

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390251

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)Assessment of bone tissue as a central regulator for 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) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織内骨細胞の造血システムに及ぼす影響を、骨細胞特異的にジフテリア毒素受容体を発現させた DMP1-DTR Tg マウスにジフテリア毒素を投与することで骨細胞除去マウス(osteocyte-less (OL) mouse)を作成し、骨細胞破綻による造血幹ニッチや遠隔臓器への影響を検討した。その結果、骨細胞は、骨髄内では骨芽細胞ニッチへサポートシグナルを送っていること、これが神経シグナルで調整されていることが明らかとなった。また、骨細胞は胸腺など一次リンパ組織の環境を制御し、さらに全身の脂肪代謝も司っていることが判明した。本研究により骨組織を頂点とする多臓器連関の構図が見えて来た。

研究成果の概要(英文)：Osteocytes are a major cell component in the bone tissue. We utilized DMP1-DTR Tg mouse model, in which diptheria toxin receptor (DTR) is specifically expressed in osteocytes and diptheria toxin injection induces the generation of osteocyte-less (OL) mouse, to reveal the the function of osteocytes for bone marrow niche and remote organs. We found that osteocytes send a supporting signal to osteoblastic niche and this pathway is controlled by the sympathetic nervous system. Furthermore, we showed that osteocytes regulate primary lymphoid organs such as thymus and fat metabolism. Our study proposes "the bone pinnacled functional orchestration of multiple organs".

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：骨細胞

1. 研究開始当初の背景

造血の場である骨髄は骨組織で覆われている。従来の研究で明らかにされてきた骨代謝関連細胞と造血の関係は、骨髄内骨辺縁の骨芽細胞が造血幹細胞ニッチの一つであることを中心に研究されていた。しかし、骨と造血の生理的関連は単に骨髄との接地面のみで営まれているのではなく、接地面から離れた骨組織内部からの直接的または間接的な影響は全く知られていなかった。

2. 研究の目的

骨髄内骨辺縁の骨芽細胞・破骨細胞に加え、骨組織構成細胞の大多数を占める「骨細胞」に注目し、骨細胞を含めた骨組織全体が神経や内分泌領域など多臓器との関連の中で、いかに骨髄造血システムを制御しているかを明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

骨細胞特異的にジフテリア毒受容体を発現させたトランスジェニックマウス DMP1-DTR Tg にジフテリア毒を投与することで骨細胞除去を行ったのち、骨髄造血システムの変化、造血幹・前駆細胞の骨髄から末梢血への動員効率の変化、交感神経システムと骨細胞の関係、リンパ造血システムへの影響、またその他遠隔臓器への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) サイトカイン G-CSF 投与による造血幹・前駆細胞動員における骨細胞の役割

野生型マウスに G-CSF を 12 時間おきに 8 回投与することで、造血幹・前駆細胞の骨髄から末梢血への強い動員がおこるが、この過程において、どの段階で骨芽細胞特異的遺伝子と骨細胞特異的遺伝子に変化がおきるかについて、骨組織での定量的 PCR で調べたところ、骨芽細胞特異的遺伝子は動員直前の 6 dose あたりから低下を示すが、骨細胞特異的遺伝子ははじめの 1 dose の 3 時間後に低下しており、G-CSF による刺激が骨芽細胞よりも先に骨細胞に影響を与えていることがわかった。これは、G-CSF 1 dose 投与後の骨組織を酵素処理して骨細胞を単離しての PCR でも確認できた。更に、G-CSF を 8 dose 投与すると、骨細胞は形態的に変化し、多数の細い細胞質で隣の骨細胞や骨辺縁の骨芽細胞と連絡している部分が萎縮して途切れることが観察された。G-CSF 投与により引き

起こされるこれらの現象は G-CSF に刺激された交感神経から放出されたカテコラミンによるものと考えられた。なぜなら、骨細胞に $\beta 2$ アドレナリン受容体が発現していることが免疫染色で認められ、外科的神経切除術を行うことによって、G-CSF にともなう骨細胞遺伝子低下がみられなくなったからである。

実際に骨細胞が造血幹・前駆細胞動員に必須であるかどうかを確かめるため、DMP1-DTR Tg にジフテリア毒を投与し、骨細胞除去マウス (osteocyte-less (OL) mouse) を作製し、G-CSF を投与したところ、造血幹細胞も造血前駆細胞もほとんど動員されず、骨髄内に留まっていた。この現象は、骨細胞除去に引き続いて、骨辺縁のオステオカルシン陽性骨芽細胞も著明に低下するため、骨細胞から骨辺縁の骨芽細胞へのサポートシグナルが途絶えていることが考えられた。

また、骨細胞除去により、骨髄中のケモカイン CXCL12 が上昇し、造血幹細胞の細胞周期がより静止期に留まりやすくなる現象も認められた。更に、骨細胞除去により、骨辺縁のマクロファージが減少することも明らかとなった。すなわち、骨組織中の骨細胞は骨髄中の複数の細胞集団の機能や位置取りを制御していることが考えられた。

骨粗鬆症を呈する Klotho hypomorphic (kl/kl) マウスでは、骨組織中骨細胞のネットワークが破綻しており、このマウスでの G-CSF 造血幹・前駆細胞の動員は著明に抑制されていた。

以上より、G-CSF 投与時は、① 興奮した交感神経から放出されるカテコラミンにより $\beta 2$ アドレナリン受容体を発現した骨芽細胞が直接抑制シグナルを受ける従来の経路に加え、② $\beta 2$ アドレナリン受容体を発現した骨組織内骨細胞が抑制シグナルを受け、骨芽細胞や骨髄内マクロファージへのサポートシグナルを減らすこと、更に③ G-CSF による直接抑制と骨細胞からのサポートシグナルの減弱によるマクロファージの破綻とそこから骨芽細胞へのサポートシグナルの減弱、の三つの異なる経路による骨芽細胞ニッチの強力な抑制により動員がおこることが明らかとなった。

(2) 骨細胞による遠隔多臓器連関

寝たきりの高齢者と宇宙飛行士は体全体にかかる重力シグナルが少ないという共通点がある。臨床的には、いずれの場合も骨粗鬆症と免疫異常という臨床的特徴を呈する。すなわち、重力シグナルが骨組織の恒常性や免疫を保つシグナルになっている可能性があり、重力シグナルを感知する骨細胞がこれらを担う要となっている可能性を探った。

尾部懸垂により後ろ足のみ荷重がかからなくすると、この部分の骨組織内骨細胞ネットワークは破綻し、その部分の骨髄中の B

細胞は著明に減少していた。ところが、前足は地上に着いているため全身的な荷重除去ではなく、末梢血のB細胞を含めた血球数は全て正常であった。これは、低荷重における骨細胞破綻と局所リンパ球造血不全が関連していることを示している。

骨細胞とリンパ球造血の関係を探るため、DMP1-DTR Tg を骨代謝がほぼ平衡となる15週齢でジフテリア毒を投与しOLマウスを作成した。OLマウスでは骨細胞ネットワークの破綻に伴い、末梢血中のB/Tリンパ球の減少、胸腺の著明な萎縮、脾臓の萎縮が見られた。骨髄球系の細胞の低下は認められず、リンパ球系特異的な減少であった。このマウスを約3ヶ月間そのまま飼育していると、骨細胞の再生とともにこれらリンパ球数は回復するため、骨細胞との関連が強く示唆された。

Bリンパ球の一次リンパ臓器は骨髄である。OLマウスの骨髄では、免疫グロブリン陰性のBリンパ球前駆細胞が著明に減少していた。分化段階を詳細に解析すると造血幹細胞や共通リンパ球前駆細胞といった非常に未分化な部分は大きな減少は見られなかったが、pro-B細胞と呼ばれる骨髄支持細胞依存的な細胞集団をはじめとした減少であることが明らかとなった。一方骨髄球系の前駆細胞数は正常であり、この異常がやはりリンパ球造血特異的なものであることが再確認された。次に、Bリンパ球造血を培養で再現できる長期骨髄培養を行った。野生型マウスの骨髄からは6週間以上の長期にわたるBリンパ球造血を造血支持細胞とともに培養皿の中で再現できるが、OLマウスの骨髄からはB細胞は産生されず、培養皿底面の付着系細胞もフローサイトメトリーの解析で本来B細胞造血をサポートするはずの間葉系細胞が野生型の培養では30-40%認められるものの、OLマウスの培養ではほぼ消失していた。一方、骨髄球系の長期培養では野生型、OLマウスいずれからも、長期に骨髄球系前駆細胞の産生をサポートする間葉系支持細胞が同じように確認できた。すなわち、骨細胞を除去したOLマウスの骨髄では、B細胞特異的にサポートする間葉系支持細胞が欠落していることが明らかとなった。

次に、Tリンパ球の一次リンパ組織である胸腺の解析を行った。OLマウスでは胸腺は著明に萎縮するが、免疫染色ではこれはKeratin8を発現する胸腺皮質間葉系支持細胞の減少によるものであった。すなわち、骨髄でのBリンパ球造血同様、血球そのものではなく環境側の異常に起因することが示唆された。これを確認するため、2匹のマウスの側腹部を手術でつなぎ、側腹血行路を介した血流の共有させたパラバイオーシスモデルを用いた。野生型とDMP1-DTR Tgの2匹をパラバイオーシスとし、両者にジフテリア毒を投与することにより、DMP1-DTR TgのみOLマウスとなるも、血流は野生型と共有されている状態ができあがる。このモデルでは、血

行性の液性因子（ホルモンなど）やT細胞細胞も隣のマウスに移動できる。OLマウス由来のT細胞前駆細胞は野生型マウスの胸腺で正常に分化することができたが、野生型マウス由来のT細胞前駆細胞はOLマウスの胸腺で分化増殖ができなかった。すなわち、骨細胞除去をすることで骨組織とは明らかに離れた遠隔臓器である胸腺の環境が異常となること、それがパラバイオーシスで血行性に供給される因子ではない可能性が示唆された。

また我々は、OLマウスではリンパ球のみでなく、全身の白色脂肪が急速に失われることも見いだした。失われた脂肪は決して肝臓に貯留しているわけではなく、むしろ肝臓内の脂肪も減少している傾向にあった。視床下部の摂食中枢を化学的に破壊することで過食となり、非常に脂肪層の厚いマウスでも骨細胞除去により同様に皮下脂肪等は消失したが、この場合は肝臓が著明な脂肪肝となった。遺伝子解析より、摂食中枢の破壊そのもので肝臓での脂肪クリアランスを司る遺伝子の発現が抑制されていたため、肝での脂肪排出機能異常が原因の一つと考えられた。これらから、骨細胞は全身の脂肪の適切な保持に必須の役割を果たしており、脳と協調して肝での脂肪貯留の調整を行っていることも明らかとなった。

以上のことから、骨組織内骨細胞は、隣接している骨髄のみでなく、胸腺、脂肪、肝臓といった遠隔臓器をも機能的に調整している、すなわち「骨を頂点とした多臓器連関」の構図が見えて来たわけである。

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 Sato M, Asada N, Kawano Y, Wakahashi K, Minagawa K, Kawano H, Sada A, Ikeda K, Matsui T, Katayama Y. Osteocytes regulate primary lymphoid organs and fat metabolism. *Cell Metab.* 2013, 18: 749-58. doi: 10.1016/j.cmet.2013.09.014.

② Asada N, Katayama Y, Sato M, Minagawa K, Wakahashi K, Kawano H, Kawano Y, Sada A, Ikeda K, Matsui T, Tanimoto M. Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Stem Cell.* 2013, 12: 737-47. doi: 10.1016/j.stem.2013.05.001.

〔学会発表〕（計 2 件）

① Mari Sato, Noboru Asada, Kentaro Minagawa, Yuko Kawano, Hiroki Kawano, Kanako Wakahashi, Akiko Sada, Kyoji Ikeda, Toshimitsu Matsui, Yoshio Katayama.

Osteocytes in the homeostasis of remote organs (Oral session, Young Investigator Award). American Society for Bone and Mineral Research 2012 Annual Meeting, 2012 年 10 月 13 日 米国ミネアポリス

② Noboru Asada, Yoshio Katayama, Mari Sato, Kentaro Minagawa, Kanako Wakahashi, Hiroki Kawano, Yuko Kawano, Akiko Sada, Kyoji Ikeda, Toshimitsu Matsui, Mitsune Tanimoto.

Osteocytes embedded inside bone are essential for G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor mobilization (Oral session, Abstract Achievement Award). 53th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, 2011. 2011 年 12 月 12 日 米国サンディエゴ

〔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：