

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790923

研究課題名(和文)

骨髄抑制ストレス時の生体防御機構の解明

研究課題名(英文)

Host defense against myelo-suppressive stress

研究代表者

宮本 佳奈 (MIYAMOTO KANA)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：60464997

研究成果の概要(和文)：

造血幹細胞を生涯にわたって維持すること、また骨髄で産生された造血前駆細胞を末梢へ動員することは、生命を維持するうえで極めて重要である。造血ならびに造血幹細胞の維持には骨髄腔が必要であること、骨髄腔の形成ならびに骨髄系細胞の末梢への動員には骨を吸収する破骨細胞が必須であるとされている。本研究では、造血幹細胞の維持ならびに骨髄系細胞の末梢への動員のどちらにおいても、骨髄腔および破骨細胞とも必須ではないことを見出した。

研究成果の概要(英文)：

The maintenance of haematopoietic stem cells and mobilization of haematopoietic progenitor cells to the periphery is very important for lives. It was reported that bone marrow cavities and osteoclasts are required for maintenance of haematopoietic stem cells and mobilization of bone marrow cells to periphery, respectively. In this study, we found that bone marrow cavities and osteoclasts were both dispensable for the maintenance of haematopoietic stem cells and mobilization of bone marrow cells to periphery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：血液内科学

## 1. 研究開始当初の背景

生体では生命ならびにその恒常性を維持するために十分な血液をまかなうため、骨髄において常に新たな血液細胞を供給するための造血と、生涯を通じて造血を行い続けるための造血幹細胞の維持が平行して行われていることから、骨髄腔は造血幹細胞の維持および骨髄細胞の末梢への供給の両面において必須と考えられた。骨髄腔ではいわゆるニッチを発達させ、骨芽細胞や血管内皮などの様々な細胞種や、それらの細胞が産生する因子が造血幹細胞の維持に必須であること

が多くの論文により報告されている。また、破骨細胞の分化又は機能不全によっては骨髄腔の形成が出来ないこと、また破骨細胞の活性は造血前駆細胞を末梢へ動員するために必須であることも報告されている。しかし、一方で破骨細胞の活性は造血前駆細胞の末梢への動員には必要ないとする報告もあり、相反する意見が併存する状況であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、破骨細胞の分化が起こらず、したがって骨髄腔の形成が全く起こらない

マウスを用いて、造血幹細胞の維持に骨髓腔が必須であるかを検証することを目的とする。また、破骨細胞は造血前駆細胞の末梢への動員にも必須であることが報告されており、破骨細胞が形成されないマウスにおける、末梢への造血前駆細胞の供給状況についても解明することとした。

### 3. 研究の方法

破骨細胞分化が障害されているマウスモデルとして、*op/op* マウス、RANKL 欠損マウスならびに c-Fos 欠損マウスの3種類のマウスを用いる。これらのマウスは破骨細胞の形成障害により骨髓腔が形成されない。造血幹細胞はその機能維持のため細胞周期が静止期に維持されており、このことにより細胞周期特異的な抗癌剤である 5-fluorouracil (5-FU) に耐性であることが知られている。そこで、5-FU の投与により造血幹細胞の機能評価を行う。また、造血前駆細胞を末梢へ動員させる方法として G-CSF の連続投与が知られており、実際臨床においても末梢血幹細胞移植の際に末梢へ造血前駆細胞を動員するのに用いられている。そこで、末梢への造血前駆細胞の動員能を評価するため、G-CSF 連続投与を行う。末梢への造血前駆細胞は、フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原による造血前駆細胞の同定の他、コロニー形成能および致死量放射線照射マウスへの移植による骨髓再建能によって機能的にも評価する。人為的に破骨細胞機能を抑制するため、ビスフォスフォネート製剤の1つであるアレンドロネートと、破骨細胞形成に必須のサイトカインである RANKL に対する中和抗体を用いる。

### 4. 研究成果

*op/op* マウスに 5-FU を投与したところ、*op/op* マウスはコントロールマウスに比べて 5-FU に対して極めて感受性が高いことが示された (図1)。このことは、骨髓腔あるいは破骨細胞が造血幹細胞の維持に極めて重要な機能を有することを示唆している。

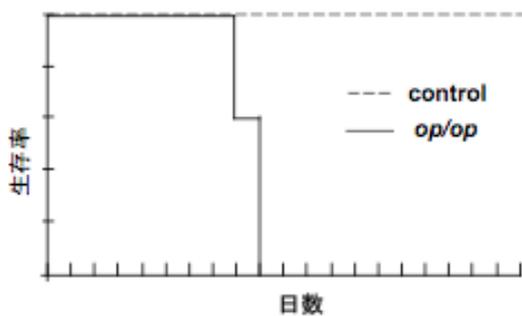


図1 5-FU投与後の死亡率

そこで、さらに *op/op* マウスにおける造血

維持能と末梢への造血前駆細胞の動員能を解析するため、*op/op* マウスに対して連続 G-CSF 投与したところ、予想に反してコントロールマウスよりもむしろ末梢への造血前駆細胞の動員が亢進することがフローサイトメトリーを用いた Lineage-negative, Sca-1-positive, c-Kit-positive (LSK) 細胞の出現率や、コロニー形成能、移植による長期骨髓再建能によって確認された。このことは、*op/op* マウスでは造血前駆細胞の維持がむしろコントロールより良いことを示しており、造血前駆細胞の維持や末梢への動員には破骨細胞を必要としないことを示唆している。

そこで、次に破骨細胞が全く分化できず、骨髓腔も形成されないモデルマウスとして c-Fos 欠損マウスならびに RANKL 欠損マウスの解析を行うこととした。これらのマウスモデルでは、骨髓腔が形成されないことを確認した (図2、3)。

興味深いことに、c-Fos 欠損マウスおよびコントロール



c-Fos欠損



図2 c-Fos欠損マウスのマイクロCT解析

RANKL 欠損マウスとも、*op/op* マウスに比べて 5-FU への感受性は高くなく、5-FU への感

コントロール



RANKL欠損



図3 RANKL欠損マウスのマイクロCT解析

受性の高さは骨髓腔や破骨細胞が形成されないことによるものではないことが明らかとなった。5-FU への感受性は *op/op* マウスで欠損している M-CSF というサイトカインによるものであると推察された。続いて、*c-Fos* 欠損マウスならびに RANKL 欠損マウスを用いて G-CSF 連続投与による造血前駆細胞の末梢への動員能について解析したところ、*op/op* マウスと同様にコントロールマウスに比べて末梢への動員能が欠損マウスの方で亢進していたことから、骨髓腔は少なくとも造血前駆細胞の維持には必要なく、また破骨細胞も造血前駆細胞の維持や末梢への動員に必須ではないことが明らかとなった。

破骨細胞分化が障害されたマウスモデルでは全て造血前駆細胞の末梢への動員が亢進していたことから、最後に人為的な破骨細胞の抑制により末梢への造血前駆細胞の動員を増やすことができるか、という点について解析を行った。破骨細胞分化を抑制する薬剤としてビスフォスフォネートの1つであ

るアレンドロネートと破骨細胞分化に必須のサイトカインである RANKL に対する中和抗体を投与したところ、良好な骨量の増加を認めた (図4)。この破骨細胞阻害剤投与マウスを用い、破骨細胞抑制条件下で G-CSF 連続投与による造血前駆細胞の末梢への動員能を解析したところ、やはり動員の阻害は起こらず、むしろわずかではあるものの増加したことから、破骨細胞は末梢への造血前駆細胞の動員において必要でないとともに、むしろネガティブな機能を有することが示唆された。

コントロール



破骨細胞阻害剤投与



図4 破骨細胞阻害剤投与マウスのマイクロCT解析

#### 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)Miyuchi Y, Ninomiya K, Miyamoto H, Sakamoto A, Iwasaki R, Hoshi H, Miyamoto K, Hao W, Yoshida S, Morioka H, Chiba K, Kato S, Tokuhisa T, Saitou M, Toyama Y, Suda T, Miyamoto T. The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis. J Exp Med. 査読有、207(4), 2010. 751-762.

(2)Miyamoto K, Ninomiya K, Sonoda K, Miyuchi Y, Hoshi H, Iwasaki R, Miyamoto H, Yoshida S, Sato Y, Morioka H, Chiba K, Egarashi K, Suda T, Toyama Y, Miyamoto T. MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner. Biochem Biophys Res Commun. 査読有、383, 2009. 373-377.

〔学会発表〕（計2件）

(1)第72回日本血液学会学術集会 平成22年9月24-26日 パシフィコ横浜  
Osteoclasts as negative regulators of the hemaopoietic microenvironment. Kana Miyamoto, Yoshiaki Toyama and Takeshi Miyamoto.

(2)第71回日本血液学会学術集会 平成21年10月23-25日 国立京都国際会館 MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner. Kana Miyamoto, Takeshi Miyamoto, Toshio Suda and Yoshiaki Toyama.

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

宮本 佳奈 (MIYAMOTO KANA)  
慶應義塾大学・医学部・研究員  
研究者番号：60464997

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし