

論文内容の要旨

巨核球・血小板造血における Spleen tyrosine kinase の役割
(岡野良昭)
(岩手医学雑誌 69 巻, 5 号 平成 29 年 12 月掲載)

I. 研究目的

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。最近, プレドニン, 摘脾, トロンボポイエチン容体作動薬 (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。Syk がマクロファージの貪食機能発現, 血小板凝集, さらに軽度の血小板減少に関与していることは報告されているが, 巨核球, 血小板造血に関して検討した報告はない。本研究は Syk 阻害薬のマクロファージ貪食, 巨核球造血, 血小板造血に与える影響についてマウスを用いて検討した。

II. 研究対象ならび方法

C57BL/6マウスあるいはgreen fluorescence protein 発現マウス (GFPマウス) の骨髄細胞, 腹腔マクロファージを用いた。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。Syk阻害剤として日本新薬から提供されたNS-737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の方法にて採取したマウス腹腔マクロファージを用いて, 抗マウス血小板抗体の結合したGFPマウスの血小板がマクロファージに貪食される様子を, pHインジケーター蛍光色素を用いることにより, 観察し, マクロファージの貪食インデックスを求めた。

(2) NS-737の血小板造血に及ぼす影響: C57BL/6マウス大腿骨から骨髄細胞を採取, 部分精製した巨核球300個を96マイクロプレートにまき, NS-737を0, 1, 10, 100, 1000nMとなるように加えて5%CO₂, 37°Cで24時間培養後に胞体突起形成率を求めた。胞体突起形成率は胞体突起形成を伴う巨核球比率 (%) とした。

(3) NS-737の巨核球造血に及ぼす影響: C57BL/6マウス大腿骨から骨髄細胞を採取し MegaCult法にて巨核球コロニーを形成させた。刺激因子としてマウスインターロイキン3, ヒトインターロイキン6, トロンボポイエチンを用いた。NS-737を0, 1, 10, 100, 1000nMとなるように加え5%CO₂, 37°Cで7日間培養した。アセチルコリンエステラーゼ染色しコロニー数を算出した。構成細胞数によって小(3~20細胞), 中(21~50細胞), 大(51細胞~)コロニーとした。また, コロニーを構成する巨核球数もカウントした。

(4) NS-737の巨核球多倍体に及ぼす影響: C57BL/6マウス大腿骨から骨髄細胞を採取し10% FCS下で上記の刺激因子を, さらにNS-737を0, 1, 10, 100, 1000nMとなるように加

え5%CO₂, 37°Cで7日間液体培養した. FITCラベル抗マウスCD41抗体とpropidium iodideを加え2color フローサイトメトリー解析を行って, ploidy分布を求めた.

III. 研究結果

(1) NS-737 のマクロファージ貪食能に及ぼす影響: マクロファージによる貪食は NS-737 100nM で有意に抑制された ($P < 0.05$). NS-737 は 100nM でマクロファージによる血小板貪食を強力に抑制した.

(2) NS-737 の血小板造血に及ぼす影響: 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. NSN-737 は血小板造血に影響を及ぼさなかった.

(3) NS-737 の巨核球造血に及ぼす影響: NS-737 添加によりコロニー形成能は抑制されなかったが, 中, 大コロニーを形成する巨核球数は 100nM, 1000nM で有意に減少した. このことから NS-737 は未熟あるいは比較的未熟な巨核球前駆細胞の増殖を抑制していることが示唆された.

(4) NSN-737 の巨核球多倍体に及ぼす影響: NSN-737 は巨核球多倍体化に影響を及ぼさなかった.

IV. 結 語

Syk 阻害薬である NS-737 は, 高濃度で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. 一方, 低濃度で強力にマクロファージによる貪食を抑制した. ITP の治療薬として使用する場合は, マクロファージの貪食抑制作用が最大となり, 巨核球前駆細胞の増殖抑制作用が最小となる最適な濃度を使うことが重要と考えられた.

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 佐藤 孝 (病理学講座：機能病態学分野)
副査 教授 人見 次郎 (解剖学講座：人体発生学分野)
副査 准教授 遠藤 幹也 (小児科学講座)

特発性免疫性血小板減少性紫斑病 (Immune thrombocytopenia; ITP) では、自己免疫により抗血小板抗体が産生され、オプソニン化血小板が脾臓で貪食されることがその病態に深く関わっている。ITP 治療における Spleen tyrosine kinase (Syk) 阻害薬の有効性が近年明らかにされているが、本研究では、マウスを用いて、マクロファージの貪食活性および巨核球造血に着目して Syk 阻害薬の作用機序について解析を行った。Syk 阻害薬は低濃度でマクロファージのオプソニン化血小板貪食能を抑制し血小板の増加に関係することを明らかにした。一方、Syk 阻害薬は血小板造血に関わる巨核球胞体突起形成には影響を及ぼさないものの、高濃度で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することを示した。Syk 阻害薬を用いた ITP 治療では、マクロファージ貪食作用抑制に加えて、巨核球造血抑制を考慮した至適投与濃度の検討の重要性を示しており、学位に値する研究論文である。

試験・試問結果の要旨

巨核球の形態、血小板造血の機序に加えて、ITP の病態、実験手技、手法について試問をおこな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られる。また、学位論文の作成にあたり、剽窃・盗作等の研究不正の無いことも確認した。

参考論文

- 1) 造血器腫瘍における画像診断の役割：画像診断に何を求めるか(藤島行輝 他 2名と共著)
臨床画像 32 巻, 10 号 (2016) : p1060-1069.
- 2) 貧血の病理・病態と発症機序 赤血球の動態と貧血発症機序(外川 亮 他 1名と共著)
日本臨床 75 巻, 増刊 1 (2017) : p45-50.