

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成23年 5 月 24 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20590289

研究課題名(和文) 骨のリモデリングと造血代謝の相互作用に関する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanisms that link bone remodeling and hematopoietic homeostasis

研究代表者

中山(六車) ゆかり(NAKAYAMA(MUGURUMA) YUKARI)

東海大学・医学部・特定研究員

研究者番号：80398750

研究成果の概要(和文)：我々は、Notch 受容体のリガンドである Jagged1 (J1) と Delta-like ligand 1(Dll1) の過剰発現マウスおよび欠損マウスの骨形態並びに骨代謝を解析することにより、Notch シグナルはリガンド特異的に骨代謝を制御していることを今回初めて明らかにした。また、Notch シグナルは成体造血の主たる場である骨髄において骨代謝を正常に保つこと、すなわち、造血幹細胞ニッチを供給し続けることで、間接的に造血恒常性の維持にかかわっていることも明らかとなった。これらの結果は、骨代謝疾患や造血障害の治療方法を開発する上で重要な意義を有する。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the skeletal phenotypes and bone metabolisms of two of Notch ligands transgenic mice, in which Jagged 1(J1) or Delta-like ligand 1 (Dll1) was over-expressed or conditionally deleted. The results revealed for the first time that the Notch signal regulated and maintained bone homeostasis in a ligand specific manner. In addition, the Notch signal indirectly influenced the hematopoietic homeostasis through the proper supply of the hematopoietic stem cell niche in bone marrow, where hematopoiesis primarily occurs throughout the adult life. These results have an important meaning for the development of novel treatment for diseases caused by an abnormal bone metabolism and/or hematopoietic disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：再生医学、骨と骨髄

1. 研究開始当初の背景

骨は、成長を終えたあとも活発にリモデリングを営み、単に支持組織として重要であるだけでなく、ミネラルの恒常性や造血など生命現象の維持にとっても不可欠な役割を果たしている。リモデリングによる骨代謝の恒常性は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の動的平衡関係の上に成り立っており、通常のリモデリングでは骨吸収量と骨形成量はほぼ等しく、骨格系の質および量は一定に保たれている。一方、骨粗鬆症などの骨代謝疾患では、この動的平衡が崩れ、骨吸収が骨形成を上回るために骨量が減少する。リモデリングは、PTHなどの骨吸収シグナルによる骨芽細胞の活性化に始まり、骨芽細胞から破骨細胞へ情報が伝達され破骨細胞が骨を吸収し、その後骨吸収窩にマクロファージが出現する逆転相を経て、骨芽細胞による骨形成が行われた後静止する。このようにリモデリングを正常に行うためには、骨芽細胞と破骨細胞の密接な情報伝達が重要な鍵を握っているが、破骨細胞と骨芽細胞の動的平衡を調節する因子(カップリング因子)の実体は不明である。したがって、カップリング因子を明らかにすることは、リモデリングのメカニズムを解明し、骨量を減少させる代謝疾患への有効な対策を考案する足がかりとなる。

骨髄は、骨の内側に存在する多彩な細胞集団からなるユニークな結合組織であり、生命維持に最も重要な造血(血液新生)機能を担っている。骨髄の細胞は大きく二つに分類することができる。造血幹細胞を起源とする血液細胞と、血液以外の細胞から構成され、造血の場を提供している造血微小環境である。中でも造血幹細胞が存在する場所は、幹細胞ニッチと呼ばれ、造血幹細胞の未分化性の維持と分化を制御するという、造血の恒常性に非常に重要な役割を果たしているが、その実態は長い間なぞに包まれていた。近年複数の論文が、骨芽細胞を操作(薬剤や遺伝子導入による活性化および自殺遺伝子による欠乏)すると、造血幹細胞の数が増幅したり造血が抑制されたりすることを発表し、骨芽細胞が造血ニッチの主役であると認められつつある(Zhang et al. Nature 2003, Calvi et al. Nature 2003, Arai et al. Cell 2004, Vinsinjcic et al. Blood 2004)。その一方で、骨芽細胞と造血幹細胞の相互作用の鍵をなす分子であると認識されていたN-カドヘリンは、実は不可欠ではないという発表

(Kiel et al. Cell Stem Cell 2007)や、幹細胞ニッチの主役は骨芽細胞ではなく特殊なストローマ細胞や血管内皮細胞であるという報告(Kiel et al. Cell 2005, Sugiyama et al. Immunity 2006)もあり、幹細胞ニッチの実体解明は決着していない。確かに、骨芽細胞を操作すると造血機能に影響が見られる。しかし、骨芽細胞操作の直接的な効果は、リモデリングの促進もしくは破綻であり、造血への影響は間接的なものである可能性もある。つまり、造血の恒常性と骨代謝は密接に関係しており、リモデリングを調節するカップリング因子は造血機能にも重要な役割を果たしていると考えられる。

膜貫通型分子であるNotchを介した情報伝達は、種を超えて、発生・分化過程のさまざまな段階で重要な役割を果たしている。骨格系では、NotchとNotchリガンドであるDelta1とJagged1が骨再生時の骨芽細胞に発現し、細胞株を利用した試験管内の実験では、Notchシグナルが骨芽細胞と破骨細胞の分化に関与していると報告されている(Yamada et al. Blood 2003, Nobuta et al. J.Biol.Chem. 2005)。また、Notchシグナルを活性化すると造血幹細胞の自己複製能が亢進するという報告もある(Stier et al. Blood 2002)。これまで遺伝子欠損マウスを利用することにより、さまざまな遺伝子の生体内での働きが同定されてきたが、Notch1, Delta1, Jagged1の遺伝子欠損マウスはいずれも発生早期に骨格形成不全で死亡するため、Notchシグナルが骨再生やリモデリング、造血機能にどういった形で関与しているかは特定できていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨代謝と造血代謝の相互作用に関する分子メカニズムを解明することである。

これまで我々は、ヒト造血幹細胞を免疫不全マウスに移植し、移植後のヒト造血再構築における造血幹細胞の動態解析を行い、造血再生過程における造血幹細胞の自己複製と分化機構に関する新たな知見を報告してきた。また、ヒト間葉系幹細胞を骨髄内に直接移植することで、マウス骨髄内におけるヒト造血微小環境の再構築に成功している。そして、ヒト造血微小環境を有するマウスではヒト造血再構築能が亢進し、未分化な造血幹細胞が維持されることを見だし、生体内におけるヒト造血微小環境の重要性を報告した。さ

らに、ヒト造血幹細胞の骨髄内での局在を明らかにしつつある。これまでの我々の造血幹細胞の機能解析と、造血幹細胞と造血微小環境や幹細胞ニッチの相互作用に関する研究実績、そして未発表の研究結果から、造血恒常性の維持には骨芽細胞－破骨細胞の相互作用による骨リモデリングが重要な役割を果たしていると考え、本研究の着想に至ったものである。今回我々は、Delta 1, Jagged 1, Delta 1/Jagged 1 のコンディショナルノックアウトマウスならびに骨芽細胞特異的に上記リガンドを過剰発現するマウスを入手したので、それらのマウスを用いて、生体内での Notch シグナルの骨代謝と造血恒常性への関与を解析する。具体的には、リモデリングにおけるカップリングファクターを同定し、リモデリングの造血への関与は、造血環境の変化による間接的なものか、それとも、カップリングファクター自身が造血幹細胞に作用しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1), Notch リガンドの有無における骨代謝の検討

- ① Notch リガンドコンディショナルノックアウトマウスと過剰発現マウスの骨の表現系の解析
定常状態マウスの骨の表現系を、骨髄組織標本作製して顕微鏡下にて観察する。また、骨形態計測にて骨形成率及び骨吸収率を定量的に測定する。
- ② 骨の再生と骨髄微小環境再構築における Notch リガンドの役割
Notch リガンドが骨破壊後の骨の再生にどのように関わっているかを、骨髄アブレーションモデルを使用して明らかにする (Yamashita et al. Endocrinology 2000)。麻酔したマウスの関節部にマイクロドリルで開けた穴から先の曲がった 29 ゲージ針を差し込んで、脛骨または大腿骨髄腔内をくまなくアブレーションすることによって骨髄を破壊すると、骨梁部分を含む骨髄環境と造血機能の再生を観察することができる。アブレーション後の骨髄内は、まず増殖した線維芽細胞で覆われ、その後それらが骨芽細胞に分化して骨化し、次に破骨細胞が活性化されて骨髄内の骨が吸収され、通常 2～4 週間骨梁と骨髄内腔が再構築されて、造血機能も回復する。
Delta 1, Jagged 1, Delta 1/Jagged 1 のコンディショナルノックアウトマウスおよび野生型マウスに骨髄アブレーション

ションを施し、経時的に骨髄組織標本作製して解析する。

(2), Notch シグナル標的細胞の同定

① 造血幹細胞移植による骨代謝異常救済実験

Mx-cre プロモーターを用いたコンディショナルノックアウトマウスでは全ての細胞で Notch リガンドの発現が欠損してしまうので、どの細胞での発現が重要であるか特定することができないため、造血幹細胞移植を行う。造血幹細胞相互移植は、造血機能不全が見られた場合にその原因が造血細胞側にあるのか環境側にあるのかを特定するために用いられる血液学の分野では一般的な実験方法である。骨芽細胞は間葉系の細胞であり、破骨細胞は造血幹細胞由来であるので、野生型マウスと Notch リガンド欠損マウスで造血幹細胞相互移植を行うことにより、どちらの細胞における Notch リガンドの発現が重要であるのかを確定することができる。造血幹細胞相互移植を行ったマウスに骨髄アブレーションを施し、その後の骨髄再構築と造血機能の回復を観察する。破骨細胞側の Notch リガンドの発現が重要であれば、野生型マウスの造血幹細胞を Notch リガンド欠損マウスに移植した場合は、骨髄と造血は正常に回復するが、Notch リガンド欠損マウスの造血幹細胞を野生型マウスに移植するとその回復に異常が発生する。一方、骨芽細胞における Notch リガンドの発現が重要である場合は、野生型マウスの造血幹細胞を Notch リガンド欠損マウスに移植しても骨と造血の回復異常は救済されず、Notch リガンド欠損マウスの造血幹細胞を野生型マウスに移植しても異常は見られないはずである。この実験により、Notch リガンドコンディショナルノックアウトマウスにおける骨と造血の再生異常は、破骨細胞と骨芽細胞のどちらの Notch リガンドの欠損に起因しているのかを特定することができる。

② in vitro での破骨細胞分化と活性化実験・骨芽細胞分化実験

生体内実験では、目的とする分子以外の様々な要素が影響するため、予想した結果が得られないことも考えられる。破骨細胞は in vitro でも、造血幹細胞と骨髄間葉系細胞由来のストローマ細胞を共培養によって形成することができる。さらに、形成した破骨細胞を骨基質上で培養すると、骨吸収能を解析することも可能である。Notch リガンド欠損マウスおよび野生型マウスから回収した造血幹細胞

胞とストローマ細胞を共培養し、上記造血幹細胞相互移植実験同様、どの組み合わせで破骨細胞の形成と機能に異常が見られるか解析する。この *in vitro* の実験で、骨芽細胞—破骨細胞間の情報伝達において、どちらの細胞における Notch リガンドの発現がどの段階に作用しているのかを特定する。

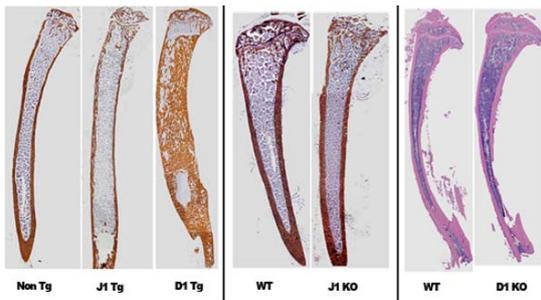
また、骨髄ストローマ細胞を骨分化条件で培養して、骨芽細胞への分化と石灰化における Notch リガンドの関与を調べる。さらに、Notch リガンド欠損の細胞に Notch リガンドを遺伝子導入して、破骨細胞形成、骨吸収能、骨芽細胞分化における異常が救済できるか解析し、Notch シグナルの関与を確認する。

4. 研究成果

Notch受容体のリガンドである Jagged1 (J1) と Delta-like ligand 1(D1) の遺伝子改変マウスを用いて、Notchシグナルが 1) 骨代謝と 2) 造血恒常性において果たしている役割を明らかにしたので以下に示す。

(1), Notch リガンドの遺伝子改変による骨形態の変化

- ① 骨芽細胞特異的に【J1】を過剰発現させたマウスでは、骨形成が低下し骨吸収が亢進傾向にあるという高回転型の骨量の減少が見られた。骨粗鬆症モデルマウスの確立。
- ② 骨芽細胞特異的に【D1】を過剰発現させたマウスでは、骨量が大幅に増加していたが、骨形成も骨吸収も測定時点では低下していた。大理石病モデルマウスの確立。
- ③ Mx-creプロモーターを用いて、生後にJ1とD1を欠損させたマウスは、どちらも明らかな形態異常は見られなかった。ノックアウトの実験に関しては、骨形成が完成する前の発生時期におけるNotchリガンド欠損の影響を解析することが重要であると思われる。



図の説明

左: J1 過剰発現マウスは皮質骨の骨融解像を呈し、D1 過剰発現マウスでは骨量が増加している。

中央・右: Mx-cre プロモーターを用いた Notch リガンドノックアウトマウスでは骨形態異常が見られない。

(2), Delta-like ligand 1(D1)の骨代謝における役割

- a) 骨芽細胞特異的に【D1】を過剰発現させたマウスの骨髄の組織標本では、一見して明らかな骨量の増加が認められた。詳細に観察すると、石灰化した骨が形成されていない、通常は血液細胞が存在している部分が、線維芽細胞様の細胞で占められていた。b) それら細胞は、免疫染色により、osterix 陽性の骨芽細胞であることが明らかとなった。c) その osterix 陽性骨芽細胞は、細胞増殖マーカーki67 が陽性であり、活発な増殖期にあることが分かった。d) 一方で、破骨細胞には変化が見られなかった。e) 以上より、Delta-like ligand 1を介した Notch シグナルは、骨芽細胞を増殖させる役割があると思われる。

(3), Jagged1 (J1) の骨代謝における役割

- 一方、【J1】を骨芽細胞特異的に発現させたマウスは、骨形態計測で骨吸収の亢進が確認されるとともに、*in vitro* の破骨細胞形成実験においても、野生型マウスに比べて有意に破骨細胞形成率が増強していた。

(4), 骨破壊後の骨再生における Notch シグナルの役割

Jagged 1 コンディショナルノックアウトマウスでは他の Notch リガンドのノックアウトマウスや同腹対照マウスに比べて、骨髄アブレーション後の骨髄内の再構築が顕著に遅延することが、組織学的解析により明らかとなった。Jagged 1 が骨と骨髄の再生過程で、どの細胞にどのように関与しているのか現段階では明確になっていないが、組織学的観察により骨芽細胞による骨化の程度や、破骨細胞の数に変化がないことが明らかになっており、骨芽細胞—破骨細胞の情報伝達になんらかの影響があると考えられる。

さらに Jagged 1 コンディショナルノック

アウトマウスでは、アブレーション後1～4週間における骨髓内造血細胞数および造血幹細胞数が有意に減少していた。これらの結果から、Jagged 1がカップリング因子であり、造血機能にも影響を与えていることが強く示唆される。

また、造血幹細胞相互移植実験により、非造血細胞におけるJagged1の発現が、骨破壊後の骨と造血の再生に重要であることも明らかとなった。

(5) 造血恒常性における Notch シグナルの役割

① Notch リガンド欠損マウスは、定常状態では骨形態や造血機能に明らかな変化は見られない。b) しかし、骨破壊後の骨と骨髓環境の再構築に大幅な遅れが見られ、造血細胞の回復も著明に遅延していた。c) このことから、Notch シグナルは骨代謝を正常に保ち、造血幹細胞のニッチの供給を制御することで、間接的に造血恒常性の維持にかかわっていると思われる。

以上の結果より、Notch シグナルはリガンド特異的に骨代謝を制御していることが初めて明らかとなった。また、Notch シグナルは成体造血の主たる場である骨髓において骨代謝を正常に保つこと、すなわち、造血幹細胞ニッチを供給し続けることで、間接的に造血恒常性の維持にかかわっていることも明らかとなった。これらの結果は、骨代謝恒常性維持機構を解明し、骨代謝疾患や造血障害の治療方法を開発する上で重要な意義を有する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Muguruma Y, Matsushita H, Yahata T, Yumino S, Tanaka Y, Miyachi H, Ogawa Y, Kawada H, Ito M, Ando K
Establishment of a xenograft model of human myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2011 Apr;96(4):543-51、
査読有
- ② Nakao N, Nakayama T, Yahata T, Muguruma Y, Saito S, Miyata Y, Yamamoto K, Naoe T.

Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate hematopoiesis in vitro and in vivo: advantages over bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Pathol*. 2010 Aug;177(2):547-54、

査読有

- ③ Yahata T, Muguruma Y, Yumino S, Sheng Y, Uno T, Matsuzawa H, Ito M, Kato S, Hotta T, Ando K.

Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis. *Stem Cells*. 2008 Dec;26(12):3228-36、査読有

- ④ Ando K, Muguruma Y, Yahata T
Humanizing bone marrow in immune-deficient mice. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;324:77-86.
Review

[学会発表] (計9件)

- ① 六車ゆかり、八幡崇、弓野静、盛音、穂積勝人、安藤潔
Notch signals regulated hematopoietic homeostasis through osteoblastic niche maintenance.
第72回日本血液学会、2010年9月24日、パシフィコ横浜
- ② 六車ゆかり、八幡崇、穂積勝人、安藤潔
骨芽細胞における Delta-like ligand1 の発現が骨代謝維持に重要である
第28回日本骨代謝学会、2010年7月22日、京王プラザホテル
- ③ 六車ゆかり
造血幹細胞制御における Notch シグナルの役割
第10回血液フォーラム21、2010年3月6日、東京
- ④ Muguruma Y, Yahata T, Yumino S et al.
Importance of Notch signals in hematopoietic homeostasis.
The 26th Naito Conference on Osteobiology, Awaji, Japan, 2009
- ⑤ Muguruma Y, Yahata Y, Sheng Y et al.
Importance of Notch signaling in maintaining hematopoietic homeostasis.
第71回日本血液学会、京都国際会議場、2009
- ⑥ 八幡崇、高梨朋美、盛音、宇野トモ子、六車ゆかり他「DNA 損傷の蓄積によるヒト造血幹細胞の自己複製能の低下」第71回日本血液学会、京都国際会議場、2009
- ⑦ Muguruma Y, Yahata T, Sheng Y et al.

Importance of Notch signals in hematopoietic homeostasis. The 7th Stem Cell Research Symposium, Tokyo, Japan, 2009

- ⑧ 六車ゆかり他5名「骨髓異形成症候群 in vivo モデルの確立」、第70回日本血液学会、京都国際会議場、2008
- ⑨ 八幡崇、六車ゆかり他3名「骨髓造血微小環境の恒常性維持における Jagged-1 分子の重要性」、第70回日本血液学会、京都国際会議場、2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山(六車) ゆかり (MUGURUMA YUKARI)
東海大学・医学部・研究員
研究者番号：80398750

(2) 研究分担者

安藤 潔 (ANDO KIYOSHI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：70176014

八幡 崇 (YAHATA TAKASHI)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：10398753

(3) 連携研究者

穂積 勝人 (HOZUMI KATSUTO)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：30246079