

皮下脂肪組織から単離されるプレ巨核球前駆細胞からの血小板産生における c-MPL の役割

松原由美子

慶應義塾大学医学部 臨床研究推進センター

【研究の背景】

研究代表者は、少量のヒト皮下脂肪組織から *in vitro* 分化誘導法にて多量(造血幹細胞から同じ培地、同スケールで培養した場合の約 30 倍)の機能を有する血小板を得られること(文献 1-3)を発見して以来、その分子機序の解明研究を続けている。その主な知見として、脂肪前駆細胞は巨核球・血小板分化に重要な転写因子 p45NF-E2、GATA2、RUNX1 などを有していること、それらの中でも巨核球分化に重要であることを皮膚線維芽細胞からのダイレクトリプログラミングによって証明された p45NF-E2 が脂肪前駆細胞からの巨核球・血小板分化においても重要であることを報告した(文献 4、5)。さらに脂肪前駆細胞に特異的な機序として、CD71 を介するトランスフェリン刺激で内在性 TPO を分泌しながら巨核球分化を行うことを見いだした。これら知見を基に皮下脂肪の細胞集団に存在する高度に巨核球分化が決定づけられた PMP 細胞(CD45-/Ter119-/CD31-/CD71+/c-MPL+)の同定・単離に成功した。この細胞における CD71 の役割は遺伝子改変実験などを重ね詳細な解析結果を得ているが、造血幹細胞と巨核球では独自の働きを有することが知られている c-MPL に関して、PMP 細胞では十分に解明されていない。

【目 的】

本研究は、造血幹細胞と巨核球では独自の働きを有することが知られている c-MPL の PMP 細胞における役割を解明することを目的とする。具体的には、c-mpl ノックアウトマウスの PMP (c-mpl-)細胞、c-mpl 遺伝子改変ヒト PMP 細胞を用いて、巨核球分化・血小板産生の各過程における遺伝子改変の効果を詳細に検討する。

【方 法】

マウス細胞に関しては、c-MPL ノックアウトマウスと野生型マウスの皮下脂肪から PMP 細胞を分離し、巨核球・血小板への *in vitro* 分化誘導の為に調整した無血清 Megakaryocyte Lineage Induction Media(トロンボポエチン非添加/添加)にて培養、既報の方法にて解析を行った(文献 1-5)。フローサイトメリー法を用いて、巨核球・血小板の表面マーカーである CD41 や CD42b 発現、巨核球 DNA ploidy にて行った。マウス細胞とヒト細胞に関して、c-MPL の阻害抗体の添加+/-状態で巨核球・血小板への *in vitro* 分化誘導の為に調整した無血清 Megakaryocyte Lineage Induction Media(トロンボポエチン非添加/添加)にて培養、既報の方法にて上記同様の解析を行った。またヒト脂肪にトロンボポエチン刺激を与え、c-MPL を介するシグナル伝達を測定した。

【結 果】

c-MPL ノックアウトマウスと野生型マウスの皮下脂肪から分離された PMP 細胞を巨核球・血小板に分化誘導したところ、c-MPL ノックアウトマウスからは野生型の約 5-10%の巨核球・血小板が産生されたことが、CD41 や CD42b 発現、巨核球 DNA ploidy 解析により示された。またマウスやヒト細胞を用い、c-MPL の阻害抗体存在下で巨核球・血小板に分化誘導をかけた際もノックアウトマウス使用時と同様の結果を得た。これらの結果は、c-MPL ノックアウトマウスの骨髓を用いた検討と同様であった。ヒト脂肪を用いて、トロンボポエチン 100ng/mL で 10 分間刺激したところ、c-MPL の下流に存在するシグナル伝

達因子 AKT や STAT5 のリン酸化を認めた。

【考 察】

トロンボポエチンとその受容体 c-MPL の反応は造血幹細胞や iPS 細胞、ES 細胞からの巨核球分化・血小板産生には非常に重要な役割を有することが知られていたが、今回の結果から脂肪においても、c-MPL は自身が分泌する内因性トロンボポエチンとの反応が巨核球分化・血小板産生に重要な役割を持つことが認められた。

c-MPL は、既存の血小板増多薬の標的であり、c-MPL 発現細胞における、それぞれの役割を新たに解明・発信することは、既存の c-MPL 標的の血小板増多薬の作用機序の理解を深めること、また未だ議論されている「未知の巨核球分化経路の存在」の解明に加え、細胞分化プログラミング機構の新しい概念を発信することが期待出来る。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究に用いる分化誘導法は皮下脂肪組織から血小板造血を安全・容易・高効率に行える。今回、その分子機序の解明研究を行うことにより出血性疾患や易出血性病態に対する新たな治療法の開発、より有用性の高い血小板輸血製剤や血小板産生促進薬の開発に貢献すると考えられる。また、既存の c-MPL 標的の血小板増多薬の作用機序の理解を深め、既存薬剤を用いた血小板減少症の予防・治療に対する有用性の高い新規アプローチ法開発に貢献すると考えられる。

【参考・引用文献】

1. **Matsubara Y**, Emi Saito, Hidenori Suzuki, Naohide Watanabe, Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda: Generation of megakaryocytes and platelets from human subcutaneous adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 378: 716-720, 2009
2. **Matsubara Y**, Suzuki H, Ikeda Y, Murata M: Generation of megakaryocytes and platelets from preadipocyte cell line 3T3-L1, but not the parent cell line 3T3, *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402: 796-800, 2010.
3. **Matsubara Y**, Murata M, Ikeda Y. Culture of megakaryocytes and platelets from subcutaneous adipose tissue and a preadipocyte cell line. *Methods Mol Biol.* 788: 249-58, 2012.
4. Ono Y, Wang Y, Suzuki H, Okamoto S, Ikeda Y, Murata M, Poncz M, **Matsubara Y**. Induction of functional platelets from mouse and human fibroblasts by p45NF-E2/Maf. *Blood* 120 (18): 3812-21, 2012
5. **Matsubara Y**, Ono Y, Suzuki H, Arai F, Suda T, Murata M, Ikeda Y. OP9 bone marrow stromal cells differentiate into megakaryocytes and platelets. *Plos One* 8 (3): e58123, 2013