

166. リン代謝に注目した造血制御中枢としての骨組織評価

片山 義雄

Key words: 交換神経, リン代謝, カルシウム代謝,
造血システム, 骨細胞

神戸大学 医学部附属病院 血液内科

緒言

骨髄にとって骨は単なるプロテクターではなく、一見無関係なように見える「骨代謝」と「造血システム」は、最近にわかにその深い関係がクローズアップされるようになった。造骨性細胞である骨辺縁骨芽細胞が造血幹細胞ニッチのひとつであることが認知されて以来、多くの知見が蓄積されてきている。特に我々の研究により、健常人ドナーにサイトカイン G-CSF を 4～6 日間連続で投与すると、骨髄中の造血幹・前駆細胞がニッチを離れ、末梢血に大量に流出するようになり（動員と呼ばれる現象）、これを採取し骨髄移植の代替移植ソースとして用いる治療が一般的となっている。この G-CSF による動員メカニズムの一部が、G-CSF による交感神経シグナル増強を介した骨芽細胞ニッチの抑制であること、更にこの交感神経シグナルの下流でカルシウム (Ca) 代謝に重要な役割を果たすビタミン D 受容体 (VDR) が転写レベルで制御されていることを我々は報告している^{1,2)}。また、この交感神経シグナルは、骨芽細胞だけでなく、骨組織に埋もれた骨芽細胞の最終分化段階である骨細胞をも制御しており、この骨細胞からのシグナルが造血幹細胞ニッチである骨芽細胞を背後からサポートしているため、神経シグナルは複数経路にわたって直接、間接に造血幹細胞ニッチに影響を与えていることも明らかにしてきた³⁾。更に、この骨細胞が遠隔臓器である胸腺などリンパ組織の免疫造血環境維持に必須である事や、脳と強調しつつ全身の脂肪維持に働いている事も報告している⁴⁾。このように、これまでに見えて来ている造骨システムが造血・免疫システムを制御している構図を、Ca 代謝に重要な VDR とリン (P) 代謝に重要な fibroblast growth factor-23 (FGF23)- α Klotho 系の役割に注目し、これらの相互関係を紐解くことにより、更に明らかにすることを本研究の目的とした。

方法および結果

1. G-CSF 投与時の骨組織での FGF23 mRNA の変化

FGF23 は骨組織に埋もれた骨細胞で主に産生され、co-receptor である α Klotho と共役して受容体にシグナルを通し、腎での P 再吸収を抑制し血中 P 濃度を低下させる方向に働くことが知られている。我々はまず、造血幹・前駆細胞の骨髄から末梢血への動員目的でサイトカイン G-CSF を C57BL/6 マウスに投与した際に、骨組織での FGF23 mRNA に変化があるかどうか検討した。7 週齢の野生型 C57BL/6 雄マウスに、G-CSF 125 μ g/kg/dose, 12 時間毎に皮下注射を行い、2 dose 目, 4 dose 目, 6 dose 目, 8 dose 目の投与後それぞれ 3 時間で大腿骨を採取し、そこから抽出した total RNA から cDNA を作製し、real-time 法にて FGF23 mRNA を定量した。図 1 のように、G-CSF 2 dose 目ですでにベースからは優位差をもって FGF23 mRNA の上昇が見られ ($n=3, p < 0.05$)、これが G-CSF 投与中続く傾向があった。

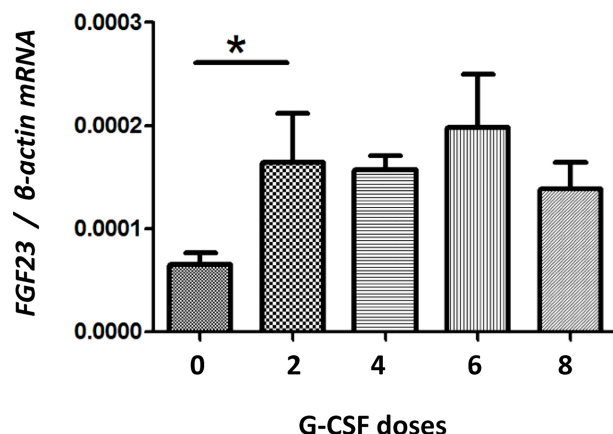


図1. G-CSF 投与時の骨組織での FGF23 mRNA の変化.

G-CSF 各回数投与後3時間での骨組織における mRNA を real-time 法により検証した. 投与早期 (動員効果がまだみられない時期) から骨組織での FGF23 mRNA は有意に上昇していた (n=5, *p < 0.05).

ここで, 8 dose は骨髓造血幹・前駆細胞の末梢血への動員効率が著明に上昇するタイミングであり, ヒトの臨床でもほぼ同じである. これらから, 動員効率が上昇する以前から FGF23 は骨組織で多く産生されることが示唆された. しかしながら, これらのマウスの末梢血中の P 濃度を経時的に測定したところ, 全く一定であった (図2).

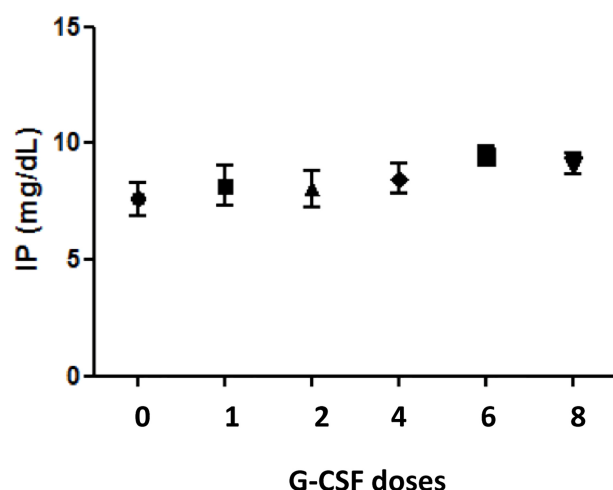


図2. G-CSF 投与時の末梢血でのリン (P) の変化.

G-CSF 各回数投与後3時間での血中 P 濃度を測定した. 4日間にわたる G-CSF 投与中, 血中のリン濃度に明らかな変化は認められなかった.

これらは, G-CSF 投与により (骨芽細胞系列は G-CSF 受容体を発現しておらず, おそらく交感神経シグナルを介して) 骨組織では FGF23 産生が増強されるものの, その目的は末梢血中の P の変化ではなく, 現在までにわかっていない FGF23 の局所 (特に骨組織や骨髓内) での作用を示唆しているデータと現状で我々は考えている.

2. 交感神経に支配された FGF23 と VDR の骨組織でのシグナル伝達の関係

我々の既報²⁾より, G-CSF (により刺激された交感神経) により, 骨組織内の VDR mRNA は急速に上昇する. それでは, 1. で明らかとなった G-CSF 投与による FGF23 mRNA 上昇は VDR の下流にあるのであろうか. この疑問に答えるため, 我々は野生型と VDR 欠損マウスに G-CSF を単回投与し, 1時間後の大腿骨における FGF23 mRNA を定量した. まず, 野生型では前述の結果と同様, 非常に強い上昇がみられた (図3). もし FGF23 が VDR の下流にあるとすれば VDR 欠損マウスでは FGF23 mRNA の上昇は阻害されているはずである. しかし, VDR 欠損マウスで

も同様に FGF23 mRNA は非常に強い上昇を見せ (図 3), 少なくとも FGF23 の上流に VDR はないことが明らかとなった.

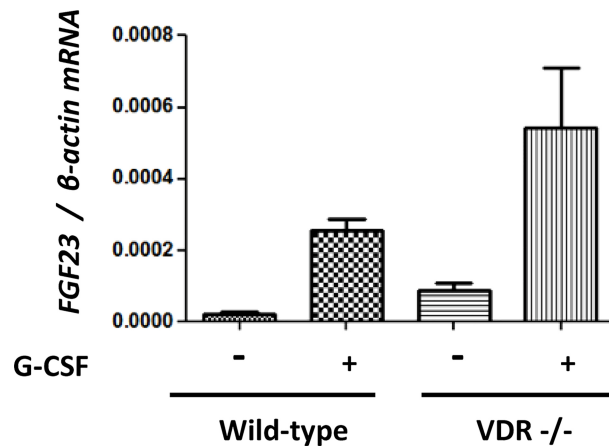


図 3. G-CSF 投与時の FGF23 と VDR の関係.

G-CSF 単回数投与後 1 時間での骨組織における mRNA を real-time 法により検証した. 野生型マウスで認められた FGF23 mRNA 上昇が, 同様に VDR 欠損マウスでも観察され, VDR は FGF23 の上流にあるわけではないことが明らかとなった (n=3).

おそらく, G-CSF から交感神経の経路の下流では, VDR と FGF23 は並列して別経路として機能していると現在我々は考えている.

3. 骨髄細胞での VDR mRNA の発現

VDR は本来骨組織での骨芽細胞に強く発現してその機能を発揮していると従来考えられて来たが, 我々は, 骨髄細胞 (血球と間葉系細胞など非血球細胞も含め) で VDR mRNA が G-CSF 投与後急速に上昇する事も見いだした. これが血球であるのか非造血細胞であるのかについて明らかにするために, 我々は野生型マウスに G-CSF を単回投与し, 1 時間後に骨髄細胞を採取し, 高速セルソーターを用いて, CD45+ (一般的に血球) と CD45- (一般的に非血球) 細胞を分取し, VDR mRNA を定量した. 図 4 A に示すように, G-CSF 投与後に VDR mRNA を上昇させる傾向にあったのは CD45- 分画であり, これは G-CSF のかわりに汎 β アドレナリン受容体アゴニストである isoproterenol を 100 mg/kg で腹腔内単回投与して 1 時間のデータにて裏付けられた (図 4 B, n=3).

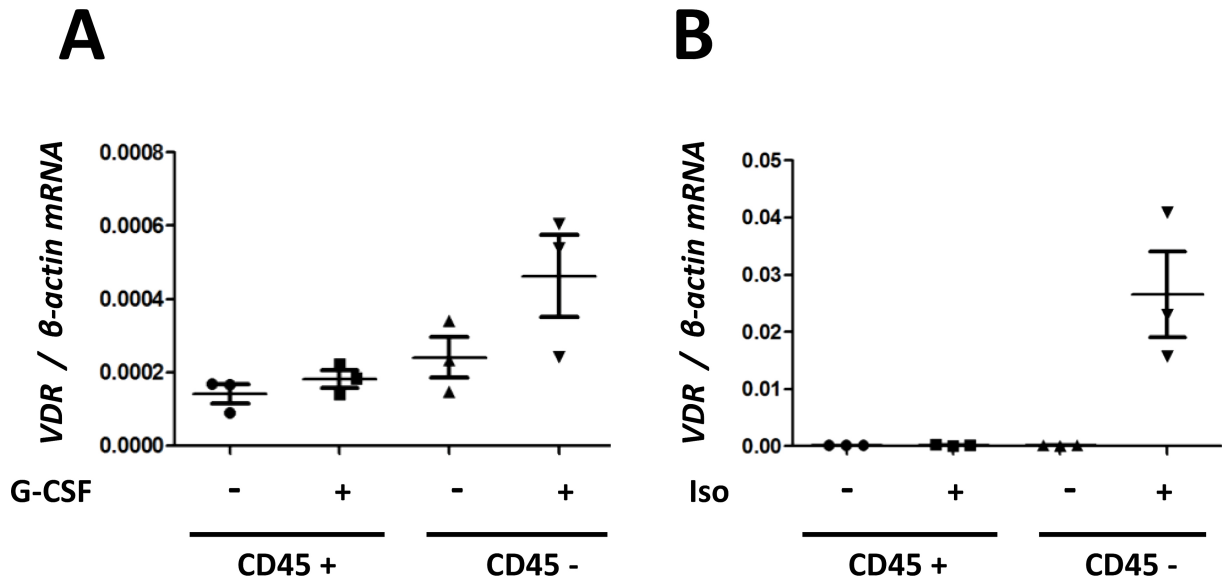


図4. 骨髄細胞における VDR mRNA の発現.

A) G-CSF 単回投与後 1 時間, B) Isoproterenol 100 mg/kg 単回投与後 1 時間での骨髄細胞をセルソーターで CD45 陽性陰性分画に分取し, Real-time 法で VDR mRNA を定量した. いずれの実験においても CD45 陰性分画において選択的に VDR mRNA の発現が上昇した (n=3).

これは, 主に骨芽細胞系列の前駆細胞 (間葉系細胞) が骨髄内交感神経シグナルによってその VDR 発現を強く制御されていることを示していると考えられる.

考 察

以上のデータより, Ca 代謝と P 代謝が vitamin D と FGF23 で強く調節されているホルモンとしての今までの常識に加え, 脳からの交感神経により個別に繊細に支配されており, その舞台が骨髄を包含する骨組織内で, おそらく並列に非常に強く制御されていることが明らかとなってきた. また, ビタミン D や FGF23 はいずれもホルモンとして全身を血行性に巡り臓器をまたいで働くことが一般的に知られているが, 我々のデータは, 骨組織 (おそらく骨髄も含め) 内の局所で効果を発揮するサイトカインのような働きもあるのではないかと予想させる. 今後, FGF23 ノックアウトマウス, FGF23 flox マウス, VDR flox マウスなどを用いて, これら分子の未だ明らかになっていない真の役割を, 造血システム中心に解明する研究を継続する予定である.

文 献

- 1) Katayama, Y., Battista, M., Kao, W. M., Hidalgo, A., Peired, A. J., Thomas, S. A. & Frenette, P. S. : Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*, **124** : 407-421, 2006.
- 2) Kawamori, Y., Katayama, Y., Asada, N., Minagawa, K., Sato, M., Okamura, A., Shimoyama, M., Nakagawa, K., Okano, T., Tanimoto, M., Kato, S. & Matsui, T. : Role for vitamin D receptor in the neuronal control of the hematopoietic stem cell niche. *Blood*, **116** : 5528-5535, 2010.
- 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*, **6** : 737-747, 2013.
- 4) 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.*, **18** : 749-758, 2013.