

令和 3 年 5 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02837

研究課題名(和文) 骨髄造血大環境としての骨組織の解析

研究課題名(英文) Evaluation of bone as a hematopoietic macroenvironment

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄脂質メディエーターの解析において、交感神経シグナルを受けた骨髄未分化好中球において、脂質メディエーターをリガンドとする受容体型転写因子PPAR の発現が増強し、食餌により骨髄に供給される脂質のうち特に 3脂肪酸がこの受容体に作用することで骨髄血管透過性が制御されていることを発見した。また、交感神経シグナルは骨髄を低酸素状態にし、この刺激で赤芽球からFGF23が産生され、これが未分化造血細胞のケモカイン受容体の機能を抑制することで血球の位置どりを制御している構図も明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄移植は難治性造血器疾患に対して治癒を望める非常に重要な治療法です。近年では、サイトカインG-CSFを健常人に投与することで、本来ほぼ骨髄にしか存在しない造血幹細胞を末梢血に動員してこれを集め、骨髄の代わりに移植する末梢血幹細胞移植が主流となりました。しかし、G-CSFによる動員はその効果発現メカニズムの理解が不十分であり、また10-20%程度の予知できない動員不全のケースがあり、臨床的に問題です。本研究成果は、動員を起こさせるのに必須の骨髄内因子を発見するとともに、食餌中の特定の脂質が動員不全の鍵として働いていることを明らかにしています。臨床現場の問題解決につながる成果です。

研究成果の概要(英文)：In the analysis of bone marrow (BM) lipid mediators, the stimulation of sympathetic nervous system (SNS) leads to the increased expression of receptor type transcription factor, PPAR in BM neutrophil precursors. 3 fatty acids in the food stimulate PPAR and induce the production of a regulator of BM vascular permeability. In addition, SNS signal induces the hypoxia in the BM microenvironment, which leads to the production of FGF23 from erythroblasts. FGF23 in the BM microenvironment suppresses the function of CXCR4 in hematopoietic stem/progenitor cells, which regulates the trafficking of these cells between BM and circulation.

研究分野：骨髄造血システム

キーワード：骨髄環境 造血 骨組織

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、「造血制御中枢としての骨組織評価」の題目で、造血環境としての骨代謝システム機能解析をこれまでの基盤研究で推進してきた。これらは、造血幹前駆細胞と造骨担当間葉系支持細胞の基本的には単一細胞同士をユニットとした「造血微小環境 hematopoietic microenvironment」を基本概念としている。しかし、これでは局所の微小環境の重要性についての理解は深まるものの、骨髄とそれを360度覆っている骨組織も含めた骨・骨髄組織の「臓器」としての理解は進まない。

2. 研究の目的

研究代表者のこれまでの研究と未発表予備データを通して、局所の微小環境の重要性とは別に、骨髄造血システム全体を完全に覆っている骨組織による「造血大環境 hematopoietic macroenvironment」の存在を新しく提唱する。具体的には、1) 主要脂質メディエーターであるプロスタノイドの分解と 2) 骨髄内酸素濃度感知機構に注目し、魔法瓶のように入れ物としての骨組織が、内容物である骨髄造血システムの恒常性を維持するメカニズムを解明する。更に、この骨髄造血大環境システムが、ミエロイドバイアスに代表される骨髄老化や高齢者に多い造血器腫瘍の発症進展に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、大環境を標的とした骨髄の老化や癌化進展に対抗できる自己の若い造血システムを維持する画期的医療の開発への道筋を示す事をねらう。

3. 研究の方法

(1) プロスタノイド制御装置としての骨組織の評価

研究代表者は骨髄でのプロスタグランジン E2 (PGE2) などプロスタノイドの主要産生細胞が交感神経に制御された好球球やマクロファージといったミエロイド系血球であることを報告している (Kawano, Katayama, Blood 2017)。主要プロスタノイドである PGE2 の制御機構として、今回は産生ではなく分解を担う酵素 15-PGDH の発現と機能に注目することで、プロスタノイド制御装置としての骨・骨髄組織における脂質メディエーターの造血における未知の役割を明らかにしていく。

(2) 骨髄酸素濃度感知装置としての骨組織の評価

30年以上前から、骨髄長期培養系は低酸素にすると造血能を非常によく維持できることが造血研究者の間では知られていた。定常状態における骨髄局所の酸素濃度の研究はある程度世界でも行われているが、骨髄に負荷がかかった時の酸素濃度の変化とそれに対応した造血システムの変容に関してはほとんど知られていない。すなわち酸素濃度の変化とその感知機構は造血システムの理解において非常に重要と考えられた。これを解明する目的で、酸素濃度変化感知受容体としての機能を持つことが報告されている TRPA1 の発現と機能に注目することで、酸素濃度変化感知装置としての骨・骨髄組織の解析を進める。

(3) 造血大環境破綻の造血器腫瘍進展における役割の解明

老化に伴うミエロイドバイアスをベースに発症する造血器ミエロイド系悪性腫瘍である MDS/白血病のマウスモデルを用いて、造血大環境要因の破綻、すなわち骨組織でのプロスタノイド分解能力や骨髄酸素濃度変化感知機構の変化が病勢進展に与える影響を解析する。

4. 研究成果

(1) プロスタノイド制御装置としての骨組織の評価

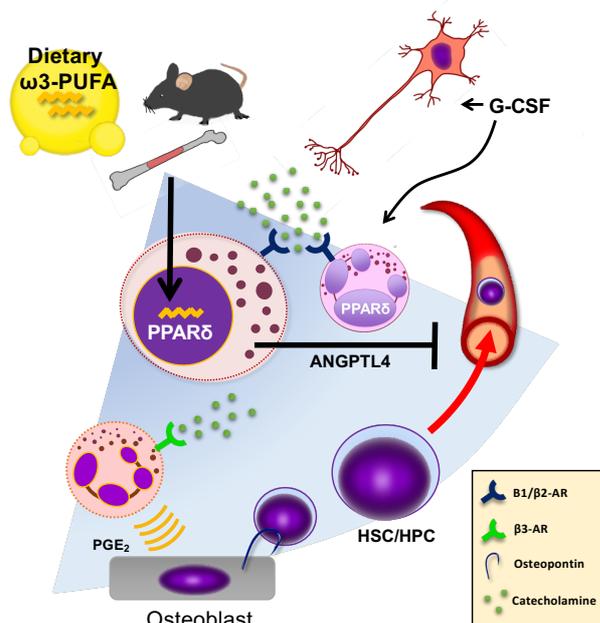
PGE2 分解を担う酵素 15-PGDH の発現を real-time PCR で確認したところ、骨髄組織よりも骨組織で強い発現が認められた。In situ hybridization を試みたところ、組織の脱灰過程が入るためか、再現性の担保されたデータとして確定することは難しかった。In vivo での機能解析を優先するため、15-PGDH ノックアウトマウスの凍結精子を米国のより搬入したが、現在までに個体復元を完了できていない。今後、このマウスの個体復元と解析を進めていく予定である。

一方、脂質メディエーターに関する本研究途中で、食餌中の ω 3 脂質、特に eicosapentaenoic acid (EPA) (ないしはその derivative) が骨髄造血システムに多大な影響を与えていることを発見し、こちらに注力している。骨髄は造血幹細胞から成熟好中球や単球・マクロファージまで非常に多彩な骨髄球系の炎症性細胞がパックされているため、血球を含めた骨髄腔内全てを脂質メディエーター産生・保持組織と捉えることとした。また、食事の脂質が骨髄脂質メディエーターに与える影響も考慮するため、G-CSF 投与 (12 時間毎 8 回投与、期間的にはヒトへの臨床的投与と同様) の有無だけでなく G-CSF 投与 2 週間前から投与終了までの期間の食事を通常食と脂肪除去食の、全体で 4 群に分けて骨髄サンプルを過冷却メタノール法で採取し解析した。この解析により、1) 骨髄脂質は交感神経シグナルや食事の脂質欠乏によって顕著な影響を受けること、2) これらにより、特に ω 3 脂肪酸が選択的に減少し、 ω 6 脂肪酸は殆ど影響を受けないこと、3) 脂質欠乏食に交感神経シグナルが加わると、統計的には脂質欠乏食単独との差は有意ではないが、骨髄中の ω 3 脂肪酸は最も強く低下し殆ど枯渇してしまうこと、が明らかとなった。また、G-CSF 投与時の骨髄で圧倒的な major population となる CD11b⁺Ly6G^{du11}F4/80^{low} 幼

若好中球は、CD11b⁺Ly6G^{high}F4/80^{low} 成熟好中球とともに、同じ交感神経シグナルでも $\beta 1/\beta 2$ アドレナリン受容体を介して、脂質メディエーターをリガンドとして働く受容体型転写因子 PPAR δ を mRNA・蛋白の両レベルで増強する事が明らかとなった。そして、ここに食餌由来の $\omega 3$ 脂肪酸 (特に EPA が DHA よりも強力に作用) がリガンドとして働き、PPAR δ 下流で制御される分子の一つである Angiopoietin-like protein 4 (Angptl4) を高発現させ、この分子が骨髄血管透過性を抑制することで、G-CSF による動員が抑制されることを見出した (Suzuki, Katayama, *Haematologica*, in press)。

この成果は、我々の既報である、 $\beta 3$ アドレナリン受容体を介して交感神経刺激を受けた骨髄成熟好中球における mPGES-1 依存性 PGE₂ 一過性産生が、発熱や骨痛だけでなく、骨芽細胞系列の EP4 受容体に作用してオステオポンチンの発現を誘導する経路が血球のアンカーとなって動員抑制に働くこと (Kawano, Katayama, *Blood* 2017) と合わせると、脂質メディエーターと交感神経シグナルの共同作業による動員抑制機構の大きな流れを表していると考えられる。すなわち、交感神経シグナルの骨髄好中球

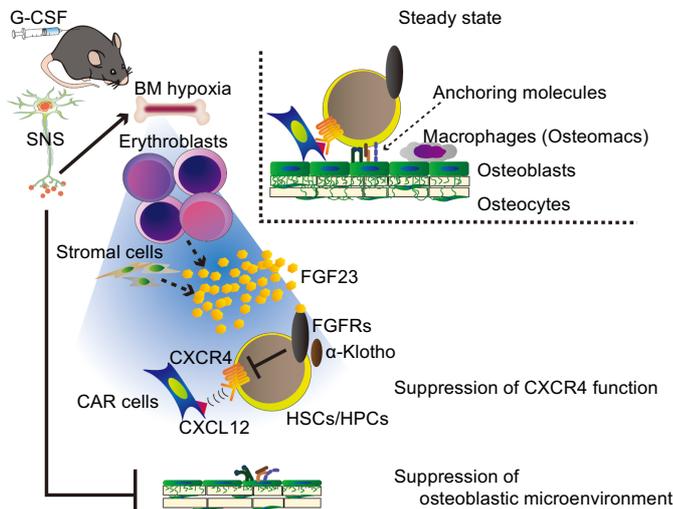
を介した間接作用で、PGE₂ を介した造血環境としての骨芽細胞保護と Angptl4 を介した骨髄血管透過性抑制の 2 経路で担われており、同じ好中球でも β アドレナリン受容体のクラスが目的によって使い分けられていることが明らかとなった (右上図)。



(2) 骨髄酸素濃度感知装置としての骨組織の評価

TRPA1 の発現を real-time PCR で確認したところ、骨組織で強い発現が認められた。すなわち、臓器とみなした場合の骨・骨髄組織における酸素濃度の変化は主に骨で感知されている可能性があると考えられる。TRPA1 ノックアウトマウスへの G-CSF 投与による動員実験では、再現性を持って動員効率が変化していることを捉えている。本研究は現在も継続中であり、今後骨髄移植によるキメラマウスを作成し、この動員効率変化が血球での TRPA1 欠損によるものかそれとも骨組織も含めた造血環境由来であるのかについて検討を進めていく。

一方、骨髄低酸素に引き続いておこる骨髄環境変化の研究の一環として、骨髄赤芽球から産生される因子による未分化造血細胞のケモカイン受容体機能制御機構を明らかにできた。G-CSF による未分化血球動員は、交感神経シグナルによる造血微小環境としての骨芽細胞系列の抑制により、未分化造血細胞が骨髄から遊離しやすくなるのが前提であった (Katayama, *Cell* 2006; Kawamori, Katayama, *Blood* 2010; Asada, Katayama, *Cell Stem Cell* 2013)。しかし、臨床的に G-CSF 投与での動員不全例にケモカイン受容体 CXCR4 のアンタゴニストである AMD3100 を追加投与すると動員効率が高まるため、G-CSF での動員には一部造血幹前駆細胞上の CXCR4 と骨髄内ストローマが強く発現する CXCL12 の間でのアンカーを阻害する生体内因子があると我々は予想していた。探索の結果、G-CSF による交感神経シグナルで骨髄内環境は低酸素状態となり、これが引き金となって骨髄内赤芽球から大量の fibroblast growth factor-23 (FGF23) が産生され、骨髄という特殊な閉鎖空間で定常時には殆ど測定できないレベルから G-CSF 投与後には末梢血の約 20,000 倍という超生理濃度にまで上昇することで、初めて FGF 受容体を介して CXCR4 の細胞内シグナルを抑制してその機能を阻害することを見出した (Ishii, Katayama, *Blood* 2021)。FGF23 全身性ノックアウトマウスや赤芽球を含む血球のみ FGF23 を産生できないキメラマウスを作成したところ、いずれも G-CSF による動員効率が著明に



著明に

抑制されていた。FGF23 は、従来ホルモンとして骨組織で産生され、腎臓で働きリンの再吸収を抑制することでリン濃度を一定に維持する重要な働きが知られていたが、骨髄から末梢血への血球動員に欠かせない因子でもあることを発見した。すなわち、動員促進機構は大きく捉えると、交感神経シグナルの直接作用による骨芽細胞系列をはじめとした骨髄造血環境抑制と間接作用による FGF23 の産生によるケモカイン受容体機能阻害の 2 段階で担われていることが明らかとなった（前ページ右下図）。

(3) 造血大環境破綻の造血器腫瘍進展における役割の解明

老化に伴うミエロイドバイアスをベースに発症する造血器ミエロイド系悪性腫瘍である MDS/白血病 のマウスモデル *vav-NUP98/HOXD13 Tg* マウスについては、搬入と繁殖を行い、*mPGES-1* ノックアウトマウスとの交配などを進め研究中であったが、動物実験施設の事情で本マウスに関する実験を一旦全て中止し改めて凍結胚から個体復元を行い、先日繁殖を再開できたところである。今後、これまで進めてきた実験を再度やり直す予定である。この際、上記(1) (2)で新しく得られた知見を元に、研究の方向性を微調整していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishii Shinichi, Suzuki Tomohide, Wakahashi Kanako, Asada Noboru, Kawano Yuko, Kawano Hiroki, Sada Akiko, Minagawa Kentaro, Nakamura Yukio, Mizuno Seiya, Takahashi Satoru, Matsui Toshimitsu, Katayama Yoshio	4. 巻 137
2. 論文標題 FGF-23 from erythroblasts promotes hematopoietic progenitor mobilization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1457 ~ 1467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2020007172	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Tomohide, Ishii Shinichi, Shinohara Masakazu, Kawano Yuko, Wakahashi Kanako, Kawano Hiroki, Sada Akiko, Minagawa Kentaro, Hamada Michito, Takahashi Satoru, Furuyashiki Tomoyuki, Tan Nguan Soon, Matsui Toshimitsu, Katayama Yoshio	4. 巻
2. 論文標題 Mobilization efficiency is critically regulated by fat via marrow PPAR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2020.265751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ishii S, Wakahashi K, Suzuki T, Kawano Y, Kawano H, Sada A, Minagawa K, Mizuno S, Takahashi S, Matsui T, Katayama Y
2. 発表標題 Erythroblasts facilitate progenitor mobilization via FGF23 production under neuronal control
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suzuki T, Ishii S, Shinohara M, Kawano Y, Wakahashi K, Kawano H, Sada A, Minagawa K, Matsui T, Katayama Y
2. 発表標題 Critical regulation of mobilization efficiency by fat via marrow PPAR (delta)
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔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			
シンガポール	Nanyang Technological Univ.			