Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

FGF23 from erythroblasts promotes hematopoietic progenitor mobilization

Ishii, Shinichi

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2021-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第8037号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008037

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文内容要旨

FGF23 from erythroblasts promotes hematopoietic progenitor mobilization

赤芽球由来の FGF23 が造血前駆細胞の動員を促進する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
血液内科学
（指導教員　南博信教授）

石井慎一

顆粒球コロニー刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF)は、造血幹細胞の骨髄から末梢血への移動(動員)を誘導するサイトカインとして骨髄移植ドナーからの造血幹細胞採取に用いられている。G-CSF の投与により交感神経が活性化され、マクロファージ、骨芽細胞系列細胞や間葉系細胞が抑制されることで造血幹細胞を取り巻く骨髄環境が変化し、造血幹細胞が骨髄から末梢血へと放出されていくことがこれまで知られていた。一方で、造血幹細胞は、骨髄間質細胞に発現するケモカイン CXCL12 に、受容体 CXCR4 を介して引き寄せられ骨髄内に保持されており、動員時には、最終的に造血幹細胞が CXCL12/CXCR4 軸のアンカーとしての働きから離脱することで、末梢血中へと動員されていくとされる。G-CSF の投与時の動員が起こるタイミングでは、骨髄細胞外液における CXCL12 蛋白濃度や骨髄細胞全体の CXCL12 mRNA が著しく低下することがこの論拠とされてきたが、実際には CXCL12 を高いレベルで産生する骨髄間質細胞の数自体は上昇しその細胞あたりの CXCL12 mRNA レベルの低下はあるものの骨髄全体に比し劇的ではないため、造血幹細胞を骨髄に留めることに働く CXCL12 の総量は大きな変化を起こさないことが最近報告された。これは、最近 G-CSF に併用することでその動員効率を大きく上昇させることがわかり臨床応用された CXCR4 のアンタゴニスト（プレリキサホル）の効果からも裏付けられる。すなわち、効率的な G-CSF による動員の成立には、骨髄内 CXCL12 の変化よりもむしろ、造血幹細胞側の受容体 CXCR4 への骨髄環境からの抑制性の働きかけが重要であることが想像できる。しかし、その分子経路の実態は不明であった。本研究は、このシグナルリレーの中心となる因子として Fibroblast growth factor-23(FGF23)を特定したものである。

FGF23 は、教科書的には骨組織に埋没した骨細胞が産生し、腎臓において α-Klotho と共役してリン代謝を制御するホルモンとされている。申請者所属研究室の過去の研究において、造血幹細胞の動員を制御する主要な細胞種の一つとして骨細胞を同定していた。この際に、G-CSF やその下流シグナルである交感神経刺激によって、骨細胞における FGF23 mRNA が上昇することがわかっていた。この研究の継続として今回、野生型マウスに G-CSF を投与後非常に短時間（1 時間）で骨細胞を多数内包する骨組織だけでなく、その骨組織に囲まれた内腔である骨髄の細胞においても、骨組織と同程度の強い FGF23 mRNA 発現上昇が起こることを発見した。交感神経刺激によっても同様の反応が起こるかどうか検討するため、汎 β アドレナリン受容体アゴニストである isoproterenol を野生型マウスに投与したところ、やはり 1 時間で骨髄細胞の FGF23 mRNA が上昇することが確認された。

骨髄内のどの細胞が FGF23 を産生するのかを確かめるために、野生型マウスに G-CSF ないしは isoproterenol を投与し、骨髄細胞から汎白血球マーカーである CD45 が陽性と陰性の分画をそれぞれソーティングしたところ、CD45 陰性細胞でのみ FGF23 mRNA の強い

上昇が認められた。この CD45 陰性分画の内訳は、殆どが $CD45^{-}Ter119^{+}CD71^{+}$赤芽球であり、一部 $CD45^{-}Ter119^{-}CD71^{-}$の stroma 細胞であった。すなわち、G-CSF とそれに引き続く交感神経シグナルに反応して骨髄内で FGF23 mRNA を急速に強く発現してくる主たる細胞分画は赤芽球であると考えられた。

さらに、赤芽球からの FGF23 の産生を蛋白レベルで確認するために、野生型マウスに G-CSF および isoproterenol 投与後に骨髄から赤芽球をソーティングし、細胞を溶解して蛋白を抽出し ELISA 法で FGF23 を測定した。この結果、G-CSF 刺激と交感神経刺激により、mRNA だけでなく蛋白レベルでも FGF23 が赤芽球内で産生されることが確認された。次に、赤芽球からの FGF23 産生誘導シグナルを探るため、ヒト赤芽球細胞株 HUDEP-2 の培養に G-CSF や isoproterenol を様々な濃度で添加したが、培養上清中の FGF23 蛋白の上昇は見られなかった。そこでこの培養を赤芽球の分化シグナルの一つである低酸素（5%O_2）条件下で行うと、培養上清中に FGF23 蛋白を測定できるようになり、その産生が確認された。実際、in vivo において、G-CSF ないしは isoproterenol を 1 回投与した後の短時間で、骨髄組織内の低酸素の誘導がピモニダゾールの取り込み実験により明らかとなった。これらの結果から、G-CSF 投与後の骨髄低酸素刺激により、骨髄内の主に赤芽球から FGF23 が産生されると結論づけた。

G-CSF 投与による造血幹前駆細胞動員の過程で、12 時間おきの連続投与回数に依存して段階的に FGF23 蛋白が骨髄細胞外液で上昇し、動員が起こり始める 6 回目に FGF23 濃度がピークに達していた。この際、末梢血中の FGF23 の蛋白濃度は変化しないにも関わらず、骨髄内細胞間隙では末梢血の約 20,000 倍の濃度に達していた。末梢血中のリン濃度は FGF23 の濃度と同様に動員の最中変化しなかった。なお、FGF23 は、intact FGF23(iFGF23)として産生された後に、一部は切断され C-terminal FGF23 フラグメントとなる。iFGF23 を特異的に測定する ELISA キットと、iFGF23 だけでなく切断後の C-terminal FGF23 フラグメントも含めて測定できる ELISA キットの 2 種類で同一のサンプルを測定することで、FGF23 産生後の切断の度合いを調べたところ、赤芽球から放出された iFGF23 は、骨髄内ではほぼ iFGF23 のままで存在し、切断を受けた C-terminal FGF23 フラグメントのみが骨髄から末梢血へ流出していくこともわかった。

以上の結果より、骨髄内で赤芽球から産生された FGF23 には、ホルモンとしての腎臓でのリン代謝調節以外の、骨髄内において高濃度で初めて発揮される別の作用があることが考えられた。この in vivo での作用を FGF23 に関する遺伝子改変マウスを用いて検討した。FGF23 欠損マウスをゲノム編集で作成し、G-CSF 投与による末梢血への造血幹前駆細胞の動員実験を行ったところ、野生型マウスと比べて、動員効率が著しく低下していた。次に、造血細胞での FGF23 欠損が動員不全の原因であるのかどうかを、野生型マウスに放射線照射を行い、FGF23 欠損マウスの骨髄を移植することで、骨髄を含めた造血細胞のみ FGF23

を産生できないキメラマウス を作製することで検討した。このキメラマウスに G-CSF を投与し動員実験を行ったところ、野生型骨髄を移植したキメラマウスと比較して著しく動員効率が低下していた。G-CSF 投与による骨髄細胞外液中の FGF23 濃度の上昇は、FGF23 欠損骨髄キメラマウスでは有意に抑制されていた。FGF23 欠損マウスは早期老化様形質を示し 9 週齢までに死亡してしまうため、これを骨髄移植のレシピエントとして造血環境側でのみ FGF23 を欠損するキメラマウスを安定的に作製することはできなかった。そこで、ゲノム編集で $FGF23^{flox/flox}$ マウスを作製し、DMP-1-cre マウスとの交配により、骨細胞特異的 FGF23 欠損マウスを作製し、G-CSF での動員実験を行なったところ、コントロールマウスと比較して骨髄細胞外液 FGF23 濃度の低下は見られず、動員の低下も起こらなかった。以上より、骨髄造血細胞（実質的に赤芽球）からの FGF23 産生が、G-CSF による動員に必須であるということが明らかとなった。

続いて、高濃度 FGF23 の造血幹前駆細胞に対する直接作用を in vitro で検証した。Transwell（直径 5μm の穴のあいた膜で上下層に仕切られた培養システム）の上層に野生型マウス骨髄単核球を入れ、これに含まれる造血前駆細胞（コロニー形成細胞 CFU-Cs）のケモカイン CXCL12 を入れた下層への遊走（chemotaxis）を定量した。造血前駆細胞である CFU-Cs は CXCL12 の受容体 CXCR4 を発現し、非常に効率よく CXCL12 に引き寄せられ下層に移動する。しかし、G-CSF 投与時に見られる骨髄中の非常に高い濃度と同等の FGF23 を上層に入れておくと、この遊走が有意に抑制され、更にα-Klotho を同時に加えるとこの抑制効果が顕著となった。また、この FGF23/α-Klotho による CFU-Cs の CXCL12 誘導性遊走の抑制効果は、FGF 受容体アンタゴニストを追加することで消失した。また、FGF23 が造血幹前駆細胞上の CXCR4 の発現やそこへの CXCL12 蛋白の結合効率を抑制しないことをフローサイトメトリーで確認し、FGF23 が細胞表面上での CXCL12/CXCR4 の反応に影響を与えているのではなく、CXCR4 からの細胞内シグナルに FGF 受容体を通して拮抗している可能性が考えられた。

以上の実験結果から次の結論を得た。①FGF23 は、骨細胞をはじめとした間葉系細胞だけでなく、骨髄中の赤芽球からも低酸素刺激で産生される。②赤芽球由来の FGF23 が G-CSF による造血幹前駆細胞の動員に必須である。③骨髄中の FGF23 は、FGF 受容体を介して CXCR4 の細胞内シグナルを阻害し、造血幹前駆細胞を骨髄から動員させる。

G-CSF 投与時に骨髄間質細胞での CXCL12 に大きな変化を生じないにも関わらず動員が起こるのは、G-CSF 投与により骨髄内で造血幹前駆細胞の CXCR4 機能に何らかの抑制性変化が生じることが原因であろうと推測されたが、その分子実態が赤芽球由来 FGF23 であることが本研究で明らかとなった。血液内科臨床で動員不全が問題になりやすい、化学療法

を繰り返し行なってきた例や多発性骨髄腫の患者では、骨髄赤芽球数が少ないことがFGF23 の産生源低下としてその一因となっている可能性が考えられる。本研究成果をもとに、今後、臨床的には赤芽球や FGF23 を標的とした造血幹細胞操作法の開発が、また基礎研究としては神経内分泌系と骨髄環境の間での分子レベルでの相互作用について理解の進展が期待される。