トピックス

IV. 造血に関する最新の話題

2. 赤芽球脱核のメカニズム

鵜生川久美 澤田 賢一

要 旨

哺乳類の赤芽球は脱核して赤血球となるが、脱核の生理的意義は不明である。生体内では、赤芽球の分化増殖、脱核後の核貪食などにマクロファージが深く関与している。近年、遺伝子導入技術の発達を背景に、脱核の機序として細胞質分裂や小胞輸送、核濃縮などに関連する分子が次々と明らかになってきている。本稿では、これらの脱核に関与する分子を中心に、赤芽球脱核のメカニズムについて紹介する。

〔日内会誌 101：2002～2009, 2012〕

Key words erythroblast, enucleation, cytokinesis, non-muscle myosin II

はじめに

哺乳類の赤芽球は、分化の最終段階で脱核して赤血球となる。脊椎動物の中で哺乳類だけが赤血球の核を捨て去る理由は未だ明らかでなく、血液学の七不思議の一つと考えられてきた。本稿では、哺乳類の脱核に関して、系統発生・個体発生、脱核の生理的意義、赤血球造血におけるマクロファージの役割を紹介する。さらに、細胞質分裂と脱核との対比、脱核に関与する分子、特に主要な細胞骨格タンパク質の一つであるミオシンの重要性について新たな知見を加えて紹介する。

1. 脱核の進化論

脊椎動物の中で、ヒトを含む哺乳類だけが赤血球に核を持たず、魚類、両生類、爬虫類、鳥類の赤血球はすべて核を持っている。進化論的には、哺乳類の境目となる鳥類の起源は今からおよそ1.3億年前（白亜紀）のミクロラプトル・グイであろうとされている。その祖先である恐竜の起源はおよそ2.3億年前、哺乳類の起源は1.6億年前であると推定されている¹⁾。鳥類の祖先や恐竜は有核赤血球を持っていて、1.6億年前の哺乳類の身体には、すでに核のない赤血球が流れていたのかもしれない。個体発生は系統発生を繰り返すとされるが、哺乳類の胎児期の一次造血では有核赤血球がみられる。例えばマウスで

秋田大学大学院医学系研究科、血液・腎臓・膠原病内科学（第三内科）

Bone Marrow Failure Syndrome (Idiopathic Hematopoietic Disorders) : Progress in Diagnosis and Treatment. Topics : IV. Recent Topics of Hematopoiesis ; 2. The mechanism of erythroblasts enucleation.

Kumi Ubukawa and Kenichi Sawada : Department of Hematology, Nephrology and Rheumatology, Akita University Graduate School of Medicine, Japan.

は、胎生 7.5 日齢の卵黄嚢で未熟な血液細胞を血管内皮細胞が取り巻く血島が形成され、有核の胚型赤血球が産生される。卵黄嚢造血は胎生 12 日まで続く一過性のもので、一次造血とも呼ばれる。胎生 10 日目以降、造血の場は肝臓へと移行し、無核の成体型赤血球が出現する。さらに胎生後期になると、造血組織は脾臓と骨髄に移行する。肝臓以降の造血を二次造血と呼ぶ²⁾。

2. 脱核の生理的意義

赤血球脱核の生理的意義については、いくつか推定されている。1 つは、余分な器官の放出によって酸素運搬能を高める、というものである。確かに、より多くのヘモグロビン (hemoglobin : Hb) を含有し、酸素を運搬するほうが、恒温動物には有利だと考えられる。哺乳類発生当時、空気中の酸素濃度は現在よりも低く、さらに胎児は母体の 1/3 の酸素濃度で発育することから、赤血球 1 個当たりの Hb を増やすことは生理的意義が大きそうである。しかし、同じ恒温動物である鳥類は、有核の赤血球を持ちながらエベレストを飛び越えていく。鳥類は効率よく酸素を取り込むための機構を持っはいるが、低酸素状態により強いのは鳥類であることは疑いない。2 つ目は、赤血球の変形能を高めて毛細血管内の移動をスムーズにするため、というものである。実際ヒトの血管の長さは 10 万 km もある。また、哺乳類の特徴でもある胎盤は毛細血管に富んだ器官である。しかし、毛細血管を有するのは哺乳類だけではないので説得性に乏しい。3 つ目は、核を放出することで、がん化を防ぐというものである。確かに、赤血球は 1 日 10^{11} 個も産生され、酸素という極めて危険な分子を運んでいる。活性酸素種による DNA (deoxyribonucleic acid) 損傷はがん化や老化を促進するため、脱核が赤血球のがん化を防いでいる可能性がある。とすると、哺乳類は他の脊椎動物よりも長寿であると

予想されるが、実際には同じ体重で比較すると、鳥類は哺乳類の 3~4 倍長生きする。以上から、脱核の生理的意義は、未だ不明であると言わざるを得ない¹⁾。

3. 脱核のメカニズム

1) 赤芽球島

生体内では、様々な分化段階の赤芽球がマクロファージと接し、いわゆる赤芽球島を形成している (図 1)。マクロファージと赤芽球は、双方の erythroblast macrophage protein (EMP) や、赤芽球の $\alpha_4\beta_1$ インテグリンとマクロファージの vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)、赤芽球の intercellular adhesion molecule-4 (ICAM-4) とマクロファージの α_v インテグリンなどの接着分子によってお互いを認識している。中心となるマクロファージは、赤芽球の固定、赤芽球の分化増殖、脱核後の核貪食、ヘム合成に必要な鉄補給などに重要な役割を果たす。細胞外マトリックスであるフィブロネクチンとラミニンも赤芽球や網赤血球の最終分化を調節する因子であることが示されている。フィブロネクチンは、赤芽球に発現する $\alpha_4\beta_1$ インテグリンと結合し、アポトーシスから細胞を守ることで赤芽球増殖を調節している。ラミニンは、赤芽球分化段階後期に表面に発現するリュテラン糖蛋白と結合し、網赤血球が骨髄類洞付近に局在してから末梢循環へ入る段階に関与していると考えられる³⁾。

2) 脱核とマクロファージ

脱核そのものにマクロファージが必要なのかどうかについて、2005 年、Yoshida らは、瀉血したマウスの脾臓から分離した赤芽球を培養し、核がマクロファージとの接触なしに自発的に放出されることを示した。さらに、脱核後の核は薄い膜で赤血球と接続しており、完全な分離には血流やマクロファージの貪食など物理的な力

トピックス

図 1. 赤芽球島（文献3より）

マクロファージと赤芽球は、双方のEMPや、赤芽球の $\alpha_4\beta_1$ インテグリンとマクロファージのVCAM-1、赤芽球のICAM-4 とマクロファージの α_v インテグリンなどのお互いを認識している。

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1, ICAM-4 : intercellular adhesion molecule-4, EMP : erythroblast macrophage protein, $\alpha_4\beta_1$: $\alpha_4\beta_1$ インテグリン, α_v : α_v インテグリン

が必要であろうと報告した。また、脱核した核は網赤血球と分離した後、表面にアポトーシスを受けるための「eat me」シグナルであるホスファチジルセリンを発現してマクロファージに貪食されることも示した⁴⁾。Hebiguchiらは、2008年、ヒト赤芽球を用いて、赤芽球がマクロファージや機械的外力なしに脱核すること、脱核は8分前後で完結することを示した⁵⁾。以上から、哺乳類赤芽球の脱核は、赤芽球自体に内在する機構によって起こる。脱核におけるマクロファージの主要な役割は脱核後の核処理である。核が貪食によりマクロファージに適切に処理されなければ、腫瘍壊死因子やインターフェロン β が恒常的に産生され、滑膜細胞の活性化や慢性の多関節炎など、自己免疫疾患類似の症状を引き起こす⁶⁾。

3) 脱核のプロセス

造血幹細胞から分化した赤芽球前駆細胞は、

4～5回の細胞分裂を経て好塩基性赤芽球、多染性赤芽球、正染性赤芽球へと分化する。この間に分裂能を失い、細胞質や核が変化していく。細胞質の変化には、ヘモグロビン産生、ミトコンドリアの減少、リボゾームの減少、微小構造の再構成などが含まれる。核の変化には、クロマチン凝集、細胞質と核の結合低下が含まれる。正染性赤芽球では、核が細胞質の一方に移動し、網状赤血球と薄い細胞膜に包まれた濃縮した核の二つの構造物に分離、つまり脱核する⁷⁾。放出された核が細胞膜に覆われていることから、脱核は細胞質分裂であり、極端な不均等細胞分裂であると考えられている（図2）。

4) 細胞分裂のメカニズム

脱核のメカニズムを理解するためには、正常な細胞分裂のメカニズムの理解が不可欠である。細胞分裂は、細胞周期において、間期とM期からなる。M期は核の分裂（有糸分裂）とそれに続く

図2. 脱核のプロセス

造血幹細胞から分化した赤芽球前駆細胞は、4～5回の細胞分裂を経て赤芽球へと分化する。この間に分裂能を失い、細胞質や核が変化していく。最終的に核が細胞質の一方に移動し、網状赤血球と薄い細胞膜に包まれた濃縮した核に分離（脱核）する。

細胞質の分裂（細胞質分裂）からなり、有糸分裂はさらに5段階に分けられる。前期には複製染色体が凝集し、離れ始めた中心体の間に有糸分裂紡錘体が形成される。前中期に核膜が分散し、染色体は動原体により紡錘体微小管に接し動き始める。中期になると、染色体は紡錘体極の中間にある紡錘体赤道面に整列する。後期に姉妹染色体が同時に分離して2組の娘染色体を形成する。動原体微小管が短縮し、紡錘体極が離れ、染色体は分割される。終期の間に、2組の娘染色体は紡錘体極に到達して脱凝縮し、新たな核膜が再形成され、有糸分裂が終了する。細胞質分裂は、有糸分裂後期のうちに始まり、終期の終わりまで続く。アクチンとミオシンの繊維でできた収縮環によって細胞質が二分割され、収縮環は細胞を締め付けてそれぞれ核を持つ2組の娘細胞を形成する（図3）⁸⁾。

有糸分裂紡錘体を形成する微小管（microtubule）は、 α -チューブリンと β -チューブリンが交互に並んだ分子で、線状で長く、一端が中心体という1個の微小管形成中心に付着している。微小管モータータンパクはキネシンとダイニンの2種類がある。キネシンは有糸分裂や減数分裂の際の紡錘体形成や細胞分裂の際の染色体分離に特別な役割を果たす。一方、収縮環はアクチンフィラメントにより構成される。アクチンフィラメントは、2本のアクチン重合体がらせん

状にからまった構造である。アクチンのモータータンパクはミオシンで、重鎖2本と2種類の軽鎖各2本からなり、重鎖のN末端には球形の頭部ドメインがある⁸⁾。

5) 脱核に関与する分子

1970年、Skutelskyらは、脱核直前のマウス赤芽球の核近傍に中心小体を認め、さらにコルセミドを投与して1.5時間後に核と細胞質の高度変形を認めたことから、脱核における中心小体の関与を推定した⁹⁾。この研究は、脱核における紡錘体およびその構成分子であるチューブリンの関与を示唆したものであった。しかし、コルセミドをマウスに直接投与しているため、どの分化段階の赤芽球が観察されているのかは不明であり、また定量的解析もなされていない。

1989年、Kouryら¹⁰⁾は、フレンドウイルスの貧血誘導株を感染させたマウス脾臓から得た高純度・分化段階均一な赤芽球を研究対象とし、脱核過程の赤芽球に収縮環が存在することを示した。さらに脱核における細胞骨格阻害剤の影響を検討し、チューブリン/微小管阻害剤は脱核を阻害せず、アクチン阻害剤は脱核を完全に抑制することを定量的に示した。

脱核とアクチン重合の上流分子との関係も報告されている。2008年Jiら¹¹⁾は、アクチンフィラメント重合に必須の分子であるRho GTPaseに対する阻害剤が、脱核を完全に抑制することを示

トピックス

図3. 有糸分裂と細胞質分裂

上段：有糸分裂期には2つの中心体が細胞の両極に移動し、中心体と染色体に接着した紡錘体が短縮することで2組の娘染色体が分割される。細胞質分裂期には、アクチンとミオシンの繊維でできた収縮環によって細胞質が二分割され、収縮環が細胞を締め付けて2個の娘細胞を形成する。下段：紡錘体を形成する微小管は、 α -チューブリンと β -チューブリンが交互に並んだ分子であり、微小管モータータンパクはキネシンとダイニンの2種類がある。一方アクチンフィラメントは、2本のアクチン重合体からせん状にからまった構造で、アクチンのモータータンパクはミオシンである。

した。さらに、siRNAによりRac GTPaseの下流分子であるmDia2を阻害すると、マウス後期赤芽球脱核の収縮環形成と脱核が抑制されることを示した。KouryやJiらの研究により、脱核は、アクチン系が重要な役割を果たす非対称な細胞質分裂であることが強く示唆されてきた。

これに対し、Keerthivasanら¹²⁾は2010年、アクチン以外の細胞分裂に関与する分子の阻害剤がマウス赤芽球の脱核を抑制せず、小胞輸送に関与する分子の阻害剤が後期赤芽球の脱核を抑制することと、エンドソームの骨格タンパクであるクラスリンをノックダウンすると脱核が抑制されることを示した。このことから、哺乳類赤芽球の脱核においては、細胞質分裂ではなく小胞輸送とそれに引き続いて起こる空胞形成が重要であると結論付けた。アクチンについてはミオシンV, VIと共に小胞輸送に関わっていると

推察した。しかし、細胞分裂阻害剤の効果は、動物種や細胞の種類、代償機構の有無などによって異なる。また、小胞輸送は細胞分裂に必須の一過程であってミオシンやアクチンの代替機構ではない、と考えられる。

我々は最近、ヒト造血幹細胞から分化誘導した正常赤芽球前駆細胞（colony-forming unit-erythroid：CFU-E）と成熟赤芽球を用いて、細胞分裂と脱核との関係を探し、脱核とミオシンの関係を明らかにした¹³⁾。ヒト正常CFU-Eに対して有効な細胞分裂阻害剤を用い、成熟赤芽球に対する影響を検討した。有糸分裂を阻害するチューブリン、キネシン系阻害剤は脱核を抑制せず、細胞質分裂を阻害するアクチン、ミオシンII阻害剤は脱核もまた完全に抑制した。ミオシンIIの構成要素であるnon-muscle myosin heavy chain II (NMHC II)にはIIA, IIB, IICの3つの

図 4. HDACsとHATsによる赤芽球核濃縮の調節（文献 19 より）

HDAC2はクロマチン凝集を促進し、脱核に関与する。HATsのうちGcn5はMycの下流分子であり、核濃縮とヒストンの脱アセチル化を阻害する。また、miR-191はRiok3とMxi1を抑制し、Gcn5の低下を妨げ、核濃縮と脱核を阻害する。HDACs：histone deacetylases, HATs：histone acetyltransferases, miR-191：micro RNA-191, Gcn5：general control of amino-acid synthesis, Riok3：RIO kinase 3, Mxi1：MAX-interacting protein 1, Myc：myelocytomatosis oncogene

アイソフォームがある。ヒトCFU-Eおよび赤芽球にはNMHC IIA, IIBが存在し、IICは存在しなかった。NMHC IIA, IIBをアイソフォーム特異的に阻害すると、NMHC IIB阻害のみが脱核を抑制した。すなわち、脱核にはミオシンIIが関与することを初めて示し、さらに、ミオシンIIBが脱核に重要な役割を果たしていることを証明した。

脱核に関与する分子についての報告は、細胞分裂以外の観点からも相次いでいる。2010年、Jiら¹⁴⁾は、マウス赤芽球において、ヒストンデアセチラーゼ（histone deacetylases：HDACs）阻害剤が脱核前のクロマチン凝集と収縮環形成、引き続いて起こる脱核を抑制することと、

HDAC1, 2, 3, 5のアイソフォームのうちHDAC2だけがクロマチン凝集と脱核に関与することを示した。

また、Jayapalら¹⁵⁾は、生理的なレベルのc-myc（Myc）の発現は赤芽球の分化や細胞周期には影響しないが、クロマチン凝集と脱核を抑制し、Mycの過剰発現は早期赤芽球の増殖促進・分化阻害・アポトーシス誘導作用を示すと報告した。さらに、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（histone acetyltransferases：HATs）のうちGcn5がMycの下流分子であり、Gcn5の異所性発現が核濃縮とヒストンの脱アセチル化を阻害することも示した。

2011年、Zhangら¹⁶⁾は、マイクロRNA191（microRNA-191, miR-191）の過剰発現が脱核を抑制すると報告し、miR-191のターゲット遺伝子はRiok3とMxi1であること、Riok3とMxi1のノックダウンによりGcn5低下が抑制されることを示した。つまり、miR-191発現によりRiok3とMxi1が抑制されるため、Gcn5が低下せず、核濃縮と脱核が阻害される。以上3編の報告から、クロマチンを凝集させるHDACsと、分散させるHATsの重要性が示され、赤芽球脱核前に起こる核濃縮を調節する分子機構が解明されつつある（図4）。

2010年にThompsonら¹⁷⁾は、RNA発現、マイクロアレイ、系統発生的分析を行い、タイトジャンクションを形成する主要タンパクであるクロードイン・ファミリーのうち、クロードイン13（Claudin13, *Cldn13*）遺伝子がマウス赤芽球造血に特異的な役割を果たしている可能性を示した。彼らはクロードインが脱核に関与する直接の証拠を示していないが、赤芽球脱核前に起こる核の極在化やタンパク配置が正常に行われるための、未知の機構があることを示唆した。

トピックス

4. 脱核と造血疾患

脱核が細胞質分裂類似の現象であり、アクチン・ミオシン系が重要な役割を担っていることはすでに述べた。特に我々が報告したミオシンIIと血液疾患の関係は興味深い。NMHC IIAは*Myh9*, NMHC IIBは*Myh10* 遺伝子にコードされており、NMHC IIA異常としてMYH9 異常症が知られている¹⁸⁾。May-Hegglin異常症(MHA)は、巨大血小板、血小板減少、白血球封入体の特徴とする。類縁疾患として、封入体形態が異なるSebastian症候群、Alport症状（腎炎、難聴、白内障）を合併するFechtner症候群、封入体を持たずAlport症状を合併するEpstein症候群がある。ヒトでのMYH9 のヘテロ異常はこれらのMYH9 異常症を引き起こすのに対し、MYH9 ヘテロ欠損のマウスはほぼ正常である。ヒトとマウスではミオシンIIA異常の表現形が異なることから、ミオシンIIAについては、マウスの結果をそのままヒトに当てはめることはできない。

一方、ミオシンIIB異常については、NMHC IIBのノックアウトマウスは胎生14.5日まで生存し、心室中隔欠損を含む心臓異常、大動脈の位置異常、水頭症、神経細胞遊走異常などを合併するが、造血に関する異常は報告されていない。しかし、ヒトとマウスでミオシンII異常の表現形が異なること、ミオシンIIBがヒト赤芽球脱核において重要な役割を担っていることを考慮すると、今後ヒトの造血器疾患とミオシンIIBの関係が明らかになる可能性がある。

おわりに

赤芽球脱核に関与する分子や、脱核のプロセスは近年明らかになりつつあるが、哺乳類だけが脱核する理由は未だ不明である。また、脱核開始シグナルや、核の位置を決定するチューブ

リン・キネシン系と、核と細胞質を分離するアクチン・ミオシン系を統合するシグナルの伝達機構に関しても不明である。赤芽球からの核放出を制御する、より上流の分子について、今後の新たな知見が期待される。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) 澤田賢一：赤血球脱核の新知見。血液・腫瘍科 59:332-338, 2009.
- 2) 藤本哲広, 小川峰太郎：造血・血管内皮細胞の発生。血管医学 2:427-433, 2001.
- 3) Chasis JA, et al: Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. Blood 112:470-478, 2008.
- 4) Yoshida H, et al: Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. Nature 437:754-758, 2005.
- 5) Hebiguchi M, et al: Dynamics of human erythroblast enucleation. Int J Hematol 88:498-507, 2008.
- 6) Kawane K, et al: Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. Nature 443:998-1002, 2006.
- 7) Migliaccio AR: Erythroblast enucleation. Haematologica 95:1985-1988, 2010.
- 8) 中村桂子, 松原謙一監訳：細胞の分子生物学第4版。Newton Press, 東京, 2007.
- 9) Skutelsky E, et al: Comparative study of nuclear expulsion from the late erythroblast and cytokinesis. Exp Cell Res 60:427-436, 1970.
- 10) Koury ST, et al: Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. J Cell Biol 109:3005-3013, 1989.
- 11) Ji P, et al: Enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts requires Rac GTPases and mDia2. Nat Cell Biol 10:314-321, 2008.
- 12) Keerthivasan G, et al: Vesicle trafficking plays a novel role in erythroblast enucleation. Blood 116:3331-3341, 2010.
- 13) Ubukawa K, et al: Enucleation of human erythroblasts involves non-muscle myosin IIB. Blood Epub ahead of print 2011.
- 14) Ji P, et al: Histone deacetylase 2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts. Haematologica 95:2013-2021, 2010.
- 15) Jayapal SR, et al: Down-regulation of Myc is essential for terminal erythroid maturation. J Biol Chem 285:40252-

- 40265, 2010.
- 16) Zhang L, et al: miR-191 regulates mouse erythroblast enucleation by down-regulating Rik3 and Mx1. *Genes Dev* 25: 119-124, 2011.
- 17) Thompson PD, et al: Claudin 13, a member of the claudin family regulated in mouse stress induced erythropoiesis. *PLoS One* 5: e12667.
- 18) 國島伸治：白血球封入体を伴う巨大血小板性血小板減少症とMYH9異常症. *臨床病理* 57: 365-370, 2009.
- 19) Ji P, et al: Formation of mammalian erythrocytes: chromatin condensation and enucleation. *Trends Cell Biol* 21: 409-415, 2011.
-