慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	放射線照射による骨髄内環境の損傷とマクロファージによる修復機構の解析
Sub Title	Repairing of hematopoietic niche in bone marrow after X-ray irradiation
Author	三瀬, 節子(Mise, Setsuko) 青木, 和広(Aoki, Kazuhiro)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、致死量のX線照射後に造血幹細胞移植を行うと骨量が減少するマウスと増加するマウスの2つの異なる系統のマウスを用いて、骨量の維持や造血能力は、骨髄内の脂肪細胞の分化の程度に影響されることを明らかにした。骨量の減少するRelA欠損型マウスでは、骨髄内に多くの脂肪細胞が分化すると共に造血能が低下し末梢に多くの造血細胞が流出する。反対に骨量が増加するSpred1/Spred2欠損型マウスは、分化した脂肪細胞が速やかに除去され、造血能力がよくなる。脂肪細胞が増えるRelA欠損型マウスでは炎症を引き起こすマクロファージが多く存在していることがわかった。 Lethal X-ray radiation before HSC transplantation often induce the bone loss in the patients. We found a correlation between bone loss and the impairment of hematopoietic environment induced by hyper-differentiation of adipocytes, by using two different strains of mice, one is RelA-deficient mouse suffering from severe bone loss and the other is Spred1/Spred2 double knockout mouse which increases its bone mass after HSC transplantation. The adipocytes differentiated in the bone morrow after X-ray radiation were rapidly deprived in the Spred DKO mice and in these mice hematopoietic ability was enhanced compared with wild type mice. In contrast, the number of adipocytes markedly increased and hematopoietic ability was impaired in RelA-deficient mice. Inflammatory macrophages are highly differentiated in RelA-deficient mice, it may cause the over-differentiation of adipocytes.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K09867 研究分野：造血幹細胞移植
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K09867seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月　 ４ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ０９８６７

研究課題名（和文）放射線照射による骨髄内環境の損傷とマクロファージによる修復機構の解析

研究課題名（英文）Repairing of heamatopoietic niche in bone marrow after X-ray irradiation

研究代表者
三瀬　節子（Mise-Omata, Setsuko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：００２６９０５２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究では、致死量のX線照射後に造血幹細胞移植を行うと骨量が減少するマウスと増加するマウスの２つの異なる系統のマウスを用いて、骨量の維持や造血能力は、骨髄内の脂肪細胞の分化の程度に影響されることを明らかにした。骨量の減少するRelA欠損型マウスでは、骨髄内に多くの脂肪細胞が分化すると共に造血能が低下し末梢に多くの造血細胞が流出する。反対に骨量が増加するSpred1/Spred2欠損型マウスは、分化した脂肪細胞が速やかに除去され、造血能力がよくなる。脂肪細胞が増えるRelA欠損型マウスでは炎症を引き起こすマクロファージが多く存在していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
造血幹細胞移植は、白血病や再生不良性貧血などで病気からの治癒を目指すことのできる唯一の治療法である。造血幹細胞移植を行う前には、患者自身の造血細胞を死滅させるために致死量のX線照射や抗がん剤投与などが行われるが、X線照射を受けた患者のなかには、骨量が減少し治療後のQOLが著しく低下するケースがある。本研究成果によってX線照射は脂肪細胞の分化を引き起こし、その分化が強いと骨形成や造血が低下し、その反対に脂肪細胞が少ないと骨形成や造血が亢進することを明らかにした。本研究成果は、造血幹細胞移植後の患者のQOLの向上に一助を与えるものと考える。

研究成果の概要（英文）：Lethal X-ray radiation before HSC transplantation often induce the bone loss in the patients. We found a correlation between bone loss and the impairment of hematopoietic environment induced by hyper-differentiation of adipocytes, by using two different strains of mice, one is RelA-deficient mouse suffering from severe bone loss and the other is Spred1/Spred2 double knockout mouse which increases its bone mass after HSC transplantation. The adipocytes differentiated in the bone morrow after X-ray radiation were rapidly deprived in the Spred DKO mice and in these mice hematopoietic ability was enhanced compared with wild type mice. In contrast, the number of adipocytes markedly increased and hematopoietic ability was impaired in RelA-deficient mice. Inflammatory macrophages are highly differentiated in RelA-deficient mice, it may cause the over-differentiation of adipocytes.

研究分野：造血幹細胞移植

キーワード：骨代謝　脂肪細胞　造血幹細胞ニッチ　マクロファージ

１．研究開始当初の背景

造血幹細胞移植は､白血病や再生不良性貧血からの治癒を目指すのに重要な治療方法である。造血幹細胞移植を行った患者では、骨量が著しく低下し、骨組織の脆弱化による骨折などの危険があり患者の QOL に大きく影響する。この骨の脆弱さをもたらすひとつの要因に移植前に行われる全身的な放射線照射が考えられる。我々は、免疫反応や細胞の生存に不可欠な転写因子 NF-κB のひとつの RelA の胎児肝臓細胞を造血幹細胞のソースとして骨髄移植を行った RelA 欠損型移植マウスでは、骨量が著しく減少することを明らかにした。このマウスでは、ミエロイド系の細胞の分化が亢進している。RelA 欠損型マウスのほかに、多くのシグナル伝達の関わる MAPK の１つである ERK の細胞内阻害分子である Spred1 と Spred2 を造血系の細胞で欠損した(Tie2Cre Spred1/2 欠損マウス､以下 Spred DKO マウスでもミエロイド系の細胞の分化が亢進している。

本研究では、2 つのミエロイド系の細胞が亢進したマウスを用いて、骨量の変化と造血のための骨髄内環境の変化との因果関係を明らかにし、造血幹細胞移植後に良好な予後をもたらす因子を明らかにする。

２．研究の目的

骨量が減少する RelA 欠損型移植マウスにおける造血能と造血環境、特に移植後の脂肪細胞の分化の程度について調べ、因果関係を明らかにする。また、ミエロイド系の細胞の分化が亢進しているが、造血幹細胞の造血能も亢進しているといわれている Spred DKO マウスにおいても、骨量の変化と造血能の相関、脂肪細胞の分化の程度を明らかにする。これら 2 つの系統のマウスの結果から、脂肪細胞による、骨組織や造血環境への影響を明らかにする。また、同時に脂肪細胞の分化や消失に与えるマクロファージの役割を明らかにする。

３．研究の方法

(1) 造血幹細胞移植

Ly5.1 を発現している C57BL6 のコンジェニックマウスを造血幹細胞移植の宿主として用いる。

このマウスに致死量に当たる９Gy の X 線を照射する。24 時間以内に、造血幹細胞のソースとなる RelA 欠損型(野生型)の胎児肝臓細胞か、Spred 欠損型(野生型)骨髄細胞を移植する。

(2) 骨組織の解析

8 週齢あるいは造血幹細胞移植後のマウスの脛骨、大腿骨を 4%PFA で固定後、PBS で PFA を除いた後に、マイクロ CT 解析による画像解析、DEXA（骨密度測定検査）法及び pQCT 法（定量的 CT 法）による骨量測定を行った。

(3) 造血能力の検定

造血細胞の競合試験は、対象となる胎児肝臓細胞や骨髄細胞を野生型骨髄細胞とを 1：1 に混合し移植する。造血細胞の頻度の測定は、骨髄細胞、脾臓細胞、末梢血細胞を用いて、CFC-U(Colony-forming cell unit)アッセイにより行った。

(4) 脂肪細胞の観察

固定した大腿骨を用いて、凍結切片を作成し、オイルレッド染色により組織中の脂肪粒を検出した。カウンターステインとして、トルイジンブルー染色を施した。

(5) 骨髄内マクロファージの同定

骨髄細胞をマクロファージのマーカーである抗 F4/80 モノクローナル抗体で染色し、セルソーターによって細胞を単離する。RNA を抽出し、RT、qPCR により炎症性マクロファージや組織修復性マクロファージのマーカー遺伝子の発現量を野生型のものと比較し、マクロファージの性質を特定する。

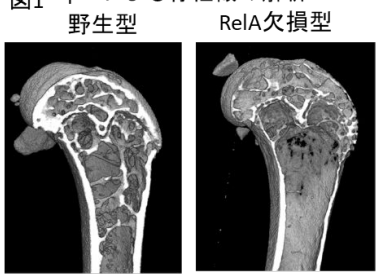
４．研究成果

(1)転写因子 NF-κB の RelA 欠損型マウスでの解析

①　RelA 欠損型移植マウスの骨量の変化

RelA 欠損型移植マウスの骨組織をμCT 解析および DEXA 法によって解析した。RelA 欠損型移植マウスでは、海綿骨、皮質骨共に骨量が減少していた(図 1)。骨形態計測によって、破骨細胞と骨形成の動態を調べたところ、骨量の減少にも関わらず破骨細胞の分化の程度は野生型のものと変わりなかったが、骨芽細胞による骨形成が著しく減少していた。これが、骨量の原因であると思われるが、移植マウスの骨芽細胞は宿主由来であるため、野生型である。そのため、RelA 欠損型移植マウスの骨形成異常は、骨芽細胞そのものによるのではなく、移植された造血細胞によって作り出された環境によるものと思われる。

図1　μCTによる骨組織の解析

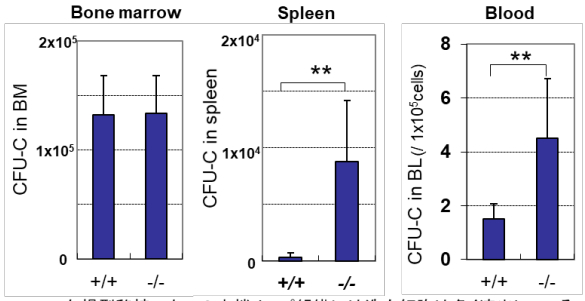


RelA欠損型移植マウスでは著しく骨量が減少している。

② RelA 欠損型移植マウスの骨髄内環境

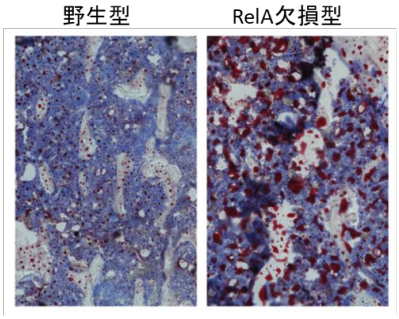
RelA 欠損型移植マウスでは、ミエロイド系の細胞が多く分化し、リンパ球の分化が抑制されている。RelA 欠損型の骨髄細胞を野生型の骨髄細胞と等量混ぜて、造血幹細胞移植を行ったところ、野生型のものと同程度分化してきた。このことは RelA 欠損型の造血細胞そのものの造血能には問題がないことがわかる。しかし、繰り返しの移植後には徐々に造血能が低下してくる上、RelA 欠損型移植マウスでは、脾臓や末梢血などに多くの造血細胞が流出してきており(図 2)、このことは骨髄内の造血環境が悪化していることを表している。

図2 骨髄、脾臓、末梢血でのCFU-C assay



RelA欠損型移植マウスの末梢リンパ組織には造血細胞は多く流出している。

図3 X線照射し胎児肝臓細胞を移植したマウスの骨髄内の脂肪細胞の様子



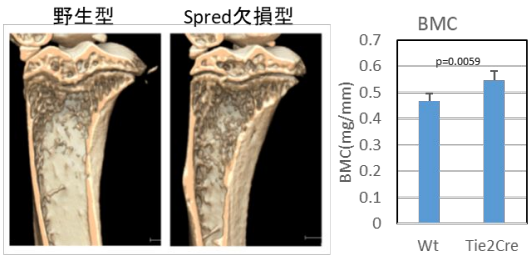
X 線照射し造血幹細胞移植を行ったマウスの骨髄内には一過性に脂肪細胞が分化する。そのピークは移植後 5 日目で、その後徐々に減少し 12 日後にはほぼ正常の状態に戻る。RelA 欠損型移植マウスでは、野生型移植マウスに比べて、12 日後になっても未だ骨髄内には多くの脂肪細胞が存在していた (図 3)。これも骨髄内環境の悪化になんらか関係しているものと思われる。

(2) Spred DKO マウスでの解析

①Spred DKO マウスの骨組織の解析

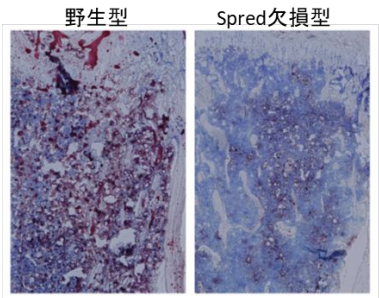
Spred DKO マウスは、野生型のものと比べ、皮質骨は減少するが、海綿骨は増加していることを明らかにした(図 4)。海綿骨表面は造血幹細胞ニッチの場となるために、造血環境において特に重要である。Spred DKO マウスは、破骨細胞が増加しているため、それが皮質骨の骨量を減少させている要因と考えられる。

図 4 Spred欠損型マウスにおいては、海綿骨が増加している。



② Spred DKO マウスの骨髄内環境

図5 骨髄移植7日後の骨髄内の脂肪細胞
Spred欠損型では脂肪細胞が消失している。



Spred DKO マウスの造血幹細胞の造血能を調べるために、Spred DKO マウスの骨髄細胞と野生型の骨髄細胞との競合試験を行ったところ、Spred DKO マウスの造血幹細胞のほうが造血能が高いことが明らかになった。また、骨髄内の脂肪細胞の状態を調べたところ、Spred DKO 移植マウスの骨髄では、野生型移植マウスに比べ、極端に脂肪細胞が少なかった（図 5）。少ない原因を探るために、Spred DKO マウスの骨髄細胞をドナーとして造血幹細胞移植を行ったところ、移植直後の 5 日目には野生型と同様に脂肪細胞が分化してくるが、その後速やかに除去されることがわかった。脂肪細胞を処理するためのマクロファージの能力が高いものと考えられる。

(3)骨髄内マクロファージと造血環境との因果関係

造血環境が悪化し、脂肪細胞が多く分化する RelA 欠損型移植マウスの骨髄では、TNF や NOS を多く産生する炎症性マクロファージが多く存在していることが分かった。この炎症性マクロファージが骨髄内の脂肪細胞を増やし、造血環境を悪化すると考えられる。このマウスに野生型のマクロファージを移植すると、造血環境が正常に戻ることを明らかにした。Spred DKO マウスはマクロファージを含むミエロイド系の細胞の亢進が見られるが、炎症性ではなく組織修復性のマクロファージが多く存在し、それが増えすぎた脂肪細胞を除去してくれることによって造血環境が良好になると考えられる。

これらの研究成果から、X 線照射後の造血幹細胞移植においては、骨髄内に分化するマクロファージの性質によってその後の造血環境を改善できることを明らかにした。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　7 件）

1. Ito M, Komai K, Mise-Omata S, Iizuka-Koga M, Noguchi Y, Kondo T, Sakai R, Matsuo,K, Nakayama T, Yoshie O, Nakatsukasa H, Chikuma S, Shichita T, Yoshimura A. Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate

neurological recovery. **Nature** *565*: 246-250 (2019)(査読有) doi: 10.1038/s41586-018-0824-5.

2. Kondo T, Imura Y, Chikuma S, Hibino S, Omata-Mise S, Ando M, Akanuma T, Iizuka M, Sakai R, Morita R, Yoshimura A. Generation and application of human induced-stem cell memory T cells for adoptive immunotherapy. **Cancer Sci.** *109*: 2130-2140.(2018)(査読有) doi: 10.1111/cas.13648.
3. Hibino S, Chikuma S, Kondo T, Ito M, Nakatsukasa H, Omata-Mise S, Yoshimura A. Inhibition of Nr4a Receptors Enhances Antitumor Immunity by Breaking Treg-Mediated Immune Tolerance. **Cancer Res**. *78*:3027-3040 (2018) （査読有） doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3102.
4. Chikuma S, Kanamori M, Mise-Omata S, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling: Potential immune checkpoint molecules for cancer immunotherapy. **Cancer Sci.** *108*:574-580 (2017) (査読有) doi: 10.1111/cas.13194.
5. Sugamori Y, Mise-Omata S, Maeda C, Aoki S, Tabata Y, Murali R, Yasuda H, Udagawa N, Suzuki H, Honma M, Aoki K. Peptide drugs accelerate BMP-2-induced calvarial bone regeneration and stimulate osteoblast differentiation through mTORC1 signaling. **Bioessays**. *38*:717-25 (2017) (査読有). doi: 10.1002/bies.201600104.
6. Arai Y, Aoki K, Shimizu Y, Tabata Y, Ono T, Murali R, Mise-Omata S, Wakabayashi N. Peptide-induced de novo bone formation after tooth extraction prevents alveolar bone loss in a murine tooth extraction model. **Eur J Pharmacol** *782*:89-97(2016) (査読有)doi: 10.1016/j.ejphar.2016.04.049.
7. Uehara T, Mise-Omata S, Matsui M, Tabata Y, Murali R, Miyashin M, Aoki K. Delivery of RANKL-Binding Peptide OP3-4 Promotes BMP-2-Induced Maxillary Bone Regeneration. **J Dent Res.** *95*:665-72 (2016).(査読有) doi: 10.1177/0022034516633170.

〔学会発表〕（計　3 件）

1. Mise-Omata S and Yoshimura A. Blockade of suppressor of cytokine signaling 3 enhances anti-tumor immunity. 第 47 回　日本免疫学会　2018
2. Mise-Omata S, Ohkura C, Chikuma S, and Yoshimura A. Blockade of suppressor of cytokine signaling 3 enhances anti-tumor immunity.第 46 回内藤コンファレンス (2018).
3. 三瀬節子、Neil Alles、青木和広　放射線照射後の骨髄内環境の修復における骨髄マクロファージの役割 第 2 回日本骨免疫学会　(2016)

〔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
　無し

６．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：青木　和広

ローマ字氏名：AOKI, Kazuhiro

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：大学院医歯学総合研究科

職名：教授

研究者番号（8 桁）：40272603

※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。