Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Mobilization efficiency is critically regulated by fat via marrow PPARδ

Suzuki, Tomohide

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2021-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第8029号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008029

※ 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）

学位論文の内容要旨

Mobilization efficiency is critically regulated by fat via marrow PPARδ

骨髄 PPARδ を介した脂質による動員制御

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

血液内科学

(指導教官：南　博信 教授)

鈴木　知秀

要旨

顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）投与による造血幹・前駆細胞（HSC/HPC）の末梢循環への動員は、血液悪性腫瘍に対する移植治療に用いる造血幹細胞を採取するために臨床で広く用いられている手法である。HSC/HPC の動員は、交感神経と G-CSF 受容体を介し、骨芽細胞抑制や骨髄間質細胞の CXCL12 による HSC/HPC 保持の抑制、及び骨髄微小環境（Niche）を支持するマクロファージの抑制などより制御されていることなどが近年明らかとなっている。しかしながら、動員効率は各個体間により異なり、中には動員効率が低い個体も認められる。何故個体間で動員効率に差異が認められるのかについては明確な答えはなく、造血幹細胞採取において常に問題となる。骨髄微小環境の一つとして挙げられる骨髄脂肪は、造血を制御し、また骨髄に豊富に存在する各種免疫細胞は炎症性・抗炎症性脂質メディエーターを産生することが近年報告されている。このように骨髄に存在する細胞には、我々が日々摂取する食餌性脂肪酸の影響もあるものと推測されるが、HSC/HPC 動員への影響についてはまだ未解明である。そこで食餌性脂肪酸が動員を調節している可能性を考え解析を行った。

まず、食餌性脂肪の動員への影響を検討するため、野生型マウスに 2 週間の無脂肪食を給餌し、継続して 5 日間の顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 投与し、FCM 及び CFU-Cs アッセイにて動員効率を評価した。その結果、2 週間無脂肪食給餌マウスの末梢血循環への HPC の動員効率は、普通食給餌条件で動員と比較して劇的に上昇した。骨髄 HPC の数に変化は認められなかった。その末梢循環に動員された細胞を放射線照射した野生型マウスに移植し、その長期再構築能を解析したところ、無脂肪食給餌条件で動員された末梢血液を移植されたマウスでは、普通食給餌条件で動員された末梢血を移植されたコントロール群と比較し、その再構築能が高いことが示された。以上から HSC 動員効率もまた無脂肪食給餌により増加することが示された。

食餌性脂肪の有無により HSC/HPC の動員効率が上昇したことから、動員を制御する食餌性脂肪酸とその機構についてさらに解析をおこなった。まず申請者は、脂肪酸をリガンドとすることが知られている核内転写因子 Peroxisome proliferator-activated receptor family（PPARs）に着目した。骨髄 PPARα/δ/γ のそれぞれのアイソフォーム mRNA 発現量を、PBS/BSA 投与群と G-CSF 投与群で比較したところ、PPARδ mRNA の発現が G-CSF 投与回数とともに特異的に誘導されることを見つけた。さらに興味深いことに、コントロール食給餌条件の動員時、骨髄 PPARδ mRNA の発現量は HPC の動員効率と強い正の相関があり、無脂肪食給餌条件ではさらに強い発現を示した。

骨髄の主な PPARδ 発現細胞を決定すべく、PPARδ 抗体を用いて免疫組織染色、及び骨髄細胞のフローサイトメトリ解析を行ったところ、G-CSF 刺激では、主に分節核・桿状核細胞が強く染色された。また骨髄好中球系細胞を Ly6G,F4/80 の発現強度により、各々成

熟好中球 CD11b+Ly6G^{high} F4/80^{low}, 幼弱好中球 CD11b+Ly6G^{dull} F4/80^{low} 及び単球・マクロファージ CD11b+Ly6G^{dull} F4/80^{high} 分画を Sorting したところ、成熟/幼弱好中球分画にて PPARδ mRNA 及びタンパク質いずれも強く発現が増加していた。以上から G-CSF による動員刺激において、PPARδ の発現を上昇させる主な細胞は成熟/幼弱好中球と考えられた。

また G-CSF は交感神経刺激が高度に惹起されることにより動員を引き起こすことが複数報告されており、また申請者らは以前に G-CSF 刺激において、好中球が全てのβアドレナリン受容体を発現しアドレナリン刺激を受けていることを見出していたため、βアドレナリン(β1,2,3)刺激と好中球 PPARδ の発現について検討した。骨髄成熟/幼弱好中球分画の細胞を分離・培養し、各アドレナリンβ受容体刺激を加えると、PPARδ mRNA の発現量は β1/β2 アドレナリン受容体アゴニストに反応し上昇した。β3 刺激には反応しなかった。これらの結果は好中球前駆細胞株 32D においても同様の結果であった。以上から骨髄好中球 PPARδ の発現は G-CSF を介した一部交感神経刺激により制御されていることが推測された。

さらに、PPARδ の直接的な HPC 動員への影響を、FCM 及び CFU-Cs アッセイにより検討した。PPARδ アゴニスト GW501516 を、G-CSF 刺激と並行して経口投与したところ、HPC の動員効率はコントロール群と比較して有意に減少した。さらに、GW501516 投与により 2 週間の無脂肪食給餌条件による HPC の動員効率の上昇もまた抑制した。一方で、PPARδ アンタゴニスト GSK3787 の経口投与、及び PPARδ ヘテロ接合骨髄キメラマウスでは、有意に HPC の動員効率を増加させた。以上から骨髄好中球 PPARδ は HPC の動員を負に制御していることが示された。

次に G-CSF 刺激下における骨髄脂質メディエーターを測定すべく、過冷却メタノールを用い全骨髄から脂質を抽出し、LC-MS/MS による分析を行ったところ、2 週間の無脂肪食給餌及び G-CSF 刺激により、骨髄ではエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸（DHA）を中心に、その誘導体を含む ω3-PUFA の著しい減少が認められた。一方で無脂肪食給餌条件や G-CSF 刺激条件いずれも ω6-PUFA の有意な変化は認められなかった。そこで EPA や DHA が成熟/未熟好中球の PPARδ リガンドとして機能しているかを検討するため、骨髄成熟/未熟好中球分画細胞を骨髄より単離・培養し EPA/DHA で刺激した。その結果、EPA 刺激では PPARδ 制御下の Angiopoetin like 4 (ANGPTL4)及び Carnitine palmitoyltransferase(Cpt1α)の mRNA の発現量が有意に増加した。また両者は PPARδ アンタゴニスト GSK3787 による共刺激により有意に減少した。以上から EPA が骨髄好中球の PPARδ リガンドとして機能していることが示唆された。

実際に In vivo で EPA が PPARδ のリガンドとして動員を制御するか検討すべく、無脂肪食給餌マウスに G-CSF 刺激と並行して EPA を静注したところ、HPC の動員効率は EPA 非投与群と比較し有意に抑制された。以上から、EPA は好中球において PPARδ リガンドとして機能し、動員を負に制御する可能性が示された。しかしながら、無脂肪食給餌

条件において、野生型マウスに PPARδ ヘテロ接合骨髄を移植したキメラマウスの動員効率は、同条件下の野生型骨髄移植マウスと比較しさらに増加し EPA 投与によりその動員効率の増加はキャンセルされた。骨髄 PPARδ ヘテロ接合骨髄キメラマウスにおいても EPA が作用することから、EPA はまた骨髄好中球 PPARδ 以外の経路を介した動員制御も行っている可能性が残された。

次に、PPARδ の動員制御の機序を探るため、PPARδ 下流の遺伝子 ANGPTL4 の分泌性タンパク質に着目した。ANGPTL4 は血管透過性制御因子として機能することが報告されていることから、骨髄内 ANGPTL4 と動員の関係を調べた。骨髄細胞外液の ANGPTL4 タンパク質は G-CSF と GW501516 投与に反応して増加し、同様に骨髄成熟/幼弱好中球の ANGPTL4 mRNA 発現も増加した。そこで、G-CSF 刺激下に ANGPTL4 中和抗体を投与し、HPC 動員効率を、コントロール IgG 投与群と比較したところ、中和抗体投与群において動員効率の有意な上昇が認められた。また、両群の骨髄血管透過性について検討するため、Evans Blue を静脈注射し、灌流後の骨髄内色素量を比較したところ、GW501516 を投与群及び ANGPTL4 中和抗体投与群で有意に骨髄血管透過性が亢進していた。以上から骨髄好中球 PPAR δ を介した ANGPTL4 の発現は骨髄内血管透過性を抑制する傾向があることが示された。

これらの研究成果から以下の新たな知見が明らかとなった。

1）G-CSF 投与下では骨髄好中球の PPARδ 発現が増加するが、それは交感神経刺激により好中球の β1 及び β2-アドレナリン受容体を介して誘導される。この骨髄好中球 PPARδ は HSC/HPC の動員を負に制御する。

2) 骨髄内 ω-3 脂肪酸は食餌性脂質供給に依存し、一部 G-CSF 刺激によっても減少する。特に ω-３脂肪酸の一つである EPA は骨髄好中球 PPARδ のリガンドとして機能する。

3）骨髄好中球 PPARδ により発現制御される ANGPTL4 は骨髄血管透過性を低下させることで、HSC/HPC の動員を抑制している。

G-CSF 刺激は骨髄内に過剰な好中球を産生させ、細胞外基質を分解する酵素が HPC 動員に必要とも考えられており、実際に抗 Ly6G 抗体による好中球欠失は HPC 動員を減少させる。このような骨髄内の変化はストレス刺激として組織を障害する可能性があるが、この交感神経を介した脂質による動員の制御は、日々摂取する食事に含まれる脂質が一部に担っており、動員のようなストレス刺激時には、恐らく過剰な動員を防ぐブレーキとしての役割を担っている可能性がある。このような知見は今後の造血環境による血液細胞の調整メカニズムを深く理解することに寄与するものと考えられる。