

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460671

研究課題名(和文) 巨核球造血促進因子 “BDNF” による新規血小板造血マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of a novel platelet-biogenesis marker, BDNF

研究代表者

尾崎 由基男 (OZAKI, Yukio)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号：30134539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウス正常巨核球前駆細胞を対象に、脳由来神経栄養因子(BDNF)の正常巨核球への生理作用を検討した。In vitroにおいてBDNFは巨核球の自己増殖を促進したが、多核化や血小板産生は促進せず、BDNFのmegakaryocyte-colony stimulating factorとしての生理作用が示された。しかし、抗血小板抗体を用いた一過性血小板減少症モデルマウスへのBDNF投与は血小板数回復への促進作用をもたらさなかった。昨年、マウスではヒトと異なり巨核球がBDNFを産生しないことが報告された。今後は、マウスに替わるin vivoモデルの構築が必須事項であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) had a novel function which involved in a megakaryocyte differentiation using human megakaryocyte cell-line model, MEG-01. In this study, we investigated whether BDNF affected normal primary megakaryocyte development in mice. BDNF accelerated clonal expansion of primary megakaryocyte progenitor in vitro. On the other hand, megakaryocyte maturation was not promoted by BDNF. These results suggested that BDNF had a potential as a Meg-CSF for primary megakaryocyte. However, BDNF did not show the physiological function to promote a platelet recovery in transient thrombocytopenic mouse model with anti-platelet antibody. Last year, it was reported that mouse megakaryocytes did not produce BDNF, whereas human megakaryocytes produce BDNF and platelets stored abundant BDNF in alpha-granules. To further investigate a BDFN pathophysiological function for in vivo megakaryopoiesis, an alternative in vivo model should be demanded.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血小板 巨核球 BDNF

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の化学療法、骨髄移植などでは、著明な血小板減少がほとんどの症例に認められ、脳出血などの出血事象が大きな臨床的問題となる。これに対しては、血小板輸血などの治療が行われるが、血小板製剤の供給には限りがあり、血小板輸血を継続するか、または中止して良いかの判断が早期にできることが望まれる。

現時点では、骨髄における巨核球の増殖、分化、血小板産生を早期に推定する方法として、網状血小板の測定が行われている。網状血小板は mRNA を多く含む幼若な血小板であり、末梢の血小板数が増加する 2~4 日前に増加するため、末梢血網状血小板数の測定は、血小板産生の早期評価法として提唱されてきた。しかし、網状血小板数増加が認められない、または僅かしか変化しない症例も多く、また網状血小板測定の標準化も十分に行われていない現状であり、臨床的な応用にはまだほど遠い。

巨核球の分化成熟を調節するサイトカインとして最もよく知られているものは、肝臓から産生されるトロンボポイエチン (thrombopoietin; TPO) である。TPO は造血幹細胞からの巨核球への分化、巨核球の clonal expansion, 巨核球の成熟、proplatelet の産生に至るすべての血小板産生の段階に作用することが知られている。TPO 以外の血小板産生に参与するサイトカインとして、主に幼若巨核球の clonal expansion のみを誘導する Meg-CSF (IL-3, GM-CSF など) と、巨核球の成熟を誘導する Meg-POT (IL-6, IL-11, VEGF, TGF- $\beta$  など) が知られている。これまでの研究により、Meg-CSF と Meg-POT の産生は、巨核球の増殖、成熟の時期により切り替わることが予想されている。Meg-CSF の産生が低下し、Meg-POT の産生が増加する切り替わりの時期が推定できれば、網状血小板測定より数日早く血小板産生能の回復を推定することができる。

## 2. 研究の目的

種々の血小板減少症において、血小板産生の回復を早期に評価することは、予後判定、治療法の決定に有用である。我々はこれまで巨核球系腫瘍細胞株 (MEG-01) を用いた研究で、(1) BDNF という新規サイトカインが巨核球造血に参与する事、(2) BDNF は巨核球で産生され、autocrine 的に巨核球の clonal expansion を促進する事、(3) 一方、分化後期の成熟期には内在的 miRNA によって BDNF の産生が抑制される知見を得た。

血中の BDNF は主として巨核球に由来すると考えられるため、巨核球の分化成熟の過程で産生量が大きく変化するであろう BDNF のモニタリングは、巨核球・血小板造血の状態を評価する上で有用であると考えられる。そこで本研究は、巨核球・血小板造

血を血中 BDNF の量的変化により早期に推定することを目標とし、その予備的検討としてマウスモデルを用いて BDNF の巨核球造血への影響を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 正常マウス巨核球前駆細胞の分離

正常マウス巨核球前駆細胞は骨髄および胎仔肝臓細胞から分離した。骨髄からの分離は Dynabeads を用いた Lineage depletion (CD4, CD8, B220, CD90, TER-119, Gr-1, CD11b, F4/80, CD71 陽性細胞の除去) で行った。胎仔肝臓細胞は E13.5 胎生期肝臓を single cell suspension にして実験に用いた。

### (2) Colony expansion assay

骨髄由来巨核球前駆細胞を MegaCult-C によるコラーゲンゲル 3 次元培養法で、TPO 存在下で培養することにより、巨核球前駆細胞の自己増殖能を評価した。巨核球系細胞の検出はアセチルコリンエステラーゼ染色で行い、アセチルコリンエステラーゼ陽性細胞が 3 細胞以上接触している集団をコロニーとしてカウントした。

### (3) フローサイトメトリー

In vitro で分化誘導させた巨核球を CD41 と CD42b で免疫染色し、フローサイトメーターで分化成熟の段階的評価を行った。また、propidium iodide (PI) 染色により分化誘導巨核球の DNA 量を定量的に評価した。

### (4) Proplatelet formation assay

成熟巨核球からの血小板産生に対する評価は胎仔肝臓由来巨核球を用いる proplatelet formation (PPF) assay で評価した。

### (5) 一過性血小板減少モデルマウスの構築

マウスモデルでの一過性血小板減少は「抗血小板抗体の投与」により誘導できる事が知られている。本研究では抗 GPIIb/IIIa 抗体を用いた血小板減少モデルマウスの作製条件を検討した。

### (6) 血小板減少モデルマウスにおける血小板数のモニタリング

構築した各血小板減少モデルマウスは経時的に尾静脈採血を行い、血小板数の計測を測定する。測定は多項目自動血球分析装置 XE-2100 (Sysmex 社) を用いて実施した。

### (7) ELISA

マウス血中 BDNF の測定は Promega 社の BDNF Emax Immunoassay system を用いて実施した。

## 4. 研究成果

(1) In vitro における BDNF の巨核球自己増殖促進作用の検討

マウス骨髄から巨核球前駆細胞を分離し、MegaCul-C によるコラーゲンゲル3次元培養を行い、そこに TPO などの巨核球造血因子とともに BDNF を同時に添加する実験を行った。その結果、骨髄由来巨核球前駆細胞は BDNF の存在下にて有意なコロニー数の増加が認められた (図 1)。

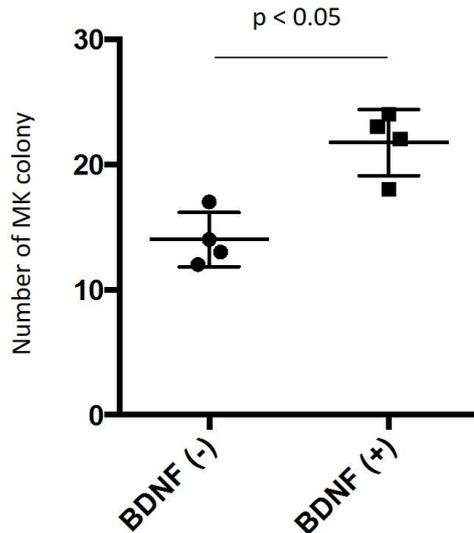


図 1. MegaCult-C による巨核球前駆細胞のコロニーアッセイ

次に、巨核球前駆細胞を通常の液体培地で TPO により巨核球へ分化させ、分化段階における BDNF の生理作用を検討した。CD41 および CD42b 陽性細胞を、成熟段階ごとにフローサイトメトリーで検出し、未熟巨核球系細胞 (CD41 陽性 CD42b 陰性) 成熟巨核球系細胞 (CD41 陽性 CD42b 陽性) として段階分けした。その結果、統計学的有意差は認められなかったものの、BDNF 添加細胞群において CD41 陽性 CD42b 陰性の未熟巨核球フラクションの増加傾向が認められた (図 2)。

以上の結果から、BDNF は in vitro において、正常マウス巨核球系細胞の自己増殖を促進することが明らかになった。

### (2) In vitro における BDNF の巨核球の成熟と血小板産生に対する作用の検討

続く検討として、BDNF の巨核球の成熟に関する検討を行った。巨核球の成熟の評価項目として多核化 (ploidy) と血小板産生能が挙げられる。検討の結果、巨核球の多核化と血小板産生について、BDNF による促進的な作用は認められなかった。以上の結果から、BDNF の in vitro における巨核球造血作用は前駆細胞を含む未熟巨核球の自己増殖に特異的なものであることが示唆された。

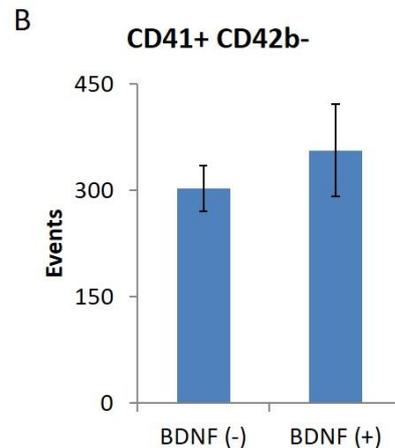
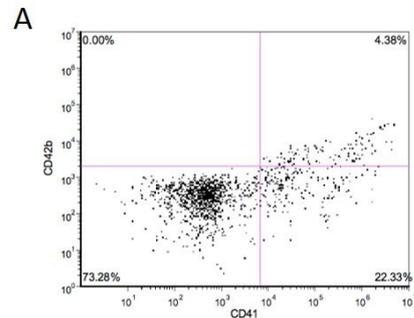


図 2. BDNF による未熟巨核球フラクション (CD41 陽性 CD42b 陰性) の増加作用. A) CD41 と CD42b の発現パターンで分画した巨核球の代表的フローサイトメトリースキャッタグラム. B) 未熟巨核球分画 (CD41 陽性 CD42b 陰性) における BDNF 添加・非添加群の定量的評価結果

### (3) 抗血小板抗体による一過性血小板減少症モデルマウスに対する BDNF の生理的作用の検討

抗血小板抗体は Emfret 社の抗 GPIb 抗体 (R300) を用い、野生型マウス (C57BL/6) に 3mg/kg の投与量で腹腔内投与した。抗血小板抗体投与後 48 時間後 (day2) から 24 時間毎に 5 回、0.5µg/body の投与量でリコンビナント BDNF を腹腔内投与した。抗血小板抗体投与後 72 時間 (day3)、120 時間 (day5)、168 時間 (day7) に尾静脈から採血し、血小板数を計測した。検討の結果、対照である PBS 投与群と BDNF 投与群の血小板回復動態は差を認めなかった (図 3)。

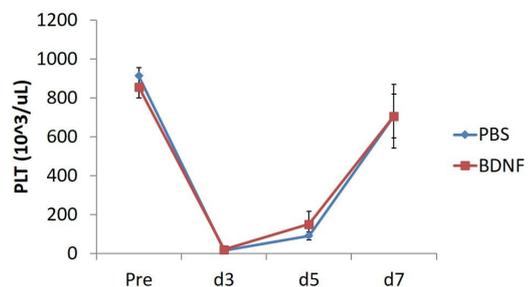


図 3. R300 誘導血小板減少症モデルマウスにおける BDNF 投与実験

本研究では、マウス血中 BDNF のモニタリングのために ELISA による測定も試みた。しかしながら、血漿、血清、骨髄溶解液すべてで BDNF を ELISA で検出することができなかった。昨年、ヒト巨核球は BDNF を産生し、血小板にも多量の BDNF が貯蔵されているものの、マウス巨核球は BDNF を産生しないことが報告された (Fernandez P et al., JBC, 2016, 291(19): 9872-9881)。これはマウスをモデルとした in vivo の検討が不適であることを示す。我々の過去の検討でもヒト巨核球と血小板には BDNF が多量に貯蔵されていることを確認している。In vitro の結果ではあるものの、BDNF はマウス正常巨核球前駆細胞に対して clonal expansion を誘導する Meg-CSF 作用が示すため、巨核球には BDNF により惹起される内在的なシグナルが存在するのだと考えられる。BDNF がヒトにおいては、巨核球・血小板造血に関わる重要なサイトカイン (Meg-CSF) である可能性は依然として高いと思われるが、骨髄における巨核球造血の状態を把握するバイオマーカーとして BDNF を応用するためにはさらなる検討が必要である。巨核球・血小板造血における BDNF の病態生理学的意義の解明に向けた今後の課題としては、マウスに替わる適切な実験モデルの構築が急務事項として挙げられる。

#### 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 (査読有)] (計 13 件)

風間文智, 雨宮憲彦, 畑山一貴, 伏見美津恵, 桐戸啓太, 尾崎由基男, 芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍 (BPDCN) の形態多様性. 日本検査血液学会雑誌. 2014; 15:386-395

Kono H, Fujii H, Suzuki-Inoue K, Inoue O, Furuya S, Hirayama K, Akazawa Y, Nakata Y, Sun C, Tsukiji N, Shirai T, Ozaki Y. The platelet-activating receptor C-type lectin receptor-2 plays an essential role in liver regeneration after partial hepatectomy in mice. J Thromb Haemost. 2017 May;15(5):998-1008. doi: 10.1111/jth.13672.

Shirai T, Inoue O, Tamura S, Tsukiji N, Sasaki T, Endo H, Satoh K, Osada M, Sato-Uchida H, Fujii H, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K. C-type lectin-like receptor 2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice. J Thromb Haemost. 2017 Mar;15(3):513-525. doi: 10.1111/jth.13604.

Suzuki-Inoue K, Osada M, Ozaki Y.

Physiologic and pathophysiologic roles of interaction between C-type lectin-like receptor 2 and podoplanin: partners from in utero to adulthood. J Thromb Haemost. 2017 Feb;15(2):219-229. doi: 10.1111/jth.13590.

Ozaki Y, Tamura S, Suzuki-Inoue K. New horizon in platelet function: with special reference to a recently-found molecule, CLEC-2. Thromb J. 2016 Oct 4;14(Suppl 1):27.

Tamura S, Suzuki-Inoue K, Tsukiji N, Shirai T, Sasaki T, Osada M, Satoh K, Ozaki Y. Podoplanin-positive periarterolar stromal cells promote megakaryocyte growth and proplatelet formation in mice by CLEC-2. Blood. 2016 Mar 31;127(13):1701-10. doi: 10.1182/blood-2015-08-663708.

Kazama F, Nakamura J, Osada M, Inoue O, Oosawa M, Tamura S, Tsukiji N, Aida K, Kawaguchi A, Takizawa S, Kaneshige M, Tanaka S, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y. Measurement of soluble C-type lectin-like receptor 2 in human plasma. Platelets. 2015;26(8):711-9. doi: 10.3109/09537104.2015.1021319.

Inoue O, Hokamura K, Shirai T, Osada M, Tsukiji N, Hatakeyama K, Umemura K, Asada Y, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y. Vascular Smooth Muscle Cells Stimulate Platelets and Facilitate Thrombus Formation through Platelet CLEC-2: Implications in Atherothrombosis. PLoS One. 2015 Sep 29;10(9):e0139357. doi: 10.1371/journal.pone.0139357.

Ohkawa R, Kurano M, Mishima Y, Nojiri T, Tokuhara Y, Kishimoto T, Nakamura K, Okubo S, Hosogaya S, Ozaki Y, Yokota H, Igarashi K, Ikeda H, Tozuka M, Yatomi Y. Possible involvement of sphingomyelin in the regulation of the plasma sphingosine 1-phosphate level in human subjects. Clin Biochem. 2015 Jul;48(10-11):690-7. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.03.019.

Akahane K, Satoh K, Ohta M, Ozaki Y. Hot Water Extracts of the Royal Sun Mushroom, *Agaricus brasiliensis* (Higher Basidiomycetes), Inhibit Platelet Activation via the P2Y1 Receptor. Int J Med Mushrooms. 2015;17(8):763-70.

Iino J, Osada M, Kurano M, Kaneko M, Ohkawa R, Satoh Y, Okubo S, Ozaki Y, Tozuka M, Tsuno NH, Yatomi Y.

Platelet-derived sphingosine 1-phosphate induces migration of Jurkat T cells. *Lipids Health Dis.* 2014 Sep 25;13:150. doi: 10.1186/1476-511X-13-150.  
Kimura Y, Takano K, Satoh K, Aida K, Kobayashi T, Ozaki Y. Aspirin Half Maximal Inhibitory Concentration Value on Platelet Cyclooxygenase1 in Severe Type-2 Diabetes Mellitus is not Significantly Different from that of Healthy Individuals. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2014 Sep;20(6):629-36. doi: 10.1177/1076029613488934.  
Jin JW, Inoue O, Suzuki-Inoue K, Nishikawa G, Kawakami Y, Hisamoto M, Okuda T, Ozaki Y. Grape seed extracts inhibit platelet aggregation by inhibiting protein tyrosine phosphatase. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2014 Apr;20(3):278-84. doi: 10.1177/1076029613481103.

〔雑誌論文(査読無)〕(計16件)

尾田村彰吾, 尾崎由基男, 小島哲人, 井上克枝. 血小板・巨核球造血微小環境を構成する骨髄間質細胞. *日本血栓止血学会誌.* 2017; 28:59-63  
佐藤金夫, 長田誠, 尾崎由基男. 血小板機能検査. *臨床検査.* 2016; 60:136-143  
河野寛, 井上克枝, 尾崎由基男, 藤井秀樹. 血小板研究の最近の進歩 血小板の肝再生における役割. *医学のあゆみ.* 2014; 251:158-163  
尾崎由基男. 一般内科以外らで見る出血傾向. *内科.* 2014; 114:199-202  
崎由基男. 生理的止血機構とその破綻による止血異常-病態の理解とその診断・治療戦略への活用-. *Medical Practice.* 2014;31(1):6-12  
尾崎由基男. 【臨床検査-ここまで進んだ検査の世界】実地医家に必要な検査. *診断と治療.* 2014;102:101-109

〔学会発表(査読有)〕(計4件)

井上克枝, 新森英之, 長田誠, 白井俊光, 望月ちひろ, 小嶋聡一, 斎藤臣雄, 佐々木知幸, 井上修, 尾崎由基男. ポドブリン結合阻害能を持つ CLEC-2 結合低分子化合物リガンド. 第 38 回日本血栓止血学会学術集会. 2016 年 6 月 17 日. 奈良春日野国際フォーラム(奈良県・奈良市)  
佐藤金夫, 畑山一貴, 尾崎由基男, 雨宮憲彦, 井上克枝. 全自動血液凝固測定装置 CS2000i による血小板凝集能の測定. 第 38 回日本血栓止血学会学術集会. 2016 年 6 月 17 日. 奈良春日野国際フォーラム(奈良県・奈良市)

佐々木知幸, 白井俊光, 築地長治, 田村彰吾, 長田誠, 佐藤金夫, 尾崎由基男, 井上克枝. 遺伝子組換えロドサイチンを用いた CLEC-2 依存性血小板凝集の制御解析. 第 38 回日本血栓止血学会学術集会. 2016 年 6 月 17 日. 奈良春日野国際フォーラム(奈良県・奈良市)  
築地長治, 井上修, 田村彰吾, 白井俊光, 佐々木知幸, 佐藤金夫, 尾崎由基男, 井上克枝. 血小板 CLEC-2 は肺中皮細胞分化を介して呼吸機能獲得に寄与する. 第 38 回日本血栓止血学会学術集会. 2016 年 6 月 17 日. 奈良春日野国際フォーラム(奈良県・奈良市)

〔その他〕

ホームページ等  
山梨大学大学院総合研究部 臨床検査医学講座ホームページ  
<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin0lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 由基男 (OZAKI, Yukio)  
山梨大学・総合研究部・医学研究員  
研究者番号：30134539

(2) 研究分担者

佐藤 金夫 (SATO, Kaneo)  
山梨大学・総合研究部・助教  
研究者番号：20242662

(3) 研究分担者

田村 彰吾 (TAMURA, Shogo)  
名古屋大学・医学系研究科(保健)・助教  
研究者番号：60722626