

平成 30 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04856

研究課題名(和文)造血制御中枢としての骨組織の評価

研究課題名(英文)Evaluation of bone tissue as a regulatory center of hematopoiesis

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：カルシウム代謝に中心的役割を果たすビタミンD受容体(VDR)とリン代謝に必須のホルモンFGF23について、骨髄造血や造血器疾患における役割を解析した。骨髄造血と骨代謝の関係のひずみが不可逆性になった場合に造血器疾患が発症する例として骨髄線維症のモデルを確立し、このひずみの中心に造血幹細胞でのVDRがあることを証明し、ヒト骨髄線維症と同じ遺伝子変異を持つマウスモデルでもVDRを標的として病勢を抑制することに成功した。また、骨髄でFGF23が神経シグナルを受けて働き、造血前駆細胞の骨髄から末梢血への移動をサポートしている構図を明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the roles of VDR and FGF23 which are critical for homeostasis of calcium and phosphate, respectively. As an example of the deviation of inter-organ communication between bone marrow and bone, we could establish a myelofibrosis model in which VDR played a central role. Even a murine myelofibrosis induced by a gene mutation which is identical to the one in human myelofibrosis could be rescued by targeting the VDR signal. We also found that FGF23 produced from hematopoietic cells facilitated the mobilization of hematopoietic progenitor cells from bone marrow to circulation.

研究分野：Hematology

キーワード：bone metabolism

1. 研究開始当初の背景

骨髄にとって骨は単なるプロテクターではなく、一見無関係のように思える「骨代謝」と「造血システム」は、近年にわかにその深い関係がクローズアップされるようになった。骨髄移植後、輸注された造血幹細胞は末梢循環をめぐるうちに自分の本来の居場所である骨の中の骨髄を認識(ホーミング)し、造血を再開(生着)する。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、血球系統特異的造血支持細胞の制御機構を研究申請者は明らかにしてきた(Katayama, Blood 2003; Immunity 2003; Blood 2004; J Exp Med 2005)。2000年代はじめより、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)の一部が骨辺縁の骨芽細胞であることが相次いで報告された(Zhang, Nature 2003; Calvi, Nature 2003; Arai, Cell 2004)。移植された造血幹細胞はここにおさまり造血を再開するが、この骨辺縁はカルシウム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カルシウム(Ca)感受受容体を通して骨芽細胞ニッチまでたどり着く可能性が報告されている(Adams, Nature 2006)。同グループは副甲状腺ホルモン(PTH)刺激で造血幹細胞ニッチを増幅することで造血幹細胞を増やす事も報告している(Adams, Nature Biotechnol. 2007)。また、患者への末梢造血幹細胞移植目的で健常人ドナーにサイトカインG-CSFを4-6日間連続で投与すると、骨髄中の造血幹細胞がニッチを飛び出し大量に末梢血に動員されることがわかっており、現在我が国で行われている成人血縁者間移植ではドナーの半数以上が骨髄でなく末梢血採取を希望しており、欧米では非血縁バンクドナーの実に8割以上がG-CSF投与での末梢血採取を受けているのが現状である。我々は、このG-CSFによる造血幹細胞動員のメカニズムの一部が交感神経を介した骨芽細胞ニッチの抑制であることを報告した(Katayama et al. Immunity 2003, Cell 2006)。続いて、カルシウム制御ホルモン受容体として骨代謝に重要な役割を果たしているビタミンD受容体(VDR)が β 2-アドレナリン受容体(β 2AR)の下流でG-CSFによる交感神経シグナルを介した幹細胞動員に必須であることを明らかにした(Kawamori, Katayama et al. Blood 2010)。この研究は、カルシウム制御ホルモン/受容体経路が血中カルシウム濃度調節だけでなく直接に予想もつかない形で造血システムに関与している経路を明らかにすることとなった。更に最近、この動員機構に骨組織に埋没し重力センサーとして機能することが知られている「骨細胞」が骨表面のニッチを制御しており、G-CSFは、交感神経を介して骨芽細胞のみでなく骨細胞を抑制し、骨組織内からの骨芽細胞支持シグナルを一時的に抑制することで、ニッチ破綻にともなう動員へとつながって

いくことを報告し、H23-25年度基盤研究Bで提案した「造血制御中枢としての骨組織」の概念を確立した(Asada, Katayama et al. Cell Stem Cell 2013)。更に我々は、骨組織が脳と協調して脂肪組織・胸腺・肝臓といった遠隔臓器をも制御している構図を明らかにしている(Sato, Katayama et al. Cell Metabolism 2013)。このように、我々の研究により造血幹・前駆細胞の制御機構において、神経支配を含めた骨代謝研究の視点”Brain-Bone-Blood integration”は、もはや不可欠のものとなっている。

先のビタミンDの造血幹細胞ニッチにおける役割の研究で、この機構へのCa代謝の関与は比較的明らかになってきた。しかし、Caと同時に骨代謝がその制御の中心であるリン(P)に関しては、内分泌代謝や腎臓内科の研究ジャンルでは多大な注目を浴びているものの、血液学ではこの研究は皆無である。中でもfibroblast growth factor (FGF)-23は骨組織に埋もれた骨細胞で産生され、co-receptorである α Klothoと共役して腎に発現する受容体FGFR1にシグナルを通し、P再吸収を抑制し血中P濃度を低下させる方向に働くことが教科書的には知られている。また最近、外部から投与されたビタミンDは骨芽細胞よりも骨細胞に作用してCa代謝に関与しているという非常に重要な報告がなされたが(Lieben, J Clin Invest 2012)、実は、生体内でのPTH/ビタミンD/FGF23の相互のカルシウム・リン平衡維持機構ばかりがクローズアップされて日の目を見ていない重要な知見が、骨細胞においてVDR刺激がFGF23産生を誘導するという知見である(Yamamoto et al. J Endocrinology 2010)。

これらより、リン代謝に重要なFGF23とビタミンDがいかに協調して造血幹細胞ニッチや骨髄造血全体を制御しているかを、神経シグナルの関与も含め明らかにすることが、造血システムに対する今までにない新たな理解をもたらすと考えられた。

2. 研究の目的

造血制御中枢としての骨組織評価として我々がこれまでの研究で明らかにしてきた、「カルシウム代謝制御機構の関与」、「造血幹細胞ニッチ制御最重要細胞成分としての骨組織内骨細胞の認識」に加えて、大きく残されている「リン代謝制御機構の関与」を加えた骨代謝を俯瞰した造血環境制御機構の理解とそれへの神経系の関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

カルシウム代謝機構に関して、従来我々の研究室で知見を重ねて来た通常のVDR欠損マウスに加え、骨細胞特異的(DMP1-Cre)ない

しは骨芽細胞特異的 (Osterix-Cre) Cre マウスと VDR^{flox} マウスを交配して、それぞれの細胞特異的 VDR 欠損マウスを作製し、それらのマウスにおける造血能や G-CSF 投与によるニッチ制御様式を検討した。また、VDR 欠損マウスに関しては、新たな骨髄線維症モデルマウスへ発展させることができていたため、このモデルを発展させ、骨代謝と造血 2 つのシステムのひずみが VDR を介して造血器疾患を呈するメカニズムについても検討した。リン代謝機構に関しては、ゲノム編集技術を用いて FGF23 large deletion (FGF23^{-/-}) と FGF23^{flox} マウスを作製した。後者は DMP1-Cre マウスとの交配で FGF23 主要産生細胞である骨細胞での特異的 FGF23 欠損マウスを作製した。これらのマウスにおける造血能や G-CSF 投与によるニッチ制御様式を検討した。

4. 研究成果

(1) カルシウム代謝に必須である VDR について、ニッチ細胞特異的 VDR 欠損の造血に及ぼす影響について解析するため Osterix-Cre や DMP1-Cre マウスと VDR^{flox} マウスを交配して、骨芽細胞特異的 VDR 欠損マウスと骨細胞特異的 VDR 欠損マウスを作製した。まず、骨芽細胞特異的 VDR 欠損マウスの解析において、原因は不明ながら VDR 欠損でなくても Osterix-Cre を持っているだけで 8 週齢くらいまでに骨格が弱く小さい事が観察されたため、これが回復して野性型マウスと同様な骨格まで回復してくる 12 週齢まで待つて、同胞でのコントロールマウスとの間で末梢血や骨髄の比較解析を行った。DMP1-Cre を用いた骨細胞特異的 VDR 欠損マウスは成長に問題はなく、約 8 週齢で解析した。いずれのマウスでも末梢血血球数、骨髄細胞数、骨髄造血幹前駆細胞数、G-CSF による造血前駆細胞動員効率 (CFU-C で解析) とともに、同胞内コントロールと優位な差はみられなかった。骨芽細胞特異的ないしは骨細胞特異的 VDR 欠損マウスでは、未分化造血細胞 (lineage⁻, c-kit⁺集団) 中の Sca-1 の発現が完全に欠損する個体が毎回ではないが出現し、これがなぜおこるのか、また生理学的意義があるのかなどは現時点では説明できるデータを得られていない。造血微小環境での VDR が造血前駆細胞の末梢血への動員に重要である事は報告済みであるが (引用文献①)、今回の研究で用いたモデルではそれが骨芽細胞ないしは骨細胞特異的であるかどうかに関して明確な結論を出す事はできなかった。

G-CSF による造血幹前駆細胞の動員に造血環境側の VDR が必須であることは過去に報告済みであるが、これは VDR を介した一時的な骨代謝と造血システムのひずみと言える。もし、この骨代謝と造血システムのひずみが不可逆的に進行したら造血器疾患になるのではないかと、との観点から我々が作製したのが

通常の VDR 欠損マウスに野性型マウスの骨髄を骨髄移植することで成立する新規骨髄線維症モデルである。これは、VDR^{+/+}造血幹細胞が VDR^{-/-} recipient のビタミン D 濃度が非常に高い環境に移植され、骨髄でその強い刺激に曝される事によって、 α SMA 陽性マクロファージに強制分化させられ、これが recipient 側の骨芽細胞を異常に活性化させることによりコラーゲン線維を作らせ、骨髄が線維化するモデルであることを捉えていた。本研究では、VDR の造血と骨代謝を繋ぐ役割の解明の発展として、このモデルがヒトの骨髄線維症を引き起こす原因遺伝子変異である JAK2V617F のトランスジェニック (Tg) マウスで応用可能かどうかを検討した。まず、JAK2V617F Tg マウスを低ビタミン D 食で 5 ヶ月程度飼育すると、普通食では強い骨髄線維化と骨硬化がおこるところ、低ビタミン D 食では優位に線維化の程度が弱まっていた。骨硬化に関しては同様に低下している傾向はあったが、これは有意差までは得られなかった。次に、交配により VDR 欠損 JAK2V617F Tg マウスを作製し、この骨髄を野性型マウスに移植するモデルを作製した。VDR 野性型 JAK2V617F Tg マウスの骨髄を移植した場合、移植後 3 ヶ月で明らかな骨髄線維症を呈するが、同様の実験を VDR 欠損 JAK2V617F Tg の骨髄を移植することで観察してみると、骨髄線維化の程度が有意に減弱していた。骨硬化に関しては移植後 3 ヶ月では評価には早すぎるようで、コントロールでも十分な骨硬化は起きていなかった。以上、食餌と遺伝的モデルの 2 つの方法により、ヒトと同様の遺伝子変異を持ったマウスでの骨髄線維症もビタミン D シグナルを抑制することでその病勢進展を抑制できることが明らかとなった。この骨髄線維症の部分は現在論文を執筆中である。

ビタミン D や VDR とカルシウム代謝に関する研究は、世界的に見てもシグナル経路をはじめとした基礎的なものが盛んに進められてはいるものの個体レベルの役割についての研究は非常に少ない。特に造血システムにおける研究はほぼ皆無に近い状態であり、今後も研究継続の必要がある。骨髄線維症など造血器疾患における VDR の役割については、臨床での治療応用に直結する可能性がある。JAK2 遺伝子変異がトリガーとなっている疾患ながら JAK 阻害剤では改善しないことから、進行した真の病態生理を正確に理解することによって新たな治療法の開発につながると考えられ、研究継続の重要度は非常に高い。

(2) リン代謝に必須である FGF23 について、骨髄での役割を検討した。まず、交感神経シグナル刺激であるカテコラミンやサイトカイン G-CSF の投与により、骨髄細胞での FGF23 mRNA や骨髄細胞外液での FGF23 蛋白レベルが急速に上昇する事が明らかとなった。G-CSF による造血前駆細胞の動員は FGF23 欠

損マウスでは大きく低下しており、骨髄の造血前駆細胞数にはコントロールマウスと比較して変化がなかった。FGF23 欠損マウスの骨髄を野性型マウスに移植して作製したキメラマウスでも、同様に末梢血への造血前駆細胞の動員効果が著明に低下しており、血球からの FGF23 産生が造血前駆細胞動員に促進性に働いている可能性を見いだした。FGF23 はこれまでの一般的な認識ではほぼ特異的に骨細胞から産生されるとされていたが、我々の検討により神経シグナルが入れば骨髄血球が産生できることが明らかになったため、骨細胞特異的 FGF23 欠損マウスを作製し G-CSF による動員効率を検討したところ、まだ十分な個体数を持って確定できてはいないが、少なくとも低下はないようであるため、骨細胞から産生される FGF23 には造血前駆細胞の動員を促進させる役割はない可能性が高いと現時点では考えている。骨髄血球の中で神経シグナルによって FGF23 産生能力を急上昇させる細胞集団を探索し、おそらくこれが赤芽球である可能性が高い証拠を得ており、現在赤芽球系細胞株を用いて FGF23 産生調節機構について検討中である。FGF23 について今回得られた成果は、まだ途中経過であり論文執筆にまでは至っていないものの、2018 年 10 月の第 80 回日本血液学会学術集会での発表目的で、現在抄録を投稿中である。

FGF23 とリン代謝に関する研究は、世界的にある程度の個体レベルの研究が進んでいるものの、FGF23 の共役受容体である Klotho の不全マウスが早期老化形質を示すことがよく知られていて、FGF23 ノックアウトマウスで見られる表現型の全てが老化とされてしまっており、各臓器における丁寧な病態生理機構の理解についてはやや遅れている感がある。骨髄造血に関して言えば、これまで全く研究がされておらず我々のものが最初であり、オリジナリティーと研究継続の重要度は非常に高い。

<引用文献>

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.

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
特記事項無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 義雄 (YOSHIO KATAYAMA)
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80397885

(2) 研究分担者

該当無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

該当無し ()