

# 末梢造血幹細胞動員時の 時計遺伝子の発現変動

氏名 杉山 暁子

所属 山口大学大学院医学系研究科  
応用医工学専攻 病態制御内科学分野

平成28年 1月

## 目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	1
3. 目的	2
4. 方法	2
(1) ドナー及び幹細胞動員	2
(2) 細胞及び培養条件	3
(3) 遺伝子発現の解析と血漿カテコラミンの測定	3
(4) データ解析	4
5. 結果	4
6. 考察	7
7. 結語	9
8. 謝辞	9
9. 参考文献	10

## 1. 要旨

末梢循環血流中の造血幹細胞の動態は厳格な日内変動を有しており、それは薬剤によって強制的に動員された際においても維持されている。しかし、造血因子である *granulocyte colony-stimulating factor*(G-CSF)による末梢造血幹細胞(*peripheral blood stem cells* : PBSCs)動員時の白血球時計遺伝子の動態については未だ十分に解明されていない。その為、我々は健康な末梢血造血幹細胞移植ドナー21人のPBSC動員時の白血球時計遺伝子の変化を検討した。その結果、*CRY1* mRNAの発現量はG-CSF投与後に約3.9倍と著増( $p < 0.01$ )していた一方、*PER3*、*CRY2*及び*BMAL1* mRNAの発現量は著減していた(夫々0.2倍, 0.2倍, 0.6倍,  $p < 0.001$ )。更に、*CRY1* mRNAの発現量は血漿ノルアドレナリン値と逆相関( $r = -0.36$ ,  $p < 0.05$ )しており、*PER3*、*CRY2*および*BMAL1*の発現量はノルアドレナリン値と相関していた( $r = 0.55$ ,  $r = 0.66$ ,  $r = 0.57$ ,  $p < 0.001$ )。これらの結果より、時計遺伝子の発現量と交感神経伝達物質であるノルアドレナリン濃度に密接な関連があることが明らかになった。今後、交感神経系および概日リズムの調節がPBSCドナーにおける幹細胞採取量増加の新たな治療標的となりうる可能性が示唆された。

## 2. 研究の背景

哺乳類において、体内時計は睡眠-覚醒サイクルやホルモン分泌、体温などの種々の行動や生理学な過程を調整しており、概日リズムの障害は鬱や糖尿病、癌などといった病態とも関係している<sup>1)</sup>。哺乳類の体内時計の中核は視床下部の視交叉上核に位置し、明暗などの周囲環境の情報を統合し末梢組織の概日リズムを調整している。視交叉上核において、*PER1*、*PER2*、*PER3*、*CRY1*、*CRY2*、*ARNTL/BMAL1*、*CLOCK*などの時計遺伝子は、転写や翻訳を介したフィードバックループを形成している。特に、*CLOCK*と*BMAL1*は体内時計の転写因子の核であり、E-box配列に結合することで*PER1*、*PER2*、*PER3*、*CRY1*、*CRY2*の転写を促進する。*PER*及び*CRY*複合体は核に移動し、*CLOCK*-*BMAL1*ヘテロダイマーと相互作用することによって*PER*及び*CRY*遺伝子の転写をネガティブ・フィードバックする。その結果、これらの遺伝子の発現は約24時間のサイクルで振動することとなる<sup>2)</sup>。視交叉上核は、ノルアドレナリン性の交感神経系などの神経性、又はホルモンなどを介して体液性に中枢の概日リズムを様々な末梢組織に伝達する<sup>3)</sup>。更に、これらの時計遺伝子は造血幹細胞であるCD34陽性の骨髄細胞や末梢の白血球などの末梢組織の細胞においても同様に振動している<sup>4)5)</sup>。

PBSCsは造血幹細胞移植の移植ソースとして確立している。ドナーのPBSCsを末梢血に動員するために用いられるのが、顆粒球コロニー刺激因子(*granulocyte colony-stimulating factor* : G-CSF)である。G-CSF投与のない平常状態において、造血幹細胞および前駆細胞(*Hematopoietic stem and progenitor cells* : HSPCs)はC-X-C motif chemokine 12(CXCL12)とC-X-C chemokine receptor 4(CXCR4)による結合や、膜結合型Kitリガン

ドと c-Kit 受容体の結合, vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1)と very late antigen-4(VLA-4)などの様々な接着因子によって骨髄に留まっている<sup>6)</sup>. G-CSF は, 骨髄微小環境のプロテアーゼの活性化や, *CXCL12* mRNA などの翻訳を down-regulation することによって HSPCs を末梢血中に動員していると考えられている<sup>7)8)</sup>. 更に, G-CSF 投与時に交感神経のシグナルが HSPCs の動員の際に鍵となる役割を担っていることが最近の研究で明らかになっている<sup>8)9)</sup>.

一方, マウスにおいて, 循環血流中の HSPCs 量に明らかな日内変動があることが認められている<sup>8)</sup>. ヒトにおいても, マウスとは逆相ではあるが循環血流中の HSPCs の量に同様の日内変動が認められており, またその変動は G-CSF 等に強制的に動員されているときにも認められ, その概日リズムは HSPCs の採取量にも影響する<sup>10)</sup>. しかし, G-CSF 投与時の白血球時計遺伝子の変動はこれまで十分に解明されていない. そこで, 時計遺伝子と G-CSF による PBSCs 動員との関係性を明らかにするために, 我々は同種末梢血幹細胞移植の健常人ドナーから末梢血を採取し, その白血球から G-CSF 投与前後における 7 つの時計遺伝子(*PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2*, *BMAL1*, *CLOCK*)の発現の変化を検討した.

### 3. 目的

当院で行われた健常人ドナーの PBSCs 採取時の血液検体を用い, G-CSF 投与による末梢血幹細胞動員時のヒト白血球時計遺伝子の変動の有無を解析することによって, 効率的な幹細胞採取につながる研究を企画した.

### 4. 方法

#### 4-(1). ドナー及び幹細胞動員

本研究は当施設の倫理委員会の承認を得, 既報における倫理規範に準じて行った<sup>11)</sup>. 血液疾患を有する血縁者への PBSCs 提供目的に山口大学医学部附属病院に入院した健常人ドナーである日本人 21 名からは, 当該研究について書面による説明を行い同意を得た. なお, 採取された同種末梢血幹細胞は血縁患者に移植された. 試験に参加したドナーの詳細を Table 1 に示す. PBSCs 動員はヒト組換え G-CSF (レノグラスチム : 10

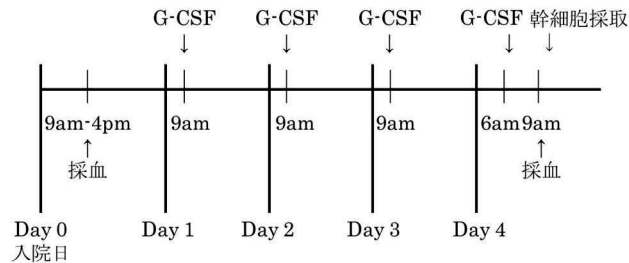
Table 1. 健常人ドナー21例の背景及びPBSCs採取量

Number of donors, <i>n</i>	21	
Age(years), median (range)	36	(20-56)
Male sex, <i>n</i> (%)	11	(52)
Preapheresis blood counts (day4)		
Total leukocyte (μl), median (range)	37100	(24530-54620)
Neutrophil count (μl), median, (range)	31132	(19133-43639)
Monocyte count (μl), median (range)	2040	(539-5631)
PBCD34 count (μl), median (range)	35.7	(8.9-63.4)
CIC count (μl), median (range)	556.5	(0-7776.3)
Platelet count (×10 <sup>4</sup> μl), median (range)	18.9	(15.7-28.5)
Number of cells harvested (day4)		
MNCs(×10 <sup>6</sup> ), median (range)	291.91	(52.56-743.08)
CD34 cells (×10 <sup>7</sup> ), median (range)	16.65	(1.70-40.50)

CIC = circulating immature cell, MNCs = mononuclear cells

$\mu\text{g}/\text{kg}$ , 若しくはフィルグラスチム :  $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$ )を1日1回, 4–6日間皮下投与し, 初回の採取は投与4日目(day 4)に行った(Figure 1). 血液採取は G-CSF 投与前(day 0)の午前9時–午後4時に, day 4はPBSCs採取直前の午前9時に行った(Figure 1).

Figure 1. 試験プロトコール



#### 4-(2). 細胞及び培養条件

ヒト急性前骨髄球性白血病細胞株である HL-60 と, ヒト急性単球性白血病細胞株である THP-1 を本研究に用いた. 細胞培養は加熱処理を行った胎仔血清(FBS; Life Technologies, Carlsbad, CA)を10%含む RPMI-1640 培養液(Life Technologies)を用い, 5%二酸化炭素を含む  $37^{\circ}\text{C}$ に設定したインキュベーターで培養した. 細胞数の計算は血球計算板を使用し, 実験には対数増殖期にあたる細胞のみを用いた. In vitro 実験においては, 細胞は  $1 \times 10^6$  cells/ml の濃度で培養液に懸濁した. 細胞は 0.1%FBS による 2 時間の血清飢餓処理を行った後, 100 ng/ml G-CSF で刺激した. 末梢血多形核白血球(polymorphonuclear cells : PMNs) は同意が得られた健常成人から採取した. PMNs は Polymorphoprep(Axis-Shield PoC AS, Dundee, Scotland)を用い, 密度勾配遠心分離で単離し, 0.1%FBS を加えた RPMI-1640 培養液に懸濁した後に 100 ng/ml G-CSF で刺激した. 組換えヒト G-CSF は中外製薬(Tokyo, Japan)より提供を受けた.

#### 4-(3). 遺伝子発現の解析と血漿カテコラミンの測定

末梢血白血球 total RNA の抽出は PAXgene Blood Kit(Qiagen, Venlo, The Netherlands)を用いた. 培養細胞と PMNs total RNA の抽出は RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen)を用いた. 全ての RNA 検体は DNase 処理を行った. 一本鎖 cDNA は High-Capacity RNA-to-cDNA Kit(Life Technology)を用い 200 ng RNA から合成した. 遺伝子発現量の測定は Power SYBR Green PCR Master Mix と Step One Plus Real-Time PCR System(Life Technology)を用い, 定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)にて製品プロトコールに従って行った. 夫々の時計遺伝子の mRNA は Table 2 に示すプライマーを用いて PCR 法を行い, 得られた値を Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)で標準化した. qRT-PCR 法で得られた結果は平均値±標準偏差(SD)で示した. 血漿中カテコラミン

濃度測定は、RNA 抽出時と同じの血液検体から高速液体クロマトグラフィーを用いて行った<sup>12)</sup>。

Table 2. 白血球時計遺伝子の Primer

Gene name	Reference seq.	Primer sets	
		Forward Primer	Reverse Primer
<i>hPER1</i>	NM002616	5'-CGCCTAACCCCGTATGTGA-3'	5'-CGCGTAGTGAAAATCCTCTTGTC-3'
<i>hPER2</i>	NM022817	5'-TCGTTTGAAGTGCAGTGACA-3'	5'-AAATTCCGCGTATCCATTCATG-3'
<i>hPER3</i>	NM016831	5'-GACACGCACAGAACCGAATG-3'	5'-CAGTGTTTGGTGGAAGGAAGTAAA-3'
<i>hCRY1</i>	NM004075	5'-ACCTCGAATGAATGCGAATTCT-3'	5'-CAACCAAATCGGAGATAAGGACTAA-3'
<i>hCRY2</i>	NM021117	5'-CAGCCAGCCGACGTGTTC-3'	5'-CAAAGGGTTCAGAGTCATATTCAAAG-3'
<i>hBMAL1</i>	NM001178	5'-CGCTAGAGGGCTTCTGTGT-3'	5'-GGCGGTCAGCTTCTTCCAA-3'
<i>hCLOCK</i>	NM004898	5'-TTGGCAAATGTCATGAGCAC-3'	5'-TTGCCCTTAGTCAGGAACCT-3'

#### 4-(4). データ解析

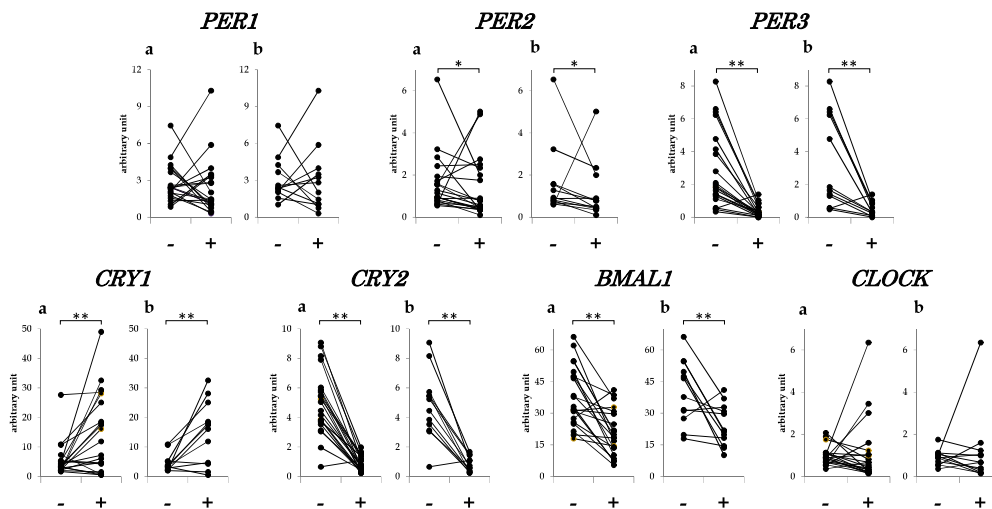
G-CSF 投与前後の時計遺伝子はウィルコクソンの符号順位検定を用いて変動の有意性の有無を統計学的に検討した。また、様々なパラメーターと時計遺伝子との関連性については、スピアマンの順位相関係数を用いて統計学的検定を行った。

## 5. 結果

HSPCs は時間によって末梢血へ動員される量が異なり、その採取量は概日リズムによって変動すると考えられる。その為、HSPCs の動員促進因子である G-CSF が細胞内の概日時計を調整する時計遺伝子の発現に与える影響を検討した。そこで、当研究では、21 人の健常人ドナーにおいて 7 つの時計遺伝子の G-CSF 投与前 (day 0) と投与後 4 日目 (day 4) における発現量の変化を検討した。その結果、G-CSF 投与後の白血球の *CRY1* mRNA の発現が約 3.9 倍に有意に増加 ( $p < 0.01$ ) していることがわかった (Figure 2)。一方、*CRY1* とは対照的に *PER3*, *CRY2*, *BMAL1* mRNA の発現レベルは、夫々 0.2 倍, 0.2 倍, 0.6 倍に有意に低下 ( $p < 0.001$ ) していた (Figure 2)。しかし、*PER1* と *CLOCK* においては明らかな変化は認めなかった。なお、フィルグラスチムとレノグラスチムの 2 種類の G-CSF 製剤を用いたが、製剤の違いによって時計遺伝子の変動の傾向に相違は認めなかった (データは示さず)。

Kusanagi らは、ヒト末梢血単核球においていくつかの時計遺伝子 mRNA の発現量が日内変動を有していることを報告している<sup>5)</sup>。時計遺伝子発現量の変化が G-CSF 投与によるものかを調べるために、我々は 21 例のドナーの中から day 0 と day 4 の採血が共に朝に行われた 12 例を抽出し再度分析を行った(Figure 2)。その結果、*CRY1* mRNA 発現は約 4 倍に有意に増加していた( $p < 0.01$ )。また、*PER3*, *CRY2*, *BMAL1* mRNA の発現レベルは夫々 0.3 倍、0.2 倍、0.6 倍に有意に低下( $p < 0.01$ )していた。なお、*PER1* と *CLOCK* においては有意な変化は認めず、これらの時計遺伝子の発現の変化の傾向は全ドナー 21 例においても採血時間をそろえた 12 例においても同様であった。

Figure 2.末梢血幹細胞移植ドナーにおける末梢白血球の時計遺伝子の発現変動



G-CSF 投与前の day 0 に採取した白血球時計遺伝子の発現を G-CSF 投与(-),day 4 を G-CSF 投与(+ )と表記。(a) : 全 21 例、(b) : day 0 と day 4 の採血時間を揃えた 12 例.\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 。

次に、G-CSF が直接ヒト白血球の時計遺伝子の発現を変化させているかを調べるために *in vitro* で検討を行った。まず、HL-60 及び THP-1 株を用いこれらの細胞を 100 ng/ml の G-CSF で刺激する前(0 分)、及び刺激後 15 分、30 分、60 分、120 分で夫々の時計遺伝子の発現量を調べた。G-CSF 投与後、extracellular signal regulated kinase(ERK)のリン酸化は確認したが(データは示さず)、HL-60 と THP-1 において G-CSF 投与前後で時計遺伝子の発現の有意な変動は認められなかった(Figure 3)。

次に、健康な成人から得たヒト末梢血多形核白血球(polymorphonuclear cells : PMNs)における G-CSF 刺激前後の時計遺伝子の発現を調べた。細胞株実験と同様に、ヒト PMNs でも G-CSF 刺激前(0 分)と比べ、刺激後 15 分、30 分の時計遺伝子発現に有意な変化は認められなかった(Figure 4)。これらの *in vitro* 実験より、G-CSF による時計遺伝子の変動が直接的な反応ではなく間接的な反応であることが示唆された。

Figure 3. HL-60 および THP-1 細胞株における G-CSF 刺激後の時計遺伝子の発現変動

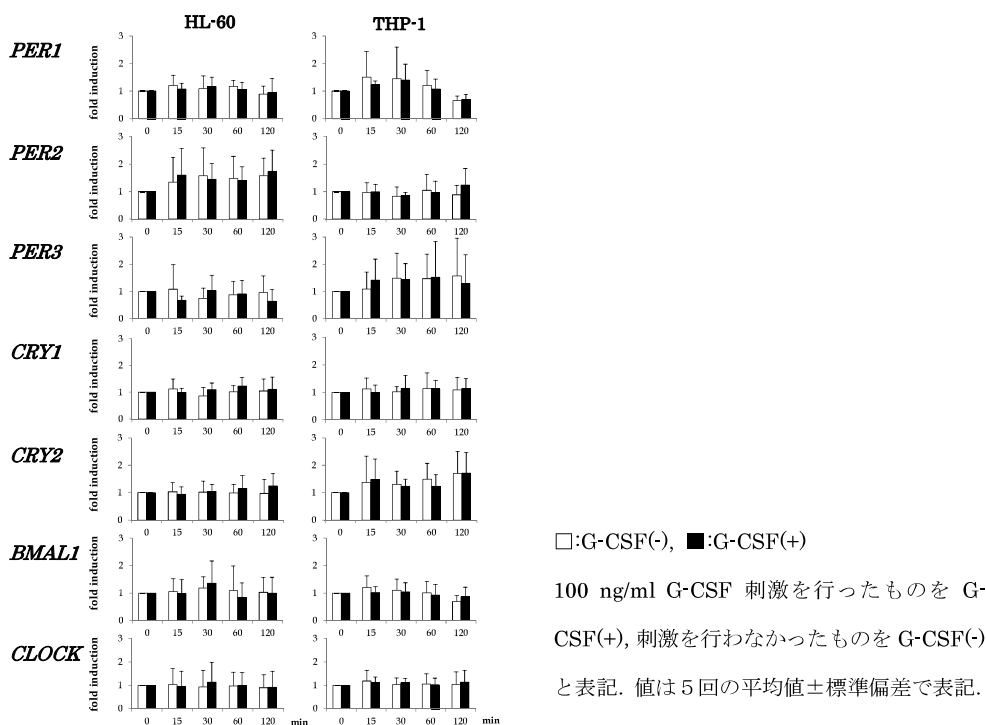
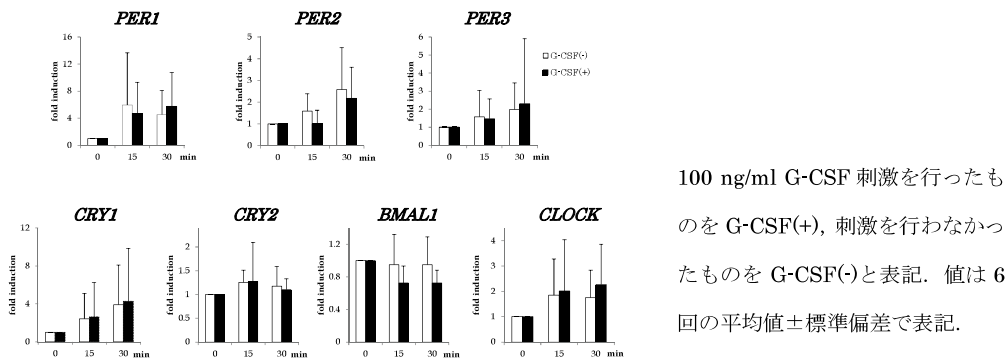


Figure 4. ヒト PMNs における G-CSF 刺激後の時計遺伝子の発現変動



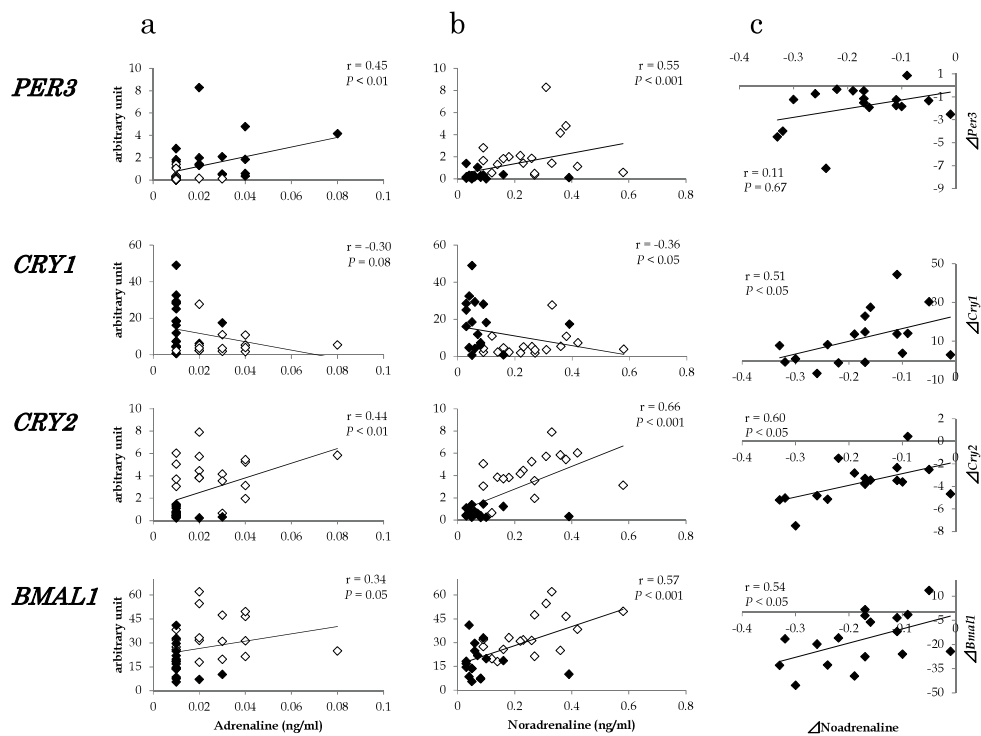
交感神経系 (sympathetic nervous system : SNS) は G-CSF による PBSCs 動員に重要な役割を担っている<sup>3)</sup>。我々は以前、G-CSF による PBSCs 動員後のドナーの血漿中ノルアドレナリンとアドレナリン値が有意に低下していることを発表している<sup>12)</sup>。その為、血漿カテコラミン値と時計遺伝子発現の関係性を、両者のデータが揃っている 17 例において検討した (Figure 5)。その結果、*PER3*mRNA 発現レベルと血漿アドレナリン及びノルアドレナリン値の間に有意な相関関係を認めた (夫々  $r = 0.45$ ,  $p < 0.01$ ,  $r = 0.55$ ,  $p < 0.001$ )。また、*CRY1*mRNA 発現レベルは血漿中ノルアドレナリン値と有意な逆相関 ( $r = -0.36$ ,  $p < 0.05$ ) を示したが、アドレナリン値とは同様の傾向はあるものの有意差は認めなかった ( $r$



= -0.30,  $p = 0.08$ ). 更に, *CRY2* mRNA の発現レベルは血漿アドレナリン値( $r = 0.44$ ,  $p < 0.01$ )及びノルアドレナリン値( $r = 0.66$ ,  $p < 0.001$ )と有意に相関していた. *BMAL1* mRNA 発現はノルアドレナリン値と強い相関関係を示したが( $r = 0.57$ ,  $p < 0.001$ ), アドレナリン値とは僅かな相関関係に留まった( $r = 0.34$ ,  $p = 0.05$ ). また, 概して, これらの4つの時計遺伝子はアドレナリンよりノルアドレナリンの値とより強い相関を示した. 一方, *PER1*, *PER2*, *CLOCK*の3つの時計遺伝子の発現レベルは血漿カテコラミン値と有意な相関を認めなかった(データは示さず).

次に, G-CSF による血漿カテコラミン値と時計遺伝子の変化量およびその関係性を検討した. *CRY1*, *CRY2*, *BMAL1* の発現の変化量は, ノルアドレナリンの変化量と有意な相関関係を示した(夫々  $r = 0.51$ ,  $r = 0.60$ ,  $r = 0.54$ , 全て  $p < 0.05$ ). しかし, *PER3* の変化量はノルアドレナリンの変化量と相関しなかった (Figure 5). なお, 血漿アドレナリン値の変化量と時計遺伝子の発現の変化量には有意な相関関係を認めなかった (データは示さず).

Figure 5. 血漿カテコラミン値と *PER3*, *CRY1*, *CRY2*, *BMAL1* mRNA 発現との関係



(a): 時計遺伝子とアドレナリン値との関係. (b): ノルアドレナリン値との関係. なお, day 0 のデータは□, day 4 のデータは■で表示. (c): G-CSF 投与前後における時計遺伝子の変化量( $\Delta$ で表示)とノルアドレナリンの変化量( $\Delta$ Noradrenaline)との関係.

## 6. 考察

今回の検討で, 細胞内概日リズムを調整する遺伝子群の発現レベルが, PBSCs 動員目的

に G-CSF を投与された健常人ドナーにおいて有意に変化していることが初めて明らかになった。G-CSF を投与された末梢血白血球において、*CRY1* mRNA 発現は上昇する一方、*PER2*, *PER3*, *CRY2*, *BMAL1* mRNA 発現は低下していた。なお、*PER1* と *CLOCK* mRNA については有意な変化は認めなかった。興味深いことに、これらの時計遺伝子の変動は、G-CSF 投与前後の採血が共に朝に行われたドナーにおいても、2 点の採血時間が異なるドナーを含む全 21 例と全く同じ傾向であった。今回の検討の限界は、血液検査を G-CSF 投与前(day0)と PBSC 採取直前(day4)の 2 点しか行っていないことであり、これらの時計遺伝子の発現レベルの変化が、元来有している日内変動の位相の変化によるものか、変動の振幅の変化によるものか、もしくは両者なのかが判明しないことである。また、この変化が G-CSF を投与された 4 日間の間に徐々に起きた変化なのか、もしくは day4 の PBSC 採取 3 時間前に投与された G-CSF による短時間の変化なのかも判明しない。その為、多数のポイントでの検体採取による経時的な時計遺伝子の変化の更なる検討が必要である。しかし、今回の検討より、G-CSF 投与によって少なくとも部分的にはヒト白血球の時計遺伝子の発現が変化することが明らかになった。

今回の検討の注目すべき点は、白血球において *PER3*, *CRY1*, *CRY2*, *BMAL1* といった時計遺伝子の発現と血漿ノルアドレナリン値が有意な相関関係を示したことである。更に、G-CSF 投与による *CRY1*, *CRY2*, *BMAL1* の発現の変化量は、神経伝達物質であるノルアドレナリンの変化量と相関していた、骨髄はノルアドレナリン性交感神経系などに強力に神経支配されており<sup>13)</sup>、ノルアドレナリンは、マウスにおいて破骨細胞の抑制や、破骨細胞などが産生しているケモカイン CXCL12 を down regulate することにより間接的に骨髄からの造血幹細胞前駆細胞の動員を調節している<sup>14)</sup>。生体内でノルアドレナリンは骨髄内の HSPCs の増殖を刺激し、その結果として HSPCs を末梢血中に動員させる<sup>15)</sup>。SNS の神経伝達物質であるノルアドレナリンは、神経末端での分泌と再取り込みによってその濃度活性が調整されているが<sup>16)</sup>、G-CSF は、その交感神経のノルアドレナリンの取り込みを調整することによって、神経末端のカテコラミン濃度を上昇させていると報告されている<sup>9)</sup>。

骨髄球系の強力な成長因子である G-CSF は、PBSCs 動員の他に、獲得免疫などの免疫応答についても重要な役割を持っている<sup>17)</sup>。また、概日リズムも免疫機構の一部を調節していると考えられている。例えば、免疫系のメディエーターの動態は概日リズムを有しており、それらは免疫系の活動性と一致している。これらの変動は、組織の修復や有害な循環物質の除去と同様に、感染症の予測や管理においてより良い効率をもたらす可能性がある<sup>18)</sup>。内在性 G-CSF による健常状態の顆粒球生成時や感染下で顆粒球を増やす必要がある状態、若しくは臨床的に G-CSF を投与されている時などに関わらず、SNS は常に末梢組織の体内時計を同調させ、結果として個体の日内変動を作り出している。このように、概日リズムと免疫担当細胞との間には強い関連がある。

Kusanagi らは、通常状態のヒト末梢血単核球の時計遺伝子の動態について、*BMAL1*,

*CRY1*, *CRY2*の発現は日内変動を示さない一方, *PER1*, *PER2*, *PER3*はとくに朝に発現が高い日内変動を示すと報告をしている<sup>5)</sup>. 一方, 我々の検討では, 睡眠-覚醒パターンや食事摂取時間など末梢組織の時計遺伝子に影響を与える生活因子には個人差があると考えられるのにも関わらず, *PER3*, *CRY2*, *BMAL1*の発現はG-CSF投与後全てのドナーにおいてほぼ均一に低下し, *CRY1*の発現は明らかに上昇していた. これらの結果は, PER群とCRY群が同じような位相で増減し, *BMAL1*とは逆位相となるという一般的な時計遺伝子の日内変動のモデルとは異なっている. 現在のところ, この時計遺伝子の発現変動のメカニズムは不明で, 更なる検討を要する. *BMAL1*タンパク質は分子時計の主要な構成物質であり, *BMAL1*はマウスにおいてそのノックアウトによって全ての概日リズムを失ってしまう唯一の時計遺伝子である<sup>3)</sup>. 同様に, Nguyenらは骨髄系細胞に特異的に*BMAL1*を欠損したマウスモデルを使い, リステリア菌の排除における*BMAL1*の機能を明らかにした. 彼らは, 単核球において*BMAL1*はケモカイン*CCL2*を抑制することで抗炎症物質として働いていると述べている<sup>19)</sup>. このことから, この時計遺伝子やそのタンパク質は, 元来は日内変動を担っているものではあるが, その機能を介してヒトやマウスにおいて免疫系やG-CSF誘導性のPBSC動員においても重要な役割があると考えられる.

造血幹細胞採取目的にPBSCsを動員した際, その採取を朝より夜に行う方がより多く採取できるという報告がある<sup>10)</sup>. これは, 末梢血中のPBSCsの動態は薬剤によって強制的に動員されているときも日内変動を維持しているという知見に基づいている. 検討数が少なかったため, 今回の我々の検討では時計遺伝子の発現量もしくはその変化量と, 動員されたCD34陽性細胞数などのPBSCs採取成績との明らかな相関関係を認めることが出来なかった. その為, PBSCs動員における時計遺伝子の役割については更なる検討が必要である. 例えば, *in vitro*における白血球や動員されたPBSCs, 造血微小環境の時計遺伝子へのノルアドレナリンによる直接的な作用などが検討課題である. 更に, 採取時間や入院中の室内の環境因子の調節など加えてノルアドレナリン性アゴニストを使用することによってPBSCsの採取量が増加する可能性がある. それは患者に対してより多くのPBSCsを提供することを可能とし, 結果として患者の予後を改善させる可能性がある.

## 7. 結語

末梢血幹細胞移植ドナーにおいて, G-CSF投与前後の白血球で顕著な時計遺伝子の発現の変動を認め, その変動に血漿ノルアドレナリンが関与している可能性が示された. この変動のメカニズムを更に解明することによって, より効果的なPBSCs採取が期待できる.

## 8. 謝辞

本論文作成にあたり, 検体収集にご協力いただきました先生方に心から感謝いたします. また, 日頃より暖かい御指導を賜りました湯尻俊昭先生, 谷澤幸生先生に心から感謝致します. また, 有益な御意見を頂いた研究室の皆様へ感謝致します.

## 9. 参考文献

- 1) Bass J. (2012). Circadian topology of metabolism. *Nature*. 491: 348–56.
- 2) Reppert SM, Weaver DR. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 418:935–41.
- 3) Bunker MK, Wilsbacher LD, Moran SM, et al. (2000). Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*. 103:1009–17.
- 4) Tsinkalovsky O, Smaaland R, Rosenlund B, et al. (2007). Circadian variations in clock gene expression of human bone marrow CD34+ cells. *J Biol Rhythms*. 22:140–50.
- 5) Kusanagi H, Hida A, Satoh K, et al. (2008). Expression profiles of 10 circadian clock genes in human peripheral blood mononuclear cells. *Neurosci Res*. 61:136–42.
- 6) Winkler IG, Levesque JP. (2006). Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: When innate immunity assails the cells that make blood and bone. *Exp Hematol*. 34:996–1009.
- 7) Levesque JP, Hendy J, Winkler IG, et al. (2003). Granulocyte colony-stimulating factor induces the release in the bone marrow of proteases that cleave c-KIT receptor (CD117) from the surface of hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 31: 109–17.
- 8) Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*. 452:442–7.
- 9) Lucas D, Bruns I, Battista M, et al. (2012). Norepinephrine uptake inhibition promotes mobilization in mice: Potential impact to rescue low stem cell yields. *Blood*. 119:3962–5.
- 10) Lucas D, Battista M, Shi PA, et al. (2008). Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell Stem Cell*. 3:364–6.
- 11) Portaluppi F, Smolensky MH, Touitou Y. (2010). Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. *Chronobiol Int*. 27:1911–29.
- 12) Yujiri T, Tagami K, Tanimura A, Tanizawa Y. (2008). Alteration of adrenergic signals during peripheral blood stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Leuk Res*. 32:195–7.
- 13) Tang Y, Shankar R, Gamelli R, Jones S. (1999). Dynamic norepinephrine alterations in bone marrow: Evidence of functional innervation. *J Neuroimmunol*. 96:182–9.
- 14) Katayama Y, Battista M, Kao WM, et al. (2006). Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*. 124:407–21.
- 15) Spiegel A, Shivtiel S, Kalinkovich A, et al. (2007). Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells

through Wnt signaling. *Nat Immunol.* 8:1123–31.

16) Ramamoorthy S, Shippenberg TS, Jayanthi LD. (2011). Regulation of monoamine transporters: Role of transporter phosphorylation. *Pharmacol Ther.* 129:220–38.

17) Panopoulos AD, Watowich SS. (2008). Granulocyte colony-stimulating factor: Molecular mechanisms of action during steady state and “emergency” hematopoiesis. *Cytokine.* 42:277–88.

18) Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, O’Neill LA. (2014). Circadian clock proteins and immunity. *Immunity.* 40: 178–86.

19) Nguyen KD, Fentress SJ, Qiu Y, et al. (2013). Circadian gene *Bmal1* regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science.* 341:1483–8.