

博士（医学） 吉田 真

学位論文題名

Thrombopoietin alone stimulates the early proliferation and survival of human erythroid, myeloid and multipotential progenitors in serum-free culture

（トロンボポイエチンは単独で巨核球系のみならず、赤芽球系、骨髓球系、多能性前駆細胞の増殖、分化を刺激する）

学位論文内容の要旨

1994年、thrombopoietin (TPO)のクローニングが報告されて以来、TPOは巨核球系前駆細胞の増殖と成熟を著しく促すことが *in vitro*、および *in vivo* の実験で示され、また TPO のレセプター遺伝子である c-mpl のノックアウトマウスで、末梢血中の血小板数や骨髓中の巨核球数が減少し TPO の血中濃度が上昇していることが報告された。これらより TPO は巨核球造血の主たる調節因子であることが示された。

申請者は TPO が巨核球以外の血球系統の増殖や分化に対し効果を有するか否かを解明することを目的として研究した。

実験方法および結果

ヒト臍帯血から比重遠沈法および免疫磁気ビーズを用いて得られた CD34⁺細胞を使用し以下の実験を行った。巨核球コロニーの算定は培養開始後 11 日目、他のコロニーは 14 日目に行った。

1) CD34⁺細胞 500 個あたりのコロニー形成能を、各種濃度の TPO を添加した無血清メチルセルロース培養法により比較した。

【結果】 TPO の濃度依存性に巨核球コロニーの形成が増加し 2~4ng/ml でプラトーに達した。巨核球コロニー以外には芽球コロニーが形成されるのみであった。芽球コロニーはその後経時的に観察しても分化傾向を示さず芽球の形態のまま変性した。この芽球コロニーは TPO のみでは分化成熟できない巨核球系以外の前駆細胞の存在を示唆するものと考え実験を進めた。

2) CD34⁺細胞を TPO のみ添加した無血清メチルセルロース法で 7 日間一次培養した後、6 種のサイトカインカクテル (SCF, IL-3, IL-6, GM-CSF, EPO, TPO)を添加しコロニーの形成を観察した。

【結果】 サイトカインカクテルの添加で種々の血球系統のコロニーの形成を認めた。TPO のみによる培養で得られた芽球コロニーには、様々な系統の前駆細胞が含まれていることが示唆された。サイトカインカクテル添加で得られた巨核球系以外のコ

口ニー数は、TPO のみで誘導された一次培養での芽球コロニー数から考えると予想以上の数であった。これは TPO が造血前駆細胞を増殖させるだけではなく、細胞分裂させることなしに生存させる可能性を有することも示唆した。

3) 2)の一次培養で得られた芽球コロニーあるいはクラスターを 1 つずつ採取し、サイトカインカクテルを添加した新しい培地へ replate し、その後のコロニーの形成を観察した。

【結果】 replate した 73 個の芽球コロニー中 51 個に二次コロニーが形成され、巨核球コロニーのみならず約半数は種々のコロニーの形成を認めた。したがって約半数の芽球コロニーは多能性前駆細胞由来のものと思われた。

4) TPO が造血前駆細胞を分裂させずに生存を維持し得ることを明確にするため、セルソーターを用いて 1 個ずつソーティングした CD34⁺細胞を TPO のみを加えた無血清液体培地で一次培養し、7 日後 TPO またはサイトカインカクテルを添加し生成される細胞を観察した。

【結果】 培養に用いた 96 個の well のうち 7 日目の時点で細胞増殖を認めなかつたものは 70well、認めたものは 26well であった。増殖の有無にかかわらず 47well に TPO を、49well にサイトカインカクテルを添加したところ、後者のうち 15well よりコロニーが得られた。これらは巨核球系のみならず顆粒球系、赤芽球系および多系統の細胞から成り立っており、この現象は 7 日目の細胞の増加の有無に関係なく観察された。つまり TPO により細胞分裂することなしに生存し得た細胞には多能性前駆細胞も含まれることがわかった。

5) TPO が造血前駆細胞を増幅せしめるかを知るために、CD34⁺細胞を TPO のみを加え無血清液体培養した後、7 日毎にサイトカインカクテルを添加したメチルセルロース培地へ replate し産生される前駆細胞数を算定した。

【結果】 CD34⁺細胞中に含まれる総前駆細胞は TPO による培養で 7 日目に 2.5 倍に増幅された。また巨核球系、赤芽球系、顆粒球系および多能性前駆細胞はそれぞれ 6.8 倍、3.1 倍、1.5 倍、4.5 倍に増幅された。さらにこの現象は、TPO の濃度依存性であることが確認され、また抗 TPO 抗体により完全に抑制された。

6) CD34⁺細胞を TPO のみで培養することで long term culture-initiating cell (LTC-IC) が増幅されるか否かを観察した。

【結果】 LTC-IC は幹細胞に最も近い細胞の一つといわれているが、CD34⁺細胞中に含まれる LTC-IC は TPO による培養で 7 日目に約 2 倍に増幅された。

考察

今まで、TPO は巨核球造血における鍵となる役割をはたすことが報告されている。しかしそのレセプター遺伝子である v-mpl は元来、マウスの赤芽球系、顆粒球系、単球系、巨核球系、組織球系の白血病をおこす myeloproliferative leukemia virus (MPLV) に見いだされたものであることから、TPO とそのレセプター(c-Mpl)を介したシグナルは巨核球系の細胞に限られるものではないことが推測された。

申請者は、リンパ球、単球などが放出し得る、または血清中に含まれ得る造血因子の影響を除外するため、単離した CD34⁺細胞と無血清培養とを用いて実験し、TPO

のみの添加は巨核球の他に芽球コロニーも形成されることが示され、サイトカインカクテルを delayed addition することで多数の GEMM コロニー (granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte コロニー) が形成され、芽球コロニー中に多能性造血前駆細胞が高頻度に含まれることを見いだした。またその前駆細胞の性質は TPO のみによって維持されることがわかった。この TPO の効果が直接的なものであることは、clone-sorting した CD34⁺ 細胞を用いた実験や、抗 TPO 抗体を使用した抑制実験で証明された。

TPO の多能性造血前駆細胞に対する効果は他のサイトカインとの相乗作用によるものは報告されているが、本研究では TPO 単独による効果について証明した。

TPO のみで誘導された芽球コロニーから delayed addition により純粋な赤芽球系あるいは顆粒球系コロニーが形成され、さらに single-cell culture でも同様な結果が得られたことから、TPO はコミットした monopotent な前駆細胞にも効果を有することが示された。赤芽球系前駆細胞に対する効果はすでに報告されているが、TPO 単独による顆粒球系前駆細胞に対する効果は本研究が最初である。

本研究により TPO は成熟段階により差はあるが、すべての系統の造血前駆細胞に対し効果を有することが証明された。また、LTC-IC を含む造血幹細胞に相当近接した前駆細胞に効果を有しあつ增幅を示すことが示された。このことは臨床の実際において、血小板減少症のみならず顆粒球減少症や貧血に対して効果を期待できると考えている。そして造血幹細胞/前駆細胞の ex vivo expansion に非常に有用な手段の一つと思われ、臨床への寄与は大きなものと考える。

学位論文審査の要旨

主査教授 小林邦彦

副査教授 細川眞澄男

副査教授 今村雅寛

学位論文題名

Thrombopoietin alone stimulates the early proliferation and survival of human erythroid, myeloid and multipotential progenitors in serum-free culture

(トロンボポイエチンは単独で巨核球系のみならず、赤芽球系、骨髄球系、多能性前駆細胞の増殖、分化を刺激する)

Thrombopoietin (TPO)は巨核球系前駆細胞の増殖と成熟を著しく促すこと、またTPOのレセプター遺伝子であるc-mplのノックアウトマウスで、末梢血中の血小板数や骨髄中の巨核球数が減少しTPOの血中濃度が上昇することから、TPOは巨核球造血の主たる調節因子であることが示されている。

本研究はTPOが巨核球以外の血球系統への効果を解明することを目的とした。

①ヒト臍帯血から比重遠沈法および免疫磁気ビーズを用いて得られたCD34+細胞を使用した。巨核球コロニーの算定は培養開始後11日目、他のコロニーは14日目を行い、CD34+細胞500個当たりのコロニー形成能を、各濃度のTPOを添加した無血清メチルセルロース培養法により比較した。

【結果①】 TPOの濃度依存性に巨核球コロニーの形成が増加し2~4ng/mlでプラトーに達した。巨核球コロニー以外に芽球コロニーも形成されたが、芽球コロニーはその後、経時的に観察しても分化傾向を示さず芽球の形態のまま変性した。この芽球コロニーはTPOのみでは分化成熟できない巨核球系以外の前駆細胞の存在を示唆するものと考え次の実験を進めた。

②CD34+細胞をTPOのみ添加した無血清メチルセルロース法で7日間一次培養した後、6種のサイトカインカクテル (SCF, IL-3, IL-6, GM-CSF, EPO, TPO)を添加し、コロニーの形成を観察した。

【結果②】 サイトカインカクテルの添加で種々の血球系統のコロニーの形成を認めた。TPOのみによる培養で得られた芽球コロニーには、様々な系統の前駆細胞が含まれていることが示唆された。サイトカインカクテル添加で得られた巨核球系以外のコロニー数は、TPOのみで誘導された一次培養での芽球コロニー数から考えると予想以上の数であった。これはTPOが造血前駆細胞を増殖させるだけではなく、細胞分裂させることなしに生存させる可能性を有することも示唆した。

③TPOのみの一次培養で得られた芽球コロニーを採取し、サイトカインカクテルを添加した新しい培地へreplateし、その後のコロニーの形成を察した。

【結果③】 replateした73個の芽球コロニー中51個に二次コロニーが形成され、巨核球コロニーのみならず約半数は種々のコロニーの形成を認めた。したがって芽球コロニーの約半数は多能性前駆細胞由来と思われた。

④TPOが造血前駆細胞を分裂させずに生存を維持し得ることを明確にするため、個々のCD34+細胞をTPOのみを加えた無血清液体培地で一次培養し、7日後TPOまたはサイトカインカクテルを添加し生成さ

れる細胞を観察した。

【結果④】 培養に用いた96個のwellのうち7日目の時点で細胞増殖を認めなかつたものは70well、認めたものは26wellであった。増殖の有無にかかわらず47wellにTPOを、49wellにサイトカインカクテルを添加したところ、後者のうち15wellよりコロニーが得られた。これらは巨核球系のみならず顆粒球系、赤芽球系および多系統の細胞から成り立つており、この現象は7日目の細胞の増加の有無に関係なく観察された。つまりTPOにより細胞分裂することなしに生存し得た細胞に多能性前駆細胞が含まれることがわかつた。

⑤ TPOが造血前駆細胞を増幅せしめるかを知るために、CD34+細胞をTPOのみを加えた無血清液体培養した後、7日毎にサイトカインカクテルを添加したメチルセルロース培地へreplateし、産生される前駆細胞数を算定した。

【結果⑤】 CD34+細胞中に含まれる総前駆細胞はTPOによる培養で7日目に2.5倍に増幅された。また巨核球系、赤芽球系、顆粒球系および多能性前駆細胞はそれぞれ 6.8倍、3.1倍、1.5倍、4.5倍に増幅された。さらにこの現象は、TPOの濃度依存性であることが確認され、また抗TPO抗体により完全に抑制された。

⑥ CD34+細胞をTPOのみで培養することでlong term culture-initiating cell (LTC-IC)が増幅されるか否かを観察した。

【結果⑥】 LTC-ICは幹細胞に最も近い細胞の一つといわれているが、CD34+細胞中に含まれるLTC-ICはTPOによる培養で7日目に約2倍に増幅された。

[考察]

今まで、TPOは巨核球造血における鍵となる役割をはたすことが報告されている。しかしそのレセプター遺伝子の一つであるv-mplは元来、マウスの赤芽球系、顆粒球系、単球系、巨核球系、組織球系の白血病をおこすmyeloproliferative leukemia virus (MPLV)に見いだされたものであることから、TPOとそのレセプター(c-Mpl)を介したシグナルは巨核球系細胞に限られるものではないことが推測された。

申請者は、リンパ球、単球などが放出し得る、または血清中に含まれ得る造血因子の影響を除外するため、単離したCD34+細胞と無血清培養とを用いて実験し、TPOのみの添加は巨核球のみならず他の芽球コロニーも形成されること、その後サイトカインカクテルを添加することによって多数のGEMMコロニー(granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte)が形成され、芽球コロニー中に多能性造血前駆細胞が高頻度に含まれることを見いだした。またその前駆細胞の性質はTPOのみの培養で維持されることがわかつた。このTPOの効果が直接的なものであることは、clone-sortingしたCD34+細胞を用いた実験や、抗TPO抗体を使用した抑制実験で証明された。TPOの多能性造血前駆細胞に対する効果は他のサイトカインとの相乗作用によるものは報告されているが、本研究ではTPO単独による効果について証明した。TPOのみで誘導された芽球コロニーからサイトカインの添加により純粋な赤芽球系、顆粒球系コロニーが形成され、さらにsingle-cell cultureでも同様な結果が得られたことから、TPOはコミットしたmonopotentな前駆細胞にも効果を有することが示された。赤芽球系前駆細胞に対する効果はすでに報告されているが、TPO単独による顆粒球系前駆細胞に対する効果は本研究が最初である。

本研究によりTPOは細胞の成熟段階により差はあるものの、すべての系統の造血前駆細胞に対し効果を有することが証明された。また、LTC-ICを含む造血幹細胞に相当近接した前駆細胞に効果を有しかつ増幅をすることが示された。このことから臨床の実際において、TPO投与は血小板減少症のみならず顆粒球減少症や貧血に対しても効果が期待できると考えられ、さらに、TPO添加培養法は造血幹細胞/前駆細胞のex vivo expansionに非常に有用な手段の一つと思われ、本研究の臨床への寄与は大きいと考えた。

公開発表に際し、副査の細川教授より、サイトカインカクテルにTPOを入れた理由、LTC-ICと真のstem cellとの差異、遺伝子導入のための多能性造血細胞として利用できる可能性等、また副査の今村教授から、TPOの濃度と芽球コロニーの出現頻度について、使用したTPO濃度と生体における濃度との関係等、第三内科の武蔵講師から、TPOが造血前駆細胞を増殖・維持させるとする結論の妥当性、LTC-IC

の維持に関して他のサイトカインの効果について等、主査の小林教授から、臍帯血を用いた理由と、末梢血や骨髄血でのデータについて等の質問があったが、申請者は何れに対しても自らのデータを中心に概ね適切な回答を行った。審査員一同は、これを高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。