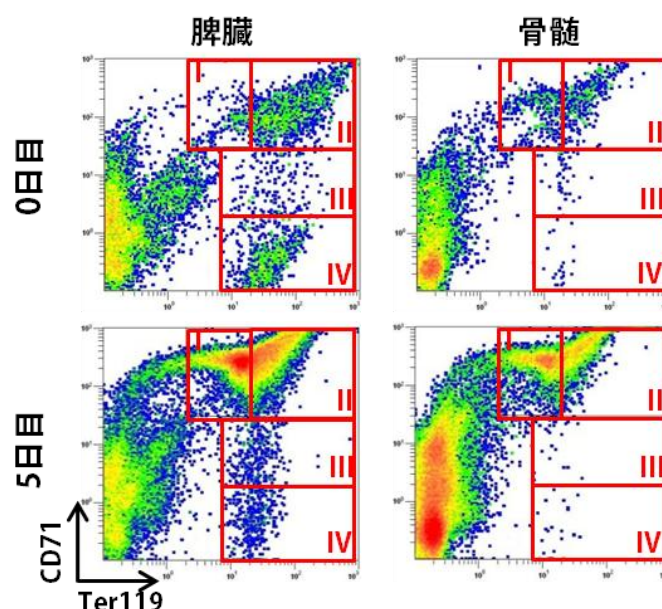


図 6-4 フローサイトメリー法による造血巣中の赤芽球系細胞分画

Ter119とCD71抗体による蛍光二重染色とフローサイトメリー解析により, 赤芽球を四つの分化段階に分離できる。I, 前赤芽球; II, 好塩基性赤芽球; III, 多染性赤芽球; IV, 正染性赤芽球。(Maekawa *et al.*, *J Exp Biol.*より改変引用)。

低温曝露後 5 日目のマウス脾臓では, 前赤芽球細胞の数は定常時の約 2.5 倍に増加していたが, それ以降は減少する傾向が見られた。また主要造血巣である骨髄においても, 低温曝露後 1 日目から前赤芽球数の増加傾向が見られ, 脾臓と異なり極大値は 10 日目を示し, 低温曝露後 14 日目まで高値を維持する結果となった。好塩基性赤芽球数も前赤芽球数と同様の傾向を示した。一方, 分化段階が進んだ, 多染性赤芽球や正染性赤芽球数は低温曝露後 10, 14 日目に増加する傾向が見られた。これら分化が進んだ赤芽球は, 低温曝露後 5 日目に増加した前赤芽球に由来すると考えられる。

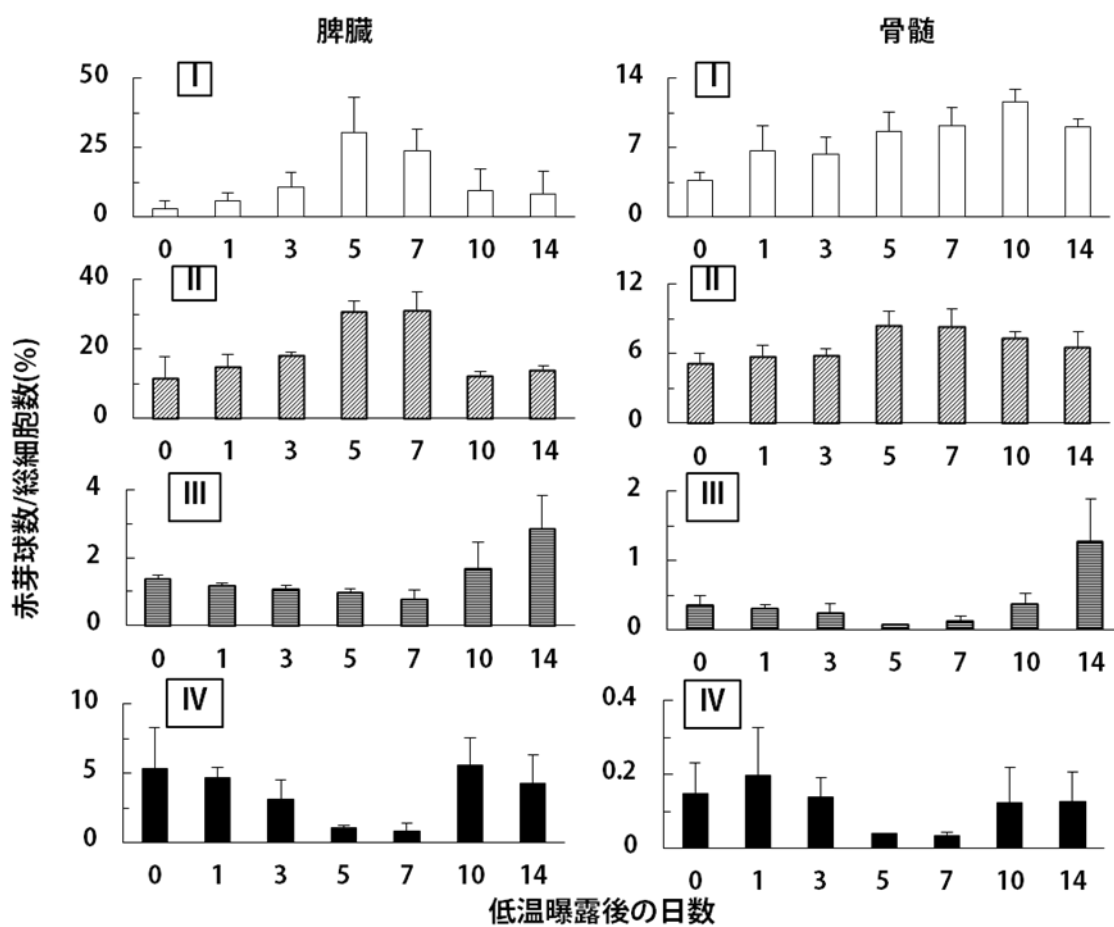


図 6-5 低温曝露マウス造血巣中の各赤芽球数の分布変動

低温曝露後のマウス脾臓と骨髄における各分化段階の赤芽球数の分布。I, 前赤芽球; II, 好塩基性赤芽球; III, 多染性赤芽球; IV, 正染性赤芽球(原出典:Maekawa *et al.*, J Exp Biol)。

6-3-3. 低温曝露後の造血巣中のコロニーアッセイ法による CFU-E 数の検討
赤芽球よりも未熟な CFU-E 数の造血巣内の変動を解析するため、赤芽球コロニーアッセイを行った。その結果、低温曝露 3 日目の脾臓において、CFU-E 数の顕著な増加が見られた。また脾臓の CFU-E 数はその後、減少する傾向が見られた。一方、骨髄においても脾臓ほどではないが増加傾向が見られた。

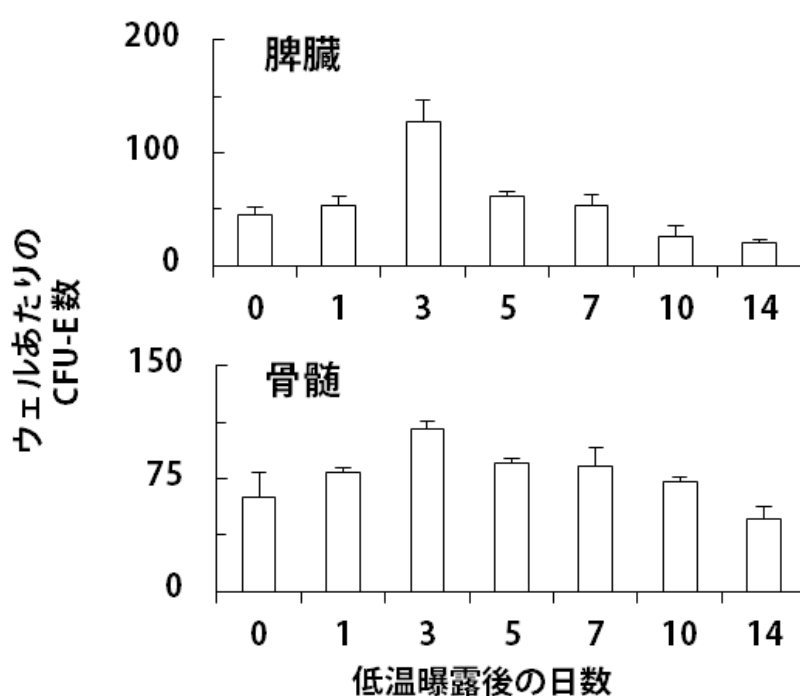


図 6-6 低温曝露マウス造血巣中の CFU-E 数の変動

低温曝露後のマウス脾臓と骨髄における CFU-E 数の変動を *in vitro* コロニー形成法により計数した(原出典:Maekawa *et al.*, J Exp Biol)。

6-3-4. 低温曝露後の EPO および低酸素応答遺伝子発現量の測定

これまでの解析により、低温曝露により造血巣中の赤血球前駆細胞数が増加していた。次に、腎臓での赤血球造血因子 EPO の遺伝子発現量を qRT-PCR 法により解析した。その結果、低温曝露後 1 日目に増加傾向を示し、

さらに4日目には初期値の約20倍程度の極大値となった(図6-6)。またHIFによる低酸素応答性の転写制御を受ける遺伝子はEPO以外にも多数報告されている(Semenza, 2001)。そこで腎臓中での、EPO以外のHIF応答遺伝子4種(GLUT1, LDHA, PGK1, VEGF)についても発現量の変動を解析した。その結果、低温曝露後4日目において、発現量の増加がそれぞれ見られた(図6-7)。

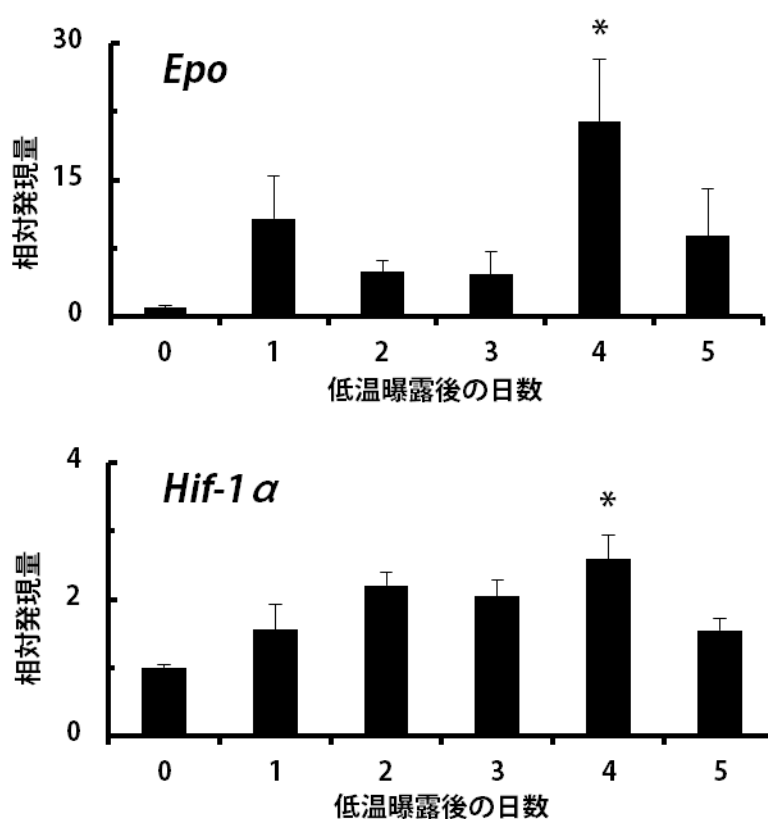


図6-7 低温曝露後腎臓でのEPOおよびHIF-1αの遺伝子発現量

低温曝露後腎臓におけるEPOとHIF-1αの遺伝子発現量をqRT-PCR法により定量した。低温曝露後1日目からEPOの発現量は増加傾向を示し、4日目には初期値の約20倍程度の増加を示した。またEPOの低酸素応答性の転写制御発揮に重要なHIF-1αの発現量も4日目に極大値を示した(原出典:Maekawa *et al.*, J Exp Biol)。

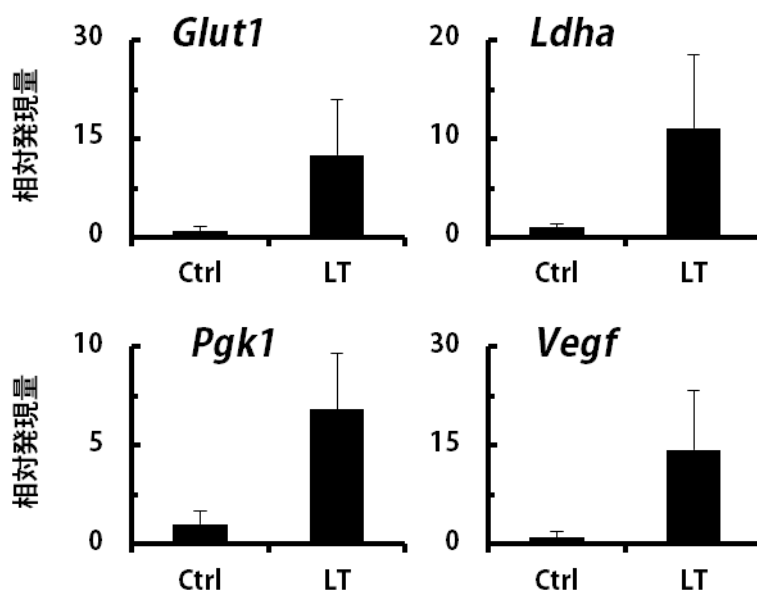


図 6-8 低温曝露後腎臓での HIF 応答遺伝子の発現解析

低温曝露前 (Ctrl) と低温曝露後 4 日目 (LT) の腎臓における HIF 応答遺伝子の発現量を解析した。いずれの遺伝子においても、低温曝露による発現量増大を示した。低温曝露前と比較した統計値は以下の通り、*Glut1*, $p = 0.15$; *Ldha*, $p = 0.04$; *Pgk1*, $p = 0.05$; *Vegf*, $p = 0.10$ 。(原出典: Maekawa *et al.*, J Exp Biol)。

6-4. 考察

前章で、低温曝露後によってマウスの循環赤血球数が上昇する現象が見いだされた。本章の解析を通して、循環赤血球数上昇が、腎臓での赤血球造血因子 EPO の発現量増大に伴う、赤血球造血亢進に起因することが明らかとなった。齧歯類において、主たる造血の場は骨髄であるが、低酸素環境曝露、貧血からの回復など、造血ストレス時は、脾造血が重要な役割を担う。脾摘出マウスを低酸素曝露すると、正常マウスと比較して赤血球数の上昇が遅延する (Markoe *et al.*, 1973)。よって、造血ストレス時の赤血球数増加においては、脾臓血が担うということが示された。低温曝露でも同様に、脾臓における一過的な赤血球造血亢進が見られたため、低温曝露 14 日目までの循環赤血球数上

昇は、脾造血が由来であることが示唆された。一方、骨髄でも赤血球造血亢進が見られたが、脾臓ほど顕著ではなく、低温曝露を通して持続的に亢進していた。これはマウスの赤血球寿命は40日と短く(Van Putten, 1958)、一過的な造血亢進だけでは、低温曝露後まもなく循環赤血球数が初期値へと戻ってしまうことが予想される。したがって、低温環境下での骨髄の持続的な赤血球造血亢進は、循環赤血球数の高値維持を担っていると考えられる。

また低温曝露後の赤血球造血は腎臓での EPO 遺伝子発現量の増大に起因することが明らかとなった。加えて HIF-1 α や HIF 応答遺伝子の発現量上昇も見られたことから、低温曝露後の腎臓内の酸素分圧が低下し、結果 HIF-1 α が安定化していることが示された。腎臓内の酸素分圧低下は、熱産生に必要な酸素の消費量増大に起因するものと考えられる。HIF の標的遺伝子は多岐にわたっており、解糖系による ATP 合成の促進も担う(Semenza, 2001)。実際に我々は、解糖系で機能する遺伝子(GLUT1, LDHA, PGK1)の発現量増大を示した(図 6-7)。腎臓内では解糖系も積極的に働かせ、熱産生に必要な ATP 合成を促進していると考えられる。よって低温曝露への適応において、HIF が重要であることが示唆される。低温環境曝露または低体温時の HIF の転写活性を検証した事例が存在する。外温動物であるコイでは、低温曝露によって HIF の転写活性が促進される(Rissanen *et al.*, 2006)。一方、低体温マウスでは低酸素下での HIF-1 α 転写活性が抑制されるとの報告がある(Tanaka *et al.*, 2010)。内温動物と外温動物、ならびに体温調節時と低体温時における HIF の挙動は異なるが、HIF が動物の低温環境適応において重要な役割を担うことが示唆される。

先行研究で Deveci らは、8週間低温順化させたラットにおいて、循環赤血球数の増加は見られたが、網状赤血球数は減少していることから、赤血球寿命の

寿命延長に伴い循環赤血球数が増加したと結論した(Deveci *et al.*, 2001)。本報告においては、低温曝露後継時的な血球数ならびに造血の変動を追尾していないが、ラットにおいても低温曝露初期の循環赤血球数増加は、我々のマウスでの知見同様、赤血球造血亢進に起因するものと考えられる。一方、我々の解析結果では、低温曝露後 56 日目(8 週目)の網状赤血球数は、初期値と同程度であった。したがって、低温環境下での赤血球数高値維持の機序はラットとマウスでは異なることが示唆された。

【第七章】 統括と展望

50 年前, Cline と Waldmann によって, ヒョウガエルを用いた研究から低温環境に応答した循環赤血球数の変動および赤血球造血制御の存在が示された(Cline and Waldmann, 1962)。その後, 低温環境下における血球数変動や造血への影響について複数報告がなされた。しかしながら, いずれの報告においても循環血球数変動に至る, 造血制御の応答について明らかにした例はない。また動物は, 環境温度変化への応答について外温動物と内温動物に大別されることを第一章で述べた。それぞれ異なる様式で, 環境の温度変化へ適応するが, 造血制御も同様であると考えた。実際, 本研究により外温・内温動物それぞれで異なる循環赤血球数および赤血球造血制御の応答が明らかとなった。これまで循環赤血球数の恒常性は, 造血因子あるいは組織細胞間相互作用などの「内因性」刺激によって維持あるいは調節に関する研究が中心であった。これらに加え, 本研究は新たに「外因性」刺激として低温環境を提示し, 動物の個体維持の基幹系である造血系, 特に赤血球造血系の応答を見出した。

【ツメガエル赤血球造血の低温環境応答】

ツメガエルを低温環境(5°C)に曝露すると 1 日以内に, 循環赤血球数が初期値の約 70%にまで低下し, 少なくとも 5 日間は低値を維持した。その後常温飼育に戻すことで, 循環赤血球数がわずか 2 日で可逆的に回復した。ツメガエルにおける循環赤血球数の変動に至る機序を解析した結果, まず急性期における赤血球数の減少は肝臓内での赤血球破壊亢進によるものであることが示された。その後の慢性期については, 一過的に肝臓での赤血球造血が亢進するものの, 新生赤血球が循環血に移行せず, 肝臓内に貯留するため循環赤血球

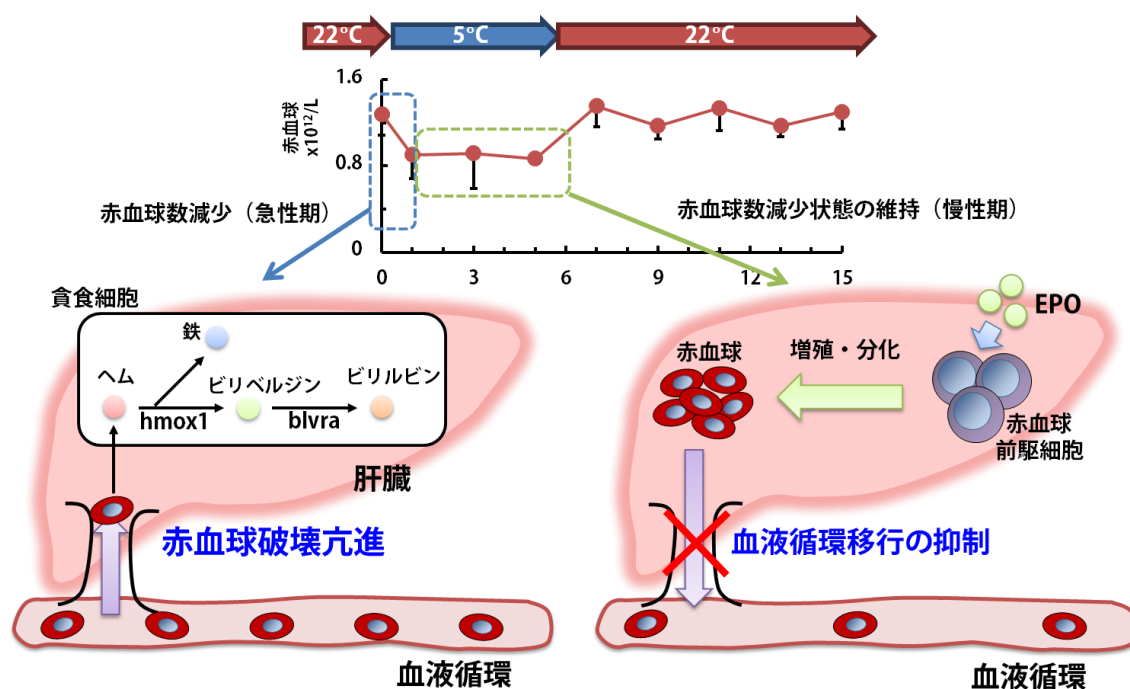


図 7-1 低温曝露ツメガエルにおける赤血球造血応答の模式図

数が低値を維持することが明らかとなった(図 7-1)。

低温環境下のツメガエルでは、体温低下に伴い活動性、基礎代謝量、酸素消費量が減少する。よって、循環赤血球数の減少は、末梢組織への過剰な酸素運搬を防ぎ、体内の酸素環境を維持する役割を担うことが示唆される。ヒキガエル (*Bufo americanus*) では、5°C の環境下において呼吸量が、正常時の約 5% にまで減少する (Hutchison *et al.*, 1968)。またウシガエルを用いた解析では、低温環境下において血圧と心拍数低下が報告されている (Herman and Mata, 1985)。これら調節系と赤血球系が協調的に作用することで、外温動物は低温環境下において体内酸素環境を維持すると考えられる。

本研究からツメガエルは、低温曝露後 1 日以内での赤血球数減少、ならびに新生赤血球の肝臓内貯留による常温飼育移行後の速やかな赤血球数回復といった、環境温度変化に応答して迅速な赤血球数調節機序を持つことが明らかとなった。ツメガエルはアフリカ中南部の温帯域に生息しており、本地域の最高気温は 30°C 程度であり、最低気温は 10°C を下回る。またツメガエルは水棲

かつ湖沼で生息しており、気温の変化に応じた適温箇所への移動はできず、環境温度変化の影響を直接的に受ける。したがって、本研究で見出された赤血球数調節は、環境温度変化に対して迅速に適応するための一つの重要な機序であると考えられる。緊急時に臓器(特に脾臓)から、貯蔵赤血球を循環血中に放出し、酸素運搬能を増加させる現象が報告されている。キタゾウアザラシ (*Mirounga angustirostris*) は、潜水後数分でヘマトクリット値が上昇するが、その増加は脾臓に貯蔵されていた赤血球の放出に由来することが明らかとなっている(Thornton *et al.*, 2001)。

本ツメガエルの解析により、これまで未解明であった、低温環境下での赤血球数変動に至る、赤血球造血の応答が明らかとなったが、これらはその一端を捉えたに過ぎない。例えば、低温曝露後1日以内に赤血球破壊されるが、赤血球破壊による循環赤血球数調節機序の詳細は不明である。これまで循環赤血球数調節機序は、EPO などによる赤血球造血系(正の制御系)の調節によると考えられてきた。しかし、2007年にBogdanovaらは、赤血球貪食という負の制御系による循環赤血球数調節機序の存在を、EPO 過剰発現トランスジェニックマウスの解析から明らかにした(Bogdanova *et al.*, 2007)。具体的な分子機序は未知だが、本研究のツメガエルが、赤血球数負の制御調節を解き明かすモデルとして期待される。

また低温曝露による造血巣内での新生赤血球貯留の機序も不明である。哺乳類における赤血球造血は、赤芽球小島(Erythroblastic island)と呼ばれる微小環境内で起こり、赤血球前駆細胞の分化・増殖、脱核を支持していることが明らかとなっている(Chasis and Mohandas, 2008)。この微小環境の中心に

接着相互作用に関わる因子として, Erythroblast macrophage protein (Hanspal and Hanspal, 1994), インテグリン $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1(Sadahira *et al.*, 1995), ICAM-4/インテグリン α_v (Lee *et al.*, 2006)などが報告されている。これら接着因子を介して赤血球前駆細胞の分化・増殖, 抗アポトーシス, 脱核を制御しているとされている。ツメガエルにおける赤血球造血の微小環境はいまだ明らかになっていないが, 仮にマクロファージのような足場となる微小環境が存在するならば, 低温環境によって接着因子の発現に変化が見られ, 足場から離れることなく肝臓内に貯留したと考えられる。そこで細胞間結合及び細胞-細胞外マトリックス接着時に細胞内に分布する局所接着蛋白質であるビンクリン (Vinculin)を, 免疫染色法にて検出し, 肝臓内で新生赤血球が細胞接着により

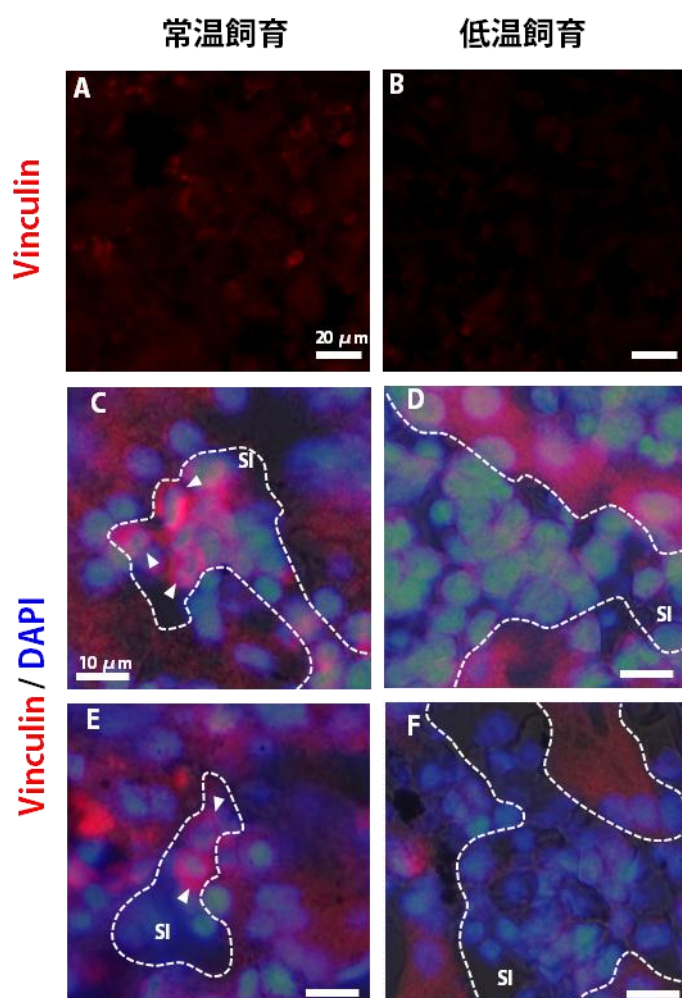


図 7-2 低温曝露後肝臓切片での抗ビンクリン抗体による免疫組織染色

PHZ投与後の貧血回復期(7日目)に低温環境に移行し, 移行後5日目の肝臓の凍結切片を作製した。切片を抗ビンクリン抗体で蛍光染色を施し, 蛍光顕微鏡にて観察した。常温飼育群では, 肝類洞内にビンクリン陽性細胞が検出された(A,C,E)。一方で, 赤血球貯留が見られる低温飼育群では, ビンクリン陽性細胞は観察されなかった(B,D,F)。本結果から, 新生赤血球貯留の機序は, 接着因子による制御以外の別の可能性が考えられた(原出典:Maekawa *et al.*, J Exp Biol, 2012)。

貯留されているかを検証した。結果、常温飼育群ではビンクリン陽性な血球細胞が観察されたが、低温飼育群ではビンクリン陽性で、細胞接着している血球は検出されなかった(図 7-2)。したがって、肝臓内の新生赤血球貯留については他の可能性が考えられる。その一つが、肝臓内類洞の血流量減少である。血圧低下や肝臓の血管収縮などにより、物理的に赤血球が循環血へ移行しにくくなっている可能性があり、今後検討を重ねていく必要がある。

また本研究では、慢性的および急性的な低温曝露による循環血球数の変動を示した(図 2-1, 2)。循環血球の減少はどちらも観察されたが、減少に至るまでの期間や血球減少数は慢性と急性で大きく異なった。慢性および急性での循環血球数変動の違いは、低温度への順化過程が異なることが一因と考えられる。同じ動物種でも、生息域または季節によって低温耐性の限度が異なることは古くから報告されている。例えば、冬の動物は、夏の動物ならば致死的な低温にも耐えることができる。このような効果は、動物を一定時間きまった温度で飼育することによっても再現できる。低温耐性と造血系との関連を明らかにすることは、低温環境適応における造血系関与の理解をより深めることができると考えられる。ツメガエルを 20~10°C の異なる温度でそれぞれ順化させた実験群を用意する。その後、5°C の環境下へ移行し、本研究で行った解析手法を用いて赤血球造血の変動を検討する。本実験により、低温耐性獲得における赤血球造血系の関与を明らかにすることができる。

【マウス赤血球造血の低温環境応答】

マウスを低温環境に曝露すると、ツメガエルとは対照的に赤血球数が増加した。また赤血球造血能の亢進も観察され、特に脾臓での亢進が顕著に見られた。加えて、低温曝露後の赤血球造血亢進は、腎臓での EPO 発現上昇に起因するものであり、同時に低酸素応答遺伝子の発現量も増加したことから、腎臓内の組織内酸素分圧が低下していると示唆された(図 7-3)。酸素分圧の低下は、組織内酸素消費量の増大に伴うと考えられ、赤血球数増加により末梢組織への酸素運搬能を上昇させることが可能となる。内温動物が備える体温調節機序は、ふるえによる熱産生に始まり、皮膚血管収縮による放熱抑制や筋肉・臓器などにおける熱産生など、神経・内分泌系により低温曝露後速やかに働く。一方、低温曝露後の赤血球数増加に至るまでの期間は 14 日目と長い。よって低温曝露後の赤血球数変動は、体温調節機序の中でも、長期間の低温曝露

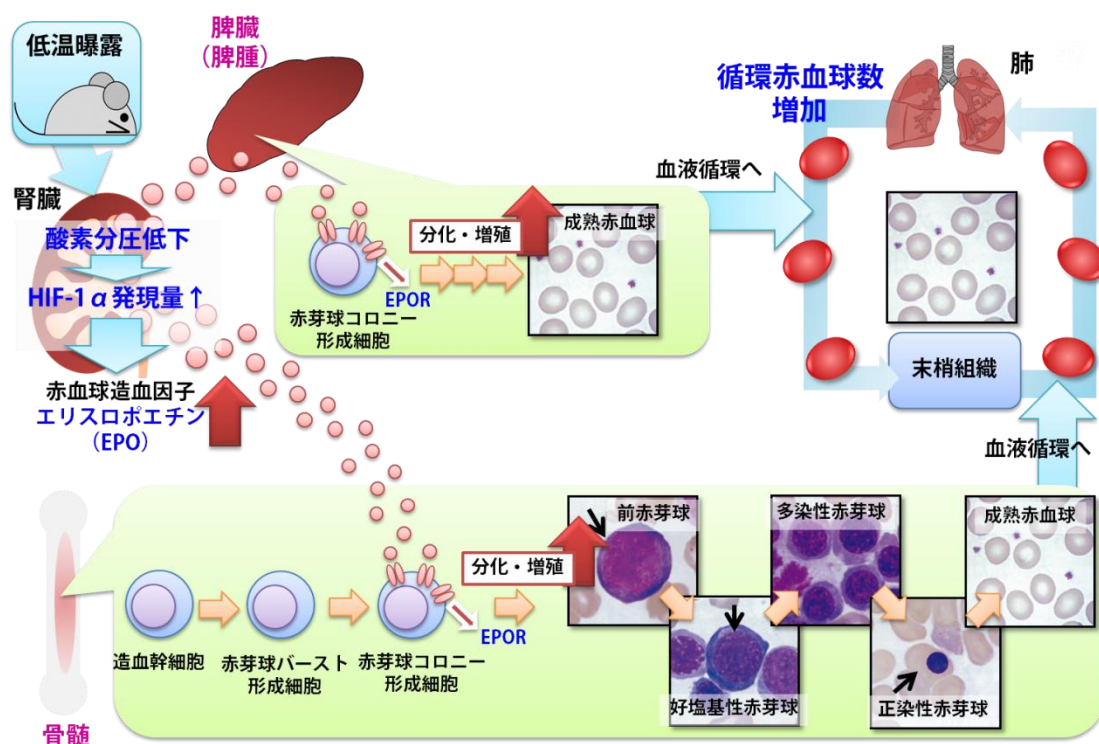


図 7-3 低温曝露マウスにおける赤血球造血応答の模式図

時に重要であると考えられる。

体温調節機序は、主に神経・内分泌系を中心として、膨大な知見が集積されている。本研究では、新たに赤血球造血系が体温調節に関与することを示した。しかしながら、それぞれの調節系が独立して機能し、体温調節を担うのではなく、赤血球造血系と神経・内分泌系が相互に干渉・交差すると考えられる。実際に、低温環境下で機能する神経・内分泌系の分子が、赤血球造血機能に関与することが多数報告されている。

甲状腺ホルモンは低温曝露後に産生・分泌量が増加し、末梢組織における ATP 合成・分解を促進し、熱産生を促す。また赤血球造血への作用についての報告も多数存在する。赤血球前駆細胞を *in vitro* で培養する実験において、甲状腺ホルモンが赤血球前駆細胞の分化と増殖を促進させることが明らかとなっている(Golde *et al.*, 1977; Dainiak *et al.*, 1978)。また臍帯血由来血球細胞を出発材料とした *in vitro* での赤血球生産の過程において、甲状腺ホルモン(T₃; 3,5,3-triiodothyronine)添加により、赤血球の最終分化を高効率で誘導可能であることが報告されている(Leberbauer *et al.*, 2005)。また *in vivo* 投与実験では、赤血球造血亢進に伴う、循環赤血球数の増加が報告されている(Sullivan and McDonald, 1992)。甲状腺ホルモンのレセプター(TR α)遺伝子欠損マウスでは、赤血球造血機能が低下し、貧血を呈する(Kendrick *et al.*, 2008)。さらに EPO の産生・分泌への甲状腺ホルモンの影響も報告されている。EPO を産生するヒト肝癌由来細胞株 HepG2, ならびにラット腎臓の *in vitro* 培養系において、低酸素誘導した EPO 遺伝子の発現量が、甲状腺ホルモン添加によって促進されることが明らかとなっている(Fandrey *et al.*, 1994)。これら知見と我々の結果を統合すると、低温曝露後の EPO 発現量の増大および赤

血球造血亢進は、甲状腺ホルモンの産生・分泌量増大に起因することが示唆される。

インスリンは膵ランベルハンス島のβ細胞から分泌され、血中グルコース濃度の調節を担っている。インスリンは、食事後などの血中グルコース濃度増加により分泌が促進される。インスリンは特に脂肪組織と筋肉に作用し、GLUT4 遺伝子発現量を増大および蛋白質の細胞膜への移行を促進し、細胞内へのグルコースの取り込みを促進させる(Cushman and Wardzala, 1980; Coderre *et al.*, 1992)。結果、血中グルコース濃度調節を行う。インスリン刺激により取り込まれたグルコースが、ATP 合成に利用されるという観点から、インスリンが体温調節において重要な役割を担うことが示唆されているが、直接的な証拠は報告されていない(Rothwell and Stock, 1988; Silva, 2006)。一方、インスリンの赤血球造血への関与は多数報告されている。Sawada らは、ヒトの赤芽球コロニーアッセイにおいて、インスリンまたはインスリン様成長因子-1 (IGF-1) が赤血球前駆細胞に直接作用し、赤芽球コロニー形成に重要な因子であることを明らかにしている(Sawada *et al.*, 1989)。その後、インスリンと IGF-1 がそれぞれの受容体どちらにも結合し、赤血球前駆細胞の分化・増殖を促進していることが確認された(Miyagawa *et al.*, 2000)。現在では、赤芽球コロニーアッセイならびに *in vitro* での赤血球分化誘導において、インスリンまたは IGF-1 含有培地が利用されている。*in vivo* 作用については、IGF-1 の赤血球造血亢進作用がいくつか報告されている。出生直後のラットに IGF-1 を投与することにより、骨髄での赤血球造血が亢進する(Philipps *et al.*, 1988)。この時、血中 EPO 濃度も増加するが、赤血球造血亢進よりも後に起こることがわかっている。また下垂体除去ラットに IGF-1 を投与することで、赤血球造血が亢進することが明らかとなっている(Kurtz *et al.*, 1988)。以上の報告から、インスリンまたは IGF-1 が

内分泌作用により直接赤血球前駆細胞に作用し、分化・増殖を刺激すると考えられる。低温環境下におけるインスリン分泌制御については不明だが、低温環境下のマウスでは摂餌量が増加するという報告から(Imai *et al.*, 2006), 血中グルコース上昇に伴うインスリン分泌量増大が示唆される。したがって、インスリンが低温環境下における血中グルコースの調節ならびに赤血球造血機能の亢進を担う可能性がある。

副腎髄質から分泌されるエピネフリン(アドレナリン)は骨格筋における血管拡張作用や酸素消費量増大作用がヒトにおいて報告されており、体温調節への関与が示唆されている(Simonsen *et al.*, 1992; Simonsen *et al.*, 1993)。またエピネフリンと赤血球造血の接点は古くから知られている。ラスターウイルス性マウス赤白血病細胞株 R-19A は、機能的な β -エピネフリン受容体を発現しており、その受容体数は EPO 依存的に増加することが報告されている(Sytkowski and Kessler, 1984)。またエピネフリンおよびノルエピネフリンは、ヒトの *in vitro* 赤芽球コロニー形成能を促進する作用があることが報告されている(Fonseca *et al.*, 2004)。

以上のように、EPO の内分泌作用だけではなく、神経系・内分泌系因子が EPO と共作用して、低温曝露後マウスにおける赤血球造血亢進に至ったと考えられる。上述した因子が、低温曝露後の赤血球造血亢進に関与しているかは不明であり、今後の課題であるが、個体内の赤血球造血系と神経・内分泌系の連鎖調節機序を解明する上で、低温曝露モデルが非常に有用であると期待される。

地球上には数多の脊椎動物が存在する。第一章で述べたように、ほとんどすべての脊椎動物は造血系を備えているが、動物によって造血巣が異なることから、造血機序は多様である。加えて、動物はそれぞれ生息環境が異なり、環境に合わせて様々な調節系を働かせることで、その環境ないし環境変化に適応する。本研究では外温動物としてツメガエルを、内温動物としてマウスを対象に、低温環境に応答する赤血球造血機序を解析し、これまで報告のある低温環境への適応機序を元に、赤血球造血系の関与を論じた。しかしながら、本研究では二種の動物について解析したに過ぎず、ここで見出せなかった赤血球造血機序ならびに本研究成果では説明できない事象が存在するだろう。その一つに、哺乳類の冬眠が挙げられる。多くの齧歯類は、冬期などの環境温度が低下した際に、低体温となり、呼吸量、心拍数、酸素消費量が低下し、エネルギー消費量を最小限にする。冬眠動物の循環血球数の変動は、Reznikらのグループ(ヨーロッパハムスター)と Deveci らのグループ(ゴールデンハムスタ)によって報告されており、冬眠中のハムスターは、冬眠前と比較して赤血球数は変動しない(Reznik *et al.*, 1975; Deveci *et al.*, 2001)。本結果は、低温曝露後マウスの赤血球数増加やヒトの低体温症時に呈する貧血とは異なることから、低温曝露後に冬眠を行う動物には異なる赤血球造血機序、すなわち冬眠時に循環赤血球数を維持する機序の存在が示唆される。本研究をきっかけとして今後、様々な動物で環境温度変化に応答する造血機序を解析・比較することで、共通原理と相違点が明らかとなり、脊椎動物における造血機序ならびに環境温度変化への応答機序の理解が深まることを期待する。

【謝辞】

本研究をおこなうにあたり、丁寧な御指導、御鞭撻を頂いた早稲田大学 大学院先進理工学研究科の加藤尚志教授に心より感謝申し上げます。修士課程からの配属だったのにもかかわらず、快く研究室に向かい入れてくれ、血液学に関する幅広い知識と実験手技を授けていただきました。また研究だけではなく、広い視点で様々なことを学ぶ機会を頂きました。

学位論文審査において、貴重な御指導、御助言を賜りました早稲田大学 大学院先進理工学研究科の中村正久教授、小泉博教授に深く感謝いたします。

早稲田大学での研究期間の終始にわたり、多くの御助言と PBL プログラムなどの貴重な機会を与えてくださいました、早稲田大学 大学院先進理工学研究科の梅津光生教授、早稲田大学 大学院先進理工学研究科の清水功雄教授に御礼申し上げます。

学部研究において生物学研究への道を示していただき、卒業後も多くの御助言を賜りました埼玉大学 理学部 生体制御学科の小林哲也教授に、心より感謝申し上げます。

早稲田大学 加藤研究室の皆様には、修士課程からの研究室配属にも関わらず、暖かく向かい入れていただきましたこと感謝申し上げます。また会沢洋一氏、小坂展慶氏、小坂菜美氏、倉持裕子氏、山本雄介氏、西川裕展氏、家村

仁美氏, 奥井武仁氏には, 研究に関する議論や御指導, 御協力頂きましたこと感謝申し上げます。特に家村仁美氏には本研究を進めるにあたり, 多くの支援を頂きました。

両生類を用いた研究ならびに内分泌学の豊富な知識を授けていただきました, 早稲田大学 山本和俊氏, 東邦大学 理学部 蓮沼至講師に心より御礼申し上げます。

大内一夫ご夫妻には, いつも健康な実験動物のご提供のみならず, 両生類についての幅広い知識を授けていただきました。心より感謝いたします。

またこの研究のために犠牲となった動物たちに, 心から感謝します。

最後に, ここまで育ててくれ, 大学・大学院生活を支えてくれた両親に感謝いたします。

【引用・参考文献】

【自筆】

Maekawa, S., Iemura, H., Kuramochi, Y., Nogawa-Kosaka, N., Nishikawa, H., Okui, T., Aizawa, Y. and Kato, T. (2012). Hepatic confinement of newly produced erythrocytes caused by low-temperature exposure in *Xenopus laevis*. *J. Exp. Biol.* 215, 3087-3095.

Maekawa, S., Iemura, H., and Kato, T. Enhanced erythropoiesis in mice exposed to low environmental temperature. *J. Exp. Biol., in press.*

【その他】

Aizawa, Y., Nogawa, N., Kosaka, N., Maeda, Y., Watanabe, T., Miyazaki, H. and Kato, T. (2005). Expression of erythropoietin receptor-like molecule in *Xenopus laevis* and erythrocytopenia upon administration of its recombinant soluble form. *J Biochem* 138, 167-175.

Anderson, D. M., Lyman, S. D., Baird, A., Wignall, J. M., Eisenman, J., Rauch, C., March, C. J., Boswell, H. S., Gimpel, S. D., Cosman, D. *et al.* (1990). Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell* 63, 235-243.

Anderson, D. M., Johnson, L., Glaccum, M. B., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Valentine, V., Kirstein, M. N., Shapiro, D. N., Morris, S. W. *et al.* (1995). Chromosomal assignment and genomic structure of Il15. *Genomics* 25, 701-706.

Auron, P. E., Webb, A. C., Rosenwasser, L. J., Mucci, S. F., Rich, A., Wolff, S. M. and Dinarello, C. A. (1984). Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 7907-7911.

Avery, S., Rothwell, L., Degen, W. D. J., Schijns, V. E. J. C., Young, J., Kaufman, J. and Kaiser, P. (2004). Characterization of the first Nonmammalian T2 cytokine gene cluster: The cluster contains

functional single-copy genes for IL-3, IL-4, IL-13, and GM-CSF, a gene for IL-5 that appears to be a pseudogene, and a gene encoding another cytokinelike transcript, KK34. *J. Interferon Cytokine Res.* 24, 600-610.

Azuma, C., Tanabe, T., Konishi, M., Kinashi, T., Noma, T., Matsuda, F., Yaoita, Y., Takatsu, K., Hammarstrom, L., Smith, C. I. *et al.* (1986). Cloning of cDNA for human T-cell replacing factor (interleukin-5) and comparison with the murine homologue. *Nucleic Acids Res* 14, 9149-9158.

Bartley, T. D., Bogenberger, J., Hunt, P., Li, Y. S., Lu, H. S., Martin, F., Chang, M. S., Samal, B., Nichol, J. L., Swift, S. *et al.* (1994). Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 77, 1117-1124.

Barton, J. C., Bertoli, L. F. and Rothenberg, B. E. (2000). Peripheral blood erythrocyte parameters in hemochromatosis: evidence for increased erythrocyte hemoglobin content. *J. Lab. Clin. Med.* 135, 96-104.

Bartunek, P., Karafiat, V., Bartunkova, J., Pajer, P., Dvorakova, M., Kralova, J., Zenke, M. and Dvorak, M. (2008). Impact of chicken thrombopoietin and its receptor c-Mpl on hematopoietic cell development. *Exp. Hematol.* 36, 495-505.

Bei, J. X., Suetake, H., Araki, K., Kikuchi, K., Yoshiura, Y., Lin, H. R. and Suzuki, Y. (2006). Two interleukin (IL)-15 homologues in fish from two distinct origins. *Mol. Immunol.* 43, 860-869.

Bird, S., Zou, J., Kono, T., Sakai, M., Dijkstra, J. M. and Secombes, C. (2005a). Characterisation and expression analysis of interleukin 2 (IL-2) and IL-21 homologues in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*, following their discovery by synteny. *Immunogenetics* 56, 909-923.

Bird, S., Zou, J., Savan, R., Kono, T., Sakai, M., Woo, J. and Secombes, C. (2005b). Characterisation and expression analysis of an interleukin 6 homologue in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 775-789.

- Blahova, J., Dobsikova, R., Strakova, E. and Suchy, P. (2007). Effect of low environmental temperature on performance and blood system in broiler chickens (*Gallus domesticus*). *Acta Veterinaria Brno* 76, S17-S23.
- Bogdanova, A., Mihov, D., Lutz, H., Saam, B., Gassmann, M. and Vogel, J. (2007). Enhanced erythro-phagocytosis in polycythemic mice overexpressing erythropoietin. *Blood* 110, 762-769.
- Boudarra, N., Frippiat, C., Dournon, C. and Frippiat, J. P. (2002). An alternative internal splicing site defines new Ikaros isoforms in *Pleurodeles waltl*. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 659-673.
- Bradley, T. R. and Metcalf, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 44, 287-299.
- Broudy, V. C., Lin, N., Brice, M., Nakamoto, B. and Papayannopoulou, T. (1991). Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood* 77, 2583-2590.
- Bunn, H. F., Gu, J., Huang, L. E., Park, J. W. and Zhu, H. (1998). Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *J. Exp. Biol.* 201, 1197-1201.
- Carey, F. G. and Teal, J. M. (1966). Heat conservation in tuna fish muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 56, 1464-1469.
- Catton, W. T. (1951). Blood cell formation in certain teleost fishes. *Blood* 6, 39-60.
- Caxton-Martins, A. E. and Daimon, T. (1976). Histochemical observations on chicken blood and bone marrow cells. *J. Anat.* 122, 553-558.
- Chasis, J. A. and Mohandas, N. (2008). Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* 112, 470-478.
- Chegini, N., Aleporou, V., Bell, G., Hilder, V. A. and Maclean, N. (1979). Production and fate of erythroid cells in anaemic *Xenopus laevis*. *J.*

Cell Sci. 35, 403-415.

Chen, A. T. and Zon, L. I. (2009). Zebrafish blood stem cells. *J. Cell. Biochem.* 108, 35-42.

Choi, K. D., Lillehoj, H. S., Song, K. D. and Han, J. Y. (1999). Molecular and functional characterization of chicken IL-15. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 165-177.

Chou, C. F., Tohari, S., Brenner, S. and Venkatesh, B. (2004). Erythropoietin gene from a teleost fish, *Fugu rubripes*. *Blood* 104, 1498-1503.

Chou, S. and Lodish, H. F. (2010). Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7799-7804.

Chu, C. Y., Cheng, C. H., Chen, G. D., Chen, Y. C., Hung, C. C., Huang, K. Y. and Huang, C. J. (2007). The zebrafish erythropoietin: functional identification and biochemical characterization. *FEBS Lett.* 581, 4265-4271.

Cline, M. J. and Waldmann, T. A. (1962). Effect of temperature on erythropoiesis and red cell survival in the frog. *The American journal of physiology* 203, 401-403.

Coderre, L., Monfar, M. M., Chen, K. S., Heydrick, S. J., Kurowski, T. G., Ruderman, N. B. and Pilch, P. F. (1992). Alteration in the expression of GLUT-1 and GLUT-4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscles. *Endocrinology* 131, 1821-1825.

Cushman, S. W. and Wardzala, L. J. (1980). Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 255, 4758-4762.

Dabrowski, Z., Sano Martins, I. S., Tabarowski, Z., Witkowska-Pelc, E., Spadacci Morena, D. D., Spodaryk, K. and Podkowa, D. (2007). Haematopoiesis in snakes (Ophidia) in early postnatal development.

Cell Tissue Res. 328, 291-299.

Dainiak, N., Hoffman, R., Maffei, L. A. and Forget, B. G. (1978). Potentiation of human erythropoiesis in vitro by thyroid hormone. *Nature* 272, 260-262.

Dame, C., Fahnenstich, H., Freitag, P., Hofmann, D., Abdul-Nour, T., Bartmann, P. and Fandrey, J. (1998). Erythropoietin mRNA expression in human *fet al* and neonatal tissue. *Blood* 92, 3218-3225.

de Abreu Manso, P. P., de Brito-Gitirana, L. and Pelajo-Machado, M. (2009). Localization of hematopoietic cells in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Cell Tissue Res.* 337, 301-312.

de Sauvage, F. J., Hass, P. E., Spencer, S. D., Malloy, B. E., Gurney, A. L., Spencer, S. A., Darbonne, W. C., Henzel, W. J., Wong, S. C., Kuang, W. J. *et al.* (1994). Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 369, 533-538.

DeLamarter, J. F., Hession, C., Semon, D., Gough, N. M., Rothenbuhler, R. and Mermod, J. J. (1987). Nucleotide sequence of a cDNA encoding murine CSF-1 (Macrophage-CSF). *Nucleic Acids Res* 15, 2389-2390.

Deveci, D., Stone, P. C. and Egginton, S. (2001). Differential effect of cold acclimation on blood composition in rats and hamsters. *J Comp Physiol B* 171, 135-143.

Dodge, W. H. and Moscovici, C. (1973). Colony formation by chicken hematopoietic cells and virus-induced myeloblasts. *J. Cell. Physiol.* 81, 371-386.

Dumoutier, L., Louahed, J. and Renauld, J. C. (2000a). Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J. Immunol.* 164, 1814-1819.

Dumoutier, L., Van Roost, E., Colau, D. and Renauld, J. C. (2000b). Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an

hepatocyte-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10144-10149.

Engelsma, M. Y., Stet, R. J., Saeij, J. P. and Verburg-van Kemenade, B. M. (2003). Differential expression and haplotypic variation of two interleukin-1beta genes in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cytokine* 22, 21-32.

Fandrey, J., Pagel, H., Frede, S., Wolff, M. and Jelkmann, W. (1994). Thyroid hormones enhance hypoxia-induced erythropoietin production in vitro. *Exp. Hematol.* 22, 272-277.

Finch, C. A., Gibson, J. G. and *et al.* (1949). Iron metabolism; utilization of intravenous radioactive iron. *Blood* 4, 905-927.

Fischer, U., Ototake, M. and Nakanishi, T. (1998). In vitro cell-mediated cytotoxicity against allogeneic erythrocytes in ginbuna crucian carp and goldfish using a non-radioactive assay. *Dev. Comp. Immunol.* 22, 195-206.

Fonseca, R. B., Mohr, A. M., Wang, L., Clinton, E., Sifri, Z. C., Rameshwar, P. and Livingston, D. H. (2004). Adrenergic modulation of erythropoiesis following severe injury is mediated through bone marrow stroma. *Surg Infect (Larchmt)* 5, 385-393.

Frangioni, G. and Borgioli, G. (1988). Sites and trend of erythropoiesis in anemic, normal, and splenectomized newts. *J. Exp. Zool.* 247, 244-250.

Frede, S., Freitag, P., Geuting, L., Konietzny, R. and Fandrey, J. (2011). Oxygen-regulated expression of the erythropoietin gene in the human renal cell line REPC. *Blood* 117, 4905-4914.

Fujiki, K., Nakao, M. and Dixon, B. (2003). Molecular cloning and characterisation of a carp (*Cyprinus carpio*) cytokine-like cDNA that shares sequence similarity with IL-6 subfamily cytokines CNTF, OSM and LIF. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 127-136.

Fujiki, K., Shin, D. H., Nakao, M. and Yano, T. (2000). Molecular

cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 beta, high affinity immunoglobulin E Fc receptor gamma subunit and serum amyloid A. *Fish Shellfish Immunol* 10, 229-242.

Fung, M. C., Hapel, A. J., Ymer, S., Cohen, D. R., Johnson, R. M., Campbell, H. D. and Young, I. G. (1984). Molecular-Cloning of Cdna for Murine Interleukin-3. *Nature* 307, 233-237.

Fuse, A., Fujita, T., Yasumitsu, H., Kashima, N., Hasegawa, K. and Taniguchi, T. (1984). Organization and structure of the mouse interleukin-2 gene. *Nucleic Acids Res* 12, 9323-9331.

Garavini, C. and Scandellari, A. (1974). Erythropoiesis in/splenectomized *Triturus cristatus*. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 50, 2105-2110.

Garceau, V., Smith, J., Paton, I. R., Davey, M., Fares, M. A., Sester, D. P., Burt, D. W. and Hume, D. A. (2010). Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products. *J. Leukoc. Biol.* 87, 753-764.

Gill, J. (1989). Seasonal changes in the red blood cell system in the European bison, *Bison bonasus* L. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 92, 291-298.

Golde, D. W., Bersch, N., Chopra, I. J. and Cline, M. J. (1977). Thyroid hormones stimulate erythropoiesis in vitro. *Br. J. Haematol.* 37, 173-177.

Goodwin, R. G., Lupton, S., Schmierer, A., Hjerrild, K. J., Jerzy, R., Clevenger, W., Gillis, S., Cosman, D. and Namen, A. E. (1989). Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 302-306.

Gordon, C. (1990). Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol. Behav.* 47, 963-991.

Gough, N. M., Gough, J., Metcalf, D., Kelso, A., Grail, D., Nicola, N. A., Burgess, A. W. and Dunn, A. R. (1984). Molecular cloning of cDNA

encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Nature* 309, 763-767.

Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M. A., Ahdieh, M. *et al.* (1994). Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264, 965-968.

Gray, P. W., Glaister, D., Chen, E., Goeddel, D. V. and Pennica, D. (1986). Two interleukin 1 genes in the mouse: cloning and expression of the cDNA for murine interleukin 1 beta. *J. Immunol.* 137, 3644-3648.

Gregory, C. J. and Eaves, A. C. (1977). Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. *Blood* 49, 855-864.

Gregory, C. J. and Eaves, A. C. (1978). Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* 51, 527-537.

Guerra, C., Koza, R. A., Walsh, K., Kurtz, D. M., Wood, P. A. and Kozak, L. P. (1998). Abnormal nonshivering thermogenesis in mice with inherited defects of fatty acid oxidation. *J. Clin. Invest.* 102, 1724-1731.

Gunimaladevi, I., Savan, R., Sato, K., Yamaguchi, R. and Sakai, M. (2007). Characterization of an interleukin-15 like (IL-15L) gene from zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol* 22, 351-362.

Hadji-Azimi, I., Coosemans, V. and Canicatti, C. (1987). Atlas of adult *Xenopus laevis laevis* hematology. *Dev. Comp. Immunol.* 11, 807-874.

Hall, A. J., Wells, R. S., Sweeney, J. C., Townsend, F. I., Balmer, B. C., Hohn, A. A. and Rhinehart, H. L. (2007). Annual, seasonal and individual variation in hematology and clinical blood chemistry profiles in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from Sarasota Bay, Florida. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 148, 266-277.

- Hanspal, M. and Hanspal, J. S. (1994). The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. *Blood* 84, 3494-3504.
- Hara, H. and Ogawa, M. (1977). Erythropoietic precursors in mice under erythropoietic stimulation and suppression. *Exp. Hematol.* 5, 141-148.
- Herman, C. A. and Mata, P. L. (1985). Catecholamine effects on blood pressure and heart rate in warm- and cold-acclimated American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 59, 434-441.
- Hultman, K. A., Bahary, N., Zon, L. I. and Johnson, S. L. (2007). Gene Duplication of the zebrafish kit ligand and partitioning of melanocyte development functions to kit ligand a. *PLoS Genet* 3, e17.
- Hutchison, V. H., Whitford, W. G. and Kohl, M. (1968). Relation of body size and surface area to gas exchanger in anurans. *Physiol. Zool.* 41, 65-85.
- Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Ogihara, T., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Sasano, H. *et al.* (2006). Cold exposure suppresses serum adiponectin levels through sympathetic nerve activation in mice. *Obesity (Silver Spring)* 14, 1132-1141.
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S. D., Kaufman, R. J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S. S., Hewick, R., Fritsch, E. F. *et al.* (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313, 806-810.
- Kam, H. Y., Ou, L. C., Thron, C. D., Smith, R. P. and Leiter, J. C. (1999). Role of the spleen in the exaggerated polycythemic response to hypoxia in chronic mountain sickness in rats. *J. Appl. Physiol.* 87, 1901-1908.
- Kato, T., Ogami, K., Shimada, Y., Iwamatsu, A., Sohma, Y., Akahori, H., Horie, K., Kokubo, A., Kudo, Y. and Maeda, E. (1995). Purification and characterization of thrombopoietin. *J Biochem* 118, 229-236.

- Kawasaki, E. S., Ladner, M. B., Wang, A. M., Van Arsdell, J., Warren, M. K., Coyne, M. Y., Schweickart, V. L., Lee, M. T., Wilson, K. J., Boosman, A. *et al.* (1985). Molecular cloning of a complementary DNA encoding human macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1). *Science* 230, 291-296.
- Kawashima, I., Ohsumi, J., Mita-Honjo, K., Shimoda-Takano, K., Ishikawa, H., Sakakibara, S., Miyadai, K. and Takiguchi, Y. (1991). Molecular cloning of cDNA encoding adipogenesis inhibitory factor and identity with interleukin-11. *FEBS Lett.* 283, 199-202.
- Kendrick, T. S., Payne, C. J., Epis, M. R., Schneider, J. R., Leedman, P. J., Klinken, S. P. and Ingley, E. (2008). Erythroid defects in TRalpha^{-/-} mice. *Blood* 111, 3245-3248.
- Kinashi, T., Harada, N., Severinson, E., Tanabe, T., Sideras, P., Konishi, M., Azuma, C., Tominaga, A., Bergstedt-Lindqvist, S., Takahashi, M. *et al.* (1986). Cloning of complementary DNA encoding T-cell replacing factor and identity with B-cell growth factor II. *Nature* 324, 70-73.
- Knutson, M. D., Vafa, M. R., Haile, D. J. and Wessling-Resnick, M. (2003). Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages. *Blood* 102, 4191-4197.
- Kobayashi, I., Sekiya, M., Moritomo, T., Ototake, M. and Nakanishi, T. (2006). Demonstration of hematopoietic stem cells in ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorfii*) kidney. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 1034-1046.
- Kobayashi, I., Kuniyoshi, S., Saito, K., Moritomo, T., Takahashi, T. and Nakanishi, T. (2008). Long-term hematopoietic reconstitution by transplantation of kidney hematopoietic stem cells in lethally irradiated clonal ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*). *Dev. Comp. Immunol.* 32, 957-965.
- Kondera, E. (2011). Haematopoiesis in the head kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.): a morphological study. *Fish Physiol Biochem* 37, 355-362.

- Kono, T., Bird, S., Sonoda, K., Savan, R., Secombes, C. J. and Sakai, M. (2008). Characterization and expression analysis of an interleukin-7 homologue in the Japanese pufferfish, *Takifugu rubripes*. *FEBS J* 275, 1213-1226.
- Krantz, S. B. (1991). Erythropoietin. *Blood* 77, 419-434.
- Kulkeaw, K., Ishitani, T., Kanemaru, T., Fucharoen, S. and Sugiyama, D. (2010). Cold exposure down-regulates zebrafish hematopoiesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394, 859-864.
- Kuramochi Y., Nogawa N., Ishida T., Watanabe T., Kosaka N. and Kato T. (2005). Hematological Changes in Cold-Acclimated *Xenopus laevis*. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 106, 4212.
- Kurtz, A., Zapf, J., Eckardt, K. U., Clemons, G., Froesch, E. R. and Bauer, C. (1988). Insulin-like growth factor I stimulates erythropoiesis in hypophysectomized rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7825-7829.
- Kuter, D. J. (2007). New thrombopoietic growth factors. *Blood* 109, 4607-4616.
- Leberbauer, C., Boulme, F., Unfried, G., Huber, J., Beug, H. and Mullner, E. W. (2005). Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors. *Blood* 105, 85-94.
- Lee, F., Yokota, T., Otsuka, T., Meyerson, P., Villaret, D., Coffman, R., Mosmann, T., Rennick, D., Roehm, N., Smith, C. *et al.* (1986). Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor 1 activities and T-cell- and mast-cell-stimulating activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 2061-2065.
- Lee, G., Lo, A., Short, S. A., Mankelow, T. J., Spring, F., Parsons, S. F., Yazdanbakhsh, K., Mohandas, N., Anstee, D. J. and Chasis, J. A. (2006). Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood*

108, 2064-2071.

Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., Chen, K. K., Fox, G. M., Martin, F., Stabinsky, Z. *et al.* (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 7580-7584.

Liongue, C., Hall, C. J., O'Connell, B. A., Crosier, P. and Ward, A. C. (2009). Zebrafish granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling promotes myelopoiesis and myeloid cell migration. *Blood* 113, 2535-2546.

Lok, S., Kaushansky, K., Holly, R. D., Kuijper, J. L., Lofton-Day, C. E., Oort, P. J., Grant, F. J., Heipel, M. D., Burkhead, S. K., Kramer, J. M. *et al.* (1994). Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 369, 565-568.

Macleay, G. S., Lee, A. K. and Withers, P. C. (1975). Haematological adjustments with diurnal changes in body temperature in a lizard and a mouse. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 51, 241-249.

Macmahon, J. A. and Hamer, A. (1975). Effects of temperature and photoperiod on oxygenation and other blood parameters of sidewinder (*Crotalus cerastes*) adaptive significance. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 51, 59-69.

March, C. J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D. P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C. S., Kronheim, S. R., Grabstein, K. *et al.* (1985). Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315, 641-647.

Markoe, A. M., JP, O. K. and Schiffer, L. M. (1973). Kinetic analysis of splenic erythropoiesis in mice under prolonged hypoxic stress. *Exp. Hematol.* 1, 340-349.

Martin, B. L. and Harland, R. M. (2004). The developmental expression of two *Xenopus laevis* steel homologues, Xsl-1 and Xsl-2. *Gene Expr Patterns* 5, 239-243.

- Meints, R. H., Carver, F. J., Gerst, J. W. and McLaughlin, D. W. (1975). Erythropoietic activity in the turtle: the influence of hemolytic anemia, hypoxia and hemorrhage on hemopoietic function. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 50, 419-422.
- Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood* 111, 485-491.
- Meurs, I., Hoekstra, M., van Wanrooij, E. J., Hildebrand, R. B., Kuiper, J., Kuipers, F., Hardeman, M. R., Van Berkel, T. J. and Van Eck, M. (2005). HDL cholesterol levels are an important factor for determining the lifespan of erythrocytes. *Exp. Hematol.* 33, 1309-1319.
- Miyagawa, S., Kobayashi, M., Konishi, N., Sato, T. and Ueda, K. (2000). Insulin and insulin-like growth factor I support the proliferation of erythroid progenitor cells in bone marrow through the sharing of receptors. *Br. J. Haematol.* 109, 555-562.
- Morita, Y., Ema, H. and Nakauchi, H. (2010). Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J. Exp. Med.* 207, 1173-1182.
- Morris, J. C., Neben, S., Bennett, F., Finnerty, H., Long, A., Beier, D. R., Kovacic, S., McCoy, J. M., DiBlasio-Smith, E., La Vallie, E. R. *et al.* (1996). Molecular cloning and characterization of murine interleukin-11. *Exp. Hematol.* 24, 1369-1376.
- Musacchia, X. J. and Sievers, M. L. (1956). Effects of induced cold torpor on blood of *Chrysemys picta*. *Am. J. Physiol.* 187, 99-102.
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y., Yamazaki, T., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., Nomura, H. *et al.* (1986). Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* 319, 415-418.
- Namen, A. E., Lupton, S., Hjerrild, K., Wignall, J., Mochizuki, D. Y., Schmierer, A., Mosley, B., March, C. J., Urdal, D. and Gillis, S. (1988). Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* 333, 571-573.

- Nogawa-Kosaka, N., Hirose, T., Kosaka, N., Aizawa, Y., Nagasawa, K., Uehara, N., Miyazaki, H., Komatsu, N. and Kato, T. (2010). Structural and biological properties of erythropoietin in *Xenopus laevis*. *Exp. Hematol.* 38, 363-372.
- Nogawa-Kosaka, N., Sugai, T., Nagasawa, K., Tanizaki, Y., Meguro, M., Aizawa, Y., Maekawa, S., Adachi, M., Kuroki, R. and Kato, T. (2011). Identification of erythroid progenitors induced by erythropoietic activity in *Xenopus laevis*. *J. Exp. Biol.* 214, 921-927.
- Obara, N., Suzuki, N., Kim, K., Nagasawa, T., Imagawa, S. and Yamamoto, M. (2008). Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood* 111, 5223-5232.
- Ohtani, M., Hayashi, N., Hashimoto, K., Nakanishi, T. and Dijkstra, J. M. (2008). Comprehensive clarification of two paralogous interleukin 4/13 loci in teleost fish. *Immunogenetics* 60, 383-397.
- Oritslan, N. (1970). Temperature Regulation of Polar Bear (*Thalarctos-Maritimus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 37, 225-&.
- Orkin, S. H. and Zon, L. I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242-245.
- Paffett-Lugassy, N., Hsia, N., Fraenkel, P. G., Paw, B., Leshinsky, I., Barut, B., Bahary, N., Caro, J., Handin, R. and Zon, L. I. (2007). Functional conservation of erythropoietin signaling in zebrafish. *Blood* 110, 2718-2726.
- Pandey, B. N. (1977). Haematological studies in relation to environmental temperature and different periods of breeding cycle in an air breathing fish, *Heteropneustes fossilis*. *Folia Haematol. Int. Mag. Klin. Morphol. Blutforsch.* 104, 69-74.
- Pennica, D., Hayflick, J. S., Bringman, T. S., Palladino, M. A. and

- Goeddel, D. V. (1985). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 6060-6064.
- Philipps, A. F., Persson, B., Hall, K., Lake, M., Skottner, A., Sanengen, T. and Sara, V. R. (1988). The effects of biosynthetic insulin-like growth factor-1 supplementation on somatic growth, maturation, and erythropoiesis on the neonatal rat. *Pediatr. Res.* 23, 298-305.
- Pluznik, D. H. and Sachs, L. (1966). The induction of clones of normal mast cells by a substance from conditioned medium. *Exp. Cell Res.* 43, 553-563.
- Ratcliffe, M. J. (2006). Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 101-118.
- Reznik, G., Reznikschuller, H., Emminger, A. and Mohr, U. (1975). Comparative studies of blood from hibernating and nonhibernating european hamsters (*Cricetus-cricetus* L). *Lab. Anim. Sci.* 25, 210-215.
- Rissanen, E., Tranberg, H. K., Sollid, J., Nilsson, G. E. and Nikinmaa, M. (2006). Temperature regulates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in a poikilothermic vertebrate, crucian carp (*Carassius carassius*). *J. Exp. Biol.* 209, 994-1003.
- Rodnan, G. P., Ebaugh, F. G., Jr. and Fox, M. R. (1957). The life span of the red blood cell and the red blood cell volume in the chicken, pigeon and duck as estimated by the use of $\text{Na}_2\text{Cr}^{51}\text{O}_4$, with observations on red cell turnover rate in the mammal, bird and reptile. *Blood* 12, 355-366.
- Rothwell, L., Hu, T., Wu, Z. and Kaiser, P. (2012). Chicken interleukin-21 is costimulatory for T cells and blocks maturation of dendritic cells. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 475-482.
- Rothwell, N. J. and Stock, M. J. (1988). Insulin and thermogenesis. *Int. J. Obes.* 12, 93-102.

Sadahira, Y., Yoshino, T. and Monobe, Y. (1995). Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *J. Exp. Med.* 181, 411-415.

Salt, R. W. (1949). Cold and Cold-blooded Animals. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 13, 177-181.

Santos, M. D., Yasuike, M., Hirono, I. and Aoki, T. (2006). The granulocyte colony-stimulating factors (CSF3s) of fish and chicken. *Immunogenetics* 58, 422-432.

Sawada, K., Krantz, S. B., Dessypris, E. N., Koury, S. T. and Sawyer, S. T. (1989). Human colony-forming units-erythroid do not require accessory cells, but do require direct interaction with insulin-like growth factor I and/or insulin for erythroid development. *J. Clin. Invest.* 83, 1701-1709.

Sawada, K., Krantz, S. B., Kans, J. S., Dessypris, E. N., Sawyer, S., Glick, A. D. and Civin, C. I. (1987). Purification of human erythroid colony-forming units and demonstration of specific binding of erythropoietin. *J. Clin. Invest.* 80, 357-366.

Schmidt-Nielsen, K. (1997). ANIMAL PHYSIOLOGY Adaptation and environment. Cambridge, UK.: Cambridge University Press.

Schneider, K., Klaas, R., Kaspers, B. and Staeheli, P. (2001). Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties. *Eur. J. Biochem.* 268, 4200-4206.

Schroeder, C., Gibson, L., Nordstrom, C. and Beug, H. (1993). The Estrogen-Receptor Cooperates with the Tgf-Alpha Receptor (C-ErbB) in Regulation of Chicken Erythroid Progenitor Self-Renewal. *EMBO J.* 12, 951-960.

Semenza, G. L. (2001). HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 107, 1-3.

Shoemaker, C. B. and Mitscock, L. D. (1986). Murine erythropoietin gene: cloning, expression, and human gene homology. *Mol. Cell. Biol.* 6,

849-858.

Silva, J. E. (2006). Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 86, 435-464.

Simonsen, L., Stallknecht, B. and Bulow, J. (1993). Contribution of skeletal muscle and adipose tissue to adrenaline-induced thermogenesis in man. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 17 Suppl 3, S47-51; discussion S68.

Simonsen, L., Bulow, J., Madsen, J. and Christensen, N. J. (1992). Thermogenic response to epinephrine in the forearm and abdominal subcutaneous adipose tissue. *Am. J. Physiol.* 263, E850-855.

Sinha, R. C. (1983). Haematological studies on the prewintering and wintering frog, *Rana esculenta*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 74, 311-314.

Socolovsky, M., Nam, H., Fleming, M. D., Haase, V. H., Brugnara, C. and Lodish, H. F. (2001). Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* 98, 3261-3273.

Sohma, Y., Akahori, H., Seki, N., Hori, T., Ogami, K., Kato, T., Shimada, Y., Kawamura, K. and Miyazaki, H. (1994). Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett.* 353, 57-61.

Sullivan, P. S. and McDonald, T. P. (1992). Thyroxine suppresses thrombocytopoiesis and stimulates erythropoiesis in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 201, 271-277.

Sundick, R. S. and Gill-Dixon, C. (1997). A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *J. Immunol.* 159, 720-725.

Suzuki, N., Obara, N., Pan, X., Watanabe, M., Jishage, K., Minegishi, N. and Yamamoto, M. (2011). Specific contribution of the erythropoietin gene 3' enhancer to hepatic erythropoiesis after late

embryonic stages. *Mol. Cell. Biol.* 31, 3896-3905.

Suzuki, T. and Dale, G. L. (1987). Biotinylated erythrocytes: in vivo survival and in vitro recovery. *Blood* 70, 791-795.

Sytkowski, A. J. and Kessler, C. J. (1984). The beta-adrenergic receptor adenylate cyclase complex of Rauscher murine erythroleukemia cells and its response to erythropoietin-induced differentiation. *Blood* 64, 84-90.

Tanaka, T., Wakamatsu, T., Daijo, H., Oda, S., Kai, S., Adachi, T., Kizaka-Kondoh, S., Fukuda, K. and Hirota, K. (2010). Persisting mild hypothermia suppresses hypoxia-inducible factor-1 α protein synthesis and hypoxia-inducible factor-1-mediated gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298, R661-671.

Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. and Hamuro, J. (1983). Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 302, 305-310.

Tavassoli, M., Watson, L. R. and Khademi, R. (1979). Retention of hemopoiesis in tail vertebrae of newborn rats. *Cell Tissue Res.* 200, 215-222.

Thornton, S. J., Spielman, D. M., Pelc, N. J., Block, W. F., Crocker, D. E., Costa, D. P., LeBoeuf, B. J. and Hochachka, P. W. (2001). Effects of forced diving on the spleen and hepatic sinus in northern elephant seal pups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9413-9418.

Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y. and Nagata, S. (1986). Isolation and characterization of the cDNA for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 7633-7637.

Van Putten, L. M. (1958). The life span of red cells in the rat and the mouse as determined by labeling with DFP32 in vivo. *Blood* 13, 789-794.

Van Snick, J., Cayphas, S., Szikora, J. P., Renauld, J. C., Van Roost, E., Boon, T. and Simpson, R. J. (1988). cDNA cloning of murine

interleukin-HP1: homology with human interleukin 6. *Eur. J. Immunol.* 18, 193-197.

Van Snick, J., Goethals, A., Renauld, J. C., Van Roost, E., Uyttenhove, C., Rubira, M. R., Moritz, R. L. and Simpson, R. J. (1989). Cloning and characterization of a cDNA for a new mouse T cell growth factor (P40). *J. Exp. Med.* 169, 363-368.

Vasse, J. and Beaupain, D. (1981). Erythropoiesis and haemoglobin ontogeny in the turtle *Emys orbicularis* L. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 62, 129-138.

Visser, J. W., Bauman, J. G., Mulder, A. H., Eliason, J. F. and de Leeuw, A. M. (1984). Isolation of murine pluripotent hemopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 159, 1576-1590.

Wang, G. L. and Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 270, 1230-1237.

Wang, T., Hanington, P. C., Belosevic, M. and Secombes, C. J. (2008). Two macrophage colony-stimulating factor genes exist in fish that differ in gene organization and are differentially expressed. *J. Immunol.* 181, 3310-3322.

Wang, X. and Herman, C. (1996). Changes in blood cell numbers and formation of eicosanoids during clotting in warm- and cold-acclimated bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 101, 211-219.

Weining, K. C., Sick, C., Kaspers, B. and Staeheli, P. (1998). A chicken homolog of mammalian interleukin-1 beta: cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *Eur. J. Biochem.* 258, 994-1000.

Weiss, L. P. and Wislocki, G. B. (1956). SEASONAL VARIATIONS IN HEMATOPOIESIS IN THE DERMAL BONES OF THE 9-BANDED ARMADILLO. *Anat. Rec.* 126, 143-&.

Williams, D. E., Eisenman, J., Baird, A., Rauch, C., Van Ness, K.,

- March, C. J., Park, L. S., Martin, U., Mochizuki, D. Y., Boswell, H. S. *et al.* (1990). Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* 63, 167-174.
- Wojtaszek, J. S. (1992). Seasonal-changes of circulating blood parameters in the grass snake *Natrix natrix natrix* L. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 103, 461-471.
- Wong, G. G., Witek, J. S., Temple, P. A., Wilkens, K. M., Leary, A. C., Luxenberg, D. P., Jones, S. S., Brown, E. L., Kay, R. M., Orr, E. C. *et al.* (1985). Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science* 228, 810-815.
- Yamaguchi, M., Takahashi, H. and Wakahara, M. (2000). Erythropoiesis and unexpected expression pattern of globin genes in the salamander *Hynobius retardatus*. *Dev. Genes Evol.* 210, 180-189.
- Yang, Y. C., Ricciardi, S., Ciarletta, A., Calvetti, J., Kelleher, K. and Clark, S. C. (1989). Expression cloning of cDNA encoding a novel human hematopoietic growth factor: human homologue of murine T-cell growth factor P40. *Blood* 74, 1880-1884.
- Yang, Y. C., Ciarletta, A. B., Temple, P. A., Chung, M. P., Kovacic, S., Witekgiannotti, J. S., Leary, A. C., Kriz, R., Donahue, R. E., Wong, G. G. *et al.* (1986). Human Il-3 (Multi-Csf) - Identification by Expression Cloning of a Novel Hematopoietic Growth-Factor Related to Murine Il-3. *Cell* 47, 3-10.
- Yasukawa, K., Hirano, T., Watanabe, Y., Muratani, K., Matsuda, T., Nakai, S. and Kishimoto, T. (1987). Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J.* 6, 2939-2945.
- Yokota, T., Otsuka, T., Mosmann, T., Banchereau, J., Defrance, T., Blanchard, D., Devries, J. E., Lee, F. and Arai, K. I. (1986). Isolation and Characterization of a Human Interleukin Cdna Clone, Homologous to Mouse B-Cell Stimulatory Factor-I, That Expresses B-Cell-Stimulating and T-Cell-Stimulating Activities. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. U. S. A. 83, 5894-5898.

Yoshihara, H., Arai, F., Hosokawa, K., Hagiwara, T., Takubo, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., Matsuoka, S., Miyamoto, K. *et al.* (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* 1, 685-697.

Zapata, A., Leceta, J. and Villena, A. (1981). Reptilian Bone-Marrow - an Ultrastructural-Study in the Spanish Lizard, *Lacerta-Hispanica*. *J. Morphol.* 168, 137-149.

Zhou, J. H., Ohtaki, M. and Sakurai, M. (1993). Sequence of a cDNA encoding chicken stem cell factor. *Gene* 127, 269-270.

Zola, H., Swart, B., Banham, A., Barry, S., Beare, A., Bensussan, A., Boumsell, L., C, D. B., Buhring, H. J., Clark, G. *et al.* (2007). CD molecules 2006--human cell differentiation molecules. *J. Immunol. Methods* 319, 1-5.

Zou, J., Bird, S., Minter, R., Horton, J., Cunningham, C. and Secombes, C. J. (2000). Molecular cloning of the gene for interleukin-1beta from *Xenopus laevis* and analysis of expression in vivo and in vitro. *Immunogenetics* 51, 332-338.

Zsebo, K. M., Williams, D. A., Geissler, E. N., Broudy, V. C., Martin, F. H., Atkins, H. L., Hsu, R. Y., Birkett, N. C., Okino, K. H., Murdock, D. C. *et al.* (1990). Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 63, 213-224.

浅野茂隆, 池田康夫, 内山卓 監修 (2006) 『三輪血液病学 第3版』文光堂

池田康夫 編集 (2012) 『トロンボポエチン受容体作動薬のすべて』先端医学社

三輪史朗, 渡辺陽之輔 著 (2004) 『血液細胞アトラス 第5版』文光堂

【研究業績】

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 ○	<ol style="list-style-type: none"> 1. Enhanced erythropoiesis in mice exposed to low environmental temperature. <u>Shun Maekawa</u>, Hitomi Iemura, and Takashi Kato. J. Exp. Biol. 印刷中. ○ 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. 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.
講演	<ol style="list-style-type: none"> 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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.

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, 曾沢洋一, 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, 曾沢洋一, 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, 曾沢洋一, 加藤尚志.</p>

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>