

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461458

研究課題名(和文)血小板はどこでどのように産生されるか

研究課題名(英文)Where and how are mature platelets produced?

研究代表者

石田 陽治 (Ishida, Yoji)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：70151389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄巨核球からいかにして血小板が産生されるかを検討した。明らかになったのは点は以下の点である。通常は、骨髄巨核球は胞体突起と呼ばれる突起を静脈洞に進展させ、それが切断されて血小板前駆体を放出する。血小板減少が起こり、短期間に血小板が必要な場合は、thick protrusionと呼ばれる、巨核球細胞質の一部を静脈洞に放出する。これらの2つの血小板前駆体は、循環床のどこかで成熟血小板に変化するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：How and where mature platelets are produced were investigated. Two evidences were obtained. The first, megakaryocytes in the bone marrow extended the proplatelets into the sinusoid and the proplatelet snapped, resulting in the immature platelets were released into the sinusoid in a steady state. The second, in the emergency state, in which a lot of platelets were demanded in thrombocytopenia, another immature platelets called "thick protrusion" were released into the sinusoid. These two types of immature platelets were converted into the mature platelets in the circulation.

研究分野：巨核球・血小板造血

キーワード：megakaryocyte thrombocytopoiesis proplatelet thick protrusion immature platelet

### 1. 研究開始当初の背景

われわれは麻酔をかけたマウスの頭蓋骨に2光子顕微鏡をあて、骨髄中の静脈洞に焦点をしぼり、骨髄間質中に存在する巨核球が血小板を静脈洞に放出する現象を、ビデオ撮影にとることに成功した。この顕微鏡による撮影は再現性にすぐれ、2つの放出様式をとることが明らかになった。ひとつは、胞体突起状と呼ばれる現象である。静脈洞に巨核球が小さな隆起をだし、そこから血流にそって長く細い突起(突起には小さな隆起が連なっている)が延びてくる現象である(下図、巨核球を青色、胞体突起を緑で示す)。連なっている小さな隆起の間で切断されて、先端部は血流にのって流れていく(proplatelet fragment)。巨核球を *in vitro* で培養していると、細胞質から多くの胞体突起(proplatelet)なるものが多方面に延びてくるのが観察されるが、これと類似している現象である。

もうひとつは、静脈洞に小さな隆起をだしたあと、太くて長い突起のようなものをだし、巨核球の根元で切断されて、血流にのって流れていく(thick protrusion)現象である。2007年にはJuntら(Science 317:1767-1770, 2007)も、多光子顕微鏡を用いてマウスの *in vivo* thrombocytopoiesis imaging を報告している。彼らの報告では、巨核球は静脈洞壁にそって位置し、そこから静脈洞に大きな細胞質の一部(大きな固まり)を放出している像がキャプチャーされた。その固まりが静脈洞を流れていくのがビデオに映されていた。しかしその後、どうなるかは不明のままである。

ItalianoらはJCB(Journal of Cell Biology 2010;191:861-874)に *in vitro* の研究として、未熟血小板は proplatelet fragment と preplatelet に分類されると報告している。

### 2. 研究の目的

巨核球は成熟血小板を直接産生するのではなく、未熟血小板を産生し、血管内で成熟血小板に成熟していることが明らかとなった。未熟血小板の産生様式は proplatelet model、thick protrusion model の2つが存在する。この2つの差異さらには未熟血小板がどのように、どの場所で成熟血小板になっていくかは未だ明らかでない。そこで、以下の3つの点について明らかにする。

(1)どのような状況の時に、どの産生様式が増加するか?

(2)proplatelet fragment と thick protrusion との差異は?(例えば、血小板が急速に必要な場合はどのような産生様式で血小板が産生されるか?)

(3)未熟血小板がどこでどのようにして成熟血小板に変わっていくのか?

### 3. 研究の方法

1. 2光子顕微鏡解析:血小板造血を刺激した際、どちらの産生様式をとるのかを検討する。

2. 血管床での血小板前駆体から成熟血小板への変化の様子を *in vitro* で観察する。

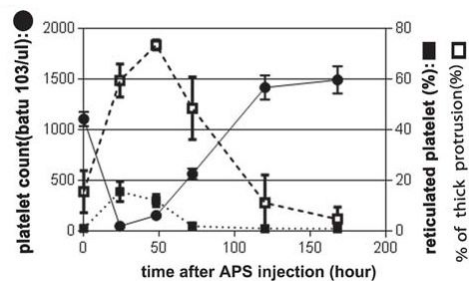
3. 走査電子顕微鏡での検討:マウス proplatelet fragment と thick protrusion との差異(特に demarcation membrane system の発達の差異)を明らかにする。

4. マウス肺組織の病理学的検討:肺動脈、肺静脈での巨核球、proplatelet fragment, preplatelet の存在を確認する(HE染色、免疫染色)。

### 4. 研究成果

1. 血小板造血を刺激した場合どちらの産生様式を取るか?

マウスに抗血小板抗体を投与すると、6時間後には血小板数は、10万以下になり、24時間後から血小板数は急激に増加してくる。急激に増加する時期は血小板造血が亢進していると考えられる。その時期に、2光子顕微鏡を用いて血小板産生様式を検討したところ、以下ようになった。網状血小板比率と



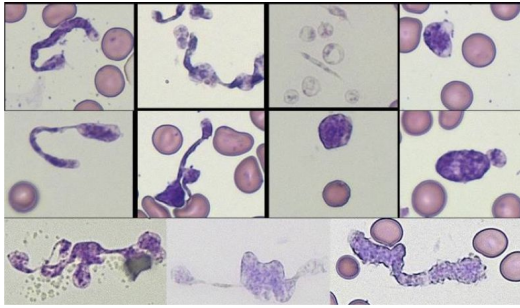
ともに示す。

網状血小板比率が上昇している時、つまりは血小板造血が亢進している時は、thick protrusion model で血小板が産生されている比率は70%にも達した。この結果から、血小板が緊急に必要な場合は、通常の proplatelet model ではなく thick protrusion model で血小板産生が起きていることが明らかとなった。

2. 未熟血小板がどのように成熟血小板に変化するかを *in vitro* で観察した。

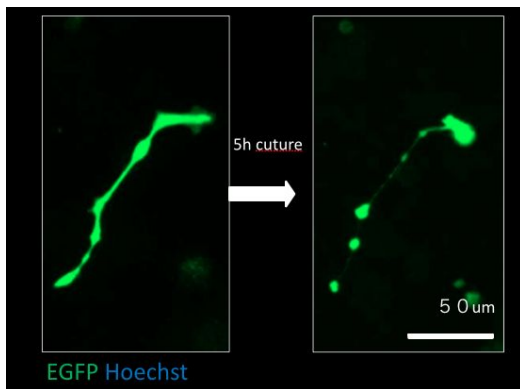
まず、末梢血中に未熟血小板が存在するか否かをマウスで検討した。

マウス腹腔大静脈からクエン酸ソーダを抗凝固剤として、採血後、PRPを得る方法で、100g 20分間遠心した。血漿の分画をとってスメアにしてみたところ、下に示すように多くの未熟血小板が認められた。



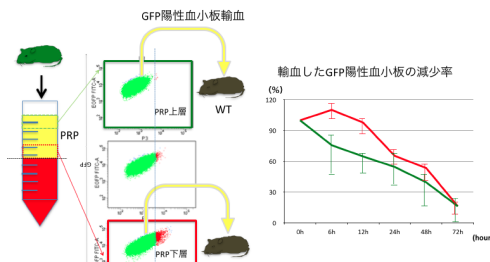
これらの血小板前駆体の比率は、抗血小板抗体を投与した時の血小板増加時数増加時に増加した。

これらの血小板前駆体を5時間培養すると以下のように成熟血小板のように分かれていった。



これらの血小板前駆体を多く含む分画を、正常マウスに輸注をすると、血小板の寿命をみたところ、血小板数は一過性に増加し、以後漸減した。このことは、血小板前駆体から成熟血小板が産生され、その寿命は、正常な血小板と同じだと推測された。

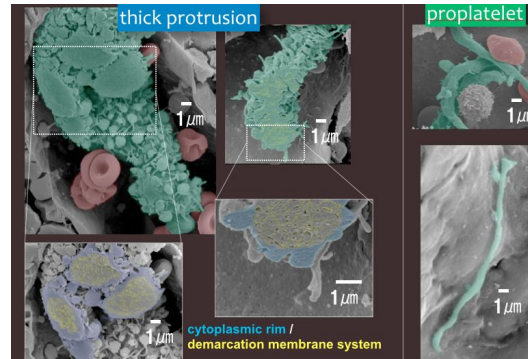
### 血小板前駆体の分裂能（生体内）



3. 走査電子顕微鏡での検討：マウス proplatelet fragment と thick protrusion との差異（特に demarcation membrane system の発達の差異）を明らかにする。

Proplatelet では、demarcation membrane system の発達が悪く、一方、thick protrusion では demarcation membrane system の発達が顕著に認められた。これらから、thick

protrusion はより巨核球に似た成分を有しているものと考えられた。



4. マウス肺組織の病理学的検討：肺動脈、肺静脈での巨核球、proplatelet fragment, preplatelet の存在を確認する(HE染色、免疫染色)。

マウスの肺の毛細血管に、ひっかかっている、血小板前駆体を認めたものの、そこで成熟血小板に変化している像は認められなかった。

以上の結果から、巨核球は成熟血小板を産生しているわけではなく、血小板前駆体を骨髄静脈洞に訪室している。定常状態では、胞体突起形成モデルであり、緊急時の差異は、thick protrusion モデルで血小板前駆体を放出している。前者では、demarcation membrane system の発達が未熟であるものの、後者は十二分に発達している。さらに、これらの血小板前駆体を invitro で培養すると5時間後には私塾血小板のように変化することが明らかとなった。このことから、我々が提唱している血小板産生モデル—巨核球は血小板前駆体を静脈洞に放出し、血管床で成熟血小板に分離・成熟する—が正しいことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計10件)

1. Suzuki Y, Sasaki R, Ito S, Ishida Y Resveratrol suppresses cell proliferation via inhibition of STAT3 phosphorylation and Mcl-1 and cIAP-2 expression in HTLV-1-infected T cells Leuk Res 37(12) 1674-9 201 査読あり DOI:10.1016/j.leukres.2013.09.010
2. Sawai T, Uzuki M, Ishida Y et al. World's first telepathology experiments employing WINDS ultra-high-speed internet satellite, nicknamed "KIZUNA"

- J Pathol Inform 4 24 2013 査読あり  
DOI: 10.4103/2153-3539.119002
3. Ito S, Oyake T, Murai K, Ishida Y.  
Successful use of cyclophosphamide as an add-on therapy for multiple myeloma patients with acquired resistance to bortezomib or lenalidomide  
Case Rep Hematol 651902 2013 査読あり  
DOI: 10.1155/2013/651902
  4. Fujisawa S, Nakamae H, Ishida Y et al.  
Efficacy and safety of dasatinib versus imatinib in Japanese patients with newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia (CML-CP): Subset analysis of the DASISION trial with 2-year follow-up  
Int J Hematol 99(2)141-153 2014 査読あり  
DOI: 10.1007/s12185-013-1470-1
  5. Murai K, Kowata S, Ishida Y et al.  
Bortezomib induces thrombocytopenia by the inhibition of proplatelet formation of megakaryocytes  
Eur J Haematol 93 290-296 2014 査読あり  
DOI: 10.1111/ejh.12342
  6. Kowata S, Isogai S, Ishida Y et al.  
Platelet demand modulates the type of intravascular protrusion of megakaryocytes in bone marrow  
Thrombosis and Haemostasis 112(4) 743-56 2014 査読あり  
DOI:10.1160/TH14-02-0123
  7. Murai K, Akagi T, Ishida Y et al.  
A prospective analysis of clinical efficacy and safety in chronic myeloid leukemia-chronic phase patients with imatinib resistance or intolerance as evaluated using European LeukemiaNet 2013 criteria  
Eur J Haematol 95 558-565 2015 査読あり  
DOI:10.1111/ejh.12536.
  8. Imagawa J, Tanaka H, Ishida Y et al.  
Discontinuation of dasatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained deep molecular response for longer than 1 year (DADI trial): a multicentre phase 2 trial  
Lancet Haematol 2(12)e528-35 2015 査読あり  
DOI: 10.1016/S2352-3026(15)00196-9
  9. Oyake T, Kowata S, Ishida Y et al.  
Comparison of micafungin and voriconazole as empirical antifungal therapies in febrile neutropenic patients with hematological disorders: a randomized controlled trial  
Eur J Haematol 96 602-609 2016 査読あり  
DOI : 10.1111/ejh.12641
  10. Ishida Y, Murai K, Yamaguchi K et al.  
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dasatinib in the chronic phase of newly diagnosed chronic myeloid leukemia  
Eur J Clin Pharmacol 72(2) 185-93 2016 査読あり  
DOI:10.1007/s00228-015-1968-y
- [学会発表](計7件)
1. Yamaguchi K, Murai K, Ishida Y et al.  
Clinical efficacy and safety of dasatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase.  
55<sup>th</sup> ASH Annual Meeting 2013年12月8日-11日 New Orleans (USA)
  2. Murai K, Akagi T, Ishida Y et al.  
The prospective analysis of clinical efficacy and adverse events in CML-CP patients with imatinib resistance or intolerance, evaluated by European LeukemiaNet (ELN) 2013 criteria  
55<sup>th</sup> ASH Annual Meeting 2013年12月8日-11日 New Orleans (USA)
  3. Ishida Y, Murai K, Yamaguchi K et al.  
Pharmacokinetic (PK) & Pharmacodynamics (PD) analysis of dasatinib in chronic phase of newly diagnosed chronic myeloid leukemia (CML-CP)  
55<sup>th</sup> ASH Annual Meeting 2013年12月8日-11日 New Orleans (USA)
  4. Murai K, Kowata S, Ishida Y et al.  
Dasatinib induced thrombocytopenia might be due to the inhibition of proplatelet formation of megakaryocytes via the pathways including Rho/Rock and Rac.  
55<sup>th</sup> ASH Annual Meeting 2013年12月8日-11日 New Orleans (USA)
  5. Shimoyama T, Okano Y, Ishida Y et al.  
Dasatinib is effective in the treatment of mice models with immune thrombocytopenia.  
56<sup>th</sup> ASH Annual Meeting 2014年12月5日-9日 San Francisco (USA)
  6. Murai K, Kowata S, Ishida Y et al.  
Index to predict MMR at 12 months in chronic phase chronic myeloid leukemia patients based on the area under the lymphocyte curve  
56<sup>th</sup> ASH Annual Meeting 2014年12月5日-9日 San Francisco (USA)
  6. Kowata S, Murai K, Ishida Y et al.  
Platelet progenys after leaving bone marrow  
20<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association 2015年6月11日-14日 Vienna
  7. Murai K, Yamaguchi K, Ishida Y et al.  
Velocity of early BCR-ABL transcript elimination as a optimized predictor of deep molecular response in chronic myeloid leukemia patients in chronic phase on treatment with dasatinib  
57<sup>th</sup> ASH Annual Meeting 2015年12月7日 Orland, FL (USA)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：現在作成中

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 陽治 (ISHIDA, Yoji)  
岩手医科大学医学部内科学講座血液腫瘍  
内科分野・教授  
研究者番号：70151389

### (2) 研究分担者

古和田 周吾 (KOWATA, Syugo)  
岩手医科大学医学部内科学講座血液腫瘍  
内科分野・教授  
研究者番号：30418884

### (2) 研究分担者

伊藤 薫樹 (ITO, Shigeki)  
岩手医科大学医学部腫瘍内科学科・教授  
研究者番号：60316362

### (3) 連携研究者