

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2020

課題番号：20K22941

研究課題名(和文) 骨髄内脂肪細胞による造血再生障害メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of impaired hematopoietic regeneration by bone marrow adipocytes

研究代表者

原田 介斗 (HARADA, Kaito)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：70880441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、線溶系を阻害するアディポカインであるPAI-1に着目し、骨髄内脂肪細胞(BMA)がPAI-1を介して造血再生を負に制御していることの証明を試みた。まず、BMAがPAI-1を産生することを、免疫染色、FACS、qPCRで証明し、BMAが豊富な骨髄において造血再生が遅延し、またPAI-1を阻害剤すると改善することを示した。次に、肥満マウスでBMAが豊富に存在し、肥満個体の骨髄中では豊富なPAI-1が線溶系を抑制し、stem cell factorが低下することで造血が抑制されることを確認し、PAI-1阻害剤投与により肥満個体でも効率の良い造血再生が達成できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、PAI-1は骨髄内脂肪細胞が豊富な微小環境において造血再生を障害する因子であり、骨髄内脂肪細胞が豊富な個体に対して造血幹細胞移植後にPAI-1活性を阻害することは造血再生を促進する新しい治療戦略となりうると考えられた。この結果は、ドナーが見つからない肥満患者への移植適応拡大や、細胞数が少ない臍帯血の有効利用などにつながることを期待できた。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow adipocytes (BMAs) have been recognized as a niche component with a suppressive function. We hypothesized that plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) contributes to impaired hematopoiesis in BM microenvironment with abundant BMAs. We demonstrated that BMAs were positive for PAI-1. The BMA-rich microenvironment exhibited impaired hematopoietic regeneration after transplantation. The impaired hematopoietic regeneration in BMA-rich microenvironment was significantly alleviated by PAI-1 knockout or PAI-1 inhibitor treatment. Obese mice with abundant BMAs exhibited higher bone marrow PAI-1 concentrations after transplantation. PAI-1 inhibitor administration activated the fibrinolytic system in obese mice, contributing to the higher SCF concentration. Moreover, PAI-1 inhibitor treatment alleviated the impaired hematopoietic regeneration in obese mice after transplantation. These results indicate that PAI-1 hinders hematopoietic regeneration in BMA-rich microenvironments.

研究分野：血液学

キーワード：造血幹細胞 骨髄微小環境 造血幹細胞移植 骨髄内脂肪細胞 PAI-1

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに、骨髄内脂肪細胞は造血再生を抑制する因子であることが知られている。実臨床においても骨髄内脂肪細胞が豊富な肥満患者においては造血再構築障害がみられ、造血幹細胞移植に際してより多くのドナー細胞輸注を必要とし、体重当たりの輸注細胞が少ないと生着不全や生着遅延によって致命的な感染症などを発症する。しかし、マウスにおいてはたった1つの造血幹細胞が全ての造血を再構築できることがわかっており、なぜヒトの移植において体重が増えた場合により多くの細胞を要するのかはわかっていない。

## 2. 研究の目的

近年、我々は Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) を阻害することで骨髄内線溶系経路が活性化し、造血促進するサイトカインである Stem cell factor の増加を介して造血再生促進に働くことを報告した (Ibrahim AA, Stem cells, 2014)。PAI-1 は脂肪細胞から分泌されるアディポカインの一つとして知られているため、骨髄内脂肪細胞が豊富な骨髄微小環境においては骨髄内脂肪細胞由来の PAI-1 が造血再生障害の原因であると仮説を立て、この造血再生抑制メカニズムの証明を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

マウス: C57B6/J および C57B6/J をバックグラウンドとした PAI-1 欠損マウスを用いた。肥満マウスは 60 kcal% の高脂肪食を 12 週間投与して作成した。造血幹細胞移植はレシピエントマウスに 9Gy の致死量放射線を照射した後、同系ドナーマウスから骨髄細胞を単離して  $3 \times 10^6$  を尾静脈から輸注した。移植後、TM5614 (PAI-1 阻害剤) もしくは vehicle を 2 週間経口投与した。

細胞単離: 骨髄細胞は脛骨、腓骨を PBS+0.5% bovine serum albumin+2 mM EDTA でフラッシュすることで回収した。骨髄微小環境細胞はフラッシュ後の骨を DMEM+0.2% type I collagenase で 60 分処理したのちに、 $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ -free Hanks' buffered saline solution+2% FBS+1% PS で 3 回洗浄して回収した。

免疫染色: 大腿骨もしくは尾骨は rabbit anti-PAI-1 (ab28207; Abcam)、goat anti-perilipin-1 antibodies (ab61682, Abcam) で反応させ、その後 Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-goat IgG (A-11058; Invitrogen)、Alexa Fluor 488-conjugated chicken anti-rabbit IgG antibodies (A-21441; Invitrogen) で染色した。染色画像は HS All-in-one Fluorescence Microscope BZ-9000 (Keyence Corporation) を使用して撮影、解析した。

ELISA: 骨髄を 1ml の PBS+0.5% bovine serum albumin+2 mM EDTA でフラッシュし、350 g 10 分で遠心分離して細胞成分をペレットとし、上清を回収し、骨髄液とした。骨髄内容を 25  $\mu$ l と見積もり、25 倍希釈として計算した。active PAI-1 は Innovative Research、SCF は Proteintech の ELISA キットを用いて測定した。

## 4. 研究成果

- (1) まず、大腿骨と尾骨において骨髄内脂肪細胞の多寡を比較したところ、図 1 のように大腿骨と比較して尾骨ではペリリピン陽性の骨髄内脂肪細胞が豊富に存在し、同細胞は PAI-1 を共発現していた (図 2)。

次に、骨髄をコラゲナーゼ処理して骨髄微小環境細胞を回収し、PAI-1 の発現をフローサイトメトリーで確認したところ、脂肪細胞の progenitor は PAI-1 を高発現していた (図 3)。

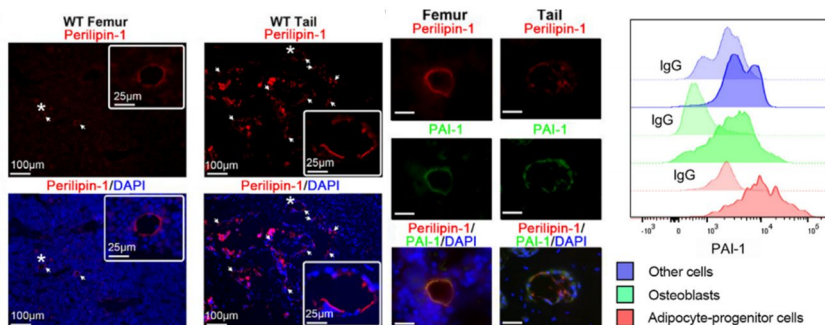


図 1(左),2(右). 大腿骨、尾骨におけるペリリピン (赤)および PAI-1(緑)、DAPI(青)の免疫染色

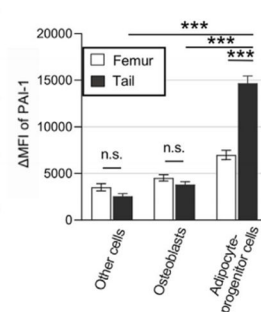


図 3. フローサイトメトリーによる骨髄内脂肪細胞における PAI-1 発現

(2)次に、大腿骨と尾骨を用いて同系造血幹細胞移植後の造血再生を比較した。予想した通り、尾骨における同系移植後のドナー細胞の造血再構築は大腿骨よりも劣っており、総ドナー細胞数、ドナー造血幹細胞(CD34-Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞)数ともに少なかった。この造血再生障害はPAI-1欠損マウスや移植後にPAI-1阻害剤を投与したマウスにおいて有意に改善していた。これにより、骨髄内脂肪細胞が豊富な骨髄においては造血再生が遅延し、PAI-1を阻害することで造血再構築が回復することがわかった。

(3)次に、高脂肪食を給餌して肥満マウスを作成し、同マウスにおけるPAI-1阻害剤の造血再生に対する効果を検証した。肥満マウスの骨髄は通常体重マウスよりも脂肪細胞が豊富で(図4) PAI-1を高発現していた。輸注ドナー細胞が骨髄に到達するホーミング能は両マウスで同等であった。しかしながら、肥満マウスは移植後造血再生障害を呈し、総ドナー細胞数、ドナー造血幹細胞数ともに少なかった。この造血再生障害はPAI-1阻害剤投与によって改善し、この効果は末梢血中白血球の回復、および組織学的にも確認できた。また移植後の肥満マウスの骨髄は通常体重マウスと比較してPAI-1が高値で(図5)線溶系経路であるtissue plasminogen activator (t-PA)やplasminが抑制されていたが、PAI-1阻害剤投与によってt-PA、plasminともに増加し、線溶系の亢進が確認できた。その結果、肥満マウスで低下していたStem cell factor濃度はPAI-1阻害剤によって上昇した(図6)。これらにより、肥満個体において豊富に存在するBMAはPAI-1を介して骨髄内線溶系を抑制し、造血再生を負に制御しており、PAI-1を阻害することでstem cell factorの増加を介して肥満個体でも効率の良い造血再生が達成できることを実証した。

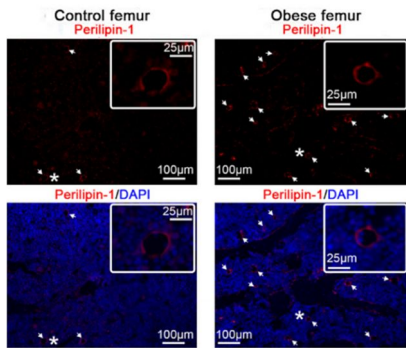


図4. 肥満マウスと通常体重マウスの骨髄内脂肪細胞

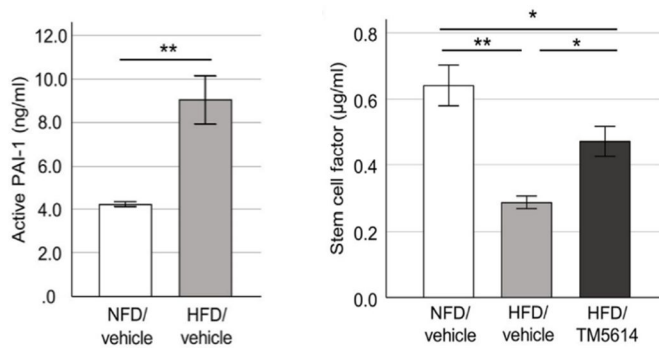


図5(左),6(右). 肥満マウスと通常体重マウスの移植後骨髄内のPAI-1およびSCF濃度

上記結果より、PAI-1は骨髄内脂肪細胞が豊富な微小環境において造血再生を障害する因子であり、骨髄内脂肪細胞が豊富な個体に対して造血幹細胞移植後にPAI-1活性を阻害することは造血再生を促進する新しい治療戦略となりうると考えられた(図7)。この結果は、ドナーが見つからない肥満患者への移植適応拡大や、細胞数が少ない臍帯血の有効利用などにつながるものが期待できた。

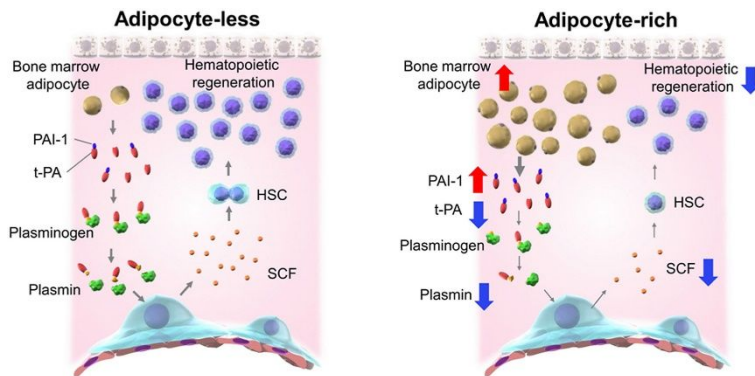


図7. 本研究のabstract figure。骨髄内脂肪細胞が豊富な骨髄においては豊富なPAI-1が線溶系を抑制し、SCFを低下させることで造血再生を負に制御している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaito Harada, Takashi Yahata, Makoto Onizuka, Abd Aziz Ibrahim, Eri Kikkawa, Toshio Miyata, Kiyoshi Ando	4. 巻 557
2. 論文標題 Plasminogen activator inhibitor type-1 is a negative regulator of hematopoietic regeneration in the adipocyte-rich bone marrow microenvironment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 180-186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.04.017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------