

# 博士論文審査報告書

## 論 文 題 目

ツメガエルおよびマウスにおける  
赤血球造血の低温環境応答

Erythropoietic response to low-temperature  
environments in frogs and mice

申 請 者

前川	峻
Shun	Maekawa

生命理工学専攻 分子生理学研究

2012 年 12 月

赤血球は、動物の生命活動に必須となる酸素を全身に運搬する機能を担う。血管を循環する赤血球の数は、個体毎に恒常的に調節される。赤血球産生の仕組み（赤血球造血）は古くから研究され、モデル生物としては、主にマウスの研究を通じて膨大な知見が集積されてきた。脊椎生物における赤血球造血の科学的知見全般を俯瞰すると多くの未解明課題がある。その一つが環境温度に対する造血応答の機序である。脊椎動物は、体温調節の面から内温動物と外温動物に大別される。内温動物（鳥類，哺乳類）は体温を一定に保つ調節系を備える。低温環境にある内温動物は、神経系・内分泌系による調節が作動して熱損失を減少させ、熱産生を増加させて体温を維持する。外温動物（魚類，両生類，爬虫類）は、体温調節系を備えておらず、環境温度に依存して体温が変動する。このため低温環境では受動的に体温が低下する。低温環境に応答した循環赤血球数の変動は、内温動物，外温動物の各々で複数報告されている。しかし、このような環境温度変化による造血応答の詳細や機序は不明である。本研究は、外温動物としてアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*, 以下ツメガエル) を、また内温動物としてマウス (*Mus musculus*) を研究対象とし、低温刺激による循環赤血球数の変動を生理生化学的に解析し、その造血応答の機序を実験血液学において初めて明らかにした。

第1章では、脊椎動物における造血を概説している。マウスやヒトで得られた諸知見を中心として、脊椎動物における造血系の共通点や多様性を詳細に論じている。また環境温度や季節変動に応じた造血や循環血球数変動に関する先行研究を示し、本研究の位置づけと仮説を提示している。

第2章では、外温動物ツメガエルにおける低温曝露後の循環血球数変動を調べる実験設計の考え方と、実験結果、解釈を述べている。ツメガエルを低温環境（5°C）に曝露すると、1日以内に循環血中の赤血球，白血球，栓球の全血球の数は減少し、全ての血球系譜における循環血球数の低下，すなわち汎血球減少症を呈した。低温曝露の間，この減少は持続したが，その後，常温飼育（22°C）に戻すと，各血球数は可逆的に正常値にまで回復した。

第3章では、低温曝露後1日以内に起こる急性の赤血球数減少の原因のうち、赤血球代謝回転の亢進に起因する可能性について検討している。本検証に先立ち、正常の成体ツメガエルの赤血球代謝回転速度，すなわち赤血球寿命の基準値を測定した結果， $220 \pm 12$ 日と決定された。この結果より，全循環赤血球数に占める1日あたりの新生赤血球数および破壊赤血球の割合は0.45%（2千万個）であると算定された。一方，低温曝露では，1日以内に赤血球数は約30%も減少する。このことから低温曝露直後の赤血球数減少は，血球寿命の単純短縮に起因するのではなく，赤血球破壊亢進が一因であると仮説を立てた。血液循環中に損傷あるいは老化した赤血球は，肝臓や脾臓内のマクロファージに貪食される。貪食された赤血球内のヘモグロビンは，ヘム分解代謝経路を経て，最終的にビリルビンに転換される。ヘモグロビンの代謝過程は哺乳類において詳細に明らかとされている。すなわち貪食マクロ

ファージでは、ヘム分解酵素（HMOX1）とビリベルジン還元酵素（BLVRA）の遺伝子発現が上昇する。ヘム分解で生じた鉄は、フェリチン鉄として細胞内に貯蔵される。これらの知見をツメガエルに当てはめ、低温曝露前後のツメガエルの肝臓と脾臓より RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法によって HMOX1 と BLVRA の mRNA の発現量変動を比較した。その結果、低温曝露後の個体の肝臓と脾臓において、HMOX1 と BLVRA の RNA 発現量が上昇した。肝臓と脾臓の薄切片を観察すると、プルシアンブルーで染色されるフェリチン鉄は、低温曝露後の肝臓で増加していた。以上の結果、ツメガエルのヘモグロビン-鉄代謝系の変動が初めて明らかとなり、低温曝露後の急性的な赤血球数減少は肝臓での赤血球破壊亢進によると結論した。

第4章では、低温曝露直後のツメガエル赤血球造血能の変化について示している。成体ツメガエル赤血球の主要造血巣は肝臓であり、その他に脾臓でも血球産生が起こる。また赤血球産生因子エリスロポエチン（EPO）の主な発現臓器は、肺と肝臓である。循環赤血球数の低下の要因の一つに赤血球造血機能の低下が考えられたため、EPO mRNA の発現量の解析を実施した。その結果、EPO mRNA 発現量は低温曝露後1日目の肺で、初期値より約20倍増加し、肝臓でも上昇傾向が見られた。肝臓の赤血球系細胞に特異的に発現する転写因子 GATA1a および EPO 受容体の mRNA 発現量は、低温曝露後に上昇した。肝臓組織切片上の成熟赤血球の分布は、低温曝露後1日目には成熟赤血球数が減少し、その後増加し、低温曝露後5日目には定常状態よりも多数の成熟赤血球が出現した。したがって低温曝露直後の肝臓では、赤血球造血刺激が亢進したと結論した。低温環境が持続すると、新生赤血球は肝臓内に貯留し、循環赤血球数が低値で維持する可能性が考えられた。この仮説について、溶血剤フェニルヒドラジンを投与した溶血性貧血ツメガエルを用いて検証した。このツメガエルモデルでは、循環赤血球数は徐々に減少し、8日目に極小値となり、その後回復する。回復期には、肝臓の赤血球造血が亢進し、大量の未熟赤血球が血液循環へ放出される。しかしこの貧血回復期に個体を低温に曝露すると、貧血からの回復は抑制された。さらに肝臓内に多数の新生赤血球が貯留され、新生赤血球の末梢循環への移行はわずかであった。以上により、低温曝露下での末梢赤血球数の低値維持は、新生赤血球の肝臓内貯留が一因であると結論した。

第5章では、解析対象を内温動物マウスに転じて、低温環境で誘導される循環赤血球数変動について記している。マウスを低温飼育（5°C）し、循環赤血球数を経時測定した。低温曝露7日目には新生赤血球数の指標となる網状赤血球数に有意な増加があり、14日目より循環赤血球数の増加を認め、以後56日目まで高値を維持した。これらのことは、内温動物マウスにおいては低温刺激によって循環赤血球数が増多し、赤血球造血能が亢進する可能性を示した。

第6章では、低温曝露マウスにおける赤血球造血能の解析結果を示してい

る。齧歯類の主要造血巣は骨髄であるが、低酸素環境下などの赤血球造血ストレス時には、骨髄に比して脾造血が優位となる。そこで脾臓および骨髄にある赤血球前駆細胞の分化段階を比較した。マウス赤血球膜表面に特異的に発現する Ter119 と、細胞増殖期に発現するトランスフェリン受容体 (CD71) を分化マーカーにすると、分化途上の赤芽球は 4 つの集団に分別できる。各々の蛍光標識抗体で細胞を重染色し、フローサイトメトリーで解析した。低温曝露後 5 日目のマウス脾臓では、前赤芽球細胞 (Te119 弱陽性、CD71 強陽性) の数は、定常時の約 10 倍に増加した。また骨髄においても、前赤芽球数の増加傾向が見られた。したがって低温曝露後マウスにおける循環赤血球数の増加は、主に脾臓の赤血球造血亢進に由来することが判明した。次いで、EPO 産生臓器である腎臓の EPO mRNA の発現量変動を調べたところ、低温曝露後 4 日目に定常時よりも約 20 倍増加していた。以上の結果から、マウスが低温に曝露されると、腎臓では EPO 発現が上昇し、特に脾臓における赤血球造血の亢進によって循環赤血球数の増加が起こる、と結論した。

最終章では、本研究により明らかとなった赤血球造血の低温環境応答について、外温動物と内温動物とで比較している。さらに、低温環境適応における赤血球造血の応答を考察した上で本研究を統括し、環境変化に応答する未知の造血機序の解明に向けた今後の展望が示されている。

以上をまとめると本研究は、動物の循環赤血球数が低温環境によって変化することに着目し、*in vivo* 動物モデルを作出し、現代生物学的手法を駆使して、これまでに不明であった血球数の変動過程を質的かつ量的に詳らかにした。特筆すべきことは、外温動物ツメガエル、内温動物マウスのそれぞれを対象にして比較生理学的解析を展開したことである。この結果、外温動物と内温動物では、低温環境に対する赤血球造血と循環赤血球数調節には差異があることを検証した。過去、循環血球数の恒常性は、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される、との理解が中心であった。しかし本研究は、動物の個体維持の基幹系である造血系と、個体の環境応答との新たな連鎖を見出した。このことは脊椎動物の環境適応の研究において、造血の環境応答という新たな視点をもたらした。本研究は、脊椎動物における未知の造血制御の発見につながりものであり、血液学や基礎生物学に広く貢献する。よって本論文は博士 (理学) の学位論文として相応しいものであると認める。

2012 年 12 月

(主査) 早稲田大学教授	博士 (理学)	(早稲田大学)	加藤 尚志
早稲田大学教授	理学博士	(早稲田大学)	中村 正久
早稲田大学教授	理学博士	(早稲田大学)	小泉 博