

## 論文の内容の要旨

論文題目 血小板減少状態におけるトロンボポエチンによる血栓形成亢進作用の減弱  
：機序の解明及び治療における意義

氏名 西山宇一

トロンボポエチン (TPO) は、巨核球・血小板造血を司る主要なサイトカインであり、遺伝子組換え TPO は、血小板減少症治療薬としての応用が期待されている。一方で、TPO は *in vitro* 及び *ex vivo* おいて、血小板表面に存在する c-Mpl (TPO 受容体) に結合し、血小板機能を亢進させることが明らかとなっている。このことから、TPO 投与による血栓形成の亢進に伴う血栓症の増悪が懸念されている。頸動脈及び冠動脈血栓症モデルを用いてこれまでに実施された検討において、TPO の血栓形成亢進作用は認められていないが、十分な検討が実施されたとは言い難い。

以上の背景から、新たな血栓症モデルを用いて血栓形成に対する TPO の作用の有無を明らかにすることを目的とする検討を行い、その成果を前半に示した。また、前記検討の結果、TPO は血栓形成亢進作用を有するものの、その作用は血小板減少状態において減弱することが明らかとなったことから、その減弱の機序を明らかとすることを目的とする検討を行い、その成果を後半に示した。

### 腸間膜微細静脈血栓症モデルラットを用いた血栓形成に対するトロンボポエチンの作用検討

微細血管の血栓症モデルにおける TPO 投与の影響はこれまでに検討されていない。そこで本検討では、腸間膜微細静脈血栓症モデルラットを用いた。その際、正常ラットに加え、TPO が使用される臨床状態を想定し、血小板減少ラットを用いた。血小板減少は、全身放射線照射 (TBI) により惹起した。

正常ラットに開存性の血栓を作製後、媒体又は TPO (PEG-rHuMGDF) を静脈内投与したところ、媒体投与群では血栓の増大は認められなかったが、TPO 投与群では多くの個体において、投与後 10 分以内に血栓の増大に伴う血管閉塞が認められた (表 1)。一方、血小板減少ラットでは、TPO 投与による血栓形成の亢進は認められなかった (表 1)。

以上の結果から、TPO の血栓形成亢進作用は、TBI による血小板減少状態においては減弱することが判明した。また、血小板減少状態における TPO の血栓形成亢進作用減弱の機序を解明する上で、血小板の性状解析が必要と考えられた。

表 1 正常及び TBI 惹起血小板減少ラットにおける血栓の増大に伴う血管閉塞に対する TPO (PEG-rHuMGDF) 投与の影響

動物	血小板数 ( $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	被験物質	閉塞例数 / 試験例数
正常	550 $\pm$ 15.3	媒体	0/6
		PEG-rHuMGDF (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	5/7
TBI	317 $\pm$ 14.7	媒体	0/5
		PEG-rHuMGDF (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0/5

血小板数 : n=26 (正常), n=14 (TBI) ; 平均値  $\pm$  標準誤差。

全身放射線照射による血小板減少状態において認められる血栓形成に対するトロンボポエチンの亢進作用減弱の機序に関する検討

上記の通り、TBIによる血小板減少状態において、血栓形成に対するTPOの亢進作用の減弱が認められたことから、減弱の機序を明らかにするため、本検討では、ラットに加えマウスを用い、血小板機能として凝集能を測定した。TBIによる血小板減少期のマウス及びラット血小板の凝集能を正常動物のそれと比較したところ、アゴニストにより惹起される凝集能は正常であったが、*in vitro*にて添加したTPOのアゴニスト惹起凝集に対する亢進作用の減弱が認められ、TPOシグナルの異常が示唆された。

そこで、免疫沈降及びイムノプロットティングを用いて、TBIによる血小板減少期のマウス血小板のc-Mpl、及びその下流シグナルを担うJak2、Stat5蛋白質の量並びにチロシンリン酸化を正常動物のそれらと比較した。その結果、c-Mpl及びJak2蛋白質量の減少が見出され、*in vitro*におけるTPO (rMuMGDF) 刺激後のStat5蛋白質のチロシンリン酸化は認められなかった (図1)。

TBIなどの骨髄抑制処置により、内因性TPOレベルが上昇することがこれまでに明らかとなっている。そこで、血小板減少期の血小板におけるc-Mpl及びJak2蛋白質量減少とレベル上昇する内因性TPOの影響との関連、及び*in vitro*にて添加したTPO (rMuMGDF) に対する血小板減少期の血小板の応答性減弱と内因性TPOの影響との関連を、以下の通り検討した。TBI後の血小板減少期の血小板採取に先立ち、内因性TPOを吸収する目的で、過剰量の可溶性c-Mpl (s-Mpl) をマウスに連続投与し、媒体投与マウスと比較検討した。その結果、血小板採取時の末梢血血小板数は媒体投与マウスのそれと同程度に減少したが、採取した血小板において、*in vitro*にて添加したTPOの凝集亢進作用の回復が認められ、Jak2蛋白質量及び*in vitro*にて添加したTPOによるJak2活性化の回復が認められた (図2)。

以上の結果から、TBIによる血小板減少状態においては、レベル上昇した内因性TPOに暴露された血小板のc-Mpl及びJak2蛋白質量が減少することにより、*in vitro*にて添加したTPOに対する血小板の応答性が減弱するものと考えられた。

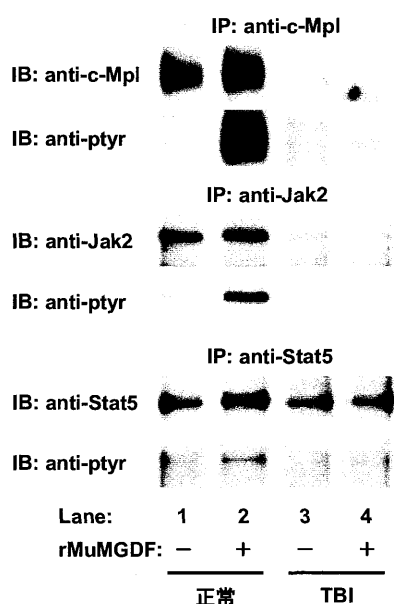


図 1 TBIによる血小板減少マウスにおける血小板のc-Mpl、Jak2及びStat5蛋白質量並びにTPO (rMuMGDF) 刺激によるそれぞれの蛋白質のチロシンリン酸化

正常及び血小板減少マウスより採取した同数の血小板に対し、媒体 (-) 又はrMuMGDF (30 ng/mL, +) を添加して5分間培養後、whole cell lysateよりc-Mpl、Jak2及びStat5を免疫沈降 (IP) し、イムノプロットティング (IB) により蛋白質量 (上パネル) 及びそれぞれの蛋白質のチロシンリン酸化 (tyr, 下パネル) を比較した。

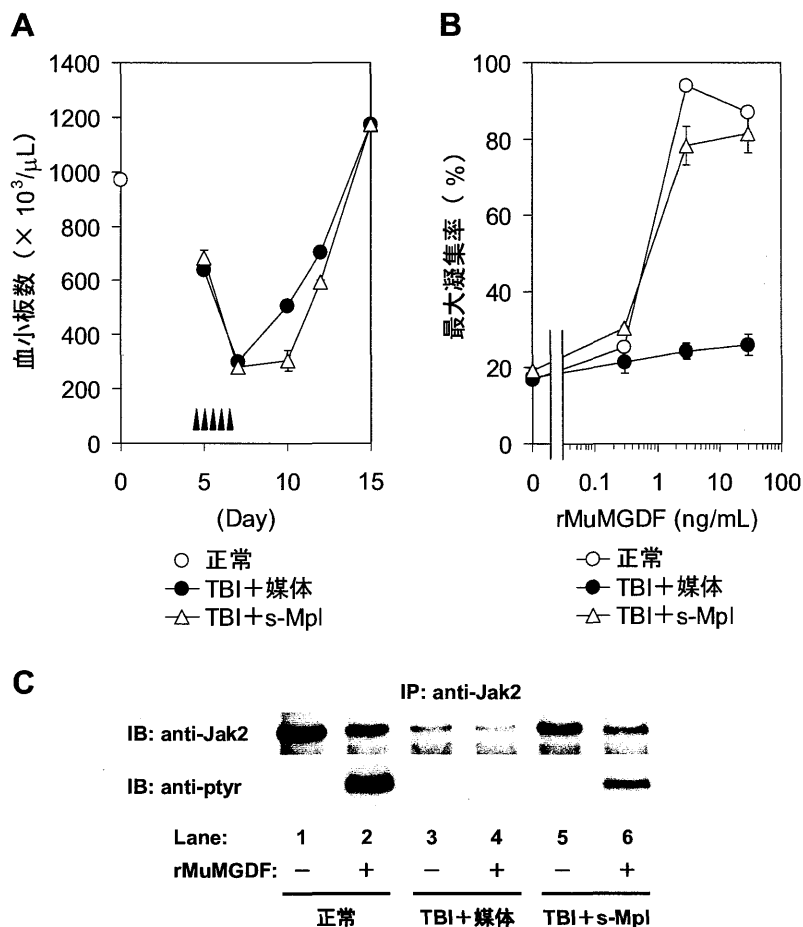


図2 TBIによる血小板減少マウス血小板において認められるTPO (rMuMGDF)による凝集亢進作用減弱及びJak2蛋白質量減少に対するs-Mpl投与の影響

(A) TBI (0日目)後、媒体又はs-Mpl (3 mg/kg/回)を4日目から6日目までの間に12時間間隔で5回(黒三角)静脈内投与した。0日目より15日目まで、末梢血血小板数を測定した。7日目に採取した血小板を洗浄し、同数の血小板を用いて以下の検討を行った。(B) 媒体又はrMuMGDFを添加して3分間培養後、ADP (8 μmol/L)を添加し、最大凝集率を比較した。(C) 媒体(-)又はrMuMGDF (30 ng/mL、+)を添加して5分間培養後、Jak2を免疫沈降(IP)し、イムノブロットティング(IB)により蛋白質量(上パネル)及び蛋白質のチロシンリン酸化(ptyr、下パネル)を比較した。以上の検討を、正常マウスより採取した同数の洗浄血小板を用いて同時に行った。(A、B) N=4、平均値±標準誤差。

### 総括・結論

本研究において、TPOの*in vivo*における血栓形成亢進作用が初めて示された。また、TBIにより惹起される血小板減少状態においては、前記の作用が減弱すること、及びその分子機序の一端が本研究において明らかとなった。

本研究の結果、TBIなどの骨髄抑制処置に伴う血小板減少状態におけるTPOの血栓形成亢進作用減弱に関し、以下の機序が考えられた。即ち、血小板は無核のために積極的な蛋白質合成が行われず、一方で骨髄抑制処置により内因性TPOレベルが上昇する結果、血小板のc-Mplに内因性TPOが結合し内在化した後、c-Mpl及びJak2蛋白質が分解され減少し、投与や*in vitro*における添加など、追加的に作用させたTPOに対する血小板の応答性が減弱することにより、TPOの血栓形成亢進作用が減弱しているものと考えられた(図3)。

本研究結果から、骨髄抑制処置により惹起される血小板減少症患者や、骨髄抑制状態にある難治性血液疾患患者においては、内因性TPOレベルの上昇によって、血小板減少症治療のために投与されたTPOの血栓形成亢進作用は減弱するものと考えられ、従って、TPO投与による血栓症増悪の懸念は緩和されると考えられた。

現在、TPOと同様の作用を有するいくつかのc-Mpl作動性分子が血小板減少症治療薬として非臨床・

臨床開発下にあるが、本研究成果は、血小板減少症の治療法に関して重要な知見を提供するものと考えられた。

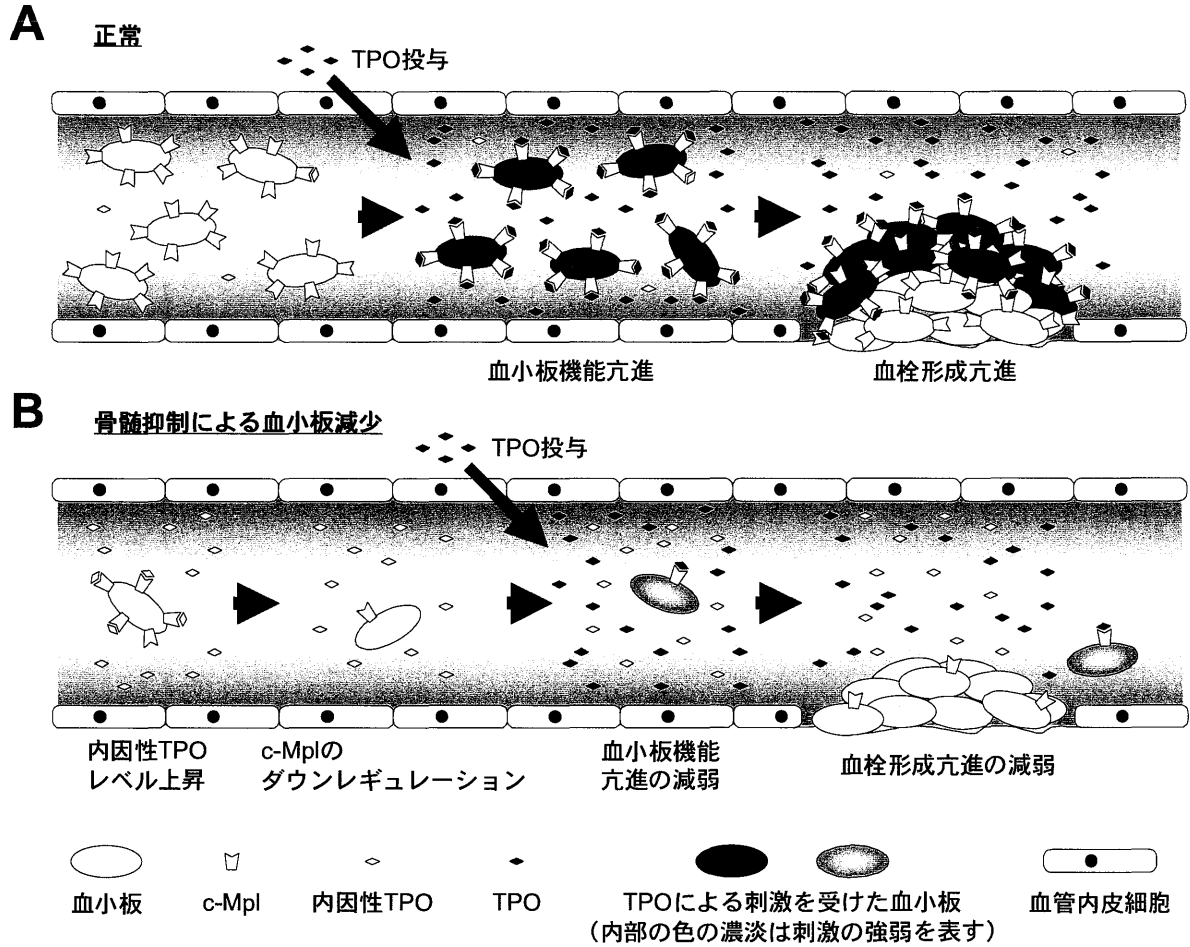


図3 骨髄抑制による血小板減少状態において認められる血栓形成に対するTPOの亢進作用減弱に関し、本研究結果から考えられる機序