トピックス

骨代謝研究の新たな展開とビタミン D

New insight into bone metabolism and molecular mechanisms of vitamin D

1. はじめに

骨は言わずと知れた健康長寿のためのキーファクターである。厚生労働省による2019年の国民生活基礎調査では、要介護および要支援が必要となった要因の上位にいずれも骨折・転倒が挙げられており¹⁾,高齢者における骨および骨格筋機能維持の重要性が伺える。さらに近年、骨機能が全身に及ぼす影響についても多くの知見が報告されている。骨芽細胞などの骨代謝に関わる細胞が造血幹細胞に及ぼす影響や、骨と多臓器間ネットワークによる全身性疾患との関連性が注目されており²⁾⁻⁵⁾,高齢者のみならず全世代において骨機能は重大な健康作用を及ぼすと考えられる。

骨はカルシウムなどのミネラルからなる無機的な組織であると考えられがちであるが、骨吸収と骨形成からなる有機的で活発な骨代謝 (リモデリング) が行われており、これに種々のビタミンやバイオファクターが関与していることは既に知られている 67 0. とりわけビタミン D はカルシウム吸収促進と骨リモデリング制御による間接および直接的な骨形成作用を有し、活性型代謝物である 1α ,25-dihydroxyvitaminD3 (1,25D3) やその誘導体は骨粗しょう症治療薬としても応用されている. その一方でビタミン D の骨形成作用に関する分子メカニズムは近年ようやく解明されつつあるとともに、骨髄において造血幹細胞ニッチや免疫系を介した全身作用も報告されている. 本稿では、骨代謝研究の新たな展開により明らかになってきたビタミン D の生理作用と分子メカニズムについて最近の報告を紹介する.

2. 脂質メディエーター解析から明らかになっ たビタミンDの骨量増加メカニズム

上述の通り天然の活性型ビタミン D である 1,25D₃ やその誘導体がすでに骨粗鬆症治療薬として応用され、これらの骨形成作用は骨吸収抑制に起因することが報告される一方, in vitro 試験系では 1,25D₃ が破骨細胞分化誘導・活性化作用を示すことが報告されるな

大阪大学の石井らのグループは, in vivo におけるビ タミンDの骨形成作用機序として、ビタミンDが脂 質メディエーターであるスフィンゴシン1リン酸 (S1P)と協調して破骨前駆細胞の血液 - 骨髄間遊走を 制御していることを明らかにした(図1)11. 本発見に 先立って石井らは二光子励起顕微鏡を用いた骨組織の in vivo リアルタイムイメージング技術を開発し、破骨 前駆細胞の血管から骨表面への遊走過程が SIP により 制御されていることを見いだした 12)13). S1P の血中 -組織間濃度勾配は血中 S1P 濃度が高くなるように維持 されており、破骨前駆細胞はSIP 受容体としてSIPR1 と S1PR2 を発現している. S1PR1 は S1P に正の走化 性を示し, 破骨前駆細胞の骨表面から血管への遊走に 関与している¹²⁾. 一方で S1PR2 は S1P に対して負の 走化性を示し、S1PR2 ノックアウトマウスの破骨前駆 細胞は SIP に対する負の走化性が弱まり骨表面に局在 する破骨細胞数が減少する13). すなわち破骨前駆細胞 は相反する SIP 走化性を示す 2 つの受容体を使い分け て骨表面 - 血液間局在を変えることで骨代謝を制御し ていることを明らかにした.

SIP による破骨細胞制御機構の発見はビタミンDの骨吸収抑制作用メカニズムの解明につながるのではないかと考え、ビタミンDが SIP 依存的な破骨前駆細胞の遊走に与える影響を解析したところ、 $1,25D_3$ およびビタミンD誘導体であるエルデカルシトールは破骨前駆細胞様の性質をもつ RAW264.7 細胞の SIPR2 発現を抑制し、SIP に対する負の走化性を減弱することで細胞の骨表面指向性を低下させることが明らかになった1110. さらに、OVX 処置マウスに $1,25D_3$ やエルデカルシトールを投与すると骨密度の回復が認められるが、これらの個体由来の破骨細胞においても SIPR2 発現低下と破骨細胞の遊走活性化が認められた1110. これらの結果より、ビタミンDの骨形成作用は破骨細胞の

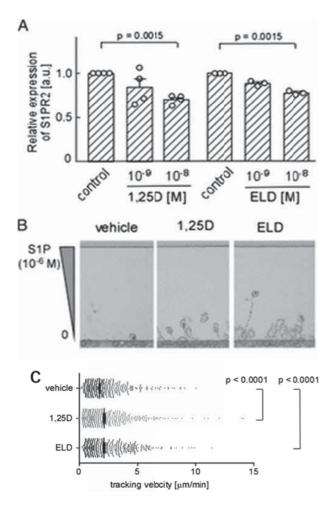


図 1 1,25D3 およびエルデカルシトール (ELD) による破骨前駆細胞の骨表面指向性の抑制 ¹¹⁾

ビタミン D 添加により RAW264.7 細胞の S1PR2 発現量は減少し(A), S1P に対する正の走化性は増強される(B). in vivo イメージング解析においても、マウス頭蓋骨における EGFP 標識破骨前駆細胞の遊走は 1,25D3 および ELD 経口投与群で活性化した(C).

S1PR2 発現を抑制することで破骨細胞の骨表面指向性を低下させ、骨吸収抑制作用を示すことが明らかになった(図1).

3. 骨と多臓器間ネットワークをつなぐビタミン D シグナル

神戸大学の片山らのグループは、骨と神経および造血系のネットワークにビタミンD受容体(VDR)依存的な1,25D3のシグナルが重要な役割を果たすことを報告している。近年、白血病やリンパ腫などの血液疾患に対する造血幹細胞移植療法として、ドナー負担軽減の観点から骨髄由来幹細胞に替わり末梢血由来幹細胞移植が主流になりつつある。サイトカインであるgranulocyte

colony stimulating factor (G-CSF) は造血幹細胞の髄外遊 走因子として知られ、移植治療にはドナーへの G-CSF 投与4~5日後に骨髄から末梢血に遊走した造血幹細 胞が用いられる. しかし G-CSF が造血幹細胞の強力な 髄外遊走因子であることは臨床的に広く知られているに も関わらず、その分子メカニズムは不明のままであった. 片山らは造血幹細胞ニッチの維持に関与する細胞のう ち骨芽細胞が G-CSF に応答性を示すことを発見し¹⁴⁾, 骨芽細胞の G-CSF 応答性はカテコールアミン分泌型交 換神経によって介在されることを見いだした(図2). さ らに、骨芽細胞上の β2-アドレナリン受容体 (β2-AR) を 介した交感神経性カテコールアミン下流シグナルとして VDR が必須であることを明らかにした(図 2) 15). VDR ノックアウトマウスでは G-CSF 誘導性の造血幹細胞髄 外遊走が起こらず、これはカルシウム添加飼料によって もレスキューすることが不可能であった. さらに β2-AR 介在性の交換神経シグナルは骨芽細胞で迅速な VDR 発 現を誘導し、増強された VDR シグナルは造血幹細胞遊 走に必要な receptor activator of nuclear factor-кВ ligand (RANKL) などの下流シグナルを数時間にわたり活性化 した¹⁵⁾. RANKL は破骨細胞活性化因子であり, RANKL により活性化した破骨細胞は骨髄中の造血幹細 胞におけるアンカータンパク(CXCL12 など)の分解に 関わることが報告されているため 16), 造血幹細胞の髄 外遊走に際しては VDR 依存的な 1,25D3 シグナルが種々 の細胞を介した造血幹細胞ニッチの制御に重要な役割 を果たしていると推察される.

また片山らは近年, 難治性疾患である骨髄線維症の 進展にビタミン D シグナルを介したマクロファージの

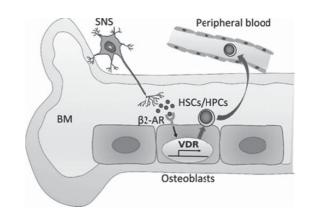


図 2 造血幹細胞の髄外遊走に関与する VDR 依存的ビタ ミン D シグナル ^{14) 15)}

BM, bone marrow; SNS, sympathetic nervous system; β2-AR, β2-adrenergic receptor, HSCs/HPSs, hematopoietic stem cells/hematopoietic progenitor cells

分化異常が関係していることを報告した ¹⁷⁾. 骨髄線維症は骨髄腔における線維芽細胞の異常増殖による線維置換によって骨髄の造血機能を維持できなくなる疾患である. 発生要因は主として造血幹細胞の JAK2 変異に起因する原発性と骨髄増殖性腫瘍などの基礎疾患から進展する二次性に分けられる. 発病率自体は極めて低い稀な疾患であるが, その要因となる骨髄増殖性腫瘍は高齢化に伴い今後患者数が増加することが予想される. 骨髄増殖性腫瘍が線維化に進展する原因としては, 骨髄における巨核球の増加が線維芽細胞を刺激することによると説明されてきたが, それ以上のメカニズムは分かっておらず, 骨髄増殖性腫瘍で骨髄線維化のみならず骨梁過形成 (骨硬化) が生じる理由も不明であった (図 3).

上述の VDR が造血幹細胞の髄外遊走に与える影響を解析する中で、VDR ノックアウトマウスに野生型骨髄を移植したキメラマウスは骨硬化症を伴う重篤な骨髄線維症に進展することを見いだした。 VDR-KO マウスにおける血中の活性型ビタミン $D(1,25D_3)$ は著しい高値を示す $D(1,25D_3)$ は著しいもメラマウスでは骨髄線維症の発症を抑制できたこと

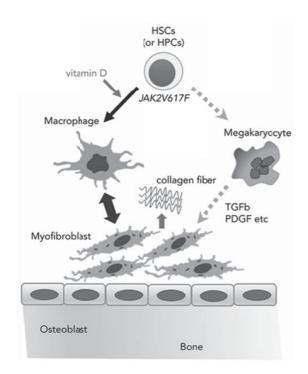


図3 骨髄線維症の進展に関与するビタミンDシグナルとマクロファージ形態のひずみ¹⁷⁾

HSCs, hematopoietic stem cells; HPCs, hematopoietic progenitor cells, TGFb, transforming growth factor-beta; PDGF, platelet-derived growth factor

から、レシピエントである VDR-KO マウスの強い活 性型ビタミンDシグナルに暴露されたドナー由来の VDR 陽性造血幹細胞が骨髄線維症の発症に関わってい るのではないかと考えた. 実際に骨髄線維症を発症し たキメラマウスの線維化組織はドナー由来血液細胞で あるマクロファージとレシピエント由来間葉系細胞で ある前骨芽細胞の2種類の細胞集団によって構成され ており、レシピエント由来の前骨芽細胞は、線維芽細 胞マーカーの発現やコラーゲンの産生などにより線維 芽細胞のように振る舞うことが明らかになった170.ま た野生型の Sca-1 陽性 c-kit 陽性造血幹細胞系譜は VDR を高発現しており、これらの VDR 陽性造血幹細 胞に対する高濃度 1.25D3 暴露が造血幹細胞から病的マ クロファージへの分化を誘導し、この病的マクロ ファージがレシピエントの骨芽細胞を刺激することで 骨髄線維化のみならず骨硬化を誘発することが明らか になった(図3)¹⁷⁾.

次に、ヒト骨髄線維症モデルである JAK2V697F トランスジェニックマウスを用いてビタミン D シグナルが骨髄線維症の進展に与える影響を解析したところ、JAK2V617F トランスジェニックマウスにおいても低ビタミン D 飼料での飼育や骨髄特異的 VDR ノックアウトによる VDR シグナルの遮断、また JAK2V617F / MaFIA 多重トランスジェニックによる誘導性マクロファージの枯渇によって骨髄の線維化を効果的に抑制できることを確認した 170 .

本研究では初めに VDR ノックアウトマウスを用いることでビタミン D シグナルの異常が病的マクロファージ分化に及ぼす影響を見いだしたが、JAK2V627トランスジェニックマウスや骨髄増殖性腫瘍患者における血中 1,25 D_3 濃度は高くないため $^{17)19}$, 今後はヒトにおける骨髄線維症進展に対するビタミンD シグナルの作用機序の解明も期待される. マクロファージは活性型ビタミンD 産生酵素である CYP27B1を発現していることから 20 , 初期の分化課程に加えて成熟マクロファージにおける病態制御にも関与しているもかもしれない.

4. おわりに

骨は間葉系細胞である骨細胞および骨芽細胞,血液細胞由来の破骨細胞といった系譜が大きく異なる細胞集団により構成・代謝されるダイナミックな容器の中に,さらに多様な細胞集団より構成される骨髄を容れており、このことが in vitro 試験で生体環境を反映することの難しさを物語っているように思われる.一方で in vivo イメージングなどの解析技術の発達や、多臓器間ネットワーク

に着目した骨代謝研究の新たな展開により、骨代謝にとどまらないビタミン D の生理作用やその分子基盤が明らかになりつつある。髄内造血を行う哺乳類において、骨代謝やビタミン D のひずみが造血をはじめとした全身作用にどこまで影響を及ぼすのか、生理作用の解明による栄養指針や治療戦略の進展が期待される。

利益相反自己申告:申告すべきものなし

(2020.10.2 受付)

Key words: vitamin D, bone and mineral metabolism, in vivo bioimaging, hematopoietic stem cell niche

Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Toyama Prefectural University, Imizu, 939-0398, Japan Miyu Nishikawa

富山県立大学 工学部生物工学科 西川 美宇

文 献

- 1) 厚生労働省 (2020) 2019 年 国民生活基礎調査の概況
- Bowers M, Zhang B, Ho Y, Agarwal P, Chen C C, Bhatia R (2015)
 Osteoblast ablation reduces normal long-term hematopoietic stem cell self-renewal but accelerates leukemia development. *Blood* 125, 2678-2688
- 3) Calvi L M, Adams G B, Weibrecht K W, Weber J M, Olson D P, Knight M C, Martin R P, Schipani E, Divieti P, Bringhurst F R, Milner L A, Kronenberg H M, Scadden D T (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-846
- 4) Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W G, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng J Q, Harris S, Wiedemann L M, Mishina Y, Li L (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-841
- 5) Sato M, Asada N, Kawano Y, Wakahashi K, Minagawa K, Kawano H, Sada A, Ikeda K, Matsui T, Katayama Y (2013) Osteocytes Regulate Primary Lymphoid Organs and Fat Metabolism. Cell Metabolism 18, 749-758
- 6) Whiting S J, Kohrt W M, Warren M P, Kraenzlin M I, Bonjour J P (2016) Food fortification for bone health in adulthood: a scoping review. Eur J Clin Nutr 70, 1099-1105
- 7) Ahmadieh H, Arabi A (2011) Vitamins and bone health: beyond calcium and vitamin D. *Nutr Rev* **69**, 584-598
- 8) Sakai A, Nishida S, Tsutsui T, Takeuchi K, Takeda S, Nakamura T (2001) 1alpha-Hydroxyvitamin D₃ suppresses trabecular bone resorption by inhibiting osteoclastogenic potential in bone marrow

- cells after ovariectomy in mice. J Bone Miner Metab 19, 277-286
- 9) Shibata T, Shira-Ishi A, Sato T, Masaki T, Masuda A, Hishiya A, Ishikura N, Higashi S, Uchida Y, Saito M O, Ito M, Ogata E, Watanabe K, Ikeda K (2002) Vitamin D hormone inhibits osteo-clastogenesis in vivo by decreasing the pool of osteoclast precursors in bone marrow. J Bone Miner Res 17, 622-629
- 10) Suda T, Takahashi F, Takahashi N (2012) Bone effects of vitamin D - Discrepancies between *in vivo* and *in vitro* studies. *Arch Biochem Biophys* 523, 22-29
- 11) Kikuta J, Kawamura S, Okiji F, Shirazaki M, Sakai S, Saito H, Ishii M (2013) Sphingosine-1-phosphate-mediated osteoclast precursor monocyte migration is a critical point of control in antibone-resorptive action of active vitamin D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7009-7013
- 12) Ishii M, Egen, J G, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, Proia R L, Germain R N (2009) Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 458, 524-528
- 13) Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, Meier-Schellersheim M, Germain R N (2010) Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. J Exp Med 207, 2793-2798
- 14) Katayama Y, Battista M, Kao W M, Hidalgo A, Peired A J, Thomas S A, Frenette P S (2006) Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cellegress from bone marrow. Cell 124, 407-421
- 15) Kawamori Y, Katayama Y, Asada N, Minagawa K, Sato M, Okamura A, Shimoyama M, Nakagawa K, Okano T, Tanimoto M, Kato S, Matsui T (2010) Role for vitamin D receptor in the neuronal control of the hematopoietic stem cell niche. *Blood* 116, 5528–5535
- 16) Kollet O, Dar A, Shivtiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, Tesio M, Samstein R M, Goichberg P, Spiegel A, Elson A, Lapidot T (2006) Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* 12, 657-664
- 17) Wakahashi K, Minagawa K, Kawano Y, Kawano H, Suzuki T, Ishii S, Sada A, Asada N, Sato M, Kato S, Shide K, Shimoda K, Matsui T, Katayama Y (2019) Vitamin D receptor-mediated skewed differentiation of macrophages initiates myelofibrosis and subsequent osteosclerosis. *Blood* 133, 1619-1629
- 18) Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, Kawakami T, Arioka K, Sato H, Uchiyama Y, Masushige S, Fukamizu A, Matsumoto T, Kato S (1997) Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. Nat Genet 16, 391-396
- 19) Pardanani A, Drake M T, Finke C, Lasho T L, Rozell S A, Jimma T, Tefferi A (2011) Vitamin D insufficiency in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic syndromes: clinical correlates and prognostic studies. Am J Hematol 86, 1013-1016
- 20) Overbergh L, Decallonne B, Valckx D, Verstuyf A, Depovere J, Laureys J, Rutgeerts O, Saint-Arnaud R, Bouillon R, Mathieu C (2000) Clin Exp Immunol 120, 139-146