

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25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591073

研究課題名（和文） 骨代謝と血球分化における転写因子NF- κ B RelAの役割研究課題名（英文） Role of NF- κ B RelA in homeostasis of bone and hematopoietic niche.

研究代表者

三瀬 節子 (MISE SETSUKO)

独立行政法人理化学研究所・生体情報統合技術開発チーム・開発研究員

研究者番号：00269052

研究成果の概要（和文）：

骨代謝と造血とは相互作用している。転写因子NF- κ BのRelAを欠損したマウスの胎児肝臓細胞を移植したRelA欠損キメラマウスは、重度の骨粗鬆症を発症すると同時にリンパ球の分化が低下する。このマウスの骨粗鬆症は、骨芽細胞による骨形成が低下により起こる。RelA欠損型造血幹細胞そのものの機能は正常であるが、骨粗鬆症の造血環境に置かれた事で、造血幹細胞の機能が低下する。RelA欠損キメラマウスに野生型骨髄マクロファージを移植すると、骨形成のみならず、血球分化の異常も回復した。このことから、正常マクロファージには骨形成を促進し、骨髄内環境を整える作用があり、マクロファージのこれらの機能にはRelAが不可欠であることが明らかした。

研究成果の概要（英文）：

Bone remodeling and hematopoiesis are interrelated. We found that NF- κ B *rela*-deficient chimeric mice, generated by transplanting *rela*^{-/-} fetal liver cells into lethally irradiated hosts, develop osteopenia. *rela*^{-/-} HSCs from fetal liver have normal hematopoietic ability, but those harvested from the bone marrow of osteopenic *rela*^{-/-} chimeric mice have reduced repopulation ability, indicating impairment of microenvironment for hematopoietic niche. Osteopenia in *rela*^{-/-} chimeric mice is due to reduced bone formation, even though osteoblasts differentiate from host mesenchymal stem cells. This finding indicates impaired interaction between osteoblasts and HSC-derived cells. Transplantation with wild-type F4/80⁺ bone marrow macrophages recovers bone formation in *rela*^{-/-} chimeric mice and ameliorates lymphopoiesis, indicating that *rela*^{-/-} macrophages fail to support bone formation and hematopoietic niche. Therefore, RelA in F4/80⁺ macrophages is important both for bone homeostasis and for maintaining the hematopoietic niche after lethal irradiation and HSC transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

1. 研究開始当初の背景

転写因子 RelA を欠損したマウスは胎生期 14 日目に死亡する。RelA 欠損型の血球細胞を持つマウスを作製するために、致死量の X 線を照射したマウスに、胎生 13.5 日の RelA 欠損型の胎児肝臓細胞を移植し、RelA 欠損キメラマウスを作製した。図 1 に示すようにこのマウスは、重度の骨粗鬆症を発症すると共に、リンパ球の分化が著しく低下している

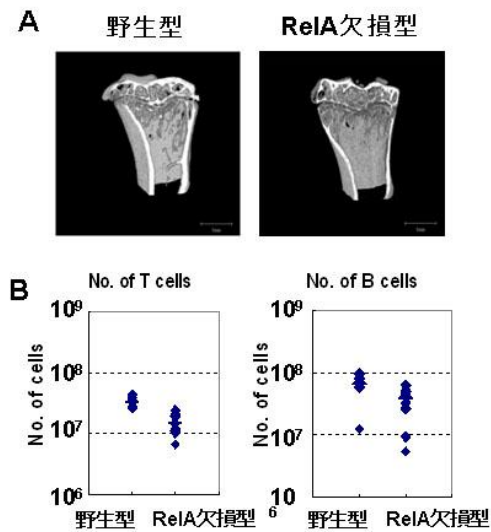


図1 RelA欠損型キメラマウスは重度の骨粗鬆症になると共に末梢のリンパ球が減少する。(A)脛骨のマイクロCT画像を示す。(B)脾臓のT及びB細胞数を示す。各点は各個体を示す。事を発見した。

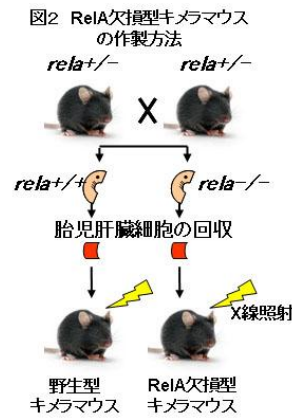
2. 研究の目的

骨代謝と造血幹細胞ニッチとは相互作用している事が知られている。RelA 欠損キメラマウスでは、骨代謝と造血幹細胞ニッチの両者に異常がある。本研究では、RelA 欠損キメラマウスで発症する骨粗鬆症の原因を明らかにする。次いで、骨粗鬆症の原因が造血幹細胞ニッチにどう関わっているか明らかにする事で、骨代謝と造血幹細胞ニッチの因果関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)図 2 に示すように、RelA の遺伝子座をヘテロに持つマウスを掛け合わせて、RelA 欠損型と野生型胎児を回収する。胎児肝臓細胞を採取し、致死量の X 線照射した別のマウスに移植し、RelA 欠損型キメラマウス及び野生型キメラマウスを作製する。

(2)骨粗鬆症の原因の追求



RelA 欠損キメラマウスの骨形態計測を行い、骨を吸収する破骨細胞と骨を形成する骨芽細胞のどちらに異常があるのかを明らかにする。

(3)正常の細胞移植によるレスキュー実験

RelA 欠損型キメラマウスで起こる骨粗鬆症や造血異常が、正常骨髄細胞やマクロファージを移植する事で、回復させることができるかを検討する。

(4)連続移植による造血活性の検定

RelA 欠損キメラマウス骨髄細胞を採取し、別の X 線照射したマウスに 2 次移植する。この際、野生型の骨髄細胞と一緒に移植し、野生型の骨髄細胞との造血能を比較する。

(5)RelA 欠損型骨髄マクロファージの特徴付け

野生型、RelA 欠損キメラマウスのそれぞれの骨髄からマクロファージを単離し、RNA を回収する。一酸化窒素合成酵素やプロスタグランジン生成酵素の発現を調べ、マクロファージが炎症性なのか治癒性なのかを明らかにする。

4. 研究成果

(1)RelA 欠損キメラマウスの骨形態計測を行った。図 3 に示すように、破骨細胞の過剰分化ではなく、骨芽細胞の骨形成の低下によって骨粗鬆症になる事を明らかにした。

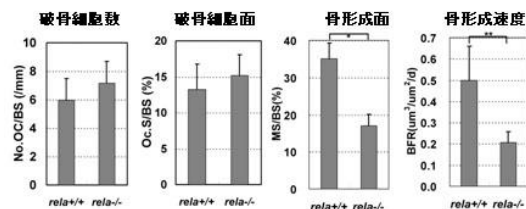
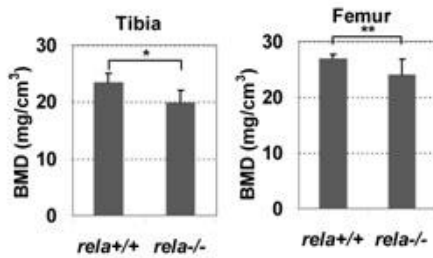


図3 RelA欠損型キメラマウスでは骨形成が著しく劣っており、破骨細胞数はやや増加傾向であった。

(2)RelA 欠損型キメラマウスを作製する際、野生型の骨髄細胞を共に移植すると、図 4 に示すように、RelA 欠損型キメラマウスで減少していた骨密度が回復した。また同時に、末梢でのリンパ球の減少も回復した。このことは、RelA 欠損型の造血幹細胞そのものに

は異常がない事を示している。

A 胎児肝臓細胞単独移植の場合



B 野生型骨髄細胞との共移植の場合

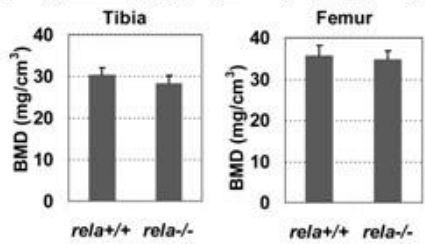


図4 RelA欠損型キメラマウスと野生型キメラマウスの骨密度を示す。野生型骨髄細胞を共に移植するとRelA欠損型キメラマウスの骨密度減少が回復する。

(3)骨粗鬆症を発症している RelA 欠損型キメラマウスの骨髄細胞を野生型の骨髄細胞と共に移植した。RelA 欠損型造血幹細胞由来の血球細胞は著しく減少し、RelA 欠損型造血幹細胞の活性が著しく低下していることが明らかになった。

(2)と(3)の結果より、RelA 欠損型造血幹細胞そのものは異常がないが、骨粗鬆症の骨髄内環境にいることで造血活性は低下することを明らかにした。

(4)RelA 欠損キメラマウスではマクロファージは過剰に分化しているが、骨髄内の成熟マクロファージはむしろ著しく減少している。

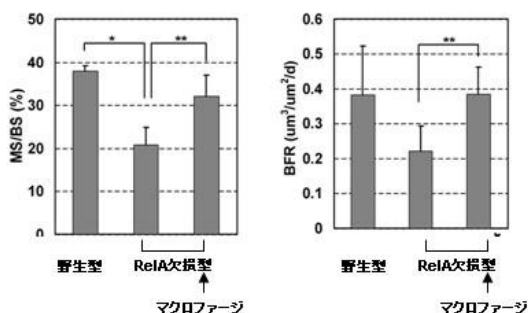


図5 野生型F4/80+マクロファージによってRelA欠損型キメラマウスの骨形成の減少をレスキューする。

そこで、野生型マウス骨髄から、成熟マクロファージを単離し、RelA 欠損胎児肝臓細胞と共に移植した。図5に示すように、このマウスの骨形成は回復した。また同時に、

リンパ球の減少もレスキューされた。このことから、RelA 欠損型キメラマウスでは、マクロファージの異常が骨代謝や造血幹細胞ニッチの異常をもたらしている事が明らかになった。

(5)RelA 欠損型および野生型キメラマウスの骨髄内マクロファージの遺伝子発現について解析した。その結果、RelA 欠損型キメラマウスの骨髄では、炎症刺激に対して治癒的に働くプロスタグランジン E2 を合成酵素の発現が低い一方、炎症を誘導・亢進する一酸化窒素合成酵素の発現が高かった(図6)。

このことから、RelA 欠損型キメラマウス

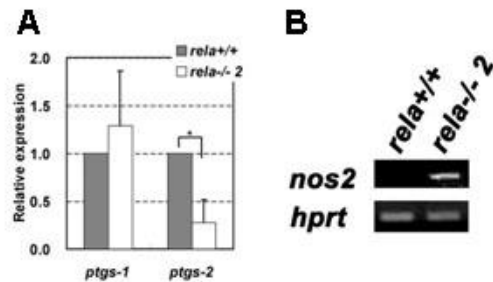


図6 野生型キメラマウスとRelA欠損型キメラマウスでの骨髄内マクロファージの遺伝子発現の違い。プロスタグランジンE2合成酵素(A)と一酸化窒素合成酵素(B)の発現を調べた。炎症によって誘導されるptgs-2の発現がRelA欠損型では低く、炎症の激化によって発現する一酸化窒素の発現が高かった。

では、X線照射後の治癒がうまくいかないために、骨髄内環境が悪化することを明らかにした。

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)

[学会発表] (計4件)

1. Setsuko Mise-Omata, Neil Alles, Taro Fukazawa, Kazuhiro Aoki, Keiichi Ohya, Eijiro Jimi, Yuichi Obata, and Takahiro Doi NF- κ B, *rela*-deficient bone marrow macrophages fail to support bone formation and maintain HSC niche after lethal irradiation and HSC transplantation. JSICR-MMCB 2013 May 20-21 2013 Tokyo.
2. Setsuko Mise-Omata, Taro Fukazawa, Yuichi Obata and Takahiro Doi. *rela*-deficient osteal tissue macrophages (osteomac) are not able to support bone formation, resulting in impairment of microenvironment for hematopoiesis. 日本免疫学会総会 2012年12月5-7日神戸

3. Setsuko Mise-Omata, Taro Fukazawa, Yuichi Obata, and Takahiro Doi. NF- κ B *rela*-deficient hematopoietic cells developed osteoporosis and poor activity of hematopoietic stem cells. 日本免疫学会総会 2011年11月27-29日 幕張
4. Setsuko Mise-Omata, Taro Fukazawa, Yuichi Obata and Takahiro Doi Deficiency of NF- κ B/RelA molecule in hematopoietic cells impairs lymphocyte development and bone metabolism: a possibility on a damage of hematopoietic niche. 14th International Congress of Immunology. August 22-27, 2010. Kobe.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三瀬 節子 (MISE SETSUKO)

独立行政法人理化学研究所・生体情報統合技術開発チーム・開発研究員

研究者番号：00269052

(2) 研究分担者

土井 貴裕 (DOI SATORU)

独立行政法人理化学研究所・生体情報統合技術開発チーム・サブチームリーダー

研究者番号：60227684

(3) 連携研究者