

令和元年5月15日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19660

研究課題名(和文) 内分泌器官としての骨髄の評価とその神経支配の解明

研究課題名(英文) Evaluation of bone marrow as an endocrine organ governed by the nervous system

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：通常骨組織で産生されるリン代謝ホルモンとして知られるFGF-23が、骨組織のみでなく骨髄でも交感神経シグナルを受けて産生される。骨髄血球のうち主たる産生細胞は赤芽球の可能性が高い。骨髄造血細胞でFGF-23を産生できない状態のマウスではG-CSFによる造血前駆細胞動員が非常に強く抑制される。すなわち血球産生ホルモンが神経シグナルの支配下で骨髄局所では未分化造血細胞の移動を制御している可能性を見いだした。また、骨髄細胞由来FGF-23がホルモンとして全身性に老化形質阻止の波及効果を及ぼすかどうかについては、その端緒のデータは得られているものの、確定できるところまでは至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究による新知見は、骨髄局所では造血幹前駆細胞の動員制御という臨床現場で行われている医療の改善に直結する可能性のあるものである。また、通常骨組織産生ホルモンと思われていた因子が、神経シグナル誘導性に別の臓器で強発現し、局所のみならず全身へその効果を波及させる可能性を追求しており、これが確立できればこれまでのホルモンの概念を大きく変えることができ、定常状態ではなく誘導性ホルモンという生理的概念が生まれる学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：FGF-23 is produced by bone tissue and is well known as a hormone to regulate the phosphate metabolism. We found that FGF-23 is inducible in the bone marrow (BM) erythroblasts by the sympathetic tone. G-CSF-induced hematopoietic progenitor mobilization is strongly suppressed in mice with FGF-23-deficient BM. In other words, blood-derived humoral factor facilitates immature hematopoietic cell trafficking from the BM to the circulation under the control of nervous system. It has not been confirmed yet if BM-derived FGF-23 controls the general phenotype of senescence. I will continue these researches to re-define the BM as an endocrine organ.

研究分野：血液学、造血細胞移植学、骨代謝学

キーワード：骨髄 内分泌臓器

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

本来骨髄では、造血幹細胞から全ての血球が分化増殖することで一定の血球数を保ち、また感染症や出血など緊急時には必要に応じた血球の一時的増産が速やかに遂行される。これらの反応の多くは、骨髄内での造血環境細胞群（血管内皮細胞、間葉系幹・前駆細胞（ストローマ）、骨芽細胞など）から分泌ないしは産生細胞表面に提示されるサイトカインやケモカインの局所での働きが大きいと理解されている。すなわち、血球の恒常性維持は周囲細胞からの液性因子も含めた影響で調整されており、この造血支持の場は骨髄での造血ニッチともよばれる。しかし、その逆に骨髄血球由来で、しかも骨髄局所、更には血流によって全身にもその効果を波及させている可能性のある因子については報告がなかった。しかし、我々の最近の研究で、骨髄交感神経シグナルに刺激された骨髄成熟好中球が脂質メディエーターである prostaglandin E2 を産生し、骨髄局所で造血ニッチを保護修復に働くと同時におそらく末梢循環を通して中枢神経に到達し全身性発熱を引き起こすことを報告している（Kawano, Katayama et al. Blood 2017）。

それに引き続き、最近我々は、同様に骨髄血球由来の可能性のあるホルモンを特定した。それが fibroblast growth factor-23 (FGF-23) である。一般的に知られている FGF-23 についての情報は、骨組織内に埋没して存在する骨芽細胞系列最終分化段階である骨細胞が産生し、共役受容体 α -Klotho の存在下で腎でのリンの再吸収を抑制し、その血中濃度を下げる働きを持つ、とされている。既に、抗FGF-23 抗体がヒト遺伝性低リン血症性くる病の治療薬として開発されており、臨床的にも非常に注目度の高い分子である。FGF-23、 α -Klotho いずれのノックアウトマウスも、生後数週のうちに突然始まる胸腺萎縮によるリンパ球数低下、脂肪量の急速な低下に伴う体重減少、骨粗鬆症の進行、生殖能の喪失、毛並みの艶の低下や全体的な動きの鈍さなどの早期老化に特徴的な症状を呈し、10 週齢を待たずに死に至る個体も多いことは内分泌内科や腎臓内科関連の研究者の間では特によく知られている。このホルモンの mRNA が骨組織ではなく骨髄で検出できる条件を我々は見いだした。すなわち、条件によっては骨髄はリン代謝ホルモンである FGF-23 を産生する能力を有しているということである。

2. 研究の目的

本研究では、造血組織として認識されている骨髄を内分泌臓器と捉え、そこから分泌された液性因子が骨髄そのもの、更には遠隔臓器や全身に及ぼす影響について明らかにすることを目的とする。具体的には、腎でのリンの再吸収を抑制し、その血中濃度を下げる働きを持つ FGF-23 の骨髄血球からの産生と骨髄や全身への寄与についてマウスモデルを用いて詳細に解析する。

3. 研究の方法

FGF-23 ノックアウトマウスと FGF-23^{fllox} マウスをゲノム編集技術を用いて作成した。野性型マウスとこれらを用いて *in vivo* における FGF-23 の mRNA/蛋白発現の変化と全身性ないしは組織特異的に FGF-23 を欠損したマウスでの骨髄機能、全身の老化形質の出現について検討した。骨髄への交感神経シグナル負荷には顆粒球コロニー刺激因子 G-CSF による造血幹細胞動員を用いた。また、野性型骨髄を FGF-23 ノックアウトマウスに移植することで、老化形質の回復が得られるかどうか検討した。

4. 研究成果

(1) 骨髄局所での検討

まず、野性型マウスを用いて定常状態での FGF-23 の発現を RT-PCR 法で検討したところ、既報のように骨組織では非常に高い mRNA 発現が認められたが、同じマウスの骨髄細胞では殆ど発現をみとめなかった。これは骨髄細胞外液の ELISA でも同様であり、定常状態では殆ど蛋白レベルでも捉えられなかった。G-CSF を投与すると 1-2 時間という短時間で骨髄での FGF-23 mRNA が非常に強く定常状態の骨組織と同程度まで上昇してくること、一日 2 回の G-CSF 連日投与により 8 回目の投与後造血前駆細胞の末梢血への動員が強くなった時点では骨髄での FGF-23 蛋白も非常に強く発現しており、骨髄細胞外液採取時の高度な希釈を考慮すると、in vivo では末梢血中にホルモンとして巡っているものよりも格段に高い濃度が骨髄に放出されていることが明らかとなった。

G-CSF や交感神経シグナルを mimic する汎 β アドレナリン受容体アゴニストであるイソプロテレノールを野性型マウスに 1 回投与した後の骨髄での FGF-23 mRNA の上昇がどの細胞種に由来するものかをセルソーターを用いて各種細胞を分取し検討したところ、CD45 陰性 Ter119 陽性の赤芽球が主たる mRNA 発現誘導を起こした集団であった。現在、赤芽球を更に Ter119 と CD71 を用いて prospective に分取し、mRNA 発現とその細胞集団からの in vitro FGF-23 蛋白放出様式について詳細に検討中である。

次に、FGF-23 ノックアウトマウスに G-CSF を一日 2 回、計 8 回投与で造血前駆細胞の骨髄から末梢血への動員実験を行った所、非常に強く動員が抑制されていた。これは、FGF-23 ノックアウトマウスの骨髄を放射線照射した野性型マウスに移植して作製したキメラマウスに G-CSF を投与することでも動員抑制の再現が確認され、骨髄造血細胞（おそらく赤芽球）からの FGF-23 産生が動員には必須であることが確定した。FGF-23flox マウスと DMP-1-Cre マウスとの交配により、骨組織に埋もれた骨細胞（従来より FGF-23 の主要産生細胞とされている）特異的な FGF-23 ノックアウトマウスを作製して G-CSF による動員実験を行ったが、これでは動員は抑制されず、むしろ若干動員効率が良くなる傾向が得られた。

以上より、交感神経シグナルをうけた骨髄赤芽球は FGF-23 を産生し、それが動員には必須であることが明らかとなった。現在骨髄で増加した FGF-23 が具体的にどのように働いて動員を促進するのかについて検討中である。

(2) 全身性の影響の検討

野性型骨髄を FGF-23 ノックアウトマウスに骨髄移植すると、赤芽球を含めた造血細胞のみでしか FGF-23 を産生できないマウスができあがる。このマウスを長期に飼育することで、通常の FGF-23 ノックアウトマウスで見られる早期老化形質について観察を行った。FGF-23 ノックアウトマウスは生後 2.5 週~3 週頃から成長が弱くなり、全身性の早期老化形質が出現してくる。通常の骨髄移植はレシピエントが十分育って放射線照射に耐えられるようになる生後 6 週程度で行うことが多いが、できるだけ老化形質が完成してしまう前に移植を行うことを目的としてまず生後 5 週で移植を行った。餌や水分摂取の工夫で非常に多くの移植実験のうち数匹は生後 10 週以上の長期に生き残ったが、大半は移植後早期に死亡した。生き残ったマウスは体は小さいが通常の 9-10 週例の FGF-23 ノックアウトマウスよりも毛のつやがよく動きが機敏なものの中にはいたものの、生き残る数が少なく、末梢血中の FGF-23 やリン濃度を複数検討する

までには至っていない。現在、安定的に長期生存が可能となる移植法を検討中である。もう少し安定的に長期生存個体が得られるようになれば、特に末梢血中の FGF-23 やリンだけでなく、骨髄での赤芽球動態も含めた骨髄の内分泌臓器としてのシステムの変容について検討して行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

石井 慎一、Erythroblasts facilitate progenitor mobilization via FGF23 production under neuronal control、第 80 回日本血液学会学術集会、2018 年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

該当無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

該当無し

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。