

博士論文

オンコスタチン M による
骨髄造血環境の制御機構の解明

佐藤 郁

目次

第一章	序論	・ ・ ・ ・ ・ 2
第二章	材料と方法	・ ・ ・ ・ ・ 9
第三章	結果	・ ・ ・ ・ ・ 16
第四章	考察	・ ・ ・ ・ ・ 48
第五章	結論	・ ・ ・ ・ ・ 51
参考文献		・ ・ ・ ・ ・ 53
謝辞		・ ・ ・ ・ ・ 58

第 1 章 序章

1. 成体における造血維持機構

血液の細胞成分は、造血幹細胞 (Hematopoietic stem cell: HSC) から分化する赤血球、白血球、血小板である。生涯にわたり血液細胞の供給を担う成体型造血は、胎児期の大動脈-生殖原基-中腎 (Aorta-gonad-mesonephros: AGM) 領域に始まり、その後、造血の場は胎児肝臓、脾臓、骨髓へと移行する。成体においては、主に骨髓が造血を担っており、造血幹/前駆細胞が増殖・分化することで造血している¹。血液細胞には寿命があるため、生命活動の維持に必要な血液細胞は、骨髓造血により絶えず供給され続けている。血液細胞は全身を循環することで、酸素やホルモン、サイトカインなどを組織や器官に運搬するとともに免疫応答を行うなど、個体の恒常性を維持し生命活動の基盤をなしている。

成体の主要な造血組織である骨髓には、血液細胞の他に間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC)、骨芽細胞、脂肪細胞、内皮細胞などの様々な細胞種が存在し、それらの細胞が産生するサイトカインや細胞外基質等によって造血環境が維持されている¹ (Figure 1-1)。骨髓環境に異常をきたすと造血が障害され、貧血や汎血球減少などの障害を引き起こすことから²、骨髓環境を正常に維持することは、造血の維持を通して生体のホメオスタシスを保つ上で重要である。骨髓において、造血ニッチ (Hematopoietic niche) と呼ばれる造血幹細胞を取り巻く環境は、大きく分けて2種類存在することが知られている。一つは血管内皮細胞が造血ニッチ細胞として寄与する Vascular niche (血管近傍のニッチ)^{3,4,5}、もう一つは、骨芽細胞が造血ニッチ細胞として寄与する Endosteal niche (骨内膜近傍のニッチ)^{6,7,8}である。

造血ニッチ細胞とされる骨芽細胞は、骨髓内の間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) から分化し、更に骨細胞へと分化を遂げる細胞である。MSC は多分化能を有し、*in vitro* において、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞に分化することが知られている^{9,10}。近年、Morikawa

らによって報告された、マウス骨髄由来 PDGFR α ⁺Sca-1⁺CD45⁻Ter119⁻細胞画分の MSC (PaS 細胞) は, *in vitro* において, 脂肪細胞, 骨芽細胞, 軟骨細胞に分化することが明らかとされており, PaS 細胞を放射線照射後のマウスに移植すると, 骨髄の造血ニッチ細胞とされる骨芽細胞に分化して造血に寄与することが報告されている¹¹. しかしながら, 骨髄内における, PaS 細胞から脂肪細胞, あるいは骨芽細胞への分化の制御機構は, 未だ明らかとされていない.

一方, 骨髄内の脂肪細胞については, Naveiras らは野生型 (WT) マウス及び, 脂肪細胞を持たない A-ZIP/F1 マウスに致死量の放射線を照射した後, WT マウス由来の骨髄細胞を移植すると, A-ZIP/F1 マウスでは末梢血中の白血球数やヘモグロビン量の回復が早いことを示している¹². このことは, 骨髄内の脂肪細胞は造血前駆細胞の増殖を阻害し造血を負に制御することを示唆するものである. また, ヒトにおいても, 貧血あるいは汎血球減少を引き起こす再生不良性貧血では, 骨髄内の脂肪細胞が増加する脂肪髄化を伴う場合が多いことが知られる¹³. 更に, 加齢によっても脂肪髄化は進行することが知られている¹⁴.

以上の様に, 骨髄環境における MSC の脂肪細胞あるいは骨芽細胞への分化バランスは, 骨髄造血能を決定する造血環境にとって重要な要因であると言える. そのため, MSC からの脂肪細胞, あるいは骨芽細胞への分化の制御機構の解明は, 造血ニッチ細胞による造血環境の維持機構の解明のみならず, 骨髄環境の異常, 特に脂肪髄化を伴うような血液疾患の治療法の開発にも資することが期待できる.

2. オンコスタチン M (Oncostatin M: OSM) の多機能性

オンコスタチン M (Oncostatin M: OSM) は, IL-6 ファミリーに属するサイトカインであるが, 当研究室ではこれまでに, 細胞の増殖や分化, 免疫系や代謝系において様々な特有の機能を有することを報告してきた¹⁵. 特に造血系においては, マウス胎児の造血幹細胞が発生する場である AGM 領域において OSM が発現していることを報告しており, AGM 初代培養系にお

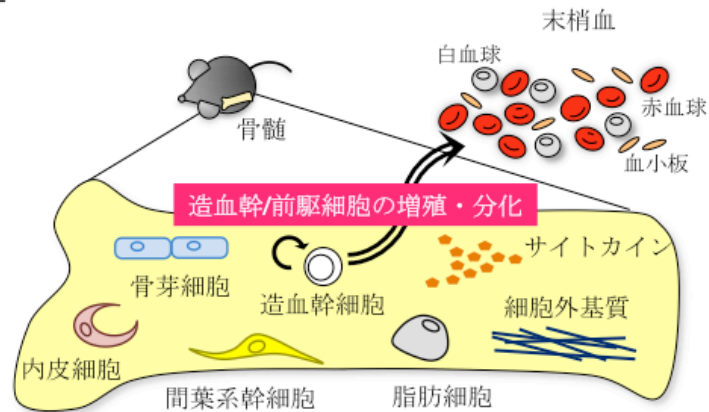
いて OSM 添加により、造血前駆細胞が著しく増殖する作用を明らかにしている¹⁶。また、OSM 受容体欠損マウス (OSMR KO) では、末梢血中の赤血球数と血小板数が減少しており、貧血症状を呈すること、コロニーアッセイ (Colony-forming unit assay) により骨髄中の造血前駆細胞が少ないことなどを報告している¹⁷(Figure 1-2)。更に、OSMR KO マウスに WT マウスの造血幹細胞を移植しても、その症状は改善されないことから、OSM が骨髄環境に作用することが造血環境の維持において重要であることが示唆されていた。一方、OSM 欠損マウス (OSM KO) では、骨髄中の造血前駆細胞が末梢血中に流出しやすくなっており、OSMR KO マウスと同様の貧血症状を示すことを報告している¹⁸。このように、OSM は造血環境の維持に関わることが示唆されるが、OSM による造血環境の制御機構の詳細については未だ不明であった。

一方、造血系以外での OSM の作用としては、*in vitro* における解析から、IL-6 ファミリーサイトカインの中で OSM のみが脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を強く抑制することも報告している¹⁹(Figure 1-3)。また、OSM はヒト MSC やマウス MSC の細胞株の骨芽細胞分化を促進させるという報告もなされており^{20,21,22}、骨再生分野において近年注目され始めている。しかしながら、骨芽細胞分化への作用を介した骨髄造血能への影響について、*in vivo* における検討は不十分であり、OSM の造血環境への作用は未解明な点が多い。以上の背景から、OSM は骨髄内において MSC に作用し、脂肪細胞分化を抑制する一方で、骨芽細胞分化を促進することで、骨髄造血環境の形成と維持に関わっているのではないかと考えられた (Figure 2)。

3. 本研究の目的

本研究では、骨髄環境における造血ニッチ細胞に分化するとされる MSC の分化に焦点を当て、OSM KO および OSMR KO マウスの利用や *in vitro* 解析、OSM の *in vivo* 投与実験などにより、OSM による骨髄造血環境の制御機構の解明を目指した。

正常時



傷害時

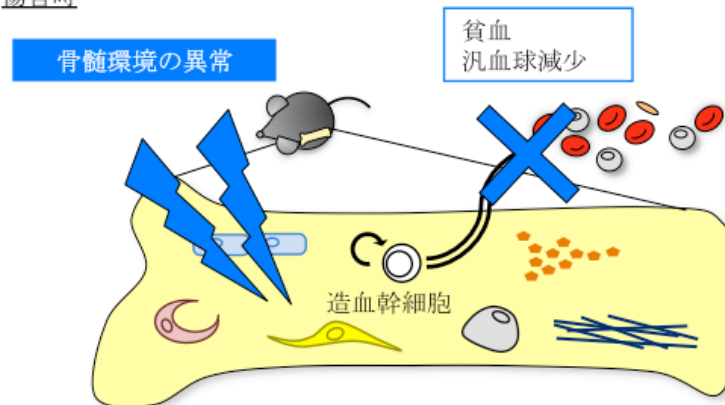


Figure 1-1 成体の骨髄造血環境のモデル図

（上段）正常時の骨髄造血環境

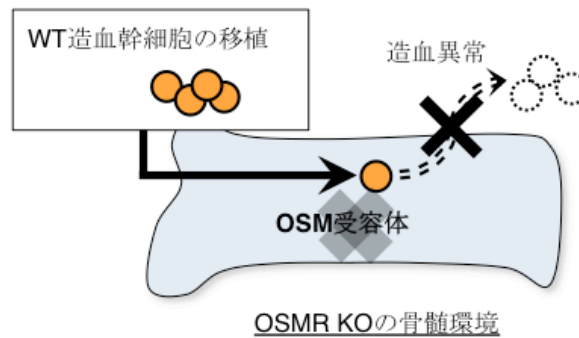
骨髄内には血液細胞の他に、間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell: MSC）、骨芽細胞、脂肪細胞、内皮細胞などの様々な細胞種が存在し、それらの細胞が産生するサイトカインや細胞外基質等によって造血環境が維持されている。

（下段）傷害時の骨髄造血環境

骨髄環境に異常をきたすと、造血幹/前駆細胞が正常な増殖と分化を遂げられず、貧血や汎血球減少などの造血障害を引き起こす。

OSMR受容体欠損マウス(OSMR KO)

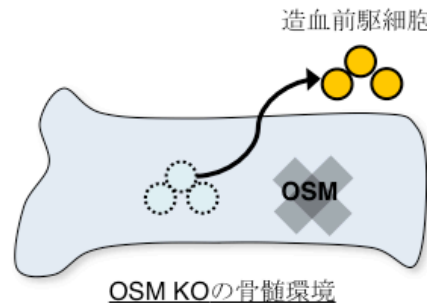
軽度の貧血及び血小板減少を呈する
WT造血幹細胞を移植しても、貧血症状が回復しない



Tanaka et al. *Blood*, 2003; 102:3154-3162.

OSM欠損マウス(OSM KO)

軽度の貧血及び血小板減少を呈する
造血前駆細胞が骨髄内に保持されず、末梢血中に流出し易い

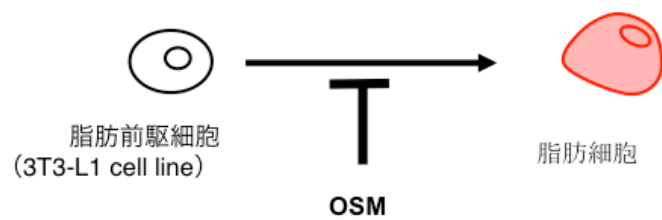


Minehata et al. *Int J Hematol.* 2006;84: 319-327.

Figure 1-2 OSMR KOマウス及びOSM KOマウスの骨髄造血環境

(上段) OSMR KOマウスは貧血及び血小板減少を呈する。OSMR KOマウスにWTの造血幹細胞を移植しても、正常に造血されず、貧血症状は回復しない。

(下段) OSM KOマウスは貧血及び血小板減少を呈する。OSM KOマウスの骨髄では、造血前駆細胞が骨髄中に保持されずに末梢血中に流出しやすくなっている。OSM KOマウスも、貧血及び血小板減少を呈する。



Miyaoka et al. *JBC* 281, 37913-20. (2006)

Figure 1-3 造血系以外へのOSMの機能

脂肪前駆細胞株（3T3-L1）を用いた *in vitro* における解析から、IL-6ファミリーサイトカインの中で、OSMのみが脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を強く抑制する。

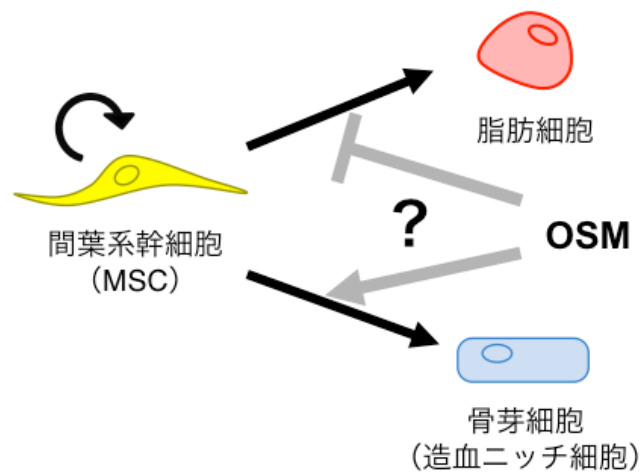


Figure 2 骨髄環境におけるOSM作用の作業仮説

骨髄内において、MSCに作用し、脂肪細胞分化を抑制し、一方で、骨芽細胞分化を促進することで、骨髄造血環境の形成と維持に関わっているのではないかと考えた。本研究では、骨髄環境における造血ニッチ細胞に分化するとされるMSCの分化に焦点を当て、OSMによる骨髄造血環境の制御機構の解明を目指した。

第 2 章 材料と方法

マウス

日本クレア社より購入した C57BL6/J 系統マウスを用いた. Ly5.1 コンジェニックマウスは理化学研究所バイオリソースセンターより購入した. OSM KO マウス及び OSMR KO マウスは当研究室で作製され, SFP 施設で維持されたものを使用した. すべての動物実験は, 東京大学の実験動物指針に基づいて行った.

脾臓切除術及びブスルファン投与

マウスに吸引麻酔を施した後, 左腹部が上になるようにマウスを手術台上に静置し, 左腹部(脾臓がある辺り)から開腹した. 脾臓を体外に露出させて脾門部の血管を結紮した後, 脾臓を摘出した. その後, 腹膜と外皮を絹糸でそれぞれ縫合した (Vicryl; Ethicon, Inc., Somerville, NJ, USA). ブスルファン溶液は, 10 mg ブスルファン (B-2635; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を 1 mL アセトン (Wako) に溶解させた後, フィルター滅菌済の蒸留水 4 mL を加えて混和した. 骨髄傷害を誘導するため, 20 mg/kg でブスルファン溶液を, 29 G マイジェクターを用いて, 1 週間毎に 3 回腹腔投与した (Figure 6a).

ヘマトクリット値及び血清エリスロポエチン濃度の測定

マウス尾静脈から, Micro-Hematocrit Capillary tubes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に末梢血を採血し, 3000 rpm, 20 分間遠心した後, 全容積及び赤血球容積を長さで測定し, ヘマトクリット値を算出した. また, 遠心後の Micro-Hematocrit Capillary tubes から血清 (Capillary tube 上部の透明部分) を採取した. 血清エリスロポエチン濃度は, mouse EPO ELISA kit (MEP00B; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した.

骨切片の作製

マウス大腿骨を 10%中性緩衝ホルマリン溶液 pH 7.0-7.5 (Wako Chemical Co., Kyoto, Japan) に浸漬し, 4℃で 24 時間固定した. 4 時間流水洗浄した後, 脱灰液 B(0.5 M EDTA, pH7.4) (Wako) に浸漬し, 4℃で攪拌しながら, 12 日間かけて脱灰した. その後, 4 時間流水洗浄した. 凍結切片を作製する場合は, 5, 10, 15, 20% スクロースに 6 時間ずつ浸漬した後に OCT コンパウンド (Sakura finetek Inc.) に包埋し, クリオスタット (MICROM HM 525, Thermo) を用いて 14 μm に薄切した. パラフィン切片を作製する場合, 流水洗浄後に, 70, 80, 90, 95, 100, 100% エタノールに 1 時間ずつ浸漬して徐々に脱水し, キシレンで透徹した. 更に, 60℃のインキュベーターでパラフィン溶液に浸漬した後, パラフィン包埋した. パラフィン切片は 8 μm に薄切した.

免疫組織化学的解析

パラフィ切片を, キシレン, 100, 100, 95, 90, 70%エタノールに 5 分ずつ浸漬して脱パラフィン処理をした後, PBS で洗浄し, 0.2% Triton X-100 (Wako) を載せて浸透化処理をした. PBS 洗浄後, 5%スキムミルク-PBS 溶液で室温, 30 分間ブロッキングした. 一次抗体には, goat anti-mouse OSM R antibody (1:20) (R&D systems) 及び goat IgG (1:500) (Vector Laboratories, Inc.), 二次抗体には anti-goat Alexa Fluoro 555 secondary antibody (1:1000) (Invitrogen), 核染色には Hoechst 33342 (Sigma) を用いた. Fluoview 1000 confocal scanning microscopy setup (FV10-ASW; Olympus) を用いて撮影した.

PaS 細胞の調製及び維持培養

PaS細胞の調製は, Morikawaらの報告を参考にして行った¹¹. マウス骨髄を大腿骨及び脛骨に解剖した後, 23Gの針 (Terumo) を使ってPBSで骨髄 (marrow部) をフラッシュした. 骨を細

かく砕いて、乳鉢ですりつぶした後、0.2%コラゲナーゼ溶液（Sigma）に入れ37℃で30分間攪拌した。その後、反応溶液を70 μ m ストレーナーに供して、溶液中に遊離した細胞を回収し、1300 rpm, 20分間遠心分離し、溶血バッファー（0.38% NH₄Cl）を用いて氷浴中で7分間溶血した後、3% FBS-PBS溶液で2回洗浄した。氷浴中でanti-FcRと15分間インキュベートした後、1次抗体としてAPC-conjugated rat anti-mouse PDGFR α （APA5, eBioscience）、FITC-conjugated rat anti-mouse Sca-1（E13-161.7, BD Bioscience）、PE-conjugated rat anti-mouse CD45（30-F11, BD Bioscience）、及び PE-conjugated rat anti-mouse TER119（TER-119, eBioscience）を反応させた。その後、死細胞除去のためにpropidium iodideで染色した後、CD45⁺ TER119⁻ PDGFR α ⁺ Sca-1⁺ の画分をMoflo XDP（Beckman-Coulter）を用いて分取した。データ解析にはFlowJo softwareを用いた。P α S細胞は、10% FBS（JRH bioscience, Inc.）、Penicillin Streptomycin Glutamine（Invitrogen）、及び Guluta-Max（Invitrogen）を添加した α -MEM（Invitrogen）を用いて維持培養した。継代時の細胞分散には、0.25% Trypsin-EDTAを用いた。

脂肪細胞への分化誘導培養

P α S 細胞の脂肪細胞分化誘導培養は、Adipogenic Induction Medium/Adipogenic Maintenance Medium（Lonza, PT-3004）、及び Adipogenic Induction/Adipogenic SingleQuots Kit（Lonza）を使用した。WT 及び OSM KO マウス骨髄から調製した P α S 細胞を 10,000 cells/wells の播種密度で 6-well plate（Corning Incorporated, 3516）に播き込み、サブコンフルエントになるまで維持培地で培養した。サブコンフルエントになった時点で、培地を Adipogenic Induction Medium に交換して分化誘導培養を開始した。OSM（10 ng/mL）の添加は、誘導培養時のみに添加した（Figure 7a）。脂肪細胞分化の評価を行うために、脂肪滴を染色する Oil red O 染色を行った。染色方法は先行研究を参考にして行った¹⁹。

骨芽細胞への分化誘導培養

骨芽細胞への分化誘導培養には，Osteogenic induction medium (Lonza, PT-3002)，及び Osteogenic SingleQuots Kit (Lonza) を使用した．30,000 cells/well の播種密度で 6 well-plate に PαS 細胞を播き込み，細胞が接着した後，OSM (10 ng/mL) の添加あるいは非添加の条件下で分化誘導培養を開始した．骨芽細胞分化に伴うカルシウム産生を評価するため，アリザリンレッド S 染色を行った．染色液は，Alizarin red S (Sigma, 01-2180-2) を蒸留水に溶解し，0.25%アンモニア水を用いて pH 6.38 に調製したものを使用した．培養後の細胞を，95%エタノールを用いて室温下で 10 分間固定した．蒸留水で洗浄後，アリザリン溶液を入れて室温で 10 分間染色した．その後，蒸留水，95% エタノールで洗浄した．

定量的 RT-PCR

Trizol reagent (Invitrogen) を用いて骨髓，脾臓，及び肝臓の RNA 抽出を行った．DNase I (Invitrogen) 処理を施した後に，total RNA を Prime Script RT reagent Kit (TaKaRa) を用いて RT 反応させ，cDNA を作製した．Real-time PCR には，Light Cycler (Roche, Mannheim, Germany) を用いた． β -actin で標準化した．用いたプライマー配列は Table 1 に示した．

LSK 細胞の調製

マウス大腿骨から 23G 針を用いて骨髓をフラッシュして回収し，溶血処理した後，PE conjugated anti-mouse CD3e (145-2C11, BD Bioscience)，CD4 (L3T4, BD Bioscience)，CD8a (53-6.7, BD Bioscience)，B220 (RA3-6B2, BD Bioscience)，Mac-1 (M1/70, BD Bioscience)，Gr-1 (RB6-8C5,eBioscience)，Ter119 (TER-119,eBioscience)，FITC conjugated anti-mouse Sca-1 (E13-161.7, BD Bioscience)，and APC conjugated anti-mouse c-Kit (2B8, BD

Bioscience) (1:200) の一次抗体と、氷浴中で 15 分間インキュベートした。PSB で洗浄した後、anti-PE microbeads (1:9) (Miltenyi Biotec) と 4℃で 15 分間インキュベートした。その後、自動磁気細胞気分離装置 auto MACS (deplete, 2 回) を用いて Lin⁺ 細胞 (CD4⁺, CD8a⁺, B220⁺, Mac-1⁺, Gr-1⁺, Ter119⁺) を除去した。MACS 後のネガティブフラクション (Lin⁻) からセルソーターMoflo XDP を用いて、Lin⁻Sca-1⁺cKit⁺画分を分取した。

PaS 由来骨芽細胞と LSK 細胞の共培養

WT-PaS を Moflo にて分取した後、WT- PaS を 600 cells/well の播種密度で 96 well plate (Corning Incorporated, 3595) に播種した。PaS 細胞をサブコンフルエントになるまで維持培地で培養し、その後、骨芽細胞分化誘導培地に切り替え、OSM 添加あるいは非添加で培養した。OSM 添加あるいは非添加の条件下で骨芽細胞へ分化誘導培養した 7 日目の細胞をフィーダー層として用いた。7 日目に調製した LSK 細胞を、5,000 cells/well の播種密度でフィーダー層の上に播種した (Figure 9a)。LSK 細胞との共培養は Sugimura らの報告を参考にして改変した。10 ng/mL recombinant mouse SCF (PEPRO TECH, Inc., 25003) , 20 ng/mL recombinant mouse TPO (SIGMA, T4184) 及び penicillin/streptomycin (GBCO, 15070) を添加した HSC culture medium (Stem Span SFEM medium, Stem Cell Technologies, Inc. 09600) を用い、37℃, 4% O₂, 5% CO₂ の条件下で 7 日間共培養した。2-3 日毎に 100 µl ずつ、培地交換を行った。LSK 細胞の再解析は、APC-Cy7 conjugated anti-mouse CD45, lineage markers (上記参照) , anti-mouse Sca-1, and anti-mouse c-Kit により染色した後、FACS Canto II (BD) を用いて行った。細胞は CD45 positive ゲートの中から Lin⁻Sca-1⁺cKit⁺画分を解析した。

OSM 投与による治療効果の検討

WT マウス (Ly5.2) に致死量 X 線 (9.5Gy) を照射した後、ドナーWT マウス (Ly5.1) から調製した骨髓細胞を 2×10^6 cell/mouse の量で、29G マイジェクターを用いて尾静脈から移植した。

OSM 投与群では、移植細胞を OSM-PBS 溶液に溶解することで、移植と同時に OSM 投与を開始した (Figure 10a)。1 回 600 ng/匹の OSM を、1 日 2 回 (10:00 及び 18:00) 7 日間腹腔内投与した。その後、Oil red O 染色を行うことで、骨髓環境を検討した。更に、7 日目、14 日目、21 日、及び 28 日目において、マウス尾静脈より微量採血し、pocH-100iV (Sysmex) を用いて血液検査を行い、造血の回復を検討した。また、骨髓造血能のみに注目するために、脾臓を切除したマウスにおいても同様に骨髓移植後に OSM 投与を行い、経時的に血液検査を行った (Figure 10f)。

Table 1. 定量的 RT-PCR に用いたプライマー配列

OSM	Forward	tgctccaactcttctctcag
	Reverse	caggttttggaggcggata
IL-6	Forward	gctaccaaactggatataatcagga
	Reverse	ccaggtagctatggtactccagaa
LIF	Forward	aacgggacagagaagaccaa
	Reverse	agggaggcgctcaggtat
CNTF	Forward	tgattcccaggcacaaaatc
	Reverse	ccctgcctgaatcagaggt
PPAR γ	Forward	caagccctttaccacagttga
	Reverse	cagctcttgtgaatggaatgtc
Adipsin	Forward	ctgggagcggtgtatgt
	Reverse	cacggaagccatgtaggg
Perilipin	Forward	ggatggagacctccctgag
	Reverse	ctcacaggtcccgctcac
ALP	Forward	aatgaggtcacatccatcctg
	Reverse	cacccgagtggtagtcacaa
OPN	Forward	cccggtgaaagtgactgatt
	Reverse	ttcttcagaggacacagcattc
OCN	Forward	agactccggcgctacctt
	Reverse	ctcgtcacaagcagggttaag
TPO	Forward	tagcctgggagaatggaaaa
	Reverse	tccctccagtagaagggaca

第 3 章 結果

1-1 OSM KO マウスの骨髄造血の解析

当研究室では, OSM KO マウス及び OSMR KO マウスは貧血症状を示すがその程度は軽微なものであると報告してきた. OSM KO マウス及び OSMR KO マウスにおいて, コロニーアッセイにより成体の造血能を検討した結果, 骨髄細胞のコロニー形成能が低く, その一方で, 脾臓細胞のコロニー形成能が亢進していることを明らかとしてきた^{17,18}. この結果により, 骨髄造血能の低下を補うために, 髄外造血器である脾臓が造血を亢進させていることが示唆される. そこで, 本研究では, 髄外造血器である脾臓を切除し (脾摘), 骨髄造血を全身に反映させることで, 骨髄環境のみによる造血を検討した. 脾摘後のマウスの末梢血のヘマトクリット値を, 1 週間毎に 8 週間に渡り測定した. その結果, WT マウスでは脾摘後も, 脾摘前と同程度の値を示し, その後も 8 週間持続していた (Figure 3a). これに対し, OSM KO マウスでは, 脾摘して 1 週間後にすでに, ヘマトクリット値は約 40%に低下し, 以降 8 週間連続して 40%前後で推移し, 貧血症状を維持していた.

赤血球産生に必須のサイトカインであるエリスロポエチン (Erythropoietin: EPO) は, 成体の腎臓内で低酸素に応答する低酸素誘導因子 (Hypoxia-inducible factor: HIF) により産生量が調節されている²³. 例えば, 大量出血による貧血で低酸素状態になると, HIF の転写を介して EPO の発現が誘導され, 赤血球が増産される. 一方で, 腎臓疾患により EPO 濃度が低下した場合には, 赤血球産生が低下し, 貧血症状を呈する.

そこで, OSM KO マウスにおける貧血は, EPO 濃度の低下によるものかを検討するため, WT および OSM KO マウスの血清 EPO 濃度を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により測定した. その結果, WT マウスでは, 脾摘 1 週間後において, EPO 濃度は 3.9 倍に上昇していた (Figure 3b). WT マウスでは, EPO 濃度が上昇することでヘマトクリット値が正常値に維持されていることが明らかとなった (Figure 3a,b). 脾摘 1 週間後の OSM KO マウス

においても、同様に、EPO 濃度は 2.1 倍に上昇していた。この結果は、OSM KO マウスでは、低酸素応答により EPO 濃度が上昇しているにもかかわらず、貧血を呈していることを示している。興味深いことに、脾摘前の正常時の血清 EPO 濃度は、OSM KO は WT と比べて 2.8 倍高いことが示された。すなわち、定常状態での OSM KO マウスの貧血症状は EPO 濃度の低下によるものではなく、脾摘後も EPO 濃度の上昇によっては回復しないことが明らかとなった。

1-2 OSM 及び OSMR の発現解析

OSM は IL-6 ファミリーに属するサイトカインであり、その受容体は他の IL-6 ファミリーサイトカインとともに gp130 共役受容体を共有しているため、OSM と他の IL-6 ファミリーサイトカインは類似の生理活性を示すと考えられている¹⁵。そこで、成体の主要な造血器官である骨髄、脾臓及び肝臓における IL-6 ファミリーサイトカインの発現を検討するため、定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析を行った。OSM, IL-6, leukemia inhibitory factor (LIF), 及び ciliary neurotrophic factor (CNTF) の mRNA レベルを、 β -actin により標準化してグラフに示した (Figure 3c)。その結果、OSM は骨髄及び脾臓において高く発現している一方で、肝臓ではほとんど発現していないことが示された。これは先行研究の結果と一致していた²⁴。一方、骨髄における他の IL-6 ファミリーサイトカインの発現が著しく低いことが示された。OSM は骨髄において恒常的に高発現していることから、その機能に興味をもたれた。

そこで、骨髄における OSM の発現細胞の特定を試みた。骨髄細胞を血液細胞 (CD45⁺ または Ter119⁺)、及びそれ以外の細胞 (CD45⁻ または Ter119⁻) に分離し、定量的 RT-PCR による OSM の発現解析を行った。その結果、血液細胞が OSM を発現していることが明らかとなった (Figure 3d)。一方、OSM 受容体 (OSMR) の発現細胞を検討するため、蛍光免疫染色を行った。その結果、OSMR 陽性細胞は骨の近傍に多く存在することが明らかとなった (Figure 3e)。

以上の結果から、OSM が骨髄内において、造血環境の維持に作用することで造血維持に寄与する可能性が強く示唆された。

2-1 OSM KO マウス骨髄は加齢により脂肪髄化が進行する

先行研究において、IL-6 ファミリーサイトカインの中で OSM のみが脂肪前駆細胞及びマウス胎仔線維芽細胞の脂肪細胞分化を強く抑制することが報告されている¹⁹ (Figure 1-3)。一方、骨髄内における脂肪細胞は、造血前駆細胞の増殖を抑制し骨髄造血を負に制御することが報告されている¹²。これらの結果を踏まえると、OSM KO マウスの骨髄内では、OSM による脂肪細胞分化の抑制作用が欠如しているため、骨髄構成細胞のターンオーバーに伴い脂肪細胞が増加することが考えられた。そこで、骨髄内の脂肪細胞分化を検討した。まず、10 週令において、WT 及び OSM KO マウスの骨髄凍結切片を作製して Oil red O 染色を行った。その結果、WT マウスでは骨髄内に脂肪細胞が認められない一方で、OSM KO マウスの骨髄内には脂肪細胞が認められた (Figure 4a)。更に、10 週令の骨髄において、脂肪細胞分化に必須である PPAR γ 、及び成熟脂肪細胞分化マーカーである Adipsin, Perilipin の発現を検討した^{25,26}。その結果、PPAR γ は WT 及び OSM KO マウスで同程度の発現が認められたが、Adipsin 及び Perilipin は、OSM KO マウスでは WT と比べて発現が高い傾向が示された (Figure 4b)。

ヒトの骨髄においては、加齢につれて脂肪細胞の蓄積が進行して脂肪髄化することが知られている¹⁴。そこで次に、OSM KO マウスでは、加齢により脂肪細胞が蓄積し脂肪髄化が進行するか否かを検討した。32 週令の WT 及び OSM KO マウスの骨髄凍結切片を作製し、Oil red O で染色した結果、WT では脂肪細胞が認められない一方で、OSM KO マウスの骨髄では、脂肪細胞が認められた。32 週令の OSM KO マウスでは、10 週令と比べて脂肪細胞が顕著に増加していた (Figure 4c)。更に、定量的 RT-PCR の結果、Adipsin は OSM KO で発現が高い傾向が認められ、Perilipin の発現は、OSM KO では WT の 11 倍に上昇していることが示され、Oil red

O 染色の結果を裏付けていた (Figure 4d). 以上の結果より, OSM KO マウスの骨髄では加齢により脂肪髄化が進行することが示された.

そこで, 加齢により脂肪髄化が進行した骨髄環境における造血能について検討した. 40 週令の WT 及び OSM KO マウスの血液学的解析から, OSM KO マウスの白血球数, 血小板数, 及び赤血球数は, WT と比べて有意に低い値を示していた (Figure 4e). すなわち, 加齢により脂肪髄となった骨髄環境における造血には障害があり, 末梢血において汎血球減少がみられることが明らかとなった. 先行研究では, 若齢の OSM KO マウスが軽度の貧血及び血小板減少症を呈することを報告している^{17,18}. Thrombopoietin(TPO)は, 造血幹細胞の維持に重要であること²⁷や巨核球-赤血球系前駆細胞 (Megakaryocyte-erythroid progenitor: MEP) の増殖と分化, 及び血小板の成熟分化にも重要であること²⁸が報告されていることから, OSM KO マウス骨髄において TPO の発現の低下が予想された. そこで, 32 週令の骨髄における TPO の発現を定量的 RT-PCR により検討した. その結果, OSM KO マウス骨髄では, WT と比べて TPO の発現が有意に低下していることが示された (Figure 4f).

以上の結果から, OSM KO マウスでは加齢により脂肪髄化が進行すること, 及び, 加齢により汎血球減少を呈することが明らかとなった. また, 骨髄における TPO の発現の低下が, 汎血球減少の一因である可能性も示唆された.

2-2 OSM KO マウスでは骨髄傷害後において脂肪髄化が増悪化する

OSM 欠損により加齢による脂肪髄化が進行したことから, 次に骨髄傷害からの造血環境の回復過程における OSM の作用についても検討を行なった. すなわち, OSM が骨髄内の脂肪細胞分化の抑制に寄与しているならば, 骨髄傷害後の再生過程において OSM KO マウスでは脂肪髄化が亢進し, 造血環境が悪化することが予想された. この仮説を検証するため, 骨髄に傷害を与えた後の回復過程における骨髄環境及び造血能を検討した. 実験スケジュールを Figure 5a

に示した．骨髄造血だけを評価するために，髄外造血器の脾臓を切除した WT 及び OSM KO マウスに，ブスルファンを 1 週間毎に 3 回投与し骨髄に傷害を与え，傷害前及び傷害後において，骨髄環境，及び造血能を解析した (Figure 5a)．ブスルファンはアルキル化剤であり，骨髄内の血液細胞だけでなくストローマ細胞にも傷害を与えることが報告されている²⁹．ブスルファンの頻回投与により骨髄傷害を誘導して 7 日後の骨髄の凍結切片を作製し Oil red O 染色した．WT 骨髄中の脂肪細胞は極めて少ないが，OSM KO マウスの骨髄では多くの脂肪細胞が認められた (Figure 5b)．更に，定量的 RT-PCR を行うことにより，骨髄における PPAR γ , Adipsin, Perilipin の発現を検討した．その結果，PPAR γ の発現レベルは，傷害前後において，WT と OSM KO マウス共に同程度であった (Figure 5c)．OSM KO での Adipsin の発現は，傷害後に WT より高い傾向が認められた．Perilipin についても，傷害後の OSM KO で発現が有意に上昇していた．この結果は，Oil red O 染色結果を裏付けるものと言える．以上の結果から，OSM KO マウスの骨髄では，骨髄傷害後において脂肪髄化が増悪化することが示された．

また，骨髄傷害からの回復過程における造血能を検討するため，回復過程において 1 週間毎にヘマトクリット値を測定した．その結果，傷害後の回復過程において，WT のヘマトクリット値は上昇し，21 日目には正常値まで回復した．これに対し，OSM KO のヘマトクリット値は 7 日目まで低下し続け，更に 21 日目においてもヘマトクリット値は回復しないことが示された (Figure 5d)．

以上の結果から，OSM KO マウスでは，脂肪髄化が骨髄傷害後に増悪化し，骨髄造血能の回復が遅いことが示された．すなわち，OSM は骨髄の脂肪細胞分化を抑制することで骨髄造血環境を維持し，造血に貢献する可能性が示された．

3-1 OSM は骨髄由来間葉系幹細胞 MSC の脂肪細胞分化を *in vitro* で強く抑制する

骨髄環境では、様々な細胞種により造血環境が形成されている。近年、Morikawa.らは、放射線照射後のマウスに、骨髄由来間葉系幹細胞 MSC である PDGFR α ⁺Sca-1⁺CD45⁻Ter119⁻ (P α S) 細胞画分を移植すると、P α S 細胞が骨髄内で骨芽細胞に分化し造血ニッチに寄与することを報告している¹¹。また、彼らは、P α S 細胞は、脂肪細胞、軟骨細胞、さらに造血ニッチ細胞とされる骨芽細胞への分化能を有することも示している。

そこで本研究では、造血ニッチ細胞とされる骨芽細胞に分化し得る MSC として P α S 細胞を用い、*in vitro*において OSM が骨髄由来 MSC の脂肪細胞分化を抑制するか否かを検討した。WT 及び OSMR KO マウスの骨髄から P α S 細胞を調製し、それぞれ WT-P α S, OSMR KO-P α S と記すこととした。Figure 6a,b に示すように、WT 及び OSMR KO の骨髄由来 P α S 細胞は、CD45⁻ (non-hematopoietic cells) 画分中に同程度の割合で存在し、WT-P α S 及び OSMR KO-P α S は、間葉系細胞に特異的なスピンドル様形態を示した(Figure 6c,d)。

この P α S 細胞の脂肪細胞への分化誘導培養により OSM の作用を検討した(Figure 7a)。MSC から脂肪細胞への分化誘導は維持培養と誘導培養の2段階で行われるが、OSM の添加は誘導培養時のみ行った。脂肪細胞へ誘導培養後、脂肪細胞内の脂肪滴の蓄積を評価するため、Oil red O 染色を行った。その結果、OSM 添加により WT-P α S の脂肪細胞分化が強く抑制されることが示された (Figure 7b)。一方、OSMR KO-P α S においては OSM 添加で脂肪細胞分化が抑制されないことが確認された。

更に、定量的 RT-PCR により、PPAR γ , Adipsin 及び Perilipin の発現を検討した。すべての遺伝子において、WT-P α S では、OSM 添加により発現が強く抑制された。一方、OSMR KO-P α S では、OSM はすべての遺伝子発現に対して抑制効果が認められなかった(Figure 7c)。

以上の結果から、*in vitro*において、OSMは骨髄由来MSCの脂肪細胞分化を強く抑制することが明らかとなった。

3-2 OSMはMSCの骨芽細胞への分化を促進する一方で、終末分化は抑制する

MSCから分化する骨芽細胞は、骨内膜において、造血ニッチ細胞として機能するという報告がある^{6,7}。この報告と上記の結果を踏まえると、OSMはMSCの脂肪細胞分化を抑制する一方で、骨芽細胞に作用することで、造血ニッチ細胞の維持に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、PαS細胞の骨芽細胞分化に及ぼすOSMの作用を検討した。WTマウス骨髄より調製したPαS細胞を用いて、OSMの添加あるいは非添加の条件下で分化誘導を行なった。まず、骨芽細胞分化に伴うカルシウム産生を評価するAlizarin red S染色では、通常の誘導培養と比べて、OSMを添加した誘導培養では早期に染色が確認され、OSMが骨芽細胞への分化を促進させる可能性が示された (Figure 8a)。さらに、骨芽細胞への分化過程における初期分化マーカーであるALP (骨型アルカリフォスファターゼ)、初期から中期にかけてのマーカーであるOPN (オステオポンチン)、終末期以降のマーカーであるOCN (オステオカルシン)³⁰の遺伝子発現解析を行った。その結果、通常の分化誘導培養では培養12日以降でOPNとOCNの発現が増強し、成熟骨芽細胞に分化することが示された (Figure 8b)。一方、誘導培養にOSMを添加すると、ALPやOPNの発現が早期に誘導されるのみならず、培養12日以降も高い発現を維持した。興味深いことに、OCNの発現は誘導されなかった。この結果から、OSMはMSCの骨芽細胞への分化を促進する一方で、終末分化を抑制している可能性が示唆された。終末分化を抑制する作用を更に検討するため、骨芽細胞分化において終末分化を促進させるdexamethasone^{31,32}を添加する分化誘導培養を行い、OSM作用を検討した。7日目の細胞の遺伝子発現解析の結果、ALP及びOPNはOSM添加により発現が誘導されることが示された (Figure 8c)。一方、OCNの発現はOSMの添加により0.15倍に抑制されることが示され、前述の結果を裏付けるものとな

った。以上の結果より、OSMはMSCの骨芽細胞への分化を促進する一方で、骨芽細胞としての終末分化は抑制することが示された。

前述した様に本研究では、OSM KO マウスの骨髄では、WT と比べて TPO の発現が低下していることを明らかとした (Figure 4d)。この結果から、OSM は骨髄内の TPO の発現を制御している可能性が予想された。そこで、OSM により誘導された未成熟な骨芽細胞における TPO の発現を定量的 RT-PCR により検討した。その結果、OSM により誘導された未成熟な骨芽細胞は、通常の分化誘導培養した骨芽細胞と比べて TPO の発現が 4.6 倍に増強していることが示された (Figure 8d)。この結果から、OSM により誘導された未成熟な骨芽細胞では造血因子 TPO の発現能が高く、それが造血支持に寄与する一因となる可能性が示された。

3-3 OSM により分化した未成熟な骨芽細胞は高い造血支持能を有する

実際に OSM により分化した未成熟な骨芽細胞が、造血支持能にどのような影響を及ぼすかを検討するため、OSM により誘導された未成熟な骨芽細胞と、造血幹細胞を含む Lin⁻Sca-1⁺cKit⁺ (LSK) 細胞画分との共培養系を構築した (Figure 9a)。WT マウス骨髄より調製した PαS 細胞を OSM 添加あるいは非添加の条件下で骨芽細胞へ誘導培養し、7 日目の細胞をフィーダー層とし、以下それぞれを OSM-Ob、及び Ob と記した。各々のフィーダー層の上に、マウス骨髄から調製した LSK 細胞画分を播種し 7 日間共培養した。LSK 細胞との共培養 3 日目において、細胞形態を観察した結果、OSM-Ob-feeder との共培養した LSK 細胞では、未分化性の高い血液細胞に特徴的な cobble-stone 様 (敷石状) の増殖形態を示した (Figure 9b)。7 日間共培養した後、増殖した細胞の総数を検討した。その結果、OSM-Ob をフィーダー層とした場合では、Ob の場合と比べ、総細胞数は有意に高いことが示され、OSM-Ob は増殖を支持する能力が高いことが示された (Figure 9c)。更に、増殖した細胞中に存在する LSK 細胞画分 (造血幹細胞を含む画分) の割合を検討するため、フローサイトメトリー (FACS) を用いて LSK

細胞を再解析した。その結果、OSM-Ob と共培養した場合では、Ob と共培養した場合に比べて、共培養後の LSK 細胞の割合が高く (Figure 9d,e), LSK 細胞数は増加することが示された (Figure 9f)。

以上の結果から、OSM により誘導された未成熟骨芽細胞は、LSK 細胞の維持及び増殖に寄与することが明らかとなり、未成熟骨芽細胞による造血因子 TPO の発現上昇がその一因として示唆された。

4 OSM 投与による治療効果の検討

骨髄では OSM の産生源は血液細胞であるため、抗がん剤治療や放射線照射により骨髄に傷害を受けると、脂肪髄化することが知られている。この原因の一つとして、骨髄傷害により OSM の産生源である血液細胞が減少することで一時的に OSM の産生が低下することが考えられる。そこで、X 線照射による骨髄移植モデルを用いて、骨髄傷害後に OSM を投与することで、脂肪髄化及び造血の回復を検討した (Figure 10a)。X 線照射後、骨髄移植と同時に OSM 投与を開始し、600 ng/匹、1 日 2 回、7 日間、OSM を投与した。7 日目の骨髄を Oil red O 染色した結果、コントロール群では骨髄内に脂肪の著しい蓄積が認められる一方で、OSM 投与群の骨髄は、脂肪細胞は極めて少ないことが示された (Figure 10b)。更に、定量的 RT-PCR により成熟脂肪細胞分化マーカーである Adipsin 及び Perilipin の発現を検討した。その結果、OSM 投与群の骨髄ではコントロール群と比べて、Adipsin は 0.48 倍、Perilipin は 0.081 倍に発現が強く抑制されることが示された。以上の結果から、OSM 投与は放射線照射後の骨髄内の脂肪細胞分化の抑制に有効であることが示され、造血環境の回復にも寄与しうることが示唆された (Figure 10c)。

本研究ではこれまでに、OSM は MSC からの TPO の発現を増強することを明らかとしてきた。In vivo で OSM 投与により、骨髄内における TPO の発現が増強することが予想された。

そこで、定量的 RT-PCR により TPO の発現を検討した結果、OSM 投与群の骨髄ではコントロール群と比べて TPO の発現が有意に上昇していることが示された (Figure 10d). この結果は、Figure 8d に示した *in vitro* の結果と一致していた。

次に OSM 投与による末梢血の回復効果を検討するために、7, 14, 21, 及び 28 日目にコントロール群及び OSM 投与群の血液検査を行った (Figure 10a). 白血球数においては、コントロール群及び OSM 投与群ともに 14 日目以降に上昇するが、OSM 投与群は、コントロール群と比べて常に有意に高い値で推移し、白血球数の回復が早いことが明らかとなった。血小板数においては、コントロール群及び OSM 投与群ともに 21 日目以降に上昇を始めた。血小板数の回復過程において、OSM 投与群では、コントロール群と比べて高い傾向が示された。ヘモグロビン量、赤血球数、及びヘマトクリット値は、同様の推移を辿り、21 日目において OSM 投与群では、コントロール群と比べて有意に高い値を示し、回復が早いことが示された。28 日目においては、コントロール群及び OSM 投与群の白血球数は傷害前の正常値レベルにまで回復した。平均赤血球容積は、コントロール群及び OSM 投与群のいずれの群においても正常値の範囲で推移した (Figure 10e). 以上の結果から、OSM 投与群では、骨髄傷害後の白血球数、血小板数、赤血球数が早期に回復することが示され、OSM 投与による骨髄造血能の早期回復効果が示された。

更に、脾臓による補助的な髄外造血の影響を排除した場合についても、骨髄移植モデルを用いて OSM 投与による治療効果の検討を行った。脾摘したマウスに、X 線照射後、骨髄移植と同時に OSM 投与を開始し、600 ng/匹、1 日 2 回、7 日間、OSM を投与した。7, 14, 21, 及び 28 日目にコントロール群及び OSM 投与群の血液検査を行った (Figure 10f). 白血球数において、OSM 投与群では、21 日目においてコントロール群と比べて有意に高い値を示し、早期に回復することが明らかとなった。血小板数においては、OSM 投与群では、14 日目及び 21 日目においてコントロール群と比べて有意に高く、回復が早いことが示された。ヘモグロビン量、赤

血球数、及びヘマトクリット値は同様の推移を辿り、21日目において、OSM投与群では、コントロール群と比べて有意に高い値を示し、回復が早いことが示された。

髄外造血の影響を排除することで、骨髓造血に与えるOSM作用の効果がより顕著に示され、骨髓造血の回復において、OSM投与が有用であることが明らかとなった。

以上の結果から、OSM投与は脂肪髄化の進行を抑制することが明らかとなった。更に、OSM投与により、造血の回復を早期に誘導できる可能性が示された。また、骨髓移植モデルにおいて、初期の7日間にOSM投与することで脂肪髄化を抑制し、骨髓造血環境を維持する事が、その後の造血の回復に重要であることが示唆された。一方で、OSMはMSCにおけるTPOの発現を上昇させることで造血の回復に寄与するという可能性も示された。

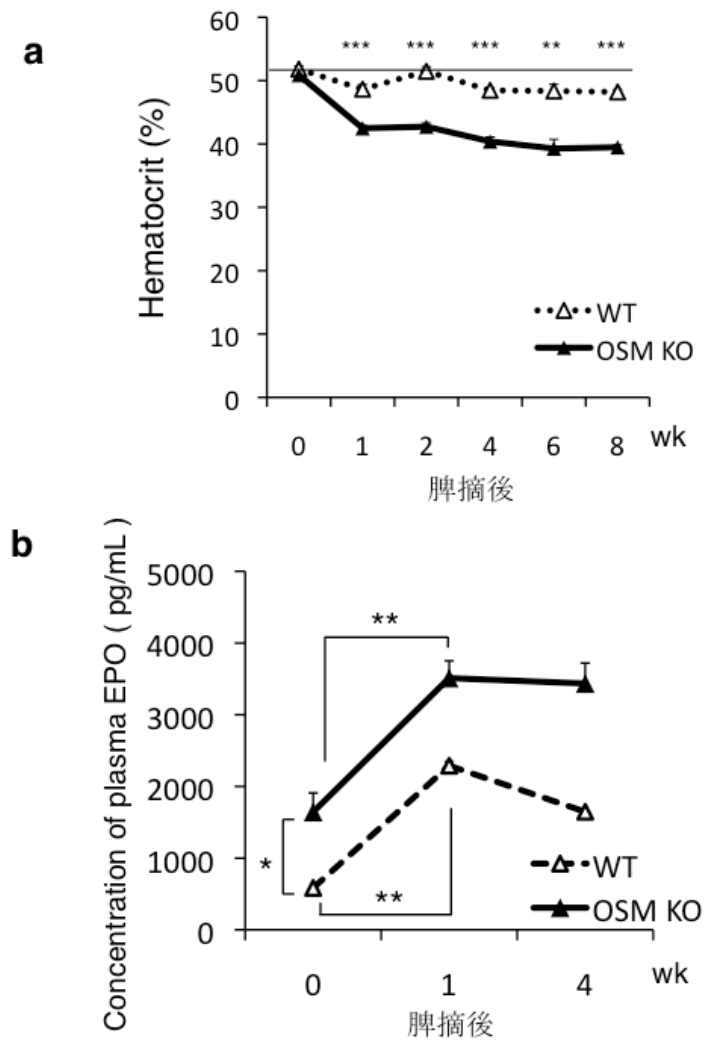


Figure 3 OSM KOマウスは血清EPO濃度が上昇しているにもかかわらず、貧血症状を呈する

(a) 脾摘したWT及びOSM KOマウスの尾静脈からヘマトクリット管に微量採血し、遠心分離後、ヘマトクリット値を測定した。測定は1週間毎に8週間行った。

(WT, n=4; OSM KO, n=4; Bar, SEM ; Student's t-test, **P<0.01, ***P<0.001)

(b) 脾摘したWT及びOSM KOマウスの血清中EPO濃度をELISAにより測定した。

(WT, n=4; OSM KO, n=4; Bar, SEM; Student's t-test, *P<0.05, **P<0.01)

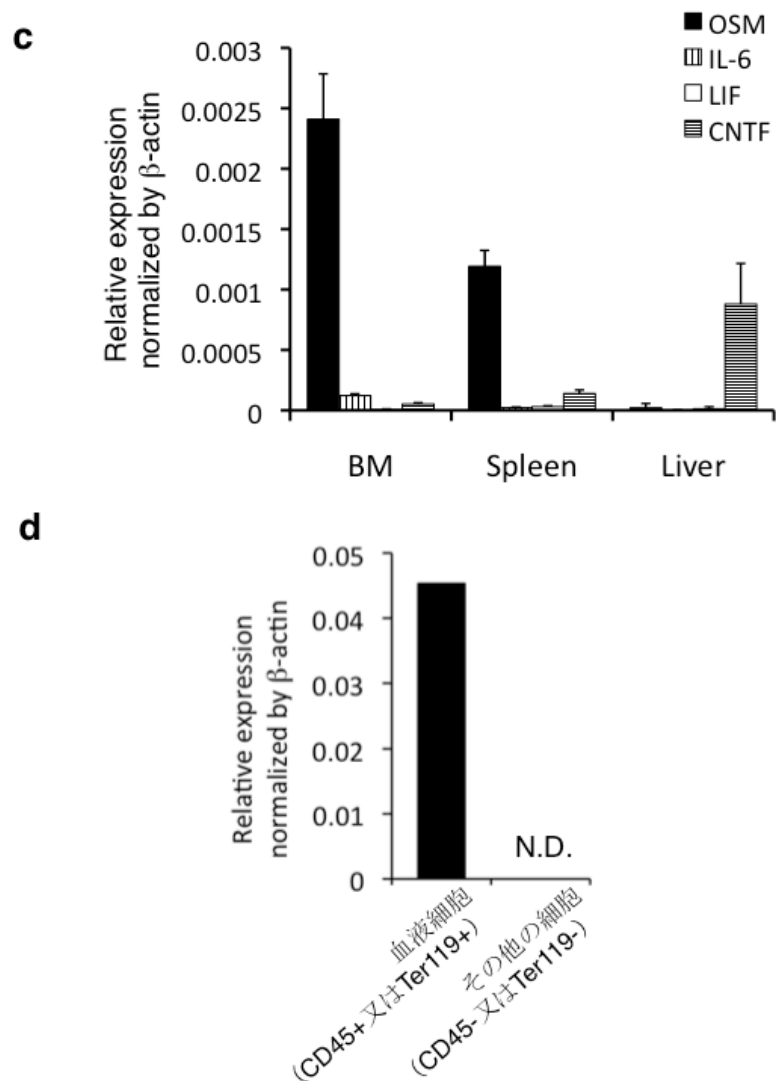


Figure 3 定量的RT-PCRによる遺伝子発現解析

(c) 骨髄において、IL-6ファミリーサイトカイン（OSM, IL-6, LIF, CNTF）の発現を検討し、脾臓及び肝臓と比較した。それぞれの発現は、 β -actinで標準化してグラフ化した。（n=5; Bars, SEM）

(d) 骨髄細胞を、CD45+またはTer119+の血液細胞と、それ以外の細胞に分離し、OSMの発現を検討した。（n=1, N.D., not detected）

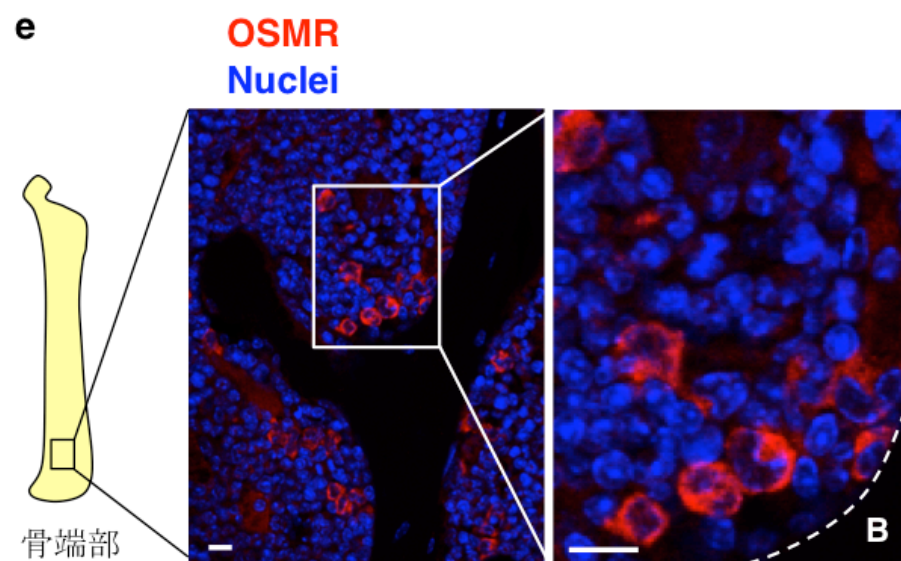


Figure 3 OSMR陽性細胞は骨部の近傍に多く存在する

(e) WTマウス骨髄パラフィン切片を用いたの抗OSMR抗体による組織化学的免疫染色。OSMR陽性細胞は骨部の近傍に多く存在することが観察された。

(赤, OSMR ; 青, 核 ; B, 骨部 ; パラフィン切片8 μm ; Scale bars, 10 μm)

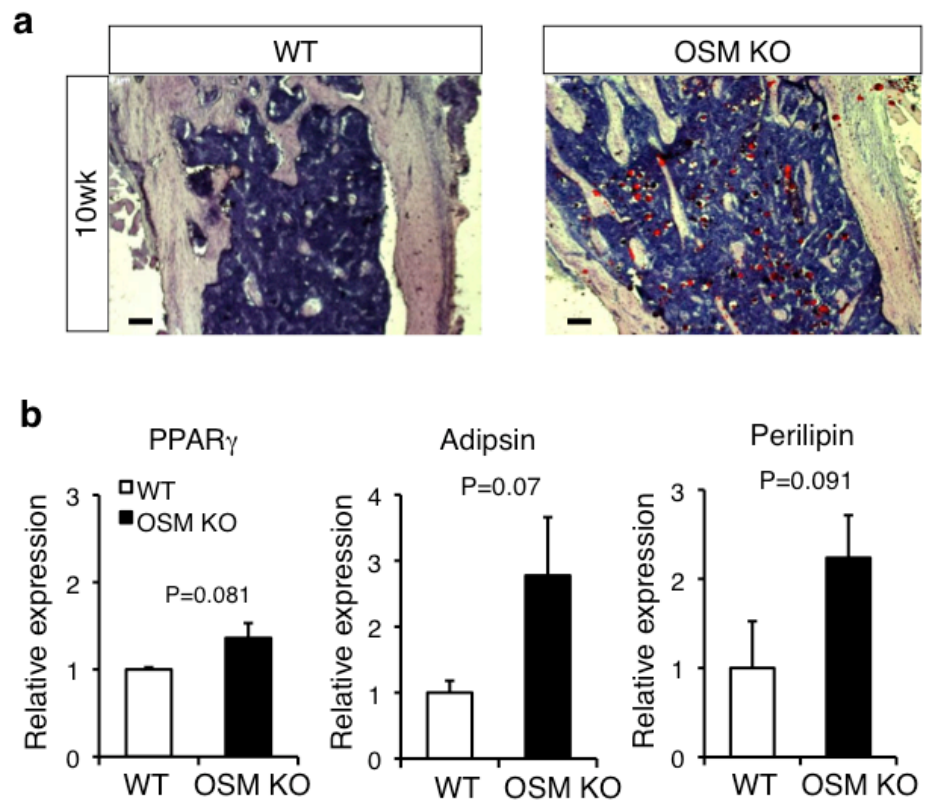


Figure 4 10週令のWT及びOSM KOマウスの骨髄環境の解析

- (a) WT及びOSM KOマウスの骨髄切片を作製し、Oil red O染色を行った。
(同腹仔；14 μ m凍結切片；Scale bars, 100 μ m)
- (b) 定量的RT-PCRにより、脂肪細胞分化に関連する遺伝子の発現解析を行った。脂肪細胞分化に必須であるPPAR γ 、及び成熟脂肪細胞分化マーカーであるAdipsin, Perilipinについて検討した。(WT, n=4; OSM KO, n=4; Bars, SEM ; Student's t-test)

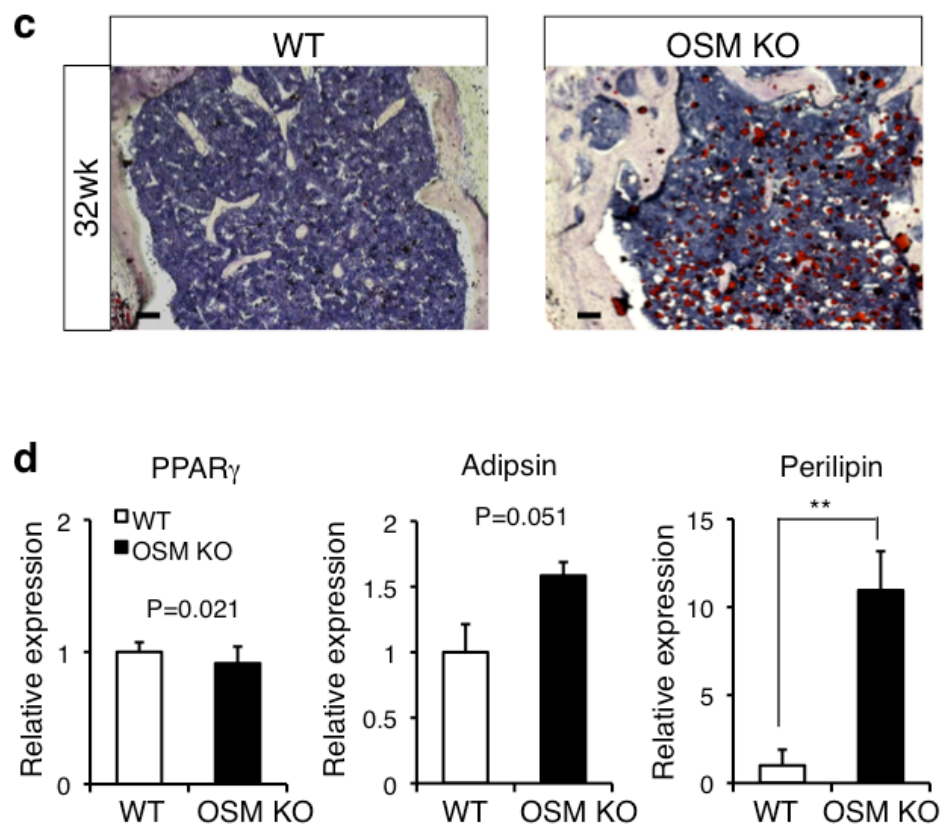


Figure 4 32週令のWT及びOSM KOマウスの骨髄環境の解析

(c) WT及びOSM KOマウスの骨髄切片を作製し、Oil red O染色を行った。

(14 μ m凍結切片；Scale bars, 100 μ m)

(d) 定量的RT-PCRにより、脂肪細胞分化に関連する遺伝子の発現解析を行った。

脂肪細胞分化に必須であるPPAR γ 、及び成熟脂肪細胞分化マーカーであるAdipsin、Perilipinについて検討した。(WT, n=5; OSM KO, n=5; Bars, SEM ; **P<0.01)

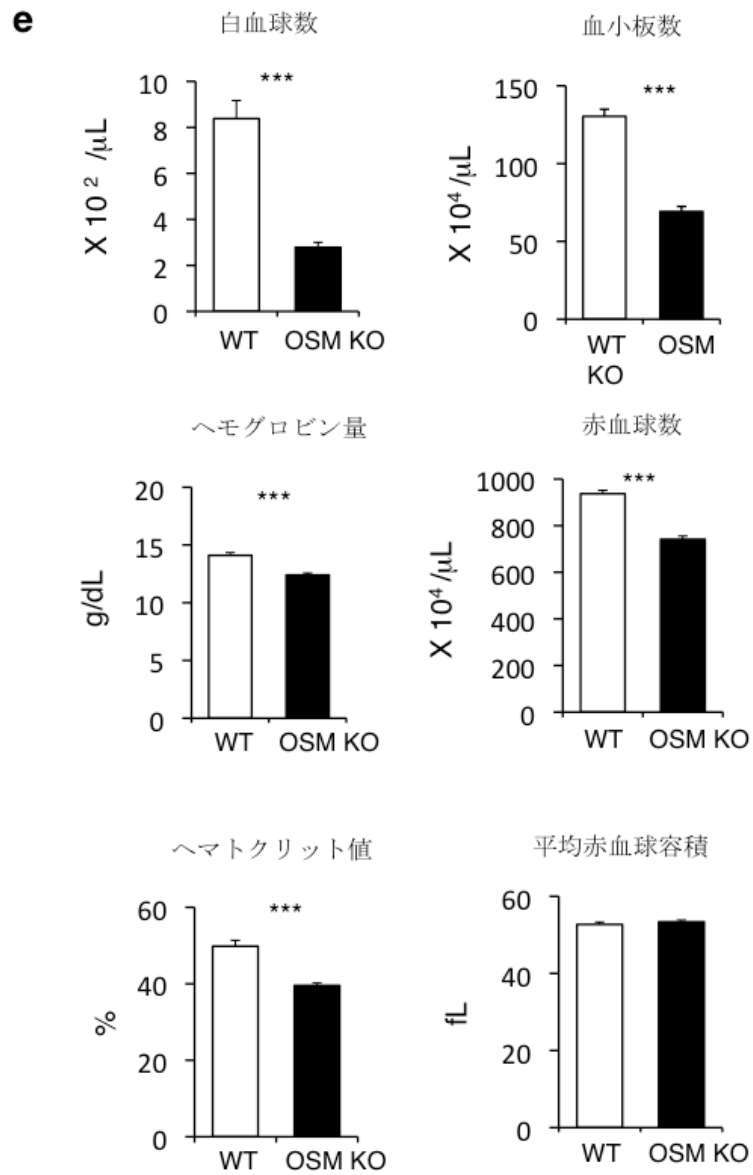


Figure 4 (e) 40週令におけるWT及びOSM KOマウスの血液学的解析

40週令のWT及びOSM KOマウスから採血したのち、オリエンタル酵母株式会社に血液検査を外注した。使用された測定器はSysmex K-4500である。

(WT, n=6; OSM KO, n=7; Bars, SEM ; **P<0.01, ***P<0.001)

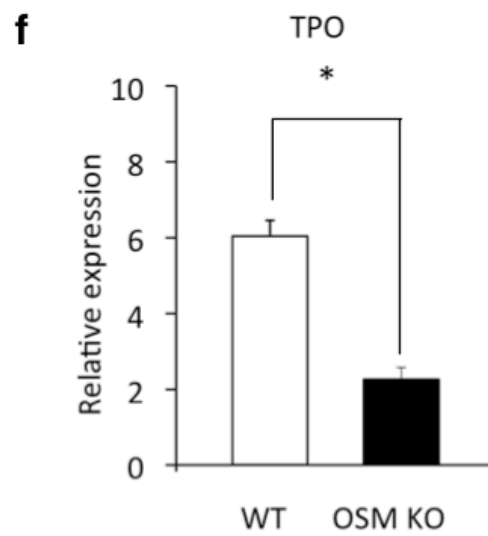


Figure 4 32週令のWT及びOSM KOマウスの骨髓環境の解析

(f) 定量的RT-PCRにより，造血因子(Thrombopoietin:TPO)の発現を検討した.
(WT, n=5; OSM KO, n=5; Bars, SEM ; Student's t-test, *P<0.05)

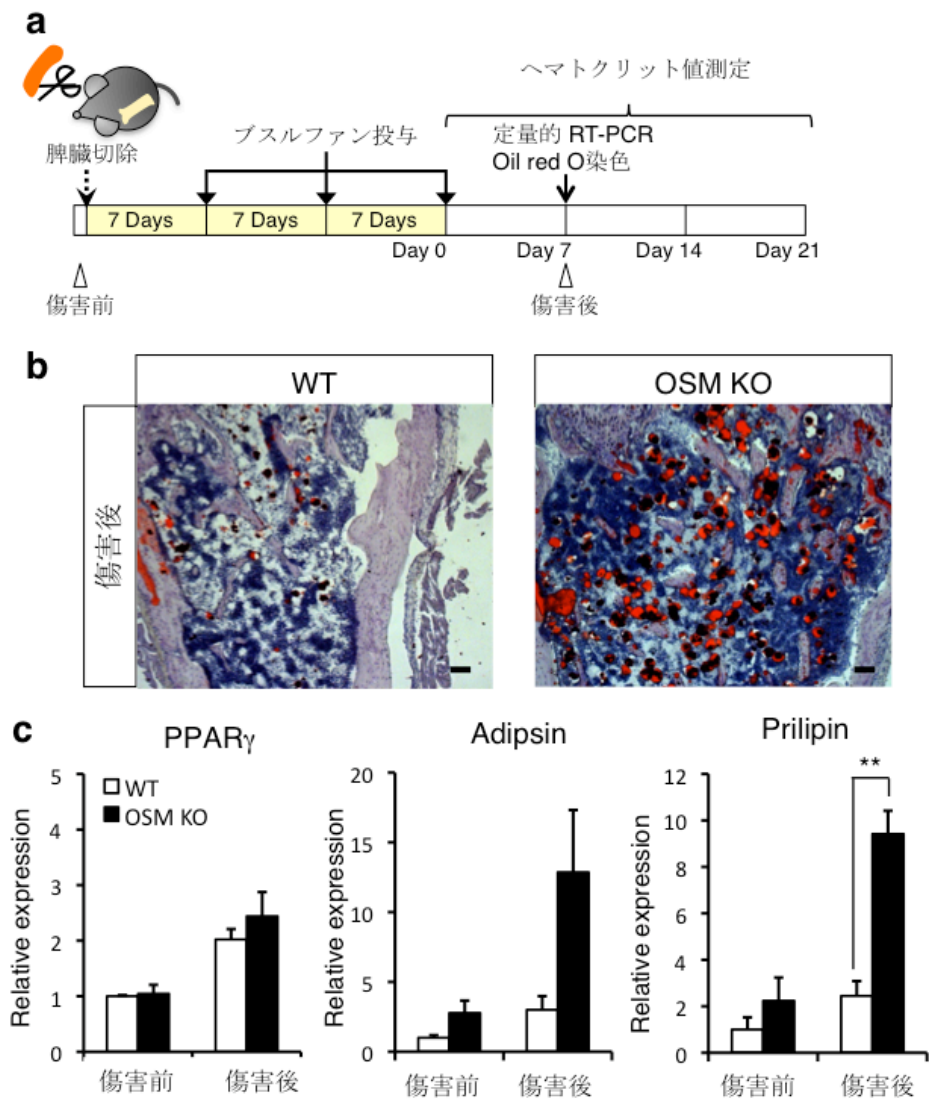


Figure 5 OSM KOマウスでは骨髄傷害後において脂肪髄化が増悪化する

(a) 骨髄傷害誘導のスケジュール. 骨髄造血のみ注目するため脾摘したマウスに、ブスルファン20 mg/kgを1週間毎に3回投与し骨髄傷害誘導し、傷害後における骨髄環境を解析した. 再生過程において1週間毎にヘマトクリット値を測定した.

(b) 28日目の骨髄傷害からの回復過程において、WT及びOSM KOマウスの骨髄切片をOil red O染色した. (同腹仔; 14 μ m凍結切片; Scale bars, 100 μ m)

(c) 定量的RT-PCRによる遺伝子発現解析. (Day 0, n=4; Day 28, n=4; Bars, SEM; Student's t-test, **P<0.01)

d

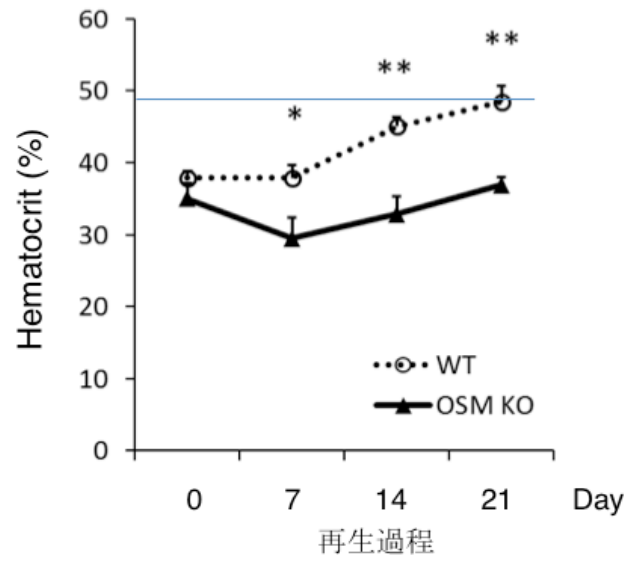


Figure 5 OSM KOマウスでは再生過程において、ヘマトクリット値の回復が遅延する

(d) ブスルファン頻回投与により骨髓傷害を誘導した後、ヘマトクリット値を1週間毎に測定した。(WT: Day 0, 7, n=8; Day 14, 21, n=3; OSM KO: Day 0, 7, n=5, Day14, 21, n=3; Bars, SEM; Student's t-test, *P<0.05, **P<0.01)

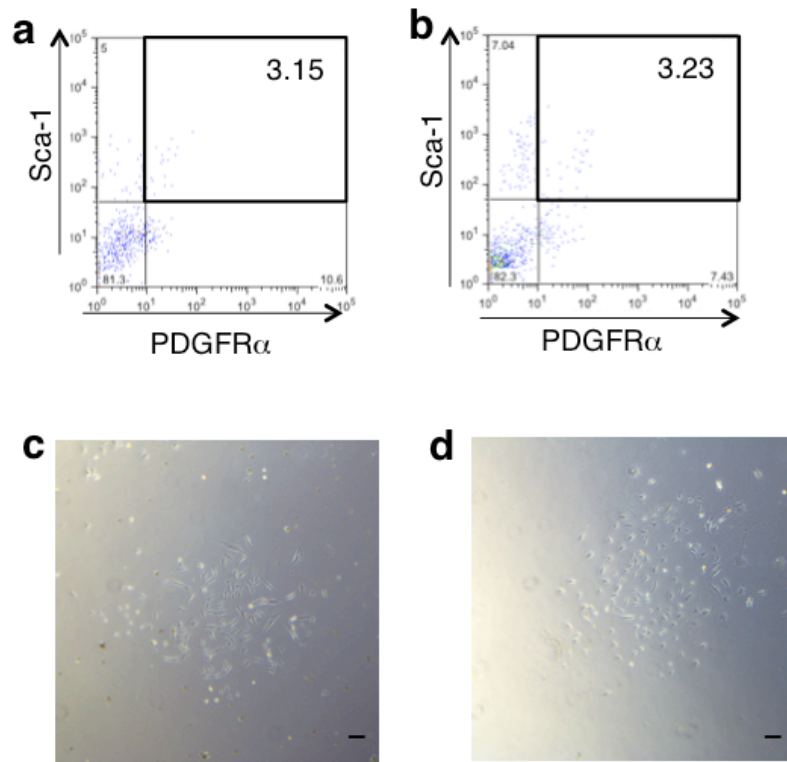


Figure 6 WT及びOSMR KOマウスの骨髄からPDGFRα⁺Sca-1⁺CD45⁻Ter119⁻ (PαS) 細胞を調製した.

(a, b) WT及びOSMR KOの骨髄由来PαS細胞は、CD45⁻ (non-hematopoietic cells) 画分において同程度の割合で存在した. (a) WT, (b) OSM KO.

(c, d) WT-PαS及びOSMR KO-PαSは、間葉系細胞に特異的なスピンドル様形態を示した. (c) WT, (d) OSM KO. (Scale bars, 100 μm)

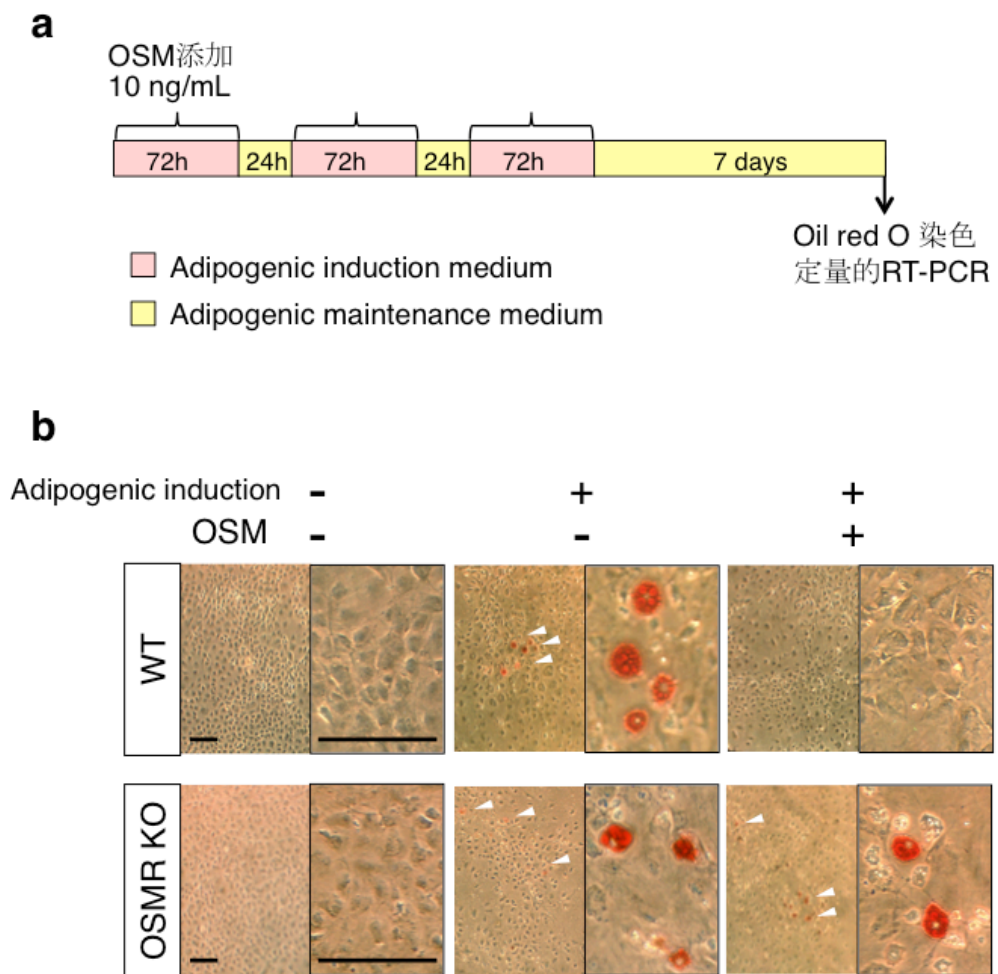


Figure 7 OSMは骨髄由来MSCの脂肪細胞分化を強く抑制する。

(a) PαS細胞を用いて、脂肪細胞へ分化誘導培養を行い、OSMの添加あるいは非添加によりOSMの作用を検討した。脂肪細胞への誘導培養におけるOSM添加は、誘導培養時のみ行った。

(b) 脂肪細胞へ誘導培養後、脂肪細胞内の脂肪滴の蓄積を評価するため、Oil red O染色を行った。(矢頭、脂肪滴が蓄積した脂肪細胞；Scale bars, 100 μm)

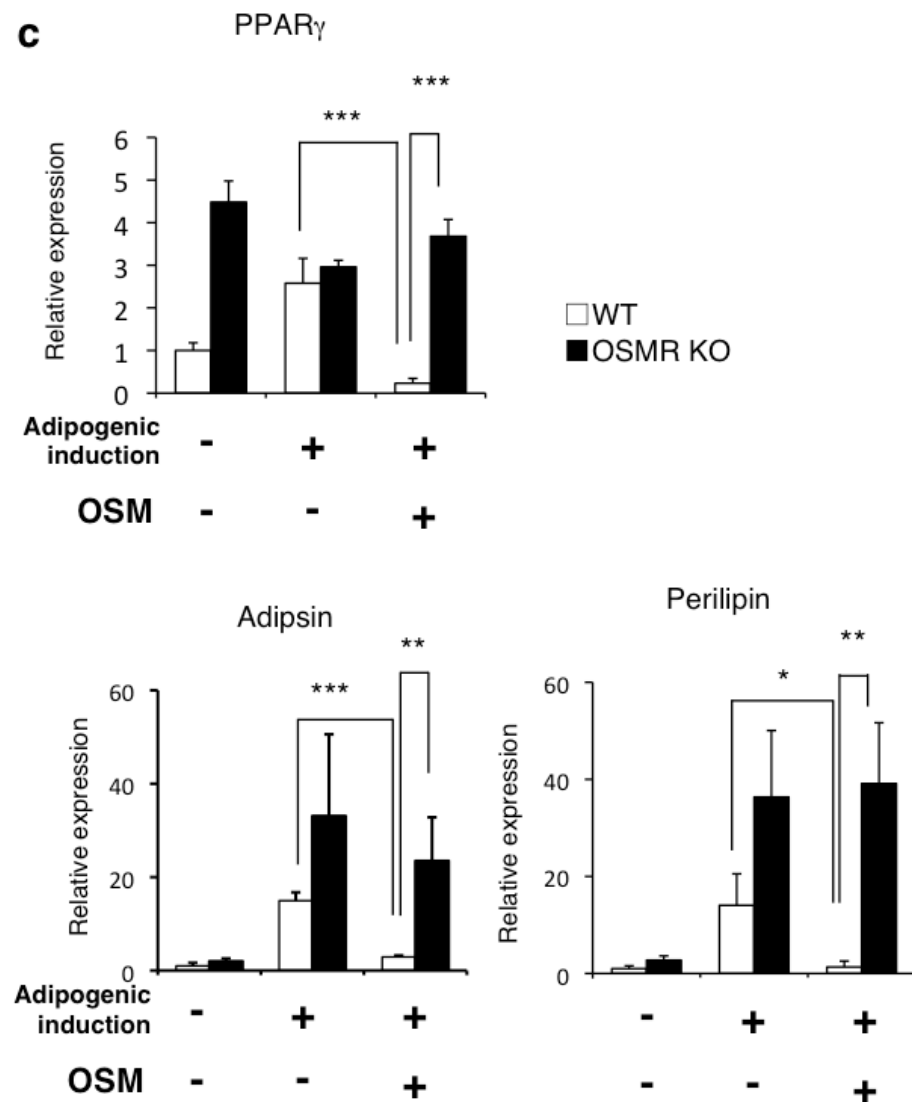


Figure 7 OSMは骨髄由来MSCの脂肪細胞分化を強く抑制する。

(c) 定量的RT-PCRによる遺伝子発現解析。

PPAR γ , Adipsin及びPerilipinの発現を検討した。(WT, n=4; OSMR KO, n=4; Bars, SD; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

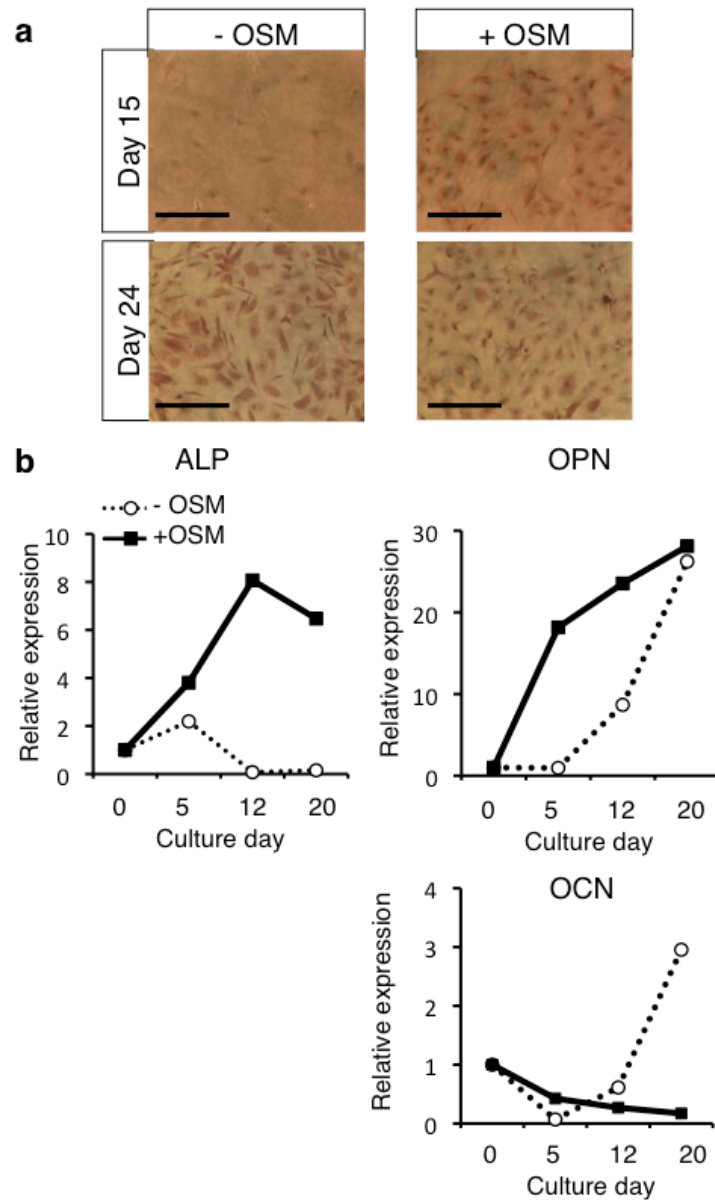


Figure 8 OSMはMSCの骨芽細胞への分化を促進する一方で、終末分化は抑制する

(a) OSM添加あるいは非添加の条件下で、PαS細胞を骨芽細胞へ分化誘導培養し、骨芽細胞分化に伴うカルシウム産生を評価するAlizarin red S染色を行った。(Scale bars, 100 μm) (b) 定量的RT-PCRによる遺伝子発現解析。初期分化マーカーALP（骨型アルカリフォスファターゼ）、初期から中期にかけてのマーカーOPN（オステオポンチン）、終末期以降のマーカーOCN（オステオカルシン）について検討した。（全てn=1）

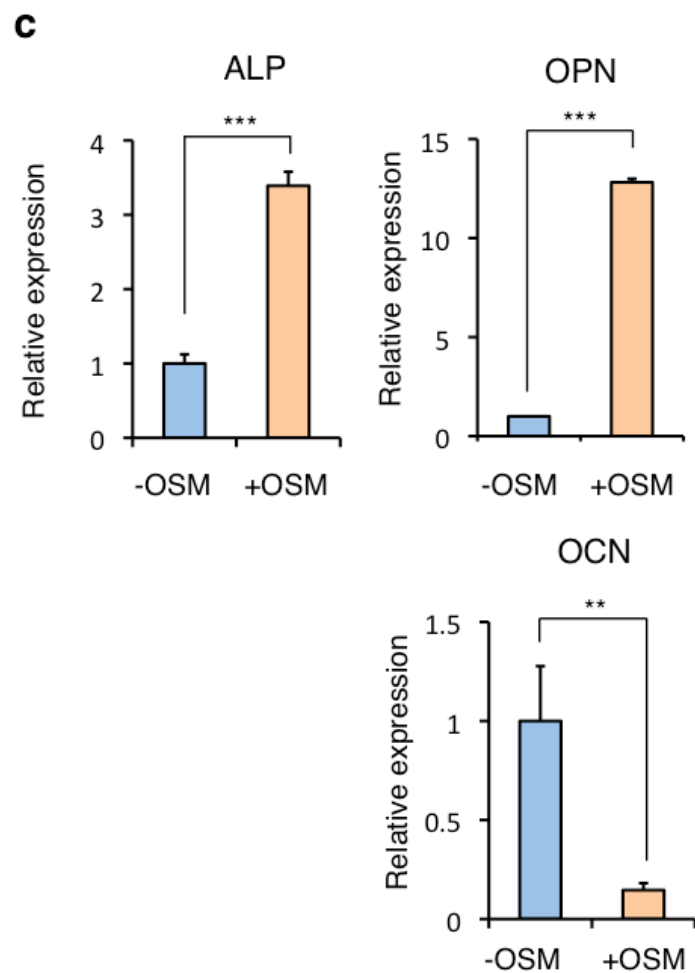


Figure 8 定量的RT-PCRによる遺伝子発現解析.

(c) 骨芽細胞分化において終末分化を促進させるDexamethasoneを添加して, OSMの添加あるいは非添加の条件下で分化誘導培養を行い, 7日目の細胞において, ALP, OPN, OCNの発現を検討した. (n=3; Bars, SD, **P<0.01, ***P<0.001)

d

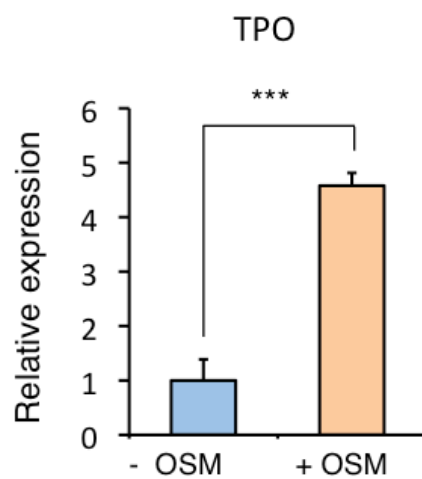


Figure 8 定量的RT-PCRによる造血因子TPOの遺伝子発現解析.

(d) 骨芽細胞分化において終末分化を促進させるDexamethasonewo添加して、OSMの添加あるいは非添加の条件下で分化誘導培養を行い、7日目の細胞において、造血因子TPOの発現を検討した。(n=3 ; Bars, SD ; ***P<0.001)

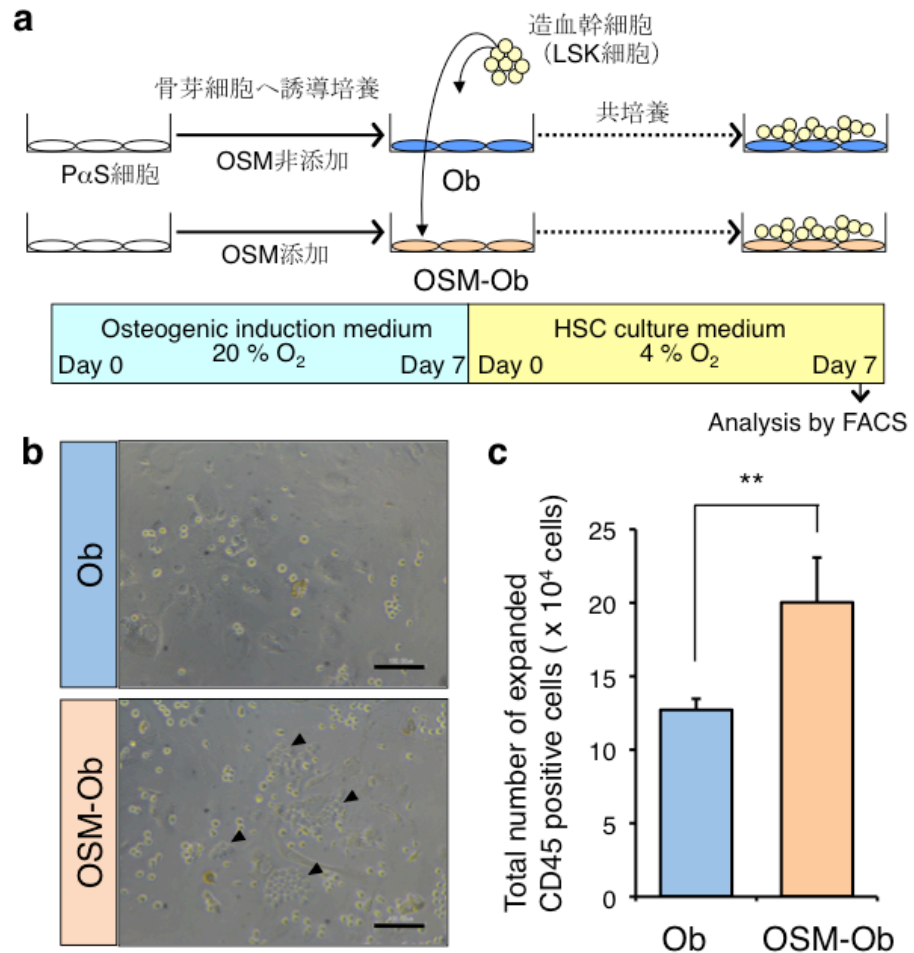


Figure 9 OSMにより分化した未成熟骨芽細胞はLSK細胞の増殖を支持する能力が高い

(a) 骨芽細胞と、造血幹細胞を含むLin⁻Sca-1⁺cKit⁺ (LSK) 細胞画分との共培養系. WT マウス骨髄より調製したPαS細胞をOSM添加あるいは非添加の条件下で骨芽細胞へ誘導培養し、7日目の細胞をフィーダー層とし、それぞれOSM-Ob及びObと記した. その上に LSK細胞を5,000 cells/wellの播種密度で播種した. 7日間共培養した後、LSK細胞をFACSにより再解析した. (Lineage marker, CD3e, CD4, CD8a, Ter119, B220, Gr-1, 及び Mac-1) (b) LSK細胞との共培養3日目の細胞形態. OSM-Ob-feederとの共培養したLSK細胞では、未分化性の高い血液細胞に特徴的なcobble-stone様 (敷石状) の増殖形態を示した (矢頭). (Scale bars, 100μm) (c) 7日間の共培養後に増殖した細胞の総数. (n=5; Bars, SEM; Student's t-test, **P<0.01)

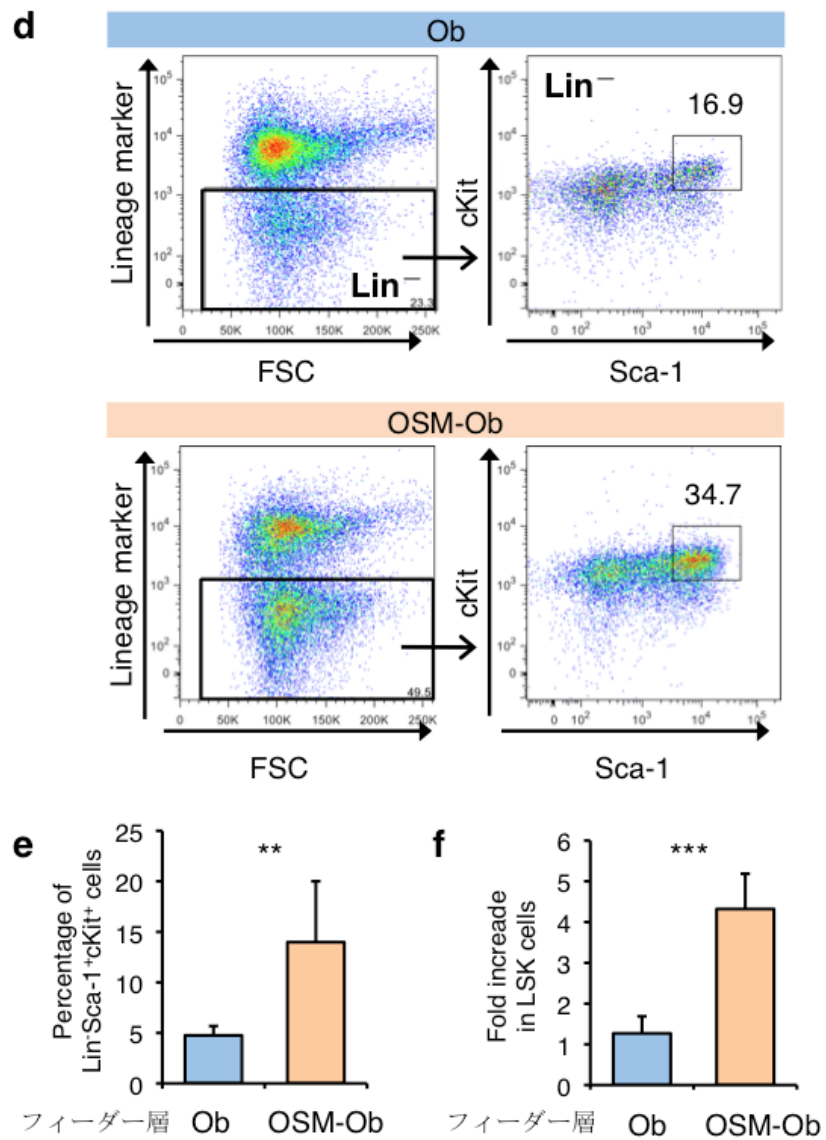


Figure 9 OSMにより分化した未成熟な骨芽細胞はLSK細胞画分の維持及び増殖に寄与する

(d,e) 7日間の共培養後におけるLSK細胞のFACS解析。(Lineage marker, CD3e, CD4, CD8 α , Ter119, B220, Gr-1, 及びMac-1) (f) 播種細胞数5,000 cellsに対する共培養後のLSK細胞の割合。(OSM-Ob, OSM添加により誘導した骨芽細胞との共培養; Ob, 通常の誘導培養した骨芽細胞との共培養; 共にn=5; Bars, SEM; Student's t-test, **P<0.01, ***P<0.001)

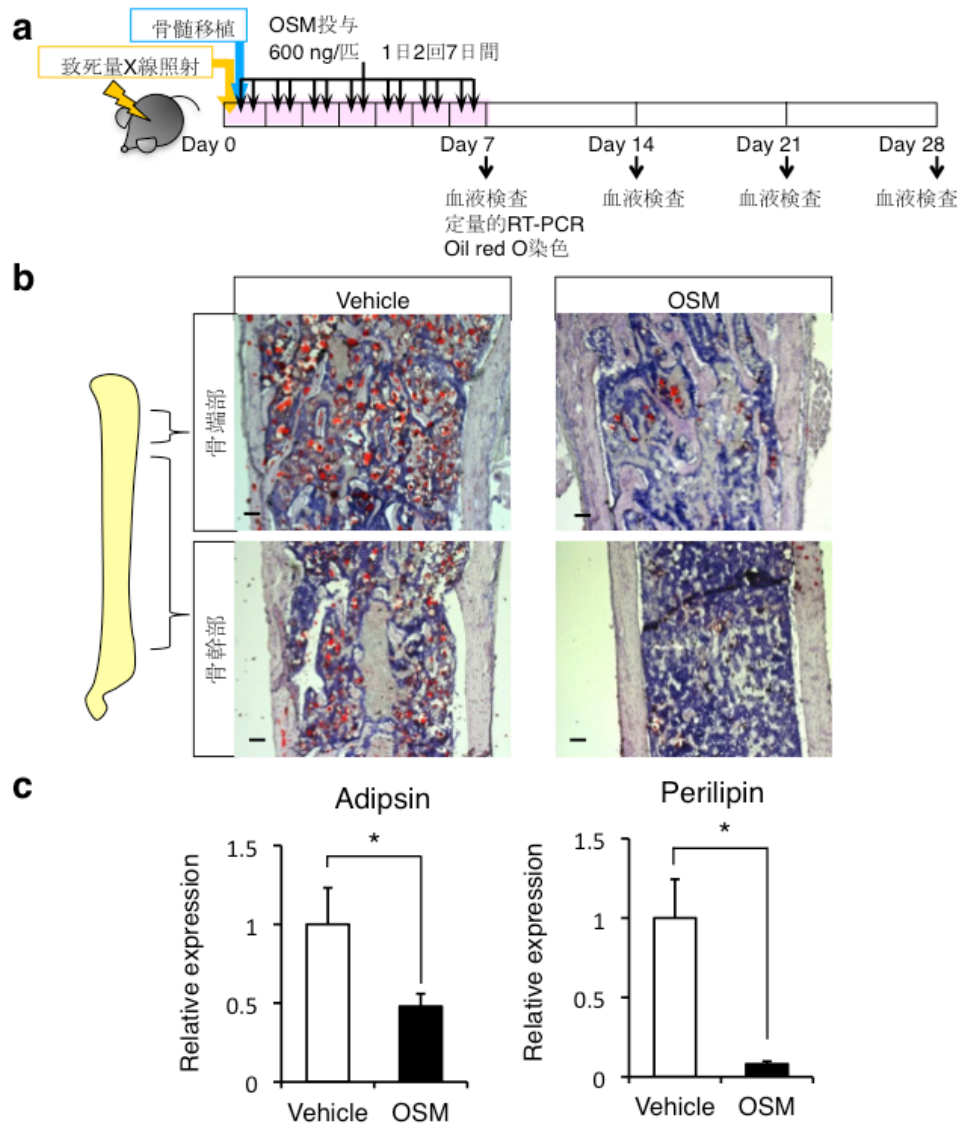


Figure 10 OSM投与により，骨髓傷害後の脂肪髄化が抑制される

(a) 骨髓傷害の誘導及びOSM投与スケジュール．致死量X線を照射後，骨髓移植と同時にOSM投与を開始し，7日間OSM投与した．7日目，14日目，21日目及び28日目に血液検査を行い造血の回復を検討した．

(b) 7日目の骨髓をOil red O染色した．(14 mm切片，Scale bars, 100 μ m)

(c) 定量的RT-PCRにより成熟脂肪細胞分化マーカーであるAdipsin及びPerilipinの発現を検討した．(Vehicle, n=4; OSM, n=5; Bars, SEM, *P<0.05)

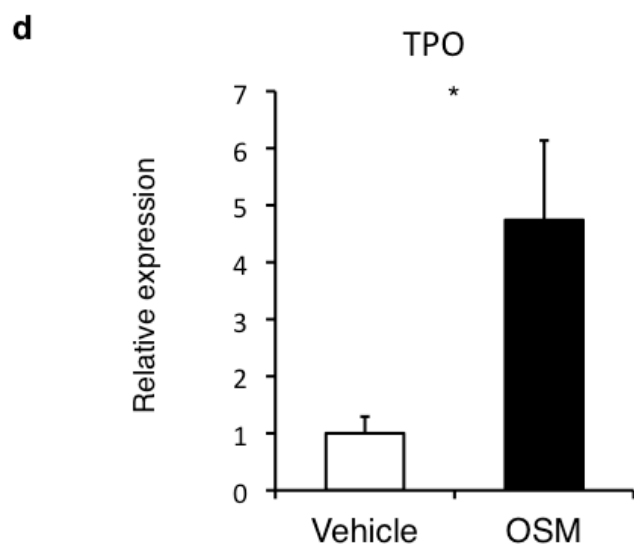


Figure 10 OSM投与により骨髄における造血因子TPOの発現が
増強する

(d) 定量的RT-PCRによりTPOの発現を検討した。
(Vehicle, n=4; OSM, n=5; Bars, SEM; Student's t-test, *P<0.05)

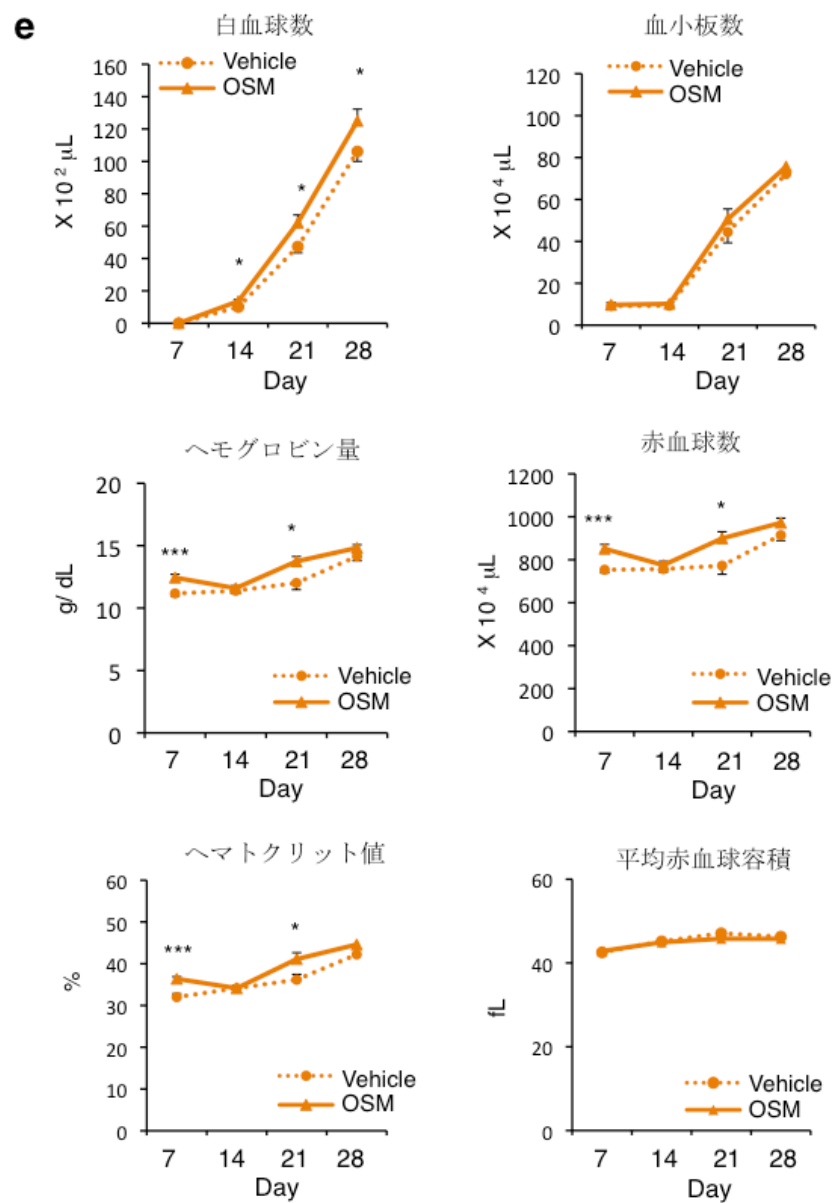


Figure 10 OSM投与は造血の回復に寄与する

(e) OSM投与を開始してから7日目、14日目、21日目、及び28日目にマウス尾静脈から微量採血して血液検査を行った。Sysmex pocH iV100を用いて測定した。

(Day 7: Vehicle, n=10; OSM, n=10; Day 14, 21, 28; Vehicle, n=9; OSM, n=10;

Bars, SEM; Student's t-test, *P<0.05, ***P<0.001)

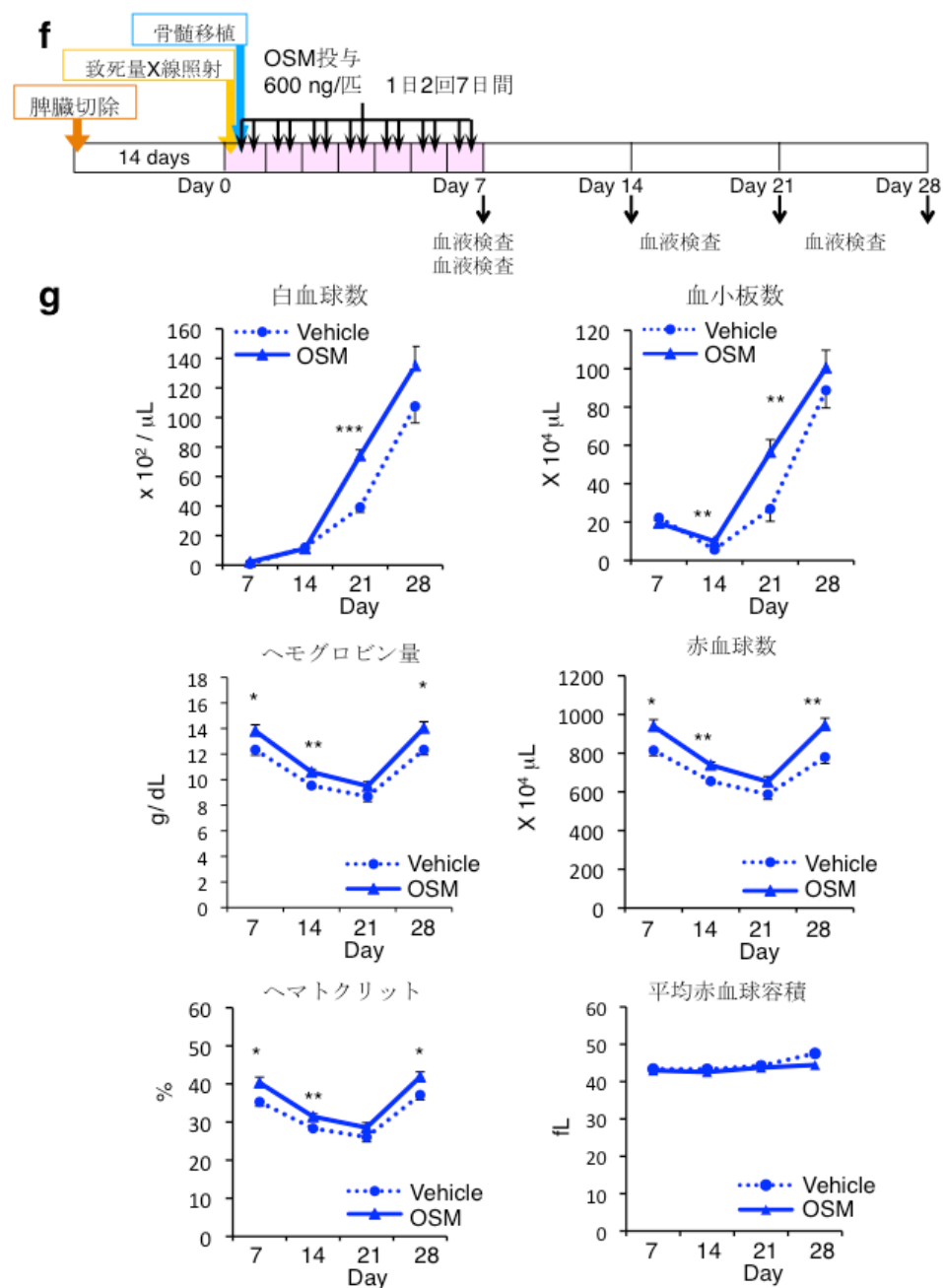


Figure 10 脾摘マウスにおける骨髄移植モデルにおいても、OSM投与は造血の回復に寄与する

(f) 脾臓切除したマウスにOSM投与を開始し、7日目、14日目、21日目、及び28日目にマウス尾静脈から微量採血して血液検査を行った。Sysmex pocH iV100を用いて測定した。(n=5; Bars, SEM; Student's t-test, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

第 4 章 考察

MSC の分化における OSM の作用

本研究により、OSM は MSC の脂肪細胞分化を強く抑制することを明らかとした。当研究室では以前に、IL-6 ファミリーサイトカインの中で OSM のみが、*in vitro* で脂肪前駆細胞株 3T3-L1 から脂肪細胞への分化を強く抑制することを報告している¹⁹。また、*in vivo* における OSM の機能については、OSM KO 及び OSMR KO マウスを作製し、成体マウスの造血能を解析し、骨髄造血能が低下している一方で、脾臓による髄外造血が亢進しており、貧血症状を呈することを報告している^{17,18}。しかしながら、*in vivo* における OSM の機能については、不明な点が多く残されていた。本研究では、*in vitro* での解析に加え、OSM KO マウスの骨髄環境を解析した結果、10 週齢の OSM KO マウスで既に脂肪細胞分化が促進していることや、その脂肪細胞は加齢に伴い増加することを明らかとした。更に、骨髄傷害からの回復過程においても、OSM KO マウスの脂肪髄化が増悪化することを示した。また、PaS 細胞を用いた *in vitro* 解析において、維持培養した細胞の PPAR γ の発現を比較すると、OSMR KO・PaS は WT・PaS と比べて発現が高いことが示された。この結果から、OSMR KO マウスの骨髄では、OSM による脂肪細胞分化抑制作用が、発生期から常に欠損していることで、MSC は脂肪細胞に分化しやすい状態にある可能性も示唆された。以上の結果は、骨髄環境の形成及び再生において、OSM は脂肪細胞分化を抑制することで、至適な造血環境を維持することに貢献していることを示唆している。Naveiras らは、骨髄内における脂肪細胞は、造血環境を負に制御することを明らかとしており、脂肪細胞分化を抑制する薬剤を投与することで、致死量放射線照射後に移植した骨髄細胞の生着が良く、造血の回復に寄与することを報告している¹²。この結果は、骨髄内の脂肪細胞分化を抑制することは、骨髄移植治療の効果を上げる可能性を意味しており、OSM 投与の有効性を支持するものである。

当研究室において、OSM KO マウスは、脾臓による髄外造血が亢進していることを報告していることから^{17,18}、脾摘により骨髓造血のみに注目した。その結果、OSM KO マウスの骨髓造血では、EPO 濃度が上昇しているにもかかわらず、貧血症状を呈することが明らかとなり、骨髓造血、特に赤血球造血が異常であることが強く示唆された。OSM KO マウスで見られる骨髓の脂肪髄化、EPO 濃度の上昇、及び貧血症状は、ヒトの特発性再生不良性貧血（*Ideopathic aplastic anemia*）においても見られる現象である。重度の患者は、骨髓移植や臍帯血移植による治療が行われている^{33,34}。骨髓移植により骨髓内の細胞が正常な細胞に置き換えることで、貧血が快方に向かうことから、貧血の原因は血液細胞にあるとも考えられる。しかし、患者の骨髓内での OSM の産生能力が低下している場合には、移植された正常な血液細胞により OSM が供給された結果、脂肪髄化が抑制されて骨髓環境が回復したという可能性も考えられる。そのため、今後、特発性再生不良性貧血と OSM の骨髓内の産生との因果関係についてさらに調べる必要がある。再生不良性貧血のモデル動物が未だ存在しないため、OSM KO マウスがその病態モデルとなりうるか否かを含めて、さらに検討する必要はあるが、OSM は有望な治療標的となりうるものと考えている。

OSM は MSC の骨芽細胞への分化を促進する一方で、骨芽細胞への終末分化は抑制することが明らかとなった。OSM は、既報^{20,21,22}の様に骨芽細胞分化を促進することを確認した。しかし、本研究では骨芽細胞分化を促進するだけでなく、OSM は骨芽細胞としての終末分化を抑制するという興味深い結果が得られた。さらに、OSM により誘導された未成熟な骨芽細胞は、造血因子 TPO の発現が増強していることが明らかになった。TPO は、造血幹細胞の維持に寄与することや²⁷、MEP の増殖・分化、及び血小板に重要であること²⁸が報告されている。OSM 投与により骨髓内での TPO の発現が増強したことから、骨芽細胞による TPO の発現を介した造血支持への寄与が OSM の作用の一つであると考えられた。

骨髓内には様々な細胞種が存在するため、造血ニッチに寄与する細胞として、骨芽細胞⁶⁷、骨細胞³⁵、Nestin 陽性 MSC³⁶、CAR 細胞 (CXCL12-abundant reticular cell)^{37,38,39}、血管内皮細胞^{3,40,41} 等が報告されている。骨芽細胞は骨細胞に分化する細胞であるが⁴²、造血ニッチ細胞として初めて報告された細胞種であり、現在も盛んに研究が行われている。骨芽細胞が造血幹細胞の保持に寄与する因子として、N-cadherin⁶、Jagged-1⁷、Framingo⁴³ など、様々な膜蛋白質が報告されている。OSM により骨芽細胞へ分化誘導培養を行った細胞では、早期に OPN の発現が誘導され、その後も高い発現を維持していた。細胞外基質である OPN は、骨芽細胞が、Integrin $\beta 1$ を介して造血幹細胞を Endosteal niche に留めることで造血幹細胞の維持に寄与することが報告されている^{44,45}。したがって、OSM はサイトカイン産生のみならず、細胞間接着分子の発現制御によっても造血環境の維持にも寄与する可能性がある。今後、OSM 添加の有無により誘導された骨芽細胞の性状を DNA マイクロアレイ解析等で詳細に比較することにより、新規造血支持因子や骨髓造血ニッチ細胞の実体の解明につながることを期待される。

第 5 章 結論

本研究により，OSM は骨髄内の MSC の脂肪細胞分化を強く抑制し，骨芽細胞分化を促進する一方で終末分化は抑制することが明らかとなった (Figure 11)．更に，OSM により誘導された未成熟な骨芽細胞は，未成熟な状態に留まることで TPO の発現を増強し，造血環境の維持に寄与する可能性が示された．OSM KO マウスは動物モデルの存在しない特発性再生不良性貧血モデルとなりうることや，OSM の投与がその治療法となる可能性を示した．

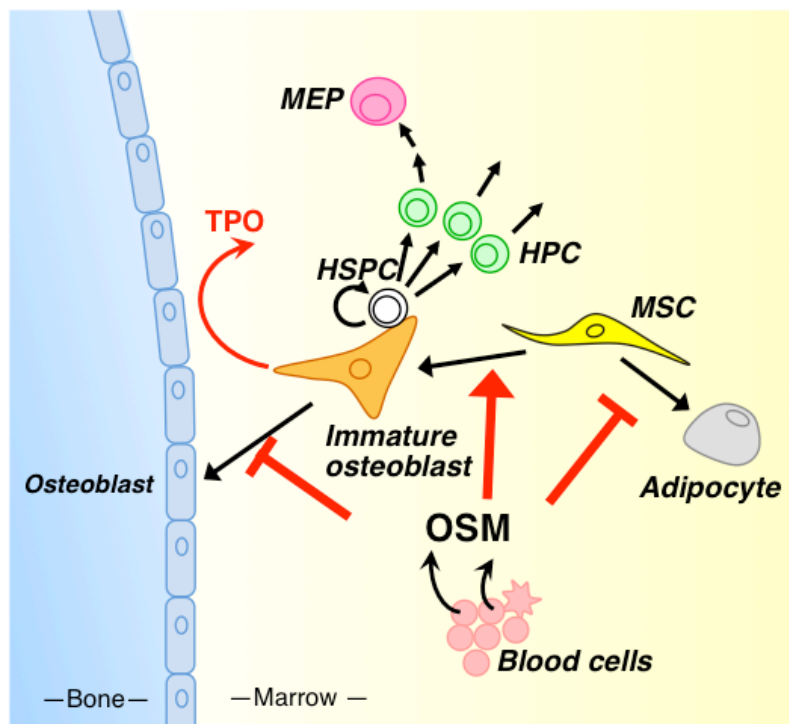


Figure 11. 骨髓造血環境におけるOSM作用のモデル

OSM, oncostatin M
HSPC, hematopoietic stem/progenitor cell
HPC, hematopoietic progenitor cell
MEP, megakaryocyte-erythroid progenitor cell
TPO, thrombopoietin

参考文献

1. Wang, L.D. & Wagers, A.J. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nature reviews* **12**, 643-655 (2011).
2. Raaijmakers, M.H. et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* **464**, 852-857 (2010).
3. Kiel, M.J. et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**, 1109-1121 (2005).
4. Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G. & Morrison, S.J. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* **481**, 457-462 (2012).
5. Winkler, I.G. et al. Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nature medicine* **18**, 1651-1657 (2012).
6. Zhang, J. et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836-841 (2003).
7. Calvi, L.M. et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841-846 (2003).
8. Adams, G.B. et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* **439**, 599-603 (2006).
9. Prockop, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science (New York, N.Y)* **276**, 71-74 (1997).

10. Pittenger, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y)* **284**, 143-147 (1999).
11. Morikawa, S. et al. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *The Journal of experimental medicine* **206**, 2483-2496 (2009).
12. Naveiras, O. et al. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* **460**, 259-263 (2009).
13. Young, N.S. & Maciejewski, J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *The New England journal of medicine* **336**, 1365-1372 (1997).
14. Kuk, J.L., Saunders, T.J., Davidson, L.E. & Ross, R. Age-related changes in total and regional fat distribution. *Ageing research reviews* **8**, 339-348 (2009).
15. Tanaka, M. & Miyajima, A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **149**, 39-52 (2003).
16. Mukoyama, Y. et al. In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity* **8**, 105-114 (1998).
17. Tanaka, M. et al. Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* **102**, 3154-3162 (2003).
18. Minehata, K. et al. Oncostatin m maintains the hematopoietic microenvironment and retains hematopoietic progenitors in the bone marrow. *International journal of hematology* **84**, 319-327 (2006).

19. Miyaoka, Y., Tanaka, M., Naiki, T. & Miyajima, A. Oncostatin M inhibits adipogenesis through the RAS/ERK and STAT5 signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* **281**, 37913-37920 (2006).
20. Song, H.Y., Jeon, E.S., Kim, J.I., Jung, J.S. & Kim, J.H. Oncostatin M promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry* **101**, 1238-1251 (2007).
21. Walker, E.C. et al. Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *The Journal of clinical investigation* **120**, 582-592 (2012).
22. Guihard, P. et al. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **30**, 762-772 (2012).
23. Haase, V.H. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood reviews* **27**, 41-53 (2013).
24. Yoshimura, A. et al. Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *The EMBO journal* **15**, 1055-1063 (1996).
25. Cornelius, P., MacDougald, O.A. & Lane, M.D. Regulation of adipocyte development. *Annual review of nutrition* **14**, 99-129 (1994).
26. Tansey, J.T., Sztalryd, C., Hlavin, E.M., Kimmel, A.R. & Londos, C. The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB life* **56**, 379-385 (2004).

27. Yoshihara, H. et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell stem cell* **1**, 685-697 (2007).
28. Gurney, A.L., Carver-Moore, K., de Sauvage, F.J. & Moore, M.W. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science (New York, N.Y)* **265**, 1445-1447 (1994).
29. McManus, P.M. & Weiss, L. Busulfan-induced chronic bone marrow failure: changes in cortical bone, marrow stromal cells, and adherent cell colonies. *Blood* **64**, 1036-1041 (1984).
30. Beck, G.R., Jr. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *Journal of cellular biochemistry* **90**, 234-243 (2003).
31. Leboy, P.S., Beresford, J.N., Devlin, C. & Owen, M.E. Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. *Journal of cellular physiology* **146**, 370-378 (1991).
32. Porter, R.M., Huckle, W.R. & Goldstein, A.S. Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *Journal of cellular biochemistry* **90**, 13-22 (2003).
33. Yoshimi, A. et al. Unrelated cord blood transplantation for severe aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant* **14**, 1057-1063 (2008).
34. Scheinberg, P. Aplastic anemia: therapeutic updates in immunosuppression and transplantation. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology* **2012**, 292-300 (2012).
35. Asada, N. et al. Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell stem cell* **12**, 737-747 (2013).

36. Mendez-Ferrer, S. et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**, 829-834 (2010).
37. Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.I. & Nagasawa, T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* **20**, 707-718 (2004).
38. Greenbaum, A. et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* **495**, 227-230 (2013).
39. Ding, L. & Morrison, S.J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* **495**, 231-235 (2013).
40. Arai, F. et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **118**, 149-161 (2004).
41. Butler, J.M. et al. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell stem cell* **6**, 251-264 (2010).
42. Long, F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature reviews* **13**, 27-38 (2012).
43. Sugimura, R. et al. Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell* **150**, 351-365 (2012).
44. Stier, S., Cheng, T., Dombkowski, D., Carlesso, N. & Scadden, D.T. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* **99**, 2369-2378 (2002).

45. Nilsson, S.K. et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* **106**, 1232-1239 (2005).

謝辞

本研究は、東京大学分子細胞生物学研究所 発生・再生研究分野 宮島 篤研究室において行われたものです。博士課程4年間の長きに渡り指導くださいました宮島 篤教授に深く御礼申し上げます。本研究を行うにあたり、数々の実験をご指導下さり、また、日々のディスカッションのなかでの的確な助言を下さった東京大学分子細胞生物学研究所 幹細胞制御分野 田中 稔准教授に深く感謝致します。

実験を遂行するにあたり、セルソーターのオペレーションにあたって下さいました宮田 奈保子技術職員、実験手技やマウス管理等でサポートして下さいました神谷 淑子技術職員、毎日丁寧にマウスを管理して下さいました今泉 典子技術職員に深く感謝致します。

研究室生活において、苦楽を共にした研究室の皆様に感謝致します。