

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

### 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

氏 名 佐藤 郁

#### 【研究背景】

成体における造血は主に骨髄内で造血幹/前駆細胞が増殖・分化することにより担われている。骨髄内には血液細胞の他に、様々な細胞種が存在し、それらの細胞が産生する細胞外基質やサイトカイン等によって造血環境は維持されている。骨髄に異常をきたすと、貧血あるいは汎血球減少などの障害を引き起こすことから、骨髄造血環境を正常に維持することは、生体のホメオスタシスを保つ上で不可欠と言える。

オンコスタチンM (oncostatin M: OSM) は IL-6 ファミリーサイトカインに属する多機能性サイトカインであり、成体マウスでは骨髄や脾臓等の造血器官において、強く発現している。当研究室では、OSM 受容体欠損マウス (OSMR KO) を作製し、成体の造血能を調べた結果、野生型マウス (WT) と比べ、骨髄中の造血前駆細胞が少なく、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を報告している。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 は骨髄の造血環境の維持に寄与するものと考えられた。

(Figure 1). このように、OSM は骨髄造血環境に作用し造血環境の維持に関わっていることが強く示唆されるが、その制御機構は未だ不明である。一方、造血系以外での OSM の作用としては、細胞株を用いた *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ことも報告している。

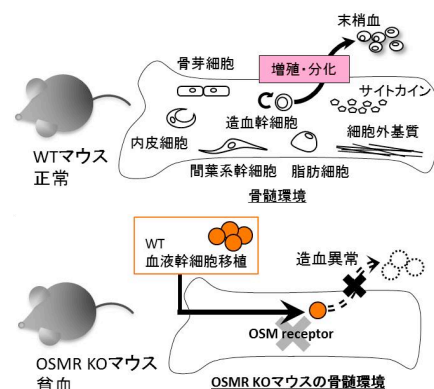


Figure 1. OSMR KO マウスの骨髄造血

## 【目的】

以上の背景から、OSM は骨髄中で間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) に作用し、脂肪細胞分化を抑制することで骨芽細胞への分化を促進し、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 (Figure 2). 本研究では、骨髄造血ニッチ細胞の分化に焦点を当て、OSM による造血環境の制御機構の解明を目指した。

## 【方法・結果】

### MSC の脂肪細胞分化における OSM 作用の検討

作業仮説より、OSM KO マウスでは、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。ヒトの骨髄においては、加齢するにつれて脂肪細胞の蓄積が進行し、脂肪髄化することが知られている。そこで 32 週令の骨髄を Oil red O で染色した結果、WT では脂肪細胞が認められなかったが、OSM KO マウスの骨髄では脂肪細胞が認められた。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 の発現を検討した結果、OSM KO では発現が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。そこで、加齢により脂肪髄となった骨髄環境における造血能について検討した。その結果、WT に比べて OSM KO マウスでは、赤血球数、白血球数、及び血小板数が有意に減少していた。この結果から、加齢により脂肪髄となった骨髄環境における造血能が低下しており、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 マウスが貧血及び血小板減少症を呈すると報告している。TPO (Thrombopoietin) は、造血幹細胞の維持に重要であることや巨核球-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重要であること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 3C)。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や、TPO の発現が低下すること、末梢血においては汎血球減少を呈することが示された。

そこで OSM 作用のメカニズムを明らかにするため、*in vitro* において検討した。WT 及び OSMR KO マウス骨髄より造血環境に寄与するとされる MSC のサブセット (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>) を調製し、OSM 添加あるいは非添加の条件下で脂肪細胞へ誘導培養した。脂肪滴を赤く染める

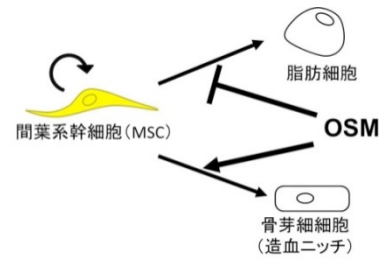


Figure 2. 骨髄における OSM 作用の作業仮説

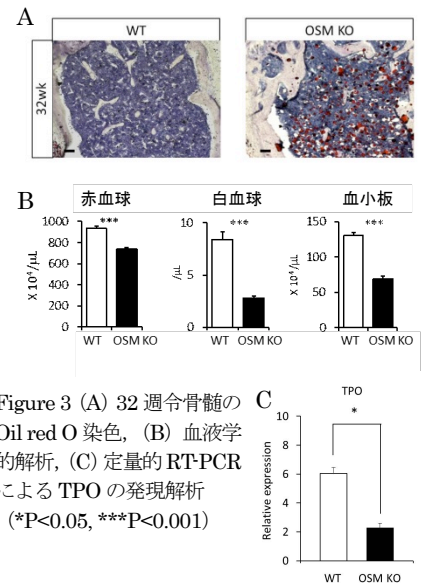
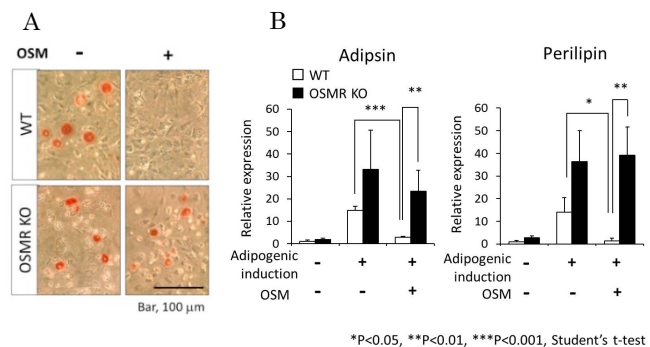


Figure 3 (A) 32 週令骨髄の Oil red O 染色, (B) 血液学的解析, (C) 定量的 RT-PCR による TPO の発現解析 (\*P<0.05, \*\*\*P<0.001)



\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, Student's t-test

Figure 4. *in vitro* において OSM は MSC の脂肪細胞分化を抑制する (A) Oil red O 染色 (赤; 脂肪細胞), (B) 定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析

Oil red O 染色で評価した結果、WT では OSM 添加により脂肪細胞分化が強く抑制されたのに対して、OSMR KO では OSM による抑制効果は認められなかった (Figure 4A). 更に、Adipsin と Perilipin の発現を検討した結果、WT ではともに OSM 添加により強く抑制されていた。一方 OSMR KO では、このような抑制効果は確認されなかった (Figure 4B). 以上の結果より、OSM は骨髄 MSC の脂肪細胞分化を *in vitro* において強く抑制することが示された。

### MSC の骨芽細胞分化における OSM 作用の検討

MSC は造血ニッチ細胞の一つとされている骨芽細胞へも分化する。そこで、骨芽細胞分化に及ぼす OSM 作用を明らかにするため、OSM 添加あるいは非添加の条件下で MSC の分化誘導培養を行った。骨芽細胞分化マーカーである骨型アルカリフォスファターゼ (ALP)、オステオポンチン (OPN)、オステオカルシン (OCN) の遺伝子発現解析を行った。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 5)。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。以上の結果から、OSM は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可能性が示された。

OSMR 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てきた。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 TPO の発現を検討した結果、OSM により誘導された、未成熟骨芽細胞において発現が増強することが確認された。

そこで、OSM により誘導された、未成熟骨芽細胞の造血支持能を検討するため、造血幹細胞との共培養系を構築した。OSM 添加あるいは非添加の条件下で、骨芽細胞への分化誘導培養を行い、培養 7 日目の細胞をフィーダー層とした。7 日目に、造血幹細胞を含む Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>cKit<sup>+</sup> (LSK) 細胞画分を播種し、7 日間共培養した後、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 を添加して誘導培養した細胞 (OSM-Ob) をフィーダー層とした場合では、共培養後の LSK 細胞の割合が高く (Figure 6A,B), LSK 細胞数も維持されていることが示された (Figure 6C)。この結果から、OSM により誘導された未成熟な骨芽細胞は、LSK 細胞の維持に寄与することが示唆された。

### 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

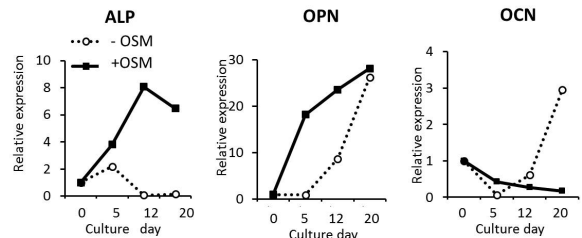


Figure 5. *in vitro*において OSM は MSC の骨芽細胞分化を促進するが、終末分化を抑制する。定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析

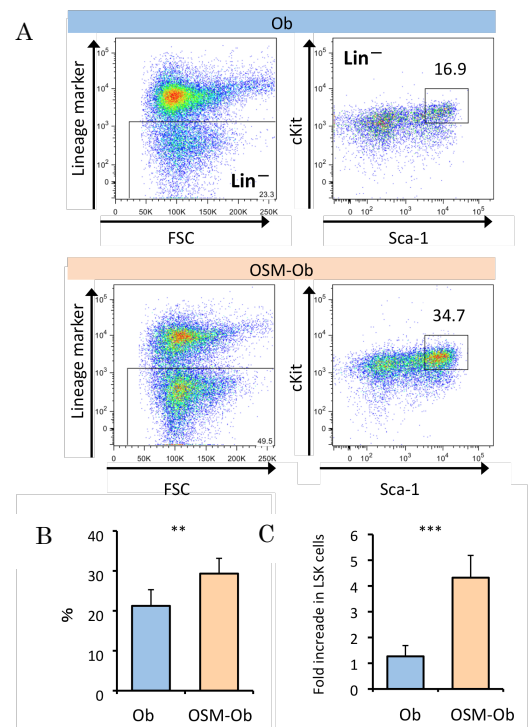


Figure 6. (A) FACS 解析, (B) Percentage of LSK, (C) Fold increase of LSK cells, (Ob, 通常の誘導培養; OSM-Ob, OSM 添加誘導培養)

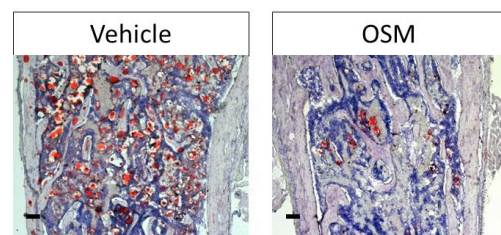


Figure 7. OSM 投与は骨髄抑制による脂肪髄化の進行を抑制する。OSM 投与 7 日目の骨髄の Oil red O 染色

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 7 日間投与することで (600 ng/匹, 1 日 2 回)、脂肪髄化及び造血能の回復を検討した。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細胞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 7)。更に、経時的に血液検査を行った結果、OSM 投与群では、白血球数、血小板数、及び赤血球数が有意に高く、骨髄抑制からの造血能の回復が早いことが示唆された。以上の結果から、OSM 投与により、脂肪髄化の進行が抑制され、骨髄造血能の回復を早期に誘導できる可能性が示された。

#### 【考察・今後の展望】

以上の結果から、OSM は骨髄において MSC に作用し、造血環境を制御することで骨髄造血の維持に寄与していることが示された (Figure 8)。OSM は MSC の脂肪細胞分化を抑制することが示された。骨髄内に存在する脂肪細胞は、造血を負に制御することが報告されていることから、OSM は脂肪細胞分化を抑制することで骨髄造血の維持に貢献している可能性が考えられる。OSM KO マウスで見られる骨髄の脂肪髄化は、ヒトの特発性再生不良性貧血においても見られる現象であり、OSM KO マウスがその病態モデルとなる可能性も考えられる。骨髄の脂肪髄化の原因を突き止めることは、未だ動物モデルのないこの病気の治療法開発にも貢献できるものと考えている。

OSM は MSC の骨芽細胞分化を促進するだけでなく、興味深いことに、骨芽細胞としての終末分化を抑制する可能性が示された。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 の発現が増強することが明らかになった。

OSM により誘導された未成熟な骨芽細胞は、TPO の発現を介して造血支持に寄

与する可能性が示された。しかし、OSM の作用は TPO だけでなく、その他のサイトカインや膜蛋白質などを介して造血支持に寄与している可能性も十分に考えられる。今後、OSM 添加の有無により誘導された骨芽細胞の性状を詳細に比較することにより、新規造血支持因子の探索や骨髄造血ニッチ細胞の実体解明に貢献したいと考えている。

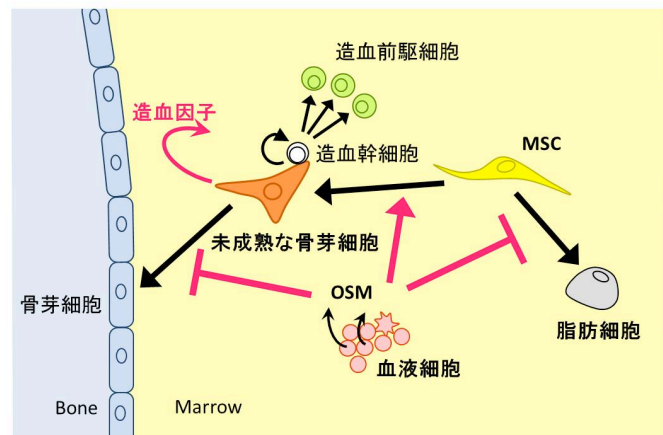


Figure 8. 骨髄における OSM 作用のモデル図