

研 究 報 告 書

「骨を要とする多臓器恒常性維持機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研 究 者: 片山 義雄

1. 研究のねらい

骨を要としたネットワークの破綻により引き起こされる多臓器不全の理解とその制御をねらいます。硬組織である骨の機能異常に基づく骨粗鬆症・造血幹細胞ニッチ制御不全・免疫不全・体内脂肪分布不全マウスモデルを独自に確立しており、これによる骨を要とした多臓器間機能的ネットワーク理論の確立をめざし、脳を最上位においた各臓器への一方通行のシグナルではなく、脳との双方向性ないしは脳を介さない骨を起点とした末梢臓器間シグナルネットワークの存在を明らかにします。また、この機構の破綻を疾病罹患素因ととらえる新たな概念に基づくより効果的な先制医療を確立します。

2. 研究成果

(1) 概要

骨内には「骨細胞」の縦横に張り巡らされたネットワークがあります。一般に重力感知装置として知られるこの細胞が、骨髄中で全ての血球の元となる造血幹細胞の本来の居場所(ニッチと呼びます)の機能を、交感神経からの指令をうけつつ調整していることを明らかにしました。すなわち、脳と血液を骨がつかないでいることになります。また、骨細胞ネットワークは、骨から離れた免疫臓器である胸腺でのリンパ球造血機能も司っていることがわかりました。加えて、皮下や内蔵といった全身の脂肪の保持に必須の役割も担っており、更に脳と協調して肝臓への脂肪の蓄積も調整していることが明らかになりました。すなわち、「骨」は一部脳と相談しつつ、実際には隣接した骨髄機能のみでなく免疫システムや脂質エネルギー代謝システムといった全身の遠隔臓器機能を統合しており、脳よりもむしろ多臓器間ネットワークの頂点に位置する役割を果たしていることが見えてきました。

(2) 詳細

1. 「骨細胞」の骨髄造血システムとの関係

さがけ研究開始前に、我々は、サイトカイン granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) 投与後に骨髄中の造血幹前駆細胞が末梢血に大量に流出(血液内科で動員とよばれる現象で、既に実臨床では保険診療として応用されています)する際に、G-CSF が骨髄交感神経を刺激してカテコラミンを放出し、造血幹細胞ニッチの一つである骨芽細胞がこの神経シグナルを感知して抑制されることで惹起される事を報告していました(Katayama et al. Cell 2006; Kawamori, Katayama et al. Blood 2010)。この現象に骨表面の骨芽細胞のみでなく、骨組織内に埋もれ骨関連細胞の 90%以上を占め、重力感知装置として知られている「骨細胞」

がどのような役割を果たしているか検討してみました。

まず、骨表面の骨芽細胞と骨組織に埋もれた骨細胞どちらにはじめに影響が及ぶのかを検討してみました。遺伝子変化を定量的にみていくと、骨芽細胞では G-CSF 投与数日してからその遺伝子変化が生じるのに比べ、骨細胞では初回投与後数時間という急速な抑制系の反応が観察されました。免疫染色で $\beta 2$ アドレナリン受容体が骨細胞に発現していることを確認し、また機能的にもこれが骨細胞への交感神経支配によるものであることを外科的神経切除実験で示す事ができました。さらに、遺伝子組み換え技術を用いて作製された骨細胞特異的ジフテリア毒素受容体発現マウス(DMP1-DTR Tg マウス)にジフテリア毒を投与することにより骨細胞を誘導的に除去した上で G-CSF による動員を検討したところ、骨髓中の造血幹細胞数は骨細胞除去で変わらないものの、G-CSF による動員はほぼ起きない、すなわち骨組織中の骨細胞が働かなければ骨髓中の造血幹細胞が骨髓から遊離できないことが確認されました。また、骨細胞除去を行うと、骨髓腔側から骨芽細胞性造血幹細胞ニッチをサポートしている骨周辺マクロファージ(osteomac と呼ばれる)が著減することもわかりました。骨芽細胞性造血幹細胞ニッチは、骨髓腔側からマクロファージに、骨組織側からは骨細胞に、双方向から強力に支持されているわけです。ここに G-CSF が投与されることにより、交感神経シグナルによる骨芽細胞直接抑制経路に加え、同じ交感神経シグナルによる骨組織内骨細胞の機能抑制と、これに引き続き骨髓腔の osteomac の抑制がおこり、これらに伴うサポートシグナルの減少、すなわち骨芽細胞ニッチにとっては 3 つの経路で強力に抑制されることになります。

これらの研究により、神経系による骨代謝を介した造血システム制御 Brain-Bone-Blood integration の概念が確立しました(5. 主な研究成果リスト 論文リスト 3)。しかし、これは臓器連関の中でも、骨芽細胞性造血幹細胞ニッチという隣り合った臓器における局所的ターゲットを中心にみた構図であり、そこから一歩離れて、骨細胞が遠隔臓器を含めた全身に及ぼす影響を以下に述べます。

2. 骨組織による免疫・脂質代謝制御

寝たきりの高齢者と宇宙飛行士に共通した臨床症状として、急速に進行する骨粗鬆症は容易に思い至ります。これは微小重力による骨組織内骨細胞への刺激の低下ととらえることは既に一般的に受け入れられている考え方です。もう一つ共通した臨床所見として、免疫不全を我々は想定しました。宇宙飛行士の地球への帰還後のリンパ球の数や機能が異常であることは多くの報告があり、また寝たきりの高齢者の易感染性は臨床的に良く知られています。

一定期間マウスの尾部懸垂により後ろ足のみ荷重負荷を解除すると、この部分の骨組織内骨細胞ネットワークは破綻し、その部分の骨髓中 B リンパ球数は著明に減少していました。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 リンパ球を含めた血球数は全て正常でした。重力シグナルと局所リンパ球造血の関係を骨を介して説明する一例と考えられます。更に深く骨細胞とリンパ球造血の関係を探るため、DMP1-DTR Tg マウスに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骨細胞除去(osteocyte-less:OL)マウスを作成しました。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ました。骨

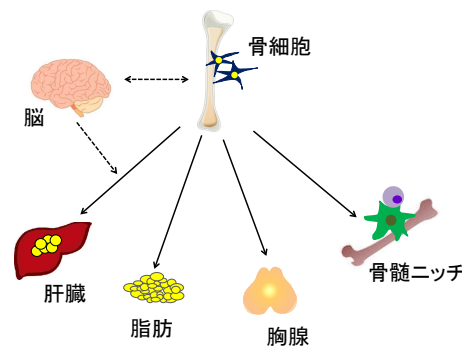
髓球系細胞の低下は認められず、リンパ球系特異的な減少でした。

次に、リンパ球造血に必須の一次リンパ臓器を詳細に検討しました。B リンパ球の一次リンパ臓器は骨髄です。OL マウスの骨髄では、B リンパ球前駆細胞(免疫グロブリン陰性分画)が著明に減少していました。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ませんでした。pro-B/pre-B 細胞と呼ばれる骨髄支持細胞依存的な細胞集団が特異的に減少していました。一方骨髄球系の前駆細胞数や造血幹細胞は正常であり、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ました。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いました。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ますが、OL マウスの骨髄からはBリンパ球は産生されず、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リンパ球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ました。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ました。すなわち、骨細胞を除去した OL マウスの骨髄では、B リンパ球特異的にサポートする間葉系支持細胞が欠落していたわけです。

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いました。OL マウスでは胸腺は著明に萎縮しますが、免疫染色ではこれは胸腺皮質間葉系支持細胞の減少によるものでした。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ました。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、側腹血行路を介し血流を共有させたパラバイオーシスモデル(併体接合)を用いました。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ていきます。このモデルでは、血行性の液性因子(ホルモンなど)や T リンパ球前駆細胞も隣のマウスに移動できます。OL マウス由来の T リンパ球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ましたが、野生型マウス由来の T リンパ球前駆細胞はOL マウスの胸腺で分化増殖ができませんでした。この実験で、OL マウスでの胸腺萎縮は、血球側ではなく環境側の問題であることが強く考えられました。骨組織とは明らかに離れた免疫臓器が骨で制御されている構図です。

また OL マウスでは急速に体重が低下します。これは、全身の脂肪組織の消失に起因していました。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でした。これは、高脂肪食を食べさせて脂肪肝にした状態で骨細胞除去をしても同様であり、通常食マウスより非常に厚い皮下脂肪とともに肝内脂肪も消失しました。一方、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くなったマウスでも骨細胞除去により同様に皮下脂肪や内蔵脂肪は消失しましたが、この場合は肝臓が激しい脂肪肝となりました。遺伝子解析より、脳の部位によっては摂食中枢の破壊そのもので、また脳の別の摂食中枢を破壊した上での骨細胞除去によっても、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ました。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いること、またこの調整機能は脳や肝臓と協調して行われている構図が見えてきました。

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や脂肪量は回復するため、やはり骨細胞とリンパ球造血・脂肪調整は深く関連していることが示唆されました。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す(右図)(5. 主な研究成果リスト 論文リスト2)。



以上より、当初のさがけ研究目的の一つである「骨を要とした多臓器間機能的ネットワーク理論の確立」は達成され、脳を最上位においた各臓器への一方通行のシグナルではなく、脳との双方向性ないしは脳を介さない骨を起点とした末梢臓器間シグナルネットワークの存在が明らかになりました。しかし、この連関の分子メカニズムの解明や、この機構の破綻を疾病罹患素因ととらえる新たな概念の構築とそれに基づくより効果的な先制医療の確立に関しては、さがけ研究期間内に十分達成することができず、今後の研究課題として残りました。現在、これらの研究を進めているところで、その重要性についても啓蒙を進めています(5. 主な研究成果リスト 論文リスト1)。

3. 今後の展開

本研究で明らかとなった「骨」を頂点とした多臓器間ネットワークは、骨疾患・血液疾患・免疫異常・脂肪エネルギー代謝異常など全身疾患に対して、深い病態理解のみでなく、科学的理論に基づいた骨への刺激や運動、既存の薬剤による本来の薬効と違った利用法による新たな治療や効果的に予防していく先制医療への応用が期待されます。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

申請時に打ち立てた研究目的のうち、最も重要である「骨を要とする多臓器恒常性維持機構」の存在は証明できました。この目的のための研究実施体制構築や研究費執行もほぼ予定通り進行できています。実質的なラボの規模から考えると、いただいた研究費を無駄にすることなく、比較的スムーズに具体的成果につなげて行く作業ができたと思っております。しかし、私個人としては、研究内容が部分的に論文化されたことも大事ではありますが、本研究に携わってくれた研究者の研究に対する意識、すなわち、論文作製済みの2人がいずれも海外でポスドクとして研究の研鑽を続けていること、現在携わってくれている大学院生も、研究を続けて行きたい希望があると聞いている事が、研究責任者として何よりうれしく、本研究計画の大

きな隠れた成果のひとつと考えております。

現在はまだ、「骨を要とする多臓器恒常性維持機構」の存在を示したに過ぎませんが、今後、骨を起点とする連鎖的臓器破綻シグナルの実態が明らかになれば、免疫不全、脂質代謝異常を是正する全く新規の薬理標的が見つかる可能性が高いと考えられます。おそらく老化に伴う免疫不全や脂質代謝異常にも大きく影響してくる事が予想され、対象は疾患特異的ではなく人類全てになるため、社会的にも大きなインパクトをもたらす展開が予想されます。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題は、骨を要とした多臓器間機能的ネットワークの解明をめざして行われ、具体的には重力を感知する骨細胞を除去したマウスを作成し、それを用いて、骨細胞が骨髄中で造血幹細胞のニッチの機能を交感神経からの指令をうけつつ調整していることを明らかにした。また、この骨細胞除去マウスでは胸腺が皮質間葉系支持細胞の減少により著明に萎縮しており、また、全身の脂肪組織も消失していた。すなわち、骨組織内骨細胞は隣接している骨髄のみでなく胸腺、脂肪といった遠隔臓器にも影響を及ぼしていることが明らかとなった。

以上から、「骨を要とする多臓器恒常性維持機構」の存在が明確になった。本研究者は、さきがけ研究により、インパクトのある原著論文を発表し、新しい分野のトップランナーとして注目され、研究者としての飛躍につながった。

研究費は、本研究を着実に迅速に実施するために病理組織標本作成装置を計画外の増額予算で購入した以外は、計画通りの予算で研究を行った。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Asada N, Sato M, Katayama Y. Communication of bone cells with hematopoiesis, immunity and energy metabolism. *Bonekey Reports* 2015, 4, 748. (invited review article)
2. 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 Metabolism* 2013, 18, 749–758.
3. 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.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

プレスリリース「骨が免疫を育て脂肪バランスを整える～骨をターゲットにした新たな治療戦略の提示へ～」(2013 年 10 月) <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20131018/>