

## ミニ・レビュー —小西賞受賞者—

## 末梢血造血幹細胞動員に関する研究

湯尻俊昭

山口大学大学院医学系研究科病態制御内科学分野(内科学第三) 宇部市南小串1丁目1-1(〒755-8505)

Key words : 造血幹細胞移植, 末梢血幹細胞, G-CSF

## 和文抄録

造血幹細胞に関する研究は組織幹細胞の中で最も進んでいる領域の一つである。特に注目されている造血幹細胞と骨髄微小環境(いわゆるニッチ)との関連は、幹細胞としての自己複製能や多分化能維持に極めて重要であり、造血幹細胞が骨髄から末梢血中へ「動員」させる際に、この両者間でダイナミックな変化が生じている事が明らかにされている。骨髄から動員された末梢血幹細胞は自家移植や同種移植の重要な細胞源として認識され、この幹細胞動員・採取は顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)製剤を使用し、世界中の施設で行われている。しかしながら動員メカニズムには未解明の部分が多く、臨床的に改善の余地が残されている。さらに効率的で安全な末梢血幹細胞動員・採取法の開発につながることを目的として、我々はG-CSF製剤投与による末梢血幹細胞動員時に生じる様々な生体内変化について臨床検体を用いて検討してきた。同種末梢血幹細胞移植のためにG-CSF製剤を投与した健常人ドナーについて骨代謝、脂肪組織、交感神経等に焦点を当て解析を行った。さらに自家末梢血幹細胞採取のタイミングをはかるために、より簡便なCD34+細胞の代替マーカーの検討を行った。

## はじめに

造血幹細胞や前駆細胞は恒常的に骨髄から末梢血中に少数流出している。この過程はストレス刺激(たとえば感染症、骨髄破壊的薬剤、サイトカインなど)によって一過性に増加し、生体の恒常性維持のために機能していると考えられている<sup>1)</sup>。長年の研究により組織幹細胞の一つである造血幹細胞は骨髄から末梢血中へ「動員」させることが可能である。この末梢血幹細胞は自家移植や同種移植の重要な細胞源である。自家移植の場合、患者に対し化学療法後に顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)製剤を投与し採取する。一方、同種移植の場合は、健常人ドナーに対して大量のG-CSF製剤を投与して採取を行う。このようにG-CSF製剤は好中球減少症に対する治療だけでなく、末梢血幹細胞動員薬剤として重要な役割を担っている。全身麻酔下で採取する骨髄採取に比べ、覚醒下で末梢血から造血幹細胞を採取できることや、移植後の血球回復が末梢血幹細胞は骨髄幹細胞に比べ速やかであること等から、移植細胞源は末梢血幹細胞が主流になりつつある。しかしながら自家移植の場合、度重なる化学療法によって自己造血幹細胞採取が不十分になることや、同種移植の場合では、健常人ドナーに大量のG-CSF製剤を投与することによる副作用や合併症も懸念されている。G-CSFによる造血幹細胞動員機構を解明することは、生体維持機構の一つを明らかにすることだけでなく、より効率的で安全な幹細胞採取法の開発につながる。さらには組織幹細胞源として組織修復・再生医療の発展に寄与する可能性も有している。造

血幹細胞に関する研究は組織幹細胞の中で最も進んでいる領域である。特に注目されている造血幹細胞と骨髄微小環境（いわゆるニッチ）との関連は、幹細胞としての自己複製能や多分化能維持に極めて重要であり、動員時にダイナミックな変化が生じている事が多くの研究により明らかにされている。これらの知見を基にして、我々はG-CSF投与による末梢血幹細胞動員時に生じる種々の生体内変化について臨床検体を用いて検証してきた。自家移植ドナーでは罹患している血液疾患やこれまでの治療歴など背景が多様であるため、同種末梢血幹細胞の健常人ドナーを対象として解析してきた。

### 骨代謝

骨髄微小環境は前述の通り、造血幹細胞の維持に重要な役割を担っている。解剖学的にも骨内膜には造血幹細胞が存在する事が証明されている。さらに骨芽細胞は“骨内膜ニッチ”の重要な構成因子の一つであることが証明されており、造血幹細胞の挙動に重要な役割を担っているケモカインCXCL12の産生細胞として機能している。またG-CSF投与時での骨芽細胞の数的、機能的抑制は幹細胞動員に重要な役割を果たしている<sup>2)</sup>。さらに破骨細胞もこの課程に重要であることが報告されている<sup>3)</sup>。このように骨芽細胞・破骨細胞のバランスは、直接または間接的に造血幹細胞動員に影響を与えている。そこで我々は骨代謝マーカーの幹細胞動員時の変化について検討した。Wntシグナルの調節因子である

Dickkopf-1 (DKK1) は骨代謝のみならず、脂肪組織、造血細胞など様々な機能に関与していることが報告されている。DKK1に加え、破骨細胞分化に関与するsoluble receptor activator of nuclear factor- $\kappa$  B ligand (sRANKL)、破骨細胞抑制因子のosteoprotegerin (OPG) の血中濃度を健常人ドナー20名の4日間G-CSF投与前後で比較検討したところDKK1は有意な低下を示し、sRANKLは有意な増加を示した(図1)。OPGは有意な変動は認められなかった<sup>4)</sup>。このように骨内膜ニッチを構成している骨芽細胞や破骨細胞はG-CSF投与によりダイナミックな変化をきたし、造血幹細胞の動員に関与していることが示唆された。

### 脂肪組織

骨髄内は造血細胞以外にも多くの細胞が存在しており、脂肪細胞もその一つである。近年、脂肪組織は内分泌臓器の一つとして認識されており、エネルギー調節、炎症、免疫反応に関与することが明らかになっている。アディポカインはその脂肪細胞から分泌される生理活性物質の総称である<sup>5)</sup>。脂肪細胞が造血幹細胞動員に与える影響を検討するため、G-CSF投与による末梢血幹細胞動員時の血中アディポカイン(visfatin, resistin, adiponectin, leptin)の変動を比較検討した。前述の健常人ドナー20名のG-CSF投与前後の検討では、visfatinとresistinが有意な増加を示したが、adiponectinやleptinは有意な変動を示さなかった(図2)。さらに我々は培養脂

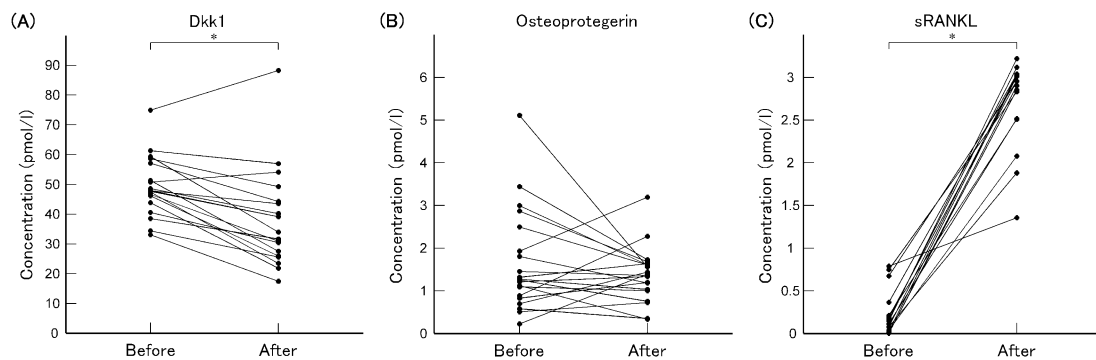


図1 骨代謝マーカーの変動

(A) 血清DKK1, (B) 血漿osteoprotegerin, (C) 血漿sRANKLのG-CSF投与前 (Before) と投与後4日目幹細胞採取前 (After) の測定値を示した。\* P値<0.05

肪細胞を用い、G-CSF受容体の発現を確認し、G-CSF添加によって細胞内シグナル伝達経路が活性化することを見いだした。さらに、この培養脂肪細胞の系ではG-CSF添加によってvisfatinは培養上清中に有意な増加を示した<sup>6)</sup>。SkokowaらはG-CSF投与により健康人の血中visfatin増加に加え、visfatinはCD34+細胞の増加と顆粒球分化を促すことを報告している<sup>7)</sup>。このように造血支持組織の一つとして脂肪細胞から分泌されるvisfatinのようなアディポカインが造血幹細胞動員に関与していることを示唆するものと考えられる。

### 交感神経

骨髄微小環境は神経支配されていること、カテコラミン作動物質が免疫反応に影響を与えていることは多くの研究から明らかにされている。KatayamaらはG-CSF投与による幹細胞動員に交感神経系を介した骨髄微小環境の調節が必要であることをマウスモデルによって明らかにした<sup>8)</sup>。またヒトCD34+細胞には $\beta$ 2アドレナリン受容体やドーパミン受容体が発現し、G-CSFによって発現上昇が認められ、交感神経作動物質は造血幹細胞の直接的な走化性物質

であることが報告された<sup>9)</sup>。さらに最近、定常状態において造血幹細胞の動員は日内変動を来していることが報告され、交感神経系の支配を受けていることがマウスモデルにおいて証明された<sup>10)</sup>。そこで我々は末梢血幹細胞動員時の血中カテコラミン（ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン）の変動を検討した。G-CSF投与前後ではドーパミンの有意な変動は認められなかったが、ノルアドレナリン、アドレナリンは有意に低下していた<sup>11)</sup>（図3）。このような血中カテコラミンの変化がG-CSF投与後に認められたことは、ヒトにおいても造血幹細胞動員に交感神経系を介する経路が存在する事を示唆しているものと思われる。またこのような結果はG-CSFが神経内分泌系に与える影響や神経細胞の保護効果、再生作用の観点からも興味深いものと思われる。

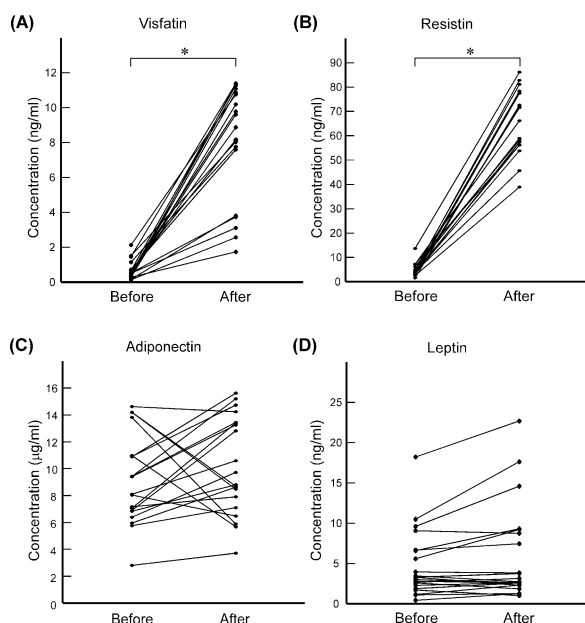


図2 アディポカインの変動

(A) 血清Visfatin, (B) 血清Resistin, (C) 血清Adiponectin, (D) 血清LeptinのG-CSF投与前 (Before) と投与後4日目幹細胞採取前 (After) の測定値を示した。\* P値<0.05

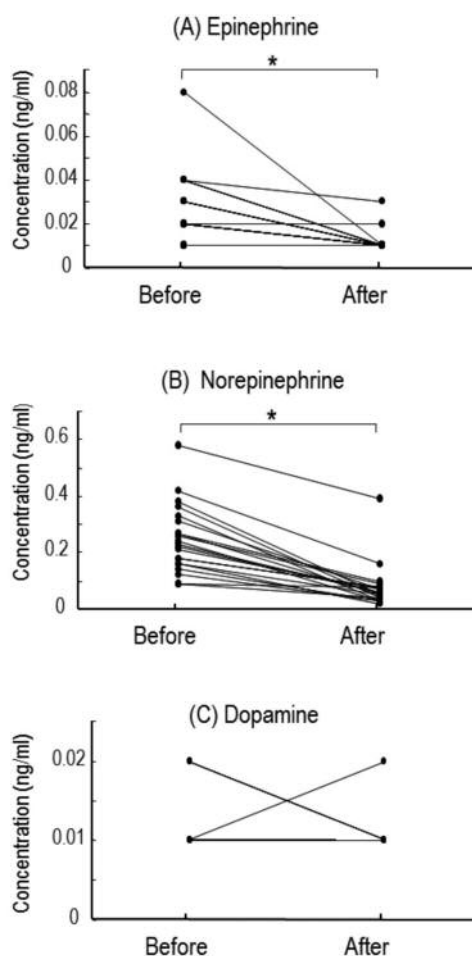


図3 血中カテコラミンの変動

(A) 血漿Epinephrine, (B) 血漿Norepinephrine, (C) 血漿DopamineのG-CSF投与前 (Before) と投与後4日目幹細胞採取前 (After) の測定値を示した。\* P値<0.05



### High mobility group box 1 (HMGB1)

HMGB1は非ヒストン核内蛋白として様々な細胞に発現している。この蛋白は核内の転写調節機構に影響を与えるだけでなく、マクロファージ/単球から細胞外に能動的に分泌されたり、死細胞や障害された細胞からも放出される。この蛋白は細胞外では炎症誘導物質としてreceptor for advanced glycation end products (RAGE) や toll-like receptor 4 (TLR4) を介して周囲の免疫細胞や血管内皮細胞の炎症性サイトカイン、ケモカイン、接着因子の分泌を促進させることが報告されている<sup>12)</sup>。さらに血管前駆細胞の走化性や増殖を促進することや心筋組織の再生に関与していることが報告されている<sup>13)</sup>。そこで我々はG-CSF投与による末梢血幹細胞動員時の血中HMGB1の変動について検討した。G-CSF投与後には有意な血中HMGB1増加を示し、造血幹細胞動員にもHMGB1が関与していることが示唆された<sup>14)</sup> (図4)。HMGB1は免疫、炎症、再生、腫瘍等の領域においても興味深い多面的作用を有しており、幹細胞動員機構以外の作用についても研究を進めているところである<sup>15)</sup>。

#### 末梢血幹細胞採取の効率化

末梢血幹細胞は末梢血中CD34+細胞数によって採取のタイミングをはかることが可能である。しかしながらこのフローサイトメトリーを用いる方法では時間とコストがかかり頻回にモニタリングはでき

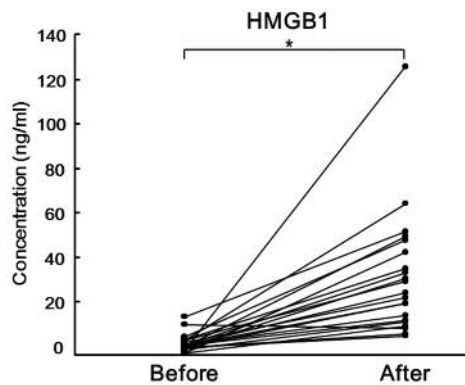


図4 血中HMGB1の変動

血清HMGB1のG-CSF投与前 (Before) と投与後4日目幹細胞採取前 (After) の測定値を示した。\* P値<0.05

ないことが問題である。代わりに簡便かつ低コストの検査によって末梢血幹細胞採取のタイミングをはかることができればドナーの負担軽減につながることを予想される。我々は、臨床検査部との共同研究として自動血球分析装置XE-2100 (シスメックス社) を用いた幼弱な骨髄球系細胞分画Hematopoietic progenitor cell (HPC) と幼弱な血小板分画Immature platelet fraction (IPF) を測定し、これらがCD34+細胞の代替マーカーになり得るかどうかが検討した。これらの細胞分画は通常末梢血細胞数カウントの際に同時に自動測定することが可能である。第3内科に入院した自家末梢血幹細胞移植予定の血液悪性疾患患者20名を対象とした臨床研究を行い、HPCはCD34+細胞の有力な代替マーカーとなり得るが、一方IPFはそうではないことを報告した<sup>16)</sup>。今後、HPCを末梢血幹細胞採取時にモニタリングし採取時期の最適化をはかる検討を行っていく予定である。また同種末梢血幹細胞ドナー (健常人) に対してもこのモニタリングを行い、過不足のないG-CSF投与量を設定できるような研究を開始する予定である。

#### まとめ

造血幹細胞は幹細胞の中で最も古くから研究され、移植源として多くの難治性血液疾患患者の治療に役立っている。また幹細胞とその周囲にある骨髄微小環境に関する研究は現在も世界中で精力的に行われている領域である。骨髄から末梢血中に幹細胞が動員され、逆に幹細胞が骨髄微小環境に生着する機序を解明することは生物学的にも興味深いテーマであるが、臨床医学的にも極めて重要な課題の一つである。末梢血幹細胞動員をいかに効率にかつ安全に行うかは、患者やドナーの安全や経済的負担を考慮すれば明らかである。また移植後のドナー細胞の生着不全回避や早期生着を促すことは、患者の生命に関わる重要な問題である。末梢血幹細胞動員は造血幹細胞が骨髄微小環境から離れて末梢血液中に流出する現象であるとすれば、幹細胞といゆるニッチとの関係をいかに動員方向にシフトさせるかが肝要である。G-CSFは動員薬剤として広く臨床応用されているが、その投与量を減らし効率に幹細胞を動員させるためには、新たな添加薬剤が必要にな

と思われる。我々の臨床研究はG-CSF投与下での血中変化のみを検討したものであるが、マウス個体レベルの研究がヒトにおいても同様な結果を示すか不明であり、その検証の一つとして、さらには今後の併用薬剤開発のきっかけとして意義あるものと考えている。骨代謝、脂質代謝、交感神経系に作用する薬剤は現時点においても多数上市されている。これらの薬剤を動員時の併用薬剤として使用することにより新規導入薬剤に比べ安全性も高く、より効率的な動員が行える可能性があると思われる。さらに効率的な幹細胞採取の開発は採取方法にも改善する余地が残されており、現在我々はこの前臨床研究を進めているところである。

### 謝 辞

これらの研究は第3内科病棟・研究室・臨床検査部スタッフと大学院生の協力のもとに行われた研究であり、この稿を終えるにあたり改めて感謝の意を表したい。

### 引用文献

- 1) Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis : an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008 ; 132 : 631-644.
- 2) Greenbaum AM, Link DC. Mechanisms of G-CSF-mediated hematopoietic stem and progenitor mobilization. *Leukemia* 2011 ; 25 : 211-217.
- 3) Kollet O, Dar A, Shvitiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, Tesio M, Samstein RM, Goichberg P, Spiegel A, Elson A, Lapidot T. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* 2006 ; 12 : 657-664.
- 4) Tanaka M, Yujiri T, Tanaka Y, Mitani N, Tanimura A, Tanizawa Y. Alteration of Dickkopf-1 and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand during PBSC mobilization in healthy donors by G-CSF. *Bone Marrow Transplant* (in press).
- 5) Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007 ; 18 : 313-325.
- 6) Tanaka Y, Yujiri T, Tanaka M, Mitani N, Tanimura A, Tanizawa Y. Alteration of adipokines during peripheral blood stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor. *J Clin Apher* 2009 ; 24 : 205-208.
- 7) Skokowa J, Lan D, Thakur BK, Wang F, Gupta K, Cario G, Brechlin AM, Schambach A, Hinrichsen L, Meyer G, Gaestel M, Stanulla M, Tong Q, Welte K. NAMPT is essential for the G-CSF-induced myeloid differentiation via a NAD (+) -sirtuin-1-dependent pathway. *Nat Med* 2009 ; 15 : 151-158.
- 8) Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, Frenette PS. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 2006 ; 124 : 407-421.
- 9) Spiegel A, Shvitiel S, Kalinkovich A, Ludin A, Netzer N, Goichberg P, Azaria Y, Resnick I, Hardan I, Ben-Hur H, Nagler A, Rubinstein M, Lapidot T. Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 1123-1131.
- 10) Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 2008 ; 452 : 442-447.
- 11) Yujiri T, Tagami K, Tanimura A, Tanizawa Y. Alteration of adrenergic signals during peripheral blood stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Leuk Res* 2008 ; 32 : 195-197.
- 12) Huang W, Tang Y, Li L. HMGB1, a potent proinflammatory cytokine in sepsis. *Cytokine* 2010 ; 51 : 119-126.
- 13) Germani A, Limana F, Capogrossi MC. Pivotal advances : high-mobility group box 1 protein-

- a cytokine with a role in cardiac repair. *J Leukoc Biol* 2007 ; 81 : 41-45.
- 14) Tagami K, Yujiri T, Tanimura A, Mitani N, Nakamura Y, Ariyoshi K, Ando T, Fujii Y, Tanizawa Y. Elevation of serum high-mobility group box 1 protein during granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilisation. *Br J Haematol* 2006 ; 135 : 567-569.
- 15) Yujiri T, Tagami K, Tanaka Y, Mitani N, Nakamura Y, Ariyoshi K, Ando T, Tanizawa Y. Increased serum levels of high-mobility group box 1 protein in patients who developed acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol* 2010 ; 85 : 366-367.
- 16) Mitani N, Yujiri T, Tanaka Y, Tanaka M, Fujii Y, Hinoda Y, Tanizawa Y. Hematopoietic progenitor cell count, but not immature platelet fraction value, predicts successful harvest of autologous peripheral blood stem cells. *J Clin Apher* 2011 ; 26 : 105-110.

## Study on the Peripheral Blood Stem Cell Mobilization

Toshiaki YUJIRI

Department of Endocrinology, Metabolism, Hematological Sciences and Therapeutics (Internal Medicine III), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

### SUMMARY

The bone marrow microenvironment plays a critical role in regulating the proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) - mobilized peripheral blood stem cells (PBSCs) are widely used to reconstitute hematopoiesis ; however, preclinical and clinical studies show that improvements to this mobilization can be achieved. To investigate the mechanisms involved in the stem cell mobilization, we examined several marker levels of bone metabolism, adipose tissue, and sympathetic nervous system in the blood samples from G-CSF-treated healthy human donors. Furthermore, in order to develop a simple, rapid, and reliable method of assessing the harvest quality of PBSCs, we conducted a prospective study comparing the use of CD34+ cell count with some surrogate decision markers for patients requiring autologous PBSC mobilization. Further studies will be required to fully develop a safe and efficient mobilization and harvesting of PBSCs.