

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月3日現在

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591243
 研究課題名（和文） カベオラ膜結合型ビタミンD受容体を介する神経-骨-免疫系による造血制御の解明
 研究課題名（英文） VITAMIN D RECEPTOR IS A PIVOT OF THE BRAIN-BONE-BLOOD TRIANGLE FOR HEMATOPOIETIC STEM CELL NICHE
 研究代表者
 松井 利充（MATSUI TOSHIMITSU）
 神戸大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：10219371

研究成果の概要（和文）：血液は骨で造られる。サイトカイン G-CSF による造血幹細胞の骨髄から末梢血への動員に、交感神経シグナルによる骨芽細胞の抑制が重要である。本研究において私達はビタミン D3 受容体（VDR）ノックアウトマウスを用い、VDR が G-CSF による骨芽細胞の抑制とそれに引き続く造血幹細胞動員に必須であることを明らかにした。本研究は、カルシウム調節因子として認識されてきた活性型ビタミン D₃ が造血幹細胞移動の神経系による調節に極めて重要な役割を果たしており、神経-骨-免疫系による造血制御において有機的統合システムの要として VDR が機能している事を証明した独創的研究成果として世界的に注目されている。

研究成果の概要（英文）：Bloods are born in the bone. Here, we present the severe impairment of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)-induced hematopoietic stem cell (HSC) mobilization in vitamin D receptor (VDR) deficient mice. VDR is essential for durable β 2-adrenergic receptor signaling in stem cell niche. Our study demonstrates not only a novel function of VDR as a critical modulator of HSC trafficking, but also the presence of a sympathetic nervous system-mediated bone remodeling mechanism through VDR. VDR plays a pivotal role in the regulation of hematopoietic stem cell niche.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	2,200,000	660,000	2,860,000
22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23年度	100,000	30,000	130,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：ビタミンD受容体、交感神経、造血幹細胞ニッチ、G-CSF、骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 成体において、血液は骨で造られる。その合理性が最近の造血幹細胞研究で明らかにされつつある。造血幹細胞を骨髄中で維持するための重要な特殊微小環境(ニッチ)の位

置が骨辺縁の骨芽細胞であることが報告された。また、移植された造血幹細胞はニッチにおさまり造血を再開するが、この骨辺縁はカルシウム(Ca)濃度が高く保たれていると考えられており、造血幹細胞上に発現している

Ca 受容体を通して骨芽細胞ニッチまでたどり着く可能性も報告されている。すなわち、「骨代謝」と「造血制御」の深い関係が次々と明らかにされている。

(2) 「免疫」と「骨代謝」の研究も古くはそれぞれ独立して行われていたが、骨代謝疾患に免疫が関与する可能性を我々は以前より指摘していた。1998年、Tリンパ球産生膜結合型サイトカインRANKLが、T細胞だけでなく骨芽細胞にも発現し、破骨細胞との間で造骨と骨吸収のバランスを調節するいわゆるカップリング分子として機能していることが見出された。この発見を契機に骨代謝学と免疫学は新たな研究ジャンル「骨免疫学」として融合し、今さらなる広がりを見せている。代表的な骨代謝調節ホルモンの1つである活性型ビタミンD₃は、骨芽細胞上のRANKL発現を増強させる強力な因子の1つだが、研究代表者は骨代謝ホルモンとしての知見とは全く別に、活性型ビタミンD₃の血液細胞に対する作用を古くから検討し、そのマクロファージ分化・活性化能とともにTリンパ球抑制作用を世界に先駆けて報告した。その後15年以上の月日を経て、ビタミンD受容体(VDR)欠損マウスを用い、活性型ビタミンD₃の免疫抑制作用は*in vivo*においても証明されるに至っている。最近では、VDRの転写因子コアアクチベーターが単球分化において重要な役割を果たしている事を我々は報告している。

(3) 骨髄移植後、輸注された造血幹細胞は末梢循環をめぐらううちに自分の本来の居場所である骨髄にホーミングし、造血を再開する。研究分担者の片山は、この骨髄認識機構や骨髄造血における重要な接着分子の働きを次々と明らかにしてきた。

(4) これらの研究経歴を背景に、申請者は「免疫制御」と「骨代謝」の両方に作用する生理活性物質として活性型ビタミンD₃に焦点を当て、平成19・20年度の萌芽的研究課題(免疫制御学)として「骨免疫調節ホルモン/サイトカインによる造血制御メカニズムの解明」を立ち上げ、未知の造血制御機構の探索に取りかかった。その研究成果として「ビタミンD受容体がG-CSF誘導性の造血幹細胞の動員に必須である」ことを発見した。

2. 研究の目的

(1) VDR欠損マウスにおける幹細胞動員不全がなぜ生じるのか、その分子機構の解明をめざす。

(2) 特に、骨芽細胞のカベオラ結合型VDRがカテコラミン受容体シグナルに必須かど

うか、カベオラの構造そのものが両者の受容体のシグナルに必須かどうかを、カベオリン-1欠損マウスを用い検証する。

(3) 結果として造血幹細胞動員がVDRで制御されていることを裏付け、新しく開発されつつあるVDRアゴニスト・アンタゴニストが幹細胞動員や生着促進薬剤として有用かどうかを検証する。

3. 研究の方法

(1)カベオリン-1欠損マウスにおいて、骨髄中造血幹細胞数やG-CSFによる造血幹・前駆細胞の動員効率がいかに変化しているか検討した。

(2)βアドレナリンおよびビタミンD受容体(VDR)刺激により、マウス骨髄中で大きく変動する骨代謝関連遺伝子をRT-PCRにて探索した。

(3)高カルシウム食で飼育下のVDR欠損マウスにおいて、G-CSF投与中の骨代謝マーカーの変化を検討した。同様に、骨髄中の骨芽細胞の形態変化、幹細胞の骨髄内貯留に中心的役割を果たしていると考えられているケモカインCXCL12の変化についても検討した。

(4)βアゴニスト誘導性骨芽細胞VDR発現についてRT-PCRおよびイムノブロット解析にて検討するとともに、誘導されたVDRがrapid non-genomic作用を有するかどうかMAPキナーゼの活性化を指標として解析するとともに、genomic作用についてはビタミンD応答性遺伝子配列(VDRE)挿入ルシフェラーゼレポーター遺伝子発現系を用いて検証した。

(5)VDR欠損マウスにおいて、G-CSF投与中の血漿中オステオカルシンの変化を検討した。同様に、骨髄中の骨芽細胞の形態変化、幹細胞の骨髄内貯留に中心的役割を果たしていると考えられているケモカインCXCL12の変化についても定量的PCR法とELISA法にて検討した。

(6)骨髄においてVDRの発現レベルが選択的に高い骨芽細胞での欠損が問題である可能性が非常に高いため、骨髄移植実験により骨髄造血細胞を野生型に置き換えたVDR欠損キメラマウスにおけるG-CSFによる造血幹・前駆細胞の動員効率を検討した。

(7)骨芽細胞由来の細胞株を用いた*in vitro*培養系にβアゴニストを加えることにより、急速に変化する遺伝子を、定量的PCR法にて探索した。特に、上記2)で捉えた遺伝子については、βアゴニストの濃度、暴露時間な

どにつき詳細に条件設定を行い、その変動を観察した。

(8) 野生型マウスないしは *VDR* 欠損マウスの骨芽細胞を採取培養し、 β アゴニスト刺激による骨代謝遺伝子変化や CXCL12 の遺伝子・蛋白レベルの変化が欠損マウス由来骨芽細胞で抑制されているかどうかを確認した。
(9) *VDR* 欠損マウスにおける、CXCL12 受容体 (CXCR4) 阻害剤の幹細胞動員に及ぼす影響を解析した。

(10) *VDR* アゴニストが幹細胞動員や生着促進薬剤として臨床応用可能かどうか、様々な投与量・投与スケジュールを検証した。

4. 研究成果

(1) 本研究において私達は *VDR* ノックアウトマウスを用い、ビタミン D₃ 受容体 (*VDR*) が G-CSF による骨芽細胞の抑制とそれに引き続く造血幹細胞動員に必須であることを明らかにした。

(2) 培養骨芽細胞のみならずマウス骨髄の骨芽細胞において、種々の β 2 アドレナリン受容体アゴニストが、暴露後短時間で mRNA のみならず蛋白レベルにおいても *VDR* を著明に発現誘導している事を見出した。

(3) ヒト 24-hydroxylase 遺伝子のビタミン D 応答配列を用いたルシフェラーゼアッセイにより、発現誘導された *VDR* は核内受容体として機能し、その転写活性が交感神経刺激により上昇することも確認した。

(4) 更に、骨芽細胞では交感神経刺激により誘導された *VDR* 蛋白は、リガンドである活性型ビタミン D₃ と長時間にわたって安定型複合体を形成し、受容体下流シグナルとして、破骨細胞とのカップリングや免疫応答に重要な *Rankl* mRNA の発現増加を維持することも発見した。

(5) 生理的な活性型ビタミン D₃ である 1,25-(OH)₂D₃ の血中濃度は数 10pg/ml と厳密にコントロールされているが、個体における生物活性が、血中リガンド濃度の変動以上に、特異的受容体の発現変動によりダイナミックに調節されていることもはじめて明らかとなった。

(6) しかし、カベオリン-1 欠損マウスでは G-CSF 誘導性末梢血幹細胞動員に異常を認めなかった。

(7) 本研究は、カルシウム調節因子として認識されてきた活性型ビタミン D₃ が造血幹細胞

移動の神経系による調節に極めて重要な役割を果たしており、神経-骨-免疫系による造血制御において有機的統合システムの要として *VDR* が機能している事を証明した独自の研究成果として世界的に注目されている。

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 2 件)

- ① Kawamori, Y., Katayama, Y., Asada, N., Minagawa, K., Sato, M., Okamura, A., Shimoyama, M., Nakagawa, K., Okano, T., Tanimoto, M., Kato, S., Matsui, T.: Role for vitamin D receptor in the neuronal control of the hematopoietic stem cell niche. *Blood*, 116:5528-5535, 2010. (査読有り)
- ② Asada, N., Ishii, S., Wakahashi, K., Kawano, H., Kawamori, Y., Nishikawa, S., Minagawa, K., Okamura, A., Shimoyama, M., Katayama, Y., Hayashi, Y., Itoh, T., Tanimoto, M. and Matsui, T.: Progressive osteosclerosis and visceral calcification after cord blood transplantation. *Int. J. Hematol.* 91:542-5, 2010. (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kawamori, Y., Katayama, Y., Matsui, T. et al.: Vitamin D receptor is essential for neuronal control of hematopoietic stem cell niche. 第 15 回欧州血液連合会議 会頭シンポジウム 2010 年 6 月 12 日 パルセロナ、スペイン
- ② Kawamori, Y., Katayama, Y., Matsui, T. et al.: Vitamin D receptor is essential for neuronal control of hematopoietic stem cell niche. 第 72 回日本血液学会学術集会 プレナリー講演 2010 年 9 月 25 日 横浜国際会議場、神奈川県
- ③ Katayama, Y. 3B (Brain-Bone-Blood) integration in hematopoietic stem cell trafficking. 第 7 回日光国際シンポジウム 2010 年 10 月 8 日 自治医科大学、栃木
- ④ 片山義雄 骨代謝研究の視点から見た血液学. 日本骨代謝学会 2009 年 7 月 25 日 大阪国際会議場、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 利充 (MATSUI TOSHIMITSU)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 10219371

(2) 研究分担者

片山 義雄 (KATAYAMA YOSHIO)

神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80397885