

氏名(本籍)	なが ひさ ひろ し 長久博志(山口県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第1,737号		
学位授与年月日	平成9年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	Bone marrow stromal cells produce thrombopoietin and stimulate megakaryocyte growth and maturation but suppress proplatelet formation (骨髄間質細胞のトロンボポエチン産生と間質細胞による巨核球成熟促進および巨核球の Proplatelet 形成抑制について)		
主査	筑波大学教授	医学博士	深尾立
副査	筑波大学教授	医学博士	小山哲夫
副査	筑波大学教授	医学博士	中内啓光
副査	筑波大学客員教授 (山之内製薬株式会社)	薬学博士	増保安彦
副査	筑波大学助教授	医学博士	戸村成男

論文の内容の要旨

(目的)

血小板の分化の段階は、造血細胞に由来した巨核球前駆細胞が増殖分化して巨核芽球になり、多核化と細胞質が成熟して成熟巨核球になり、巨核球の分解、あるいは胞体突起形成を起こして血小板となる。これらの段階に種々の液性因子が関与するが、中でも巨核球産生を制御するサイトカインレセプターの Mpl のリガンドであるトロンボポエチン (thrombopoietin : TPO) は最も強力な血小板増加因子として知られ、造血幹細胞、巨核球前駆細胞からの巨核球コロニー形成、未熟巨核球の成熟促進、血小板機能亢進作用などを持つ。

候補者らの研究グループでは、骨髄造血微小環境には、巨核球が成熟した状態で保持されていて、血小板減少に即時に対応する機構が存在していると想定して一連の研究を進めてきているが、本研究では、骨髄微小環境において巨核球成熟分化に間質 (ストローマ) 細胞と TPO がいかにかかわっているか検討した。

(方法と結果)

1. Mpl の細胞性遺伝子 c-mpl を IL-3 依存性マウス細胞株 (BaF 3) に導入し、TPO 依存性細胞株 (BaF 3/mpl) を作った。

BaF 3/mpl をマウス骨髄ストローマ細胞株 (PA 6) の細胞シート上にて重層培養すると、BaF 3/mpl は IL-3 非存在下でも 1 ヶ月以上増殖能を維持した。しかし、BaF 3 単独重層培養では 2 日後に死滅した。

2. PA 6 細胞の m-RNA レベルにおける TPO の発現を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法にて調べた。その結果、PA 6 細胞に TPO が発現していることを確認した。定量的 PCR 法にてマウスの全骨髄細胞、骨髄ストローマ細胞、肝臓および肝臓の TPO の発現を測定したところ、いずれの組織、細胞でも TPO が発現しているが、骨髄では肝臓のおよそ 1/5 量であった。量的には少ないものの骨髄ストローマ細胞が TPO を産生していることが示唆された。

3. TPO と骨髄ストローマ細胞の巨核球造血や血小板放出における役割を検討する目的で、マウス骨髄細胞を

TPO 添加培養液にて培養すると巨核球造血が起きた。誘導された巨核球は成熟し、一部は胞体突起形成巨核球にまで成熟した。

4. 成熟巨核球とストローマ細胞の相互作用を検討する目的で、成熟巨核球を骨髓細胞より精製し、PA 6 細胞シート上にて重層培養した。

PA 6 細胞と接着した成熟巨核球は、接着していない成熟巨核球に比較して、胞体突起形成する割合が低下していた。以上の結果は、ストローマ細胞に接着している巨核球では胞体突起形成が抑制されていることを示唆している。

5. 上記実験系に TPO を添加しても胞体突起形成率に変化はなかった。したがって、TPO は巨核球を胞体突起形成可能な巨核球にまで成熟させるが、胞体突起形成には直接影響を与えないものと考えられた。

(考察)

骨髓造血微小環境においては、ストローマ細胞が微量ではあるが恒常的に TPO を産生し、巨核球前駆細胞はストローマ細胞と近接して存在することにより維持され、巨核球の増殖と成熟が行なわれていると考えられる。一方、巨核球がストローマ細胞に接着している限り胞体突起形成は抑制されており、胞体突起形成という血小板分化の最終段階には巨核球がストローマ細胞から離れる必要があるものと推測された。ストローマ細胞から離れた巨核球が胞体突起形成を行なうためになんらかの因子が必要であるのか否かは今後の検討が必要である。

なお、*in vivo* では TPO 投与により巨核球数増加と血小板数増加をきたすことから、TPO が胞体突起形成を促進すると考えられていたが、TPO は成熟巨核球の胞体突起形成を促進させないことが明らかとなり、骨髓微小環境にあっては、TPO の作用は巨核球数の増加と巨核球前駆細胞を胞体突起形成可能な巨核球にまで成熟させるものであると推察された。

審査の結果の要旨

本研究は、血小板研究領域のトピックスである。TPO に関し、骨髓微小環境における骨髓ストローマ細胞と巨核球の相互作用と TPO の役割を詳細に検討したものである。

その結果、①巨核球前駆細胞は骨髓ストローマ細胞に接触していることにより維持され成熟すること、②その成熟には骨髓ストローマ細胞が産生する微量な TPO が関与している可能性があること、③しかし血小板生成の最終段階である成熟巨核球の胞体突起形成には TPO は関与せず、④巨核細胞が骨髓ストローマ細胞に接触していると、かえって胞体突起形成が抑制される、などの新知見が得られた。

対照群の取り方、骨髓ストローマ細胞のモデルとして PA 6 細胞以外は検討していない点、培養液に含まれる TPO 以外の因子の影響は検討していない点などにやや難点があることが指摘された。

しかし、本研究は最新の実験技術を駆使して行われ、この実験条件における限り得られた結果は明解である。ここで得られた新知見は血小板分化の機序解明に大きく寄与するものとして評価できる。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。