

学 位 論 文 題 名

A Novel Immunosuppressant 15-Deoxyspergualin
and Thrombopoiesis

(新しい免疫抑制剤15-Deoxyspergualin と血小板産生)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

研究目的

15-Deoxyspergualin (DSG)は、*Bacillus laterosporus*から単離されたSpergualinの誘導体であり、抗腫瘍作用と免疫抑制作用とを有することが知られている。今回は、DSGを[BALB/c→C3H/He]骨髄キメラマウスに投与すると血小板の増加を認めているので、その血小板産生作用の機序の解析を目的とした。

材料及び方法

- 1) マウス：4-6週齢の雄性C3H/HeとBALB/cSPF マウスとを用いた。
- 2) 骨髄移植：BALB/c或いはC3H/Heマウスの 10^7 個の骨髄細胞を875radのX線照射したC3H/Heマウスに移植した。
- 3) DSG投与：移植後14日目より25日目まで3mg/kgDSGを[BALB/c→C3H/He]骨髄キメラマウスの腹腔内に注射した。対照群としてはPBS 0.1mlを投与した。
- 4) 末梢血球数の算定：マウス眼静脈から採血して、5匹のマウスを一組として用いた。Micro Cell Counterで末梢血球数を測定した。
- 5) 半定量RT-PCR法によるサイトカインmRNAの測定：移植後19、25、28と32日目に[BALB/c→C3H/He]骨髄キメラマウスから脾細胞と骨髄細胞を採取し、 10^7 個の細胞よりtotal-RNAを抽出した。2 μ g total-RNAを用いてRT-PCR法によりDNAを増幅した。サイクルの設定は、94°C60秒、60°C60秒、72°C2分である。

対照にした β -actin は、20と25サイクルの増幅を行った。interleukin-3 (IL-3)、IL-6、granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)、granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) と stem cell factor (SCF) のDNA増幅のサイクル数は、30、37と44であり、leukemia inhibitory factor (LIF) のDNA増幅のサイクル数は、25、30と35である。

結 果

- 1) DSG投与したキメラマウスの血小板数：DSG投与群の血小板数は25日目より33日目まで増加することが認められた。29日目のDSG投与群では対照群より1.85倍の血小板数増加が見られた。
- 2) mRNAの半定量性の評価：構成したcDNAを二倍希釈して、PCR法により β -actin mRNA量を同定した。これを根拠として、mRNA量の差を判定した。
- 3) DSG投与したキメラマウスの脾或いは骨髄細胞のIL-6 mRNA量：IL-6 mRNA量は25、28と32日目に脾細胞で増加し、29日目に減少した。骨髄細胞のIL-6 mRNA量は、19、25と28日目に増加し、32日目に減少した。
- 4) DSG投与したキメラマウスの脾と骨髄細胞のSCF mRNA量：脾細胞では25と28日目に増加し、19と32日目では対照群と差が認められなかった。骨髄細胞では28日目に増加したが19日目に減少した。25と32日目には、対照群と同じであった。
- 5) DSG投与したキメラマウスの脾或いは骨髄細胞のLIF mRNA量：両者とも対照群と有意差が認められなかった。
- 6) その他のサイトカインのmRNA量の測定：DSG投与したキメラマウスの脾細胞のIL-3 mRNA量は、19日目に減少したが、25と32日目に増加した。骨髄細胞のIL-3 mRNA量は、25日目に増加した。

DSG投与したキメラマウスの脾細胞のG-CSF mRNA量は19と25日目に増加したが、28と32日目には対照群と同じであった。骨髄細胞のG-CSF mRNA量は、25、28と32日目に増加したが、19日目は対照群と同じであった。

DSG投与したキメラマウスの脾細胞のGM-CSF mRNA量は、25と28日目に増加したが、19と32日目では対照群と差が認められなかった。DSG投与したキメラマウス骨髓細胞のGM-CSF mRNA量は、検索し得た全ての日数で増加した。

7) DSG投与した正常なC3H/Heマウスと[C3H/He→C3H/He]キメラマウスの血小板数：両方で25、29と33日目に明らかな血小板数の増加を認め、29日目に最高値を示した。

考 察

*in vivo*にサイトカインを投与し、血小板産生における促進作用のあることが報告されているものに、IL-6, IL-11, LIF, SCF, IL-3, GM-CSF, IL-1 β , erythropoietin (EPO) などがある。しかし、単独投与では前4者が顕著なthrombopoiesisを誘導する。今回の解析によると、DSGはIL-6 mRNA量を増加させ、19日目を除いて、それは血小板数増加と一致した。しかし、19日目には骨髓細胞のIL-6 mRNA量が増加しても、脾細胞のIL-6 mRNA量は減少した。この結果は、移植後早期の血小板産生にはIL-6以外のサイトカインの関与のあることを示唆している。

LIFは、血小板産生の誘導作用があるが、今回の結果では対照群と有意差が認められなかった。SCF mRNA量の増加も認められたが、血小板数の増加と時間的に一致するものではなかった。

IL-3とGM-CSFとの mRNAの増加も認められたが、これらのサイトカインはどちらかという巨核球の増加を促す作用が血小板増加作用より強く、IL-6あるいは他のサイトカインとの協調作用で血小板増多を誘導した可能性は残るが、単独で血小板増加作用を誘導したとは考え難い。G-CSFも同様であろうと考えられた。

この他、まだ同定されていないthrombopoietin (TPO) を介した血小板増多作用も否定できない。DSGには、同系骨髓キメラマウスと正常マウスにおいても血小板増多作用のあることが認められた。この結果は、DSGの血小板増多作用が同種骨髓キメラマウスに特有の現象ではないことを示唆した。しかし、同系骨髓キメ

ラマウスと正常マウスに比較して、同種骨髄キメラマウスにおける血小板増多が著明であった。従って、これはDSGの同種骨髄キメラマウスの血小板増多作用が graft-versus-host reaction (GVHR) と graft-versus-host disease (GVHD) との発症時に産生されたサイトカインとの相乗作用に起因する差と考えられた。DSGによる白血球減少と貧血が認められたが、GVHR と GVHD の発症時に、tumor necrosis factor α (TNF α)、interferon γ (IFN γ) と transforming growth factor β (TGF β) のような造血抑制因子も産生されると考えられ、これらのサイトカインの関与が示唆されるとともに、直接的な cytostatic effect も考慮しなければならない。

結 語

in vivo に新しい免疫抑制剤 DSG を投与して、血小板を増加させる現象は IL-6 あるいは IL-3、G-CSF、GM-CSF、SCF と IL-6 との協調作用によると考えられた。DSG は、従来の免疫抑制剤に比較して異なる作用機序を有する上に、血小板増多作用も有している。今後さらにその作用機序の解析によりその有効な利用が可能となることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 宮崎 保
副査 教授 内野 純一
副査 教授 小池 隆夫

学位論文題名

A Novel Immunosuppressant 15-Deoxyspergualin and Thrombopoiesis

(新しい免疫抑制剤15-Deoxyspergualin と血小板産生)

I. 研究目的

15-Deoxyspergualin (DSG)は、*Bacillus laterosporus*から単離されたSpergualinの誘導体であり、抗腫瘍作用と免疫抑制作用とを有することが知られている。DSGを[BALB/c→C3H/He]骨髄キメラマウスに投与すると血小板数の増加を認めたので、その血小板産生作用の機序の解析を目的とした。

II. 材料及び方法

- 1) マウス：4-6週齢の雄性C3H/HeとBALB/cSPFマウスとを用いた。
- 2) 骨髄移植：BALB/c或いはC3H/Heマウスの 10^7 個の骨髄細胞を875radのX線照射したC3H/Heマウスに移植した。
- 3) DSG投与：移植後14日目より25日目まで3mg/kgDSGを骨髄キメラマウスと正常のC3H/Heマウス腹腔内に投与した。対照群としてはPBS 0.1mlを投与した。
- 4) 血小板数の算定：マウス内眼窩叢から採血して、Micro Cell Counterで血小板数を測定した。
- 5) 半定量RT-PCR法によるサイトカインmRNAの測定：移植後19、25、28と32日目に[BALB/c→C3H/He]骨髄キメラマウスから脾細胞と骨髄細胞を採取して、 10^7 個の細胞よりtotal-RNAを抽出した。2 μ g total-RNAを用いてRT-PCR法によりIL-6、SCF、LIF、IL-3、G-CSFとGM-CSFのDNAを増幅した。対照として β -actinを用いた。

III. 結果

- 1) DSGを投与した同種骨髄キメラマウスの血小板数：DSG投与群の血小板数は25日目より33日目まで増加することが認められた。29日目のDSG投与群では対照群より1.85倍の血小板数増加が見られた。
- 2) mRNAの半定量性の評価：構成したcDNAを二倍希釈して、PCR法により β -actin mRNA量を同定した。これを根拠として、mRNA量の差を半定量的に判定した。

3) DSGを投与した同種骨髄キメラマウスの脾あるいは骨髄細胞のIL-6mRNA量：
IL-6mRNA量は25、28と32日目に脾細胞で増加し、29日目に減少した。骨髄細胞のIL-6 mRNA量は、19、25と28日目に増加し、32日目に減少した。

4) DSGを投与した同種骨髄キメラマウスの脾あるいは骨髄細胞のSCFmRNA量：
SCF mRNA量は、脾細胞では25と28日目に増加し、19と32日目では対照群と差が認められなかった。骨髄細胞では28日目に増加したが19日目に減少した。25と32日目には、対照群と同じであった。

5) DSGを投与した同種骨髄キメラマウスの脾あるいは骨髄細胞のLIF mRNA量：脾及び骨髄細胞のLIFmRNA量は、対照群と比較して有意差が認められなかった。

6) 他のサイトカインのmRNA量の測定：DSG投与した同種骨髄キメラマウスの脾細胞のIL-3 mRNA量は、19日目に減少したが、25と32日目に増加した。骨髄細胞のIL-3 mRNA量は、25日目に増加した。

DSG投与した同種骨髄キメラマウスの脾細胞のG-CSFmRNA量は19と25日目に増加したが、28と32日目には対照群と同じであった。骨髄細胞のG-CSFmRNA量は、25、28と32日目に増加したが、19日目は対照群と同じであった。

DSG投与した同種骨髄キメラマウスの脾細胞のGM-CSFmRNA量は、25と28日目に増加したが、19と32日目では対照群と差が認められなかった。DSGを投与した同種骨髄キメラマウス骨髄細胞のGM-CSFmRNA量は、検索し得た全ての日数で増加した。

7) DSGを投与した正常なC3H/Heマウスと[C3H/He→C3H/He]骨髄キメラマウスの血小板数：両者で25、29と33日目に明らかな血小板数の増加を認め、29日目に最高値を示した。

IV. 考察及び結語

1) 新しい免疫抑制剤DSGを同種骨髄キメラマウスに投与して、血小板数を増加させる現象はIL-6あるいはIL-3、G-CSF、GM-CSF、SCFとIL-6との協調作用によると考えられた。

2) DSGを投与した同系骨髄キメラマウスと正常マウスにおいても、血小板増多作用が認められ、この結果は、DSGの血小板増多作用が同種骨髄キメラマウスに特有の現象ではないことを示唆した。

3). DSGは、従来の免疫抑制剤に比較して異なる作用機序を有する上に、血小板増多作用も有している。今後、さらにその作用機序の解析によりその有効な利用が可能となることが示唆された。

以上より、本研究は博士（医学）の学位論文として妥当のものと判断される。