

審査の結果の要旨

氏 名 西山 宇一

「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」と題する本論文は、遺伝子組換え型トロンボポエチン (TPO) を臨床応用する際に起こりうる問題点を予想し、実験モデルを用いて検証した結果が述べられている。トロンボポエチン (TPO) は、巨核球の分化・成熟と血小板の形成を促す主要なサイトカインであり、血小板減少症治療薬として開発できる可能性がある。しかし、TPO は血小板機能を亢進させることも知られており、血栓形成を亢進するおそれもある。このような背景が第1章に述べられている。次に、新たな血栓症モデルを用いて血栓形成に対し TPO が促進的に作用すること、TPO の血栓形成促進作用は、血小板減少状態において減弱することを明らかにした結果が第2章に述べられている。血小板減少状態では、いかなる原因で TPO の血栓形成促進作用が減弱するかを検討した結果が第3章に述べられている。第4章は総括である。

まず行われたのは、腸間膜微細静脈における血栓症モデルラットの開発と、これ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である。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ている。血小板減少は、全身放射線照射による。正常ラットでは TPO 投与により多くの個体で血栓の増大に伴う血管閉塞が認められたが、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。

次に、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がいかなる原因で減弱するかが検討された。マウス及びラット血小板の ADP により惹起される凝集能には正常動物由来と血小板減少動物由来とで違いが無かったが、凝集に対する TPO の亢進作用が血小板減少動物由来の血小板では減弱していた。そこで、免疫沈降及びイムノブロッティングを用いて、TPO レセプターである c-Mpl、及びその下流シグナルを担う Jak2、Stat5 蛋白質の量及び tyrosine リン酸化を血小板減少期のマウスと正常動物の血小板で比較した。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 刺激後の Stat5 の tyrosine リン酸化が消失していた。

このような TPO シグナルの不応性がいかなる機構で起るかが次に検討された。すなわち、c-Mpl 及び Jak2 蛋白質量減少と内因性の TPO レベル及び TPO に対する応答性の関連が追究された。内因性 TPO の有効レベルを可溶性 c-Mpl 連続投与することによって低下させると、採取し

た血小板において、添加した TPO の凝集亢進作用の回復が *in vitro* にて認められた。以上の結果から、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、投与した TPO に対する血小板の応答性が減弱することが強く示唆された。

以上のように、新たに開発された *in vivo* における血小板機能促進を測定するシステムを作製し、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、放射線照射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。

本研究結果から学位申請者は、骨髄抑制により惹起される血小板減少症患者や、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の不応性が生じていると予想した。もしこの結論が一般化できれば、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、TPO 投与による血栓症増悪の懸念は緩和される。

本研究成果により、個体レベル及び細胞レベルでフィードバックループを多重に有している TPO の作用についてその一端が解明された。これらの結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、本研究を行った西山宇一は博士（薬学）の学位を受けるにふさわしいと判断した。