

受賞対象論文

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, 737-747.

浅田 騰
Noboru Asada

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 血液・腫瘍・呼吸器内科学, アルバートアインシュタイン医科大学 細胞生物学部門

Department of Hematology, Oncology and Respiratory Medicine, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Department of Cell Biology, Albert Einstein College of Medicine



<プロフィール>

昭和53年生まれ

平成15年3月 岡山大学医学部医学科卒業

平成15年4月 亀田総合病院 初期研修医

平成17年4月 亀田総合病院 血液腫瘍内科

平成19年6月 岡山大学医学部・歯学部附属病院 血液・腫瘍内科 医員

平成20年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程入学

平成20年6月～平成21年3月 神戸大学医学研究科 血液内科学分野 (内地留学)

平成21年11月～平成22年3月 神戸大学医学研究科 血液内科学分野 (内地留学)

平成23年8月 岡山大学病院 輸血部 医員

平成25年9月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程修了

Albert Einstein College of Medicine, Dr. Paul S. Frenette laboratory, Research fellow

現在に至る

研究の背景と経緯

血液細胞は、我々を構成する細胞のうちで最もダイナミックに移動する細胞であり、生命の維持に不可欠な臓器である。この血液細胞を終生にわたり産生するのが、骨の中にある実質臓器である骨髄であり、すべての血液細胞の元となる造血幹細胞（以下 HSC）は、骨髄の中にランダムに存在するのではなく、“ニッチ”と呼ばれる特別な居場所にいることが知られている。HSC は普段はニッチにいて活動しているが、サイトカインの一種である顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）を大量に投与することにより HSC をニッチから引き離し、末梢血液中に誘導することができる（動員という現象）。臨床現場ではこの方法により HSC を採取する末梢血造血幹細胞採取が広く行われているが、そのメカニズムについては完全には解明されていない。ニッチを構成する細胞のうち、骨内膜にある骨を形成する細胞である骨芽細胞は最も古くから研究されており、G-CSF による造血幹/前駆細胞（以下 HSPC）の動員メカニズムに関与することが知られている。また、

骨内膜周辺で骨吸収を担う破骨細胞も G-CSF による動員に関与することが示唆されている。このように、骨内膜に存在する骨関連細胞が G-CSF による動員メカニズムに関与することが知られている。しかし、骨内膜からさらに骨側、骨組織の内側に存在する骨細胞の血液細胞へ与える役割はこれまでに研究されていなかった。硬い骨組織に埋もれて存在する骨細胞はアプローチの難しさから、その機能は長い間明らかにされて来なかった。しかしながら、最近の研究技術、手法の進歩により、骨細胞は骨組織の中で緻密かつダイナミックなネットワークを形成し、重力を始めとした骨への荷重の感知、骨リモデリングの調節、さらにはカルシウムやリンといった体内ミネラルバランスの調節など、生体内で多くの重要な役割を担っている事がわかってきている¹⁾。本研究では、骨細胞の G-CSF による造血幹細胞動員メカニズムにおける役割を通して、その造血制御への関与を検討した。

研究成果の内容

1. G-CSF 投与による骨細胞の抑制

これまでに、G-CSF 投与により骨芽細胞が抑制されることが知られており、はじめに、G-CSF 投与による骨細胞の変化を遺伝子発現解析で検討した。野生型マウスに G-CSF を12時間おきに8回投与し、1, 2, 4, 6, 8回投与後に大腿骨を採取し、骨髓を取り除いた骨組織を用いて、骨芽細胞と骨細胞関連遺伝子の変化を解析したところ、骨芽細胞は、6回あるいは8回投与後に抑制されるのに対し、骨細胞は、1回投与後という極早期の段階で抑制されていた。次に、骨芽細胞と骨細胞をより明確に分離するため、G-CSF を1回投与したマウスの骨組織をコラゲナーゼと EDTA で処理し、骨芽細胞分画と骨細胞分画に分離した上で、それぞれの分画での G-CSF による遺伝子変化を解析した。G-CSF 投与初期の段階で、骨芽細胞分画では遺伝子の抑制はみとめなかった。しかしながら、骨細胞分画では骨細胞関連遺伝子の抑制をみとめた。また、ファロイدينを用いた染色により、骨組織内の骨細胞ネットワークが非常に美しく描出できることが報告されており²⁾、G-CSF による骨細胞の形態学的な変化を捉えるため、G-CSF 投与後の骨組織のファロイدين染色を行った。これにより、G-CSF 投与は、骨細胞から出る細胞突起の著明な抑制を引き起こすことがわかり、この変化は骨の深部にある骨細胞よりも骨内膜に近い骨細胞でより顕著に見られることも明らかになった。

2. 骨細胞は交感神経による調節を受ける

G-CSF 投与は交感神経を興奮させ、交感神経より放出されたカテコラミンが骨芽細胞上の $\beta 2$ アドレナリン受容体を介して骨芽細胞を抑制することによりニッチ機能の破綻を招き、動員が起こることが知られている³⁾。G-CSF 投与による骨細胞の変化への交感神経系の関与を確かめるため、まず始めに、骨髓内での tyrosine hydroxylase (TH) 陽性の交感神経線維の分布を免疫染色で検討したところ、骨内膜周辺まで TH 陽性交感神経線維が分布しており、骨内膜に近い骨細胞は骨芽細胞同様 $\beta 2$ アドレナリン受容体を発現していた。G-CSF 投与により生じる骨細胞関連遺伝子の変化が、交感神経シグナルにより生じているかどうかを調べるため、外科的に交感神経切除を施したマウスにおいて G-CSF 投与における骨細胞関連遺伝子変化を

解析した。Sham-operation を施した骨では G-CSF 投与による骨細胞遺伝子の抑制がみられた。しかしながら、神経切除した骨では G-CSF による骨細胞遺伝子の抑制をみとめなかった。以上より、骨細胞は交感神経シグナルを受けて G-CSF による HSPC の動員を制御している可能性が考えられた。

3. 骨細胞を除去したマウスでは G-CSF による動員が障害される

G-CSF による HSPC における骨細胞の役割を直接検討するため、生体内で骨細胞を特異的に除去できる DMP-1-DTR トランスジェニックマウスを用いて、骨細胞が少ない osteocyte less (OL) マウスでの G-CSF による動員効率を検討した。OL マウスでは、骨髓内の HSPC の数に変化は認めなかったが、G-CSF による動員は著しく障害されていた。すなわち、正常な骨細胞が無いと HSPC は骨髓から末梢血へ出て来れないのである。動員は HSPC が骨髓から離れる現象である。これとは逆のプロセスであるホーミングにおける骨細胞の役割を検討するため、致死放射線照射した OL マウスと野生型マウスに骨髓細胞を経静脈的に移植し、3時間後に骨髓を採取して、どれだけの HSPC がホーミングしたかを比較した。その結果、OL マウスと野生型で有意な差をみとめなかった。すなわち、骨細胞は、骨髓からの HSPC の動員という現象特異的に関与していることが示唆された。

4. 骨細胞除去による骨芽細胞と骨髄内微小環境の変化

骨細胞は、骨内膜表面にある骨芽細胞と細胞突起を介して連絡をとっており、骨芽細胞機能を調節するという報告があり、我々は、骨細胞除去マウスにおける動員不全の原因は骨芽細胞にあるのではないかと考えた。骨細胞除去マウスでの骨芽細胞を形態学的に観察したところ、骨芽細胞の丈が短くなっていることを発見した。また、骨芽細胞が分泌する代表的な蛋白であるオステオカルシンの発現も低下しており、骨芽細胞は機能的にも抑制されていることが示唆された。すなわち、骨細胞除去により骨芽細胞ニッチが障害されることによって動員障害が起こっている可能性が考えられた。

また、最近の研究により骨髓中のマクロファージが骨芽細胞や傍血管ニッチの機能をサポートしており、G-CSF 投与時には骨髓マクロファージが抑制されることにより、ニッチサポート機能が減弱しニッチ機能

の低下に至ることが明らかにされている^{4,5)}。骨細胞除去後の骨髄マクロファージの変化を検討したところ、骨髄マクロファージが骨内膜から消失しており、骨細胞は骨髄マクロファージにも影響を与え、骨芽細胞ニッチ調節を行っていることが示唆された。

ニッチ細胞が分泌するケモカインであり、HSPCをニッチに留める機能があるCXCL12は、G-CSFによる動員メカニズムにおいて重要な働きを持つことが知られており、G-CSFによる骨髄内のCXCL12レベルの低下がHSPCの動員に繋がるキーイベントであるとされている。しかしながら、骨細胞除去マウスにG-CSF投与をすると、骨髄内CXCL12の低下を認めたにも関わらず、造血幹細胞の動員は障害されていた。また、CXCL12のカウンターレセプターであるCXCR4に対するアンタゴニストのAMD3100を投与すると動員が起こる事が知られている。しかし、興味深いことに、G-CSFでは動員されない骨細胞除去マウスでは、AMD3100による動員は正常であった。すなわち、骨細胞により調節される動員機構にはCXCL12の低下だけでは十分でない可能性が考えられた。また、CXCL12は造血幹細胞の動員だけではなく、造血幹細胞の維持にも重要であり、ニッチ細胞はCXCL12を高発現することが知られている。ところが、興味深いことに、骨細胞を除去すると骨髄での *cxcl12* の発現が上昇してい

た。これは、おそらく骨髄中の *cxcl12* を多く発現する細胞、すなわち傍血管ニッチ細胞での発現上昇を見ることが予想される。さらに、この上昇を反映して、造血幹細胞が多く含まれる細胞集団の中でのG0期の細胞割合が増加していた。このことは、骨細胞からのシグナルが骨髄中のニッチ細胞へ影響を与え、造血幹細胞の細胞周期をコントロールしていることを示唆している。

5. G-CSFによる造血幹細胞動員に骨細胞ネットワークが重要である

G-CSF投与により骨細胞の突起が抑制されること、骨細胞除去マウスでは動員障害を認めることから、我々はG-CSFによる動員には骨細胞が形成するネットワークが重要であるとの仮説を立てた。老化モデルとして知られており、骨粗鬆症や骨細胞の配列異常があるKlotho低形成マウス (*kl/kl*) に着目し骨細胞ネットワークを検討したところ、*kl/kl* では骨細胞ネットワークが破綻していた。そして予想どおり、*kl/kl* では、骨細胞を除去したマウスと同様にG-CSFによる動員がほとんど認められず、G-CSFによる動員への骨細胞ネットワークの重要性が示唆された。

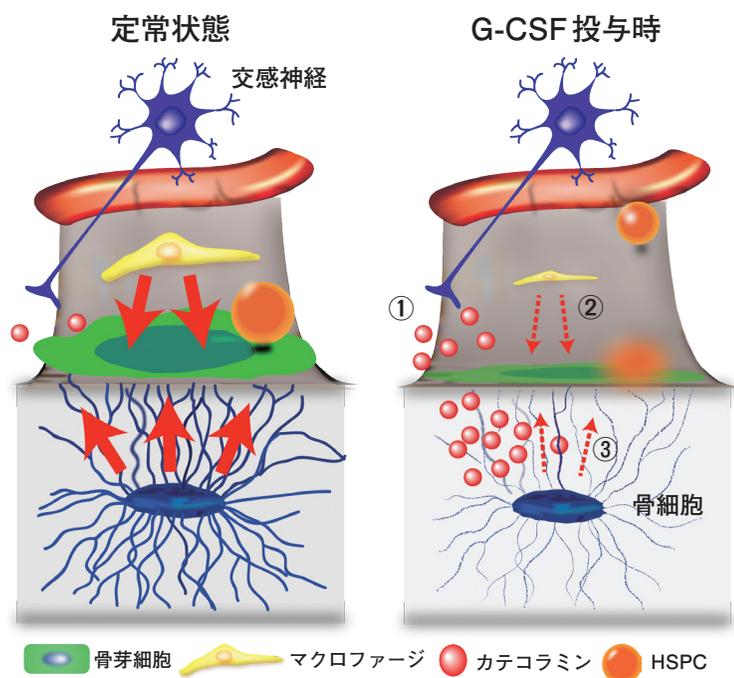


図 骨細胞による造血幹/前駆細胞動員メカニズム
定常状態では、骨内膜上の骨芽細胞は骨髄側から骨髄マクロファージからのサポートシグナルと、骨組織側から骨細胞によるサポートシグナルを受け、機能を維持している (図左)。G-CSF投与による動員時 (図右) には、骨芽細胞は、交感神経から放出されるカテコラミンシグナルを受け直接抑制を受ける経路 (①)、G-CSFにより抑制を受けた骨髄マクロファージからのサポートシグナルを失う経路 (②)、さらに本研究により今回明らかになった、カテコラミン刺激により骨細胞が抑制される第三の経路 (③) が加わり、結果三方向からの抑制を受けることによってニッチ機能の破綻に繋がり HSPCの動員が起こるものと考えられる。

研究成果の意義

本研究結果より、G-CSF 投与時には、骨芽細胞が次の3つの経路から抑制を受け、ニッチ機能の破綻に繋がり造血幹細胞の動員がおこることが考えられる。一つ目は活性化された交感神経よりカテコラミンが放出され、これが骨芽細胞上の β 2ARに働き直接抑制される経路(図①)。二つ目は、骨髄マクロファージがG-CSFによる抑制を受けて骨芽細胞へのサポートシグナルが弱まる経路(図②)。そして3つ目は、カテコラミンが骨細胞に直接作用し、骨細胞の抑制を招き、骨芽細胞へのサポートシグナルが弱まる経路(図③)である。本研究により、G-CSFによる造血幹細胞動員メカニズムにおける新たなプレーヤーとして骨細胞を明らかにし、骨芽細胞ニッチは骨髄側から骨髄マクロファージによる制御を受け、骨組織側からは骨細胞による制御を受けているという新たな構図が浮き彫りになった。これまで、造血システム制御への関与が不明であった骨細胞の新たな機能を解明した意義は大きい。

今後の展開や展望

本研究より、造血は骨髄だけではなく、神経や骨組織といった多臓器からの影響を受けて複雑に制御されていることを再認識することができた。これからは、造血システムや血液疾患の病態を考える際、血液細胞だけではなく、それを取り囲む骨組織や周辺組織を含

めて一つの臓器をして捉え、より広い視点から考えることによって新たなことが見えてくる可能性がある。

文 献

- 1) Bonewald LF : The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* (2011) 26, 229-238.
- 2) Kamioka H, Honjo T, Takano-Yamamoto T : A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone* (2001) 28, 145-149.
- 3) Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, Frenette PS : Signal from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* (2006) 124, 407-421.
- 4) Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, Poulton IJ, van Rooijen N, Alexander KA, Raggatt LJ, Levesque JP : Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* (2010) 116, 4815-4828.
- 5) Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Mendez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, Battista M, Leboeuf M, Prophete C, van Rooijen N, Tanaka M, Merad M, Frenette PS : Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med* (2011) 208, 261-271.

平成27年 8月受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1

電話：086-235-7227 FAX：086-232-8226

E-mail：noboru.asada@einstein.yu.edu