
血小板産生の調節に関する基礎的ならびに臨床的研究

<研究課題番号> 05454335

平成6年度科学研究費補助金（一般研究B）

研究成果報告書



平成7年3月

研究代表者 溝口秀昭
(東京女子医科大学医学部教授)

課題番号 0 5 4 5 4 3 3 5

研究課題 血小板産生の調節に関する基礎的ならびに臨床的研究

研究組織 研究代表者 溝口秀昭 (東京女子医科大学医学部教授)

研究分担者 寺村正尚 (東京女子医科大学医学部講師)

森 直樹 (東京女子医科大学医学部助手)

研究経費 平成5年度 4,600千円

平成6年度 2,100千円

計 6,700千円

研究発表

I. 学会誌等

1. Kobayashi S, Teramura M, Sugawara I, Oshimi K, Mizoguchi H:
Interleukin 11 acts as an autocrine growth factor for human megakaryoblastic cell line. *Blood* 81:889-893, 1993
2. 寺村正尚、齊藤博、小林祥子、星野茂、押味和夫、溝口秀昭：再生不良性貧血の免疫抑制療法とそのメカニズム。 *臨床血液* 34:273-276, 1993
3. Akahoshi M, Oshimi K, Mizoguchi H: Autophagolysosomes exhibiting lysosomophagy in the granular lymphocyte-proliferative disorders. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 63:99-105, 1993
4. Yamada O, Oshimi K, Mizoguchi H: Telomere reduction in hematologic cell. *Int J Hematol* 57:181-186, 1993
5. Takanashi M, Motoji T, Masuda M, Oshimi K, Mizoguchi H: The effects of leukemia inhibitory factor and interleukin 6 on the growth of acute myeloid leukemia cells. *Leukemia Res* 17:217-222, 1993
6. Kaneko T, Fusauchi Y, Kakui Y, Masuda M, Akahoshi M, Teramura M, Motoji T, Okumura K, Mizoguchi H, Oshimi K: A bispecific antibody

enhances cytokine-induced killer-mediated cytotoxicity of autologous acute myeloid leukemia cells. *Blood* 81:1333-1341, 1993

7. Kobayashi S, Teramura M, Hoshino S, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H : Circulating megakaryocyte progenitors in myeloproliferative disorders are hypersensitive to interleukin-3. *Br J Haematol* 83:539-544, 1993

8. Toyama K, Ohyashiki K, Yoshida Y, Abe T, Asano S, Hirai H, Hirashima K, Hotta H, Kuramoto A, Kuriya S, Miyazaki T, Kakishita E, Mizoguchi H, Okada M, Shirakawa S, Takaku F, Tomonaga M, Uchino H, Yasunaga K, Nomura T: Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: A multicentric study in Japan. *Leukemia* 7:499-508, 1993

9. Oshimi K, Yamada O, Kaneko T, Nishinarita S, Iizuka Y, Urabe A, Inamori T, Asano S, Takahashi S, Hattori M, Naohara T, Ohira Y, Togawa A, Masuda Y, Okubo Y, Furusawa S, Sakamoto S, Omine M, Mori M, Tatsumi E, Mizoguchi H: Laboratory findings and clinical courses of 33 patients with granular lymphocyte-proliferative disorders. *Leukemia* 7:782-788, 1993

10. Arai Y, Motoji T, Masuda M, Oshimi K, Tsuruo T, Mizoguchi H: Detection of a multidrug resistance associated P-glycoprotein on blast

cells of acute myeloblastic leukemia. (Miyazaki T ed). The Mechanism and New Approach on Drug Resistance of Cancer Cells 1993 p3-11

11. Toyama K, Ohbayashi K, Yoshida Y, Abe T, Asano S, Hirai H, Hirashima K, Hotta T, Kuramota A, Kuriya S, Miyazaki T, Kakishita E, Mizoguchi H, Mori M, Shirakawa S, Uchida H, Urabe A, Yasunaga K, Nomura T: Clinical and cytogenetic findings of myelodysplastic syndromes showing hypocellular bone marrow or minimal dysplasia, in comparson with typical myelodysplastic syndromes. Int J Hematol 58: 53-61, 1993
12. Shiseki M, Nishikawa R, Yamamoto H, Ochiai A, Sugimura H, Shitara N, Sameshima Y, Mizoguchi H, Sugiura T, Yokota J: Germ-line p53 mutation is uncommon in patients with triple primary cancers. Cancer Letters 73:51-57, 1993
13. 浦部晶夫、溝口秀昭、高久史麿、宮崎保、谷内昭、新津洋司郎、三浦恭定、武藤良知、藤岡成徳、野村武夫、外山圭助、川戸正文、黒川清、矢崎義雄、小野澤康輔、戸川敦、森真由美、榎本英壽、小川一誠、池田康夫、大島年照、青木功、塩谷茂、有森茂、千葉省三、小峰光博、齊藤英彦、大野竜三、小寺良尚、平林憲之、中川雅夫、春日雅人、仁保喜之、江頭澄哉、高月清、荒木弘一：遺伝子組換えヒトエリスロポエチンの多発性骨髓腫に伴う貧血に対する第II相臨床試験。臨床血液 34:919-927、1993

14. 浦部晶夫、溝口秀昭、高久史麿、宮崎保、谷内昭、新津洋司郎、三浦恭定、武藤良知、藤岡成徳、野村武夫、外山圭助、川戸正文、黒川清、矢崎義雄、小野澤康輔、戸川敦、森真由美、榎本英壽、小川一誠、池田康夫、大島年照、青木功、塩谷茂、有森茂、千葉省三、小峰光博、齊藤英彦、大野竜三、小寺良尚、平林憲之、中川雅夫、春日雅人、仁保喜之、江頭澄哉、高月清、荒木弘一：遺伝子組換えヒトエリスロポエチンの骨髓異形成症候群に伴う貧血に対する第II相臨床試験。臨床血液 34:928-936、1993
15. 浦部晶夫、溝口秀昭、高久史麿、宮崎保、谷内昭、新津洋司郎、三浦恭定、武藤良知、藤岡成徳、野村武夫、外山圭助、川戸正文、黒川清、矢崎義雄、小野澤康輔、戸川敦、森真由美、榎本英壽、小川一誠、池田康夫、大島年照、青木功、塩谷茂、有森茂、千葉省三、小峰光博、齊藤英彦、大野竜三、小寺良尚、平林憲之、中川雅夫、春日雅人、仁保喜之、江頭澄哉、高月清、荒木弘一：遺伝子組換えヒトエリスロポエチンの再生不良性貧血に対する効果－第二相臨床試験－。臨床血液 34:1002-1010、1993
16. Masuda M, Arai Y, Osawa M, Kaneko T, Aoyama M, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H: Heterogeneity of CD7⁺4⁻8⁻1⁻ Leukemia: Usefulness of cytoplasmic antigen detection for subclassification. Leukemia 7:1759-1765, 1993
17. Ohno R, Yoshida H, Fukutani H, Naoe T, Ohshima T, Kyo T, Endo N, Fujimoto T, Kobayashi T, Hiraoka A, Mizoguchi H, Kodera A, Suzuki H, Hirano M, Akiyama H, Aoki N, Shindo H, Yokomaku S, & the Leukaemia

Study Group of the Ministry of Health and Welfare: Multi-institutional study of all-trans-retinoic acid as a differentiation therapy of refractory acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 7:1722-1727, 1993

18. Azuma E, Kitagawa S, Yuo A, Mizoguchi H, Umezawa K, Takaku F, Saito M: Activation of the respiratory burst and tyrosine phosphorylation of proteins in human neutrophils: no direct relationship and involvement of protein kinase C-dependent and -independent signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta* 1179:213-223, 1993

19. 北村聖、浅野茂隆、溝口秀昭、高久史麿 (GFS39-300研究会造血障害部) : 再生不良性貧血および骨髓異形成症候群に対するGM-CSFの臨床的検討。臨床血液 34:1540-1549、1993

20. Wada M, Bartram CR, Nakamura H, Hachiya M, Chen DL, Borenstein J, Miller CW, Ludwig L, Hansen-Hagge TE, Ludwig WD, Reiter A, Mizoguchi H, Koeffler P: Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood* 82:3163-3169, 1993

21. 吾妻英里子、北川誠一、湯尾明、溝口秀昭、高久史麿、斎藤政樹 : ヒト好中球機能とチロシンリン酸化。炎症 14:199-204、1994

22. 福田淳子、吉原俊雄、新井ゆかり、金子多香子、森茂郎、青山雅、増田道彦、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：鼻腔原発のNK細胞リンパ腫の1例。臨床血液 35:588-592、1994
23. Kaneko T, Fukuda J, Teramura M, Fusauchi Y, Kakui Y, Okumura K, Mizoguchi H, Oshimi K: Combination of interleukin-2-stimulated lymphocytes and dispecific antibodies that efficiently lyse leukemic cells dose not affect bone marrow CD34-positive stem cell function in vitro. Bone Marrow Transplantation 14:213-217, 1994
24. Kaneko T, Fusauchi Y, Kakui Y, Okumura K, Mizoguchi H, Oshimi K: Cytotoxicity of cytokine-induced killer cells coated with bispecific antibody against acute myeloid leukemia cells. Leukemia and Lymphoma 14:219-229, 1994
25. Kobayashi S, Teramura M, Oshimi K, Mizoguchi H: Interleukin-11. Leukemia and Lymphoma 15:45-49, 1994
26. Takemori N, Hirai K, Onodera R, Saito N, Namiki M, Aoyama M, Mizoguchi H: Parallel tubular granules in human immature neutrophils -an electron microscopic study. Leukemia and Lymphoma 15:177-186, 1994
27. Hiraoka A, Massaoka T, Mizoguchi H, Asano S, Koderu Y, Kitamura K,

Takaku F, Komemushi S: Recombinant human non-glycosylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in allogeneic bone marrow transplantation: double-blind placebo-controlled phase III clinical trial. *Jpn J Clin Oncol* 24:205-211, 1994

28. Shiseki M, Kohno T, Nishikawa R, Sameshima Y, Mizoguchi H, Yokota J : Frequent allelic losses on chromosomes 2q, 18q, and 22q in advanced non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 54:5643-5648, 1994

29. Kanno H, Wei DC, Chan LC, Mizoguchi H, Ando M, Nakahata T, Narisawa K, Fujii H, Miwa S: Hereditary hemolytic anemia caused by diverse point mutations of pyruvate kinase gene found in Japan and Hong Kong. *Blood* 84:3505-3509, 1994

30. Nakao S, Takamatsu H, Chuhjo T, Ueda M, Shiobara S, Matsuda T, Kaneshige T, Mizoguchi H: Identification of a specific HLA class II haplotype strongly associated with susceptibility to cyclosporine-dependent aplastic anemia. *Blood* 84:4257-4261, 1994

31. 江頭元樹、金子多香子、押味和夫、溝口秀昭、石田尚志 : CD16⁺CD56⁻NK細胞型顆粒リンパ球増多症2例の末梢血NK細胞の性状. *臨床血液* 36:69-75、1995

II. 口頭発表

1. 泉二登志子、増田道彦、赤星雅、山田修、星野茂、寺村正尚、斎藤博、森直樹、鮫島勇一、小林祥子、新井ゆかり、日台裕子、大沢まゆみ、押味和夫、溝口秀昭：ハイドロオキシウレアおよびブスルファン投与時の慢性骨髄性白血病患者の急性転化について．第55回日本血液学会総会、1993
2. 赤星雅、押味和夫、溝口秀昭：ヒトCD4⁺γδT細胞の超微細構造．第55回日本血液学会総会、1993
3. 山田修、押味和夫、泉二登志子、溝口秀昭：白血病におけるテロメアDNAの変化．第55回日本血液学会総会、1993
4. 金子多香子、寺村正尚、押味和夫、溝口秀昭：CD34陽性細胞に対するlymphokine-activated killer (LAK)細胞とdispecific抗体 (BsAb)の作用．第55回日本血液学会総会、1993
5. 大沢まゆみ、増田道彦、新井ゆかり、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：白血病細胞におけるIL-7レセプターの発現．第55回日本血液学会総会、1993
6. 吾妻英里子、北川誠一、湯尾明、溝口秀昭、高久史麿、斎藤政樹：ヒト好中球機能とチロシンリン酸化．第55回日本血液学会総会、1993
7. 三浦健寿、春山宗忠、坂之上佐和子、中西俊博、中里紘、佐藤武幸、溝口秀

昭：ヒト巨核芽球細胞株CMK由来CD34陽性および陰性クローンの分離について、第55回日本血液学会総会、1993

8. 坂之上佐和子、春山宗忠、三浦健寿、中西俊博、中里紘、佐藤武幸、溝口秀昭：ヒト巨核芽球細胞株CMKの増殖分化とCD34発現との関連。第55回日本血液学会総会、1993

9. Masuda M, Osawa M, Kaneko T, Arai Y, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H : Heterogeneity of CD7⁺4⁻8⁻1⁻ leukemia: usefulness of cytoplasmic antigen detection for the subclassification. International Society for Experimental Hematology, 22nd Annual Meeting, 1993

10. Urabe A, Mizoguchi H, Takaku F: Efficacy of erythropoietin on the anemia of myelodysplastic syndrome and aplastic anemia. International Society for Experimental Hematology, 22nd Annual Meeting, 1993

11. 新井ゆかり、増田道彦、大沢まゆみ、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭、菅原勇：急性白血病細胞におけるMDR1およびMDR3糖蛋白発現の検討。第35回日本臨床血液学会総会、1993

12. 増田道彦、新井ゆかり、大沢まゆみ、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭、菅原勇：多剤耐性白血病細胞株に対するG-CSFの作用。第35回日本臨床血液学会総会、1993

13. 浦部晶夫、武藤良知、溝口秀昭、田島信元、松田浩平、外島裕：血液疾患患者のQOLについての解析．第35回日本臨床血液学会総会、1993
14. 小林祥子、寺村正尚、押味和夫、溝口秀昭：Interleukin-11(IL-11) antisense oligonucleotidesによるK562の巨核芽球への分化の抑制．第35回日本臨床血液学会総会、1993
15. 寺村正尚、押味和夫、溝口秀昭、三浦恭定、野村武夫、外山圭助、鶴岡延喜、小峰光博、浦部晶夫：抗リンパ球グロブリン投与による再生不良性貧血患者の血中サイトカインの変動．第35回日本臨床血液学会総会、1993
16. 青山雅、金子多香子、寺村正尚、押味和夫、溝口秀昭、高橋正知：急性型顆粒リンパ球増多症における顆粒リンパ球の超微細構造：ビメンチンフィラメントの束状構造と臨床経過との相関．第35回日本臨床血液学会総会、1993
17. 江頭元樹、金子多香子、福田淳子、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭、高橋聡、浅野茂隆、高橋正知、石田尚志：CD16⁺CD56⁻のNK細胞型顆粒リンパ球増多症(NK-GLP0)2例の検討．第35回日本臨床血液学会総会、1993
18. 福田淳子、金子多香子、江頭元樹、山田修、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：インターロイキン2活性化T細胞のCD16抗原(1)フローサイトメーターによる解析．第35回日本臨床血液学会総会、1993
19. 金子多香子、福田淳子、江頭元樹、山田修、泉二登志子、押味和夫、溝口秀

昭：インターロイキン2活性化T細胞のCD16抗原(2)CD16抗原の性状と機能．第35回日本臨床血液学会総会、1993

20. 北村聖、森真由美、増田道彦、堀田知光、(高齢者悪性リンパ腫THP研究会・世話人)高久史麿、宮崎保、三浦亮、溝口秀昭、柴田昭、斎藤英彦、松田保、永井清保、木村郁郎、仁保喜之：高齢者の非ホジキンリンパ腫に対するピラルビシンを含む多剤併用療法の検討．第35回日本臨床血液学会総会、1993

21. 星野茂、倉根理一、溝口秀昭：合成レチノイドAm-80の急性前骨髄球性白血病細胞に対する分化誘導作用の検討．第35回日本臨床血液学会総会、1993

22. Wada M, Bartram CR, Nakamura H, Hachiya M, Chen DL, Miller CW, Ludwig L, Hansen-Hagge TE, Ludwig WD, Reiter A, Mizoguchi H, Koeffler HP: Analysis of P53 mutations in a large series of lymphoid hematological malignancies of childhood. American Society of Hematology, 35th Annual Meeting, 1993

23. Wada M, Miller CW, Lee E, Mizoguchi H, Koeffler HP: Analysis of APC mutations in a variety of malignancies. American Society of Hematology, 35th Annual Meeting, 1993

24. 鮫島勇一、青山雅、押味和夫、溝口秀昭：骨髄異形成症候群における単一細胞を用いた遺伝子変異の証明．第56回日本血液学会総会、1994

25. 森直樹、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：骨髓異形成症候群におけるWT1遺伝子の解析．第56回日本血液学会総会、1994
26. 小林祥子、寺村正尚、押味和夫、溝口秀昭：巨核芽球性白血病細胞株におけるEvi-1の発現．第56回日本血液学会総会、1994
27. 寺村正尚、吉永健太郎、小林祥子、押味和夫、溝口秀昭：巨核芽球性白血病細胞株、CMKに対するTPAの作用機序の検討．第56回日本血液学会総会、1994
28. 王艶華、泉二登志子、金子多香子、押味和夫、溝口秀昭：薬剤耐性急性白血病細胞に対するMS-209の抗腫瘍剤感受性増強作用の検討．第56回日本血液学会総会、1994
29. 新井ゆかり、増田道彦、大沢まゆみ、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭、菅原勇：mdr3陽性細胞におけるmdr3糖蛋白の機能についての検討．第56回日本血液学会総会、1994
30. 吾妻英里子、北川誠一、湯尾明、八木澤雅子、溝口秀昭、高久史麿、斎藤政樹：ヒト単球の活性化機構．第56回日本血液学会総会、1994
31. 金子多香子、福田淳子、江頭元樹、山田修、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：IL-2+IL-7で培養した末梢血リンパ球のbispecific抗体誘導細胞傷害活性について．第56回日本血液学会総会、1994

32. 福田淳子、金子多香子、江頭元樹、山田修、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：IL-2活性化NK細胞の表面マーカー(1)正常NK細胞について．第56回日本血液学会総会、1994
33. 江頭元樹、金子多香子、福田淳子、山田修、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭、高橋正知、石田尚志：IL-2活性化NK細胞の表面マーカー(2)NK細胞型顆粒リンパ球増多症について．第56回日本血液学会総会、1994
34. 青山雅、金子多香子、押味和夫、溝口秀昭：異なる標的細胞を用いることによってnecrosisあるいはapoptosisの機序の細胞傷害が誘導された $\gamma\delta$ 型T細胞性顆粒リンパ球増多症の1例．第56回日本血液学会総会、1994
35. 山田修、押味和夫、金子多香子、福田淳子、泉二登志子、溝口秀昭、斎藤博、岡田美智子：悪性リンパ腫におけるテロメアDNAの変化．第56回日本血液学会総会、1994
36. 浦部晶夫、白杵憲祐、溝口秀昭、泉二登志子、倉根理一、平井久丸、三谷絹子、池田康夫、田野崎隆二、外山圭助、大屋敷純子、青木功、柵木信男、浜田裕之、倉石安庸、高久史麿：白血病細胞のG-CSFに対する反応性に関するin vitro検査の妥当性についての検討．第56回日本血液学会総会、1994
37. 泉二登志子、高梨美乃子、押味和夫、溝口秀昭：インターロイキン5による急性白血病細胞の正常顆粒球単球増殖抑制作用の解除．第56回日本血液学会総会、1994

38. 藤井寿一、菅野仁、三輪史朗、成澤邦明、中畑龍俊、溝口秀昭、安藤正彦：
ホモ接合型ピルビン酸キナーゼ異常症 (PK Sendai, Shinshu, Hatano, Hong
Kong) に同定した単一アミノ酸置換と溶血の重症度について. 第56回日本血液
学会総会、1994
39. 中尾真二、高松秀行、中条達也、高見昭良、杉森尚美、伊藤高明、山口正木、
上田幹夫、松田保、塩原信太郎、溝口秀昭：再生不良性貧血患者のHLA-DRB1
対立遺伝子と免疫抑制療法に対する反応性—DRB1*1501陽性患者の特殊性. 第
56回日本血液学会総会、1994
40. Teramura M, Oshimi K, Mizoguchi H: Mechanism of action of anti-
lymphocyte globulin for the treatment of aplastic anemia. Inter-
national Society for Experimental Hematology, 23rd Annual Meeting,
1994
41. 泉二登志子、王艶華、押味和夫、溝口秀昭：薬剤耐性急性白血病細胞に対す
るMS-209の抗腫瘍剤感受性増強作用の検討. 第53回日本癌学会総会、1994
42. 泉二登志子、王艶華、山口小百合、溝口秀昭、高梨美乃子、塩崎宏子、押味
和夫：サイトカインによる急性白血病細胞の正常顆粒球単球増殖抑制作用の
解除. 第36回日本臨床血液学会総会、1994
43. Masuda M, Arai Y, Sugawara I, Motoji T, Mizoguchi H: Expression of
the mdr3 gene and its product in malignant hematopoietic cells. An

International Symposium on Biomedical Diagnostic & Prognostic
Indicators. 1994

44. Yoshida Y, Oguma S, Uchino H, Maekawa T, Nomura T, Mizoguchi H:
Heterogeneity of refractory anemia: proposal for sub classification.
American Society of Hematology, 36th Annual Meeting, 1994
45. Azenishi Y, Nishimura J, Ueda E, Hirota T, Inoue N, Takeda J,
Kanakura Y, Akaogi T, Machii T, Mizoguchi H, Kinoshita T, Kitani T:
Analysis of the PIG-A gene in the blood cells from patients with
aplastic anemia. American Society of Hematology, 36th Annual Meeting,
1994
46. Nakao S, Takamatsu H, Shiobara S, Schezenmeier H, Frickhofen N,
Matsuda T, Kaneshige T, Mizoguchi H: Susceptibility to relapse of
aplastic anemia after successful immunosuppressive therapy is
closely associated with an HLA class in hapotype. American Society of
Hematology, 36th Annual Meeting, 1994
47. Kitamura K, Mori M, Masuda M, Hotta T, Miyazaki T, Miura R,
Mizoguchi H, Shibata A, Saitoh H, Matsuda T, Nagai K, Kimura I,
Niho Y, Takaku F: Improved survival with THP-COP compared to CHOP
for non-hodgkin's lymphoma in the elderly; A Japanese cooperative
study. American Society of Hematology, 36th Annual Meeting, 1994

研究成果

以下のとおり

研究目的

巨核球-血小板産生には2種類の液性因子が必要であると考えられている。第一の因子はそれを骨髄細胞に加えて培養すると巨核球コロニーを形成する因子で、巨核球コロニー刺激因子 (megakaryocyte colony stimulating factor: Meg-CSF) とよばれている。一方、第2の因子はそれだけでは巨核球コロニーを形成する活性はないが、Meg-CSFとともに骨髄細胞に加えると巨核球コロニー数、コロニーサイズ、巨核球のサイズ、ploidyなどを増加させる因子で巨核球増幅因子 (megakaryocyte potentiator: Meg-POT) とよばれている。前者は巨核球系前駆細胞の増殖を刺激する因子であり、後者は主としてその成熟を刺激する因子である。しかし、それらの性状は明らかにされていなかった。

我々は、ヒト巨核球コロニーの無血清培養を開発し、これらの因子と種々のサイトカインとの関係を検討してきた。その結果、インターロイキン-3 (IL-3) と顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) はMeg-CSF活性をもち、エリスロポエチン (Epo)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-11 (IL-11)、stem cell factor (SCF) はMeg-POT活性をもつことを明らかにした。さらに最近、c-Mplリガンドがクローニングされトロンボポエチンではないかと注目されてい

る。このように巨核球産生に關与する液性因子については明らかになってきたが、これらのサイトカインの細胞内レベルでの機構、すなわち巨核球系細胞におけるサイトカインレセプターの解析、その細胞内シグナル伝達機構や遺伝子制御機構については、まったく解明されていない。また巨核球の増殖、成熟機構の制御に關わる遺伝子レベルでの解析もされていない。本研究ではこれらについて明らかにすることを目的とする。さら骨髓異形成症候群 (MDS)、骨髓増殖性疾患 (MPD) などの血液疾患では血小板産生の異常がみられるが、その原因はサイトカインのレセプターの量的あるいは質的異常、シグナル伝達の異常、巨核球産生を制御する遺伝子の発現の異常などが考えられる。これらの研究は現在までまったくされていない。本研究では、この血小板の産生異常のメカニズムについても明らかにすることを目的とする。

(1) ヒト巨核球産生に關与するサイトカインのシグナル伝達の検討

【方法】

(1) チロシンリン酸化蛋白の検討

10%ウシ胎児血清 (FCS) を含むRPMI1640で継代している巨核球系白血病細胞株、CMKを用いて検討した。CMK細胞を培養上清中のサイトカインの影響を除くためPBSで2回洗淨し3時間培養後、各種サイトカイン (IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF, GM-CSF, Epo, SCF, TNF) やPMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) に3分間反応させた。その後蛋白を抽出し、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動したのちニトロセルロース膜に蛋白を転写した。これを抗チロシンリン酸化抗体 (anti-PY) を用いてイムノブロットした。

(2) 免疫沈降によるリン酸化蛋白の同定

各種サイトカインの刺激によって、いくつかの有意なリン酸化蛋白バンドが認められた。そこでこれまで同定された蛋白との異同を免疫沈降法を用いて検討した。上記(1)の方法で得た蛋白抽出液より特異抗体 (anti-Vav, anti-Jak2) をつけたセファロースビーズを用いて特異蛋白を抽出し、サイトカインによる蛋白リン酸化の有無をイムノブロットにて検討した。

【結果】

CMK細胞をIL-6、IL-11、G-CSF、GM-CSF、Epo、SCF、TNF、PMAで刺激し、3分後の蛋白のチロシンリン酸化を検討した。コントロールと比較してGM-CSFでは95kD、42kDにバンドが認められた。SCFでは140kDから180kDにかけて強いリン酸化バンドと、GM-CSF同じく42kDにバンドが認められた。PMAでも42kDにバンドが

認められた。その他のサイトカインでは有意なバンドは検出されなかった(図1)。

IL-3で刺激した場合にはGM-CSFと同じバンドが認められた。

GM-CSFで刺激しJak2で免疫沈降を行ったところ、Jak2のリン酸化が認められた(図2)。

SCFによる刺激で認められた140kD前後の強いリン酸化は、SCFレセプター(c-Kit)であった。また、図1で95kDにリン酸化バンドが認められたため、Vavで免疫沈降を行ったところ、Vavのリン酸化が認められた(図3)。

【考察】

GM-CSFで認められる42kDの蛋白はMAP kinase (MAPK)であることが報告されているが、95kDの蛋白については未だ不明である。今回、Vavとの異同を検討したが、Vavではない可能性が高いと思われる。近年、RasからMAPKにつながる経路とは別に、キナーゼドメインを有するもののSH2基やSH3基を欠くユニークな構造をもつJak (Janus kinase)ファミリーがサイトカインのシグナル伝達経路に関与していることが明らかにされつつある。今回、CMKを用いた検討においてもJak2のリン酸化が認められた。一方、Jak1のリン酸化は認められなかった。Jakは転写因子であるSTAT (signal transducers and activators of transcription)ファミリーへシグナルを伝達することが解明されつつある。このMAPKとJak2の2つの経路が巨核球細胞の増殖および分化に、どの様に関与しているのかは今後の検討課題の一つであると考えられる。

CMKをSCFで刺激すると、Vavのリン酸化が認められた。同じ巨核球系白血病細胞株M07Eでは、やはりSCF刺激でVavがリン酸化されるとの報告があり、SCFは巨核球系細胞のシグナルにVavを利用しているものと考えられる。従来VavはRasの経路につながるものと考えられていたが、最近VavとJak2がGM-CSF、IL-3刺激で

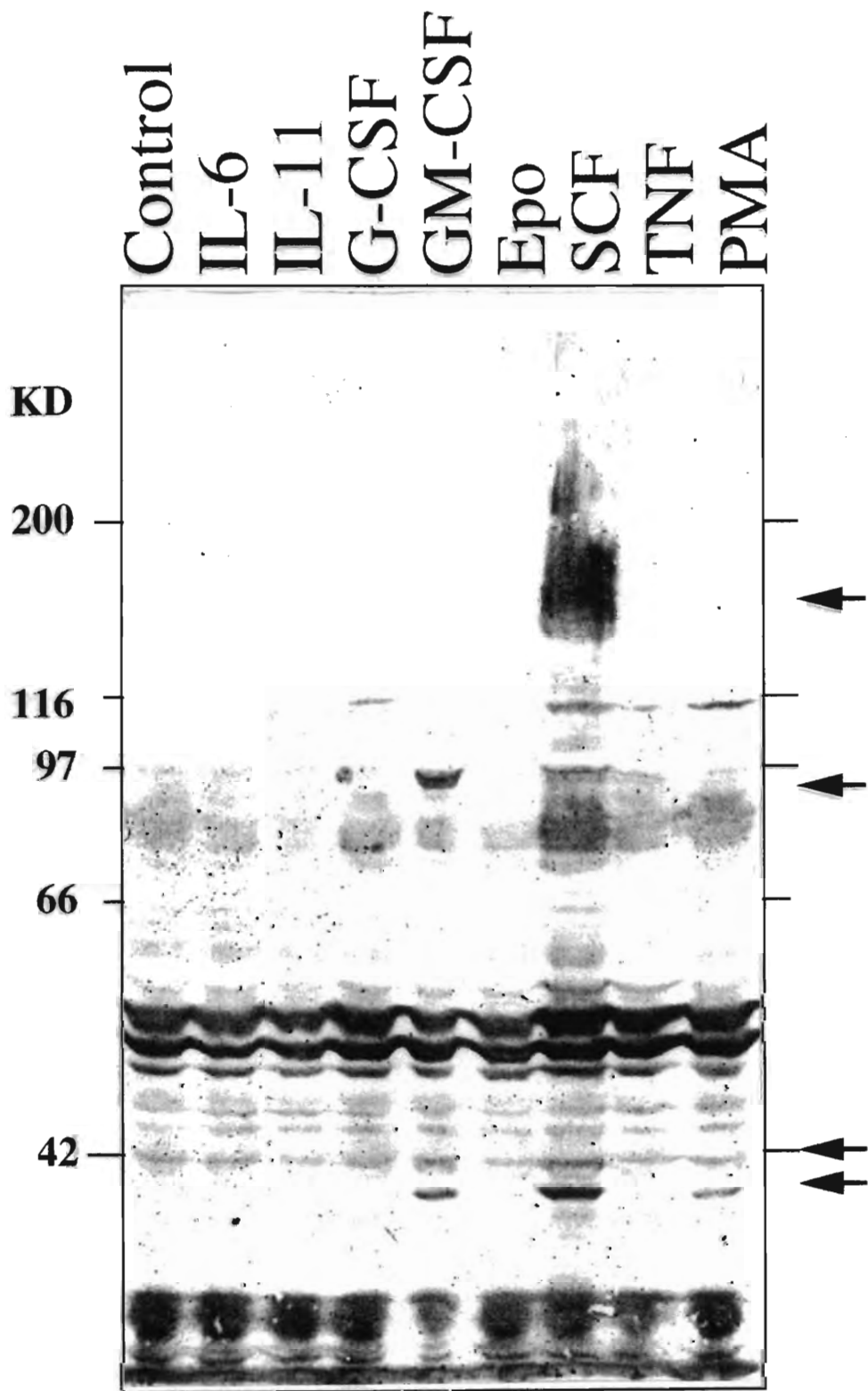


図1 各種サイトカインによる
細胞内蛋白のリン酸化
(anti-PYでImmunoblot)

Immunoprecipitation
Westernblotting
GM-CSF

anti-Jak2	
anti-PY	
(-)	(+)

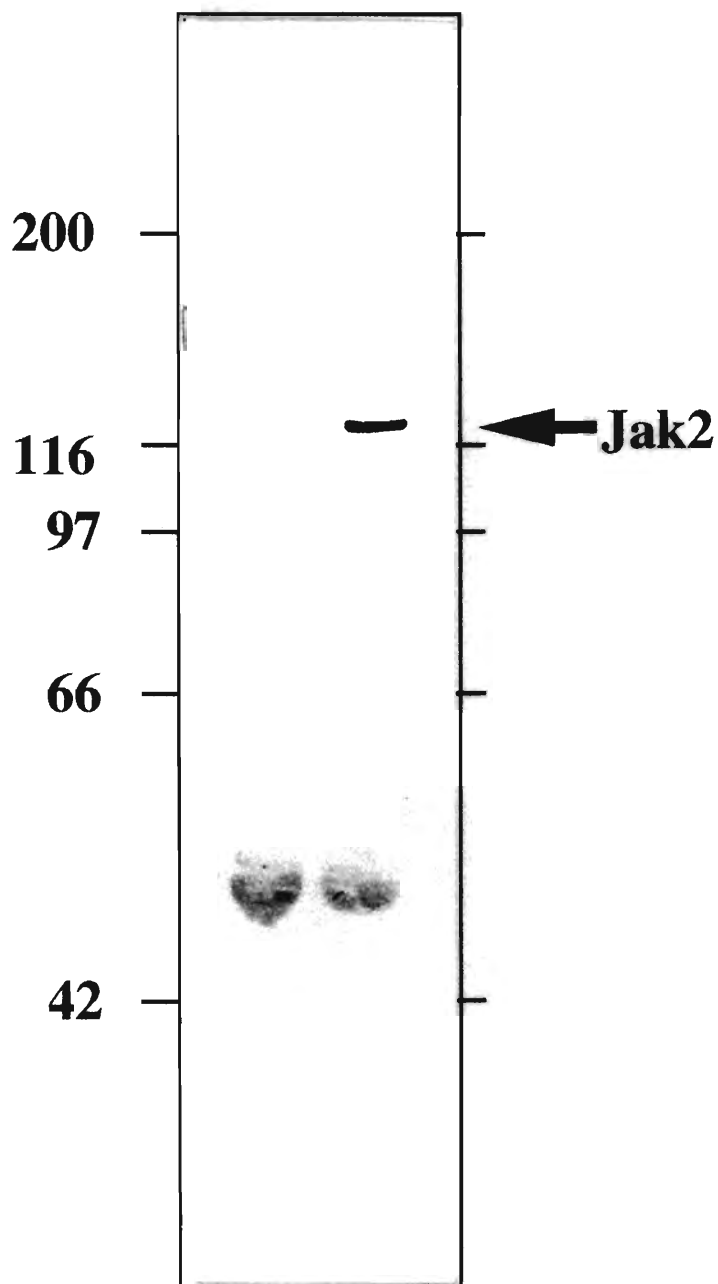


図2 GM-CSF刺激時のJak2のリン酸化

Immunoprecipitation

Westernblotting

SCF

anti-Vav			
anti-Vav		anti-PY	
(-)	(+)	(-)	(+)

KD

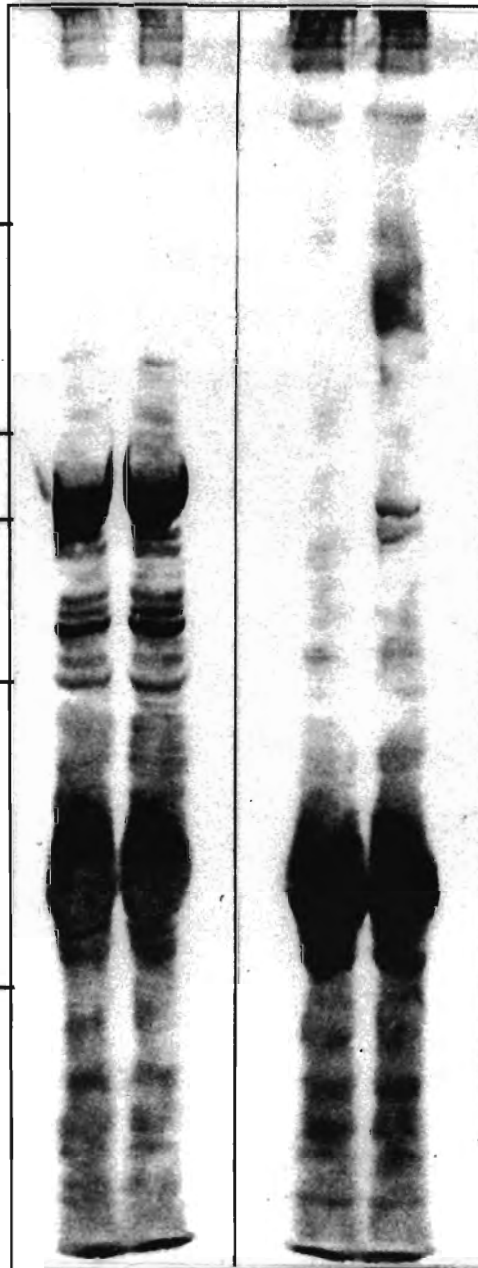
200

116

97

66

42



← p95^{vav}

図3 SCF刺激による p95^{vav} のリン酸化

リン酸化し結合するとの報告もあり、Vavの下流についてはさらに検討する必要があると思われる。

今回、巨核芽球性白血病細胞株を用いた検討の結果、SCF刺激ではSCFレセプター、Vav、およびMAPKのチロシンリン酸化、GM-CSF刺激ではJak2、MAPKのチロシンリン酸化が明らかとなった。これらの細胞内蛋白の巨核球系細胞の増殖過程における役割については不明であり、今後これらの蛋白のAntisense oligonucleotideを用いてその増殖に対する影響を検討する予定である。さらに今回の研究期間中、正常のヒト巨核球を純化し、種々のサイトカイン刺激によるチロシンリン酸化について調べたが、蛋白量が少なく十分な結果が得られなかった。我々は最近純化されたc-MplリガンドとSCFを用いると、ヒト巨核球が著明に増幅されるという知見を得ており、今後はこのアッセイ系を用いて正常ヒト巨核球のシグナル伝達の検討を行う予定である。

(2) 巨核球産生に關与するプロトオンコジン、転写因子の検討

【方法】

巨核芽球性白血病細胞株であるCMK、Meg-J、MEG-01、赤白血病細胞株のK562、HEL、骨髓性白血病細胞株のHL-60、kG-1、U937を用いて検討した。各細胞株にTPA 10^{-8} Mを添加し2.5%FCSを含むRPMI1640培地にて48時間液体培養した。またCMKについてはIL-3(500U/mL)、IL-6(100ng/mL)、IL-11(1 μ g/mL)をそれぞれ添加し、48時間培養した。培養前後の細胞からtotal RNAを抽出し、それぞれ10 μ gのRNAでreverse transcriptionを行い、cDNAを合成した。その後、Evi-1、myb、 β 2-microglobulinのプライマーを用いて同一条件(94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 2min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 30cycle)でPCR(polymerase chain reaction)を行った。

また、Evi-1およびmybのAntisense、Sense oligonucleotidesをそれぞれ作成しCMKあるいはK562に添加し、2%FCS添加RPMI1640培地に植え込み、48時間液体培養を行った。培養終了4時間前に、1 μ Ciの 3 H-チミジンを添加し、その取り込み量を β カウンターを用いて測定した。

【結果】

巨核芽球性白血病細胞株においては、CMK、Meg-JにEvi-1 mRNAの発現が認められた。MEG-01ではEvi-1の発現は認められなかった。その他の白血病細胞株である、K562、HEL、HL-60、U937では、いずれもEvi-1の発現は認めなかった(図4)。

Evi-1の発現を認めたCMK、Meg-JにTPA 10^{-8} Mを添加し培養しても、Evi-1mRNAの発現の変化は認められなかった。また、MEG-01、K562、HELにTPAを添加しても、Evi-1mRNAの発現は認められなかった。さらに、CMKにおいてはIL-3、IL-6、

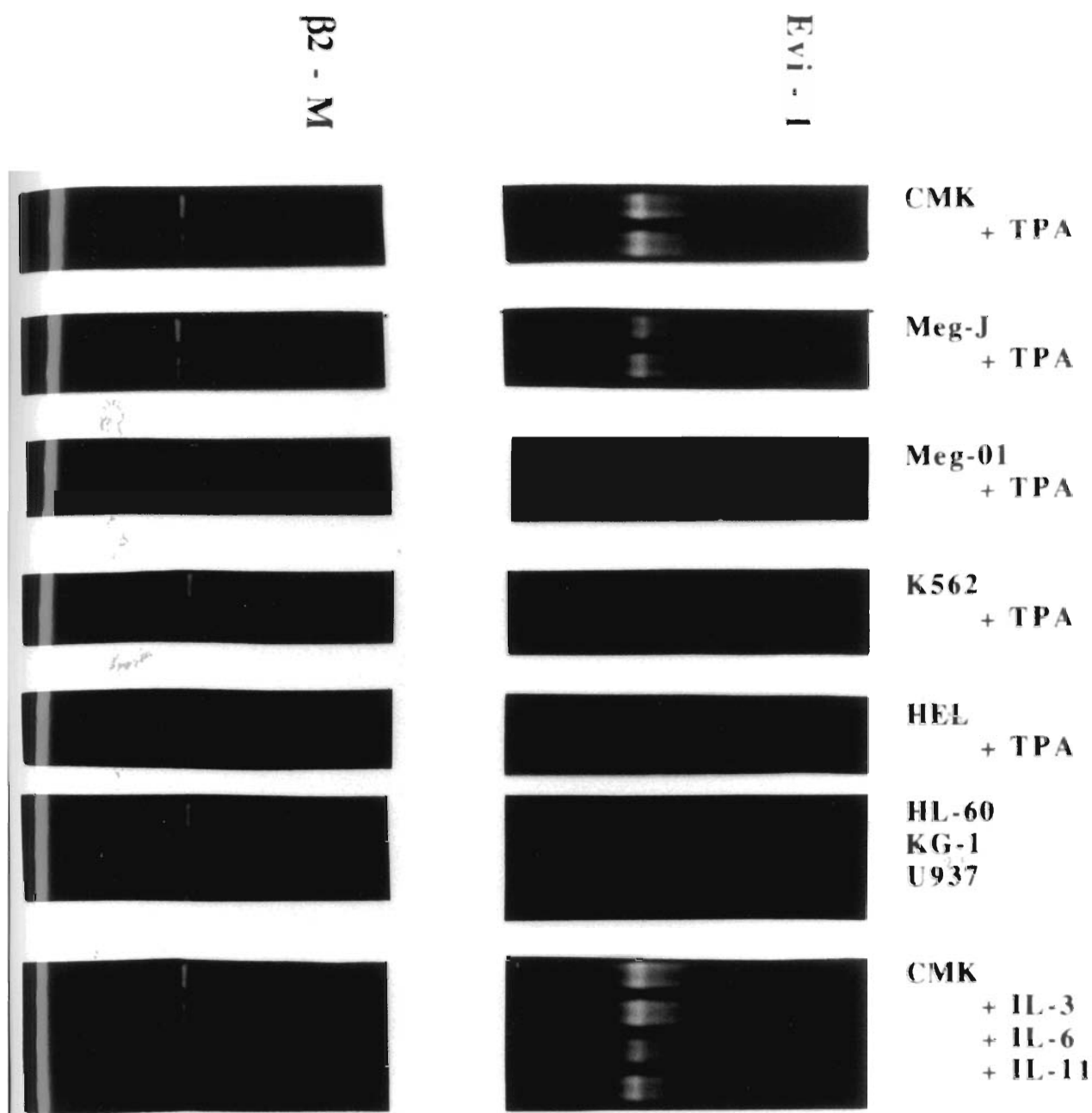


図4 巨核芽球性白血病細胞株における Evi-1の発現

IL-11を添加培養しても、Evi-1 mRNAの発現の変化は認めなかった(図4)。

Evi-1の巨核球系細胞の増殖、分化に対する影響の有無を検討するためにCMKにEvi-1のAntisense、またはSense oligonucleotideを添加培養したが、³H-チミジンの取り込み量(図5)およびCD41の発現の有意な変化は認められなかった。

CMK、K562においてはmybの発現が認められた。両細胞株にmybのAntisense、またはSense oligonucleotideを添加培養し、³H-チミジンの取り込みを測定すると、K562では³H-チミジンの取り込みの抑制がみられたが(図6)、CMKでは抑制は認められなかった(図7)。

【考察】

転写因子の一つであるEvi-1はヒトでは染色体上、3q26に位置する転写因子である。以前より3q26の染色体異常を伴う白血病では巨核球、血小板産生の異常を伴うことが知られており、我々はEvi-1が巨核球産生において重要な転写因子ではないかと考え、今回の検討を行った。巨核球系の3細胞株のうちCMK、Meg-Jの2つの細胞株においてEvi-1の発現を認めたが、IL-3、IL-6、IL-11などの巨核球系細胞の増殖および成熟刺激因子を添加しても、その発現に変化は認めなかった。またCMK、Meg-JにTPAを添加して巨核球系への分化を促進させても、Evi-1の発現の変化はみられなかった。さらに、HELやK562のようにTPA添加により巨核球系に分化する細胞においても、TPA添加後にEvi-1の発現は認めなかった。以上の検討結果より、Evi-1の巨核球の増殖、分化過程における関与の可能性は低いと考えられる。

正常ヒト巨核球においては、ヒト骨髄の単核細胞にc-mybのAntisense oligonucleotideを添加すると、巨核球コロニー形成および成熟(ploidyの増加)が抑制されるという報告がある。しかし、今回の検討では巨核芽球性白血病細胞株、

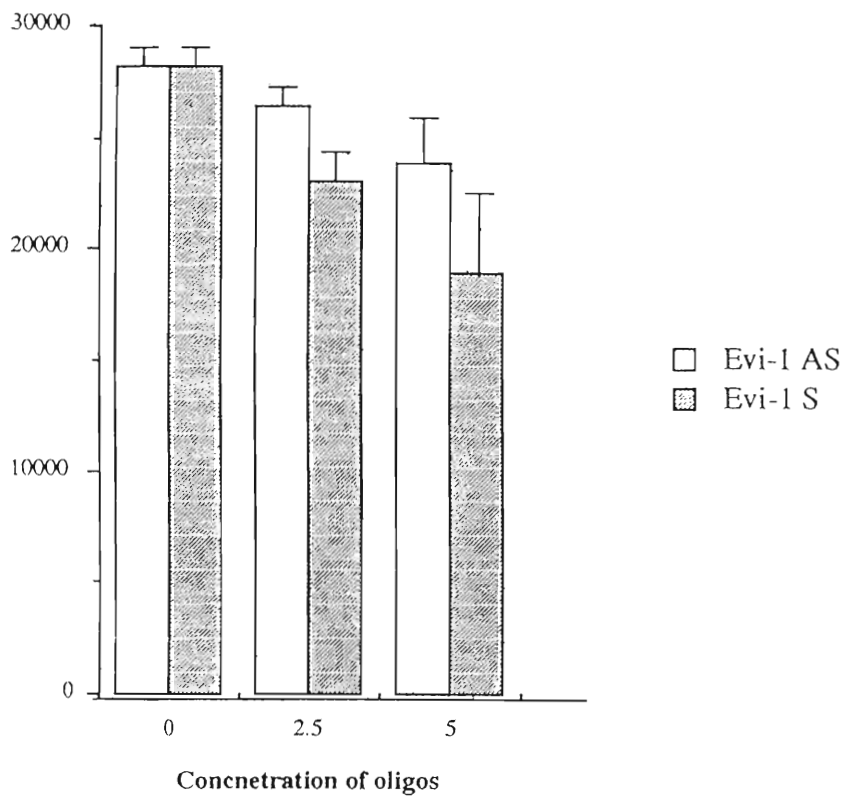


図5 Evi-1のantisenseおよびsense oligonucleotideのCMKの増殖に対する影響

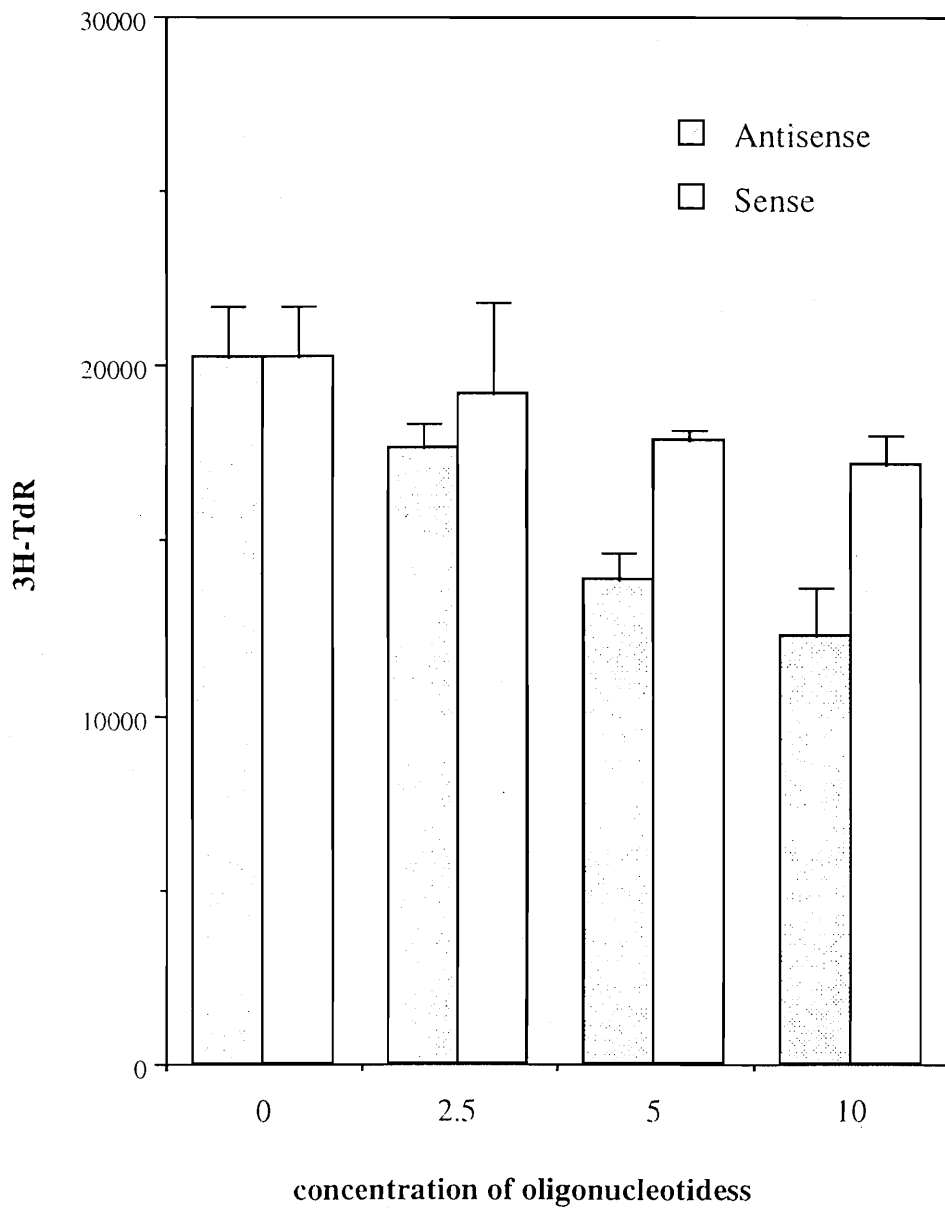


図6 mybのantisenseおよび sense oligonucleotideの K562の増殖に対する影響

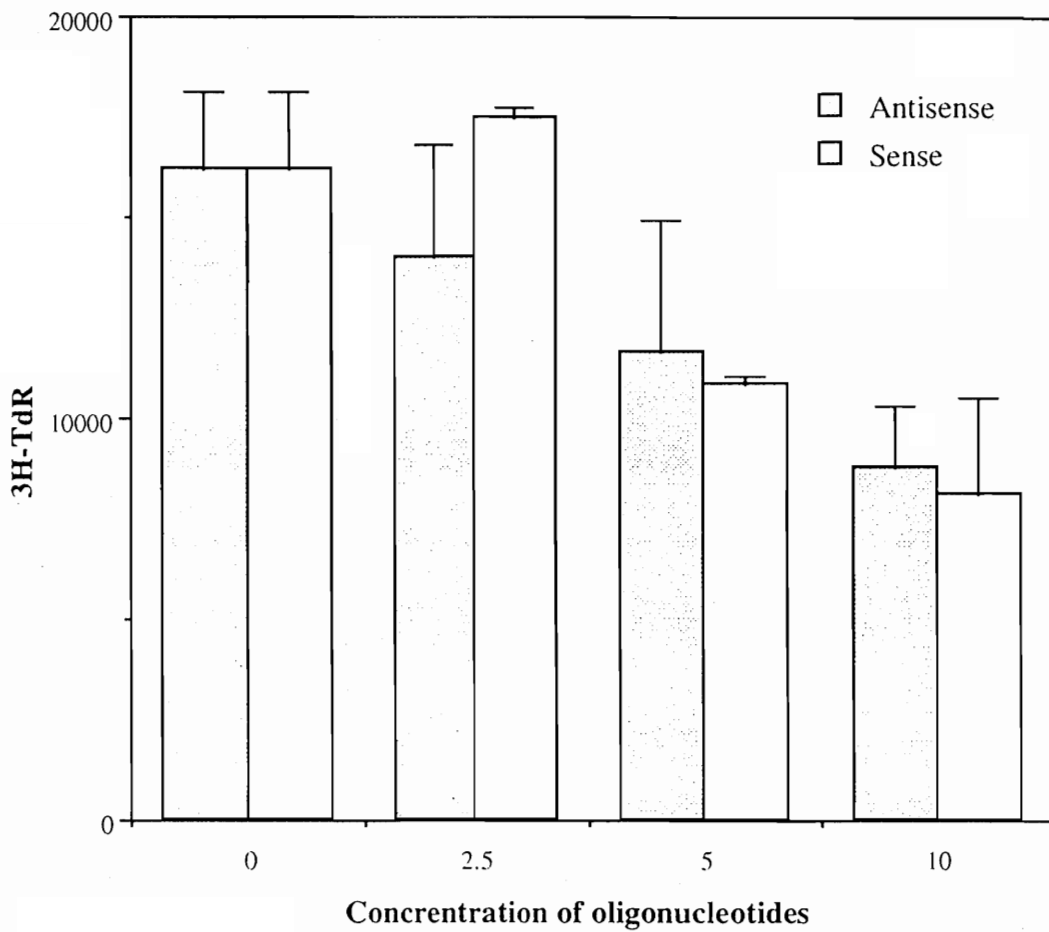


図7 mybの antisenseおよび sense oligonucleotideの CMKの増殖に対する影響

CMKにおいてc-mybは発現していたが、c-mybのAntisense oligonucleotideにより、増殖が抑制されなかった。以上より、正常および異常な巨核球造血においては、その増殖機構が異なっている可能性が示唆された。

本研究の期間中、正常のヒト巨核球を純化して、種々のプロトオンコジン(c-myb、c-myc、c-ras)や転写因子の発現について検討を試みたが、得られる細胞数が少なく、検討は困難であった。また、巨核球のploidyの増加過程に伴うプロトオンコジンや転写因子の発現の検討も細胞数の関係で、十分な検討はできなかった。しかし、前に述べたように最近になって、解析可能な量のヒト巨核球を得ることが可能となった。また、Meg-J細胞にK252aを添加することにより、ploidyが著明に増加するアッセイ系を確立することに成功した。次項に、その研究結果を述べることとする。これらの実験系を用いて、今後、巨核球造血に関与するプロトオンコジン、転写因子について、さらに明らかにしたいと考えている。

(3) 巨核球系細胞の多倍体化の実験モデルの確立

我々は巨核球系細胞の多倍体化のモデルを確立するために、種々の巨核芽球性白血病細胞株を用いて検討を行ってきた。その結果、Meg-J細胞にヒドロキシウレアを添加し、G₁期に同調させたのち、プロテインキナーゼCインヒビターの一つであるK-252aを添加して培養することにより、多倍体化する系を確立した。

【方法】

Meg-J細胞にヒドロキシウレア 2mMを添加し15時間培養後、0.3 μ MのK252aを添加し5日間液体培養した。培養後、Propidium iodide (PI)染色し、ploidyの変化についてフローサイトメトリーを用いて検討した。また抗CD41、CD42抗体を用いて、K252a添加後のCD41、CD42の発現の変化についてフローサイトメトリーを用いて検討した。

【結果】

Meg-Jは4Cのploidyを有する細胞であり、16C以上の細胞はほとんど認めない。しかし、Meg-Jにヒドロキシウレアを添加し同調させたのち、K252aを添加して5日間液体培養すると、16C、32cのploidyを有する細胞が出現し、著明な多倍体化を示した(図8)。また、K252a添加により細胞のサイズの増大および、CD42の発現の明らかな発現の増強が認められた(図9)。

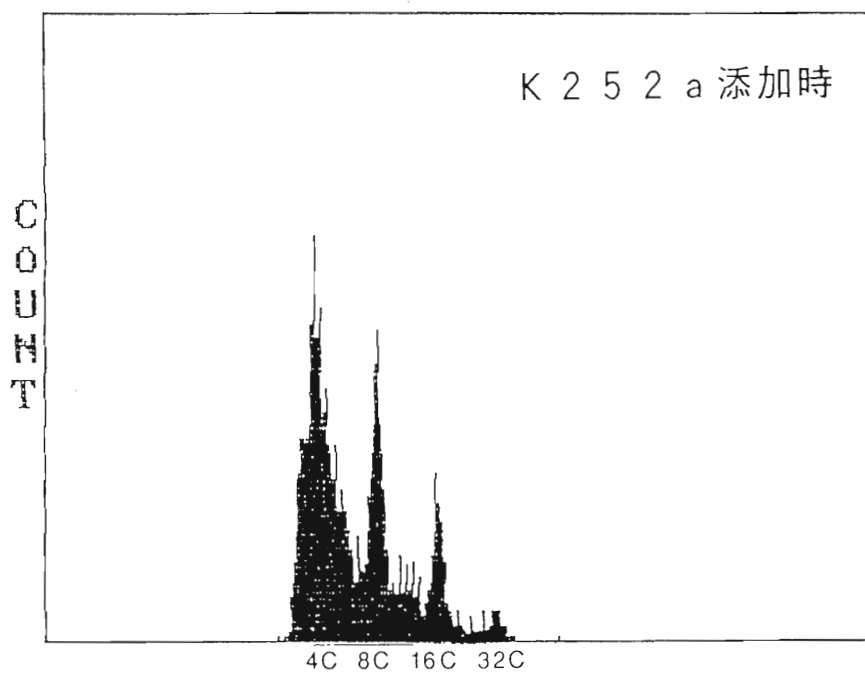
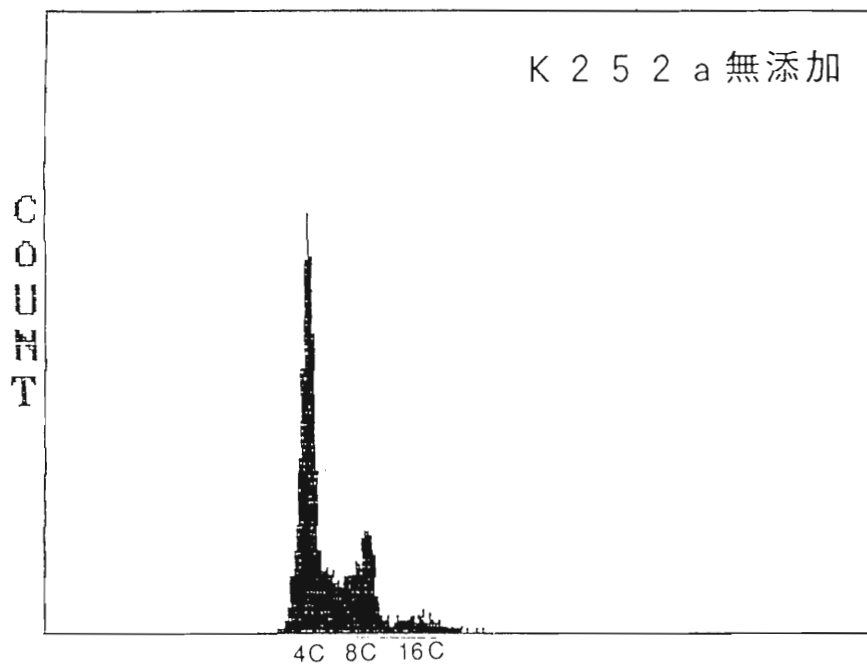


図8 Meg-JのK-252a添加によるploidyの変化

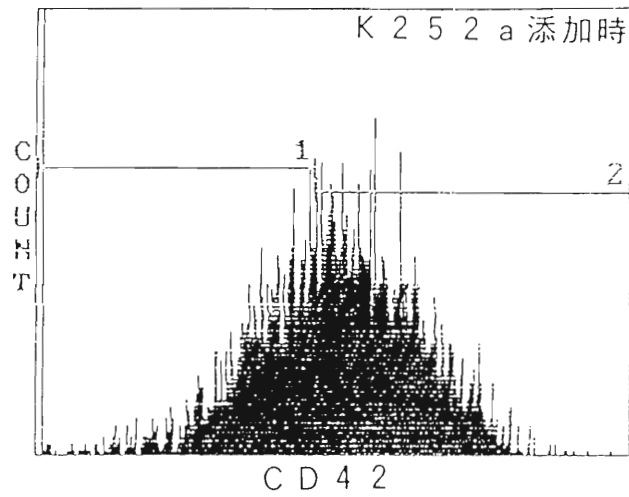
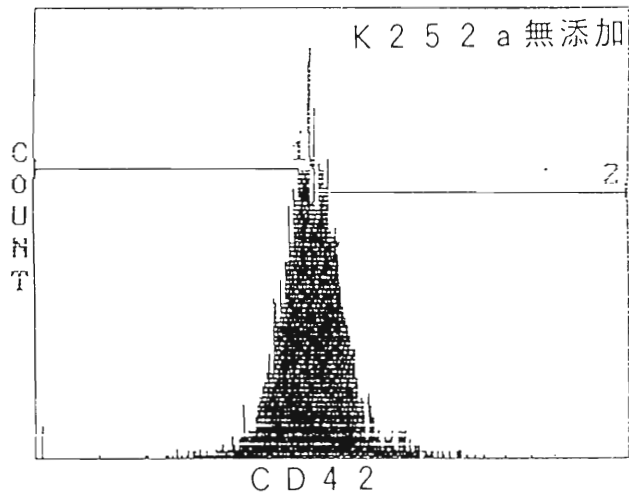
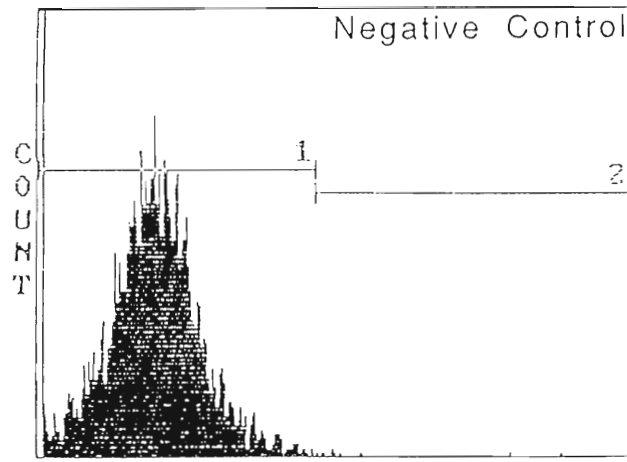
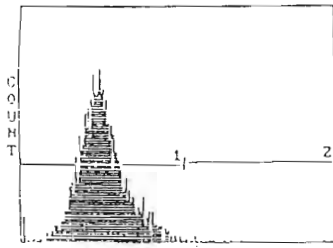
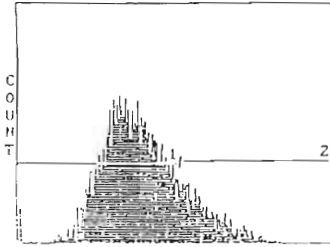


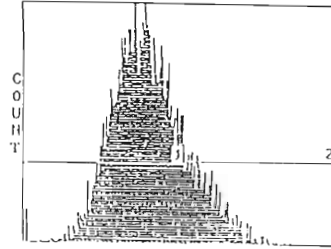
図9 Meg-JのK-252a添加によるCD42の変化



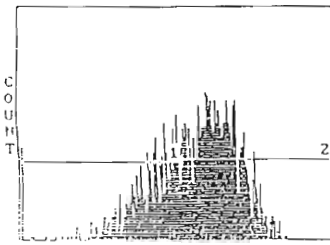
Control



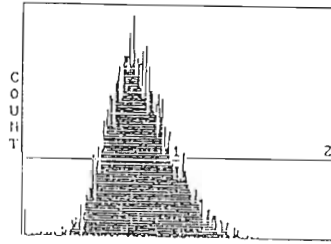
無添加



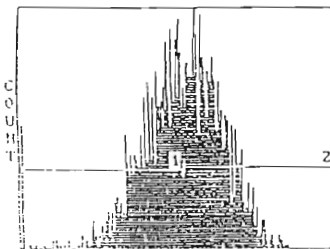
Staurosporin 1nM



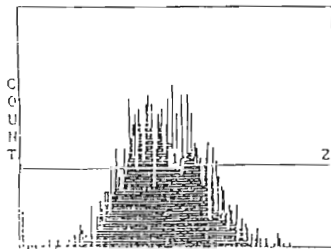
TPA



Staurosporin 10nM

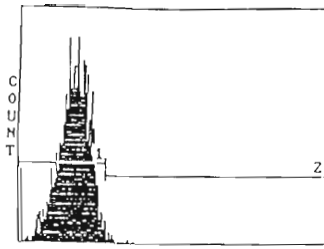


TPA+Staurosporin 1nM

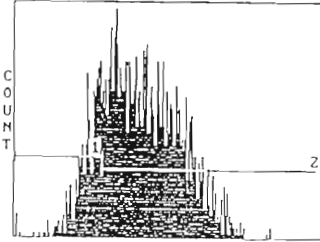


TPA+Staurosporin 10nM

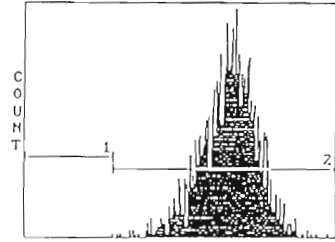
図10 TPAおよびStaurosporin のCD41発現に対する影響



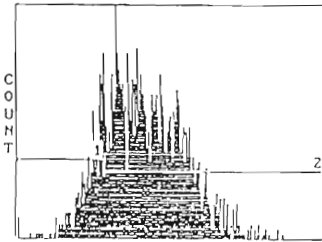
Control



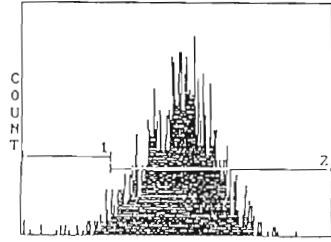
無添加



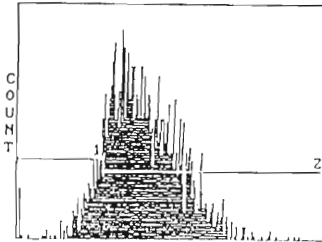
TPA



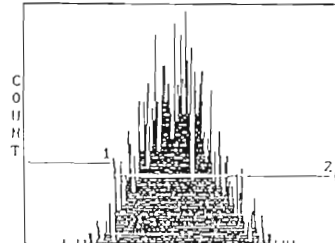
Herbimycin A 0.1 μ M



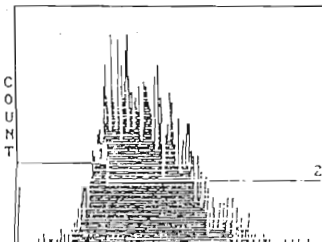
TPA+Herbimycin A 0.1 μ M



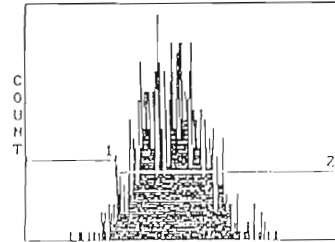
Herbimycin A 0.5 μ M



TPA+Herbimycin A 0.5 μ M

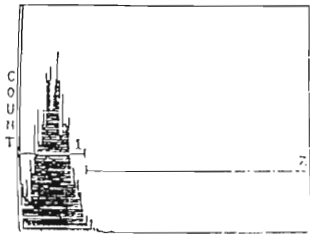


Herbimycin A 1 μ M

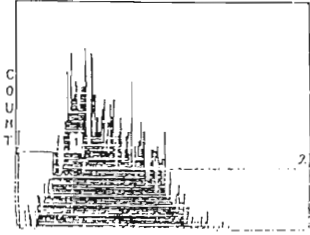


TPA+Herbimycin A 1 μ M

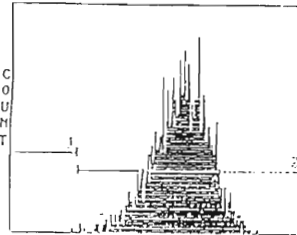
図11 TPAおよびHerbimycin AのCD41発現に対する影響



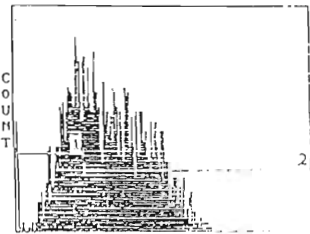
Control



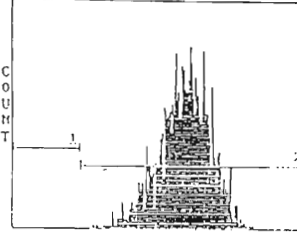
無添加



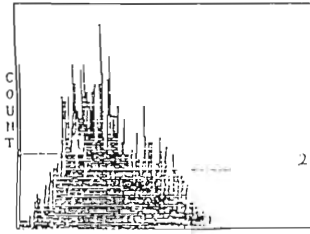
TPA



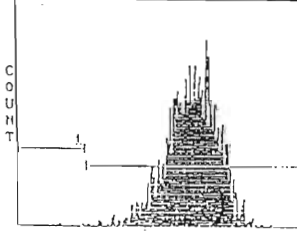
Calphostin C 0.1 μ M



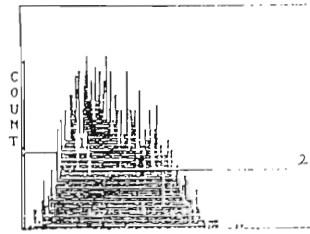
TPA+Calphostin C 0.01 μ M



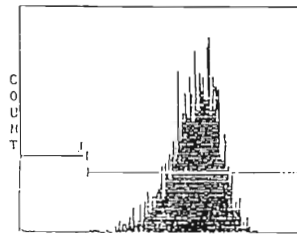
Calphostin C 0.01 μ M



TPA+Calphostin C 0.05 μ M



Calphostin C 0.05 μ M



TPA+Calphostin C 0.1 μ M

図12 TPAおよびCalphostin CのCD41発現に対する影響

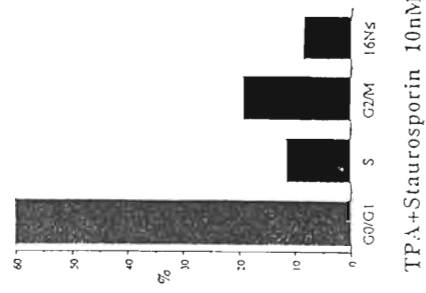
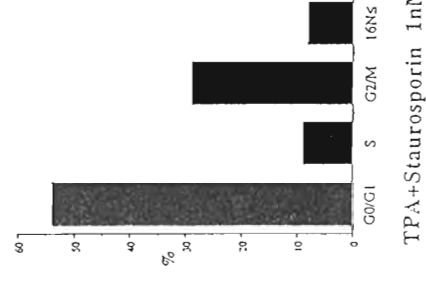
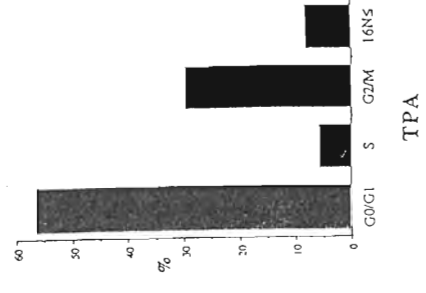
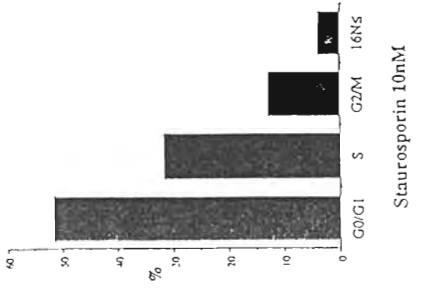
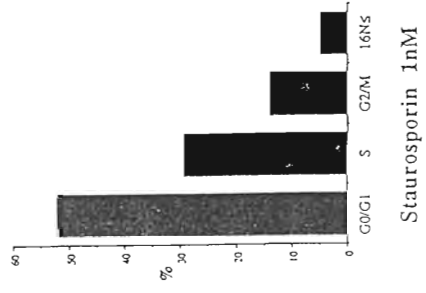
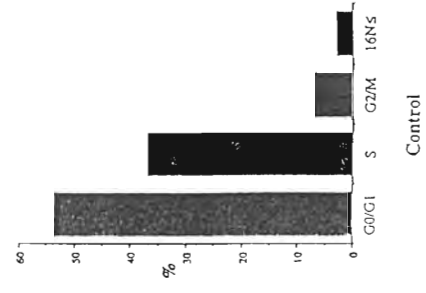
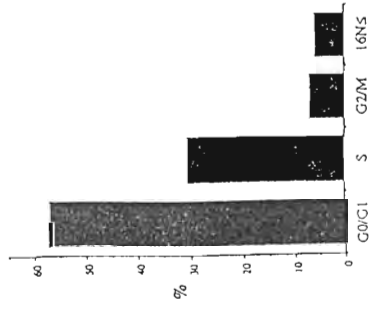
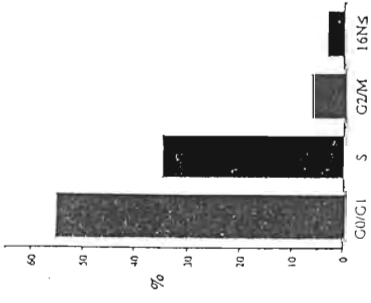


図13

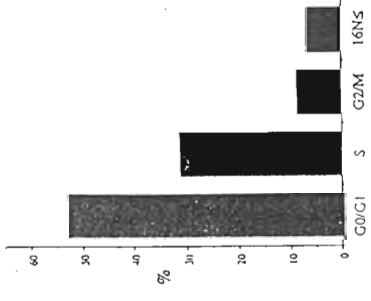
TPAおよびStaurosporinの細胞周期およびploidyに対する影響



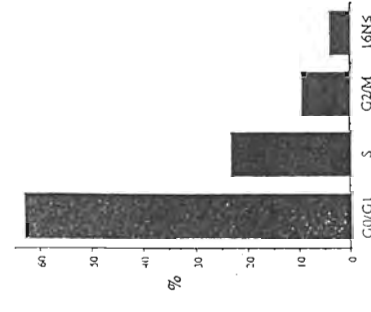
Control



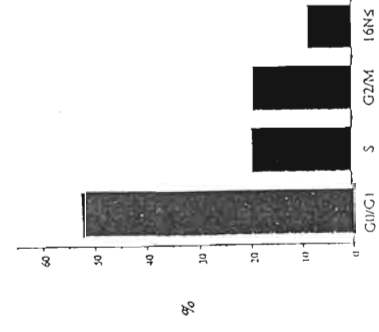
Herbimycin 0.1µM



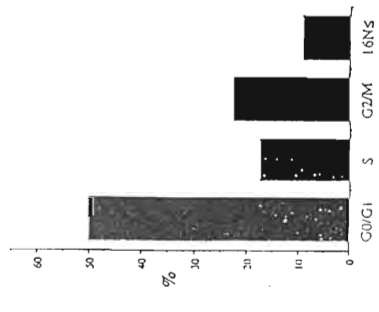
Herbimycin 0.5µM



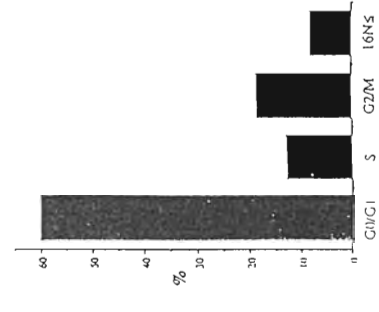
Herbimycin 1µM



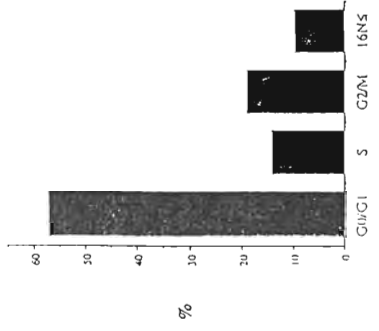
TPA



TPA+Herbimycin 0.1µM

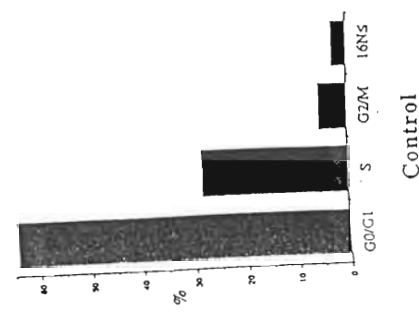


TPA+Herbimycin 0.5µM

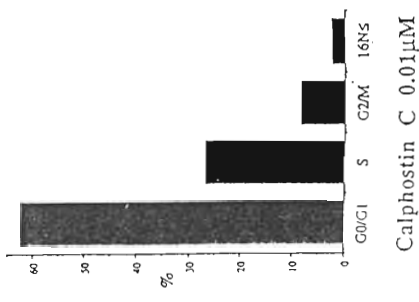


TPA+Herbimycin 1µM

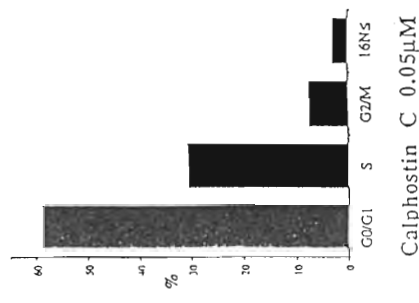
TPAおよびHerbimycin Aの細胞周期およびploidyに対する影響



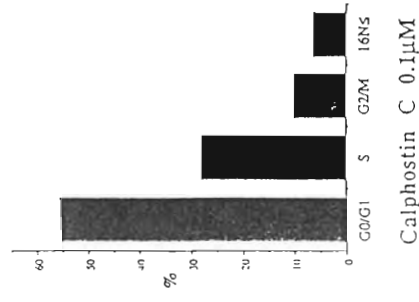
Control



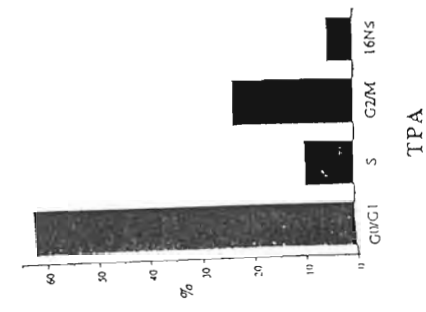
Calphostin C 0.01µM



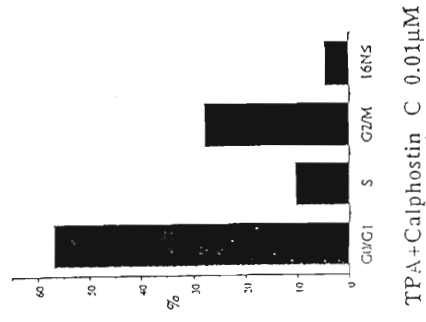
Calphostin C 0.05µM



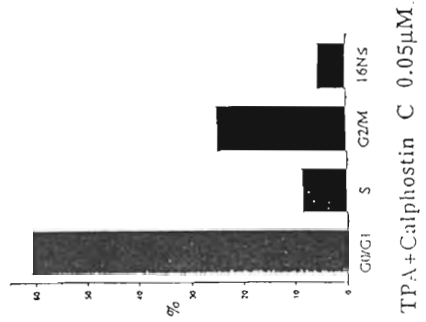
Calphostin C 0.1µM



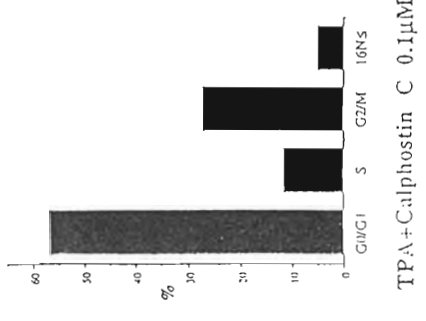
TPA



TPA+Calphostin C 0.01µM



TPA+Calphostin C 0.05µM



TPA+Calphostin C 0.1µM

図15

TPAおよびCalphostin Cの細胞周期およびploidyに対する影響

【考察】

K-252aを添加することにより巨核球系細胞の多倍体化のモデルを確立した。多倍体化に伴い血小板糖蛋白の発現の増強もみられることから、本モデルは正常の巨核球産生の過程にかなり類似している可能性が高いと思われる。今後、この系を用いて、巨核球の多倍体化のメカニズムを検討する予定である。

(4) 巨核球系細胞のTPAによる分化の作用機序についての検討

【方法】

CMK細胞にTPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate)、Staurosporin、Calphostin C、Herbimycin Aを単独あるいは同時に添加して液体培養を行い、CD41の発現の変化についてフローサイトメトリーを用いて検討した。また、CMK細胞にBrdUを取り込ませた後、FITC結合抗BrdU抗体でDNA中のBrdUを染色し、さらにPropidium iodide (PI) 染色によりDNA総量をフローサイトメトリーで検討することにより、TPA、Staurosporin、Calphostin C、Herbimycin Aの細胞周期およびploidyの変化について検討した。

【結果】

CMK細胞にTPAを添加するとCD41の発現の増強が認められた。このTPAによるCD41の発現の増強は、Staurosporin (図10)、あるいはHerbimycin A (図11)を同時に添加することにより減弱した。しかしCalphostin AをTPAとともに添加しても不変であった (図12)。

TPA添加によりS期の細胞の比率が低下し、G₂/M期 (8N)の細胞の比率が増加した。さらに16N以上のploidyの比率が増加した。このTPAによる細胞周期の変化は、Staurosporinにより一部キャンセルされた (図13)。すなわち、TPAとStaurosporinを同時に添加すると、S期の比率の増加傾向、G₂/M期 (8N)の細胞の比率の低下が認められた。しかし、Herbimycin A、あるいはCalphostin CをTPAとともに添加しても、明らかな変化は認められなかった (図14,15)。また、TPAによる16N以上のploidyを有する細胞の比率は、Staurosporin、Calphostin C、Herbimycin Aのいずれを添加しても変化しなかった。

【考察】

CMKのTPA添加によるCD41発現の増強は、Staurosporin、あるいは特異性の高いチロシンキナーゼ阻害剤であるHerbimycin Aを同時に添加すると減弱したが、プロテインキナーゼC阻害剤であるCalphostin Cを添加しても阻害されなかった。以上の結果より、CMKのTPA添加によるCD41発現の増強の機序は、少なくともチロシンキナーゼを介するものであることが示唆された。

TPAによる細胞周期に対する作用は、一部Staurosporinにより解除されたが、Calphostin C、Herbimycin Aでは解除されず、プロテインキナーゼC、チロシンキナーゼのいずれの機序によるものか明らかにできなかった。また、TPAによるploidyの増加については、今回用いた3つのキナーゼ阻害剤では変化が認めら

れなかった。今後、他のキナーゼ阻害剤を用いてさらに検討する予定である。

(5) 正常巨核球がIL-11を産生しているかについての検討

正常巨核球はIL-6を産生し、その増殖および成熟に関与しているとの報告がある。我々は、IL-11がMeg-POI活性を有することを報告し、さらに、巨核芽球性白血病のオートクリン増殖因子であることを報告した。そこで、IL-11が正常巨核球産生において、オートクリン増殖因子であるかを明らかにするために、正常巨核球がIL-11を産生しているか否かについて検討した。

【方法】

正常者の末梢血単核細胞を、IL-3、IL-6、IL-11とともに、液体培養後、抗CD4抗体とイムノビーズ法を用いて、巨核球を純化した。それよりRNAを抽出し、RT-PCR法で、IL-6、IL-11 mRNAの発現を検討した。

【結果および考察】

巨核球系細胞には、IL-6の発現は認めしたが、IL-11の発現は認めず、IL-11正常によるオートクリン増殖機構の存在は否定的と考えられる。

(6) 巨核球のサイトカインレセプターの検討

ヒト巨核球を抗CD4抗体を用いて純化し、FITC標識したサイトカインを用いて染色後、さらにpropidium iodide胞で染色し、フローサイトメトリーを用いて検討を行ったが、得られた巨核球数が少なく明確な結果は得られていない。現在、c-Mplリガンドによる巨核球の増幅、抗IL-6レセプター抗体などのモノクローナル抗体を用いて検討中である。