

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 井出 陽一

PEG-rHuMGDF は、遺伝子組替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、正常動物および血小板減少モデル動物に対して、血小板数増加あるいは血小板減少抑制に著明な効果を示す。このため、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。ところが、マウスおよびラットに薬効用量を超える PEG-rHuMGDF を投与すると、骨髄で線維化・骨形成が生じる。

本研究は、過剰量の PEG-rHuMGDF を投与した際に生じる骨髄線維化・骨形成に関して、そのメカニズムを解明し、PEG-rHuMGDF を血小板減少症治療薬として用いる際の安全性の限界を明確にすることを目的として行った。本論文は以下の 3 章よりなる。

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

Crj: CD (SD) 系雄性ラットに、PEG-rHuMGDF (100  $\mu$ g/kg) あるいは媒体を 5 日間反復皮下投与したところ、PEG-rHuMGDF 投与により、血小板の増加ならびに赤血球系パラメーターの減少、 $\gamma$ -GTP 値の増加が認められた。また、骨髄では巨核球増加に引き続き、細網線維の増生および骨形成が同一部位で認められた。また骨髄上清には骨髄線維化・骨形成を誘導する TGF- $\beta$ 1 の増量が認められ、免疫染色で増数した巨核球に TGF- $\beta$ 1 の発現が観察された。さらに、骨髄間質では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認められた。以上の結果から、PEG-rHuMGDF 投与により生じる骨髄線維化・骨形成は、過剰に増加した巨核球から TGF- $\beta$ 1 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て作製した血小板減少症モデルラットに、PEG-rHuMGDF (1, 3 および 30  $\mu$ g/kg) または媒体を 7 日間反復皮下投与した。PEG-rHuMGDF は 3  $\mu$ 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。次いで、同一スケジュールで過剰量の PEG-rHuMGDF (100  $\mu$ g/kg) を投与したところ、骨髄線維化は認められず、また TGF- $\beta$ 1 量の大幅な増加も認められなかった。以上の結果から、PEG-rHuMGDF はカルボプラチン誘発血小板減少症の治療に有効であり、血小板が減少した患者で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髄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) または媒体を 5 日間反復皮下投与したところ、PEG-rHuMGDF 投与によりラットと同様のプロセスを経て骨髄線維化・骨形成が生じ、加えて

血漿中 TGF- $\beta$ 1 量の増加が認められた。また、骨芽細胞分化マーカー (OPN と BGP)、の発現をしらべたところ、線維増生初期の増生間葉系細胞では OPN(-)/BGP(-)、線維増生～骨形成期の間葉系細胞の一部は OPN(+)/BGP(-)、新生骨周辺の骨芽細胞は OPN(+)/BGP(+ )であった。さらに PEG-rHuMGDF 投与により破骨細胞数の減少が認められた。以上の結果から、PEG-rHuMGDF 投与により、巨核球由来の TGF- $\beta$ 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誘導がおこり、線維化・骨形成が生じたと推測された。

本研究の結果により、PEG-rHuMGDF の血小板減少症治療薬としての有用性と安全性の範囲が明確にされると共に、過剰投与時に懸念される骨髄病変の発現メカニズムも明らかにされた。本研究の成果は血小板減少症の治療法開発の研究に大きな進展をもたらすと考えられた。よって審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位を授与するに値するものと認めた。