

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02947

研究課題名(和文)造血幹前駆細胞の時空間的移動ダイナミズムの解明と制御

研究課題名(英文) Dynamism of spatiotemporal trafficking of hematopoietic stem/progenitor cells

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞は移動能を持つことを特徴とする。また、MDS/MPNでは異常造血幹細胞が正常造血幹細胞にとってかわっていく。これを造血幹細胞の移動能の観点から解析した研究はない。造血幹細胞のダイナミックな移動を制御する多細胞間ネットワーク構成要素を同定し、疾患への応用で病態を理解することを目的とした。

正常造血幹細胞の骨髄からの動員においては、赤芽球が産生するFGF23と増幅された好中球PPAR α が、造血幹細胞の移動能を大きく規定していた。これらの因子を介するシグナルリレーがMDS/MPNにおいてどう働いているかについて各種組織特異的遺伝子改変マウスを作成し、現在も解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞の機能の中で解析が遅れていた移動能についての理解の前進があり、実臨床での患者やドナーの体内で引き起こされる反応と臨床的に問題になる副反応や動員効率のばらつきなどについて一定の科学的説明ができるようになってきたことは意義が高い。特に、同じ交感神経系からの刺激で動員促進と動員抑制の相反する効果が同時に発動されることは興味深い。造血器疾患にこの理論を応用するには、更に継続した研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：One of the features of hematopoietic stem cells (HSCs) is “mobility”. In MDS/MPN, normal HSCs are gradually replaced with abnormal ones in the bone marrow. This phenomenon has never been analyzed in the aspect of HSC mobility. The aim of this research is to elucidate signaling relays that govern the HSC mobility in normal and diseased hematopoietic tissues.

In the study of murine model of G-CSF-induced HSC mobilization from bone marrow to circulation, we found that FGF23 from erythroblasts and PPAR α in neutrophils strikingly regulate HSC mobility. Currently, the exact roles of these pathways in the maintenance/replacement of HSCs in MDS/MPN are under investigation by generating cell specific conditional knockout mice.

研究分野：造血環境

キーワード：移動 造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は3つの大きな性質で特徴付けられる。1) 自らを枯渇させてしまわないための「自己複製能」、2) 全ての成熟血球を一定の適正な数を保つように供給する「分化増殖能」、そして3) ダイナミックな「移動能」である。これまでの造血幹細胞に関する研究は1), 2) が非常に盛んであった。しかし3)の移動能に関しては解明が非常に遅れていて血液内科での実臨床の方が先行している。白血病等難治性造血器疾患に対する根治治療としての骨髄移植では、造血幹前駆細胞が自己複製能や分化増殖能を有していることを利用しているだけでなく、ダイナミックな移動能力を最大限に応用した診療として発展してきており、現在では骨髄よりもむしろサイトカイン G-CSF の健常人への投与で骨髄から末梢血に動員された末梢血幹細胞を用いた移植が臨床現場では主流となった。また分娩時の臍帯血に含まれている臍帯血幹細胞もドナーに負担をかけない移植ソースとして一般化している。前者は骨髄から循環系へ、後者は胎生肝から循環系への造血幹細胞の移動を臨床応用したものであり、造血幹前駆細胞の移動能の応用は、過去20年で血液内科での移植診療を一変させている。しかし、その体内での制御メカニズムの理解は非常に未熟であり、臨床は「やってみたらうまくいった」という原始的なレベルにある。

通常の子の発達を考えてみても、造血幹細胞にとって「移動能」が極めて重要な能力であることがうかがえる。胎生初期の卵黄嚢で開始された造血はすぐに胎生肝に移り、ここが発達過程における造血を担う。しかし、出生前に骨組織ができあがってくると、今度は骨組織の中に形成された空洞に造血の主座が移り、骨髄として生後の造血システムの全てを担う。また、成体骨髄では、造血幹細胞は少数ながら末梢血への生理的動員がおこり、再び骨髄へと戻ってくることが知られているが、その意義とメカニズムについては不明である。これら、造血組織から末梢循環への移動が造血幹細胞自身にプログラムされた能動的なものかどうか、もし周囲環境とのネットワークの変化による受動的なものであるとすればそれは何であるのか、実はこの観点での研究は発展途上である。

高齢社会となり、圧倒的に症例が増加してきているのが、骨髄異形成症候群 (MDS) や骨髄増殖性腫瘍 (MPN) である。共通している特徴は造血幹細胞レベルでの遺伝子異常に端を発し、異常造血幹前駆細胞とそこから分化した異常血球が正常造血幹細胞や正常成熟血球に年余をかけてゆっくりとってかわっていく点である。MDSの病態進展形式は造血幹細胞レベルの移動能が正常幹細胞と比べて低い(結果として骨髄親和性が相対的に高い)ことによるのではないかと考えられる。一方MPNでは骨髄親和性ととも脾臓への親和性も高いと予想されるが、また同時に末梢血に造血幹前駆細胞が流れ出やすいことから、MDSとはまた異なった制御が働いていると考えられる。

この造血幹前駆細胞の移動機構を十分に理解した上でその動態を予測・制御できれば、造血・免疫システムの発達・構築・維持・変容の理解を格段に深化させることができ、ひいては血液内科における移植医療の効率・成績向上にも大きく寄与すると考えられる。また、MDSやMPNといった造血器腫瘍では、この造血幹細胞の移動能に着目した研究はこれまでなく、骨髄親和性を含めた新たな病態理解と新規病勢制御法の開発の礎になると考えられる。

2. 研究の目的

造血組織を起点とした造血幹前駆細胞のダイナミックな移動を制御する多細胞間ネットワーク構成要素を同定すると同時に、それらを繋ぐ具体的分子機構を明らかにし、分子標的的操作技術を確立し、造血幹前駆細胞の移動メカニズムを理解する。この知見と技術を造血器疾患(本申請研究ではMDSとMPNを標的とする)に応用し、新たな病態理解と新規治療法の開発の礎とする。

3. 研究の方法

骨代謝・神経系・脂質メディエーターなど多細胞間ネットワークのシグナルリレーを担う候補分子の各種組織特異的欠損マウスを作成し、野生型マウスを比較することで造血幹前駆細胞の生体内移動のメカニズムを追求する。また、これらの研究で重要な役割を担うことを認めた分子について、MDS/MPN疾患モデルでどのように機能しているのかを、多重遺伝子改変マウスを作成し検討する。

4. 研究成果

(1) 骨髄からの造血幹細胞移動メカニズム

臨床で用いられている成体骨髄からのサイトカイン G-CSF による動員メカニズムに関する知見の現状は、G-CSF やこれによる交感神経刺激によって、環境として働く骨芽細胞、骨細胞、マクロファージが抑制され、造血幹前駆細胞が骨髄から遊離するという構図である。同じ健康人でも G-CSF による動員効率に大きな個人差があり、全体の 10-20%は G-CSF 投与でも移植医療に十分な動員が得られない場合 (poor mobilizer) もあり、臨床的問題となっている。G-CSF の動員不全例でも CXCR4 アンタゴニスト AMD3100 (plerixafor) の追加投与で動員効率が良くなるため、G-CSF 投与時での内因性 CXCR4 機能阻害因子の存在は容易に予想できるものの、それが何であるかはこれまで不明であった。Fibroblast growth factor-23 (FGF23) がそれで、一般的には骨組織に埋もれた骨細胞から産生されるホルモンであり、共役受容体である α -Klotho の存在下で FGF 受容体と結合し腎臓でのリンの再吸収を抑制することで血中リン濃度を低下させる機能が有名である。このホルモンの mRNA が G-CSF 投与により骨髄で非常に強く発現するようになり、骨髄細胞外液の ELISA で蛋白レベルでも定常状態でのほぼ検出感度以下から非常に容易に測定できるレベルに上昇し、希釈倍率での計算上末梢血の約 20,000 倍というとても高濃度に骨髄環境が G-CSF 投与後浸されることを発見した。骨髄中で、FGF23 mRNA を G-CSF ないしはカテコラミン刺激で強発現してくる細胞を検索し、CD45-Ter119-CD71+ 赤芽球がほぼ選択的に FGF23 を産生していた。また、赤芽球培養では骨髄中への放出形態は当初赤芽球の溶血の可能性を考えていたが、実際に発見したのは低酸素刺激での自律性放出であった。FGF23 ノックアウトマウスに G-CSF を投与すると動員はほぼ起こらず、骨髄移植によって造血システムのみ FGF23 ノックアウトのキメラマウスを作製して G-CSF を投与しても同様の結果であったため、骨髄赤芽球から産生放出された FGF23 の濃度が骨髄で急激に上昇し、造血幹前駆細胞の骨髄から末梢血への動員を促進する方向に働く事が明らかとなった。また、in vitro transwell migration assay を用いて、上層に入れた造血幹前駆細胞が CXCL12 を入れた下段に引き寄せられる実験系に FGF23+ α -Klotho を先の G-CSF 投与後の骨髄細胞外液における濃度で添加することで、その生存やコロニー形成能に全く影響を与えず、CXCL12 に対する遊走を非常に強力に抑制できることを見いだした。すなわち、FGF23 シグナルは、造血幹細胞側の CXCR4 の機能を抑制することが明らかとなり、in vivo で見られた G-CSF 投与時の骨髄での FGF23 mRNA/蛋白の急激な上昇は、内因性 CXCR4 機能抑制分子として作用していると考えられる。検討の結果、交感神経シグナルで赤芽球での FGF23 mRNA が上昇する理由は、交感神経シグナルにより、骨髄環境が急速に低酸素になることが原因と考えられた。ただし、交感神経シグナルで骨髄が低酸素になる理由までは解明できていない。

もう一つ分子リレー解析の主軸として、研究代表者独自に開発した脂質メディエーター安定的定量法 (過冷却メタノール法によるサンプル採取と高速液体クロマトグラフィータンデムマスマスペクトロメトリー (LC-MS/MS) の組み合わせ) を確立し、これによる動員制御脂質の探索を行なった。骨髄のような血球を多く含む生体サンプルでは、通常のサンプリングではピペッティングなど物理的的刺激一つで大きく脂質データが変動するため (実際にはサンプルを 4°C の緩衝液に懸濁した後数回のピペッティングのみでログスケールのデータのぶれが生じる)、正確な定量は不可能であった。我々の開発した -30°C に過冷却したメタノールでマウス骨髄を直接フラッシュしてそのまま固層化する方法はこれを可能にし、骨髄での各種脂質メディエーターの変化を正確に再現性をもって捉えることに成功している。予備実験により、同じ genetic background を持ったマウスに同じ量の G-CSF を投与しても実に 3 倍近い動員効率のばらつきがあり、その個体差を規定している因子を探索したところ、脂質制御分子ファミリーの一つである PPAR δ の骨髄中 mRNA 発現レベルと末梢血への造血幹前駆細胞の動員効率が、非常に強い相関を示す事を見いだしている。短期間 (2 週間) の脂質フリー食での飼育で、G-CSF 投与時の骨髄の PPAR δ mRNA 上昇 (主として骨髄幼弱好中球での変化によることも確認済み) とともに末梢血への動員効率が格段によくなること、更にこの効率上昇が PPAR δ のアゴニスト GW501516 の投与でキャンセルされる事を確認した。これらを踏まえ、脂質フリー食で先の方法での骨髄脂質解析を行った所、 ω 3 脂質 (DHA/EPA とその derivative 脂質) がほぼ選択的に激減していることが明らかとなっている。骨髄は食餌から得る必要のある必須脂肪酸である ω 3 脂質の要求度の高い臓器であると考えられ、また、ソーティングした骨髄好中球に in vitro で EPA を加えると PPAR δ 下流の Cpt1a mRNA が上昇しこの反応は PPAR δ アンタゴニストの存在下で消失することから、 ω 3 脂質は PPAR δ の生理的リガンドとなりうることも確認済みである。これらより、脂質フリ

一食で PPAR δ の発現が上昇する骨髄成熟好中球において PPAR δ のリガンドとして ω 3 脂質が作用した場合に動員を抑制する方向に働く何らかの物質が産生放出されるという仮説をたて、PPAR δ 刺激によって産生され各種がん細胞の転移における血管透過性制御因子として知られる Angiopoietin-like protein 4 (Angptl4)に着目して、この分子の機能阻害抗体の投与で G-CSF による動員効率が有意に上昇し、また *in vivo* で Evans Blue assay を用いた検討でも、動員においては Angptl4 は骨髄血管透過性抑制に働いていることが確認できた。

更に、本研究項目の進捗過程で、G-CSF 投与時にある血球細胞分画で劇的にその mRNA 発現強度が変化することを発見した adrenomedullin (Adm) について、Adm flox マウスを新規に作成し、交配により血球特異的 Adm 欠損マウスを作成できたところである。こちらも今後、血液学的検討を継続していく予定である。

(2) 胎生肝から末梢血への動員

骨髄からの動員実験と腫瘍モデルの検討にリソースを重点的に割いたため、本項目の検討は研究期間内には十分な進捗が得られておらず、継続研究課題である。胎生肝の脂質メディエータープロファイルも検討技術は確立できたものの、実際のデータとしては継続研究課題である。

(3) 造血器腫瘍における造血幹前駆細胞動員制御

本研究のため、MDS モデルとして *vav*-NUP98/HOXD13 Tg マウス、MPN モデルとして JAK2V617F Tg マウスを用いた。MDS モデルについて、transwell migration assay で野生型と MDS の骨髄未分化細胞の遊走能に差はなかったものの、これを modulate する並列刺激に対する反応が大きく異なることを見出し、現在そのシグナルリレーの違いと意義を追求中である。また、MDS モデルと FGF23 ノックアウトマウス (ゲノム編集による large deletion マウス) を交配してみたが、これは FGF23 ノックアウトマウス同様、生後 5-9 週あたりで死亡してしまうため、MDS 発症との関係は解析できなかった。そのため、FGF23 flox マウスと組織特異的 Cre 発現マウスを用いて、血球種特異的 FGF23 欠損 MDS マウスを複数種作成しており、今後解析予定である。また、MPN モデルについては、(1)で ω 3 脂質の受容体として働く PPAR δ のヘテロノックアウト (ホモは胎性致死) との 2 重遺伝子改変モデルを作成したが、これは明らかな病勢変化を認めなかった。逆に ω 3 脂質を過剰産生できるマウスとの交配での病勢変化を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------