

## 論文の内容の要旨

論文題目 The Study of Effects of Thrombopoietin in Various Murine Models of Thrombocytopenia and Hematological Disease

(血小板減少および血液疾患モデルにおけるトロンボポエチンの効果の研究)

氏名 渋谷和憲

血小板は止血において重要な役割を担っている血液細胞のひとつであり、骨髄中に存在する造血幹細胞から分化した巨核球系細胞より産生される。この血小板産生を特異的に促進する体液性の造血因子をトロンボポエチン (Thrombopoietin: TPO) といい、キリンビール医薬探索研究所では 1994 年にその遺伝子クローニングに成功した。その後、TPO の組換えタンパクが作製されるようになると TPO についての基礎研究が急速に進展し、TPO が血小板産生機構の重要な役割を担っていること、また正常動物に TPO を投与すると血小板数は正常値の 4~5 倍にまで増加することから、TPO は *in vivo* においても強力な血小板増加作用を有することが明らかとなった。これらの知見から、TPO は臨床における各種血小板減少症の治療薬として期待されている。本研究では *in vivo* における TPO の効果を明らかにするために、大腸菌で作製したヒト TPO の N 末端側ドメイン (TPO の生物活性を持つ部位で rHuMGDF と呼ばれる) をポリエチレングリコール (polyethylene glycol : PEG) で化学修飾した PEG-rHuMGDF を用いて、放射線療法および自己免疫疾患による血小板減少症などの実験的血小板減少モデルマウス、あるいは白血病モデルマウスなどに PEG-rHuMGDF を投与してその効果を検討し、TPO の臨床的有用性について考察した。

癌の治療では化学療法や放射線照射が行われるが、その治療に伴い骨髄の造血前駆細胞が減少し (骨髄抑制)、非常に深刻な血小板減少症が引き起こされる。本研究では放射線照射による骨髄抑制モデルにおける PEG-rHuMGDF の単回投与の効果について検討した。マウスに亜致死線量の放射線を照射して骨髄抑制モデルを作製した。このモデルでは血小板減少のみならず白血球や赤血球も減

少する。このモデルに対し PEG-rHuMGDF を放射線照射の 1 時間後に単回投与すると、用量依存的に血小板減少が軽減され、その回復期間の短縮効果が示された。同時に、白血球減少および貧血も改善された。PEG-rHuMGDF の投与により、末梢血中の各種血球の回復に先立って、骨髄では CFU-Mk や巨核球の回復、また Day-12-CFU-S などの未熟な造血前駆細胞が回復した。さらに骨髄抑制マウスの骨髄細胞を別の致死量放射線照射したレシピエントマウスに再移植した結果、PEG-rHuMGDF の投与により造血再構築能を持つ細胞の回復が促進されていることが明らかとなった。また、PEG-rHuMGDF の投与で十分な血小板減少の改善効果を得るためには骨髄抑制処置後速やかに投与を開始する必要があることが判明した。これは、骨髄抑制処置を施してから早ければ早いほど、骨髄中の CFU-Mk などの PEG-rHuMGDF に反応する前駆細胞がより多く生き残っているためと考えられた。さらに、このモデルにおいて PEG-rHuMGDF と別の造血因子である G-CSF とその効果を比較したところ、非常に高い量の G-CSF 単回投与よりも PEG-rHuMGDF の方が血球数の回復に効果的であった。PEG-rHuMGDF の血球回復に対する顕著な効果を検討するためその血中半減期を調べたところ、G-CSF と比べて非常に長いということが明らかとなった。PEG-rHuMGDF はこの長い血中半減期を持つことにより、単回投与でもある程度投与量を多くすれば十分な血小板減少の改善効果を持つと考えられた。

特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura : ITP) は抗血小板自己抗体が体内で産生され、脾臓における血小板の破壊が亢進して極度の血小板減少に陥る自己免疫疾患である。自己免疫疾患モデルマウスである雄性 (NZWxBXSB) F1 (W/B F1) は 18 週齢以降になると抗血小板自己抗体が産生し血小板減少が惹起され、ヒトの ITP によく似た症状を呈する。本研究ではこのマウスを用いて ITP に対する PEG-rHuMGDF の効果について検討した。血小板減少状態の W/B F1 に対し、PEG-rHuMGDF の投与は用量依存的に血小板減少を改善した。同時に、巨核球系造血が亢進していることを示す、新しく産生された血小板である網血小板数の増加や、脾臓および骨髄における CFU-Mk や巨核球数の増加も観察された。ITP の特徴として血小板に結合している抗血小板抗体の量 (PAIgG) が増加するが、PEG-rHuMGDF により血小板数を増加させることで PAIgG が減少することが判明した。これは、PEG-rHuMGDF により抗原である血小板が増加しても抗体産生が亢進していないことを示している。また、投与前の PAIgG の量にかかわらずほとんどの例において PEG-rHuMGDF の効果は見られたが、PAIgG が非常に高いいくつかの例では効果が見られなかった。臨床では ITP に対し脾臓を摘出することがしばしば行われるが、無効である場合も多い。血小板減少状態の W/B F1 に対して脾臓摘出を施行しても無効であったマウスに対し PEG-rHuMGDF を投与したところ、著明な血小板減少の改善効果が示された。また、ITP では血小板破壊の亢進により血小板寿命が短縮しているが、PEG-rHuMGDF の投与はその寿命に影響を与えなかったことから、血小板破壊をさらに亢進させないことが示唆された。さらに、非常に長期に渡り PEG-rHuMGDF (マウス TPO) を投与したが、その投与期間中は血小板数増加効果が維持された。以上により、慢性血小板減少疾患である ITP に対する PEG-rHuMGDF の有用性が示唆された。

TPO のレセプター (c-Mpl) は骨髄増殖性白血病症候群を発症させるネズミのレトロウイルス癌遺伝子 v-mpl の一部と相同であることが明らかにされている。また、臨床においても急性白血病患者のおよそ半数の白血病細胞の表面には c-Mpl が存在しており、その中には *in vitro* において TPO

により増殖が刺激される例も報告されている。しかし、c-Mpl を発現している細胞に対し TPO が *in vivo* においてどのような影響を及ぼすかについては明らかでなかった。本研究では c-Mpl を発現しているマウス白血病細胞をマウスに移植して白血病モデルを作製し、PEG-rHuMGDF の効果を検討した。L-8057 はマウス巨核芽球性白血病細胞であるが、放射性標識 TPO を用いた結合試験により細胞表面に c-Mpl を持つことが判明した。この細胞を静脈内移植されたマウスでは白血病が引き起こされ、その進行に伴い末梢血の白血球数の増加、血小板数の減少、および脾臓や肝臓の肥大が観察され、移植からおよそ2週間で死亡した。L-8057 に対し PEG-rHuMGDF は *in vitro* では作用を示さなかったが、L-8057 を移植された白血病モデルマウスに対し PEG-rHuMGDF を移植翌日より連日皮下投与することにより生存延長効果が認められた。PEG-rHuMGDF 投与群では白血球増加の抑制および血小板数の増加、さらに脾臓や肝臓の肥大の抑制効果が見られた。また、PEG-rHuMGDF 投与群では脾臓中の白血病細胞の数が減少すると同時に、白血病コロニー形成細胞の割合が減少し、その白血病細胞を別のマウスに再移植したときの生存期間は延長した。すなわち、PEG-rHuMGDF は *in vivo* においてマウス白血病細胞に対し質的な変化を引き起こし、白血病悪性度 (Leukemogenicity) を減少した。同様に、c-Mpl を持つ L-8330 マウス赤芽球系白血病モデルに対しても PEG-rHuMGDF 投与は生存期間を延長したが、c-Mpl を持たない L-8801 骨髓球系白血病モデルに対しては生存期間を延長しなかったため、PEG-rHuMGDF による Leukemogenicity の低下は c-Mpl を介した作用であると考えられた。

以上のように、PEG-rHuMGDF (TPO) は血小板減少症治療薬として有用な薬剤となることが期待される。また、PEG-rHuMGDF (TPO) には白血病細胞に対し Leukemogenicity の低下を引き起こす可能性も考えられ、このメカニズムは今後の白血病治療にも生かされることが期待される。