

骨髓微小環境における脂肪細胞の役割

PPAR- γ Antagonists Attenuate Bone Marrow Failure in an Aplastic Anemia Mouse Model but not in Radiation Marrow Destruction

自治医科大学	佐藤 一也
派遣期間	2011年4月3日～2013年8月22日
研究機関	National Institutes of Health (NIH), NHLBI, Hematology Branch, 9000 Rockville Pike, Bethesda, MD 20892 USA
研究指導者	Neal S. Young, MD

Aplastic anemia (AA), one of the well-known bone marrow (BM) failure diseases, is characterized by a decrease in the number and function of hematopoietic stem cells (HSCs) and progenitors, and by a massive expansion of adipocytes in BM cavities. A functional role of adipocytes in AA is unclear. In this study, we demonstrate that inhibition of adipogenesis by peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) inhibitors can improve hematopoiesis in a mouse model of immune-mediated BM failure. Mice in PPAR- γ inhibitor-treated groups showed higher levels of leukocytes, neutrophils, red blood cells, and platelets in peripheral blood (PB), and higher total nucleated cells and Lin-Sca1+ c-kit+ stem cells in BM than did animals in the control group. In PPAR- γ inhibitor-treated groups, there was significantly less CD8+ cell infiltration in BM, suggesting that inhibition of adipogenesis might affect activation of cytotoxic T cells. Both confocal microscopic imaging and HE staining of BM also showed significantly higher numbers of nucleated cells in the treated groups. This is the first report that reveals a negative role of adipocytes in immune-mediated BM failure, and this study suggests PPAR- γ can be a novel therapeutic target in AA.

研究目的

再生不良性貧血をはじめとする造血不全疾患は高度の低形成性骨髓を呈し、骨髓内の殆どは脂肪細胞で占拠されることが知られている。しかしながら、脂肪細胞は造血細胞の広汎な破綻から生じた二次的に生じたものにすぎないのか、また造血に何らかの正ないし負の影響を与えているのかは長く不明のままであった。おそらく受動的な役割を担うにすぎないものとして、これまで大きな問題として捉えられることはなかったが、2009年の*Nature*誌に骨髓脂肪細胞は造血を抑制するという衝撃的な報告がボストンのグループからなされた。先天的に脂肪が形成できないA-ZIP/F1マウスを用いて、致死量の放射線照射後に骨髓移植を実施すると、正常のマウスと比較して明らかに骨髓の生着、及び末梢血の血球回復が促進した。また脂肪分化の制御に中心的役割を担う

転写因子であるPPAR- γ 阻害剤を腹腔内投与しても、同様の結果が確認されたとしている。

われわれは本報告をうけて、原因不明の難治性造血不全（厚生労働省特定疾患治療研究対象疾患）である再生不良性貧血の治療に骨髓脂肪細胞が標的となり得るのではないかと考えた。本疾患は造血幹細胞移植や免疫抑制療法など一定の効果が期待できる治療法はあるものの、ときとして致死的な合併症を併発するなど、より安全かつ効果的な治療法が望まれてきた。すでにわれわれの研究室では造血不全の安定したマウスモデルの開発に成功しており、共焦点レーザー顕微鏡の画像を三次元再構築することで骨髓を効率よく可視化することができる。われわれはPPAR- γ 阻害剤を造血不全マウスに投与し、いくつかの分子生物学的手法を組み合わせることで、*in vivo*、*in vitro*の両方から研究課題をすすめた。

研究経過

C.B10-H2b/LilMcd マウスに亜致死量の全身放射線照射 (500cGy) を行い、同日に C57BL/6 マウス由来のリンパ球 (5×10^6 cells、MHC マイナー抗原不一致) を輸注することで、免疫学的な造血不全を発症するモデルを作成した。移植片対宿主病は発症することなく、すべてのマウスは二週間以内に高度の汎血球減少をきたした。放射線照射及びリンパ球輸注の前日より PPAR- γ 阻害剤 (BADGE、あるいは GW9662) をレシピエントマウスに腹腔内投与し、day14 まで継続したところで解析を行った。

上述のマウスモデルを用いて、PPAR- γ 阻害剤による骨髄内の脂肪新生 (adipogenesis) の抑制による効果を下記の項目にて評価した。

1. 共焦点レーザー顕微鏡、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色 (マウス胸骨、大腿骨)
2. 末梢血血球数、骨髄単核球数
3. フローサイトメトリー
4. PCR array
5. ウェスタンブロッティング
6. 血清サイトカイン測定 (Multiplex®)

共焦点レーザー顕微鏡を用いて造血不全マウスの胸骨骨髄の三次元再構築イメージングを実施したところ、骨髄内の造血細胞はほぼ消失しており、殆どが脂肪細胞で占拠されていた。一方で、PPAR- γ 阻害剤投与群 (以下、治療群と略す) では骨髄内の細胞成分の比率は明らかに高く、脂肪細胞の浸潤はきわめて少なかった。H&E 染色でも同様に、造血不全マウスでは骨髄の正常構造が高度に破壊され、脂肪に置換されているものの、治療群では比較的よく保たれていることが確認された。末梢血中の白血球数、血小板数、及び骨髄内単核球のいずれにおいても治療群で有意かつ再現性をもって高値であった。更にフローサイトメトリーを用いた解析によって、骨髄内の造血幹細胞及び前駆細胞などの造血初期段階の集団 ($\text{Lin}^-\text{Scal}^+\text{c-kit}^+$) は治療群で有意に多いことが明らかになった。はじめに仮定したように、造血不全において PPAR- γ 阻害剤による adipogenesis の抑制が造血を促進する可能性が示唆された。

次に大腿骨及び脛骨から total RNA を抽出し、adipogenesis、脂肪酸代謝、及び inflammasome (炎症やアポトーシスに関与する蛋白質の複合体) 経路の

遺伝子に着目して PCR array を実施した。これまでの実験結果を支持するように、治療群では殆どの adipogenesis に関わる遺伝子の発現レベルが 3-20 倍程度低下していた。PPAR- γ の標的遺伝子である *Agt* (-11.6 倍)、*Nrob2* (-19.3 倍)、*Sirt1* (-15.6 倍)、*Ncoa2* (-14.9 倍)、*Adig* (-14.2 倍)、*Bmp2* (-12.9 倍)、及び *Acacb* (-11.7 倍) などは 10 倍以上の発現レベルの低下がみられた。一方で細胞周期関連遺伝子の *E2f1* (6.1 倍) や *Mapk14* (3.0 倍) は上昇し、炎症関連遺伝子である *Il6* (-7.4 倍)、*Tnfsf4* (-7.7 倍)、*Irf4* (-15.8 倍) 及び *Tnf* (-6.9 倍) などは殆どが低下していた。PPAR- γ 、及びその標的遺伝子かつ代表的なアディポサイトカインのひとつとして知られる *Agt* の骨髄内での発現をウェスタンブロッティングで確認したところ、治療群で明らかに低下していた。Multiplex® を用いた血清サイトカインの解析では、治療群で、炎症性サイトカインである MCP-1、IL-6、Th1 サイトカインである IFN γ 、IP-10、及び TNF- α の低下を認めた。以上より、PPAR- γ 阻害剤の投与によって adipogenesis の抑制はもとより、骨髄のみならず、全身性の炎症反応が減弱していることが明らかになった。引き続き共焦点レーザー顕微鏡及びフローサイトメトリーを用いて骨髄内に浸潤している CD4、CD8 陽性 T 細胞の絶対数を確認したところ、造血不全マウスではドナー由来の T 細胞が輸注後 10 日程度をピークとして骨髄内に広汎に浸潤しているのに対し、治療群では CD4、CD8 のいずれのサブセットにおいてもその割合は有意に減少していた。すなわち、PPAR- γ 阻害剤による造血の回復は、必ずしも adipogenesis の抑制を介したのではなく、薬剤それ自体に何らかの直接的な細胞性免疫抑制作用がある可能性が示唆された。

更に検証をすすめるべく、(1) 致死量放射線照射 (900cGy) モデル、(2) 化学療法による骨髄抑制モデル (5-FU 100ug/g、腹腔内投与) を用いて、PPAR- γ 阻害剤の治療効果を確認した。PPAR- γ 阻害剤による adipogenesis の抑制が造血を支持するのであれば、必ずしも造血不全モデルでなくても、効果は期待できるはずである。寧ろ放射線被曝や抗がん剤などによる造血障害を PPAR- γ 阻害剤が軽減するのであれば、臨床的にはより大きな恩恵を受けるものと考えた。しかしながら、仮説に反して、(1)、(2) のいずれのモデルにおいても PPAR- γ 阻害剤による治療効果は確認できなかった。末梢血血球数、骨髄単核球数

に有意差はみられず、共焦点レーザー顕微鏡においてもコントロール群と治療群とに明らかな違いはなかった。

最後に CD4、CD8 陽性 T 細胞を MACS®にて単離し、PPAR- γ 阻害剤を添加して PMA+ionomycin で増殖刺激を与えて *in vitro* で培養したところ、PPAR- γ 阻害剤の存在下ではいずれのサブセットの増殖も dose dependent に有意に抑制され、また活性化マーカーである CD25 の発現が低下することが明らかとなった。ICAM-1 の発現も低下しており、T 細胞の骨髄へのトラフィッキングの減弱に寄与しているものと考えられた。

以上の実験結果より、骨髄脂肪細胞を標的とした造血不全に対するあらたな治療の確立が期待されたものの、その治療効果は adipogenesis の抑制を介するものではなく、薬剤それ自体に免疫抑制効果があることが示された。従って、adipogenesis の抑制が造血を回復させるとの *Nature* 誌の結論を導くためには、免疫学的な影響が実験結果を修飾していないか、再検討する必要があると思われた。

上述の実験結果からは骨髄脂肪細胞の役割を明らかにすることができず、また PPAR- γ 阻害剤を用いた解析には免疫学的な影響が払拭できないことから限界があることが明らかとなった。そこで FVB/NJ マウスを用いたあらたな造血不全モデルを開発し、従来の造血不全モデル (C.B10) と比較することで、あらたな知見を得ることを試みた。レシピエントを FVB/NJ マウスとして、放射線照射量を 700cGy、DBA マウス由来のリンパ球を 10×10^6 cells 輸注する、より重症度の高い造血不全モデルを作成した (MHC マイナー抗原不一致)。従来の造血不全モデル (C.B10) ではリンパ球輸注二週間後にマウスは広汎な骨髄不全に陥り、骨髄内の殆どが脂肪細胞で占められることは前述の通りである。造血不全の機序はドナーリンパ球による免疫学的な骨髄の破壊であるので、免疫抑制剤であるシクロスポリン (CyA) を投与することで造血不全から免れることが分かっている。興味深いことに上記に示したあらたな造血不全モデル (FVB/NJ) では、リンパ球輸注二週間後に同様に高度の汎血球減少、骨髄の広汎な破壊がみられるものの、脂肪細胞の浸潤は殆ど認められない。更に興味深いことに、CyA を投与すると、造血の回復と共に脂肪細胞が同時に骨髄内に増殖するという、従来とは相反する生体内での変化を示すことが明らかにな

った。

FVB/NJ マウスは高度造血不全かつ脂肪細胞の増加もない (骨髄内は硝子様物質で占められている) 状態に至るものの、PCR array では adipogenesis 関連遺伝子の発現は明らかに亢進しており、いくつかの中心的役割を担う負の制御因子がオーバーライドしているものと考えられる。すなわち、造血不全における adipogenesis は単に骨髄内の造血細胞の枯渇から普遍的に起こるものではなく、ドナーとレシピエントとのアロ免疫反応の程度、あるいはその組み合わせによって異なることが明らかとなった。本研究成果はこれまで発表されていないあらたな知見であり、マスターレギュレーターを同定すべく、現在なお NIH にて研究を継続している。

考察

脂肪組織は単に中性脂肪、ひいては余剰なエネルギーを貯蔵する役割を担うのみと考えられていたが、近年の基礎、臨床研究の進歩によって、アディポサイトカインなどを分泌する重要な内分泌器官であるうえに、炎症や免疫反応と密接に関わっていることが分かってきた。一方で骨髄内の脂肪の役割については、前述の *Nature* 誌を除くと殆ど報告されていない。造血不全疾患における骨髄脂肪細胞を検討した報告は おそらく本研究がはじめてである。PPAR- γ は adipogenesis に関わる中心的な転写因子であるが、現在使用可能な PPAR- γ 阻害剤はきわめて不安定な薬剤である。本稿で示したように細胞性免疫修飾作用があるなど特異的に adipogenesis を抑制しているとはいえない。更に *in vitro* の解析では比較的 low 濃度であっても cytotoxicity を示すなど、本薬剤を用いた実験結果を以て、脂肪細胞の生体内の役割を議論することは困難である。

前述の *Nature* 誌の発表後、論文は幅広く引用され、現在では脂肪細胞は造血の negative regulator であるとの認識が広まりつつある。われわれが今回あらたに開発した FVB/NJ マウスを用いた造血不全モデルは非常にユニークであり、adipogenesis がアロ免疫反応、或いは炎症性サイトカインなどの違いによって異なる形で惹起されることをはじめて示したものである。造血不全状態でも必ずしも骨髄内に脂肪細胞が増殖しないことから、少なくとも脂肪細胞が造血の負の制御因子であると決定づけることはできない。PCR array などの結果から造血不全における骨

髄中の adipogenesis の詳細なシグナル伝達を明らかにすることで、阻害剤や siRNA などを用いて特異的にブロックすることが可能となる。本研究を更にすすめることで、骨髄内脂肪の役割、とくに造血への影響を近く解明できるものと考えている。

研究の発表

口頭発表

1. Kazuya Sato, Xingmin Feng, Jichun Chen, Marie J. Disierto, Keyvan Keyvanfar, Daniela Malide, Sachiko Kajigaya, and Neal S. Young. Adipocytes

and Aplastic Anemia; Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-g (PPAR-g) Antagonists Attenuate Bone Marrow Failure in an Aplastic Anemia Mouse Model but Not in Radiation Marrow Destruction. ASH Annual Meeting, Atlanta, GA, 2012

2. Kazuya Sato. PPAR-g in adipocytes plays a negative regulatory role in immune-mediated bone marrow failure. CHI Symposium: The human immune system after perturbation and in disease, Bethesda, MD, 2012