授与番号　乙第755号

論文内容の要旨

Platelet demand modulates the type of intravascular protrusion from megakaryocytes in the bone marrow.

（血小板需要は骨髄巨核球の血管内への細胞突起のタイプを誘導する）

（Thrombosis and Haemostasis 112巻、4号　平成26年掲載）

（古和田周吾、磯貝純男、村井一範、伊藤薫樹、遠山稿二郎、依馬正次、人見次郎、石田陽治）

I. 研究目的

ほ乳類において、血小板は血管内にのみ存在し、止血作用に特化した無核の血液細胞である。血小板は骨髄組織内の髄質に位置する巨核球より産生される。巨核球はproplateletと呼ばれる血小板の連なり様の構造を持つ細胞突起を血管内に伸ばしその先端から血小板を産生し（proplatelet モデル）、最終的に１つの巨核球から数千の血小板が産生されると想定されている。しかしこれまで、解析手法によって異なるモデルが提示されており生体内でのその過程は不明な点が多い。その主たる理由として、従来の研究は固定した骨髄組織や培養巨核球を用いており、生体内での時間的情報の欠落や、生体内環境を再現し得ない点が挙げられる。

本研究は、生きたマウスの骨髄をリアルタイムに可視化することにより、骨髄巨核球が血管内へどのような過程で血小板を生み出しているかを観察した。その情報を基に電子顕微鏡による細胞内構造の変化の解析、および血小板需要に伴うそれらの変化について解析した。

II. 研究対象ならび方法

毛細胞および成熟赤血球以外の全身の細胞に EGFP(enhanced green fluorescent protein)を発現したマウス(C57BL/6 TgN(β-act-EGFP)Osb)に全身麻酔を行い、２光子顕微鏡（Zeiss LSM510 NLO）を用いて頭蓋骨内の骨髄組織を30秒毎に８時間に撮像した。撮像した静止画像を基にタイムラプスムービーを作成し、巨核球の突起形成から血小板前駆体分離までの過程を、形態、サイズ、速度について解析した。

次に同系マウス（C57BL6）を還流固定した後に、骨髄組織を取り出し、走査電子顕微鏡および透過電子顕微鏡で観察し、タイムラプスムービーから得られた時間、形態、サイズ情報を基に、電子顕微鏡レベルでの細胞内構造の変化を詳細に解析した。

また同系マウスに、瀉血または抗血小板抗体投与を行い、経時的に、フローサイトメ

トリー法による網状血小板測定、および免疫染色で骨髄組織中の巨核球の血管内突起の構造を共焦点顕微鏡で評価した。網状血小板数、巨核球血管内突起の定量データの統計学的解析は、Turkey-Kramer 法を用いた。

III. 研究結果

1. ２光子顕微鏡イメージングでは骨髄巨核球は血小板よりもサイズの大きな血小板前駆体を放出していた。また血小板前駆体の放出の過程には２つの種類があり、proplatelet から血小板前駆体を産生するものと、従来のモデルにはない大型の細胞突起（thick protrusion と命名）からより大きな血小板前駆体を産生するものに分けられた。
2. 電子顕微鏡での解析では、thick protrusion は peripheral zone が保たれており、小胞体、分離膜系が豊富であり未熟な微小管配列であった。これらの特徴は巨核球の細胞質の細胞内構造に合致した。一方 proplatelet はほぼ血小板と同じ細胞内構造を示した。これらから thick protrusion はより未熟な大きな血小板前駆体を産生していることが明らかとなった。
3. 免疫染色による検討では、血小板数が正常の場合は proplatelet からの小型の成熟血小板前駆体産生が主であり、血小板産生亢進期（血小板減少期から回復期）には thick protrusion からの未熟で大型の血小板前駆体産生が主であった。

IV. 結語

骨髄中の巨核球は血管内突起形成を経て血小板前駆体を産生していた。骨髄中の血管内へ放出される血小板前駆体の細胞内構造には成熟度の違いが認められ、血小板需要に応じて使い分けられていた。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査　教授　山内　広平　（内科学講座：呼吸器・アレルギー・膠原病内科分野）

副査　教授　石田　陽治　（内科学講座：血液腫瘍内科分野）

副査　教授　人見　次郎　（解剖学講座：人体発生学分野）

本研究は生きたマウスの骨髄を直接撮像し、これまで不明であった血小板生成過程を明らかにする目的で行われた。結果は、巨核球が proplatelet と呼ばれる血小板の連なり様構造から血小板を遊離産生する従来より想定されているタイプ(proplatelet モデル)と、従来のモデルにはない大型の細胞突起(thick protrusion)から大型の血小板前駆体を産生するタイプがあることが明らかにされた。更に血小板数が正常な場合には、proplatelet モデルによる産生が主流であり、一方血小板が減少した場合には、thick protrusion モデルによる産生が主流となることが明らかにされた。血小板生成過程を明らかにするという本質的な研究であり、新しい生成機序を明らかにした研究意義は高く、十分に学位に値する研究と考える。

試験・試問の結果の要旨

本研究の研究方法や研究結果及びその意義について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考える。また英語の試験にも合格した。

参考論文

１）Distinguishing between proliferating nodal lymphoid blasts in CML and NHL: Report of three cases and detection of a bcr/abl fusion signal by single-cell analysis.(慢性骨髄性白血病と悪性リンパ腫のリンパ節中の芽球の鑑別)

（阿保亜紀子、他 10 名と共著）. Pathology International 55,(2005):273-279.

２)Bortezomib induces thrombocytopenia by the inhibition of proplatelet formation of megakaryocytes.(ボルテゾミブは巨核球の胞体突起形成を抑制することにより血小板減少症を引き起こす)

（村井一範、他 7 名と共著）. European Journal of Haematology 93, (2014):290-296.