

論文内容の要旨

マウス全血中の血小板前駆体の解明
(下山格, 古和田周吾)
(岩手医学雑誌 67 巻 4 号掲載予定)

I. 研究目的

血小板は骨髓髄質中で造血幹細胞から分化した巨核球より産生される。成熟した巨核球は、骨髓静脈洞の血管壁外側に位置し、血管壁を貫通し、血管内に細胞突起 (proplatelet) を伸展する。その proplatelet の先端で突起の放出がおこり、それが分離しながら血小板産生が行われるといわれており、それが主要な血小板産生様式であるとみなされてきた。しかし、その細胞突起から血小板が産生されていく過程には、現在でも多数の疑問が残っている。

我々は以前 2 光子顕微鏡と電子顕微鏡を用いて、生体内 live imaging 法でマウス骨髓内の血小板前駆体の産生過程を詳細に検討し、巨核球からマウス血管内に血小板前駆体が放出されている事を報告した。しかしながら、実際のマウス流血中に血小板前駆体が存在したとの報告は今まで殆ど認められておらず、また血小板前駆体がどのように成熟血小板へと分裂していく過程については、検討された報告がない。

今回我々はマウス全血中に存在するはずの血小板前駆体を同定・分離しその前駆細胞の分裂能・変形能について検討した。

II. 研究対象ならび方法

材料：8 週齢の C57BL マウス (オス, 日本クレア, 東京), 及び同系で EGFP 遺伝子を β アクチンプロモーターを用いて全身に発現させたマウスを用いた。

吸入麻酔下でマウスの心臓あるいは眼窩から EDTA あるいはクエン酸 Na を用いて、37°C に加温して全血採血を行い、採血直後、室温 30 分後と 1 時間後に遠心 ($\times 150g$, 10 分) を行い、血小板富血漿 (platelet rich plasma: PRP) 上層, 下層, 単核球層 (buffy coat: BC) に分注採取をし、血小板前駆体の分離を行った。

分離した EGFP 発現マウス由来の血小板富血漿を一体型蛍光顕微鏡 (BZ-X700, キーエンス, 東京) のステージ上で培養装置を用いて (INUG2, TOKAIHIT, 静岡), 培養し (37°C, 20%CO₂), ガラスボトム dish 内の血小板前駆体を経時的に撮影した。

また、分離した EGFP 発現マウス由来の血小板富血漿上層と単核球層を同系の C57/BL6 マウス (8 週齢オス) の尾静脈注射により輸血を行った。その後経時的に麻酔下で採血を行った。輸血したサンプル, 輸血後の採血した全血は、自動血球計算機 (poch-100iV Diff, Sysmex, 神戸) で血球数をカウントした。また Phycoerythrin (PE) ラベル CD61 (BD, 東京) で染色を行った後、フローサイトメトリー (FACScantoII, BD, 東京) を用いて、CD61 陽性 (血小板/血小板前駆体分画) を分離した。その後血小板/血小板前駆体中の EGFP 陽性細胞の割合を解析した。それから経時的な EGFP 陽性血小板/血小板前駆体の実数を計算し、輸血直後の血小板数を 100% として減少率を Turkey Kramer 法で求めた。

Ⅲ. 研究結果

1. 37°Cで加温したクエン酸 Na 採血を行うと、マウス全血中にも骨髓で産生された血小板前駆細胞は存在した。
2. 分離した紐状の血小板前駆体を採取し、蛍光顕微鏡下培養チェンバー内で前駆体を培養して経時的に撮影した。最初複数の粒状の連なりを認める proplatelet の形態をした血小板は (0h)、その後次第にバーベル型の形態へと変化し (4h58m)、しばらくは粒子間にごく細い細胞質でつながっていたが (4-6h)、最終的には分離し (8-9h)、血小板の形態となった。
3. EGFP マウスの全血を遠心し、PRP 上層と下層、BC の 3 層に分けた。PRP 上層・下層はともに通常の円形の小型血小板が多いが、BC には紐状の血小板前駆細胞の形態をした大型血小板が多く存在していた。
4. PRP 上層と BC の血小板をそれぞれ同系の C57BL6 マウスに輸血を行うと、PRP 分画輸血の場合は輸血直後にピークとなり、その後緩やかに減少を認めた。一方 BC 分画輸血の場合、輸血直後から血小板数の増加が認められ、6 時間後に最も血小板数が増加しその状態が 12 時間持続し、その後緩やかに減少が認められた。

Ⅳ. 結 語

今回我々は、クエン酸 Na 採血で 37°Cに維持したマウス全血中から血小板前駆体の同定をし、その前駆細胞を分離した。また EGFP 陽性マウスから分離した血小板前駆体を培養し、蛍光顕微鏡で経時的に撮影をすると、分裂・変形をするなどの変化が認められ、最終的に血小板に成熟するところが認められた。また、C57BL6 マウスに EGFP 陽性血小板前駆体を輸血する事で、マウスの生体内で前駆体が分裂し、血小板が増加する事がわかった。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 佐藤 洋一 (医学教育学講座)

副査 准教授 中村 豊 (内科学講座：呼吸器・アレルギー・膠原病内科分野)

副査 教授 佐藤 孝 (病理学講座：機能病態学分野)

骨髄の成熟巨核球は、静脈洞を貫通する紐状の細胞突起 (proplatelet) を形成し、その先端が分離して血小板が作られると考えられてきた (proplatelet theory). しかし、その形成過程について明確に証明されていたわけではない。著者らは、GFP マウスを用いた *in vivo* imaging で巨核球から血小板が生成される過程を観察したところ、細胞突起そのものが血小板前駆体として骨髄静脈洞に放出されていた。こうした前駆体は、抗凝固薬として EDTA を用いた場合は末梢血に殆ど認められなかったものの、クエン酸ソーダを使った場合は頻りに認められた。これらの血小板前駆体を培養下でタイムラプス観察したところ、紐状形態からバーベル状を経て、最終的には通常の楕円形の成熟血小板様に変化した。GFP マウス由来の血小板前駆体をワイルドタイプのマウスに静脈投与すると、6 時間後に血小板数は一過性に増え、以後漸減した。これらのことから、巨核球は紐状の血小板前駆体を骨髄静脈洞に放出し、それらが循環系において成熟型の血小板に徐々に変わっていくものと思われた。

血小板形成と成熟のプロセスに新知見を加えたものであり、学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

論文に言及していないことまで幅広く文献を渉猟し、論理的に研究を進める資質があると認められた。実験方法の妥当性に関する経験と智慧が備わることで、素晴らしい研究医になる可能性を持っており、学位に値する人物と考える。

参考論文

- 1) Bortezomib induces thrombocytopenia by the inhibition of proplatelet formation of megakaryocytes. (Bortezomib は巨核球の proplatelet 形成抑制によって、血小板減少を引き起こす) (村井一範, 他 6 人と共著)
European Journal Of Haematology. 2014 Oct;93(4):290-6 DOI: 10.1111/ejh.12342
- 2) Dose-adjustment of lenalidomide according to patient age and vulnerability is feasible in relapsed or refractory multiple myeloma: retrospective analysis of 20 cases (患者年齢や脆弱性に応じたレナリドマイドの用量調整は再発または難治性の多発性骨髄腫忍容性がある: 20 例の後方視的解析) (伊藤薫樹, 他 10 名と共著)
Open Journal of Hematology 5-9 DOI:10.13055/ojhmt_5_1_9.141027