

経口血小板増加薬 YM477 の薬理学的作用に関する研究

新谷 麻理

略語一覧

ADP	Adenosine diphosphate (アデノシン二リン酸)
ATP	Adenosine triphosphate (アデノシン三リン酸)
BFU-E	Burst-forming unit-erythroid (赤芽球バースト形成細胞)
BSA	Bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)
CD	Cluster of differentiation (白血球分化抗原：細胞の表面抗原を認識する抗体を整理した分類)
CFC	Colony forming cell (コロニー形成細胞)
CFU-GM	Colony forming unit-granulocyte macrophage (顆粒球マクロファージ形成細胞)
CFU-Mix	Colony forming unit-mix (顆粒球/マクロファージ/巨核球混合コロニー形成細胞)
CFU-Mk	Colony forming unit-megakaryocyte (巨核球コロニー形成細胞：巨核球系前駆細胞と同義)
c-Mpl (c-mpl)	c-Myeloproliferative leukemia protein (TPO 受容体)
DMSO	Dimethyl sulfoxide (ジメチルスルホキシド)
ECD	Extracellular domain (細胞外ドメイン)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetate (エチレンジアミン四酢酸)
EPO	Erythropoietin (エリスロポエチン：赤血球産生を促進する造血因子)
FBS	Fetal bovine serum (ウシ胎児血清)
FDA	Food and Drug Administration (米国食品医薬品局)
FITC	Fluorescein isothiocyanate (フルオレセインイソチオシアネート：蛍光色素の一種)
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor (顆粒球コロニー刺激因子)
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)
GP	Glycoprotein (糖タンパク)
HEL	Human erythroleukemia (ヒト赤白血病細胞)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタン-1-スルホン酸)
HLA	Human leukocyte antigen (ヒト白血球型抗原)
HTS	High throughput screening (ハイスループットスクリーニング)
ICD	Intracellular domain (細胞内ドメイン)
IL-3	Interleukin-3 (インターロイキン-3)
IL-6	Interleukin-6 (インターロイキン-6)
IL-11	Interleukin-11 (インターロイキン-11)
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium (イスコフ改変ダルベッコ培地)
ITP	Idiopathic thrombocytopenic purpura (特発性血小板減少性紫斑病：原因不明の後天性血小板減少症)
LIF	Leukemia inhibitory factor (白血病阻止因子)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ)
MDS	Myelodysplastic syndrome (骨髄異形成症候群：骨髄機能の異常によって前白血球状態となり、造血障害を起こす疾患)
NK	Natural killer (ナチュラルキラー)
NOD/SCID	Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (非肥満性糖尿病/重症)

	複合免疫不全症)
PAR-1	Protease-activated receptor-1 (プロテアーゼ活性化受容体-1：トロンビン受容体の一種)
PBS	Phosphate buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)
PDGF	Platelet-derived growth factor (血小板由来成長因子)
PE	Phycoerythrin (フィコエリスリン：蛍光色素の一種)
PEG-rHuMGDF	Pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (ペグ化遺伝子組み換えヒト巨核球増殖分化因子)
PerCP	Peridinin chlorophyll protein (ペリオジニクロロフィルタンパク：蛍光色素の一種)
PGE ₁	Prostaglandin E ₁ (プロスタグランジン E ₁)
PI	Propidium iodide (ヨウ化プロピジウム：核酸染色試薬)
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase (イノシトールリン脂質 3 キナーゼ)
PPP	Platelet poor plasma (乏血小板血漿)
PRP	Platelet rich plasma (多血小板血漿)
rhTPO	Recombinant human thrombopoietin (遺伝子組み換えヒトロンボポエチン)
SCF	Stem cell factor (幹細胞因子)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-poly-acrylamide gel electrophoresis (ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)
SE	Standard error (標準誤差)
TGF- β	Transforming growth factor- β (トランスフォーミング増殖因子ベータ)
TPO	Thrombopoietin (トロンボポエチン：血小板産生を促進する造血因子)
TRAP	Thrombin receptor agonist peptide (トロンビン受容体活性化ペプチド：プロテアーゼ活性化受容体 PAR-1 を特異的に活性化させるペプチド)
vWF	von Willebrand factor (フォンヴィレブランド因子：血漿中に存在する止血に必要な因子の一つ)

目次

略語一覧

序論	1
第1章 TPO 受容体作動薬の探索および <i>in vitro</i> における薬理作用の検討	14
1.1 緒言	14
1.2 実験方法	14
1.3 結果	20
1.4 まとめと考察	28
第2章 YM477 の作用の種特異性の検討	30
2.1 緒言	30
2.2 実験方法	30
2.3 結果	31
2.4 まとめと考察	34
第3章 ヒト血小板造血を反映した <i>in vivo</i> 実験系の確立と YM477 の ヒト血小板増加作用の評価	35
3.1 緒言	35
3.2 実験方法	36
3.3 結果	40
3.4 まとめと考察	54
第4章 YM477 の血小板の活性化および凝集に及ぼす影響の検討	57
4.1 緒言	57
4.2 実験方法	58
4.3 結果	60
4.4 まとめと考察	70
第5章 YM477 の TPO 受容体への作用部位の検討	72
5.1 緒言	72
5.2 実験方法	72
5.3 結果	76

5.4	まとめと考察	80
第 6 章	造血幹細胞の分化に対する YM477 と TPO の併用効果の検討	82
6.1	緒言	82
6.2	実験方法	82
6.3	結果	83
6.4	まとめと考察	89
総括		91
参考文献		97
主論文目録		106
謝辞		107

序論

血小板は止血に重要な役割を果たしている。出血は血管が破綻し、血液が血管外に流出することにより起こる。その際、損傷し、露呈した血管内皮下組織のコラーゲンに血小板が付着するが、このとき糊の役割を果たすのが血漿中の von Willebrand 因子 (von Willebrand factor, vWF) である。vWF がコラーゲンと結合すると立体構造変化を起こし、血小板膜上の糖蛋白 (Glycoprotein, GP) Ib-V-IX 複合体と結合する。内皮下組織に粘着した血小板は活性化され、血小板膜上の GP IIb/IIIa が構造変化を起こしてフィブリノゲンと結合するようになり、フィブリノゲンは GP IIb/IIIa との結合部位を 2 カ所持つためフィブリノゲンを介して血小板同士が結合する (Figure 0-1) (1)。このようにして血小板凝集塊が形成される。

血小板凝集塊を主体とする血液細胞塊は、血管破綻部を機械的に閉塞して止血を行う (一次止血)。血管破綻部の局所血管は収縮して血流を減少させ一次止血を助ける。こうして形成された血栓 (一次止血栓) は機械的にもろく、血流圧、外力などにより再び崩壊して出血する。そのため、一次止血栓を補強して安定的な血栓を完成させるべく、血漿中に存在している血液凝固因子の活性化が起こり、フィブリノゲンが不溶性のフィブリンに変化し (二次止血)、最終的には血小板その他の細胞間にフィブリンが析出して、止血栓を強固にする (二次止血栓)。やがて血管内皮細胞が止血栓の表面を覆い、血管の修復が完成するとともに、血栓は線維素溶解現象 (フィブリン繊維が蛋白質分解酵素によって溶解される現象) や白血球の貪食によって除去される。このように、血小板は一次止血において重要な働きをしており、その量的・質的な異常が出血傾向を左右し、生命を脅かすことも少なくない (2)。

血小板の異常は、血小板の粘着反応障害、凝集不全等に代表される質的異常と、血小板の過多と減少といった量的異常に分けて考えることができる。末梢血中の血小板数の基準範囲は、おおむね 150,000-350,000/ μL であり、400,000/ μL 以上の状態を血小板増加症、100,000/ μL 以下の状態を血小板減少症という。血小板増加症で主に問題となるのは血栓である。一方、血小板が減少した場合には、出血傾向の増大が大きな問題となる。血小板数は、通常末梢血中で 100,000/ μL 以下になっても出血傾向は現れないものの、50,000/ μL 以下になると弱い打撲等による出血斑が認められ、20,000/ μL 以下になると紫斑に加えて粘膜、皮下の自然出血が出現し、治療が必要となる (3)。

血小板数が著しく減少する機序および疾患として、血小板の産生低下 (骨髄異形成症候

群 (Myelodysplastic syndrome, MDS)、再生不良性貧血等)、破壊亢進や消費 (特発性血小板減少性紫斑病 (Idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) 等)、分布異常 (肝硬変等)、体外への喪失または希釈が挙げられる (4)。特に、骨髄移植患者、癌や造血器腫瘍などの治療として化学療法を受けている患者にとって、血小板減少症は出血の危険性のみならず、原疾患の治療のために行われている化学療法の強度の制限につながり、生命を脅かしかねないため、深刻な問題の一つとなっている。また、残念なことに、そのような患者の血小板数の回復速度は通常よりも遅い。

血小板減少症患者に対する治療としては現在では血小板輸血が非常に重要な地位を占めているが (5)、血小板減少症患者に血小板を輸血するとその効果は認められるものの、同種免疫の発生、発熱・移植片対宿主反応、感染等の弊害が起こる可能性があるのも事実である。また、繰り返し血小板輸血が必要な患者の 15-20%前後は、ヒト白血球型抗原 (Human leukocyte antigen, HLA) アロ抗原の感作により、輸血不応性になるとされている。そして、最近では複数ドナーよりも単一ドナーからの血小板輸血が望まれる傾向があり、その結果、治療費の高額化につながる (6,7)。また、血小板輸血の使用量について、日本では多剤併用化学療法、造血幹細胞移植療法の普及に伴って増加傾向が見られていた。2003 年に供給された血小板製剤のデータを過去のものと比較すると、1994 年の 1.2 倍、1986 年の 2.6 倍となっている。ここ数年の血小板供給量は、厚生労働省、日本赤十字社より血小板輸血の適正利用が勧告されたこともあって、横ばいになってはいるものの、少子高齢化で献血者の減少が懸念される昨今の状況と、血小板製剤の短い保存期間のために起こる供給不足、緊急時の供給体制の問題が依然として残っている (5,8)。現在の血小板輸血を取り巻く状況下においては、血小板減少症の治療には、安全性の向上および予防、医療費の抑制という観点から取り組む必要があると考えられる (6-8)。

血小板は、その存在を示唆する報告がなされたのは 19 世紀後半である。その時すでに血液中の有形成分として、赤血球は 17 世紀に、白血球は 18 世紀にその存在が知られており、これは第三の有形成分としての報告であった。初めて血小板と思われる小粒子を報告した研究者として、W. Addison と W. Osler が挙げられ、特に Osler は小粒子が血管内では互にくっつくことはなく、血管の外へ出てはじめて塊をつくり、さらにフィブリン形成に伴い偽足を出すという特徴に言及しており、その意味では血小板をはじめて記載した研究者といえる。J.H. Wright は 1906 年にこの第三の有形成分を blood plate と名付け、後に platelet

として一般に受け入れられるようになった (9)。一方、巨核球は Robin により 1864 年に初めて記載され、1891 年に Howell が megakaryocyte の名称を提唱した。巨核球と血小板の関係、すなわち血小板の母細胞が巨核球であることを明らかにしたのは前述の Wright であり、巨核球の胞体に血小板が付着していることを明らかにした (6)。

血小板を含む血球は、生後は骨髄中で産生されるが、胎児期には骨髄以外の臓器で造られる。胎生 3 週目頃に卵黄囊中に原始赤芽球が見られはじめ、これを取り囲むように血管内皮細胞ができる (血島)。胎生 2 ヶ月ごろから肝臓において赤血球、白血球、血小板の 3 血球系統の造血が始まり、少し遅れて脾臓での造血が行われる。骨髄は胎生 4 ヶ月ごろから造血を始める。骨髄における造血は次第に増大し、胎生 7 ヶ月頃には肝と入れ替わるように主要な造血の場となる。

様々な血球を産生する骨髄には、造血幹細胞という血球共通の母細胞が約十万分の一の頻度で存在する (10,11)。この造血幹細胞の大きな特徴は、複数の血球系に分化する多分化能および自己複製能を持つことである。これらの能力は、造血幹細胞がサイトカイン等種々の造血因子の刺激を受けて、各血球へ方向付けされ、分化していくのに従い、次第に失われていく。また、造血幹細胞から各血球系への分化の過程において、細胞表面に発現している CD 抗原と呼ばれるマーカーが変化するため、CD 抗原 (Cluster of differentiation antigens, CD antigens) の測定により各細胞の分化段階を識別することができる (Figure 0-2) (12,13)。

造血幹細胞から血小板への分化は、骨髄において造血幹細胞がインターロイキン 3 (Interleukin-3, IL-3)、インターロイキン 11 (Interleukin-11, IL-11)、トロンボポエチン (Thrombopoietin, TPO) 等のサイトカイン刺激を受け巨核球コロニー形成細胞と呼ばれる前駆細胞に、さらには巨核芽球と呼ばれる巨核球のなかでも未熟な細胞に分化することから始まる (Figure 0-2)。この間に細胞は数回から数十回程度の分裂を繰り返す。さらに巨核球へと分化が進むと、核染色体数は 4 – 32 倍体と指数関数的に増加する。細胞質は核染色体数が増加するにも関わらず、細胞分裂を起こさないため (エンドマイトーシス)、細胞質のサイズは大きくなり成熟巨核球へと分化・成熟していき、血小板分離膜システム等が発達してくる。成熟した巨核球は骨髄静脈洞の血管内皮細胞直下に多く認められるようになる。細胞質の数箇所に小隆起が出現し、やがて細胞質から細長い細胞突起が形成され、突起は伸縮を繰り返しながら成長していく。突起には数珠状に血小板の原型 (プロプレートレット) である小腫瘤が形成されるようになる。巨核球の細胞突起は血管内皮細胞のホールから静脈洞内へ侵入し、この数珠状の突起が流血中で遊離され (1 回につき約 2,000 個の 2-4 μm

の血小板) 血小板が誕生するものと考えられている (5)。この過程を 4 回ほど繰り返すうちに、細胞質がなくなって、巨核球は死滅する (3)。

このような過程を経て産生される血小板は、無核である。従って、血小板は自ら増殖することができない。血小板の表面は突起がなく滑らかだが、細胞膜が細胞質に向かって陥入している開放小管系の入口の部分にあたる数個程度の穴が表面に存在する。この開放小管系は血小板の顆粒に存在する物質の放出経路になる。血小板の内部には、ミトコンドリア、ゴルジ体、リソソームが、また、血小板に特徴的な小器官として α 顆粒、濃染顆粒、暗調小管系等が存在する。 α 顆粒は血小板の中で最も数が多い顆粒で、血小板由来成長因子 (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF)、トランスフォーミング増殖因子- β (Transforming Growth Factor- β , TGF- β)、フィブリノゲン、vWF 等のサイトカインや粘着性蛋白質が存在する。中心部が黒く見えることからその名が付いた濃染顆粒には、ADP、ATP、カルシウムなどが含まれている。濃染顆粒の数は少なく、血小板あたり数個しか存在しない。暗調小管系は滑面小胞体に相当する環状の小器官でカルシウムが貯蔵されているために暗く染まって観察される。さらに血小板には細胞の骨組みとなる細胞骨格 (微小管、アクチンフィラメント等) が豊富に存在し、円盤状の形態を維持するために重要な役割を果たしている。

血小板はその形を維持したまま血液中を 1 μ L あたり約 20 万個程度流れている。血小板の数は、骨髓における血小板産生と末梢血液中の血小板崩壊の均衡によって保たれている。また、総血小板数の約 1/3 が脾臓の血小板プールに存在しており、2/3 が循環血液中に存在しているが、約 10 日で肝臓、脾臓の食細胞系によって破壊される (3)。

多分化能を持つ造血幹細胞から巨核球と血小板が産生されるにあたり、様々なサイトカインが関与していることが知られている。これらのサイトカインについて明らかになってきたのは血小板の発見からずいぶん後の 1980 年頃のことである (6)。

現在までに、巨核球系細胞の分化、成熟に関して、IL-3、インターロイキン 6 (Interleukin-6, IL-6)、IL-11、幹細胞因子 (Stem cell factor, SCF)、TPO、白血病阻止因子 (Leukemia inhibitory factor, LIF)、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、エリスロポエチン (Erythropoietin, EPO) が、主なサイトカインとして関与することが判明している (7)。その中でも、TPO、IL-3、IL-6、IL-11、LIF は有意に血小板産生を刺激する。しかし、IL-3、IL-6 は副作用が強く、臨床には用いられていない。臨床に応用されているサイトカインは現在のところ IL-11 (oprelvekin, Neumega[®], Wyeth) のみである。Oprelvekin は化学療法後

の血小板減少症の二次予防を目的にその使用が FDA から認可された。Oprelvekin は、遺伝子組み換え技術を用いて大腸菌によって産生される 19 kDa の糖鎖のない蛋白製剤であり、全長は 177 アミノ酸残基で、天然の IL-11 (178 アミノ酸残基) と比べ、N 末端側のプロリン残基を欠いているが、薬理活性に差はないとされている (8)。臨床研究では、化学療法後の血小板減少の程度を軽減し、血小板輸血を回避できることが分かっているが、IL-11 遺伝子を破壊したマウスでは、血小板減少がみられないことから、IL-11 は恒常的血小板産生にはあまり関与していないと考えられる (14)。また、oprelvekin には水分貯留、肺水腫等の副作用が認められていることから (15)、副作用の少ない血小板増加薬の登場が待たれている。

TPO は、血小板の産生を特異的に促進する因子として 1950 年代後半にその存在が推定されていた。1970 年代以降、細胞培養技術や遺伝子工学の発展に伴い、物質としての TPO を探索する研究が盛んになった。しかし、長い間、TPO は同定されず、実態は不明のままであったため、存在そのものが疑問視され、幻の因子と言われていたことがあった (5)。

そのような中、1994 年にジェネンテック社、ザイモジェネティック社、アムジェン社、キリンビール社から TPO のクローニングに成功したとの報告がなされた (7,16-19)。

ヒト TPO cDNA から推定される TPO 蛋白質は 332 アミノ酸残基からなり、2 つのドメイン構造を示す (Figure 0-3)。N 末端側のドメインは 2 つのジスルフィド結合のための 4 つのシステイン残基を有し、TPO 受容体との結合領域を形成している。すなわち、N 末端側ドメインが活性領域であり、C 末端側ドメインを欠失した部分長の N 末端側ドメインだけで活性を示す。N 末端側ドメインは赤血球増加因子である EPO と高いホモロジーを示す。一方、C 末端側ドメインは 6 つのアスパラギン結合型糖鎖付加部位を含み、グリカンドメインとも呼ばれる。また、セリン/スレオニン結合型糖鎖付加部位は C 末端側ドメインに限らず分子の各所に存在する。実際にヒト TPO cDNA を動物細胞で発現させると、糖鎖が豊富な TPO が産生される。ヒト血液中の TPO を解析した結果から、ヒト体内で産生される TPO は糖鎖を有した全長サイズの蛋白質であることが明らかになっている (20)。

TPO の種間の相同性について、TPO の C 末端側ドメインはヒトとマウスにおいて 74% であるのに対し、TPO 受容体との結合ドメインである N 末端側の相同性は 93% にもなる (21)。その結果から予想されるように、正常のマウスにヒト TPO を投与した場合、血小板数ならびに巨核球数の増加が認められる。さらにはラット、イヌ、霊長類でも同様にこれらの増加が認められている (7)。したがって、TPO が種を超えて作用することから、TPO の種差は

小さいと考えることができる。

TPO の主要産生臓器は肝臓であるが、腎臓、骨髄、筋肉、腸管などのほとんどの組織で弱いながらも TPO mRNA の発現が認められる。特に、肝臓においては、肝実質細胞で産生されることがラットで証明されている。ヒトでは血小板減少を伴った肝硬変患者の TPO 濃度は低値を示し、同所性肝移植で TPO 濃度の回復が報告されており、血液中の TPO は肝細胞での産生が主であることを示されている。しかし、高度の肝硬変でも血中濃度は正常と変わらないなど、肝臓での産生のみでは説明できないことも多い (6)。

造血因子は、一般的にその標的細胞が減少すると、血中濃度が上昇すると考えられている。TPO についても、その産生が一定であれば、血小板あるいは巨核球が減少すると、血小板あるいは巨核球の TPO 受容体に結合する TPO は減少し、TPO の血中濃度は上昇すると考えられる。これは、巨核球前駆細胞の増殖、未熟巨核球の成熟促進をもたらすこととなり、結果として血小板産生方向に向かわせると考えられる。逆に血小板増加あるいは巨核球増加が生じると、TPO は過剰にこれら細胞に結合し、TPO の血中濃度は低下すると考えられる。すなわち、血小板数または巨核球数→血中 TPO 濃度→巨核球前駆細胞の分裂・未熟巨核球の成熟の間にサイクルがあり、TPO と TPO 受容体の結合を介して血中 TPO 濃度を調節することにより血小板の産生調節を行っていると考えられる。

TPO 受容体は c-Mpl と呼ばれる。マウス骨髄増殖性白血病ウイルス (myeloproliferative leukemia virus) のがん遺伝子産物 v-Mpl と相同性を有し、その遺伝子のクローニングもその相同性によってなされたために、c-Mpl の名称がある (22)。TPO が TPO 受容体に結合することで、細胞内情報伝達を開始する。例えば、Jak2 チロシンキナーゼが活性化され、転写因子である STAT3 や STAT5 がリン酸化される。また、Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) 経路、Phosphoinositide-3 Kinase (PI3K) / Akt 経路も活性化される (Figure 0-4) (23)。

c-Mpl は、TPO のクローニングに先立ち、1992 年にクローニングされた。200 アミノ酸からなるドメインを 2 つもち、さらにこのドメインは造血系 (EPO 等) や免疫系 (IL-2、3 等) の受容体が分類されるクラス I サイトカイン受容体に特有の 4 つのシステイン残基と WSXWS (Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser) モチーフを持つことから (Figure 0-5) (24)、c-Mpl が何らかの造血因子の受容体であることが推定された。1993 年に、c-mpl に対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドを用いた実験で巨核球の増殖が抑制されることが示され、c-Mpl のリガンドが TPO である可能性が示唆された。そして、1994 年に c-Mpl リガンドとして TPO がクローニングされるに至った。

c-Mpl の種間の相同性については、ヒトとマウスの c-Mpl のアミノ酸配列は 81%の相同性が認められ、特に細胞質内ドメインでは 91%の相同性が認められている (25)。また、カンクイザルとアカゲザルの c-Mpl のアミノ酸配列も、ヒトのそれと高い相同性を示し、特にカンクイザルでは 96%の相同性が認められている (26)。

TPO またはそのレセプター遺伝子のノックアウトマウスにおいて、マウスの血小板が 9割減少することから、TPO は巨核球、血小板造血に重要な役割をもつ造血因子であることが確認されている (27)。また、正常マウスへ TPO の改変体の 1 つであるペグ化遺伝子組み換えヒト巨核球増殖分化因子 (Pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor, PEG-rHuMGDF) を投与した実験では、骨髓巨核球のサイズ、多倍体化、細胞数が一過性に増加した後、血小板数の増加が認められた。これは、PEG-rHuMGDF の投与により、骨髓での巨核球造血が刺激された結果として血小板の産生が亢進したためと考えられた。また、骨髓抑制により血小板減少を惹起させたマウスへの PEG-rHuMGDF の投与において血小板数の回復が促進された。

以上の結果より、TPO が血小板の産生に深く関わっていることが示唆され、TPO が血小板減少症の治療薬となる可能性が考えられた。そのため、TPO の臨床開発が積極的に行われることとなり、PEG-rHuMGDF およびコンビナントヒト TPO (Recombinant human TPO, rhTPO) の 2 つの TPO 製剤の開発が進められた。

固形癌や血液悪性腫瘍患者における化学療法後の血小板減少症の抑制および ITP での血小板減少症の改善を目的とした臨床試験において、PEG-rHuMGDF の投与にて血小板増加作用が認められた。しかしながら、骨髓移植患者の化学療法後の血小板減少症の改善を目的とした臨床試験では、期待された血小板輸血必要量の減少などが認められず、有効性が実証されなかった。1998 年には、悪性腫瘍患者における化学療法後の血小板減少症を適応とした別の試験および健常人における血小板採取を適応とした試験において、PEG-rHuMGDF を投与された患者および健常人の体内で PEG-rHuMGDF に対して中和抗体が誘導された。その中和抗体が内因性の TPO の作用を抑制した結果、患者および健常人にて血小板減少症が発現したことから、臨床試験は中断を余儀なくされた (28,29)。

さらに、rhTPO を投与された患者でも抗体が産生されていることが報告されており (30)、このことから、TPO には高い免疫原性があると考えられた。

そこで本研究では、感染や TPO がもつ免疫原性の問題を持たない、経口投与可能な低分

子血小板増加薬として、TPO 受容体作動薬の創製に取り組むこととした。本研究は 6 章から構成されている。以下に本研究の検討項目を示した。

第 1 章 TPO 受容体作動薬の探索および *in vitro* における薬理作用の検討

TPO 受容体作動薬の探索を目的としてハイスループットスクリーニング (High-throughput screening, HTS) を実施した。HTS によって見出された化合物 2-acylaminothiazole 誘導体をリード化合物として化合物の構造の最適化を行った結果、YM477 を見出した。YM477 について、ヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞の増殖活性および造血幹細胞の巨核球への分化促進作用を調べることで、TPO の作用との比較検討した。

第 2 章 YM477 の作用の種特異性の検討

第 1 章で実施した細胞増殖実験にて示唆された YM477 の作用の種特異性について、様々な動物の血小板を用いて血小板 STAT5 の活性化を指標に検討した。

第 3 章 ヒト血小板造血を反映した *in vivo* 実験系の確立と YM477 のヒト血小板増加作用の評価

第 2 章にて YM477 はヒトとチンパンジーの血小板にのみ作用することが判明したが、チンパンジーを用いた *in vivo* 評価は現実的ではないため、NOD/SCID (Non-obese diabetes/severe combined immuno-deficiency) マウスを用いてヒト血小板を産生するモデル動物の作製を試みた。また、本モデルマウスを用いて YM477 のヒト血小板増加作用を検討した。

第 4 章 YM477 の血小板の活性化および凝集に及ぼす影響の検討

YM477 の血小板活性化および凝集に及ぼす影響について *in vitro* にて検討した。また、ヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスを用いて、*in vivo* での YM477 の血小板機能に与える影響を検討した。

第 5 章 YM477 の TPO 受容体への作用部位の検討

YM477 の TPO 受容体に対する種特異性を利用して、2 種類のヒトとカニクイザルのキメラ TPO 受容体 (カニクイザル 膜遠位ドメイン (CRH1) / ヒト膜近位ドメイン (CRH2) - 細胞質内領域 (Intracellular domain, ICD)) キメラ TPO 受容体、およびヒト CRH1/カニクイザル

CRH2 - ICD キメラ TPO 受容体) をそれぞれ発現させた Ba/F3 細胞を用いて、その細胞増殖活性を指標として YM477 の TPO 受容体の作用部位を検討した。

第 6 章 造血幹細胞の分化に対する YM477 と TPO の併用効果の検討

第 5 章にてヒト TPO 受容体と YM477 の結合部位は TPO の結合部位とは異なることが示され、YM477 が TPO 受容体に対して TPO と同時に作用する可能性が考えられたことから、TPO と YM477 の併用効果を検討した。

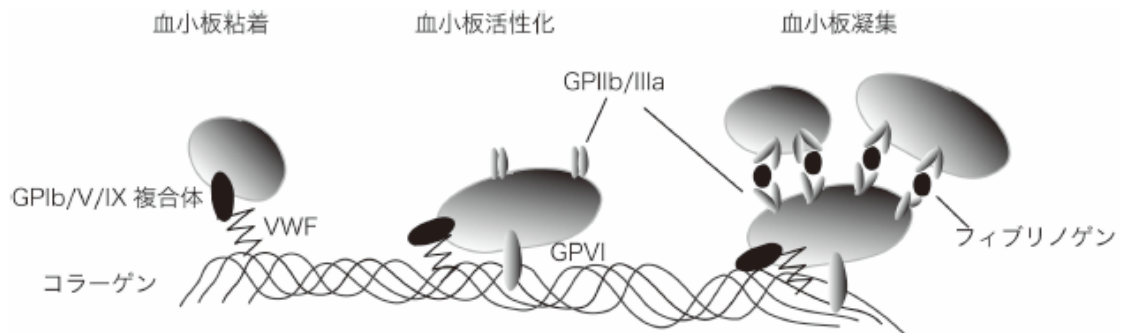


Figure 0-1 Mechanism of thrombus formation (1)

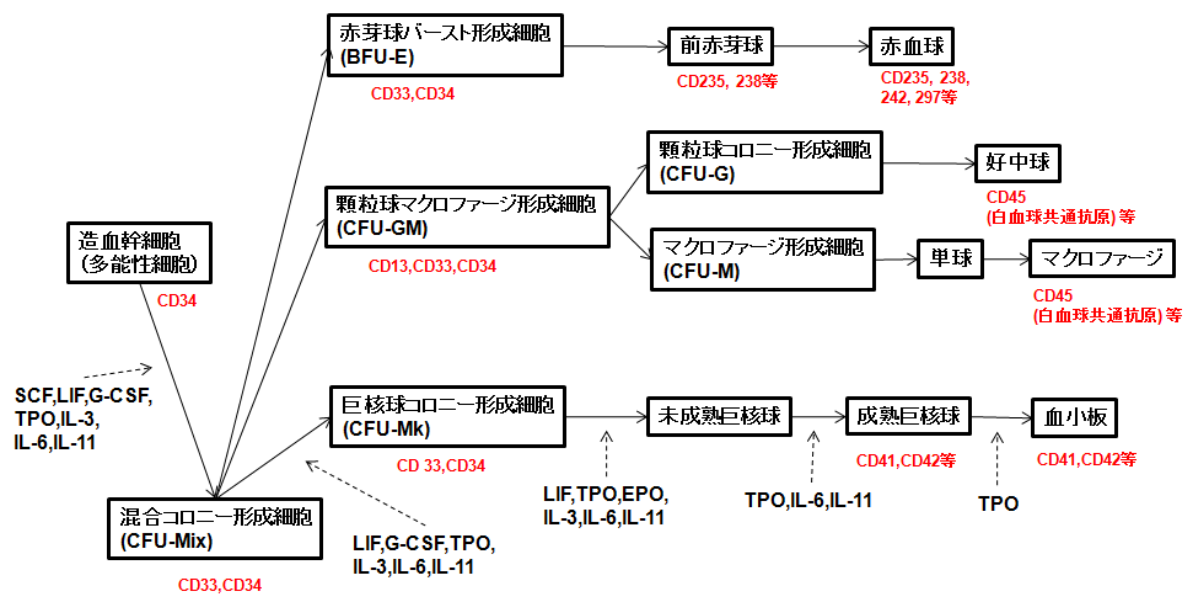


Figure 0-2 Role of cytokines in hematopoiesis (12,13)

Red text shows the CD antigens expressed on each cell.

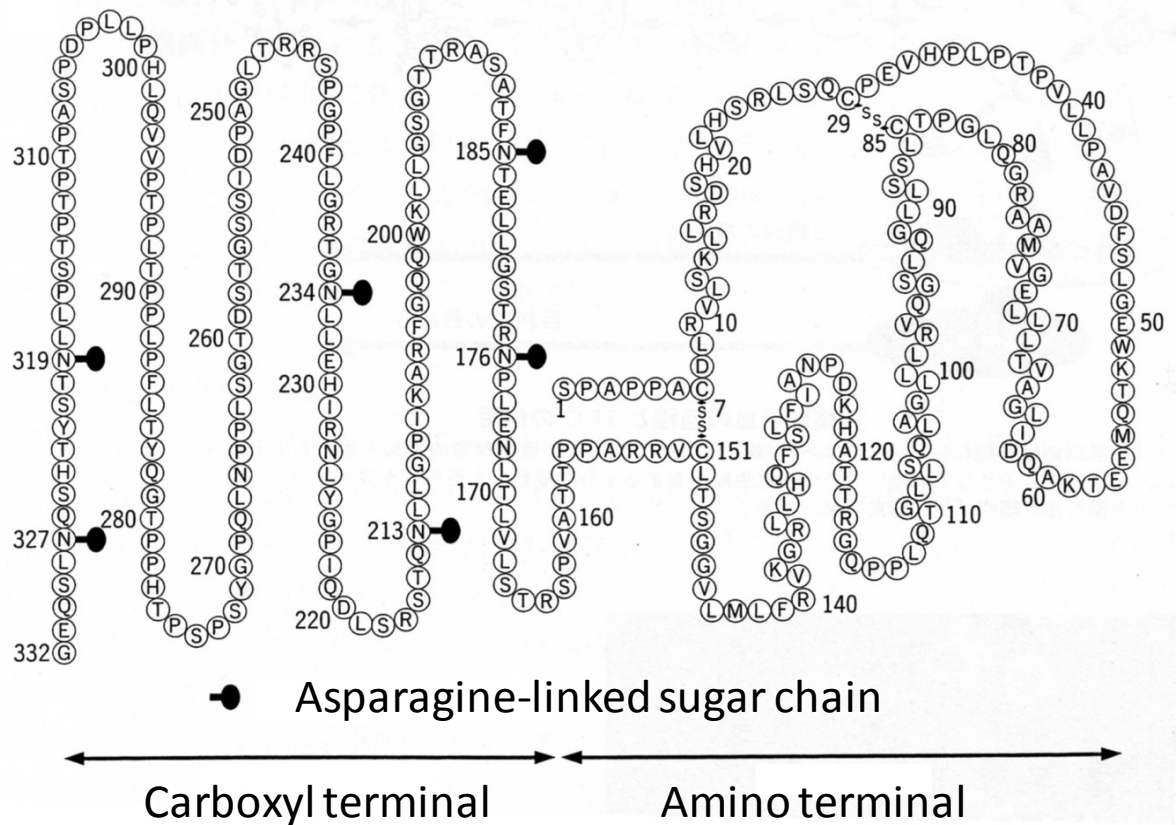


Figure 0-3 View showing a frame format of human TPO (20)

The whole-length human TPO consists of 332 amino acid residues. The 7th and the 151st cysteine residues, and the 29th and the 85th cysteine residues separately form a disulfide binding.

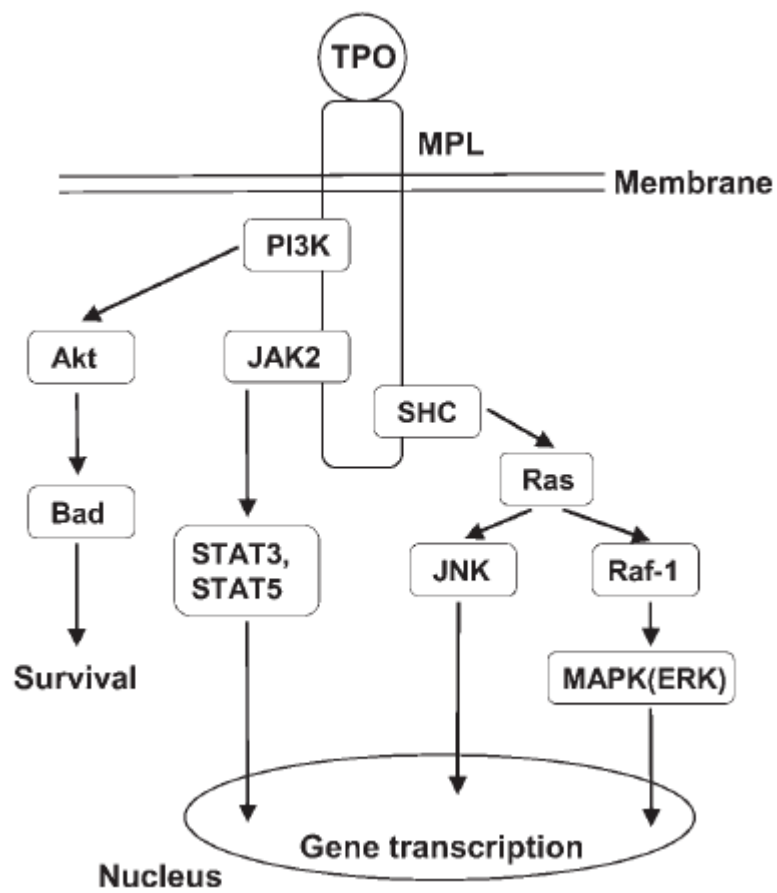


Figure 0-4 Signal transduction through TPO receptor (23)

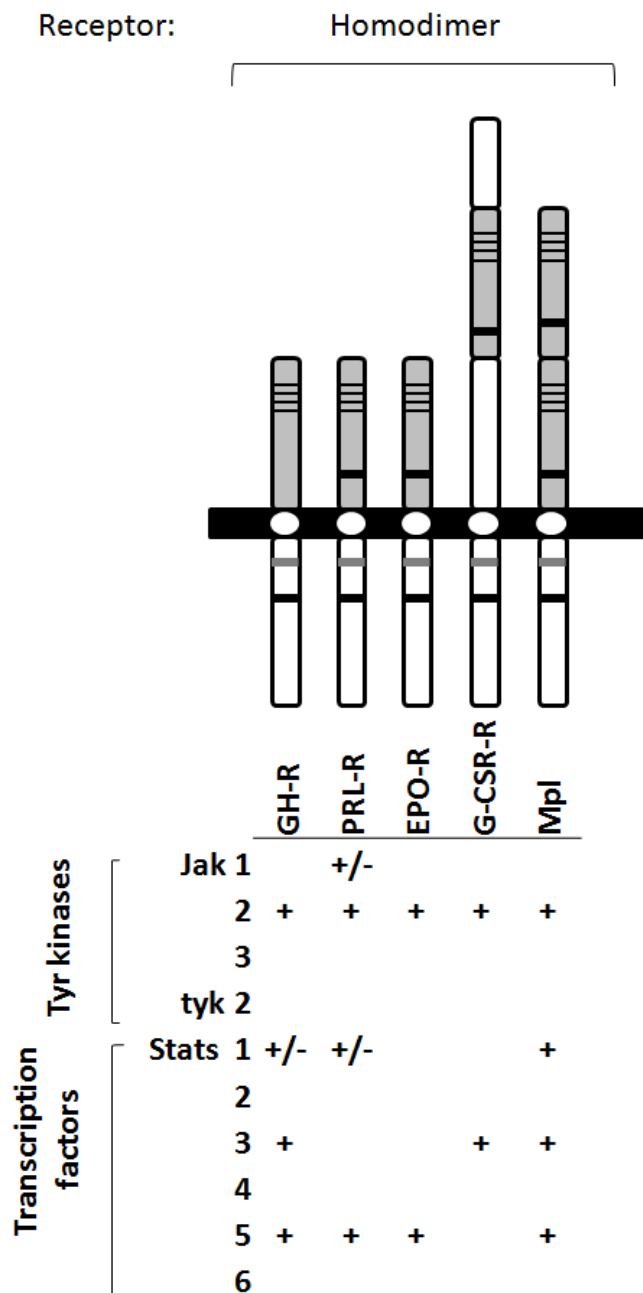


Figure 0-5 Class I cytokine receptors (24)

The receptors are a single transmembrane type. Each receptor contains at least one cytokine receptor homology (CRH) region (shaded) that can bind the ligand. The thin bands within the CRH represent conserved cysteines and the thicker bands the WSXWS motif. The intracellular domains of signaling receptors contain two conserved regions known as box 1 and 2 which are indicated by the banding.

第1章 TPO 受容体作動薬の探索および *in vitro* における薬理作用の検討

1.1 緒言

TPO はその存在が 1950 年代に示唆されながらも、実際にクローニングの成功が報告されたのは 1994 年のことである。ジェネンテック社、ザイモジェネティック社、アムジェン社、キリンビール社の 4 つのグループから TPO のクローニング成功が報告され (7,16-19)、これらの報告が TPO 受容体作動薬の探索が盛んに行われるきっかけとなった。1990 年代後半には、PEG-rHuMGDF と rhTPO の 2 つの TPO 製剤が開発された。これら TPO 製剤の臨床試験において、いくつかの血小板減少症 (化学療法後の血小板減少 (31)、血小板減少を伴う MDS (32)、ITP (33)) に対して有効性が確認された。しかしながら、PEG-rHuMGDF を投与された患者の体内で中和抗体が産生され、血小板減少症が発現したことから、臨床試験は中断を余儀なくされた (28)。また、rhTPO およびその他の TPO 改変体でも抗体産生が報告されていることから、TPO の免疫原性は高いと考えられた。本研究では、TPO 製剤で問題となった免疫原性の問題がない低分子化合物の中から TPO と同様の作用を有する経口投与可能な TPO 受容体作動薬の探索を行った。

まず最初に、ヒト TPO 受容体 (c-Mpl) を導入したマウス Ba/F3 細胞を用いて HTS を実施し、ヒト TPO 受容体に作用する化合物を発見した。このリード化合物の構造の最適化を行い、最適化した化合物の *in vitro* での薬理作用の検討を実施した。

1.2 実験方法

1.2.1 薬剤

YM477 の構造を Figure 1-1 に示す。

化学名：

1-(3-chloro-5-{{4-(4-chloro-2-thienyl)-5-(4-cyclohexylpiperazin-1-yl)-1,3-thiazol-2-yl}carbonyl}-2-pyridyl)piperidine-4-carboxylic acid

YM477 は、dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解して使用した。

rhTPO は、Pepro Tech EC (London, UK)、GT (Minneapolis, MN, USA)、または R & D Systems

(Minneapolis, MN, USA) より購入したものを使用した。

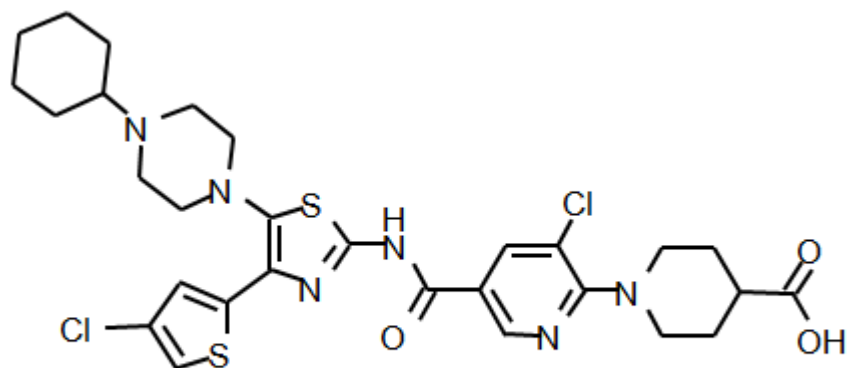


Figure 1-1 Chemical structure of YM477

1.2.2 ヒト TPO 受容体発現細胞の作製

巨核球系ヒト白血病細胞株である human erythroleukemia (HEL) 細胞由来のヒト全長 *c-mpl* cDNA (*c-mpl-p*) を pEF-BOS ベクターにサブクローニングした (34)。このプラスミド pEF-BOS-*c-mpl* と分画マーカープラスミド (pSV2bsr Kaken-Seiyaku, Tokyo, Japan) を IL-3 依存性マウス Ba/F3 細胞に 0.4 cm キュベットにて 1.5 kV (25 μ F) で electroporation した。これらの細胞を、マウス IL-3 の供給源としてマウス骨髄単球性白血病細胞 WEHI-3 細胞の培養上清 (WEHI, BD Biosciences, Bedford, MA, USA) を添加した RPMI1640 培地 (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium, GIBCO, Grand Island, NY, USA) にて 3 日間培養の後、10 μ g/mL blasticidin S (Funakoshi, Tokyo, Japan) を含む選択培地にて 1 ヶ月間培養し、rhTPO (Pepro Tech EC) に反応して増殖する安定した形質転換体を取得した。

1.2.3 マウス TPO 受容体発現細胞の作製

マウス脾臓由来のマウス全長 *c-mpl* cDNA (*c-mpl-p*) を pcDNA3.1/Zeo(-) ベクターにサブクローニングした。このプラスミド pcDNA3.1/Zeo(-)-*c-mpl* を Ba/F3 細胞に 0.4 cm キュベット内で 250 V (960 μ F) にて electroporation した。これらの細胞を、10 ng/mL rhTPO (Pepro Tech EC) を添加した RPMI1640 培地にて 8 日間培養し、rhTPO に反応して増殖する安定した形質転換体を取得した。

1.2.4 TPO 受容体発現細胞増殖実験

細胞の培養には、10% ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS, JRH BIOSCIENCES, Lenexa, KS, USA)、50 units/mL penicillin/streptomycin (GIBCO)、WEHI 含有 RPMI1640 培地を用いた。ヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞には YM477、rhTPO (GT)、Ba/F3 細胞には YM477、rhTPO またはリコンビナントマウス IL-3 (Recombinant mouse interleukin-3, rmIL-3, Pepro Tech EC) を加えて、96 穴プレートにて 2×10^4 cells/well で培養した。細胞増殖活性の測定は以下のように行った。WST-1/1-methoxy PMS reagent (Cell counting kit, Dojindo, Kumamoto, Japan) を各ウェルに添加し、添加直後および添加後 2 時間にマイクロプレートリーダー (Model3350, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) にて 450 nm および 655 nm の吸光度を測定した。細胞増殖活性は、TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞における rhTPO の最大細胞増殖活性を 100% として各ウェルの測定値から算出した。

1.2.5 TPO 受容体を介した情報伝達のウェスタンブロット解析

ヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞を RPMI1640 培地で洗浄後、10% FBS および 50 units/mL penicillin/streptomycin を含んだ RPMI1640 培地にて 37 °C で 15 時間培養した。細胞を RPMI1640 培地に再度懸濁し、細胞数を 1×10^6 /mL に調整した後、37 °C にて 15 分間、YM477 または rhTPO (R & D Systems) で細胞を刺激した。15 mM HEPES (pH 7.4)、150 mM NaCl、10 mM EGTA、1 mM sodium orthovanadate、protease inhibitor cocktail tablet (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)、および 2% (w/v) Triton X-100 を含む緩衝液で細胞を可溶化した。不溶物質は、4 °C にて $10,000 \times g$ で 30 分間遠心分離して取り除いた。溶解物は、還元条件下で SDS-PAGE に供し、polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Bedford, MA, USA) に転写した。Block Ace (Dainippon-Seiyaku, Osaka, Japan) を用いて室温で 30 分間ブロッキングした後、抗リン酸化 STAT3 抗体 (Tyr705)、抗リン酸化 STAT5 抗体 (Tyr694) または抗リン酸化 ERK 抗体 (Thr202, 204) (Cell Signaling, Beverly, MA, USA) を反応させ、情報伝達タンパク質のリン酸化を検出した。また、メンブレンから抗体を除去した後、抗 STAT3 抗体、抗 STAT5 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) または抗 ERK 抗体 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) と再度反応させ、ゲルの各レーンに情報伝達タンパク質が存在していることを確認した。シグナルは ECL kit (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) を用いて検出した。

1.2.6 巨核球コロニー形成実験

本試験では、無血清のコラーゲン培地 (MegaCult[®], StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada) を使用した。培地の構成は、IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)、1.1 mg/mL collagen、1% BSA (Bovine serum albumin)、0.01 mg/mL recombinant human insulin、0.2 mg/mL human transferrin (iron saturated)、100 μ M 2-mercaptoethanol および 7.8 μ g/mL cholesterol とした。ヒト臍帯血 CD34⁺細胞 (AllCells, Berkeley, CA, USA) を 2,500 cells/0.75 mL にて YM477 または rhTPO (GT) を含んだコラーゲン培地に懸濁し、2 well chamber slide にて培養した。培養開始後 10~12 日で、巨核球コロニーの形成が確認できた。培養終了後、スライドを抗ヒト CD41 抗体で染色し、3 個以上の CD41⁺細胞を含むコロニーをヒト巨核球コロニーとして計数した。巨核球は赤褐色に染色される。CD34 抗原は、造血幹細胞・前駆細胞に発現している細胞表面マーカーであり、CD41 抗原は巨核球および血小板に発現している細胞表面マーカーである。データは、rhTPO の最

大巨核球コロニー数に対する割合で表示し、YM477 の EC₅₀ 値を算出した。

1.2.7 YM477 の巨核球系以外の造血細胞コロニー形成実験

本実験では、MethoCult[®] (StemCell Technologies Inc.) を使用した。培地の構成は、IMDM、30% FBS、1.0% methylcellulose、1% BSA および 100 μ M 2-mercaptoethanol とした。ヒト臍帯血 CD34⁺細胞 (AllCells) を 200 cells/mL にて、YM477 (0.1-3 μ M) および 50 ng/mL recombinant human stem cell factor、10 ng/mL 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (Recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、10 ng/mL リコンビナントヒト IL-3 (Recombinant human IL-3, rhIL-3)、3 units/mL EPO、0.1% DMSO (cytokine mixture) または 0.1% DMSO を含んだメチルセルロース培地に懸濁し、1 mL ずつ 35 mm のペトリ皿にて培養した。培養開始 10~12 日後に、コロニー数を倒立顕微鏡にて形態学的な特徴に従って計測した。計測基準は、20 細胞以上の顆粒球マクロファージ形成細胞 (Colony-forming unit-granulocyte-macrophage CFU-GM)、3 細胞以上の赤芽球クラスターまたは 200 細胞以上の赤芽球バースト形成細胞 (Burst-forming unit-erythroid, BFU-E)、および赤血球系細胞を含んだ顆粒球/マクロファージ/巨核球混合コロニー形成細胞 (Colony-forming unit-mix, CFU-Mix) とした。

1.2.8 核倍数体分析

G-CSF 動員ヒト末梢血 CD34⁺細胞 (BioWhittaker Inc., Walkersville, MD, USA) を 3 μ M YM477 または 3 nM rhTPO (GT) 存在下に 10,000 cells/0.5 mL/well で 24 穴培養プレート (Iwaki, Chiba, Japan) を用いて 37 °C で培養した。培地は、100 μ M 2-mercaptoethanol、7.5 μ g/mL cholesterol、BIT9500 (StemCell Technologies Inc.)、および IMDM で構成されたものを使用した。培養開始 12 日目に細胞を回収後、細胞を 2% FBS-phosphate buffered saline (FBS-PBS) 50 μ L に懸濁し、FITC 標識抗ヒト CD41 抗体 (BD PharMingen, San Diego, CA) にて染色した。4 °C にて 20 分間インキュベーションした後、細胞を洗浄し、-40°C のメタノールを徐々に添加することにより、透過性を高め、4°C にて 30 分インキュベーションした。さらに、細胞を 4 °C で 30 分間、100 μ g/mL RNase (Nippon Gene, Toyama, Japan) と反応させた後、50 μ g/mL propidium iodide (PI) (Sigma, St. Louis, MO, USA) を添加した。4 °C で 30 分間、暗所にてインキュベーションした後、2% FBS-PBS に懸濁し、フローサイトメトリー (EPICS XL-MCL, Beckman-Coulter, Miami, FL, USA) にて解析した。CD41⁺細胞を巨核球とし、

倍数体の分布をヒストグラムで解析した。それぞれの倍数体は event%で表し、nN で表される倍数体の割合は、次の式を用いて計算した ; $\text{Events \% (nN)} = [\text{nN} / (2\text{N} + 4\text{N} + 8\text{N} + 16\text{N} + 32\text{N} <)] \times 100$ 。

1.3 結果

1.3.1 ヒト TPO 受容体作動薬の探索

TPO 様の作用を示す低分子化合物の探索を目的として、ヒト TPO 受容体を発現した Ba/F3 細胞の増殖活性を指標とした HTS を実施した。約 18 万化合物のうち、30 化合物にヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞の増殖活性を認めた。その中の 27 化合物はヒト TPO 受容体を発現していない Ba/F3 細胞に対して細胞増殖活性を示さなかった。27 化合物のうち、最も活性が強かった 2-acylaminothiazole 誘導体をリード化合物として、ヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞の増殖活性、マウスにおける薬物動態、およびヒト胎児肝臓 CD34⁺細胞を移植した NOD/SCID マウスを用いた *in vivo* でのヒト血小板増加作用を指標として、化合物の構造の最適化を行い、YM477 を見出した。

1.3.2 YM477 の TPO 受容体依存的な細胞増殖作用

Figure 1-2 に示すように YM477 および rhTPO は、ヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞を濃度依存的に増殖させた。YM477 の EC₅₀ 値は 3.3 ± 0.2 nM であった (Table 1-1)。YM477 の TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞の増殖活性は、2-acylaminothiazole 誘導体のリード化合物と比較して、約 100 倍強力であった。YM477 の EC₅₀ 値は rhTPO の約 50 倍であったが、YM477 の最大増殖活性は TPO の最大増殖活性とほぼ同等であった。rhTPO はマウス TPO 受容体発現細胞を増殖させたものの、YM477 は同細胞を増殖させなかった。一方、rhTPO、YM477 とともに、Ba/F3 細胞を増殖させなかった。

Table 1-1 EC₅₀ values and maximum efficacy of YM477 and rhTPO for the proliferation of human TPO receptor expressed Ba/F3 cells.

	EC ₅₀ (nM)	Efficacy (Max. res(%) vs. max. of rhTPO)
YM477	3.3 ± 0.2	104 ± 3
rhTPO	0.065 ± 0.005	100 ± 0

Data are shown as mean ± SE (n = 5).

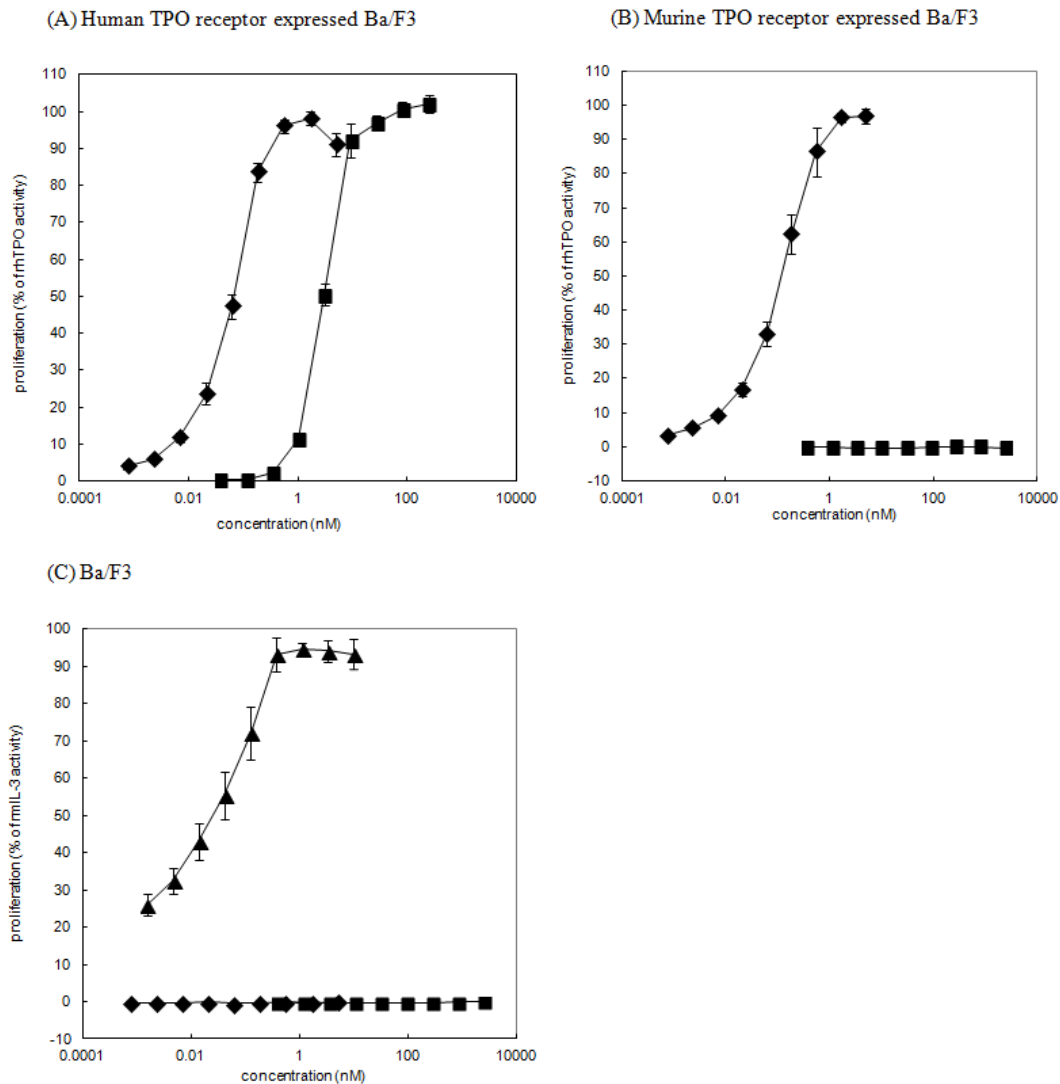


Figure 1-2 Effects of compounds on proliferation of human TPO receptor expressed Ba/F3 cells, murine TPO receptor expressed Ba/F3 cells, and Ba/F3 cells.

Proliferation of human TPO receptor expressed Ba/F3 cells (A), murine TPO receptor expressed Ba/F3 cells (B), and Ba/F3 cells (C) to YM477 (■), rhTPO (◆), and recombinant mouse IL-3 (▲) was evaluated. Data are shown as mean \pm SE (n = 5).

1.3.3 TPO 受容体を介した情報伝達

ヒト TPO 受容体発現細胞内の TPO 依存的な情報伝達因子の中で、YM477 の STAT3、STAT5 のチロシンリン酸化および ERK のスレオニンリン酸化に及ぼす影響について検討した。抗リン酸化 STAT3 抗体 (Tyr705)、抗リン酸化 STAT5 抗体 (Tyr694) または抗リン酸化 ERK 抗体 (Thr202, 204) を用いたウェスタンブロット解析を行った結果、YM477 は、rhTPO と同様に、ヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞の STAT3、STAT5 のチロシンリン酸化および ERK1/2 のスレオニンリン酸化を誘導した (Figure 1-3)。YM477 は STAT3 を終濃度 0.03 μ M、STAT5 を 0.003 μ M、ERK1/2 を 0.003 μ M から濃度依存的にチロシンまたはスレオニンのリン酸化を誘導した。

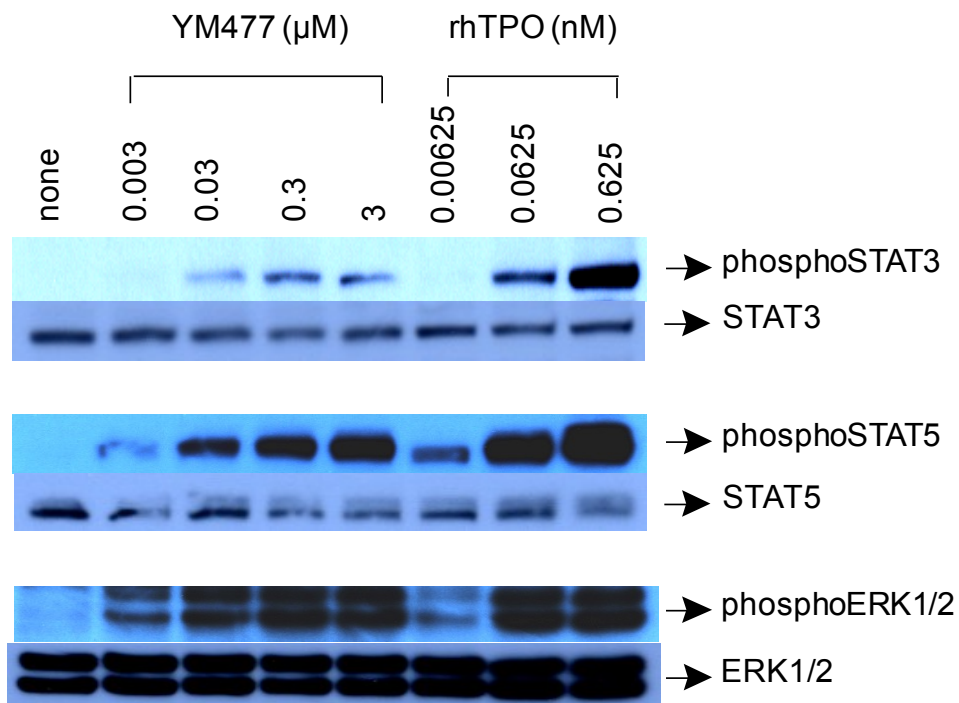


Figure 1-3 Signal induction in human TPO receptor expressed Ba/F3 cells

Human TPO receptor expressed Ba/F3 cells were stimulated by YM477 or rhTPO. Immunoblots were probed with anti-phospho-STAT3, anti-phospho-STAT5, and anti-phospho-ERK antibodies.

1.3.4 YM477 の巨核球コロニー形成への影響の検討

YM477 と rhTPO のヒト巨核球コロニー形成に及ぼす影響を Figure 1-4 に示した。YM477 は rhTPO と同様にヒト臍帯血 CD34⁺細胞からヒト巨核球までの分化を濃度依存的に促進させた。EC₅₀ 値は、YM477 が 25.0 ± 7.8 nM であり、rhTPO は 0.122 ± 0.014 nM であった。EC₅₀ 値は、YM477 は rhTPO より約 200 倍弱かったが、最大活性は rhTPO とほぼ同等であった。3 μ M YM477 および 10 nM rhTPO を作用させた際のヒト巨核球コロニーを Figure 1-4 の B および C にそれぞれ示した。YM477 と rhTPO との培養にて形成されたヒト巨核球コロニーの形態は類似していた。

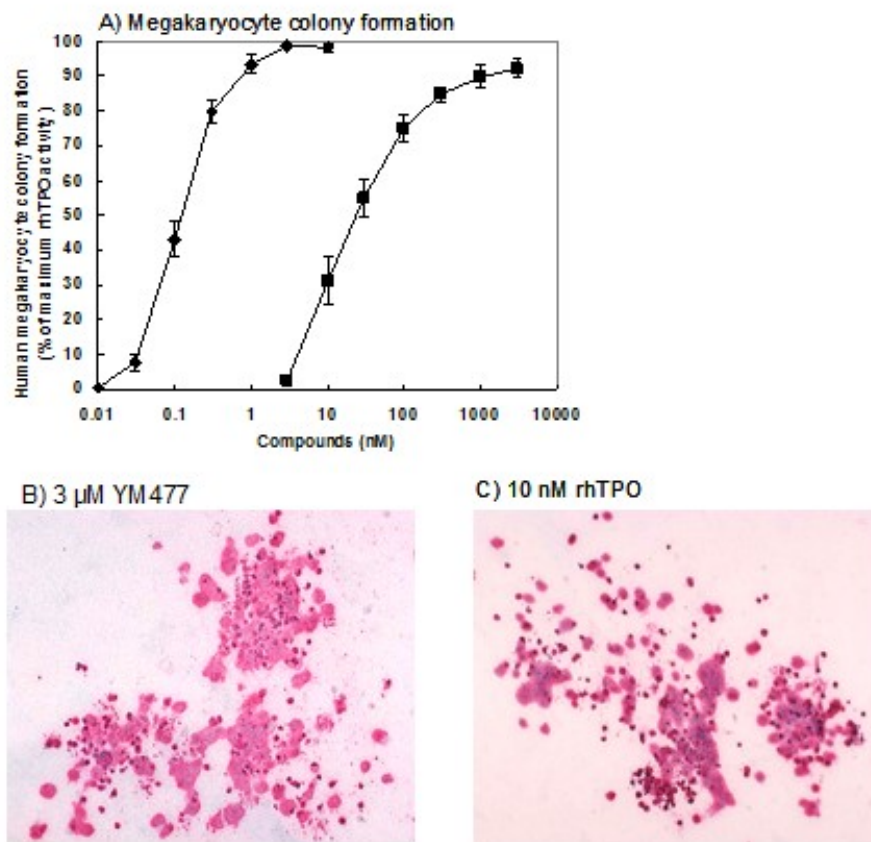


Figure 1-4 YM477 promotes megakaryocyte differentiation from human CD34⁺ cells.

(A) Megakaryocyte colony formation was measured in the presence of increasing concentrations of YM477 (■), and rhTPO (♦). Data are presented as mean \pm SE (n = 5). (B, C) Immunohistochemical identification of typical human megakaryocyte colonies generated with 3 μ M YM477 (B) and 10 nM rhTPO (C), respectively. \times 100 objectives.

1.3.5 YM477 の巨核球系以外の造血コロニー形成への影響の検討

ヒト造血コロニー形成に対する YM477 の影響を Table 1-2 に示した。サイトカイン混合物 (Cytokine mixture) はヒト造血細胞コロニー形成を刺激し、CFU-GM、BFU-E、および CFU-Mix の数を増加させた。この実験条件下で、YM477 はヒト CD34⁺細胞由来の巨核球系以外のヒト造血細胞コロニー形成を惹起しなかった。

Table1-2 Effect of YM477 on hematopoietic colony formation, other than megakaryocytic lineage, from human cord blood CD34⁺ cells.

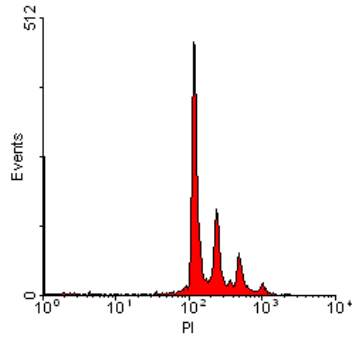
	Number of hematopoietic colonies		
	CFU-GM	BFU-E	CFU-Mix
Cytokine mixture	31.8 ± 1.4	26.3 ± 2.1	5.2 ± 0.4
0.1% DMSO	1.7 ± 0.4	0	0
YM477 0.1 μM	2.0 ± 0.4	0	0
YM477 0.3 μM	1.8 ± 0.5	0	0
YM477 1 μM	2.1 ± 0.3	0	0
YM477 3 μM	2.3 ± 0.3	0	0

Data are presented as mean ± SE (n = 5).

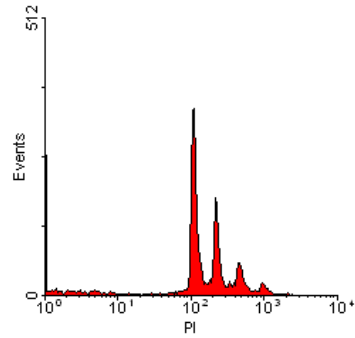
1.3.6 YM477 の巨核球の多倍体化への影響

3.4においてYM477またはrhTPO存在下でヒト臍帯血CD34⁺細胞を培養した結果、YM477およびrhTPOは巨核球への分化を促進することが確認できた。さらに、巨核球の特徴である核の多倍体化に対する影響を検討した。培養した細胞をFITC標識CD41抗体で染色し、CD41⁺細胞を巨核球としてフローサイトメトリーにて解析し、倍数体の分布をヒストグラムで解析した結果、3 μM YM477または3 nM rhTPO存在下で生成する巨核球の多倍体の分布に両薬剤間で有意な差は認められなかった (Figure 1-5)。

(A) 3 μ M YM477



(B) 3nM rhTPO



(C) DNA content analysis

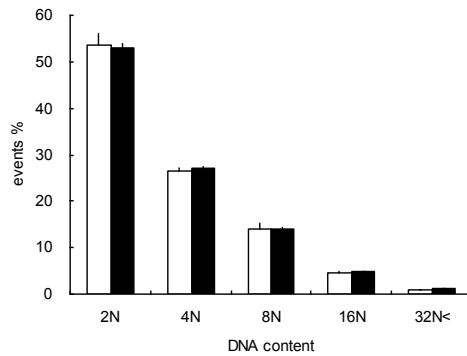


Figure 1-5 YM477 induces polyploidization of megakaryocytes.

The plots show the typical ploidy distribution after gating on CD41⁺ cells (A: 3 μ M YM477, B: 3 nM rhTPO). (C) Ploidy analysis of megakaryocytes generated by 3 μ M YM477 (open columns) or 3 nM rhTPO (filled columns). The data represent the mean \pm SE of 5 independent experiments. Statistical analysis was performed in each DNA content group using Student's t-test. There was no significant difference between YM477 and rhTPO in each group.

1.4 まとめと考察

TPO 様の作用を示す低分子化合物の探索を目的として、TPO 受容体への刺激に応じて増殖するヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞を使用した HTS を実施した。その結果、ヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞の増殖活性を示した化合物を見出し、これらの化合物のうち最も活性が強かった 2-acylaminothiazole 誘導体をリード化合物として構造の最適化を行い、YM477 を創出した。

TPO は TPO 受容体に特異的に作用することが知られている。そこで、YM477 の TPO 受容体への作用を検討するため、ヒト TPO 受容体を導入した Ba/F3 細胞、マウス TPO 受容体を導入した Ba/F3 細胞、および親細胞の Ba/F3 細胞の増殖に対する YM477 の効果を検討した。YM477 は、rhTPO と同様に、ヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞の細胞増殖を支持した。一方、rhTPO はマウス TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞を増殖させたが、YM477 は増殖させなかった。親細胞の Ba/F3 細胞を rhTPO および YM477 とも増殖させなかった。この結果から、YM477 がヒト TPO 受容体に選択的に作用することが示唆された。

TPO の細胞内情報伝達は、TPO 受容体の下流の JAK-STAT および SHC-Ras-Raf-ERK 系を介して行われ、STAT3、STAT5 のチロシン残基および ERK1/2 のスレオニン残基がリン酸化される (34,35)。そこで、YM477 が細胞増殖活性を示すヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 を用いて、YM477 の細胞情報伝達に対する影響を検討した。YM477 は、rhTPO と同様に、ヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞の情報伝達において STAT3、STAT5 のチロシン残基および ERK1/2 のスレオニン残基のリン酸化を誘導した。YM477 は TPO 受容体を介して、TPO と同等の作用を示す可能性が示唆された。

次に、造血幹・前駆細胞から巨核球への分化促進・成熟に与える YM477 の影響を検討した。血小板は骨髄で巨核球の細胞質から生じる無核片として産生される (6,34)。巨核球は、造血幹細胞がサイトカインの刺激を受けることで、前駆細胞、前巨核球へと方向付けされ、分化・成熟する過程をたどる。巨核球産生は、細胞分裂を特徴とした増殖から始まり、成熟していく過程で細胞分裂は停止する。しかしながら、核内分裂と呼ばれる DNA の複製は停止せず継続して行われることから、核が通常よりも 2 から 64 倍 (4N-128N) となった巨核球が生成され、最終的にはこの巨核球から血流に血小板を放出する。TPO はこのような造血幹細胞の巨核球への分化と成熟および血小板産生に主要な役割を果たしている (7,35)。

最初に、造血幹・前駆細胞の巨核球への分化における YM477 の影響を検討した。YM477 は造血幹細胞からのヒト巨核球コロニー形成を濃度依存的に促進させた。一方、YM477 は

ヒト巨核球コロニー形成の EC_{50} 値よりも 100 倍高い濃度である 3 μ M まで、巨核球以外へのヒト造血幹・前駆細胞の分化には影響を与えなかった。YM477 が造血幹・前駆細胞からのヒト巨核球形成を特異的に促進させたことから、造血幹・前駆細胞の分化に関して YM477 が TPO と同様の作用を持つと考えられた。次に、巨核球の成熟における YM477 の影響を検討した。3 μ M YM477 および 3 nM rhTPO 存在下でヒト末梢血 $CD34^+$ 細胞から生成する巨核球の細胞核の多倍体の分布に有意な差は認められなかった。この結果から、YM477 は巨核球の成熟に関しても TPO と同様の作用を持つと考えられた。このように、YM477 は TPO と同様に造血幹細胞から巨核球への分化・成熟を促進することが示された。

以上の結果より、本章では、YM477 がヒト TPO 受容体に作用し、*in vitro* で TPO と同様の作用を発現することを示した。また、TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞を用いた細胞増殖実験において、YM477 は、ヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞を増殖させたが、マウス TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞を増殖させなかったことから、YM477 がヒト TPO 受容体に選択的に作用することが示唆された。従って、YM477 が作用する TPO 受容体に種差を持つ可能性が高く、*in vivo* 実験をする際の工夫が必要と考えられた。

第2章 YM477 の作用の種特異性の検討

2.1 緒言

第1章では、YM477 が *in vitro* で TPO 受容体作動薬であることを証明した。次に、YM477 の *in vivo* での作用を評価するため、YM477 が作用する動物種を探索することとした。

まず最初に、YM477 の TPO 受容体への反応性を検討するために、各種動物の TPO 受容体を導入した Ba/F3 細胞の作製を考えた。しかしながら、第1章にて、ヒトおよびマウスの TPO 受容体を導入した Ba/F3 細胞を作製し、YM477 に対する反応性を検討した結果、YM477 はヒト TPO 受容体には反応するが、マウス TPO 受容体に反応しないことが判明した。この結果より、YM477 は種特異性が高い可能性が示唆されたが、反応性を示す動物の探索のために各種動物の TPO 受容体導入 Ba/F3 細胞を作製するのは非効率的であると考えられた。そのため、種差の検討には各種動物の血小板を用いることとした。血小板には TPO 受容体が発現しており、TPO を血小板に作用させると、TPO 受容体を介して血小板内で情報が伝達される。情報伝達は、JAK-STAT および SHC-Ras-Raf-ERK 系を介して行われ、その過程で、STAT3、STAT5 のチロシン残基および ERK のスレオニン残基がリン酸化される (31,32)。そこで本章では、血小板の STAT5 のリン酸化を指標として、YM477 の各種動物 TPO 受容体への反応性を検討した。

2.2 実験方法

2.2.1 薬剤

YM477 は、DMSO に溶解して使用した。

rhTPO は、R & D Systems (Minneapolis, MN, USA) より購入したものを使用した。

2.2.2 血小板を用いた STAT5 のチロシンリン酸化のウェスタンブロット解析

ヒト血液を健常人ボランティアより 1/10 容の 3.8% クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血し、150 × g で 10 分間遠心分離した上清画分 (platelet-rich plasma, PRP) を分取した。動物の血液 (チンパンジー、オリーブバブーン、アカゲザル、カニクイザル、コモンマーモセット、リスザル、ビーグル犬、モルモット、ウサギ、ハムスター、ブタ) を 1/10 容の 3.8% クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血し、170 × g で 10 分間遠心分離した PRP を分取

した。

それぞれの PRP に、5 nM PGE₁ (Sigma)、 5 mM EDTA (pH 8.05)、および 3 U/mL apyrase (Sigma) を添加し、1490 × *g* にて遠心分離を行った。沈殿を 5 nM PGE₁、5 mM EDTA (pH 8.05)、および 3 U/mL apyrase を含んだ 5 mL の Tyrode's-HEPES buffer (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 3.75 mM NaH₂PO₄, 0.98 mM MgCl₂, 5.55 mM dextrose, 0.35% (wt/vol) BSA, and 37.8 mM HEPES, pH 6.7) に再度懸濁させ、一度洗浄した。ウェスタンブロット解析のため、血小板を Tyrode's-HEPES buffer (pH 7.35) に 3×10⁸ cells/mL で再度懸濁し、37 °C にて 15 分間、YM477 または rhTPO (R & D Systems) にて刺激した。ウェスタンブロットの手順は第 1 章 1.2.5 に記載に従った。なお、STAT5 の検出には抗 STAT5 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、リン酸化 STAT5 の検出には抗リン酸化 STAT5 抗体 (Tyr694) (Cell Signaling) を用いた。

2.3 結果

2.3.1 YM477 の各種動物の血小板に対する作用 (ウェスタンブロット解析)

様々な動物の血小板を用いて、YM477 または rhTPO 刺激による STAT5 のチロシンリン酸化を検討した。ヒトおよびチンパンジー血小板において、YM477 および rhTPO は STAT5 のチロシンリン酸化を誘導した (Figure 2-1)。しかし、ヒヒ、アカゲザル、カニクイザル、コモンマーモセット、リスザル、ビーグル犬、モルモット、ウサギ、ハムスター、ブタの血小板を用いた実験では、rhTPO で STAT5 のチロシンリン酸化の誘導が認められたものの、YM477 では STAT5 のリン酸化が認められなかった (Figure 2-1, 2-2)。

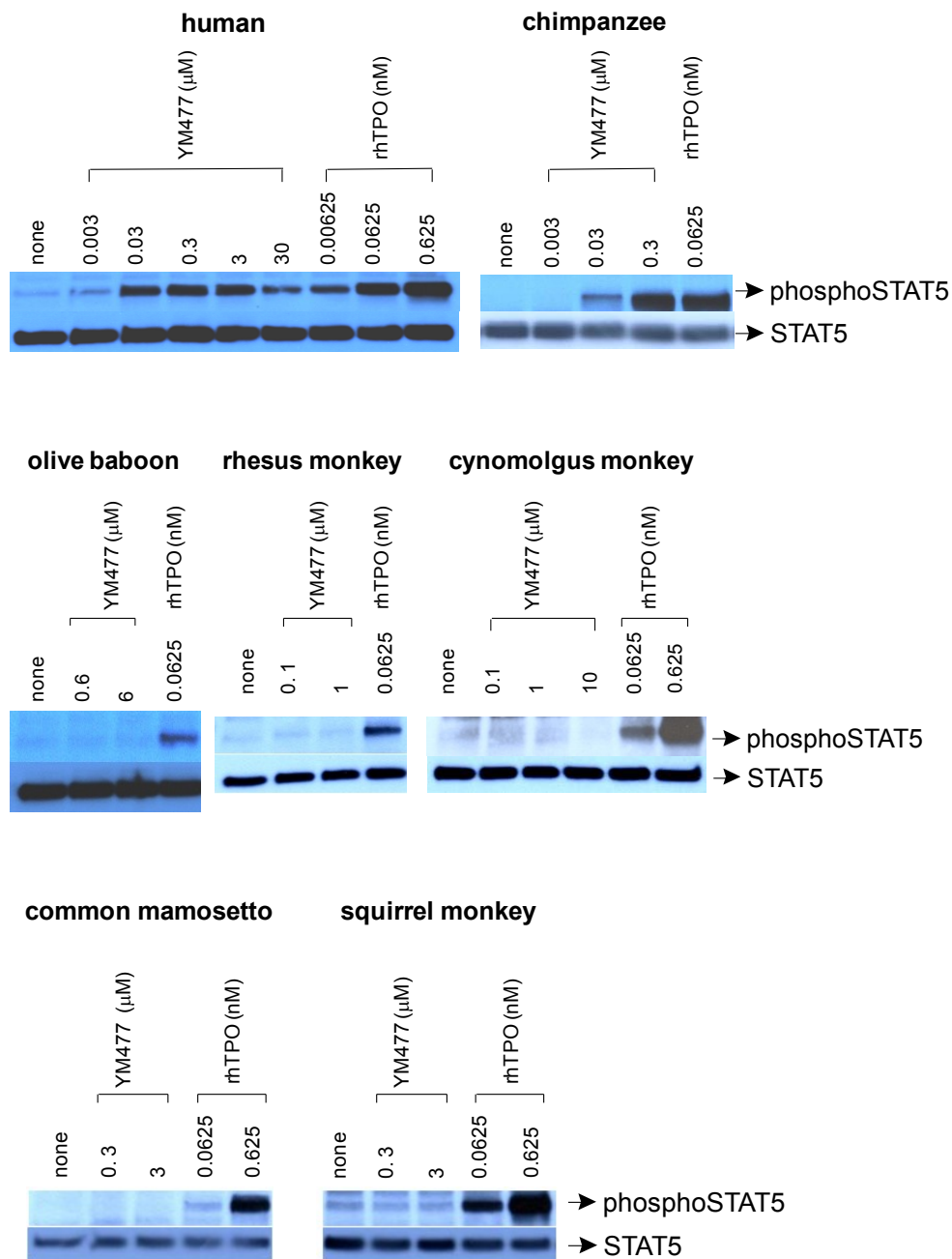


Figure 2-1 YM477 activates STAT5 in human and chimpanzee platelets, but not in other nonhuman primate's platelets (common marmoset, squirrel monkey, olive baboon, rhesus monkey, cynomolgus monkey).

Human and nonhuman primate platelets were stimulated by YM477 or rhTPO. Immunoblots were probed with anti-STAT5 and anti-phospho-STAT5 antibody.

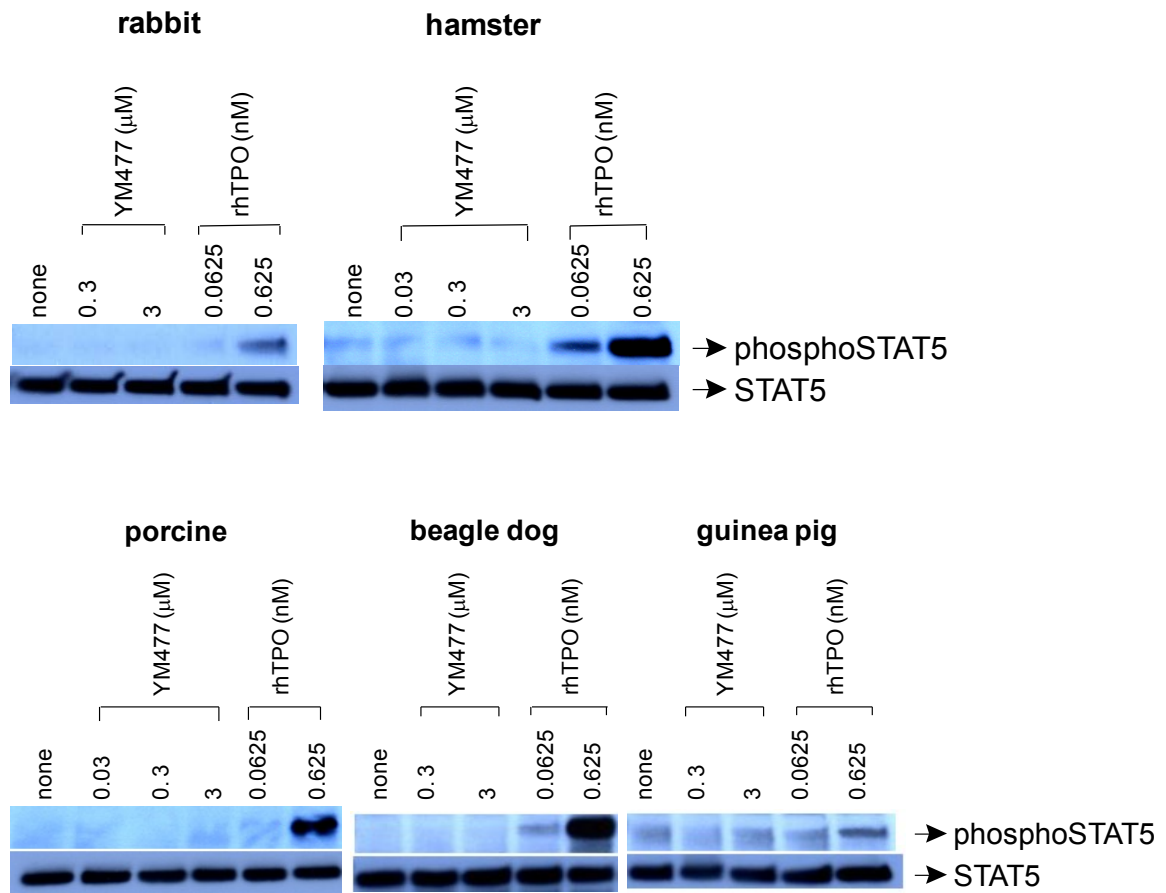


Figure 2-2 YM477 does not activate STAT5 in nonprimate's platelets (rabbit, hamster, porcine, beagle dog, guinea pig), but rhTPO activates them.

Nonprimate platelets were stimulated by YM477 or rhTPO. Immunoblots were probed with anti-STAT5 and anti-phospho-STAT5 antibody.

2.4 まとめと考察

本章では、YM477の*in vivo*効果を評価するために、YM477が作用する動物種を探索した。第1章にて、YM477は*in vitro*でヒトTPO受容体には作用したが、マウスTPO受容体には作用しなかったことから、YM477がTPO受容体に対する作用に高い種特異性を持つ可能性が予想された。そこで、本章では、各種動物の血小板の情報伝達を指標にして、YM477が作用する動物種を幅広く探索することとした。

TPOはTPO受容体を介して血小板のJAK-STATおよびSHC-Ras-Raf-ERK系の情報伝達を活性化させることが知られており、この情報伝達において、STAT3、STAT5のチロシン残基およびERKのスレオニン残基がリン酸化される(21,36)。本研究では、STAT5のチロシンリン酸化を指標として、YM477が作用する動物を探索した。その結果、ヒトおよびチンパンジーの血小板を使用した場合のみSTAT5のリン酸化が検出され、その他の動物の血小板においてはSTAT5のリン酸化が確認されなかった。この結果から、YM477の種特異性が高いことが示された。

TPOの種間の相同性について、TPOのC末端側ドメインはヒトとマウスにおいて74%であるのに対し、TPO受容体との結合ドメインであるN末端側の相同性は93%にもなる(21)。N末端側ドメインが活性領域であることから、正常のマウスにヒトTPOを投与した場合、血小板数ならびに巨核球数の増加が認められる。さらにはラット、イヌ、霊長類でも同様にこれらの増加が認められている(7)。今回の検討結果でも、ヒトTPOは種々の動物TPO受容体に作用しており、これらの結果と一致している。このように、ヒトTPOは種を超えて作用することから、TPOの種差は小さいと考えられた。一方、YM477はヒト、チンパンジーTPO受容体とのみ作用し、種特異性が高いことが示された。YM477がTPOとは異なり、種特異性が高い理由として、YM477が作用するTPO受容体の部位がTPOとは異なる可能性が考えられた。この点については、第5章で検討、考察する。

本章ではYM477がTPO受容体への作用において種差を持つことが判明し、検討した範囲ではヒトおよびチンパンジーの血小板のみに作用することを示した。しかしながら、チンパンジーは大型動物であり、*in vivo*実験を行うための動物としては現実的ではないと考えられた。そのため、*in vivo*でのYM477のTPO受容体への作用を検討するために、ヒト血小板を産生する小動物モデルを作製することとした。

第3章 ヒト血小板造血を反映した *in vivo* 実験系の確立と YM477 のヒト血小板増加作用の評価

3.1 緒言

前章において、YM477 は厳格な種特異性を持ち、検討した範囲ではヒトとチンパンジーにのみ作用することが判明した。チンパンジーは *in vivo* 評価に用いる動物として適切とは言えない。そこで、ヒト血小板造血を反映した *in vivo* 実験系を確立することが急務となった。

これまでは、ヒト血小板産生を評価するための *in vivo* 実験系は確立されておらず、ヒト巨核球産生の評価には、コロニーアッセイにおける巨核球系前駆細胞 (Colony-forming unit-megakaryocyte, CFU-Mk) の測定 (37) や巨核球特異的な抗体の発現の測定 (38)、巨核球の倍数体形成 (39,40) および液体培養での前血小板形成 (41) といった *in vitro* の評価系が代わりに用いられてきた。

近年、NOD/SCID マウスが *in vivo* での造血幹細胞の研究に用いられるようになってきた (42)。NOD/SCID マウスとは、末梢血中の機能的な T 細胞および B 細胞の欠失を特徴とし、ナチュラルキラー (NK) 細胞活性も低いため、より重度複合免疫不全症を呈する寿命約 8.5 ヶ月の重症免疫不全マウスである。このような特徴を持つため、同種異系統や異種移植が可能であり、各種免疫研究、抗腫瘍性の研究に用いられている。このマウスに、ヒト臍帯血 CD34⁺細胞を移植した後、巨核球を含むヒト造血の多分化能が長期間マウス体内で再構築されたことが報告された (43)。この結果は、ヒト臍帯血 CD34⁺細胞を移植した NOD/SCID マウスがヒト血小板産生の *in vivo* 評価系として有用である可能性を示唆した。ヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスでのヒト血小板に関して、いくつか報告があったものの、その大部分は、ヒト CD41⁺細胞がマウスの骨髄または末梢血に存在することを示したものであり (44–49)、ヒト血小板に関するデータはほとんどなかった。Perez et al.は、ヒト末梢血細胞を移植した NOD/SCID マウス内でのヒト血小板について報告した (44)。彼らは、これらのマウスの骨髄のヒト巨核球およびヒト CFU-Mk の存在および末梢血のヒト血小板の存在を示した。末梢血中のヒト血小板数のピークは移植後 3 週間であり、8 週以内に検出可能以下のレベルにまで減少した。すなわち、彼らはヒト血小板産生が長期にわたって持続することを確認できなかった。Cashman et al.は、ヒト臍帯血単核細胞を移植した NOD/SCID マウスの末梢血に、移植後 24 週までヒト血小板を検出したが、これ以上の研究は行わなかつ

た (45)。このように、ヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスにおけるヒト血小板造血に関する詳細な研究は報告されていなかった。

そこで、ヒト臍帯血 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウスにおけるヒト血小板造血の検討を実施した。また、血小板産生を主に生理的に制御している TPO の一種である PEG-rHuMGDF (50) の同マウスにおけるヒト血小板造血に対する効果を検討し、種特異性のある化合物の評価が可能な *in vivo* 実験系を確立を試みた。さらに、この実験系を用いて、YM477 の血小板増加作用を評価した。

3.2 実験方法

3.2.1 薬剤

YM477 は、0.5% methylcellulose に懸濁して使用した。

PEG-rHuMGDF は、麒麟麦酒株式会社より提供いただいたものを使用した。

3.2.2 ヒト臍帯血からの CD34⁺細胞の調製

ヒト臍帯血を、インフォームドコンセント取得後の通常満期産より倫理委員会のガイドラインに従って入手した。ヒト臍帯血単核細胞は、シリカ (Immuno Biological Laboratories, Fujioka, Japan) で食細胞を除去した後、Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway) を用いた濃度勾配遠心分離を行って分離した。ヒト臍帯血 CD34⁺細胞は、Dynabeads M-450 CD34 および DETACHaBEAD CD34 (Dyna, Oslo, Norway) を使用して調製した。CD34⁺細胞の純度は 95% 以上であった。

3.2.3 ヒト臍帯血 CD34⁺細胞の NOD/SCID マウス への移植

8-12 週齢の NOD/SCID マウス (Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki, Japan) に、2.4 Gy の ¹³⁷Cs の放射線を 2 回に分けて照射した後、ヒト臍帯血 CD34⁺細胞を尾静脈より注入した (51)。また、NK 細胞を除去するために、移植直前および移植後 11 日毎に、抗アシアロ GM1 抗血清 (Wako, Osaka, Japan) を腹腔内投与した。さらに、移植後のマウスにはネオマイシン水を投与した。ヘパリン被覆マイクロピペット (Drummond Scientific Co., Broomall, PA, USA) を使用して眼窩叢より末梢血を採取後、血液を EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 2Na 含有チューブ (Capiject, Terumo Medical, Somerset, NJ,

USA) に入れた。血球数は自動血球測定器 (MEK-6348, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) にて計測した。骨髓細胞は大腿骨から採取し、2% FBS を含む α -MEM 培地 (alpha Modified Eagle Minimum Essential Medium, GIBCO) で洗浄した。単一の細胞懸濁液になるまでピペッティングした後、細胞塊や組織片を除くため、細胞懸濁液を 70 μ m ナイロンメッシュフィルターに通した。

3.2.4 ヒト臍帯血移植 NOD/SCID マウスの末梢血および骨髓細胞のフローサイトメトリー分析

NOD/SCID マウスの末梢血および骨髓中に存在するヒト造血細胞の表面マーカーは、FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) を用いたフローサイトメトリーにて分析した。マウス末梢血中のヒトならびにマウス白血球の測定では、白血球に特異的な抗原である CD45 抗原を指標とし、FITC 標識抗ヒト CD45 抗体 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems)、APC 標識抗マウス CD45 抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) で染色する方法を用いて評価した。また、マウス末梢血中のヒトならびにマウス血小板の測定では、血小板特異的な抗原である CD41 抗原を指標とし、PE 標識抗ヒト CD41 抗体および FITC 標識抗マウス CD41 抗体 (BD Pharmingen) で染色する方法を用いて評価した。マウス末梢血中のヒト血小板の存在率はヒト CD41⁺細胞数をヒト CD41⁺細胞数とマウス CD41⁺細胞数の和で割って算出した。ヒト血小板数は、ヒト血小板の存在率と自動血球計測器で計数したマウス末梢血の全血血小板数の積として算出した。ヒト CD45⁺細胞の存在率と細胞数はヒト血小板と同様に算出した。

3.2.5 *Ex vivo* におけるヒト血小板の機能の検討

ヒト血小板の機能は、血小板の活性化に伴い血小板表面に発現する血小板活性化マーカーである CD62P (P-selectin) の発現および血小板膜上のフィブリノゲン受容体 GP IIb/IIIa の活性化を指標にして、フローサイトメトリーにより検討した。なお GP IIb/IIIa の活性化は、ヒト血小板上の活性化 GP IIb/IIIa を特異的に認識するモノクローナル抗体である PAC-1 の結合として評価した。マウスから採取した全血をトロンビン受容体アゴニスト (Thrombin receptor agonist peptide, TRAP, Peninsula Laboratories Europe, St Helens, UK) を添加して活性化させた。CD62P を発現したヒト血小板を検出するために、FITC 標識抗ヒト CD42a 抗体および PE 標識抗ヒト CD62P 抗体 (BD Pharmingen) にて染色した。また、活性化 GP IIb/IIIa を

検出するために、FITC 標識 PAC-1 および PerCP 標識抗ヒト CD42a 抗体 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) にてヒト血小板を染色し、FACSCalibur にてフローサイトメトリ一解析した。抗ヒト CD42a 抗体にて染色される画分をヒト血小板と同定し、CD42a⁺ 画分の CD62P 発現または PAC-1 結合を解析した。

3.2.6 コロニー形成実験

ヒト臍帯血 CD34⁺細胞を移植した NOD/SCID マウス骨髓細胞中の CFU-Mk を測定するために、50 ng/mL rhTPO、10 ng/mL リコンビナントヒト IL-6 (Recombinant human IL-6, rhIL-6)、10 ng/mL リコンビナントヒト IL-3 (Recombinant human IL-3, rhIL-3) を加えた無血清のコラーゲン培地 (MegaCult[®], StemCell Technologies Inc.) を使用して、骨髓細胞を培養した。培養開始後 14 日にスライドを抗ヒト CD41 抗体で染色し、CD41⁺細胞を確認した。3 個以上の CD41⁺細胞を含むコロニーをヒト巨核球コロニーとして計数した。また、NOD/SCID マウスの骨髓細胞を、100 ng/mL recombinant human SCF、20 ng/mL rhIL-3、10 ng/mL recombinant human GM-CSF および 2 U/mL recombinant human erythropoietin を含むメチルセルロース培地にて、 3×10^4 cells/mL の濃度で培養し、培養開始 14 日目にコロニー数を計測した。各コロニーの計測基準は、第 1 章 1.2.6 に記載の通りとした。なお、サイトカインは麒麟麦酒株式会社 (Tokyo, Japan) より提供いただいた。

3.2.7 PEG-rHuMGDF の NOD/SCID マウスへの投与

ヒト臍帯血 CD34⁺細胞移植後 10~13 週後に末梢血中ヒト血小板が 0.1%以上を存在している NOD/SCID マウスに、PEG-rHuMGDF (0, 0.5, 5 μ g/kg/day; 麒麟麦酒株式会社提供) を 14 日間皮下投与した。末梢血は PEG-rHuMGDF 投与前および投与 7、14、21、28 日後に採取し、全血球数、ヒト血小板 (ヒト CD41⁺細胞) およびヒト白血球 (ヒト CD45⁺細胞) を測定した。

3.2.8 PEG-rHuMGDF の NOD/SCID マウスへの再投与

PEG-rHuMGDF 投与終了 8~11 週後のヒト臍帯血 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウスに PEG-rHuMGDF (0.5 および 5 μ g/kg/day) を 14 日間皮下投与した。末梢血を投与前および投与後 7、14、21 日に採取し、全血球数、ヒト血小板数、およびヒト白血球数を計数した。骨髓細胞は 14 日目および 21 日目に採取し、ヒト CD45⁺細胞数、ヒト CFU-Mk 数およびヒ

トコロニー形成細胞数 (Colony forming cell, CFC) を測定した。

3.2.9 ヒト胎児肝臓 CD34⁺細胞の NOD/SCID マウスへの移植

ヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスでのヒト血小板造血の検証では、ヒト造血幹細胞のソースとして、ヒト臍帯血 CD34⁺細胞を用いた。しかしながら、薬剤の探索においては、良好で安定したヒト細胞の生着率が必要であるため、ヒト造血幹細胞のソースとしてヒト胎児肝臓 CD34⁺細胞を用いることとした。9～12 週齢の NOD/SCID マウスに、X 線装置 (MBR-1520R-3, Hitachi Medical Corporation, Tokyo, Japan) を用いて 2.4 Gy の X 線を 2 回に分けて照射した後、ヒト胎児肝臓 CD34⁺細胞を尾静脈より注入した。さらに、移植後のマウスにはネオマイシン水を投与した。また、NK 細胞を除去するために、移植直前および移植後 11 日毎に、抗アジアロ GM1 抗血清 (Wako) を腹腔内投与した (28)。ヘパリン被覆マイクロピペット (Drummond Scientific Co.) を使用して眼窩叢より末梢血を採取後、血液を EDTA 2Na 含有チューブ (Capiject, Terumo Medical) に入れた。血球数は自動血球測定器 (MEK-6528, Nihon Kohden) にて計測した。

3.2.10 フローサイトメトリーによるヒト胎児肝臓 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウス末梢血の解析

NOD/SCID マウス末梢血中のヒト血小板は、EPICS XL-MCL (Beckman - Coulter) を用いてフローサイトメトリー解析を実施した。ヒト血小板数は、本章 3.2.3 に記載の通りに測定・計算した。

3.2.11 ヒト胎児肝臓 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウスへの YM477 の投与

0.5% methylcellulose に懸濁した YM477 (0, 0.3, 1, および 3 mg/kg/day) をヒト血小板数の測定日翌日から 14 日間ヒト胎児肝臓 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウスへ経口投与した。末梢血を YM477 の投与開始後 7、14、21、28 日目に採取し、血球数およびヒト血小板数を測定した。ヒトおよびマウス血小板数の経時的変化は、YM477 投与前の値と比較した増加率で表した。統計学的検定には Dunnett's 法を用い、P 値が 0.05 未満の場合に有意とした。

3.3 結果

3.3.1 ヒト臍帯血 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウスにおけるヒト血小板産生

少量のヒト血小板の検出精度を確認するために、ヒトおよびマウスの血小板を様々な割合で混合したものを用いて、ヒト CD41⁺細胞を分析した。その結果、0.005%のヒト CD41⁺細胞までフローサイトメトリーにて再現性良く検出できることが確認された。

ヒト臍帯血 CD34⁺細胞の移植 4 週間後からヒト白血球およびヒト血小板がマウス末梢血で検出された。Figure 3-1 にて、移植後 7 週での末梢血中のヒト白血球数、全白血球数の中のヒト白血球の割合、およびヒト血小板数、全血小板数の中のヒト血小板の割合を示した。

ヒト臍帯血 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウスは、末梢血中にヒト白血球およびヒト血小板を産生し、移植したヒト臍帯血 CD34⁺細胞の数に応じて末梢血のヒトの白血球数および血小板数が増加した。

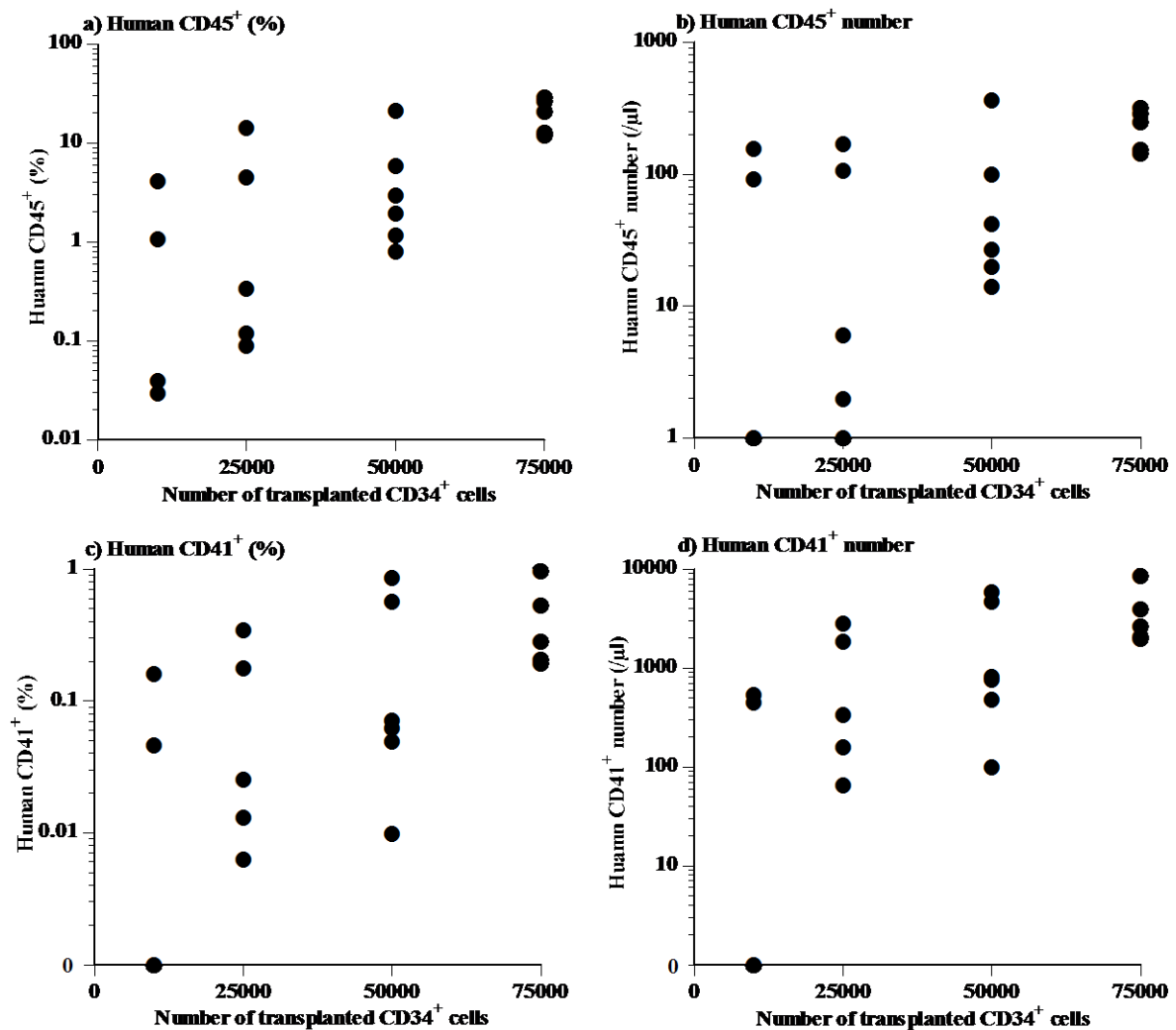


Figure 3-1 Human CD45⁺ cells and human CD41⁺ platelets in NOD/SCID mice transplanted with human cord blood CD34⁺ cells at 7-week after transplantation. Peripheral blood was withdrawn from mice transplanted with various numbers of human CB CD34⁺ cells at 7-week after transplantation. The percentage of each human CD45⁺ cells (A) and human CD41⁺ platelets (C) was measured by flow cytometry. The number of human CD45⁺ cells (B) was calculated from the percentage of human CD45⁺ cells and WBC counts in peripheral blood, and the number of human CD41⁺ platelets (D) was calculated from the percentage of human CD41⁺ platelets and platelet counts in peripheral blood.

3.3.2 ヒト血小板の機能

ヒト臍帯血 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウスの末梢血中のヒト血小板の機能を評価するために、血小板の活性化マーカーである CD62P (P-selectin) の発現および GP IIb/IIIa の活性化について検討した。GP IIb/IIIa の活性化は、モノクローナル抗体 PAC-1 の結合として評価した。TRAP は、ヒト血小板には存在するがマウス血小板には存在しないプロテアーゼ活性化受容体-1 (Protease-activated receptor-1, PAR-1) を特異的に活性化する。すなわち、マウス末梢血中のヒト血小板のみを活性化する。Figure 3-2 に示したように、臍帯血 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウスから採取した末梢血を TRAP にて刺激することにより、ヒト血小板上の CD62P 発現および PAC-1 結合は増加した。

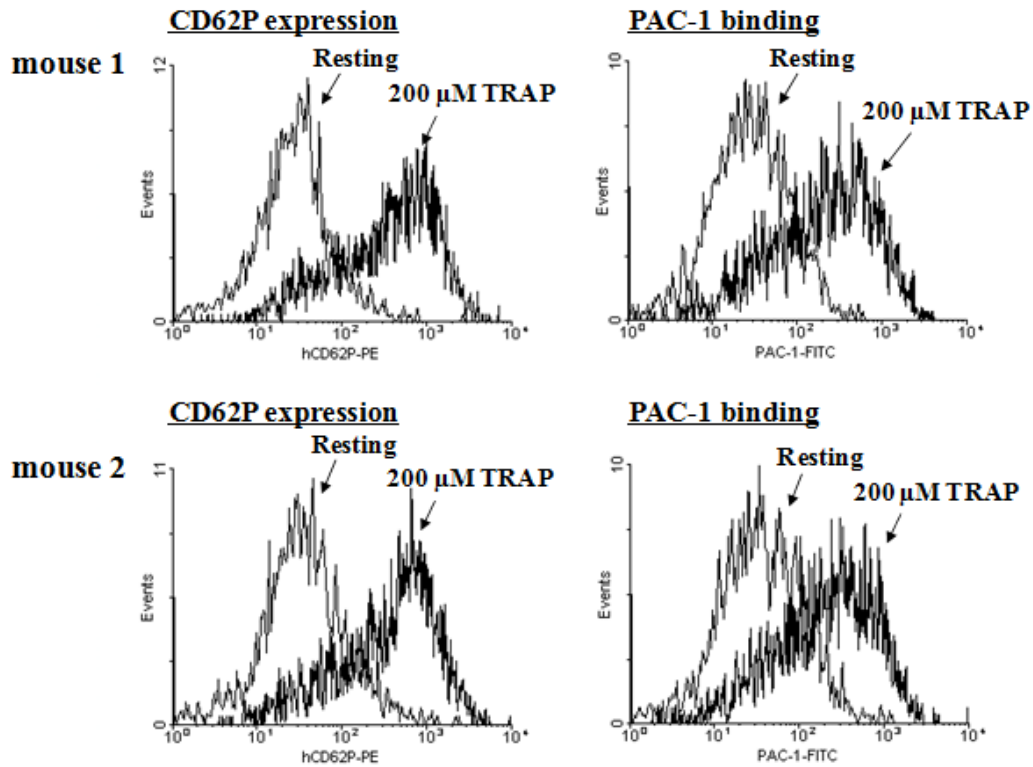


Figure 3-2 Flow cytometric analysis of *ex vivo* activation of human platelets produced in NOD/SCID mice. Platelet activation was measured as CD62P expression and PAC-1 antibody binding on platelets stimulated with thrombin receptor agonist peptide (TRAP). Thick lines and thin lines represent the stimulated and unstimulated platelets in each panel. Data of two mice are shown.

3.3.3 骨髄細胞の巨核球形成

NOD/SCID マウスの骨髄細胞のヒト巨核球形成について *ex vivo* 実験を行った。骨髄細胞は、ヒト TPO、ヒト IL-6 およびヒト IL-3 存在下でヒト巨核球コロニーを形成し、マウス骨髄細胞中にヒト巨核球前駆細胞が存在することが示された (Figure 3-3)。

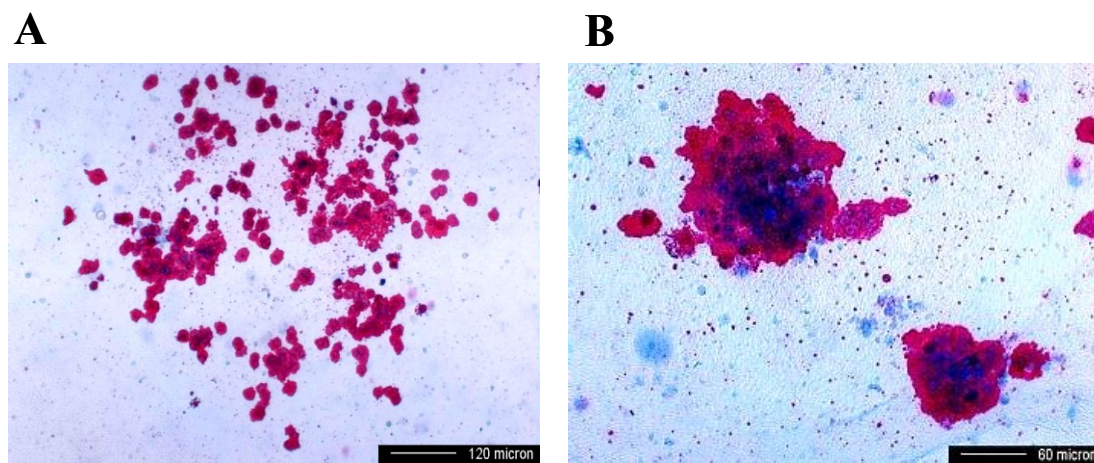


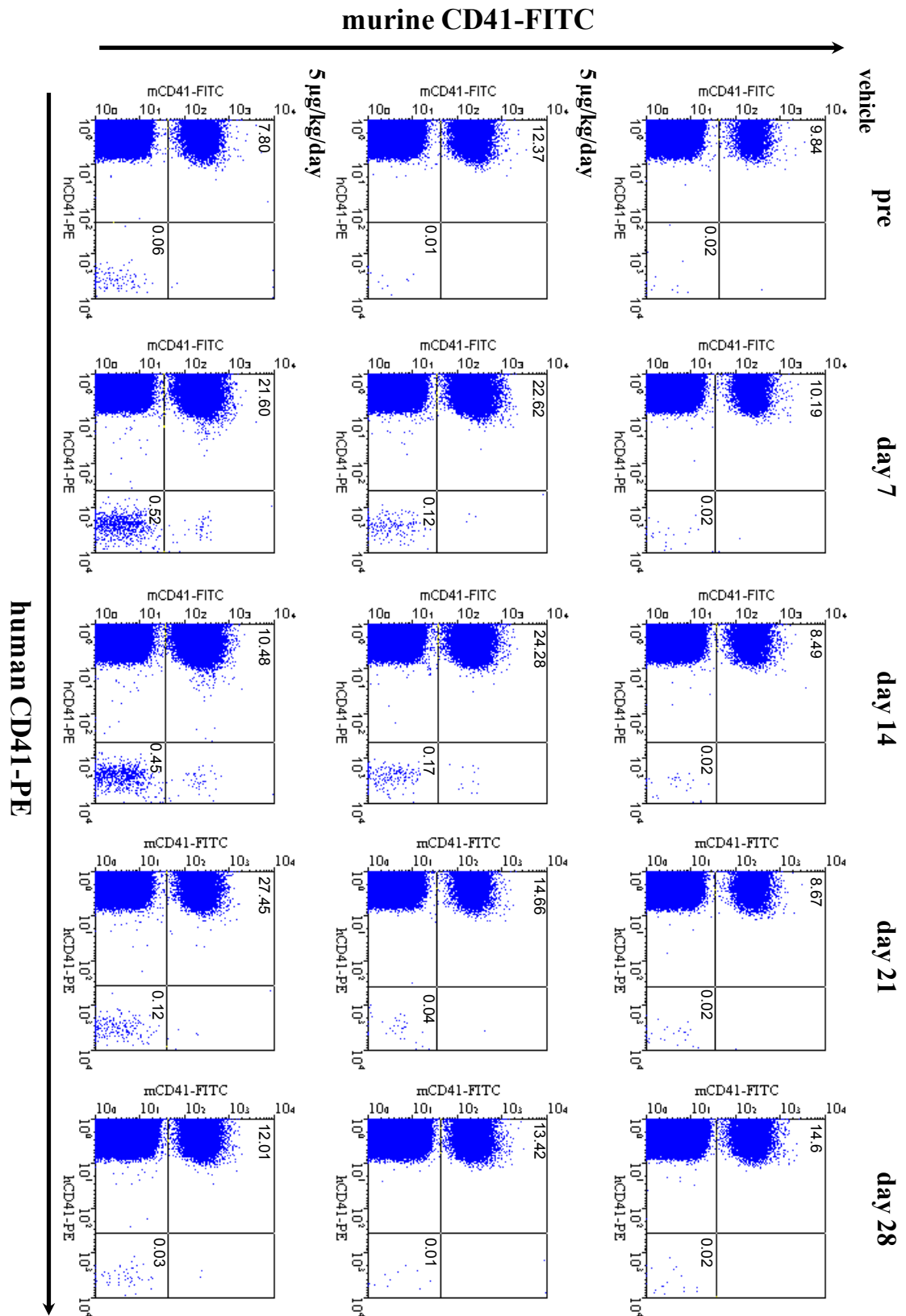
Figure 3-3 Human megakaryocyte colony formation from bone marrow cells of human platelets-generating NOD/SCID mice.

Bone marrow cells of NOD/SCID mice were collected and human megakaryocyte colony formation was examined in the presence of human TPO, human IL-6 and human IL-3. Human CFU-Mks were determined on day 14 after the start of culture. Images were photographed A) $\times 100$ and B) $\times 200$ objectives.

3.3.4 NOD/SCID マウスへの PEG-rHuMGDF の投与

血小板産生を制御する主たる生理活性物質である TPO のヒト臍帯血 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウスにおける *in vivo* でのヒト血小板増加作用を検討するため、TPO の一種である PEG-rHuMGDF を NOD/SCID マウスに投与した。移植後 10～13 週に 0.1%以上のヒト血小板を産生する NOD/SCID マウスに対し、PEG-rHuMGDF を 14 日間皮下投与した。フローサイトメトリーによる測定の代表例を Figure 3-4 A に示す。PEG-rHuMGDF はヒト血小板数を増加させ、0.5 µg/kg/day で投与前値の約 2 倍、5 µg/kg/day で投与前値の約 5 倍まで血小板数が増加した (Figure 3-4 B)。一方、マウス血小板数は 5 µg/kg/day の投与では増加したものの、0.5 µg/kg/day ではほとんど変化が認められなかった (Figure 3-4 C,D)。さらに、PEG-rHuMGDF 投与によるヒト血小板数の増加率とマウス血小板数の増加率の比を計算したところ、ヒト血小板数の増加が最大であった投与開始 14 日目には 0.5 µg/kg/day で約 1.3 倍、5 µg/kg/day で約 1.8 倍であった (Figure 3-4 D)。PEG-rHuMGDF の投与終了により、ヒト血小板数は PEG-rHuMGDF 投与前値に戻ったが、マウス血小板数の戻りより遅かった (Figure 3-4 B-D)。この結果は、PEG-rHuMGDF がヒト細胞に対して感受性が高く反応したためと考えられた。マウス白血球数およびヒト白血球数は、PEG-rHuMGDF 0.5 µg/kg/day の投与では、ほとんど変化はみられなかったが、5 µg/kg/day では上昇傾向が見られた (Figure 3-5)。赤血球数および体重はどの投与量でも変化はなかった。

A



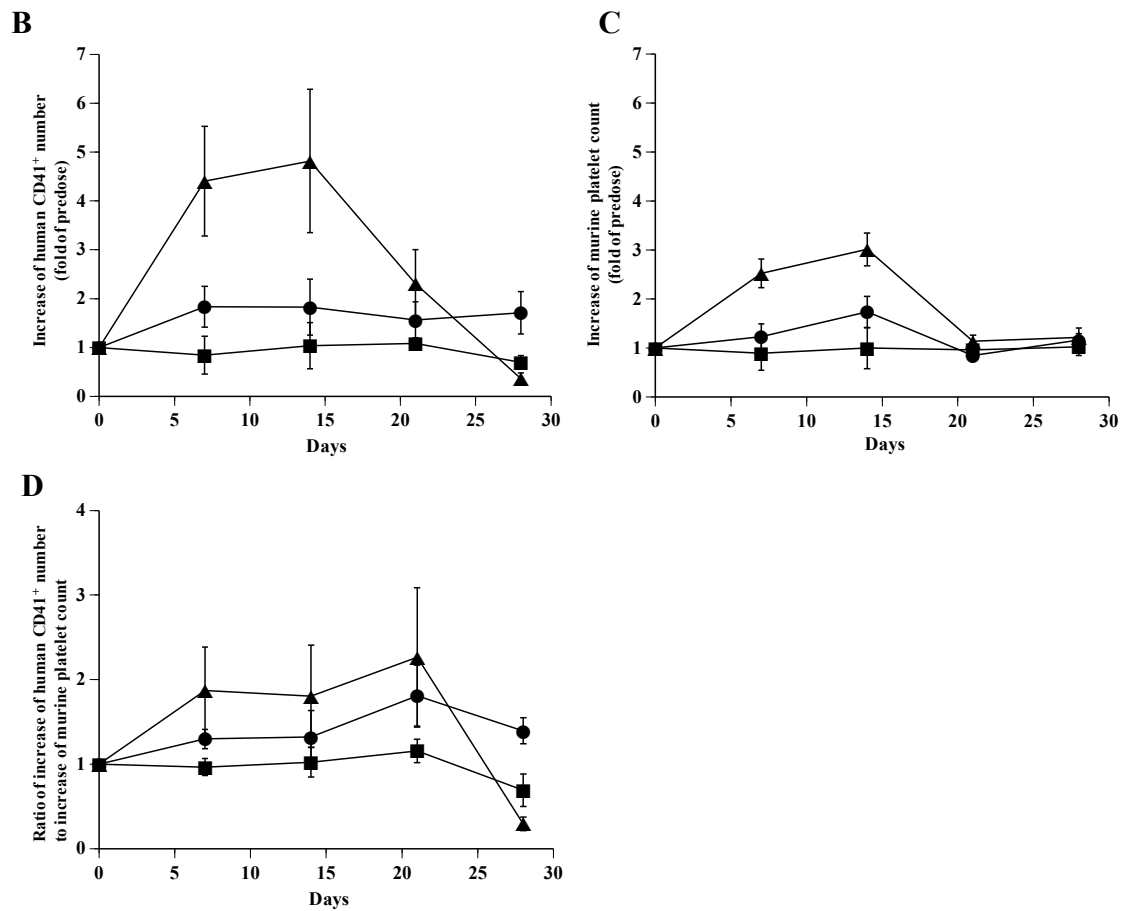


Figure 3-4 Effect of PEG-rHuMGDF on human platelet production in NOD/SCID mice transplanted with human cord blood CD34⁺ cells.

PEG-rHuMGDF (vehicle (■), 0.5 (●) and 5 (▲) µg/kg/day) was administered subcutaneously for 14 days to human platelet-producing NOD/SCID mice. Peripheral blood was collected on the indicated days, and blood cell counts were measured. The percentage of human platelets was measured by flow cytometry (A), and the number of human (B) and murine platelets (C) was calculated. The time course of changes in hCD41⁺ number is expressed in terms of the fold increase after administration of PEG-rHuMGDF relative to the value at predosing. Further, the ratio of increase in hCD41⁺ number to increase in murine platelet count (D) was calculated. Data are presented as mean ± SEM (vehicle, n = 3; 0.5 µg/kg/day, n = 5; 5 µg/kg/day, n = 6).

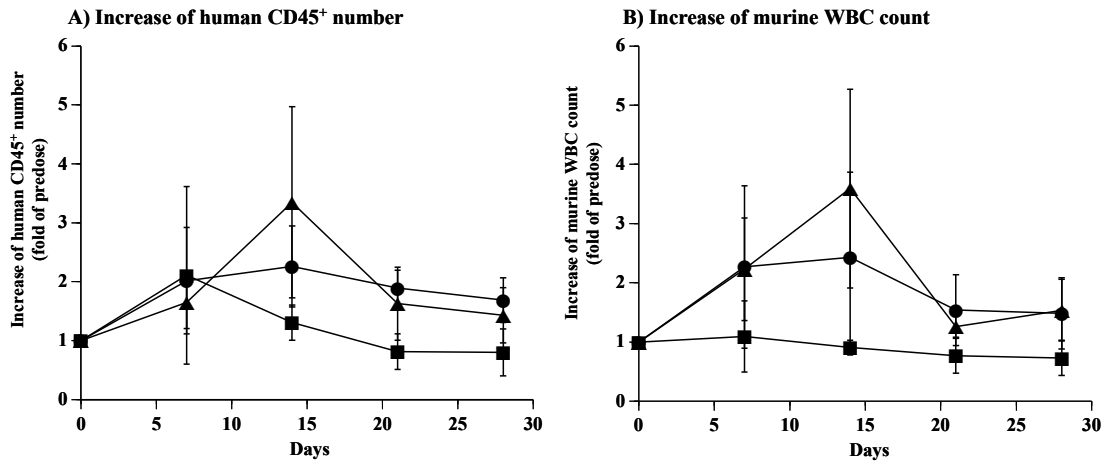


Figure 3-5 Effect of PEG-rHuMGDF on the number of human CD45⁺ cells in NOD/SCID mice transplanted with human cord blood CD34⁺ cells.

PEG-rHuMGDF (vehicle (■), 0.5 (●) and 5 (▲) µg/kg/day) was administered subcutaneously for 14 days to human platelet-producing NOD/SCID mice. The number of hCD45⁺ cells (A) and WBC counts (B) were calculated. The time course of changes in hCD45⁺ number is expressed in terms of the rate of increase after administration of PEG-rHuMGDF relative to the predose value. Data are presented as mean ± SEM (vehicle, n = 3; 0.5 µg/kg/day, n = 5; 5 µg/kg/day: n = 6).

3.3.5 PEG-rHuMGDF の再投与

ヒト血小板産生に対する PEG-rHuMGDF の再投与の効果を検証するために、PEG-rHuMGDF の投与終了 8 から 11 週後（移植後 21 から 24 週）の NOD/SCID マウスに PEG-rHuMGDF を再度皮下注射した。ヒト血小板数は 0.5 および 5 $\mu\text{g/kg/day}$ の PEG-rHuMGDF にて用量依存的に増加した (Figure 3-6)。PEG-rHuMGDF の再投与は、最初の投与時と同様のヒト血小板増加作用を示した。投与開始 14 日目および 21 日目に骨髓細胞を調製し、骨髓細胞中のヒト造血前駆細胞数を測定した。両日とも、ヒト CFU-Mk および CFC の数は PEG-rHuMGDF 5 $\mu\text{g/kg/day}$ 投与群の方が 0.5 $\mu\text{g/kg/day}$ 投与群よりも高かった (Table 3-1)。骨髓中のヒト CFU-Mk 数は、末梢血中のヒト血小板数と相関すると考えられた。

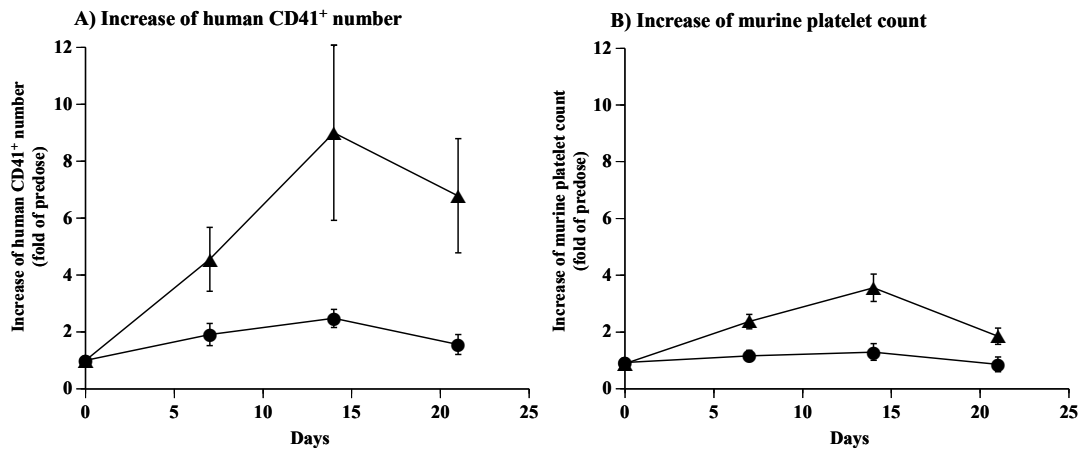


Figure 3-6 Effect of re-administration of PEG-rHuMGDF on human platelet production in NOD/SCID mice transplanted with human cord blood CD34⁺ cells. PEG-rHuMGDF (0.5 (●), 5 (▲) µg/kg/day) was readministered subcutaneously for 14 days to NOD/SCID mice at 8–11 weeks after the cessation of PEG-rHuMGDF administration. Human platelet number (A) and murine platelet count (B) were determined and expressed as described in “Materials and methods”. Data are presented as mean ± SE (0.5, 5 µg/kg/day: n = 6).

Table 3-1 Human hematopoietic colony formation from bone marrow cells after PEG-rHuMGDF re-administration to NOD/SCID mice transplanted with human cord blood CD34⁺ cells.

Dose (µg/kg/day)	hCD45 ⁺ cells		CFU-Mk/ 1×10^6		CFC/ 1×10^5	
	(10 ⁶)/femur		hCD45 ⁺ cells		hCD45 ⁺ cells	
	Day 14	Day 21	Day 14	Day 21	Day 14	Day 21
0.5	10.9 ± 4.2	3.3 ± 1.8	70 ± 4	15 ± 11	127 ± 45	198 ± 91
5	4.5 ± 3.5	5.8 ± 2.9	373 ± 184	140 ± 32	349 ± 107	649 ± 514

Data are presented as mean ± SD (0.5 µg/kg/day: n = 2 for day 14, n = 3 for day 21; 5 µg/kg/day: n = 3 for day 14, n = 4 for day 21).

3.3.6 ヒト血小板産生 NOD/SCID マウスのヒト血小板産生に対する YM477 の効果

ヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスでは、ヒト血小板造血能が再構築しており、ヒト TPO 投与によるヒト血小板増加作用を確認できた。そのため、このモデルにおいて、ヒトおよびチンパンジーTPO受容体にのみに作用する YM477 の *in vivo* 評価が可能であると考えられた。

ヒト血小板を安定して産生する NOD/SCID マウスに YM477 (0, 0.3, 1, 3 mg/kg/day) を 14 日間経口投与した。YM477 は用量依存的にヒト血小板を増加させ、投与開始 14 日目には、1 mg/kg/day で投与前値の約 2.7 倍 ($p<0.05$)、3 mg/kg/day では、投与前値の約 3.0 倍 ($p<0.01$) までヒト血小板数が増加した (Figure 3-7)。最小有効用量は 1 mg/kg/day であった。YM477 の投与終了後、ヒト血小板数は YM477 投与前値まで戻った。一方、マウス血小板数は、全ての投与群において変化が認められなかった。さらに、白血球、赤血球、体重については、薬剤投与群で実験期間中に有意な差は認められなかった。

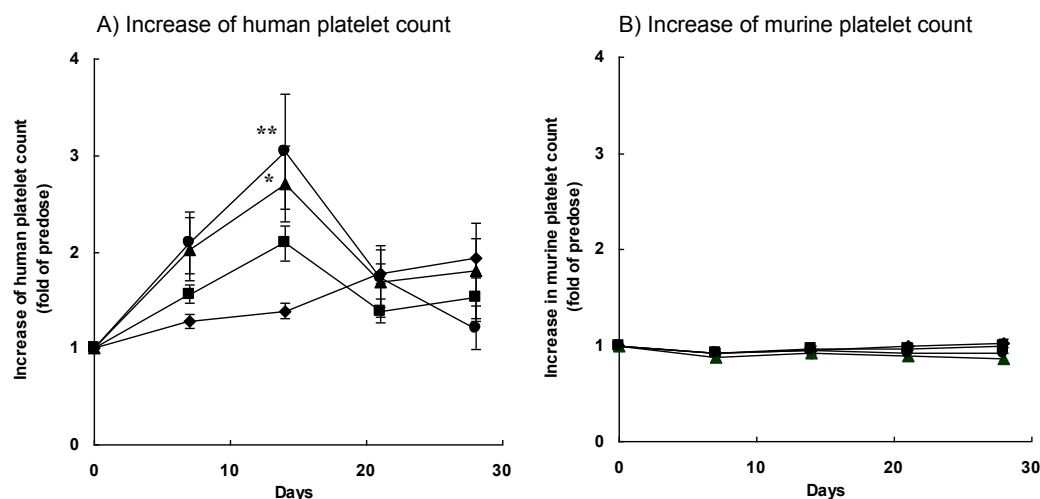


Figure 3-7 Effect of YM477 on *in vivo* human platelet production in NOD/SCID mice transplanted with human fetal liver CD34⁺ cells.

YM477 (vehicle (◆), 0.3 (■), 1 (▲), and 3 (●) mg/kg/day) was orally administered for 14 days to human platelet-producing NOD/SCID mice. Peripheral blood was collected on the indicated days. The percentage of human platelets was measured using a flow cytometry, and the number of human (A) and murine platelets (B) was calculated. The time course of changes in human and murine platelets number is expressed in terms of the rate of increase after administration of YM477 relative to the value at predosing. Data are presented as mean \pm SE (n = 10, on day 28; n = 9 for vehicle, 0.3, 3 mg/kg/day groups). *p < 0.05, **p < 0.01 vs. vehicle group by Dunnett's test.

3.4 まとめと考察

NOD/SCID マウス (47,52) は、ヒト造血幹細胞の同定・検出、ヒト造血幹細胞の体外での増幅 (53)、および造血幹細胞遺伝子療法 (54) の有効な評価モデルとして位置づけられてきた。しかし、ヒト細胞を移植した NOD/SCID マウスへのヒトサイトカイン投与の効果の報告 (55,56) およびヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスでのヒト血小板産生に関する詳細な検討の報告はほとんどなかった。また、サイトカインのなかには種特異的に働くものがある。例えば、マウス IL-3 はマウスのマスト細胞を増加させるが、ヒトマスト細胞は増加させず (57)、ヒト IL-6 はヒトとマウスの巨核球に対する作用が異なる (58)。そして、第 2 章において、YM477 の作用には種特異性があることが示された。以上のことより、*in vivo* でヒト血小板造血の評価が可能な実験系を確立することが必要となり、ヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスのヒト血小板造血について検討した。

ヒト臍帯血 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウスの末梢血中には、ヒト血小板およびヒト CD45⁺細胞が 6 ヶ月以上産生されることが示された。ヒト血小板およびヒト巨核球が recipient の末梢血および骨髓に存在することはすでに報告されているが (43)、本章においてもヒト臍帯血 CD34⁺ 細胞移植 NOD/SCID マウスにおいて、長期にヒト血小板産生が観察されることを示した。ヒト血小板の寿命の短さにもかかわらず、ヒト臍帯血 CD34⁺ 細胞移植 NOD/SCID マウスでヒト血小板が安定でかつ長期に検出されることは、マウス体内でヒト血小板が継続的に産生されることを示唆していると考えられた。

ヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウス体内で産生されたヒト血小板は TRAP によって活性化された。血小板表面の CD62P 発現および GPIIb/IIIa 活性化は血小板活性化の指標であることから (59)、ヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスの血小板が TRAP 刺激により CD62P を発現し、GP IIb/IIIa が活性化したことは、マウスの末梢血中に産出されたヒト血小板が血小板機能を有するものと考えられた。

上記のように、ヒト臍帯血 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウスでは正常な機能を有するヒト血小板が恒常的に産生されていることが示された。次に TPO の一種である PEG-rHuMGDF を NOD/SCID マウスに投与し、マウス体内でのヒト血小板造血への応答性を検討した。PEG-rHuMGDF の投与により、マウス血小板数の増加に加え、マウス末梢血中のヒト血小板数および骨髓中のヒト巨核球数が増加した。PEG-rHuMGDF の投与終了により、ヒト血小板は投与前のレベルにまで減少した。さらに、PEG-rHuMGDF の再投与の際には、最初の投与時のヒト血小板造血の反応とほぼ同等の反応が認められた。TPO は血小板産生の主な生理

的制御因子であり、巨核球の分化・成熟を促進し、循環血小板数を増加させる (7,21)。TPO をヒト (60–62)、ヒト以外の霊長類 (63–65) およびマウス (66,67) に投与したとき、末梢血の血小板数はいずれの場合においても増加し、投与中止後は投与前のレベルにまで減少する。ヒト臍帯血 CD34⁺ 細胞を移植した NOD/SCID マウスへの PEG-rHuMGDF 投与の作用は、ヒトおよび正常マウス、ラット、サル等への作用と同様であった (68)。この結果は、ヒト臍帯血 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウスは通常の動物と同様の TPO への反応性を有することを示しており、さらにマウス体内でヒト血小板産生が長期にわたって再構築されていることを示唆している。

これまでに、巨核球系細胞の分化、成熟に関与するサイトカイン IL-3、IL-6、IL-11、TPO 等が血小板減少治療薬として開発されているが、リコンビナントヒト IL-11 (Neumega) のみが臨床で使用されている (69,70)。これらの薬剤の前臨床試験は巨核球産生や血小板産生を *in vitro* および *in vivo* で刺激することが示されているが、臨床では大きな効果が認められていない。この失敗により、より一層ヒト血小板造血を反映した評価系にて血小板増加作用をもつ薬剤を評価する必要性が高まった。本研究では、ヒト臍帯血 CD34⁺ 細胞を移植した NOD/SCID マウスが機能的なヒト血小板を安定的に生産し、PEG-rHuMGDF の投与によりヒト血小板造血が亢進することを示した。これらの結果は、本マウスは長期にわたって正常のヒト血小板造血が再構築されることを示唆している。さらには、ヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスが *in vivo* でのヒト血小板産生の研究および血小板増加薬の評価に有用であることが示唆された。

このように世界で初めて、ヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスが *in vivo* でのヒト血小板産生の研究に有用であり、ヒトに特異的に作用する TPO 受容体作動薬の良い評価系になることを示した。そこで、このモデルを用いて YM477 のヒト血小板産生に対する作用について評価した。このような異種移植モデルを用いた化合物の血小板増加作用の検討については、現在までに NIP-004 (26)、butyzamide (71) 等が報告されているが、我々はそれらに先立って YM477 の評価を実施した。

ヒト血小板を安定して産生するヒト胎児肝臓 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウスへ YM477 を 14 日間経口投与した。投与開始 14 日目に、1 mg/kg/day 以上で有意なヒト血小板数の増加が認められた。YM477 の投与終了 2 週間後には、ヒト血小板数は YM477 投与前値まで減少した。約 10 日間というヒト血小板の寿命を考慮すると、YM477 の投与終了 2 週間後には YM477 投与前の造血環境に戻ると考えられ、結果はその予想と矛盾がなかった。一方、マ

ウス血小板数への影響は認められなかったが、これは YM477 がマウス TPO 受容体導入 Ba/F3 細胞の増殖活性を示さないことと一致していた。

ヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスを用いた非臨床試験で得られた YM477 のヒト血小板造血に対する効果は、臨床試験でも認められた。第 I 相試験では、健常人に YM477 が 14 日間投与された。YM477 は用量依存的に血小板数を増加させ、1 日 10 mg の投与では、血小板数が投与前値から 50%以上増加した (72)。この結果は、ヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスで得られた実験結果と一致するものであった。さらに、ピークの血漿中蛋白非結合型 YM477 濃度は、NOD/SCID マウスモデルへの 1 mg/kg/day の 14 日間の反復投与では 3.3 ng/mL であり、ヒトへの 10 mg の 14 日間の反復投与では 3.4 ng/mL であった。このように、両試験において血小板増加作用とピークの血漿中蛋白非結合型 YM477 濃度の相関はほぼ一致していた。この結果は、NOD/SCID マウスモデルがヒトでの経口 TPO 受容体作動薬の濃度と効果の関係を予想するのにふさわしいモデルであることを示唆している。

本章では、血小板機能を有するヒト血小板を体内で安定して産生するマウスモデルを確立した。また、本モデルを用いて YM477 を評価し、YM477 が *in vivo* にてヒト血小板増加作用を有することを示した。

第4章 YM477の血小板の活性化および凝集に及ぼす影響の検討

4.1 緒言

TPOは血小板の活性化および凝集に影響を与えることが知られている。TPOは、*in vitro*でヒト血小板を刺激して血小板表面に血小板活性化マーカーであるCD62Pを発現させる作用を持ち(73)、ADPやコラーゲン等の血小板刺激因子により活性化された血小板の凝集を促進させる効果がある(74)。

序論で述べたとおり、血小板は、止血機構において、粘着・放出・凝集反応による血小板血栓形成(一次止血)に大きな役割を果たしている。血小板は、損傷し、露出した内皮下組織のコラーゲンと結合して立体構造変化を起こし、血小板膜上のGP Ib-V-IX複合体と結合する。内皮下組織に粘着した血小板は、活性化され、血小板膜上のGP IIb/IIIaが構造変化を起こして(一次凝集)フィブリノゲンと結合するようになり、フィブリノゲンはGP IIb/IIIaとの結合部位を2ヶ所持つためフィブリノゲンを介して血小板同士が結合する。このようにして複数の血小板が結合した状態が血小板凝集である。刺激を受けた血小板は活性化され、ADP等の顆粒内容物を放出し、他の血小板を活性化させ、凝集反応をさらに促進させる(二次凝集)。したがって、血小板を活性化させ、凝集を促進する作用を持つ薬剤は、動脈硬化症のような血管病変において、閉塞血栓を形成し、虚血心疾患や脳血管障害等を引き起こす恐れがある。TPOが血小板を活性化することおよび血小板凝集を促進させることの臨床的意義は現在のところ不明であり、動物実験においても血栓生成傾向が確認されていない。しかしながら、上述のリスクを考慮すると、*in vitro*および*in vivo*でTPO様の作用を示すYM477について、血小板活性化および凝集に与える影響を調べることは重要であると考えられた。

また、第3章にて、YM477の投与によりヒト胎児肝臓CD34⁺細胞移植NOD/SCIDマウス体内にてヒト血小板が増加することを示した。YM477の投与により産生したと考えられる血小板としての機能を持っている必要がある。そこで、YM477投与後のNOD/SCIDマウス体内のヒト血小板の機能性について血小板の活性化を指標として検討を行った。

4.2 実験方法

4.2.1 薬剤

YM477 は、滅菌水に懸濁後、10 N NaOH を添加して溶解し、1 N HCl で中和して使用した。

rhTPO は、GT より購入したものを使用した。

4.2.2 *In vitro* における YM477 のヒト血小板凝集に対する作用の検討

YM477 は、滅菌水に懸濁し、10 N NaOH を添加して溶解させた。溶解後、1 N HCl を添加して中和した。YM477 は 0.35% BSA を含む PBS (BSA/PBS) を用いて希釈した。

ヒト血液を健常人ボランティアより 1/10 容の 3.8% クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血し、 $150 \times g$ で 10 分間遠心分離した上清 (Platelet-rich plasma, PRP) を分取した。Platelet-poor plasma (PPP) は、PRP を $2,000 \times g$ で 10 分間遠心分離して調製した。PRP の血小板数は、自動血球計算機 (MEK-6258, Nihon Kohden) にて計測し、PPP を用いて 300,000 platelets/ μ L に調整した。PRP の血小板数が、300,000 platelets/ μ L よりも少なかった場合には、血小板数を調整せず、そのまま PRP を使用した。

血小板凝集は、血小板凝集計 (HEMA TRACER 212, MC Medical, Tokyo, Japan) を用いて、懸濁液を 37 °C で 1,000 rpm にて攪拌しながら、光透過性の増加を記録することで測定した。PRP と BSA/PBS をキュベットに入れ、1 分間インキュベーションした後に ADP を添加し、血小板凝集を惹起させた。PRP は生体試料であり個体差があるため、血小板活性化を惹起させる ADP 濃度が試料によって異なる。従って、初めに、種々の ADP 濃度を用いて、各個体の PRP の ADP 惹起血小板凝集の反応性を検証し、各個体の至適 ADP 濃度を決定した。この実験では、次に示すような異なる血小板凝集を惹起する 3 種類の ADP 濃度を選択した。血小板凝集活性の最大値について、21-30% であるものを低程度 (1 μ M ADP)、31-50% であるものを中程度 (2 μ M ADP)、ほぼ最大値を高程度 (10 μ M ADP) とした。YM477 および rhTPO (GT) の血小板凝集の増強効果を検証するために、PRP に、YM477、rhTPO、または BSA/PBS を ADP を添加する 5 分前に添加して、室温にてインキュベーションした。さらに、YM477 および rhTPO の血小板凝集惹起効果を検討するために、YM477、rhTPO、または BSA/PBS を ADP の代わりに添加した。データは、平均 \pm SE ($n = 4$) で示した。統計学的検定は、Dunnett's 法を用い、P 値が 0.05 未満の場合に有意とした。

4.2.3 *In vitro* における YM477 のヒト血小板活性化に対する作用の検討

YM477 の調製、ヒト血小板の調製は本章 4.2.1 に述べた方法に従った。血小板活性化は、ADP による刺激を与えた後の血小板の CD62P の発現を指標として評価した。PRP は生体試料であり個体差があるため、血小板活性化を惹起させる ADP 濃度が試料によって異なる。従って、まず最初に、種々の ADP 濃度を用いて、各個体の PRP の ADP 惹起 CD62P 発現状態を検証し、各個体の至適 ADP 濃度を決定した。この実験では、次に示すように血小板上の CD62P を発現させる 3 種類の ADP 濃度を選択した：血小板凝集活性の最大値について、21-30%であるものを低程度 (1-2 μ M ADP)、31-50%であるものを中程度 (2-5 μ M ADP)、ほぼ最大値を高程度 (10-50 μ M ADP)とした。PRP および生理食塩水を混合させた後、0.35% BSA/PBS、rhTPO (GT)、または YM477 を添加した。10 分後に ADP または生理食塩水を添加し、室温にて 10 分間インキュベートした。さらに、FITC 標識抗ヒト CD42a 抗体 (BD Pharmingen)、PE 標識抗ヒト CD62P 抗体 (BD Pharmingen)、および生理食塩水を添加し、室温で 20 分間静置した。非特異的な結合を測定するために、PE 標識マウス IgG₁, κ 抗体 (Isotype-matched antibody, BD Pharmingen) を PE 標識抗ヒト CD62P 抗体の代わりに添加した。血小板は CellFix (Nihon Becton Dickinson, Tokyo, Japan) を用いて固定した。1 時間以上固定した後に EPICS XL-MCL (Beckman-Coulter) を用いてフローサイトメトリ解析を実施した。血小板は抗ヒト CD42a 抗体で染色した画分として検出し、CD42a 陽性画分の CD62P の蛍光強度の中央値を WinMDI 2.8 software にて解析した。各試料の CD62P の発現は、薬剤非添加時に 200 μ M ADP で血小板を刺激した場合の CD62P の蛍光強度の中央値に対する薬剤添加時の血小板の CD62P の蛍光強度の中央値の比率で表し、データは平均 \pm SE ($n = 5$) で示した。統計学的検定は Dunnett's 法を用い、P 値が 0.05 未満の場合に有意とした。

4.2.4 ヒト胎児肝臓 CD34⁺細胞細胞移植 NOD/SCID マウスで産生されるヒト血小板の活性化についての検討

NOS/SCID マウスへのヒト胎児肝臓 CD34⁺細胞の移植は第 3 章の 3.2.8 に記載した方法に従った。ヒト血小板を安定的に産生している NOD/SCID マウスに YM477 (0, 3 mg/kg/day) を 14 日間経口投与し、投与前および投与開始 15 日目に採血し、血球数、ヒト血小板数を測定した。測定方法は第 3 章の 3.2.9 に記載した方法に従った。

さらに、ヒト血小板機能を測定するため、血小板を TRAP (PENINSULA) で活性化させた

後の CD62P 発現を測定した。CD62P の測定は、第 3 章の 3.2.4 に記載した方法に従った。なお、フローサイトメトリー解析には EPICS XL-MCL (Beckman-Coulter) を用いた。ヒト血小板は抗ヒト CD42a 抗体で染色された画分とし、CD42a 陽性画分の CD62P の蛍光強度の中央値を WinMDI 2.8 ソフトウェアで解析した。CD62P の発現は、TRAP で活性化されたヒト血小板の CD62P の蛍光強度の中央値を無刺激のヒト血小板の CD62P の蛍光強度で割ることにより算出した。これは、個体間のばらつきを低減するため、計算には中央値を用い、個体ごとに活性化された血小板の蛍光強度と無刺激の血小板の蛍光強度の比を算出することとした。

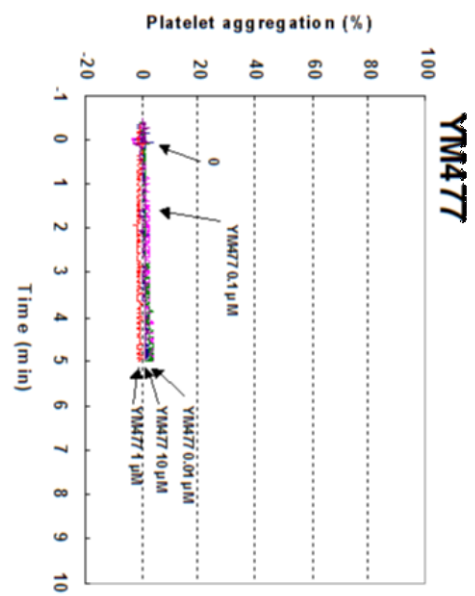
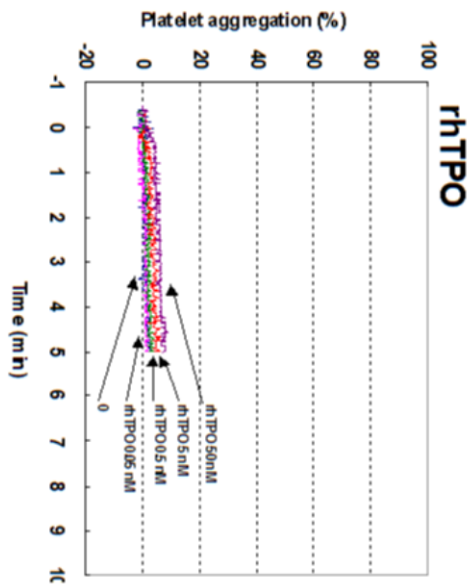
なお、ヒト血小板数と CD62P の発現の経時的変化は、投与前値に対する割合で示した。統計学的検定は、ヒト血小板数は Student's t-test にて、CD62P 発現は Student's t-test および分散を用い、P 値が 0.05 未満の場合に有意とした。

4.3 結果

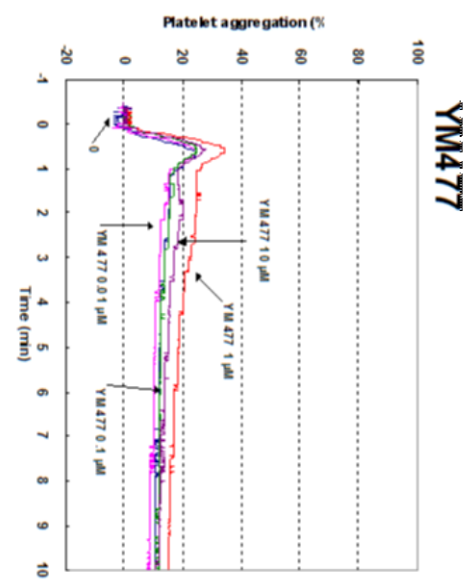
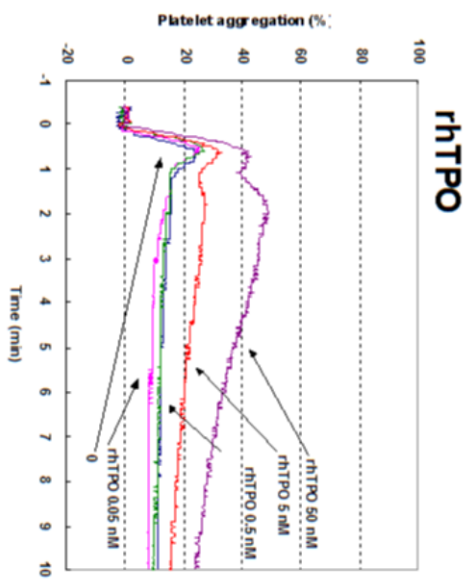
4.3.1 YM477 の血小板凝集に対する作用

血小板凝集の結果を Figure 4-1 および 4-2 に示した。血小板凝集活性の最大値の 21-30% を低程度 (1 μ M ADP)、31-50% を中程度 (2 μ M ADP)、ほぼ最大値を高程度 (10 μ M ADP) とした。rhTPO は、中程度の血小板凝集を濃度依存的に亢進させ、5 nM と 50 nM で二次凝集まで引き起こした (Figure 4-1 (C))。この亢進作用は統計学的に有意であった (Figure 4-2 (C))。一方、YM477 は血小板凝集を亢進させなかった。さらに、rhTPO は低程度の血小板凝集も有意に亢進させたが、50 nM まで低程度の血小板凝集を二次凝集まで亢進させなかった (Figure 4-1 (B), 4-2 (B))。YM477 は低程度の血小板凝集においても亢進作用を示さなかった。一方、YM477 および rhTPO ともに、高程度の血小板凝集を亢進させなかった (Figure 4-1 (D), Figure 4-2 (D))。なお、YM477 は単独では血小板凝集を惹起させなかったが、rhTPO は単独でも血小板凝集をわずかに惹起させた (Figure 4-2 (A))。

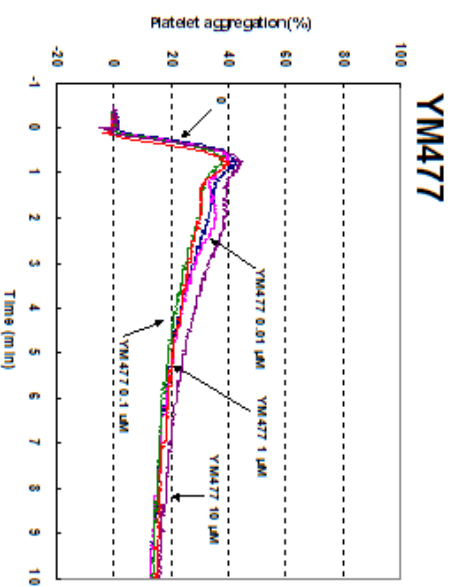
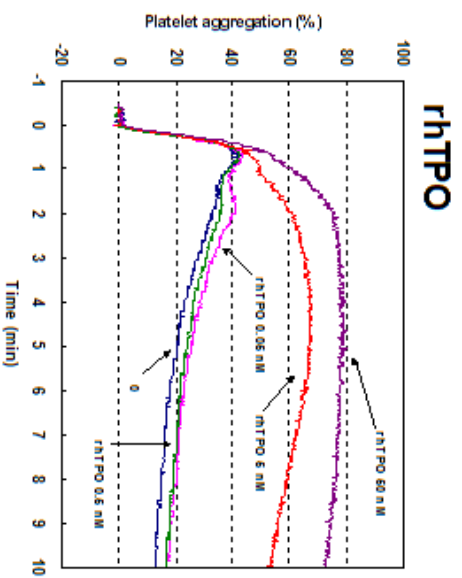
A) Drug only



B) Low level of ADP stimulation



C) Medium level of ADP stimulation



D) High level of ADP stimulation

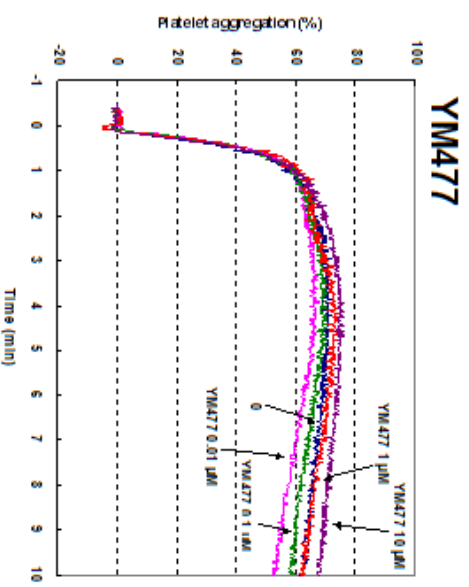
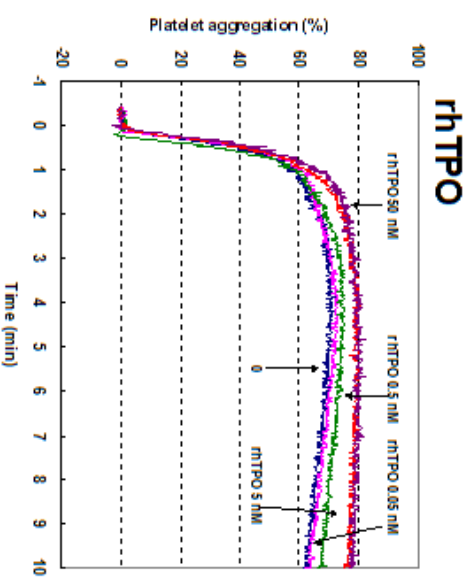


Figure 4-1 The typical results of human platelet aggregation

Representative results of platelet aggregation induced by ADP are shown. To examine the enhancing effect of platelet aggregation for YM477 and rhTPO, either 10 μ L of YM477, rhTPO or BSA/PBS was added to 80 μ L of PRP prior to the addition of ADP. Three ADP concentrations were used which induced platelet aggregation at the following levels: the maximum rate of platelet aggregation was 21-30% for the low level (B), 31-50% for the medium level (C), and almost full platelet aggregation for the high level (D). Further, to determine the platelet aggregation inducing-effect of YM477 and rhTPO, either 10 μ L of YM477, rhTPO or BSA/PBS was added instead of the addition of ADP (A). The concentrations of rhTPO used for this study was 0.05, 0.5, 5, 50 nM and that of YM477 was 0.01, 0.1, 1, 10 μ M.

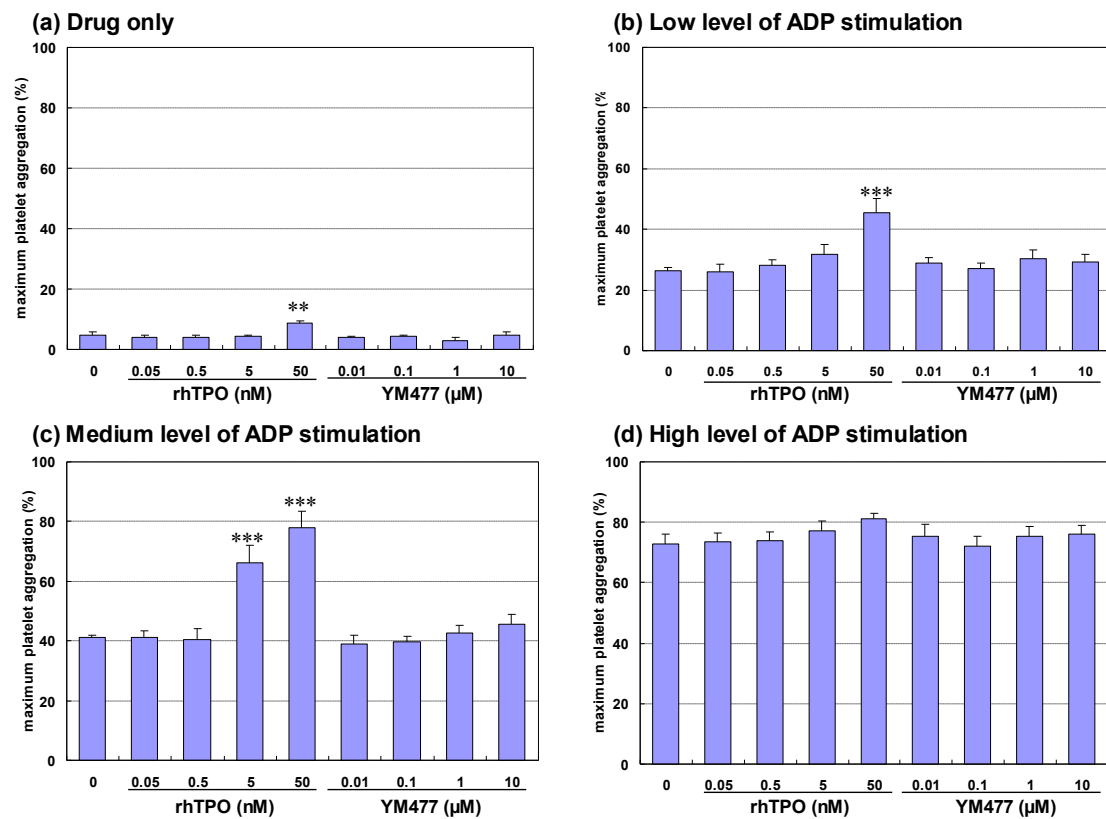


Figure 4-2 Effect of YM477 and rhTPO on *in vitro* human platelet aggregation

Three ADP concentrations were selected which induced platelet aggregation of the following levels: the maximum rate of platelet aggregation was 21-30% for the low level (B), 31-50% for the medium level (C), and almost full platelet aggregation for the high level (D). Moreover, YM477 and rhTPO were tested for their platelet activation effect (A). The concentrations of rhTPO used for this study were 0.05, 0.5, 5, 50 nM and that of YM477 were 0.01, 0.1, 1, 10 μM. Data were presented as mean ± SE (n = 4). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. vehicle group by the Dunnett's test.

4.3.2 YM477 の血小板に対する活性化作用

血小板の活性化マーカーである CD62P の発現を指標として、ヒト血小板活性化に対する YM477 と rhTPO の影響を調べた結果を Figure 4-3 に示した。rhTPO は、すべての強度の ADP 刺激による CD62P 発現を濃度依存的にかつ有意に促進させた。rhTPO による最大の CD62P 発現亢進作用は、コントロールに対して低程度の ADP 刺激 ($1-2 \mu\text{M}$ ADP) では約 1.7 倍、中程度の ADP 刺激 ($2-5 \mu\text{M}$ ADP) では約 1.5 倍、高程度の ADP 刺激 ($10-50 \mu\text{M}$ ADP) では、約 1.4 倍であった (Figure 4-3 B, C, D)。rhTPO の血小板活性化促進作用は、ADP の低程度および中程度の刺激において 5 nM 以上に有意であり、高程度の刺激においては 0.5 nM 以上で有意であった (Figure 4-3 B, C, D)。一方、すべての強度の ADP 刺激にて、YM477 はヒト血小板上の CD62P 発現を濃度依存的に増加させ、YM477 $10 \mu\text{M}$ 存在下での CD62P の発現亢進は、コントロールに対し、低程度の ADP 刺激では約 1.3 倍、中程度の ADP 刺激では約 1.2 倍、高程度の ADP 刺激では、約 1.1 倍であったが (Figure 4-3 B, C, D)、いずれも有意な作用ではなかった。また、YM477 と rhTPO 単独での血小板活性化作用を検証した結果、rhTPO 単独では 50 nM で有意な CD62P 発現を惹起させた (Figure 4-3 A)。一方、YM477 単独ではコントロールに対して CD62P 発現を濃度依存的に約 1.1 倍まで亢進させたものの、有意差は認められなかった (Figure 4-3 A)。

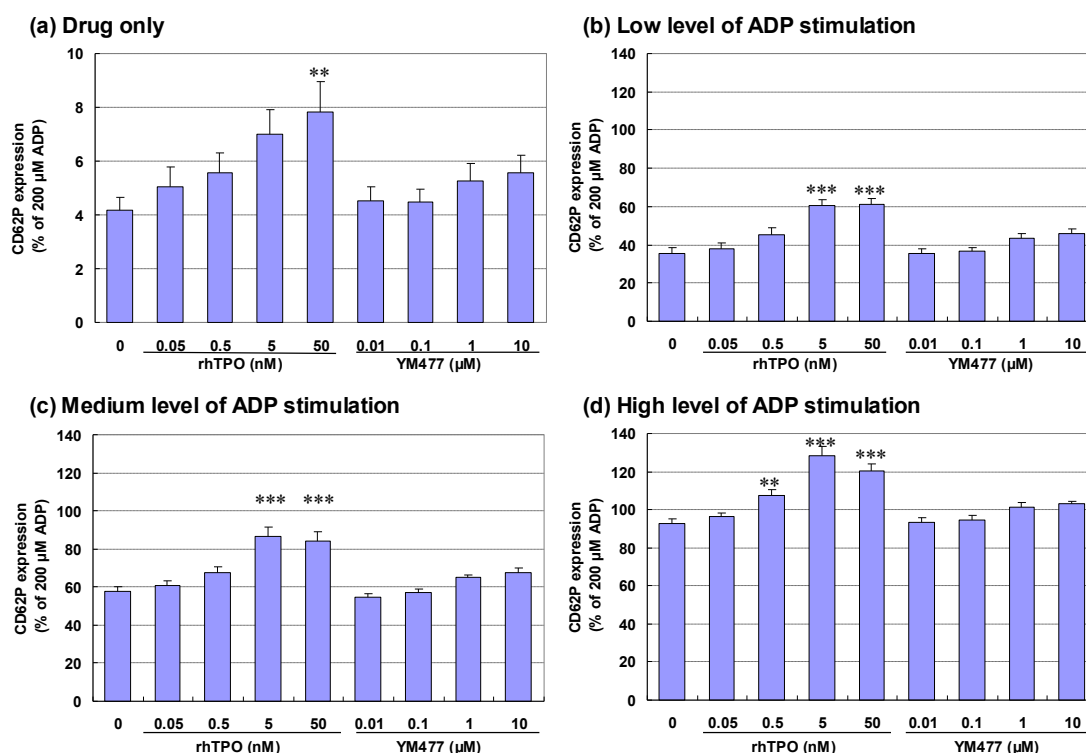


Figure 4-3 Effect of YM477 and rhTPO on *in vitro* human platelet activation

Platelet activation was measured as the CD62P expression on platelets stimulated with ADP. Platelets were activated by three intensities of ADP stimulation, which induced platelet aggregation at the following levels: the maximum rate of platelet aggregation was 21-30% for the low level (B), 31-50% for the medium level (C), almost full platelet aggregation for the high level (D). Moreover, YM477 and rhTPO were tested for their platelet activation effect (A). The concentrations of rhTPO used for this study were 0.05, 0.5, 5, 50 nM and that of YM477 were 0.01, 0.1, 1, 10 μM. Data were presented as mean ± SE (n = 5). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control by Dunnett's test.

4.3.3 YM477 投与により産生したヒト胎児肝臓 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウス体内のヒト血小板機能についての検討

ヒト胎児肝臓 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウスの血液を TRAP にて刺激することにより、ヒト血小板の CD62P の発現を観察した。この実験では、過剰量の TRAP で刺激したヒト血小板 CD62P 発現の最大反応を、vehicle または YM477 の投与前後で評価した。Figure 4-4 には、非活性化状態および活性化状態の血小板のフローサイトメトリーの結果を示した。Figure 4-5 には、vehicle または YM477 投与後のヒト血小板数の変化および TRAP 刺激による血小板 CD62P 発現誘導を薬剤投与前との比で表した。一つの細胞に結合する蛍光標識抗体はその細胞の表面抗原の量と比例する。フローサイトメトリーではその一細胞あたりの蛍光強度を測定し、その結果を一つ一つ解析チャートにプロットする (Figure 4-4)。そこで、薬剤投与による血小板活性化への影響は、各群の血小板毎の CD62P 発現の差を血小板集団の蛍光強度の中央値の比較として検討した。

YM477 群のヒト血小板の増加率は vehicle 群の増加率と比較して有意な差であった ($p < 0.05$)。一方、薬剤投与前後の血小板の CD62P の発現強度の比は、両群で有意な差は認められなかった。この結果は、YM477 は vehicle に比べヒト血小板数を増加させるが、増加させたヒト血小板の機能は vehicle 群と同等であることを意味している。

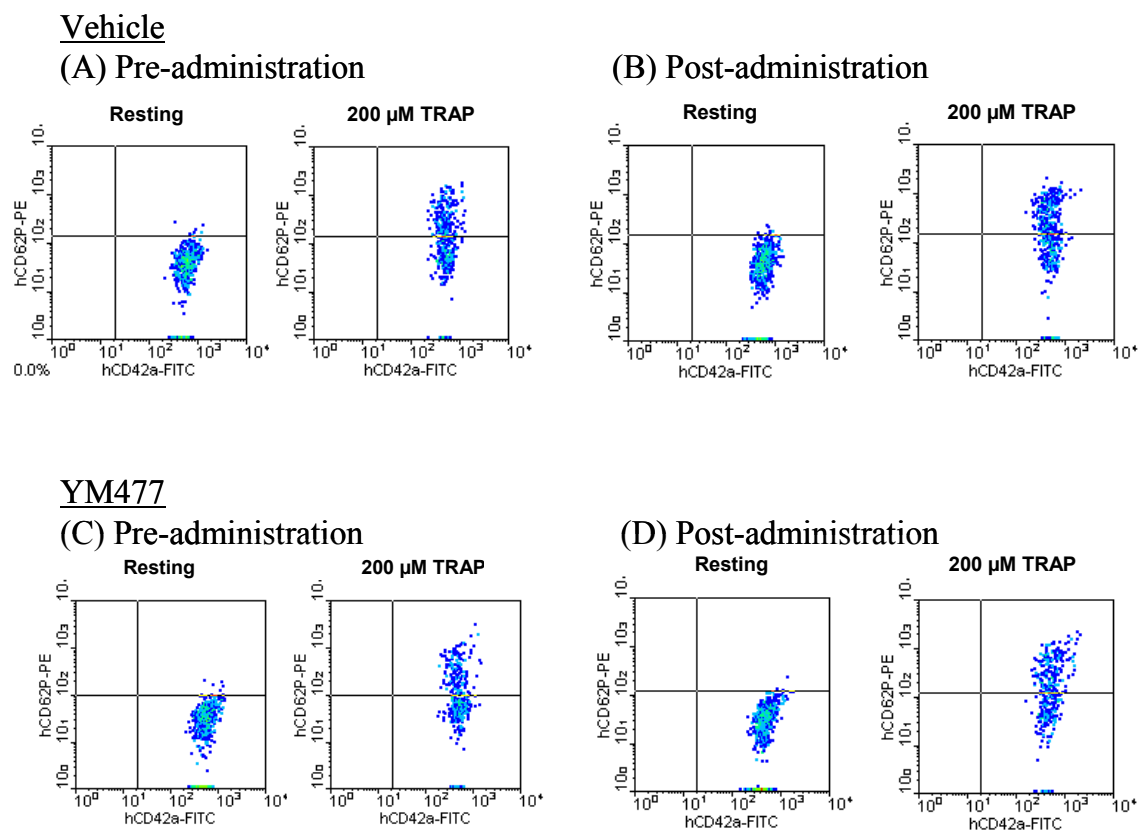


Figure 4-4 Typical results of flow cytometric analysis of TRAP-induced platelet activation.

The CD62P expression of pre-administration (A) and post-administration (B) in the vehicle group, and pre-administration (C) and post-administration (D) of YM477 in the 3 mg/kg/day group are shown. Human platelets were identified as the fractions stained by anti-CD42a antibody. The median fluorescence intensity of CD62P on CD42a⁺ fractions was analyzed.

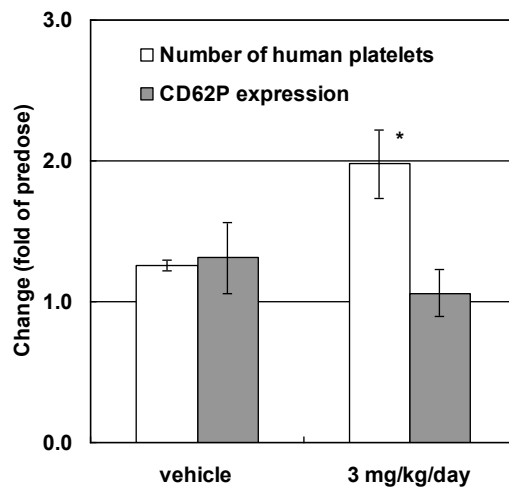


Figure 4-5 Effect of YM477 administration on *in vivo* human platelet production and CD62P expression in NOD/SCID mice transplanted with human fetal liver CD34⁺ cells.

YM477 was orally administered for 14 days to human platelet-producing NOD/SCID mice. Peripheral blood was collected and the number of human platelets was measured on day –1 and on day 15. The changes in human platelet number and the CD62P expression were estimated as percentage changes of before and after administration. Data are presented as the mean \pm SE (n = 4). *p < 0.05, vs. the vehicle group by the Student's t-test for human platelet number and by the Student's t-test and analysis of variance for the CD62P expression.

4.4 まとめと考察

TPO は血小板活性化を亢進させて CD62P 発現作用を有すること、および血小板凝集を亢進させる作用を有することが報告されている。そこで、血小板機能に対する YM477 の影響を *in vitro* での血小板凝集および血小板活性化で評価した。

YM477 は 10 μ M までいずれの強度の ADP 刺激による血小板凝集も亢進せず、CD62P 発現についても、有意な CD62P の発現亢進は認められなかった。一方、rhTPO は、0.5 nM 以上の濃度にて高程度の ADP 刺激による血小板 CD62P の発現を、5 nM 以上の濃度にて低程度および中程度の ADP 刺激による血小板 CD62P の発現を亢進させた。50 nM の rhTPO は単独で血小板 CD62P 発現を亢進させた。また、rhTPO は 5 nM 以上にて中程度の ADP 惹起血小板凝集を亢進させ、50 nM で低程度の ADP 惹起血小板凝集を亢進させた。50 nM の rhTPO は単独で血小板凝集の亢進が認められた。

第 1 章で報告したように、ヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞の増殖活性の EC₅₀ 値は YM477 が 3.3 ± 0.2 nM であり、rhTPO が 0.065 ± 0.005 nM であった。また、ヒト巨核球の分化活性の EC₅₀ 値は YM477 が 25.0 ± 7.8 nM であり、rhTPO が 0.122 ± 0.014 nM であったことから、YM477 の活性は 50-200 倍程度 rhTPO より弱いことが示されている。これらの結果から、10 μ M の濃度で血小板凝集を惹起しなかった YM477 は血小板凝集に影響を及ぼさないと考えられた。また、YM477 には血小板の CD62P 発現を促進させる傾向がみられたものの、有意な作用ではなかった。TPO は、単独でヒト血小板の CD62P 発現を増強させることが報告されているものの (73)、TPO 単独で血小板凝集を惹起する作用についてはこれまでに報告されていないが、本実験条件では rhTPO 自身の血小板凝集作用が認められた。

TPO が血小板を活性化することおよび血小板凝集を促進させることの臨床的意義は不明である。しかし、血小板を活性化させ、凝集を促進する作用を持つ薬剤の、動脈硬化症等血管病変における閉塞血栓の形成ひいては虚血心疾患や脳血管障害等を引き起こすリスクを考慮すると、TPO 様の作用を示す YM477 は血小板活性化および凝集に与える影響が認められなかったことは、安全性が高い薬剤になる可能性を示していると考えられた。

次に、YM477 投与後にヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウス体内にて産生されたヒト血小板の機能を検討した。第 3 章にて、YM477 はヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスにてヒト血小板を増加させることを示した。YM477 の投与によりマウス体内で増加した血小板は機能的であることが必要である。そこで、YM477 を投与したヒト胎児肝臓 CD34⁺細胞移

植 NOD/SCID マウス体内にて産生されたヒト血小板の機能を、血小板機能の一つである血小板の活性化を指標として、TRAP 刺激による血小板上の CD62P 発現を測定することにより検討した。NOD/SCID マウスへの 14 日間の YM477 の反復経口投与後にヒト血小板数は投与前値の約 2 倍まで上昇し、ヒト血小板の増加率は vehicle 群の増加率と比較して有意な差であった。一方、薬剤投与前後の血小板の CD62P の発現強度の比は、両群で有意な差は見られなかった。このことから、YM477 はヒト胎児肝臓 CD34⁺細胞移植 NOD/SCID マウス体内にて正常な血小板機能を有するヒト血小板を産生させると考えられた。また、*in vivo* でヒト血小板が長期間 YM477 で暴露されても血小板機能に影響を及ぼさないことが示唆され、*in vitro* 試験の結果とも一致していた。

これらの結果は、YM477 が体内にて血小板の活性化および凝集惹起に寄与する可能性が低く、正常な血小板活性化能が備わった血小板産生に寄与すること、さらに YM477 の長時間の暴露が血小板機能に影響を及ぼさないことを示しており、YM477 が安全でかつ有効性を示す血小板増加薬となる可能性が示された。

第5章 YM477 の TPO 受容体への作用部位の検討

5.1 緒言

TPO 受容体の N 末端細胞外領域は、膜遠位ドメイン CRH1 と膜近位ドメイン CRH2 で構成されている。C 末端ドメインは膜貫通領域を含んでおり、細胞内情報伝達に参与していることが知られている。また、TPO が結合するのは、TPO 受容体の細胞外領域の CRH1 部位であることが報告されている (75)。一方、CRH2 部位の働きについてはまだ分かっていない。そこで、本章ではヒト TPO 受容体および第 2 章で YM477 が作用しないことが判明したカニクイザルの TPO 受容体を用いてドメイン構成の異なる 2 種類のキメラ TPO 受容体を作製し、ヒト TPO 受容体、カニクイザル TPO 受容体、キメラ TPO 受容体それぞれに対する YM477 の作用を調べ、YM477 の TPO 受容体への結合部位について検討を行った。さらに、TPO の TPO 受容体への結合に対する YM477 の影響を検討した。

5.2 実験方法

5.2.1 YM477 の調製

YM477 は DMSO に溶解して使用した。

rhTPO は、GT または R & D Systems より購入したものを使用した。

5.2.2 TPO 受容体発現細胞の作製

5.2.2.1 カニクイザル TPO 受容体発現細胞の作製

カニクイザル骨髄由来のカニクイザル全長 *c-mpl* (TPO 受容体) cDNA を、pcDNA3.1/Zeo(-) ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にてサブクローニングした。このプラスミド pcDNA3.1/Zeo(-)-*c-mpl* を Ba/F3 clone C4 細胞に 0.4 cm キュベットにて 250 V (960 μ F) で electroporation した。これらの細胞を、10 ng/mL の rhTPO (Pepro Tech EC) を添加した RPMI1640 培地 (Invitrogen Corp.) にて 8 日間培養後、rhTPO に反応して増殖する安定した形質転換体を取得した (Figure 5-1D)。

5.2.2.2 カニクイザル CRH1/ヒト CRH2-intracellular domain (ICD) 発現細胞の作製

カニクイザル CRH1 domain (Met¹–Leu²⁵⁶) およびヒト CRH2 domain + transmembrane + ICD (Arg²⁵⁷–Pro⁶³⁵) を制限酵素である FspI に結合させた。このキメラ TPO 受容体は、広範囲な哺乳類細胞の発現に適した pcDNA3.1/Zeo(-) ベクター (Invitrogen Corp.) にてサブクローニングした。この rhTPO に反応して増殖する安定した形質転換体は第 5 章 5.2.2.1 に記載したカニクイザル TPO 受容体発現細胞と同様の方法で取得した (Figure 5-1B)。

5.2.2.3 ヒト CRH1/カニクイザル CRH2- ICD 発現細胞の作製

ヒト CRH1 domain (Met¹–Leu²⁵⁶) およびカニクイザル CRH2 domain + transmembrane + ICD (Arg²⁵⁷–Pro⁶³⁵) を FspI サイトに結合させた。このキメラ TPO 受容体は、pcDNA3.1/Zeo(-) ベクター (Invitrogen Corp.) にてサブクローニングした。この rhTPO に反応して増殖する安定した形質転換体は第 5 章 5.2.2.1 に記載したカニクイザル TPO 受容体発現細胞と同様の方法で取得した (Figure 5-1C)。

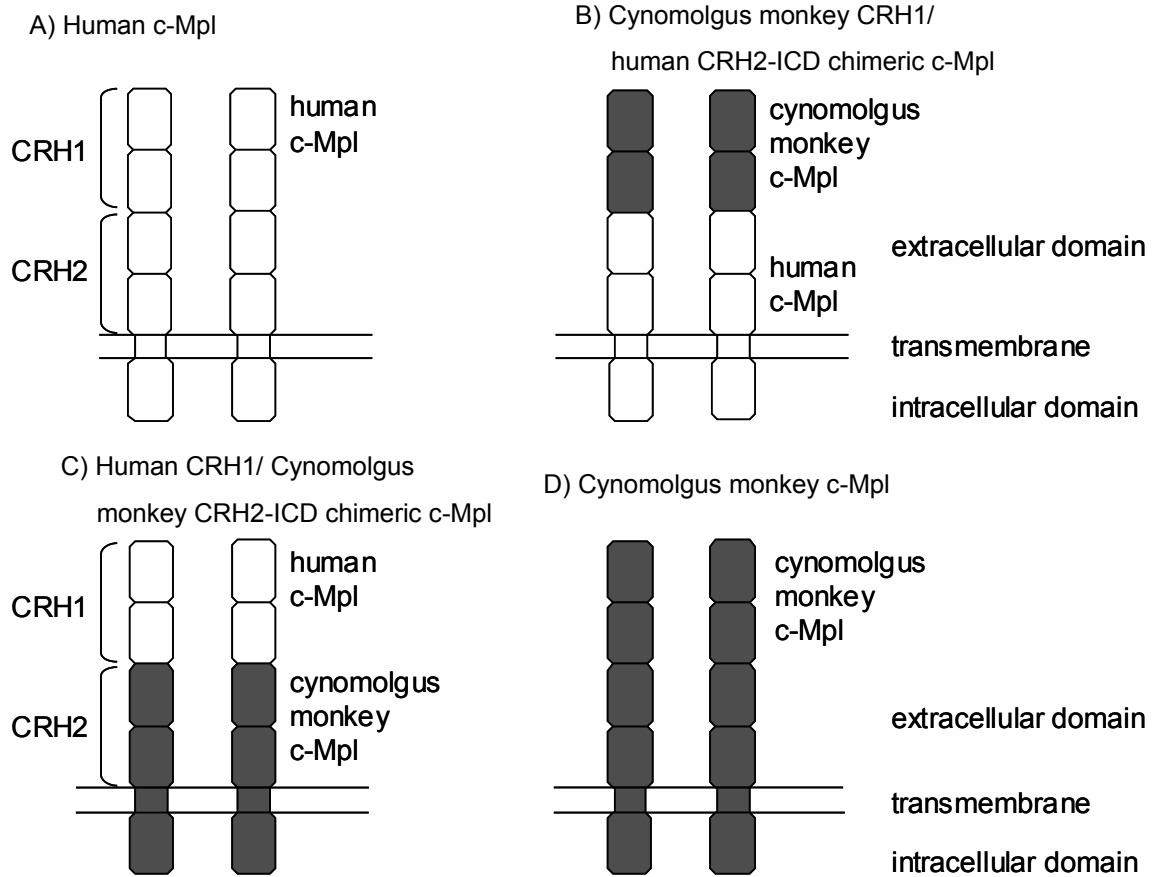


Figure 5-1 Domain structures of human, cynomolgus monkey, and chimeric c-Mpl.

The location of the extracellular, intracellular, and transmembrane domains are indicated.

Cynomolgus monkey sequences are shown in gray, and human sequences are in white. CRH1: membrane-distal cytokine receptor homology domain, CRH2: membrane-proximal cytokine receptor homology domain.

5.2.3 各種 TPO 受容体発現細胞増殖実験

細胞の培養は、10% FBS (JRH BIOSCIENCES)、50 units/mL penicillin/streptomycin (GIBCO)、WEHI (BD Bioscience) 含有 RPMI1640 培地にて行った。ヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞、カニクイザル TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞、カニクイザル CRH1/ヒト CRH2-ICD TPO 受容体 Ba/F3 細胞および、ヒト CRH1/カニクイザルを YM477、rhTPO (GT) 存在下で、96 穴プレートにて 2×10^5 cells/well で培養した。細胞増殖活性の測定は以下のように行った。WST-1/1-methoxy PMS reagent (Cell counting kit, Dojindo) を各ウェルに添加し、添加直後および添加後 2 時間にマイクロプレートリーダー (SpectraMax 340PC³⁸⁴, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) にて A450/A650 を測定した。細胞増殖活性は、TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞における rhTPO の最大細胞増殖活性を 100% として各ウェルの測定値から算出した。

5.2.4 ¹²⁵I 標識 TPO の調製

¹²⁵I 標識 TPO の調製は、IODO-GEN Pre-Coated Iodination Tubes (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いたヨードゲン法にて行った。18 μ L の 0.5 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.3) と 2 μ L の 3,700 MBq/mL Na¹²⁵I (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) を IODO-GEN Pre-Coated Iodination Tubes に加え、氷上で 10 分間インキュベーションした。混合物を、20 μ L の 100 μ g/mL TPO (R & D Systems) が入ったマイクロチューブに移し、氷中に 10 分間静置した。反応混合物は、0.35% BSA (Sigma) / PBS にて平衡化した PD10 (Amersham Biosciences Corp.) に加え、500 μ L ずつ分取した。各画分の放射能を γ -カウンター (Aloka, Tokyo, Japan) にて測定し、rhTPO が溶出している画分を収集した。

5.2.5 血小板の調製

ヒト血液を健常人ボランティアより 1/10 容の 3.8% クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血し、150 $\times g$ で 10 分間遠心分離した上清 (PRP) を分取した。PPP は、2,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離して分取した。PRP 中の血小板数は、自動血球計測器 (MEK-6258, Nihon Kohden) で計測し、PPP を用いて 300,000 platelets/ μ L に調整した。

5.2.6 結合実験

本実験では、TPO 受容体へのアゴニスト活性を持ち TPO と TPO 受容体の結合を阻害する

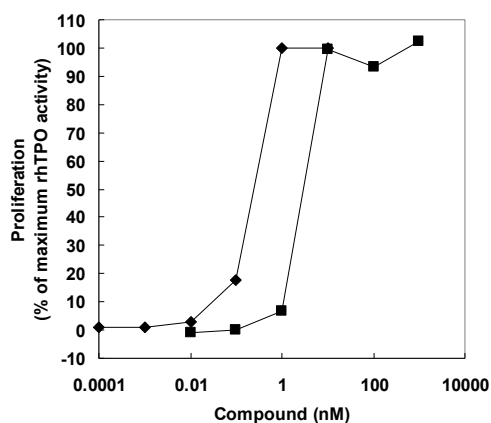
ことが報告されている TM41 (76) を陽性コントロールとして使用した。0.5 nM ^{125}I -TPO および YM477 または TM41 を PRP に加え、37°C にて 30 分間インキュベーションした。非特異的結合の測定のために、50 nM TPO (GT) を添加した。反応後、血小板と反応液を分離するため、100 μL の混合物を、200 μL の 20% sucrose の上に重層し、チューブを 12,000 $\times g$ にて 3 分間遠心分離した。チューブの先端を切断し、その放射活性を γ -カウンター (Aloka) にて測定した。データは薬剤非添加時の値に対する薬剤添加時の ^{125}I -TPO 結合率で表した。

5.3 結果

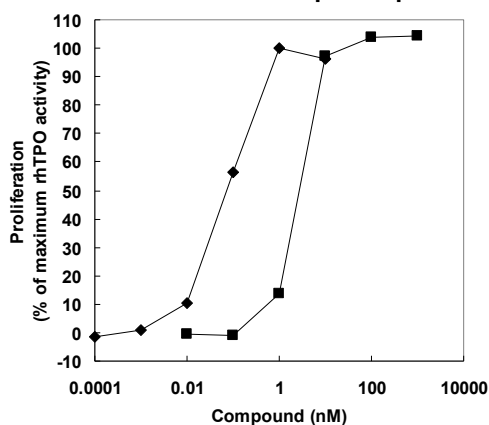
5.3.1 各種 TPO 受容体発現細胞増殖実験

カニクイザルの TPO 受容体のアミノ酸配列は、ヒト TPO 受容体のアミノ酸配列と相関性が高い。従って、ヒト TPO 受容体とキメラ受容体を作製した場合に、高次構造を維持した受容体が発現する可能性が高いと考えられたことから、ヒト TPO 受容体とキメラ TPO 受容体を作製する際にカニクイザルの TPO 受容体を利用することとした。YM477 および rhTPO は、ヒト TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞およびカニクイザル CRH1/ヒト CRH2-ICD キメラ TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞を濃度依存的に増殖させた (Figure 5-2 A,B)。一方、カニクイザル TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞およびヒト CRH1/カニクイザル CRH2-ICD キメラ TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞に対しては、rhTPO は細胞増殖活性を示したが、YM477 は細胞増殖活性を示さなかった (Figure 5-2 C,D)。

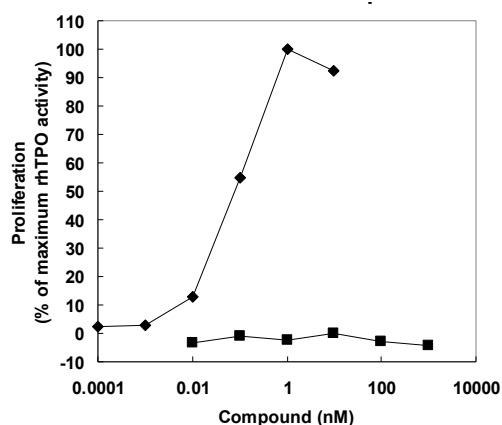
A) Human TPO receptor expressed Ba/F3



B) Chynomolgus monkey CRH1/human CRH2-ICD chimeric TPO receptor expressed Ba/F3



B) Human CRH1/Chynomolgus monkey CRH2-ICD chimeric TPO receptor expressed Ba/F3



D) Chynomolgus monkey TPO receptor expressed Ba/F3

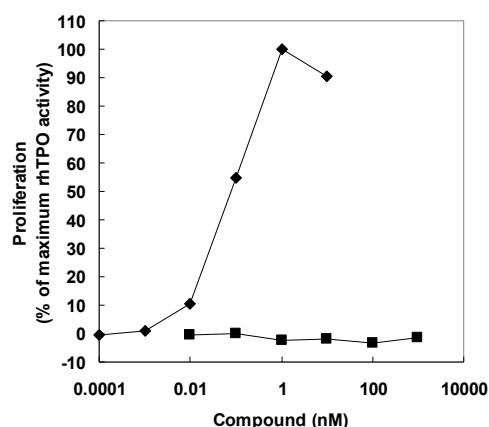


Figure 5-2 Proliferative effect of YM477 and rhTPO on various kinds of c-Mpl.

Human TPO receptor expressed Ba/F3 (A) cynomolgus monkey CRH1/human CRH2-ICD chimeric TPO receptor expressed Ba/F3 (B) human CRH1/cynomolgus monkey CRH2-ICD chimeric TPO receptor expressed Ba/F3 (C) cynomolgus monkey TPO receptor expressed Ba/F3 (D) cells were grown in the presence of increasing concentrations of YM477 (■) or rhTPO (◆). Data are determined in triplicate and presented as a mean.

5.3.2 TPO 受容体への TPO の結合に対する YM477 の効果

次に、TPO の TPO 受容体への結合に対する YM477 の影響を検討した。ヒト血小板上には TPO 受容体が発現しており、血小板上のヒト TPO 受容体へ TPO は結合する (77)。そこで、ヒト血小板を使用してヒト TPO 受容体への TPO 結合に対する YM477 の影響を検証した。ヒト TPO 受容体への TPO の結合を阻害すると報告されている化合物 TM41 は、濃度依存的に、ヒト TPO 受容体発現細胞の増殖を促進させる濃度の 10 倍で (76)、ヒト血小板への ^{125}I -TPO の結合を阻害した (Figure 5-3)。この条件下で、YM477 は EC_{50} ($3.3 \pm 0.2 \text{ nM}$) の約 30,000 倍の濃度 $100 \mu\text{M}$ までこの結合を阻害しなかった (Figure 5-3)。

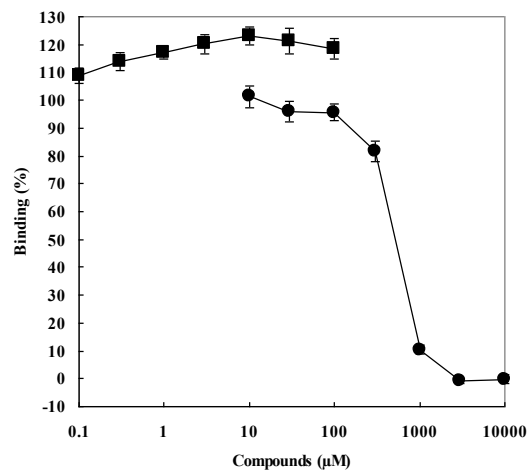


Figure 5-3 Effect of YM477 and TM41 on ^{125}I -rhTPO binding to human platelets

Binding of ^{125}I -rhTPO was measured using human PRP in the presence of increasing concentrations of YM477 (■), and TM41 (●). Data are presented as mean \pm SE (n = 5).

5.4 まとめと考察

ヒト TPO は TPO 受容体の細胞外領域の CRH1 に結合することが知られている (75)。一方、いくつかの他の低分子 TPO 受容体作動薬の TPO 受容体との結合部位は TPO の TPO 受容体との結合部位とは異なる部位に結合すると考えられている (26,71,78,79)。そこで、本章では YM477 の TPO 受容体への結合部位について検討を行った。

第 2 章で、YM477 は作用発現に種特異性を持ち、ヒトとチンパンジーの血小板には作用するが、マウス、ラット、カニクイザル等の動物の血小板には作用しないことを示した。そこで、この YM477 の種特異性を利用して YM477 の活性に必要な TPO 受容体の部位を検討することとした。

本検討では、2 種類のヒトとカニクイザルのキメラ TPO 受容体を用いた。一つ目は、カニクイザル CRH1/ヒト CRH2-ICD キメラ TPO 受容体であり、ヒト TPO 受容体の細胞外領域の膜遠位ドメインの CRH1 をカニクイザル TPO 受容体の CRH1 と置換したものである。二つ目は、ヒト CRH1/カニクイザル CRH2-ICD キメラ TPO 受容体であり、カニクイザル TPO 受容体の CRH1 をヒト TPO 受容体の CRH1 と置換したものである。YM477 は、カニクイザル CRH1/ヒト CRH2-ICD キメラ TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞の増殖を促進したが、ヒト CRH1/カニクイザル CRH2-ICD キメラ TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞の増殖は促進しなかった。一方、rhTPO は両細胞の増殖を促進した。TPO は TPO 受容体の細胞外領域の CRH1 部位に結合するが、YM477 がヒト TPO 受容体の細胞外膜近位領域の CRH2、細胞膜貫通領域および細胞内領域を発現した Ba/F3 細胞を増殖させたことから、TPO 受容体への YM477 の結合部位は TPO の結合部位とは異なり、CRH1 以外の部位に結合する可能性が高いと考えられた。

次に、TPO と TPO 受容体の結合に対する YM477 の影響を検討した。TPO 受容体への TPO の結合を阻害することが報告されている TM41 (76) がヒト血小板への TPO の結合を阻害することを確認し、同じ実験条件下で YM477 について検討した。YM477 はヒト血小板への TPO の結合を 100 μ M まで阻害しなかった。TM41 はヒト TPO 受容体発現細胞の増殖を促進させる濃度の 10 倍の濃度で TPO と TPO 受容体の結合を阻害したが、YM477 は約 30,000 倍の濃度 (EC_{50} : 3.3 ± 0.2 nM) まで阻害しなかった。この結果は YM477 が TPO のヒト TPO 受容体への結合に影響しないことを示唆すると考えられた。この実験においてもヒト TPO 受容体との YM477 の結合部位は TPO の結合部位とは異なることが示された。また、YM477 が TPO 受容体に対して TPO と同時に作用する可能性を示唆するものと考えられた。

YM477 の活性発現に必要な TPO 受容体の部位については、ヒトとマウスのキメラ TPO 受容体を用いた検討の結果が報告されている (80)。その報告によると、YM477 の活性発現には膜貫通領域の ⁴⁹⁹His が必要であることが示唆された。⁴⁹⁹His は、ヒトとチンパンジーにのみ保存されている。これは、YM477 がヒトとチンパンジーの血小板内シグナル伝達を誘導した第 2 章の種差の検討の結果と一致するものである。

これまでに他の低分子 TPO 受容体作動薬の TPO 受容体との結合部位についてはいくつかの報告がある。SKF-57626、SB-497115、NIP-004、butyzamide はヒト TPO 受容体の膜貫通領域の ⁴⁹⁹His がそれらの活性には必要であることが示されており (26,71,78,79)、TPO の TPO 受容体への結合部位とは異なる部位に結合すると考えられている。YM477 についても、これらの化合物と同様に、TPO 受容体への結合部位が TPO とは異なることが示された。しかしながら、これらの化合物は、TPO と TPO 受容体の結合部位とは異なる結合部位に作用すると考えられているものの、TPO 受容体への TPO の結合に与える影響については検討されていない。従って、YM477 は TPO と TPO 受容体の結合を阻害しないことが示された初めての化合物であると考えられた。

本章では、YM477 の TPO 受容体への結合部位は TPO の結合部位とは異なり、CRH1 以外の部位に結合する可能性が高いことが示された。また、TPO 受容体への結合に関し、YM477 と TPO と競合しないことが示された。これらの結果から、YM477 は TPO と同時に TPO 受容体に作用する可能性が考えられた。

第6章 造血幹細胞の分化に対する YM477 と TPO の併用効果の検討

6.1 緒言

第5章にて、TPO 受容体上の YM477 の結合部位は、TPO の結合部位とは異なることを示した。さらに、YM477 は、TPO の TPO 受容体への結合を阻害しないことも示した。これらの結果から、YM477 と TPO が TPO 受容体に同時に作用する可能性があると考えられた。そこで、巨核球の分化において YM477 と TPO が共存した場合の作用を *in vitro* にて検討することとした。

6.2 実験方法

6.2.1 薬剤

YM477 は、培地に溶解して使用した。

rhTPO は、GT より購入したものを使用した。

6.2.2 ヒト CD34⁺細胞の培養

G-CSF 動員ヒト末梢血 CD34⁺細胞を 24 穴培養プレート (Asahi Techno Glass, Chiba, Japan) にて、YM477、rhTPO (GT)、または YM477 および rhTPO を含んだ培地を用いて、10,000 cells/well/0.5 mL で培養した。培地の組成は、IMDM (Invitrogen Corp.)、20% BIT9500 (0.2 mg/mL human transferrin (iron saturated), 0.01 mg /mL recombinant human insulin 1% BSA, StemCell Technologies Inc.)、100 μ M 2-mercaptoethanol および 7.5 μ g/mL cholesterol (Sigma) とした。

6.2.3 フローサイトメトリー解析

培養した細胞を集め、0.35% BSA-PBS にて洗浄した。細胞溶液に FITC 標識抗ヒト CD45 抗体、PE 標識抗ヒト CD34 抗体、および PE-Cy5 標識抗ヒト CD41 抗体 (BD PharMingen) を添加して染色し、暗所で 20 分間インキュベーションを行った。0.35% BSA-PBS で洗浄した後、細胞を 0.35% BSA-PBS に懸濁した。さらに、細胞数の計測ために、Flow-Count Fluorospheres (Beckman-Coulter) を懸濁液に加え、標準粒子とした。ネガティブコントロールとして、3 nM rhTPO で刺激した細胞に PE 標識マウス IgG₁, κ および PE-Cy5 標識マウス

IgG₁, κ (Isotype-matched antibody, BD Pharmingen) をそれぞれ添加した。フローサイトメトリ解析には、CytomicsTM FC500 (Beckman-Coulter) を用いた。CD45⁺細胞分画の CD34⁺CD41⁻細胞 (造血前駆細胞)、CD34⁺CD41⁺細胞 (巨核球前駆細胞)、および CD34⁻CD41⁺細胞 (巨核球) を解析するために、Cytomics RXP analysis software (Beckman-Coulter) を用いた。マーカークポジションは、ネガティブコントロールの CD34⁺および CD41⁺細胞が 1.0%以下になるように設定し、マーカを超えたシグナルをポジティブとした。

6.2.4 コロニー形成実験

CFC の数は、3 μ M YM477、3 nM rhTPO、または 3 μ M YM477 + 3 nM TPO 存在下で CD34⁺細胞を培養開始 6 日目の細胞を用いて計数した。細胞は、IMDM、30% FBS、1.0% methylcellulose、1% BSA、100 μ M 2-mercaptoethanol、10 ng/mL recombinant human GM-CSF、10 ng/mL rh interleukin-3、および 3 units/mL EPO (MethoCultTM, StemCell Technologies Inc.) で構成されたメチルセルロースベースの培地に懸濁し、1 mL を 35 mm ペトリ皿に播種した。全ての培養は duplicate で行い、培養 12 日目に形態的な特徴に従って倒立顕微鏡にて各血球系コロニーをカウントした。各コロニーの計測基準は、第 1 章 1.2.6 に記載の通りとした。CFC の数は、これらのコロニーの合計として計算した。

6.3 結果

6.3.1 巨核球分化における YM477 の rhTPO との併用作用

YM477、rhTPO、または YM477 および rhTPO の存在下で G-CSF 動員ヒト末梢血 CD34⁺細胞の培養開始 14 日目に CD34⁺CD41⁻細胞 (造血前駆細胞)、CD34⁺CD41⁺細胞 (巨核球前駆細胞)、CD34⁻CD41⁺細胞 (巨核球) の各細胞数を計測した。YM477 または rhTPO 単独では、巨核球数は濃度依存的に増加し、YM477 の最大活性は、TPO の最大活性とほぼ同等であった (Figure 6-1)。また、巨核球の分化において最大活性を示した 3 nM TPO の存在下で、YM477 はさらに巨核球数を濃度依存的に増加させた (Figure 6-1)。3 μ M YM477 と 3 nM rhTPO を併用した場合では、3 nM rhTPO 単独の場合と比較して、巨核球数が約 200%まで増加した。従って、この併用効果は相加的であると考えられた。YM477 および rhTPO は、造血前駆細胞と巨核球前駆細胞数を濃度依存的に増加させた (Figure 6-2)。また、YM477 存在下で培養した場合の造血前駆細胞の最大細胞数は、rhTPO に比べて多かった (Figure 6-2)。

さらに、巨核球の場合と同じように、造血前駆細胞数と巨核球前駆細胞数は、YM477 と rhTPO の併用により、YM477 または rhTPO 単独の場合よりも増加した。

次に、各細胞数の経時的変化を、3 μ M YM477、3 nM rhTPO、3 μ M YM477 と 3 nM rhTPO を併用した場合それぞれについて検討した。3 μ M YM477 または 3 nM rhTPO が単独で存在した場合と比較して、YM477 と rhTPO を併用した場合では、6 日目以降で造血前駆細胞数の有意な増加がみられ、培養開始 10 日目と 14 日目に巨核球前駆細胞の数の有意な増加が見られた (Figure 6-3)。また、YM477 と rhTPO を併用した場合には、巨核球数を 6 日目以降で有意に増加させた (Figure 6-3)。さらに、YM477 と rhTPO の併用によって増加した CD34⁺CD41⁻細胞の造血前駆細胞の機能を検討するために、培養後の CFC 数を計測した。培養開始 6 日後の細胞の CFC 数を計数したところ、YM477 または rhTPO が単独で存在した場合と比較して、YM477 と rhTPO を併用した場合に、CFC 数の有意な増加が認められた (Figure 6-4)。10 μ M YM477 の存在下では、YM477 単独および TPO と併用した場合共に巨核球数の減少が認められたが (Figure 6-1)、造血前駆細胞数は増加していることから、10 μ M YM477 存在下では造血幹・前駆細胞の増殖活性が高くなり、相対的に巨核球数が減少したと考えられた。

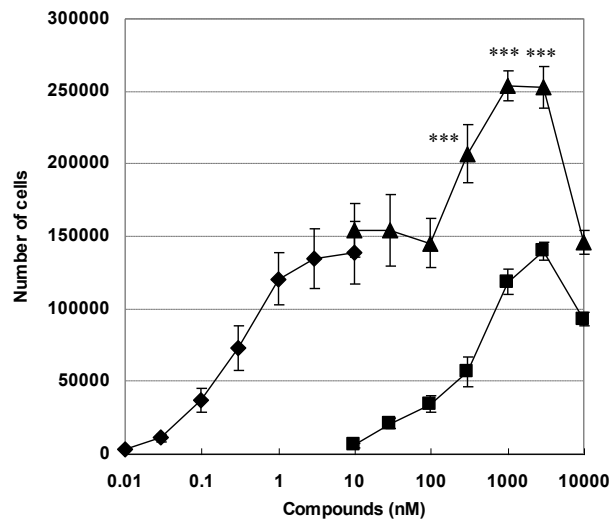


Figure 6-1 The number of megakaryocytes

G-CSF-mobilized human peripheral blood CD34⁺ cells (10,000 cells/well in 24 well plate) were cultured for 14 days in serum-free liquid medium in the presence of YM477 (■), TPO (◆), or 3 nM TPO + YM477 (▲). The number of megakaryocytes (CD34⁻CD41⁺ cells) was counted using flow cytometry. The data represent the mean \pm SE of 5 independent experiments. ***p<0.001 compared with 3 nM TPO using Dunnett's test.

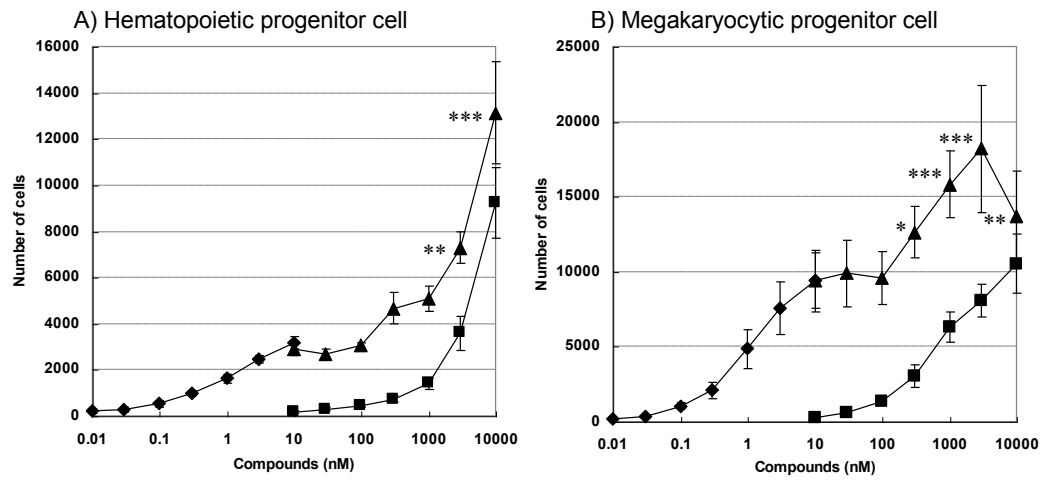


Figure 6-2 The number of hematopoietic progenitor cells and megakaryocytic progenitor cells

G-CSF-mobilized human peripheral blood CD34⁺ cells (10,000 cells/well in 24 well plate) were cultured for 14 days in serum-free liquid medium in the presence of YM477 (■), TPO (◆), or 3 nM TPO + YM477 (▲). The numbers of hematopoietic progenitor cells (CD34⁺CD41⁻ cells: A) and megakaryocytic progenitor cells (CD34⁺CD41⁺ cells: B) were counted using flow cytometry. The data represent the mean \pm SE of 5 independent experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ compared with 3 nM TPO using Dunnett's test.

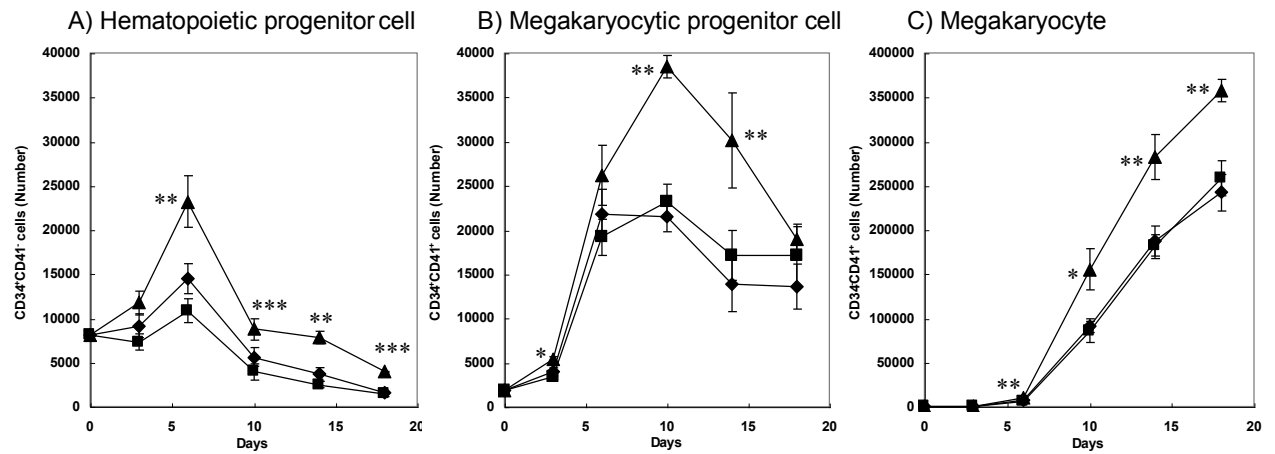


Figure 6-3 The time course for the number of hematopoietic progenitor cells, megakaryocytic progenitor cells, and megakaryocytes

G-CSF-mobilized human peripheral blood CD34⁺ cells (10,000 cells/well in 24 well plate) were cultured for 18 days in serum-free liquid medium in the presence of 3 μM YM477 (■), 3 nM TPO (◆), or 3 nM TPO + 3 μM YM477 (▲). On the indicated days, the numbers of hematopoietic progenitor cells (CD34⁺CD41⁻ cells: A), megakaryocytic progenitor cells (CD34⁺CD41⁺ cells: B), and megakaryocytes (CD34⁻CD41⁺ cells: C) were counted using flow cytometry on indicated days. The data represent the mean ± SE of 5 independent experiments.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ compared with 3 nM TPO using Student's t-test.

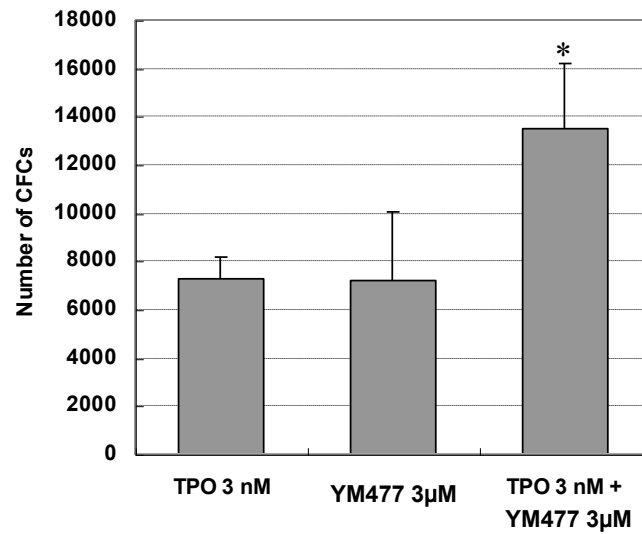


Figure 6-4 The number of hematopoietic colony-forming cells

G-CSF-mobilized human peripheral blood CD34⁺ cells (10,000 cells/well in 24 well plate) were cultured for 6 days in serum-free liquid medium in the presence of 3 μM YM477, 3 nM TPO, or 3 nM TPO + 3 μM YM477. On day 6, the cells were collected, and the number of CFCs was determined by clonal cultures. The data represent the mean ± SE of 5 independent experiments. *: $p < 0.05$ compared with 3 nM TPO using Student's t-test.

6.4 まとめと考察

現在までに複数の TPO 受容体作動薬が報告されている (26,71,76,78,81)。しかし、TPO との併用効果を報告している化合物はない。YM477 は TPO と併用した場合、YM477 または TPO 単独の場合と比較して CD34⁺細胞からの巨核球産生を相加的に増加させた。また、YM477 は TPO が巨核球産生の最大効果を示す 3 nM TPO 存在下において濃度依存的に巨核球数を増加させ、最大で約 200%の増加を示した。CD34⁺細胞からの分化を経時的に観察した実験では、YM477 と TPO は、培養開始後の早い段階から造血前駆細胞および CFC 数を増加させた。TPO 受容体は造血幹細胞/造血前駆細胞に発現しており、TPO はこれらの細胞を増加させることが知られている (76)。YM477 が TPO との併用により造血幹細胞/造血前駆細胞数の増加を増強させた結果として、巨核球数の増加を促進させることが示された。すなわち、YM477 と TPO の併用は、各々単独の場合と比較して造血幹細胞の増加や造血前駆細胞から巨核球への分化が促進されると考えられた。

この TPO と YM477 の相加的な効果の機序は不明である。TPO と YM477 が TPO 受容体との結合を拮抗しないことから、両者が TPO 受容体に同時に作用したために、相加的な効果を示す可能性が考えられた。今後、TPO、YM477、TPO 受容体の分子的な変化の共結晶構造解析等の立体構造解析の結果が判明すれば、この現象の機序を理解する一助となるであろうと考えられる。

TPO の臨床試験において、rhTPO と PEG-rHuMGDF はヒト血小板産生を刺激することにより骨髓非破壊的化学療法後の血小板減少症に対して有効性を示した (82,83)。しかしながら、骨髓移植や急性白血病における骨髓破壊的化学療法では、血小板数回復や血小板輸血量低減には大きな効果を示さなかった。化学療法や造血幹細胞移植後の血小板減少状態において、末梢血中の TPO 濃度は高いことが知られている (84-86)。このような状況下では、増加した内因性 TPO により TPO の結合サイトが飽和しているため、内因性 TPO と TPO 受容体との結合を競合するようなりコンビナント TPO や TPO 様作用を持つ薬剤の投与は効果的でないと考えられる。本章では、過剰量の TPO 存在下において、YM477 が濃度依存的に造血前駆細胞を増幅し、巨核球の分化を促進することを示した。これは YM477 が TPO 受容体に対して内因性 TPO と共存下においても作用し、内在性 TPO に上乗せして *in vivo* での血小板増加作用を促進できることを示唆している。以上の結果より、免疫性血小板減少性紫斑病や C 型肝炎に伴う血小板減少症に加えて化学療法や造血幹細胞移植を必要とするよ

うな血小板減少症の治療に対して、YM477 は TPO と TPO 受容体の結合を競合するような薬剤よりも優れた薬剤になると考えられた。

総括

本研究は、血小板減少症の治療薬としての血小板増加薬の開発を目的に行われた。血小板減少症に対する治療は、主に対症療法としての血小板輸血が行われている。1994年に血小板の産生に関与する主たるサイトカインのTPOがクローニングされ、TPO受容体作動薬の探索が盛んに行われるようになり、血小板輸血に代わる血小板増加薬の開発が期待された。1990年代後半には、リコンビナントTPOの臨床試験が実施されたが、PEG-rHuMGDFに対して中和抗体が誘導され、その中和抗体が内因性のTPOの作用も抑制したため、被験者の血小板数が減少し、試験の中断を余儀なくされた。そこで、感染やTPOがもつ免疫原性の問題を持たない経口投与可能な低分子血小板増加薬として、TPO受容体作動薬の創製に取り組んだ。

第1章では、YM477が*in vitro*においてTPOと同等の作用を持つことを示した。YM477は、ヒトTPO受容体発現Ba/F3細胞の増殖活性を指標とした*in vitro*評価系を用いたスクリーニングにより増殖活性が認められた化合物の中から活性の強い化合物の構造の最適化により創出された化合物である。TPO受容体依存的に増殖するヒトTPO受容体発現Ba/F3細胞の増殖を促進したことから、YM477はヒトTPO受容体に作用することが示唆された。YM477がヒトTPO受容体発現Ba/F3細胞のSTAT3、STAT5、ERK1/2のリン酸化を誘導したことも、ヒトTPO受容体へのYM477の作用を示唆すると考えられた。また、YM477が巨核球の分化に与える影響を検討した結果、YM477は濃度依存的にヒト臍帯血CD34⁺細胞を巨核球へ分化させた。EC₅₀値は、rhTPOと比較して約200倍弱いものであったが、最大活性はほぼ同等であった。YM477およびrhTPOで分化した巨核球コロニーの形態は、類似のものであった。一方、YM477はヒト臍帯血CD34⁺細胞を巨核球系以外のヒト造血コロニー形成を促進しなかった。さらに、YM477が巨核球の成熟に与える影響について調べたところ、YM477により分化した巨核球の核の倍数体分布はTPOと比較して有意な差は認められなかった。これらの結果から、YM477はTPOと同様に造血幹細胞を巨核球へ分化・成熟させる作用を持つことが示唆された。本章において、YM477は*in vitro*でTPOと同等の作用を示すことを証明した。

第2章では、*in vivo*実験を実施するにあたり、YM477が作用する動物種を探索した。様々な動物の血小板を用いて、血小板上に発現しているTPO受容体への刺激により活性化される情報伝達のうち、STAT5のリン酸化を指標として、YM477の各種動物TPO受容体への反

応を検討した結果、ヒトおよびチンパンジーの血小板のみに、STAT5 のリン酸化が認められた。この結果から、TPO とは異なり、YM477 は厳格な種特異性を持つことが示唆された。

YM477 が TPO 受容体への作用に関して厳格な種特異性を持つことが判明したものの、*in vivo* 実験にチンパンジーを用いることは困難であると考えられた。そこで、ヒト血小板造血を反映した *in vivo* 実験系を確立すべく、ヒト血小板を産生するマウスモデルを作製することとした。第 3 章では、重度免疫不全マウスである NOD/SCID マウスにヒト CD34⁺細胞を移植し、ヒト血小板がマウス体内で継続的に産生するモデルを作製した。モデルマウス末梢血中では、ヒト血小板が約 10 日という寿命の短さにもかかわらず 6 ヶ月以上にわたって検出されたことから、ヒト血小板がマウス体内で安定的、継続的に産生されることが示唆された。また、モデルマウス体内で産生されたヒト血小板は TRAP 刺激による血小板表面の CD62P 発現および GP IIb/IIIa の活性化が認められたことから、マウス末梢血中に産出されたヒト血小板は血小板機能を有すると考えられた。また、TPO の一種である PEG-rHuMGDF を NOD/SCID マウスに投与し、マウス内でのヒト血小板造血への応答性を検討した。PEG-rHuMGDF の投与により、マウス血小板数の増加に加えてマウス末梢血中のヒト血小板数および骨髓中のヒト巨核球数が増加した。PEG-rHuMGDF の投与中止により、ヒト血小板数は投与前レベルにまで減少した。さらに、PEG-rHuMGDF の再投与した場合には、最初の投与の際に示したヒト造血反応と同様の反応が認められたことから、ヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウス体内でのヒト血小板産生が長期にわたって再構築されていることが示唆された。このようにして、種特異性のある化合物の評価が可能な *in vivo* 実験系を確立することができた。次に、ヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスを用いて、YM477 の *in vivo* におけるヒト血小板増加作用を検討した。YM477 をヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスに 14 日間経口投与した結果、YM477 投与群では 1 mg/kg/day 以上の投与量でヒト血小板数の有意な増加が認められた。YM477 の投与終了後は、マウス体内のヒト血小板数は徐々に減少し、薬剤投与開始時の値まで戻った。

以上の結果より、TPO 受容体への作用に種差を示す YM477 は、本研究にて確立したヒト血小板を安定して産生するマウスモデルを用いた評価系にて、ヒト血小板増加作用を有することが確認できた。

第 4 章では、YM477 のヒト血小板機能に及ぼす作用について検討した。血小板は、一次止血において、粘着・放出・凝集反応による血小板血栓形成に大きな役割を果たしている。血小板粘着反応は、コラーゲンに結合した vWF に GP Ib/IX 複合体を介して行われ、粘着し

た血小板がフィブリノゲンを介して血小板凝集を引き起こす。さらに、血小板から ADP 等の顆粒内容物が放出され、他の血小板を活性化させることで、凝集反応が促進する。TPO は、血小板の活性化および凝集を亢進することが知られている。一方、血小板凝集反応の促進は、血栓を発生させるリスクを高め、血栓関連疾患発症のリスクとなりうる。そこで、まず YM477 の血小板凝集および血小板活性化に及ぼす作用を *in vitro* にて検討した。YM477 は、単独では血小板凝集および活性化のいずれも惹起しなかった。また、YM477 は ADP および TRAP といったアゴニスト刺激により惹起される血小板凝集を亢進せず、血小板活性化の亢進も認めなかった。一方、TPO は、アゴニスト刺激による血小板の凝集・活性化を亢進させた。また、高濃度の TPO は、血小板の凝集および活性化を惹起した。この結果から、YM477 が血小板活性化および凝集に寄与する可能性は低いと考えられた。次に、YM477 の投与後にヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウス体内にて産生されたヒト血小板の機能を検討した。第 3 章にて、YM477 はヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスにてヒト血小板を増加させることを示した。そこで、YM477 の投与により増加した血小板の血小板機能を調べるため、YM477 を投与したヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウス体内にて産生されたヒト血小板機能について、血小板機能の一つである血小板活性化能を指標として検討を行った。薬剤投与前後の TRAP により活性化された血小板の CD62P の発現強度の比は、vehicle 群と YM477 群で有意な差は認められなかった。この結果から、YM477 はマウス体内で血小板機能を有するヒト血小板を産生させることが示唆された。また、YM477 の長期間の暴露が血小板活性化能に影響を及ぼさないと考えられた。

第 5 章では、YM477 の TPO 受容体との結合部位について検討した。TPO 受容体の N 末端細胞外領域は、膜遠位ドメイン CRH1 と膜近位ドメイン CHR2 で構成されている。また、TPO は TPO 受容体の細胞外領域の CRH1 部位に結合することが報告されている。本章では、カニクイザル CRH1/ヒト CRH2-ICD キメラ TPO 受容体およびヒト CRH1/カニクイザル CRH2-ICD キメラ TPO 受容体を用いて、それぞれを発現した細胞の増殖を指標として、YM477 の TPO 受容体との部位を調べた。YM477 は、カニクイザル CRH1/ヒト CRH2-ICD キメラ TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞の増殖を促進したが、ヒト CRH1/カニクイザル CRH2-ICD キメラ TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞の増殖は促進しなかった。この結果から、YM477 の活性には、ヒト TPO 受容体の CRH2-ICD が必要であることが示唆された。また、TPO は TPO 受容体の細胞外領域の CRH1 部位に結合することから、TPO 受容体への YM477 の結合部位は TPO の結合部位とは異なると考えられた。YM477 の活性発現に必要な TPO 受容体の部

位については、ヒトとマウスのキメラ TPO 受容体を用いた検討の結果が報告され、YM477 の活性発現にはヒトとチンパンジーにのみ保存されている膜貫通領域の ^{499}His が必要であることが示された。次に、TPO と TPO 受容体の結合に対する YM477 の影響について検討した。TPO 受容体への TPO 結合を阻害することが報告されている TM41 がヒト血小板への TPO 結合を阻害することが確認できた実験条件下で YM477 の影響を検討したところ、YM477 はヒト血小板への TPO 結合を $100\ \mu\text{M}$ まで阻害しなかった。この結果は、YM477 が TPO のヒト TPO 受容体への結合に影響しないことを示すものと考えられた。この実験においてもヒト TPO 受容体と YM477 の結合部位は TPO の結合部位とは異なることが示され、さらに YM477 が TPO 受容体に対して TPO と同時に作用する可能性を示唆するものと考えられた。

このように、YM477 と TPO が TPO 受容体に同時に作用する可能性があると考えられたことから、第 6 章において YM477 と TPO が共存した場合に、ヒトの巨核球分化に与える影響について *in vitro* にて検討した。

YM477 または TPO 単独の場合、各薬剤の $\text{CD}34^+$ 細胞からの巨核球産生作用はほぼ同等であったが、TPO が巨核球産生の最大効果を示す TPO 濃度存在下において、YM477 は濃度依存的に巨核球数を増加させたことから、YM477 と TPO は併用効果を示すものと考えられた。さらに、 $\text{CD}34^+$ 細胞から巨核球への分化を経時的に観察した実験において、YM477 と TPO の併用は、培養開始後の早い段階でそれぞれの単独より造血前駆細胞数および CFC 数を増加させた。この結果から、YM477 と TPO を併用することにより各々単独の場合と比較して造血幹細胞数の増幅と造血前駆細胞から巨核球への分化が増強されることが示唆された。

YM477 はヒト TPO 受容体に作用し、巨核球への分化促進を持つことが示され、ヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウス体内での機能的な血小板の産生作用も確認され、TPO と同様の作用を持つことが示された。また、TPO とは異なり、YM477 は血小板凝集および血小板活性化作用を示さなかったが、薬剤としての血栓症のリスク回避の観点から、安全性を示唆する結果であると考えられた。また、YM477 の TPO 受容体に対する作用部位は、TPO との作用部位とは異なり、さらに TPO と YM477 は同時に TPO 受容体に作用する可能性が示唆された。YM477 と TPO は巨核球分化促進作用で相加的に作用するが、これは TPO と YM477 が同時に作用することが一因となっている可能性が考えられた。この機序は不明であるが、両リガンドが TPO 受容体に結合した場合の立体構造解析の結果が、さらなる知見を与えてくれると期待された。以上の結果から、YM477 は経口可能な低分子 TPO 受容体作

動薬として、血小板減少症治療において有用で安全な血小板増加薬となりうると考えられた。

現在、YM477 は ITP および慢性肝疾患を対象として第 II 相臨床試験が実施されている (87-89)。第 I 相試験では、健康成人において、血小板増加作用が認められた。単回投与試験 (1, 3, 10, 20, 50, 75, 100 mg) において、100 mg 投与群の 6 人のうち 5 人にて投与前の血小板数から 50%以上の増加が認められた。反復投与試験においては、10 mg および 20 mg 投与群 (10 日間投与) にて、6 人全員が投与前の血小板数から 50%以上の増加が認められた。本研究のヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスで認められた YM477 のヒト血小板増加作用がヒトでも確認されたものと考えられる。一方、単回投与試験および反復投与試験 (3, 10, 20 mg、10-14 日間) 両方において、重篤な副作用はなく、忍容性は良好であった (72)。そして、最近 ITP の第 II 相試験の結果の一部が明らかになった。血小板数が 30,000/ μ L 以下の被験者に対し、YM477 を 28 日間投与したところ、投与開始から 14 日目では 10 mg および 20 mg 投与群にて、28 日目には 20 mg 投与群にて有意な血小板増加が認められた。また、安全性上の大きな問題は認められなかった (90)。

一方、2008 年には、他の ITP 治療薬および脾臓摘出への反応が不十分な ITP の治療薬として TPO 受容体作動薬である Nplate[®] (romiplostim, Amgen) および Promacta[®] (eltrombopag, GlaxoSmithKline) が FDA に承認された。Romiplostim はタンパク製剤であり、皮下投与されるが、Eltrombopag は、YM477 と同じ非ペプチド性の化合物であり、経口にて投与される。Eltrombopag の第 I 相臨床試験では、Eltrombopag 30, 50, 75 mg 投与群の血小板は、それぞれ 24.1%、42.9%、50.4%増加した (91)。Eltrombopag の第 II 相臨床試験は、血小板数が 30,000/ μ L 以下の ITP 患者に対して実施され、投与開始 15 日目までに Eltrombopag 50 mg/day、75 mg/day 投与群の 80%以上で血小板数増加が認められ、出血も減少した。有害事象の頻度と重篤度は、Eltrombopag 投与群とプラセボ投与群で類似していた (92)。Eltrombopag の第 III 相臨床試験も血小板数が 30,000/ μ L 以下の ITP 患者に対して実施され、Eltrombopag 50 mg を 6 週間投与した患者のうち 59%で血小板が 50,000/ μ L に達した。また、重篤な有害事象の発現頻度および治験中止に至る有害事象の発現については、プラセボおよび薬剤投与群で差が見られなかった (93)。

TPO 受容体作動薬が臨床開発され、現在、慢性 ITP に伴う血小板減少症の治療薬として臨床現場で利用されている。今後 YM477 が第 II 相、第 III 相臨床試験においてさらなる有効性と安全性が確認され、他剤にもまして血小板減少症の予防や治療に貢献する薬剤とな

ることを期待する。

参考文献

1. Ohmori T. The Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis 2008;19(4) : 456-458.
2. エッセンシャル血液病学 1994.
3. 中村忍、中尾眞二 血液疾患臨床ハンドブック 2002.
4. 友安 茂 血液・造血器 医学評論社 2007.
5. 池田康夫、山崎博男 血小板 第一製薬株式会社 2000.
6. 池田康夫 丸山往郎 血小板生物学 2004.
7. Kaushansky K. Thrombopoietin. N Engl J Med 1998;339:746-754.
8. 血液・腫瘍科 2004;49(5):460-465.
9. 池田康夫 多能性細胞としての血小板. Molecular Medicine 2004;41(12):1474-1477.
10. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. Blood 1993;81:2844-2853.
11. 三浦恭定 血液幹細胞 (改訂版) 中外医学社 1983.
12. 右田俊介・高橋信弘 別冊医学のあゆみ CD 抗原ハンドブック 1999.
13. Beckman Coulter CD Chart 2007.
14. Annual review 血液 2005.
15. NEUMEGA® Package Insert.
16. Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ, Oles KJ, Hultgren B, Solberg Jr LA, Goeddel DV, Eaton DL. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl regand. Nature 1994;369:533-538.
17. Lock S, Kauaesy K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM, Bell LA, Sprecher CA, Blumberg H, Johnson R, Prunkard D, Ching AF, Mathewes SL, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Osborn SG, Evans SJ, Sheppard PO, Presnell SR, O'Hara PJ, Hagen FS, Roth GJ, Foster DC. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. Nature 1994;369:565-568.
18. Bartley TD, J Bogenberger, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S, Johnson MJ, Hsu RY, Parker VP, Suggs S, Skrine JD, Merewether LA, Clogston C, Hsu E, Hokom MM, Hornkohl A, Choi E, Pangelinan M, Sun Y, Mar V, McNinch J, Simonet L,

- Jacobsen F, Xie C, Shutter J, Chute H, Basu R, Selander L, Trollinger D, Sieu L, Padilla D, Trail G, Elliott G, Izumi R, Covey T, Crouse J, Garcia A, Xu W, Castillo JD, Biron J, Cole S, Hu MCT, Pacifici R, Ponting I, Saris C, Wen D, Yung YP, Lin H, Rosselman RA. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 1994;77:1117-1124.
19. Sohma Y, Akahori H, Seki N, Hori T, Ogami K, Kato T, Shimada Y, Kawamura K, Miyazaki H. Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Letters* 1994;353:57-61.
 20. 宮崎 洋 トロンボポエチンの将来展望 *Japanese Journal of Transfusion Medicine* 2000;46(3):311-316.
 21. Kaushansky K, Drachman JG. The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Oncogene* 2002;21:3359-3367.
 22. 池田康夫 2009 年最新医学別冊 血小板減少症・増加症 最新医学社 2009.
 23. Abe M, Suzuki K, Inagaki O, Sassa S, Shikama H. A novel MPL point mutation resulting in thrombopoietin-independent activation. *Leukemia* 2002;16:1500-1506.
 24. Wells JA, de Vos AM. Hematopoietic receptor complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 1996;65:609-634.
 25. Vigon I, Florindo C, Fichelson S, Guenet JL, Mattei MG, Souyri M, Cosman D, Gisselbrecht S. Characterization of the murine Mpl proto-oncogene, a member of the hematopoietic cytokine receptor family: molecular cloning, chromosomal location and evidence for a function in cell growth. *Oncogene* 1993;8(10):2607-2615.
 26. Nakamura T, Miyakawa Y, Miyamura A, Yamane A, Suzuki H, Ito M, Ohnishi Y, Ishiwata N, Ikeda Y, Tsuruzoe N. A novel non peptidyl human c-Mpl activator stimulates human megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood* 2006;107:4300-4307.
 27. Alexander WS. Thrombopoietin and the c-Mpl receptor: insights from gene targeting. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1027-1035.
 28. Bassar RL, O'Flaherty E, Green M, Edmonds M, Nichol J, Menchaca DM, Cohen B, Begley CG. Development of pancytopenia with neutralizing antibodies to thrombopoietin after multicycle chemotherapy supported by megakaryocyte growth and development factor. *Blood* 2002;99(7):2599-2602.
 29. Li J, Yang C, Xia Y, Bertino A, Glaspy J, Roberts M, Kuter DJ. Thrombocytopenia caused by

- the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood* 2001;98 (12):3241-3248.
30. Vadhan-Raj S, Murray LJ, Bueso-Ramos C, Patel S, Reddy SP, Hoots WK, Johnston T, Papadopolous NE, Hittelman WN, Johnston DA, Yang TA, Paton VE, Cohen RL, Hellman SD, Benjamin RS, Broxmeyer HE. Stimulation of megakaryocyte and platelet production by a single dose of recombinant human thrombopoietin in patients with cancer. *Ann Intern Med* 1997;126(9):731-733.
 31. Basser RL, Rasko JE, Clarke K, Cebon J, Green MD, Hussein S, Alt C, Menchaca D, Tomita D, Marty J, Fox RM, Begley CG. Thrombopoietic effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHuMGDF) in patients with advanced cancer. *Lancet* 1996;348:1279-1281.
 32. Komatsu N, Okamoto T, Yoshida T. Effects of pegylated recombinant megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHuMGDF) increased platelet counts with aplastic anemia and myelodysplastic syndrome (MDS) [abstract]. *Blood* 2000;86: 296a.
 33. Nomura S, Dan K, Hotta T, Fujimura K, Ikeda Y. Effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2002;100:728-730.
 34. Mizushima S, Nagata S. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* 1990;18:5322.
 35. Caen JP, Han ZC, Bellucci S, Alemany M. Regulation of megakaryocytopoiesis. *Haemostasis* 1999;29:27-40.
 36. Ezumi Y, Takayama H, Okuma M. Thrombopoietin, c-Mpl ligand, induces tyrosine phosphorylation of Tyk2, JAK2, and STAT3, and enhances agonists-induced aggregation in platelets in vitro. *FEBS Letters* 1995;374:48-52.
 37. Hogge D, Fanning S, Bockhold K, Petzer A, Lambie K, Lansdorp P, Eaves A, Eaves C. Quantitation and characterization of human megakaryocyte colony-forming cells using a standardized serum-free agarose assay. *Br J Haematol* 1997;96:790-800.
 38. Teramura M, Kobayashi S, Yoshinaga K, Iwabe K, Mizoguchi H. Effect of thrombopoietin (c-Mpl ligand) alone and in combination with other hematopoietic growth factors on human megakaryocytopoiesis in serumfree cultures. *Int J Hematol* 1997;66:373-381.
 39. Tomer A, Harker LA, Burstein SA. Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes.

- Blood 1988;71:1244-1252.
40. Hagiwara T, Kodama I, Horie K, Kato T, Miyazaki H. Proliferative properties of human umbilical cord blood megakaryocyte progenitor cells to human thrombopoietin. *Exp Hematol* 1998;26:228-235.
 41. Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl AC, Hunt P. Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 1995;85:402-413.
 42. Dick JE, Bhatia M, Gan O, Kapp U, Wang JC. Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice. *Stem Cells* 1997;15:199-207.
 43. Ueda T, Yoshino H, Kobayashi K, Kawahata M, Ebihara Y, Ito M, Asano S, Nakahata T, Tsuji K. Hematopoietic repopulating ability of cord blood CD34⁺ cells in NOD/Shi-scid mice. *Stem Cells* 2000;18:204-213.
 44. Perez LE, Rinder HM, Wang C, Tracey JB, Maun N, Krause DS. Xenotransplantation of immunodeficient mice with mobilized human blood CD34⁺ cells provides an in vivo model for human megakaryocytopoiesis and platelet production. *Blood* 2001;97:1635-1643.
 45. Cashman J, Bockhold K, Hogge DE, Eaves AC, Eaves CJ. Sustained proliferation, multi-lineage differentiation and maintenance of primitive human haemopoietic cells in NOD/SCID mice transplanted with human cord blood. *Br J Haematol* 1997;98:1026-1036.
 46. Kim DK, Fujiki Y, Fukushima T, Ema H, Shibuya A, Nakauchi H. Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells. *Stem Cells* 1999;17:286-294.
 47. Greiner DL, Hesselton RA, Shultz LD. SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells* 1998;16:166-177.
 48. Rice AM, Wood JA, Milross CG, Collins CJ, Case J, Vowels MR, Nordon RE. Prolonged ex vivo culture of cord blood CD34⁺ cells facilitates myeloid and megakaryocytic engraftment in the non-obese diabetic severe combined immunodeficient mouse model. *Br J Haematol* 2001;114:433-443.
 49. Verstegen MM, van Hennik PB, Terpstra W, van den Bos C, Wielenga JJ, van Rooijen N, Ploemacher RE, Wagemaker G, Wognum AW. Transplantation of human umbilical cord blood cells in macrophage-depleted SCID mice: evidence for accessory cell involvement in expansion of immature CD34⁺CD38⁻ cells. *Blood* 1998;91:1966-1976.

50. Neumann TA, Foote M. Megakaryocyte growth and development factor (MGDF): an Mpl ligand and cytokine that regulates thrombopoiesis. *Cytokines Cell Mol Ther* 2000;6:47-56.
51. Yoshino H, Ueda T, Kawahata M, Kobayashi K, Ebihara Y, Manabe A, Tanaka R, Ito M, Asano S, Nakahata T, Tsuji K. Natural killer cell depletion by anti-asialo GM1 antiserum treatment enhances human hematopoietic stem cell engraftment in NOD/Shi-scid mice. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:1211-1216.
52. Dao MA, Nolta JA. Immunodeficient mice as models of human hematopoietic stem cell engraftment. *Curr Opin Immunol* 1999;11:532-537.
53. Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, Yoshino H, Ebihara Y, Yagasaki H, Hisakawa H, Mitsui T, Manabe A, Tanaka R, Kobayashi K, Ito M, Yasukawa K. Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/ Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest* 2000;105:1013-1021.
54. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang CYJ, Bhatia M, Lapidot T, Morits T, Murdoch B, Xiao LX. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 1996;2:1329-1337.
55. Loo JC, Hanenberg H, Cooper RJ, Luo FY, Lazaridis EN, Williams DA. Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mouse as a model system to study the engraftment and mobilization of human peripheral blood stem cells. *Blood* 1998;92:2556-2570.
56. Cashman JD, Eaves CJ. Human growth factor-enhanced regeneration of transplantable human hematopoietic stem cells in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1999;93:481-487.
57. Nakahata T, Kobayashi T, Ishiguro A, Tsuji K, Naganuma K, Ando O, Yagi Y, Tadokoro K, Akabane T. Extensive proliferation of mature connective-tissue type mast cells in vitro. *Nature* 1986;324:65-67.
58. Ishibashi T, Kimura H, Uchida T, Kariyone S, Friese P, Burstein SA. Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:5953-5957.
59. Gawaz M, Neumann F-J, Schomig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: consequences for diagnosis and therapy. *Circulation* 1999;99:e1-e11.

60. Basser RL, Rasko JE, Clarke K, Cebon J, Green DM, Hussein S, Alt C, Menchaca D, Tomita D, Marty J, Fox MR, Begley GC. Thrombopoietic effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHuMGDF) in patients with advanced cancer. *Lancet* 1996;348:1279-1281.
61. Vadhan-Raj S, Murray LJ, Bueso-Ramos C, Patel S, Reddy SP, Hoots WK, Johnston T, Papadopolous NE, Hittelman WN, Johnston DA, Yang TA, Paton VE, Cohen RL, Hellmann SD; Benjamin RS, Broxmeyer HE. Stimulation of megakaryocyte and platelet production by a single dose of recombinant human thrombopoietin in patients with cancer. *Ann Intern Med* 1997;126:673-681.
62. Basser RL, Rasko JE, Clarke K, Cebon J, Green MD, Grigg AP, Zalcberg J, Cohen Brian, O'Byrne J, Menchaca DM, Fox RM, Begley CG. Randomized, blinded, placebo-controlled phase I trial of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor with filgrastim after dose-intensive chemotherapy in patients with advanced cancer. *Blood* 1997;89:3118-3128.
63. Farese AM, Hunt P, Boone T, MacVittie TJ. Recombinant human megakaryocyte growth and development factor stimulates thrombocytopoiesis in normal nonhuman primates. *Blood* 1995;86:54-59.
64. Andrews RG, Winkler A, Myerson D, Briddell RA, Knitter GH, McNiece IK, Hunt P. Recombinant human ligand for MPL, megakaryocyte growth and development factor (MGDF), stimulates thrombopoiesis in vivo in normal and myelosuppressed baboons. *Stem Cells* 1996;14:661-677.
65. Harker LA, Marzec UM, Hunt P, Kelly AB, Tomer A, Cheung E, Hanson SR, Stead RB. Dose-response effects of pegylated human megakaryocyte growth and development factor on platelet production and function in nonhuman primates. *Blood* 1996;88:511-521.
66. Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM, Bell LA, Sprecher CA, Blumberg H, Johnson R, Prunkard D, Ching AF, Mathewes SL, Bailey MC, Forstrom, JW, Buddle MM, Osborn SG, Evans SJ, Sheppard PO, Presnell SR, O'Hara PJ, Hagen FS, Roth GJ, Foster DC. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 1994;369:565-568.
67. Kabaya K, Akahori H, Shibuya K, Nitta Y, Ida M, Kusaka M, Kato T, Miyazaki H. In vivo

- effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor on hematopoiesis in normal mice. *Stem Cells* 1996;14:651-660.
68. Serres MD, Yeager RL, Dillberger JE, Lalonde G, Gardner GH, Rubens CA, Simkins AH, Sailstad JM, McNulty MJ, Woolley JL. Pharmacokinetics and Hematological Effects of the PEGylated Thrombopoietin Peptide Mimetic GW395058 in Rats and Monkeys After Intravenous or Subcutaneous Administration. *Stem Cells* 1999;17:316-326.
 69. Begley CG, Bassor RL. Biologic and structural differences of thrombopoietic growth factors. *Semin Hematol* 2000;37:19-27.
 70. Demetri GD. Pharmacologic treatment options in patients with thrombocytopenia. *Semin Hematol* 2000;37:11-18.
 71. Nogami W, Yoshida H, Koizumi K, Yamada H, Abe K, Arimura A, Yamane N, Takahashi K, Yamane A, Oda A, Tanaka Y, Takemoto H, Ohnishi Y, Ikeda Y, Miyakawa Y. The effect of a novel, small non-peptidyl molecule butyzamide on human thrombopoietin receptor and megakaryopoiesis. *Haematologica* 2008;93(10):1495-1504.
 72. Desjardins RE, Tempel DL, Lucek R, Kuter DJ. Single and Multiple Oral Doses of AKR-501 (YM477) Increase the Platelet Count in Healthy Volunteers. *Blood* 2006;108:Abstract 477.
 73. Wun T, Paglieroni T, Hammond WP, Kaushansky K, Foster DC. Thrombopoietin is synergistic with other hematopoietic growth factors and physiologic platelet agonists for platelet activation in vitro. *Am J Hematol* 1997;54 (3):225-232.
 74. Oda A, Miyakawa Y, Druker BJ, Ozaki K, Yabusaki K, Shirasawa Y, Handa M, Kato T, Miyazaki H, Shimosaka A, Ikeda Y. Thrombopoietin primes human platelet aggregation induced by shear stress and by multiple agonists. *Blood* 1996;87:4664-4670.
 75. Sabath FD, Kaushansky K, Broudy VC. Deletion of the Extracellular Membrane-Distal Cytokine Receptor Homology Module of Mpl Results in Constitutive Cell Growth and Loss of Thrombopoietin Binding. *Blood* 1999;94(1):365-367.
 76. Kimura T, Kaburaki H, Tsujino T, Ikeda Y, Kato H, Watanabe Y. A non-peptide compound which can mimic the effect of thrombopoietin via c-Mpl. *FEBS Letters* 1998;428:250-254.
 77. Fielder PJ, Gurney AL, Stefanich E, Marian M, Moore MW, Carver-Moore K, Sauvage FJ. Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. *Blood* 1996;87:2154-2161.

78. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2004 104: Abstract 2909.
79. Abe M, Suzuki K, Sakata C, Sugasawa K, Hirayama F, Koga Y, Kawasaki T, Naganuma S, Itoh H. Pharmacological profile of AS1670542, a novel orally-active human thrombopoietin receptor agonist. *Eur J Pharmacol* 2011;650 :58-63.
80. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008;112:Abstract 5391.
81. Kuter DJ. New thrombopoietic growth factors. *Blood* 2007;109:4607-4616.
82. Kuter DJ, Begley CG. Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies. *Blood* 2002;100:3457-3469.
83. Deutsch VR, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol* 2006;134:453-466.
84. Engel C, Loeffler M, Franke H, Schmitz S. Endogenous thrombopoietin serum levels during multicycle chemotherapy. *Br J Haematol* 1999;105:832-838.
85. Usuki K, Tahara T, Iki S, Endo M, Osawa M, Kitazume K, Kato T, Miyazaki H, Urabe A. Serum thrombopoietin level in various hematological diseases. *Stem Cells* 1996;14:558-565.
86. Shimodaira S, Ishida F, Ichikawa N, Tahara T, Kato T, Kodaira H, Ito T, Tanaka E, Sodeyama T, Kiyosawa K, Kitano K. Serum thrombopoietin (c-Mpl ligand) levels in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 1996;76:545-548.
87. Phase 2, Parallel Group, Rollover Study of AKR-501 in Patients With Chronic ITP Who Completed 28 Days of Study Treatment in Protocol 501-CL-003. *Clinical Trials.gov* (NCT00625443).
88. Study of AKR-501 Tablets Taken Orally Once Daily for 28 Days in Patients With Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura (ITP). *Clinical Trials.gov* (NCT00441090).
89. Once-Daily Oral E5501 Tablets Used in Subjects With Chronic Liver Diseases and Thrombocytopenia Prior to Elective Surgical or Diagnostic Procedures. *Clinical Trials.gov* (NCT00914927).
90. エーザイ株式会社. 2009 年度プロダクトクリエーションミーティング資料.
91. Jenkins JM, Williams D, Deng Y, Uhl J, Kitchen V, Collins D, Erickson-Miller CL. Phase 1 clinical study of eltrombopag, an oral, nonpeptide thrombopoietin receptor agonist. *Blood* 2007;109:4739-4741.
92. Bussel JB, Cheng Saleh MN, Psaila B, Kovaleva L, Meddeb B, Kloczko J, Hassani H, Mayer B,

Stone NL, Arning M, Provan D, Jenkins JM.. Eltrombopag for the Treatment of Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med* 2007;357(22):2237-2247.

93. Bussel JB, Provan D, Shamsi T, Cheng G, Psaila B, Kovaleva L, Salama A, Jenkins JM, Roychowdhury D, Mayer B, Stone N, Arning M. Effect of eltrombopag on platelet counts and bleeding during treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2009;373:641-48.

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文で既に公表している。

1. Suzuki K, Hiramatsu H, Fukushima-Shintani M, Heike T, Nakahata T. Efficient assay for evaluating human thrombopoiesis using NOD/SCID mice transplanted with cord blood CD34⁺ cells. *Eur. J. Haematol* 2007;78(2):123-130.
2. Fukushima-Shintani M, Suzuki K, Iwatsuki Y, Abe M, Sugasawa K, Hirayama F, Kawasaki T. 2008. AKR-501 (YM477) in combination with thrombopoietin enhances human megakaryocytopoiesis. *Exp Hematol* 2008;36:1337–1342.
3. Fukushima-Shintani M, Suzuki K, Iwatsuki Y, Abe M, Sugasawa K, Hirayama F, Kawasaki T, Nakahata T. AKR-501 (YM477) a novel orally-active thrombopoietin receptor agonist. *Eur. J. Haematol* 2009;82 (4):247-254.

謝辞

本論文の作成および発表にあたり、御指導及び御鞭撻いただきました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 長澤寛道教授および作田庄平准教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の機会を与えていただきましたアステラス製薬株式会社代表取締役社長 畑中好彦氏、研究本部長 塚本紳一博士、開発本部開発推進部 稲垣治博士、京都大学 iPS 細胞研究所 中畑龍俊教授に謹んで感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、終始御指導と御教示また御協力を賜りました研究本部薬理研究所腎研究室 鈴木健一博士に厚く感謝し、御礼を申し上げます。

本研究の実施にあたり、多大なる御協力と御助言を賜りましたアステラス製薬株式会社開発本部プロジェクト推進部 川崎富久博士、研究本部薬理研究所腎研究室 阿部正樹博士、研究本部薬理研究所免疫・感染症研究室 岩月義行博士に心より感謝申し上げます。

本研究に御協力いただきました旧山之内製薬株式会社薬理研究所薬理第二研究室の各氏、化学研究所の各氏に深く感謝申し上げます。

最後に、本論文作成に当たり、終始応援し続けてくれた家族に心から感謝します。