

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591112  
 研究課題名 (和文) 骨髄造血幹細胞の末梢血への動員メカニズムにおける PGE2 の役割に関する検討  
 研究課題名 (英文) The role of PGE2 for hematopoietic stem cell mobilization

研究代表者  
 片山 義雄 (KATAYAMA YOSHIO)  
 神戸大学・医学部附属病院・講師  
 研究者番号：80397885

## 研究成果の概要：

サイトカインによる骨髄造血幹・前駆細胞の末梢血への動員において、骨髄で産生されるプロスタグランジン E2 (PGE2) が必須であるという仮説を検証した。しかし予想に反し、ストレス状況下で定常状態からの PGE2 追加産生が起こりにくい遺伝子改変マウスにおける十分な動員を観察した。PGE2 受容体は 4 種類存在し、各分子によって同じ PGE2 による刺激でも異なる反応がおこることが知られており、PGE2 の追加産生がないことの影響が各受容体の役割の違いで相殺されている可能性を考え、各受容体ごとの動員における必要性を現在詳細に検討中である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞移植学

## 1. 研究開始当初の背景

サイトカイン granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) を健常人に数日にわたって投与することにより、骨髄に存在する造血幹細胞は末梢循環に大量に動員される。骨髄採取と違ってドナーに全身麻酔をかける必要のないことと、移植後の治療成

績は骨髄移植と差がないことが明らかにされ、健常人からの G-CSF による幹細胞動員と同種末梢血幹細胞移植は、2000 年の保険診療適応以後一般にも普及している。しかし、なぜ G-CSF を投与することにより動員がおこるのかは長い間不明であった。最近我々は、G-CSF が交感神経を興奮させ、その神経末端から放出されるカテコラミンが骨芽細胞上

に発現している $\beta 2$  アドレナリン受容体を刺激し造血幹細胞ニッチである骨芽細胞の活性を抑制することにより、骨芽細胞から産生されるケモカイン CXCL12 (造血幹細胞の強力な chemoattractant) の減少や、おそらく骨芽細胞の形態変化による造血幹細胞との接着機構の破綻によって、幹細胞がニッチに留まりにくくなることにより動員がおこることを報告した (Katayama et al. Cell 2006)。

このストーリーにおいて、残された最も大きな課題の一つは、G-CSF が直接交感神経を刺激しているのか、もしくは他の細胞や組織を標的にして、そこからの trans-acting signal により間接的に交感神経に影響を与えているのかが不明である点である。他施設からの報告では、骨髄移植によって作製したキメラマウスにおいて血液細胞の一部が G-CSF 受容体を発現していれば、G-CSF 受容体を欠損した造血幹・前駆細胞も一緒に動員されるが、骨髄移植によって野生型マウスの造血システムを全て G-CSF 受容体欠損マウス由来に入れ替えてしまうと、G-CSF による動員がおこらない事が報告されており (Liu et al. Blood 2000)、これは G-CSF のはじめの標的が骨髄移植によって生着可能な組織 (基本的には造血系細胞) である可能性を示唆していると我々は考えている。

現在我々が、骨髄中の交感神経を刺激する物質として着目しているのが prostaglandin E2 (PGE2) である。PGE2 は脾臓や腎での sympathetic outflow を増強することが知られている。骨髄交感神経を刺激するかどうかの報告はないが、他臓器と同様に刺激されている可能性は高いと考えている。また、4 種類認められているその受容体 (EP1, EP2, EP3, EP4) がそれぞれ別の役割を持ち、交感神経刺激作用のみでなく、神経性疼痛や発熱、破骨細胞活性化などさまざまな作用を示す。

興味深いことに、臨床的に健常人ドナーに G-CSF による動員を施すと、非常に高い確率で骨痛や発熱が副反応としてみられる。また、G-CSF 投与中の破骨細胞の活性化と一部動員メカニズムへの関与も報告されている。さらに、骨芽細胞等の骨組織形成細胞は、始めに他の組織から刺激を受けると PGE2 を放出し、自身に発現している受容体を介して PGE2 産生の auto-amplification がおこる。

以上のことから、骨髄は PGE2 の産生・作用の場としては特殊であると考えられ、それに伴って予想される効果 (交感神経刺激、疼痛・発熱、破骨細胞活性化) は、G-CSF による造血幹細胞動員の際に起きている多くの現象と合致する。

## 2. 研究の目的

我々は G-CSF によりマクロファージをはじめとした骨髄造血系細胞が G-CSF で刺激され、そこから PGE2 が産生され、交感神経系に発現している受容体を介して神経興奮を起こすとの仮説を立てた。本研究ではこの仮説の真偽を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 定常状態での PGE2 産生には関わらず、生体にストレスが加わり、通常量以上の PGE2 を産生する場合に発現する PGE2 合成酵素を司る遺伝子が membrane-associated PGE2 synthase-1 (mPGES-1) である。この遺伝子欠損マウスを、製作者である大阪大学微生物病研究所自然免疫学分野 審良静男教授から供与を受けた。野生型とこの遺伝子改変マウスに G-CSF を 4 日間投与し、末梢血・骨髄に

おける細胞数・造血前駆細胞数の変化を検討した。

(2) 骨髄中に存在して移植可能であり、G-CSF 受容体を持ち、PGE2 を大量に産生できる細胞の候補の一つが骨髄マクロファージである。骨髄長期培養 (Dexter type) を野生型マウスの骨髄を用いて行い、in vitro での造血微小環境を構築させた後、そこに G-CSF を加える事により、支持細胞集団 (半数以上がマクロファージ) における mPGES-1 遺伝子の変化を定量的 PCR 法にて検討した。

#### 4. 研究成果

(1) mPGES-1 欠損マウスにおける G-CSF 投与による造血前駆細胞の末梢血への動員は、野生型と比較して低下はしていなかった。しかし、4 種類存在する PGE2 受容体は、それぞれ異なる生理作用を呈する事が知られており、PGE2 の過剰産生がある場合 (野生型) とない場合 (mPGES-1 欠損) 場合いずれも動員にとって促進系と抑制系のバランスが拮抗している可能性も考えられる。そこで、現在それぞれの受容体の遺伝子欠損マウスないしはアゴニスト・アンタゴニストにて動員効率に変が生じるかどうかについて検討中である。

(2) 骨髄長期培養系に G-CSF を加えて一定時間後に、マクロファージを多く含んだ支持細胞層の RNA を抽出し、定量的 RT-PCR にて mPGES-1 遺伝子の推移を検討したところ、G-CSF 添加では殆ど変化がなく、骨髄マクロファージからの G-CSF 刺激による PGE2 産生は遺伝子変化としては捉えられなかった。しかし、時間経過を細かく見ていくことにより

一過性に上昇していることも考えられ、G-CSF 添加後の詳しい時間経過での検討と、上清中の PGE2 の定量にて検討をすすめている。

本研究は、現在臨床で広く用いられているサイトカインによる幹細胞動員のメカニズムに新たな理解を加える試みであり、造血幹細胞移植医療への貢献を目指して今後も進めていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) Kikuchi T, Kubonishi S, Katayama Y, et al (他 5 名、8 番目) Dock2 participates in bone marrow lympho-hematopoiesis. Biochem Biophys Res Commun 367, 90-96, 2008 査読有

(2) Kubonishi S, Kikuchi T, Katayama Y, et al (他 8 名、11 番目) Rapid hematopoietic progenitor mobilization by sulfated colominic acid. Biochem Biophys Res Commun 355, 970-975, 2007 査読有

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 義雄 (KATAYAMA YOSHIO)  
神戸大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号 : 80397885

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし