

巨核球・血小板造血における spleen tyrosine kinase の役割

岡野良昭

岩手医科大学医学部, 内科学講座血液腫瘍内科分野

(Received on January 25, 2017 & Accepted on February 17, 2017)

要旨

既存の治療に反応しない不応性免疫性血小板減少症 (ITP) に, spleen tyrosine kinase (Syk) 阻害薬が有効であるとの報告がされた. Syk のノックアウトマウスでも血小板減少が認められることから, 巨核球・血小板造血における Syk の役割について, Syk 阻害薬を用いて検討した. Syk 阻害薬は NS-737 を用いた. NS-737 はマクロファージによる抗体依存性貪食を低濃度で強力に抑制した. 一方, 血小板造血については影響

を及ぼさなかった. 巨核球造血に関しては, 未熟あるいは比較的未熟な巨核球前駆細胞の増殖を抑制した. 巨核球の成熟には影響を及ぼさなかった. これらの結果から, Syk は巨核球造血, 特に未熟な巨核球前駆細胞の増殖に関与しており, ITP においては, Syk 阻害薬はマクロファージによる貪食作用の抑制に影響を及ぼさずかつ巨核球前駆細胞の増殖抑制をきたさない濃度で使用すれば最大効果をもたらすと考えられる.

Key words : Syk, megakaryocytopoiesis, thrombocytopoiesis

I. 緒 言

特発性免疫性血小板減少性紫斑病 (immune thrombocytopenia; ITP) は血小板に対する自己抗体が産生される自己免疫疾患である. オプソニン化血小板は脾臓で貪食され, さらには自己抗体によって巨核球・血小板造血は抑制され, 末梢血での血小板が減少すると考えられている¹⁾. 最近, プレドニン, 摘脾やトロンボポイエチン受容体作動薬 (thrombopoietin receptor agonist; TRA) 不応性 ITP に spleen tyrosine kinase (Syk) 阻害薬が有効であると報告された²⁾. Syk は非容体型チロシンキナーゼであり, 膜受容体直下に存在する免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) に特異的に結合す

る. マクロファージ Fc 受容体に, 抗血小板抗体がオプソニン化されている血小板が結合すると膜受容体が活性化され, Src family kinase によって ITAM がリン酸化され, リン酸化された ITAM がさらに Syk をリン酸化し, Syk の自己リン酸化も起こり, 最終的に G-タンパク質の活性化を引き起こし貪食が開始される³⁾.

NS-737 は Syk 阻害薬であり, Syk に対する IC50 は 65 nM と報告されている. 開発元日本新薬によると, 血小板減少性 SLE モデルマウスに NS-737 を投与 (25 mg/kg) すると血小板数回復が認められるものの高容量 (> 50 mg/kg) では, その回復の程度が減少することが判明した. 近年, Syk は血小板にも発現しており, 血小板凝集能に深く関与していると報告されている⁴⁾. そこで, 我々は, Syk 阻害薬がマクロファージによる貪食機能を阻害すること,

Corresponding author: Yoshiaki Okano
okanoys@gmail.com

さらには巨核球・血小板造血にも関与するかもしれない点について検討した。将来、従来の治療薬に不応性 ITP に Syk 阻害薬が臨床で使用できるとすると、これらの検討が非常に大切になると考えられる。

II. 方法・材料

全ての実験の材料として、C57BL6 マウス（日本クレア，東京），あるいは GFP マウス⁵⁾ の骨髓細胞，腹腔マクロファージを用いた。マウス骨髓細胞は，フローセン麻酔下で大腿骨から採取した。抗マウス血小板抗体は家兎にマウス血小板を免疫して作成した⁶⁾。NS-737 は日本新薬（京都）から提供された。他の全ての試薬は分析級試薬を用いた。

1. NS-737 のマクロファージ貪食能に及ぼす影響

Thioglycollate の方法⁷⁾にて採取したマウス腹腔マクロファージを2回，phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後，10% FCS (GIBCO by Life Technology, Grand Island, NY, USA) RPMI 1640 (Life Technologies; Grand Island, NY, USA) に加え 35 mm ガラスボトムディッシュ (Iwaki, glass base dish, 東京) にまく (2.5×10^6 /dish)。overnight 37°C で incubate した後 (マクロファージ浮遊液)，10% FCS RPMI 1640 で洗浄し接着細胞のみ残した。GFP マウス血小板浮遊液に抗血小板抗体を 20 μ l 加え，30 分間 37°C で incubate した (血小板浮遊液浮)。血小板浮遊液 1.0 ml に pH インジケーター蛍光色素 (pHrodo[®] サーモフィッシャーサイエンス，東京) を加えた (最終濃度 5 nM)。100 μ l の血小板浮遊液 (最終濃度: 2.4×10^6 / μ l) をガラスボトムディッシュに加えて貪食を開始した。蛍光顕微鏡下で 5% CO₂，37°C のサーキュレータを回しながら，経時的に 10 の異なる画面をキャプチャーした。血小板は GFP を発現しているため，緑色の蛍光を，貪食された血小板はライソゾーム中 (pH は酸

性) に移行するので，pH インジケーター蛍光色素により赤い蛍光を発する。貪食インデックスは以下のように求めた。貪食インデックス = 赤い蛍光の血小板の数 / マクロファージの数として求め，10 画面の平均値を算出した。

2. NS-737 の血小板造血に及ぼす影響

a. NS-737 巨核球胞体突起形成に及ぼす影響
ddY マウス大腿骨から骨髓細胞を 5% BSA CATCH medium (phosphate-buffered saline, 13.6 mM trisodium citrate, 1.0 mM theophylline, 1.0 mM adenosine, 2.2 M prostaglandin E1, and 11.0 mM glucose, pH 7.4, adjusted to 290 mOsmol) 中に抽出した (骨髓液)。45% Percoll (Sigma-Aldorich, St Louis, MO, USA) のうえに重層した 20% Percoll 上に骨髓液を重層し，400g 20 分間遠心した。45% と 20% と間の細胞を吸い上げ，1% BSA (Sigma-Aldorich) IMDM (GIBCO by Life Technologies) で洗浄した。1% BSA IMDM 1 ml に再浮遊させ，BSA 勾配法 (1% / 2% / 3% / 4% / 20% BSA) で巨核球を部分精製した⁸⁾。1% Insulin- Transferin-Selenium (ITS, GIBCO by Life Technologies) /IMDM で 2 回洗浄した巨核球 300 個を 96 穴マイクロプレートにまき，NS-737 を 0, 1, 10, 100, 1000 nM となるように加えて，5% CO₂，20% O₂ で 37°C，24 時間培養した。胞体突起形成を伴う巨核球を生存している全巨核球数で割って，% を算出し胞体突起形率とした⁸⁾。

3. NS-737 の巨核球造血に及ぼす影響

a. NS-737 の巨核球コロニー形成に及ぼす影響
マウス骨髓細胞を上記の方法で採取し 3.2×10^5 を MegaCult-C medium (1.7 ml/tube) (ベリタス，東京) の tube に加え，マウスインターロイキン 3 (最終濃度 10 ng/ml) (WAKO, 東京)，ヒトインターロイキン 6 (最終濃度 20 ng/ml) (ベリタス，東京)，トロンボポイエチン (最終濃度 50 ng/ml) (協和発酵キリン，東京) を刺激因子として，NS-737 を 0, 1, 10, 100,

1000 nM となるように加え総量が 2 ml になるようにした。さらに, collagen solution (ベリタス, 東京) を 1.2 ml 加えたのち, vortex でよく混合し, double slide chamber slide に 0.75 ml ずつまいて, 5% CO₂, 20% O₂ で 37°C, 7 日間培養した。

培養後ポリプロピレンメンブレンを上層し, 4°C アセトンで固定したのち, アセチルコリンエステラーゼ染色⁹⁾を施工し, 生成されたコロニーを構成細胞数によって, 小(3~20細胞), 中(21~50細胞), 大(51細胞~)としてカウントした。

b. NS-737 の巨核球プロイディに及ぼす影響

マウス骨髄細胞を上記の方法で採取した。10% FCS IMDM で最終細胞濃度が 1×10^5 /ml になるように, マウスインターロイキン 3 (10 ng/ml), ヒトインターロイキン 6 (20 ng/ml), ヒトトロンボポイエチン (50 ng/ml) を刺激因子として, さらに NS-737 を 0, 1, 10, 100, 1000 nM となるように加え, 5% CO₂, 20% O₂ で 37°C, 7 日間液体培養した。培養後 5% BSA CATCH medium で 2 回洗浄したのち, FITC ラベル抗マウス CD41 抗体 (BD Pharmingen, 東京) を加え 30 分間インキュベーションした。コントロールとして FITC ラベルラット IgG (BD Pharmingen) を用いた。PBS で 2 回洗浄後, 冷 100% エタノールを加え -20°C 30 分インキュベーションしたのち, Propidium Iodide (Sigma-Aldorich), RNase (Sigma-Aldorich) を加えフローサイトメトリーのサンプルとした¹⁰⁾。CD41 陽性細胞群にゲートをかけて DNA 解析をした。

III. 結 果

1. NS-737 によるマウスマクロファージ貪食能に及ぼす影響 (図 1)

NS-737 を 0 nM, 10 nM, 100 nM で添加し 0, 30, 60, 90, 120 分で phagocytic index (PI) を検討した。図 1 に示すように, 100 nM ($p <$

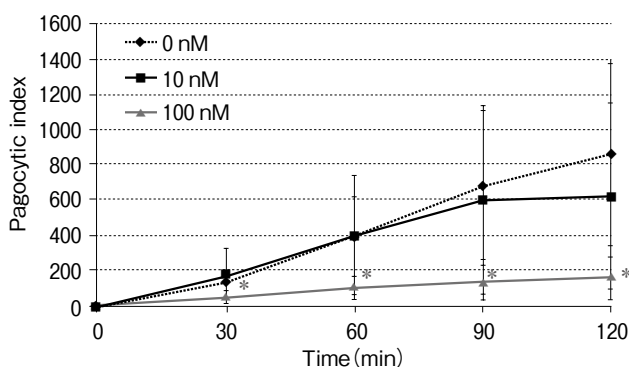


図 1. 貪食インデックス
コントロールと比較して 10 nM では有意差はないものの低下した。100 nM で有意な低下を認めた。* $p < 0.05$

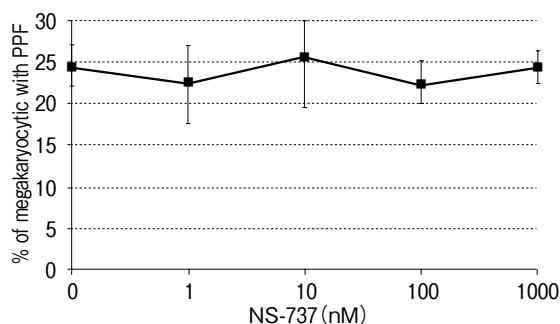


図 2. 胞体突起形成巨核球比率
NS-737 の濃度 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM において胞体突起形成巨核球比率は変化しなかった。

0.05) で各時間の PI は有意に低下した。この結果は NS-737 (Syk 阻害薬) が, オプソニン化された血小板のマクロファージによる貪食を阻害することを示している。

2. NS-737 の血小板造血に及ぼす影響

a. NS-737 の巨核球胞体突起形に及ぼす影響 (図 2)

胞体突起形成能 (%) は, NSN-737 濃度を変えても有意な変化を認めなかった。この結果は NSN-737 が血小板造血に影響を及ぼさないことを示している。

3. NS-737 の巨核球造血に及ぼす影響

a. NS-737 の巨核球コロニー形成に及ぼす影響 (図 3, 4)

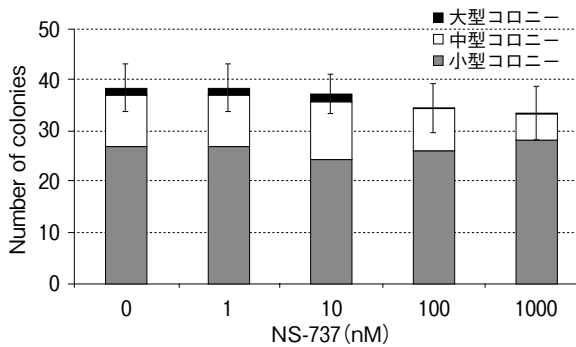


図3. 巨核球コロニー形成

NS-737 の濃度 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM において巨核球コロニー総数は変化しなかったが, 中型, 大型コロニー数は有意差を認めないものの低下した。

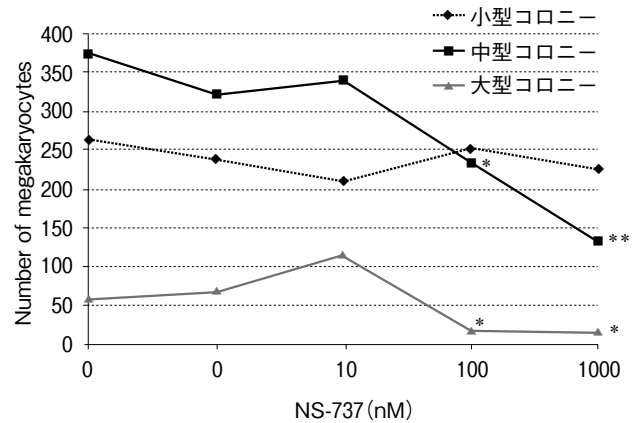


図4. 巨核球数

NS-737 の濃度 100 nM, 1000 nM において中型, 大型コロニーを構成する巨核球数は有意に低下した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

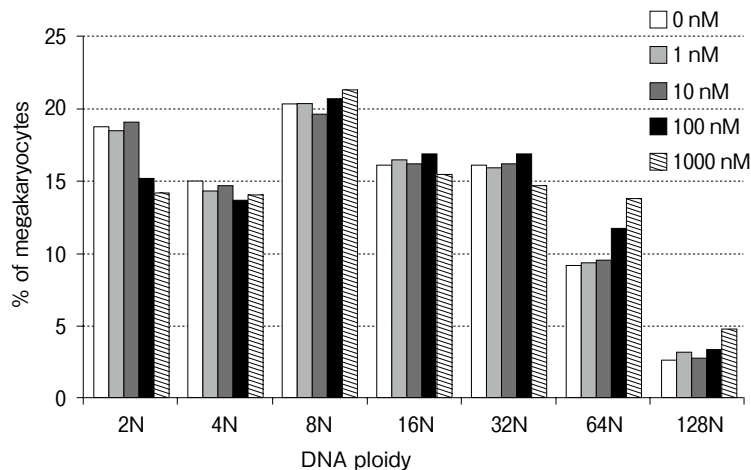


図5. 巨核球多倍体化

2回しか測定していないので有意差検定で不能であるが, NS-737 の濃度 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM において巨核球多倍体化は変化しなかった。

マウス骨髄細胞を培養して形成されるコロニーを細胞数によって小, 中, 大コロニーに分類した. 小コロニーは成熟した巨核球前駆細胞を示しており, 大コロニーは未熟な巨核球前駆細胞を示している¹¹⁾. NSN-737 添加で総コロニー数は有意な増減を認めなかった. 中, 大コロニー数は, 有意差を認めないものの, 低下する傾向であった (図3). しかしながら, コロニーを構成する細胞数で見たところ, 中, 大コロニーを構成する細胞数は 100, 1000 nM で

有意に減少していた (図4). これらの結果は, NSN-737 (Syk 阻害薬) は未熟あるいは比較的未熟な巨核球前駆細胞に何らかの増殖抑制を与えていると示唆された。

b. NS-737 の巨核球プロイディに及ぼす影響 (図5)

巨核球/血小板系は他の血液細胞と異なり, 巨核芽球に成熟すると細胞分裂は起こらず, DNA は多倍体化する (エンドマイトosis). DNA プロイディを測定することで巨核球の成

熟の程度を評価できる。NSN-737 を添加して培養したところ、DNA プロイディ変化を認めなかった。わずか2回の測定なので、有意差の検定はできていない。図5に代表的な例を示す。

VI. 考 察

今回、我々はマクロファージ貪食阻害を示す Syk 阻害薬 NS-737 が巨核球造血、血小板造血に及ぼす影響を検討した。図1に示すように、NS-737 は強力な Syk 阻害薬で、マクロファージによる貪食能を低濃度で強力に阻害した。そこで、巨核球・血小板造血に焦点を当て検討した。血小板造血の指標として、巨核球の胞体突起形成能を評価した。巨核球から血小板が産生する過程で、巨核球は胞体突起を伸ばし、そこから成熟血小板が産生される。血小板産生が低下した場合は、胞体突起を伸ばす巨核球の割合が減少することとなる。今回の結果では NS-737 はその割合を変化させなかったことから、NS-737 は血小板産生に関与しないものと考えられる。巨核球造血の指標として、巨核球コロニー形成能とそれらのコロニーを構成する細胞数とを検討した。NS-737 添加でコロニー数には有意な変化ではないものの、中、大コロニーの減少を認めた。また中、大コロニーを構成する細胞数の有意な低下も認めたことから、NS-737 は未熟あるいは比較的未熟な巨核球前駆細胞に何らかの増殖抑制を引き起こすものと考えられた。巨核球の成熟についても巨核球プロイディを測定することで評価したが、NS-737 添加で変化を認めなかったことから、NS-737 は巨核球の成熟には関与していないと思われた。Syk のノックアウトマウスでは、血小板凝集能

の低下が認められ、凝集能には Syk が不可欠だと報告されている⁴⁾。この論文では、血小板数にも言及しており、ワイルドタイプに比較して、ノックアウトマウスは、血小板数が25%程度低下することも報告されている⁴⁾。しかし、この機序として、ノックアウトマウスでは、血管とリンパ管との癒合が体のいろんな部分で起きているので、その結果、血小板減少を生じると記載されている。しかしながら、今回のこの研究で行われている詳細な検討はされていないので、血小板減少の機序については我々の結果によって起きている可能性も高いと考えられる。

Syk 阻害薬が ITP に使用されるとすると、ITP の病態では自己抗体によって巨核球造血や血小板造血が抑制されていることも明らかにされているので、マクロファージ貪食作用を阻害する濃度で、かつ巨核球前駆細胞の増殖を抑制しない濃度で使用すればより高い効果が望まれる。

結論として、Syk は血小板造血ではなく巨核球造血に関わっていることが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、本研究の機会をお与えくださり心暖かいご指導をいただきました。岩手医科大学医学部血液腫瘍内科分野石田陽治教授に深謝いたします。

利益相反：著者には開示すべき利益相反はない。

References

- 1) **Kashiwagi H** and **Tomiya Y**: Pathophysiology and management of primary immune thrombocytopenia. *Int J Hematol* **98**, 24-33, 2013.
- 2) **Podolanczuk A**, **Lazarus AH**, **Crow AR**, et al.: Of mice and men: an open-label pilot study for treatment of immune thrombocytopenic purpura by an inhibitor of Syk. *Blood* **113**, 3154-3160, 2009.
- 3) **Mócsai A**, **Ruland J** and **Tybulewicz VLJ**: The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunology* **10**, 387-402, 2010.
- 4) **Hughes CE**, **Finney BA**, **Koentgen F**, et al.: The N-terminal SH2 domain of Syk is required for (hem) ITAM, but not integrin, signaling in mouse platelets. *Blood* **125**, 144-54, 2015.
- 5) **Okabe M**, **Ikawa M**, **Kominami K**, et al.: 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407**, 313-319, 1997.
- 6) **Levin J**, **Levin FC** and **Metcalf D**: The effects of acute thrombocytopenia on megakaryocyte-CFC and granulocyte-macrophage-CFC in mice: studies of bone marrow and spleen. *Blood* **56**, 274-283, 1980.
- 7) **Gardi C** and **Lungarella G**: Purification and partial characterization of elastase activity from rat alveolar and peritoneal macrophages. *Arch Biochem Biophys* **259**, 98-104, 1987.
- 8) **Ito T**, **Ishida Y**, **Kashiwagi R**, et al.: Recombinant human c-Mpl ligand is not a direct stimulator of proplatelet formation in mature human megakaryocytes. *Br J Haematol* **94**, 387-390, 1996.
- 9) **Karnovsky MJ** and **Roots L**: A 'direct-coloring' thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem* **12**, 219-221, 1964.
- 10) **Jackson CW**, **Brown KL**, **Somerville BC**, et al.: Two-color flow cytometric measurement of DNA distributions of rat megakaryocytes in unfixed unfractionated marrow cell suspensions. *Blood* **63**, 768-778, 1984.
- 11) **Kuriya S**, **Ogata K**, **Yamada T**, et al.: Three stages of differentiation in mouse megakaryocyte progenitor cells (CFU-Meg). *Exp Hematol* **18**, 416-420, 1990.

The role of spleen tyrosine kinase in megakaryocytopoiesis and thrombocytopoiesis

Yoshiaki OKANO

Department of Hematology and Oncology, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

(Received on January 25, 2017 & Accepted on February 17, 2017)

Abstract

Spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor is reported to be effective in resistant patients with immune thrombocytopenia to the standard therapies. Another report revealed that thrombocytopenia was observed in Syk knockout mice. Therefore, the role of Syk was investigated in megakaryocytopoiesis and thrombocytopoiesis. NS-737 was used as a Syk inhibitor. NS-737 inhibited the antibody-dependent phagocytosis of murine macrophages in vitro at a low concentration. No effects of NS-

737 were observed in thrombocytopoiesis in vitro. Although no effects of NS-737 were observed in the maturation of megakaryocytes, NS-737 inhibited the proliferation of immature megakaryocytic progenitors. These results suggested that Syk inhibitor provides the greatest efficacy at the concentration with the greatest effect on macrophage phagocytosis, and little effect on the inhibition of proliferation of megakaryocytic progenitors in ITP.
