

論文の内容の要旨

論文題目 Adiponectin は in vivo で骨髄造血細胞の増殖を促進する

正本 庸介

【序文】

近年骨髄微小環境と造血細胞の相互作用が造血細胞の機能に重要な影響を与えていることが明らかになってきている。骨髄微小環境は多種類の構成細胞によって成り立っており、骨芽細胞や細網細胞などを中心に研究が進められているが、その他脂肪細胞や神経細胞なども存在し、いまだその全貌は明らかになっていない。特に脂肪細胞は、骨髄間質に大量に存在するにもかかわらず造血におけるその生理的な意義は長らく不明であり、近年造血幹細胞に対して抑制的に作用するとの報告がなされたが、いまだ骨髄脂肪細胞の作用の詳細は明らかにされていない。

Adiponectin は主に脂肪細胞に発現して分泌されるホルモンであり、インスリン感受性増強作用と抗動脈硬化作用を有する。近年 adiponectin が脂肪細胞以外にも骨芽細胞・線維芽細胞・リンパ球など多彩な細胞から分泌されて局所での作用を有することが報告されている。Adiponectin は生体内に大量に存在するホルモンであり、骨髄微小環境に多く存在する脂肪細胞が主たる産生源であることから、造血細胞に対しても何らかの効果を有することが想定される。これまで adiponectin が造血細胞に与える影響について、in vitro においては造血幹細胞・前駆細胞の増殖を抑制するという報告と、造血幹細胞の増殖を促進するという相反する報告がなされているが、in vivo での作用については造血幹細胞における adiponectin 受容体 Adipor1 のノックダウンにより増殖が抑制されるという報告のみであり、adiponectin のノックアウトマウス(adipo^{-/-})を用いた in vivo での解析はなされていなかった。そこで今回我々は adipo^{-/-}マウスを用いて、造血系における adiponectin の in vivo での作用を解析した。

【主な材料と方法】

マウス

Kubota らによって報告された adipo^{-/-}マウスを使用した。C57/BL6 系統と 12 代以上交配し、解析にはすべて littermate を使用した。

競合的造血再構築アッセイ

adipo^{+/+}または adipo^{-/-}マウス(いずれも Ly5.2)の骨髄単核細胞 1×10^6 個を、Ly5.1 マウスの骨髄単核細胞 1×10^6 個とともに、致死量照射(10.5Gy)した Ly5.1/Ly5.2 マウスの尾静脈より静注した。G-CSF 投与後の末梢血を用いたアッセイでは、150 μ l の末梢血を Ly5.1 マウスの骨髄単核細胞 1×10^6 個とともに、致死量照射(10.5Gy)した Ly5.1/Ly5.2 マウスの尾静脈より静注した。

5-FU 投与

adipo^{+/+}または adipo^{-/-}マウスに対して、PBS に懸濁した 5-FU (Kyowa Kirin) 150 mg/kg を尾静脈より静脈内投与した。5-FU の連続投与実験においては、PBS に懸濁した 5-FU 180 mg/kg を 7 日おきに合計 4 回腹腔内に投与した。

G-CSF 投与

125 µg/kg の組み換え型ヒト G-CSF (Kyowa Kirin) を PBS で希釈して 12 時間おきに合計 8 回腹腔内投与し、最終投与から 3 時間後に頸椎脱臼により安楽死させて解析した。

Listeria monocytogenes 感染

マウス腹腔内に 2×10^5 CFU の *Listeria monocytogenes* を投与し、72 時間後、168 時間後の腹腔・骨髄の細胞数、腹腔内洗浄液中の白血球数と、168 時間後の脾臓におけるリステリア生菌数を計測した。

【結果】

Adiponectin 受容体(Adipor1, Adipor2)のノックダウン

5-FU 投与後のマウス造血細胞の Adipor1, Adipor2 をノックダウンして致死量照射したマウスに移植すると、Adipor1 のノックダウンのみならず Adipor2 をノックダウンした細胞でも同様に移植後のキメリズムが低下し、Adipor1, Adipor2 を介したシグナルのいずれもが *in vivo* における増殖に必要であると考えられた。

マウス骨髄における adiponectin

ELISA 法でマウス骨髄間質液中の adiponectin 濃度を測定したところ、血漿濃度よりもはるかに低濃度であった。脂肪細胞の多く含まれる脛骨では、脂肪細胞の少ない大腿骨よりも骨髄内の adiponectin 濃度が高かった。また 5-FU を投与して骨髄中の脂肪細胞を増加させても、adiponectin の血漿濃度はほとんど変化しなかったが、骨髄間質液中の濃度は大きく増加した。骨髄中における adiponectin 濃度は、骨髄内の脂肪細胞量と関連していることが示唆された。

adipo^{-/-}マウスの定常状態における造血

adipo^{-/-}マウスは定常状態における血算、末梢血白血球分画、骨髄細胞分画、表面抗原発現パターンによる造血幹細胞分画の割合、*in vitro* でのコロニー形成能、競合的造血再構築アッセイによる造血幹細胞の頻度などにおいて、いずれも adipo^{+/+}マウスと差を認めなかった。

adipo^{-/-}マウスの 5-FU 投与後の骨髄回復

細胞周期依存的な代謝拮抗剤である 5-FU を投与すると、静止期の造血幹細胞が細胞周期に入り、その後造血系の回復が見られることが知られている。adipo^{-/-}マウスに 5-FU を投与すると、末梢血顆粒球、骨髄造血細胞の回復が有意に遅延しており、5-FU 投与後に細胞周期に入る造血幹細胞が減少していることと関連していた。細胞周期に入った造血幹細胞を枯渇させる目的で 5-FU の連続投与を行ったところ、adipo^{-/-}マウスでは生存期間が有意に延長し、adipo^{-/-}マウスでは 5-FU 投与後の造血幹細胞の細胞周期への誘導が起こりにくいことが示された。

adipo^{-/-}マウスの G-CSF に対する応答

G-CSF は末梢血への幹細胞の動員や化学療法後の骨髄球系細胞の回復促進のために用いられる薬剤であるが、内因性の G-CSF は感染などの緊急時の造血亢進に関与することが知られている。G-CSF 投与モデルにおいて、adipo^{-/-}マウスでは骨髄での造血細胞の増殖、骨髄球系コロニー形成細胞の増加、造血細胞の細胞周期への誘導などの反応がいずれも減弱していた。adipo^{-/-}マウスの骨髄細胞を adipo^{+/+}マウス由来の造血細胞で置換したキメラマウスを作製して G-CSF を投与した場合にも同様の表現型が再現され、G-CSF への反応性増強には血球由来ではなく骨髄環境中の adiponectin が重要であることが示唆された。

また G-CSF 投与後の造血細胞の細胞周期への誘導効果について、未分化な細胞を多く含む LSK (Lineage-, c-kit+, Sca-1+) 分画や、造血幹細胞を濃縮する CD150+ CD48- LSK 分画においても同様の効果が見られたことから、細胞周期にある程度依存した現象であると考えられている、G-CSF 投与後の末梢血への造血幹細胞の動員についても検証した。adipo^{-/-}マウスに G-CSF を投与すると、表面抗原発現パターン上も、*in vitro* でのコロニー形成試験や競合的造血再構築

アッセイなどの機能的な評価系においても、末梢血に動員される造血幹細胞・前駆細胞が減少していることが示された。

Adiponectin は *Listeria monocytogenes* に対する感染応答を増強する

L. monocytogenes 感染症モデルにおける G-CSF シグナルの重要性は広く知られており、*L. monocytogenes* 感染に対する骨髄中の骨髄球系細胞増殖、腹腔内への白血球の遊走、脾臓中の生菌数の抑制などは G-CSF に依存することが報告されている。*L. monocytogenes* を腹腔内投与したところ、骨髄中の骨髄球系細胞の増殖、腹腔内への白血球の遊走、脾臓・肝臓での生菌数の抑制などの感染応答が、adipo^{-/-}マウスにおいてはいずれも有意に減弱しており、adiponectin は G-CSF 依存性の感染応答に必要であることが示唆された。

Adiponectin は G-CSF 依存性の Stat3 のリン酸化を強める

G-CSF 依存性の造血細胞の増殖には Stat3 のリン酸化とその下流の C/EBPβ の転写亢進が重要であることが知られている。そこで adipo^{+/+}マウスの骨髄造血細胞に、in vitro で骨髄間質液と同濃度の adiponectin を添加して G-CSF による刺激を加えたところ、G-CSF 依存性の Stat3 のリン酸化が亢進した。一方 adipo^{-/-}マウスから採取したばかりの造血細胞に in vitro で G-CSF の刺激を加えたところ、adipo^{+/+}マウスの細胞と比較して Stat3 のリン酸化が減弱していた。採取して 48 時間後の造血細胞ではこの差は見られず、in vivo において adiponectin が造血細胞をプライミングして、G-CSF への反応性を高めていることが示唆された。adipo^{-/-}マウスの骨髄細胞を adipo^{+/+}マウス由来の造血細胞で置換したキメラマウスの造血細胞を用いて同様の検討を行っても、G-CSF 依存性の Stat3 のリン酸化が減弱しており、造血細胞由来よりも骨髄環境中の adiponectin が、G-CSF による効率的な Stat3 のリン酸化に必要であることが示された。また in vivo で G-CSF を投与した adipo^{-/-}マウスの骨髄球系細胞でも adipo^{+/+}と比較して、Stat3 のリン酸化が減弱しており、Stat3 により転写が誘導される転写因子 C/EBPβ の発現が低かった。

【考察】

今回我々は adiponectin の造血細胞に対する影響を、主に in vivo の系を用いて検証した。定常造血において adiponectin は欠失可能であるが、5-FU や G-CSF、*L. monocytogenes* により増殖刺激を加えた時の造血細胞の効果的な増殖には、骨髄環境中の adiponectin が必要であることを示した。また骨髄間質液中の adiponectin 濃度は血清濃度と並行せず、骨髄中の脂肪細胞量と関連していることが示唆された。

この結果より、抗癌剤投与後の骨髄回復や G-CSF 投与後の造血細胞の増殖や末梢血への造血幹細胞の動員のみならず、G-CSF 依存性であることが知られている感染などの緊急時の造血においても adiponectin が促進的に作用している可能性が考えられる。また骨髄に大量に存在する脂肪細胞の造血細胞に対する影響はほとんど不明だが、骨髄間質液における adiponectin の濃度は骨髄環境による制御を受けている可能性が考えられ、adiponectin の主たる産生細胞は脂肪細胞であることから、脂肪細胞は造血細胞に対して adiponectin を介して影響を与えている可能性があり、今後明らかにしていくべき課題と考えられる。