

論文の内容の要旨

論文題目 PEG-rHuMGDF 投与により生じる骨髄線維化および骨形成に関する
病理学的研究

氏 名 井出 陽一

PEG-rHuMGDF (Pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor) は、遺伝子組換え技術によって生産されたヒト型のトロンボポエチン (rhTPO) をポリエチレングリコール (PEG) で修飾したものであり、キリン・アムジェン社により開発された。PEG-rHuMGDF は正常動物 (マウス、ラットおよびサル) およびトランスジェニック動物を含む血小板減少モデル動物を用いた非臨床試験で、血小板数の増加あるいは血小板減少の抑制、回復促進に著明な効果を示した。また、ヒトへの投与により、重篤な副作用を伴わずに血小板増加作用を有することも確かめられている。これらの結果から、PEG-rHuMGDF は癌化学療法などに伴う血小板減少症の治療薬としての有用性が期待されている。しかし、マウスおよびラットに薬効用量を超える過剰量の PEG-rHuMGDF を投与すると、骨髄で線維化あるいは骨形成が生じることが明らかとなった。

線維増生または骨形成を誘導する因子として、種々の増殖因子の存在が知られている。中でも巨核球中に含まれる Platelet derived growth factor (PDGF) や Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) は骨髄線維化に深く関与するとの報告がある。特に、TGF- β 1 は強力な骨誘導因子であることから、PEG-rHuMGDF 投与で生じる骨髄線維化および骨形成においても、重要な役割を果たしていると考え

られる。

骨髄内での骨形成は、骨髄中の未分化間葉系細胞が骨芽細胞を経て骨細胞に分化することで生じる。In vitro の実験から、骨芽細胞は分化過程において分化形質を時間依存性に発現させることが示されている。すなわち、比較的早い時期にフィブロネクチンやI型コラーゲンが、その後にアルカリフォスファターゼ (ALP) や Matrix gla protein (MGP) が、さらにより後期にオステオポンチン (OPN) やオステオカルシン (または Bone gla protein : BGP) が、それぞれ発現する。従って、これらの分化形質の発現を確認することで、骨形成プロセスを明らかにすることができる。

本研究の目的は、上記の背景のもと、ラットおよびマウスに過剰量の PEG-rHuMGDF を投与した際に生じる骨髄線維化および骨形成に関して、そのメカニズムを解明すると共に、PEG-rHuMGDF の血小板減少症治療薬としての有用性および安全性を明らかにすることにある。論文は以下の3章から成る。

第1章 ラットを用いた PEG-rHuMGDF 誘発骨形成のメカニズムの検討

はじめに、過剰量の PEG-rHuMGDF 投与による血液学および血液生化学的パラメーターの変動を調べた。すなわち、Crj: CD (SD) 系雄性ラットに、PEG-rHuMGDF (100 μ g/kg) あるいは溶媒を5日間反復皮下投与し、経時的 (初回投与日 : Day1) (Day6、8、10、12 および 15) に各パラメーターの変動を調べた。その結果、PEG-rHuMGDF 投与により、血小板の増加ならびに赤血球、ヘモグロビン数およびヘマトクリット値の減少が認められた。これらの変化は Day8~10 で最大に達し、その後回復した。このうち、赤血球系パラメーターの変化は、血小板増加に伴う循環血液量の増加に起因する変化と考えられた。また、血液生化学的には、 γ -GTP 値の増加が Day6 あるいは Day8 をピークに認められ、Day15 には溶媒投与群と同程度まで減少した。 γ -GTP 値は、血小板数に伴って変動することから、血小板増加に起因する変化と考えられた。

これらの結果から、過剰量の PEG-rHuMGDF を投与したラットでは、血液学および血液生化学的に、薬理作用に基づく変化以外に重篤な毒性は発現しないことが明らかとなった。

次に、上記の検討と同一のスケジュールでラットに PEG-rHuMGDF を投与し、血小板数、大腿骨骨髄の光学顕微鏡学的および電子顕微鏡学的変化、骨髄における巨核球数の変動、骨髄中および血漿中 TGF- β 1 量の変動、骨髄における TGF- β 1 の局在を免疫組織化学的手法を用いて検討することで、線維化および骨形成のメカニズムの解明を試みた。

その結果、PEG-rHuMGDF 投与により、骨髄では巨核球の増加に引き続き、細網線維の増生および骨形成が同一部位から認められた。このことから、骨髄内での巨核

球増加が線維増生を誘発したと考えられた。また、巨核球数の変動に伴って、骨髓上清では TGF- β 1 量の増加が認められた。さらに、増加した骨髓巨核球上に TGF- β 1 の局在が確認されたことから、骨髓内で増加した TGF- β 1 は巨核球由来と推測された。加えて PEG-rHuMGDF 投与ラットでは、電子顕微鏡学的に断片化した巨核球細胞質あるいは大型血小板、巨核球細胞成分の流出が骨髓間質内で認められた。

これらの結果から、PEG-rHuMGDF 投与により生じる骨髓線維化および骨形成は、巨核球由来の TGF- β 1 が骨髓内で過剰に増加したことによる変化と考えられた。また、TGF- β 1 量の増加は、何らかの原因により、巨核球の細胞質成分が間質へ流出したためと考えられた。

第2章 カルボプラチン誘発血小板減少症モデルラットにおける

PEG-rHuMGDF 投与の影響

Crj: CD (SD) 系雄性ラットにカルボプラチンを単回静脈内投与し、血小板減少症モデルラットを作製した。このモデル動物に、PEG-rHuMGDF (1、3 および 30 μ g/kg) または溶媒を7日間反復皮下投与し、PEG-rHuMGDF の血小板減少抑制または回復作用を調べた。次いで、同一スケジュールで過剰量の PEG-rHuMGDF (100 μ g/kg) を投与し、骨髓線維化および骨形成の有無、線維化・骨形成因子である骨髓中および血漿中の TGF- β 1 量の変動を観察した。

その結果、PEG-rHuMGDF は 3 μ g/kg 以上で用量相関的にカルボプラチン投与による血小板減少を抑制した。また、過剰量の PEG-rHuMGDF はカルボプラチン誘発血小板減少症モデルにおいて骨髓線維化を引き起こさなかった。加えて、線維化の要因と考えられる骨髓中の TGF- β 1 量の大幅な増加も認められなかった。

これらの結果から、PEG-rHuMGDF はカルボプラチン誘発血小板減少症モデルに有効であることが示され、血小板の減少した患者について、血小板を正常値に戻すことを意図した臨床適用時には骨髓線維化が誘発される可能性は低いと推測された。

第3章 マウスを用いた PEG-rHuMGDF 誘発骨形成のメカニズムの検討

BALB/c 系雄性マウスに PEG-rHuMGDF (1mg/kg) または溶媒を5日間反復皮下投与し、血小板数、大腿骨骨髓の組織学的変化、破骨細胞数の変動、In situ hybridization 法による骨芽細胞分化マーカー (OPN および BGP) の発現および血漿中 TGF- β 1 量の変動を経時的に観察した。

その結果、PEG-rHuMGDF 投与により、マウスではラットと同様のプロセスを経て線維化および骨形成が生じた。また、PEG-rHuMGDF 投与により血漿中 TGF- β 1 量の増加が認められ、TGF- β 1 が線維化および骨形成の原因と考えられた。骨芽細胞分化マーカーの発現に関しては、線維増生初期の増生線維中の細胞は OPN

(-)/BGP(-)、線維増生～骨形成期の増生線維中の細胞の一部は OPN(+)/BGP(-)、新生骨周辺の骨芽細胞は OPN(+)/BGP(+)を示した。このことから、前骨芽細胞あるいは未分化間葉系細胞が PEG-rHuMGDF 投与により分化し、骨芽細胞に分化したと推測された。さらに、PEG-rHuMGDF 投与により破骨細胞数の減少が認められ、これは TGF- β 1 の破骨細胞抑制作用によると考えられた。

これらの結果から、PEG-rHuMGDF 投与により、巨核球由来の TGF- β 1 の増加を介して破骨細胞の分化抑制および未分化間葉系細胞からの骨芽細胞の分化が誘導され、結果として線維化および骨形成が生じたと推測された。

上述した本研究の結果から、PEG-rHuMGDF の血小板減少症治療薬としての有用性と安全性が明らかにされるとともに、過剰投与時に懸念される骨髄病変の発現のメカニズムも明らかにされた。