

博士學位論文

内容の要旨

および

審査結果の要旨

令和4年3月

近畿大学大学院

医学研究科

学位論文審査結果の報告書

氏 名 佐野 圭吾

生 年 月 日 昭和・平成 57年 4月 24日

本 籍 (国 籍) 奈良県

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 1375号

学位授与の条件
(博士の学位) 学位規程第5条該当

論 文 題 目

Lusutrombopag effectively promotes the growth and differentiation of megakaryocytic cells from patients with myelodysplastic syndrome

骨髓異形成患者の巨核球様細胞に対する、ルストロンボパグの効率的な増殖と分化の促進


学位論文受理日 2021年 11月 15日

学位論文審査終了日 2022年 1月 27日

審 査 委 員 (主 査) 中澤 学 

(副主査) 池上 陽司 

(副主査) 伊藤 彰彦 

指 導 教 員 松村 到 

論文内容の要旨

【目的】

骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome : MDS) は、骨髄造血細胞の障害による造血障害と腫瘍増殖を主な症状とする疾患で、血小板減少とそれに伴う出血は、MDS 患者における主な死亡原因の一つとなっている。血小板減少に対する治療は、現段階では血小板輸血しかないものの、その有効期間の短さやその経済的社会的負担が問題である。

MDS 患者における血小板減少に対する新たな治療の選択肢として、トロンボポエチン作動薬の一つであるルストロンボパグの開発可能性に着目し、骨髄異形成患者の骨髄より採取した CD34+細胞に対するルストロンボパグ投与の影響を調べることを目的とした。

【方法】

近畿大学で MDS と診断された 13 例、骨髄異形成変化を伴う急性白血病 (Acute myelogenous leukemia : AML) と診断された 3 例、2016 年版 WHO 分類による AML M6 と診断された 2 例、健康ドナー 1 例の骨髄から採取した CD34+細胞を、ルストロンボパグを添加し、液体培地による培養、ヒト巨核球系幹細胞コロニーアッセイ (Clony-forming unit assays of megakaryocyte progenitors : CFU-Mk)、連続継代アッセイを行うことで、ルストロンボパグが MDS 患者の骨髄由来の CD34+細胞の増殖、分化、長期の自己複製に及ぼす影響を調べた。また、サイトカイン抗体アレイを用い、ルストロンボパグが MDS 患者の骨髄由来の CD34+造血細胞のサイトカイン分泌に及ぼす影響を調べた。本研究は実施施設において IRB の承認を受けている。

【結果】

ルストロンボパグは、健康ドナーから採取した CD34+細胞と同程度に MDS 患者由来の CD34+造血細胞に対して、増殖と分化を促すことが示唆された。また、ルストロンボパグは、MDS 患者由来の CD34+造血細胞に対して、トロンボポエチンやルストロンボパグと同様にトロンボポエチン作動薬であるエルトロンボパグと同程度に巨核球形成を促すことが示唆された。加えて、ルストロンボパグは MDS 又は AML 患者における CD34+芽球様細胞の増殖を促進しないことが示唆された。サイトカインの分泌については、ルストロンボパグと比較して、トロンボポエチン、エルトロンボパグの方が、MDS 患者の骨髄由来の CD34+細胞に FGF-7 の分泌を促すことが示唆された。

【考察】

ルストロンボパグは、MDS 患者における芽球様細胞の増殖を促進することなく、巨核球への分化を促進すると考えられた。

【結論】

ルストロンボパグは、MDS 患者における血小板減少に対する治療薬となりうる可能性が示唆された。

	公表年月日	出版物の種類および名称
博士論文の印刷公表	令和3年12月末 掲載予定	博士学位論文 Acta Medica Kindai University 第46巻 第2号
	全文 要約	Lusutrombopag effectively promotes the growth and differentiation of megakaryocytic cells from patients with myelodysplastic syndrome

論文審査結果の要旨

1) 論文内容の要旨

【目的】

骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome : MDS) は、造血幹細胞 (hematopoietic stem cell, HSC) レベルの細胞に起こった染色体・遺伝子異常に起因する造血不全と腫瘍性増殖を主症状とする疾患で、血小板減少に起因する出血は、MDS患者における主な死亡原因の一つとなっている。血小板減少に対する治療は、現段階では血小板輸血しかなく、有効期間の短さや経済的社会的負担が問題である。本研究では、MDS患者における血小板減少に対する新たな治療選択肢として、

トロンボポエチン (thrombopoietin TPO) 受容体作動薬の一つであるルスストロンボパグ (lusutrombopag, LTP) の開発可能性に着目し、MDS患者のHSC分画を含むCD34⁺細胞に対するLTPの作用を調べることにした。

【方法】

近畿大学でMDSと診断された13例、骨髄異形成変化を伴う急性白血病 (Acute myelogenous leukemia : AML) と診断された3例、2016年版WHO分類によるAML M6と診断された2例、健常人ドナー1例の骨髄から採取したCD34⁺細胞にLTP、LTPと同じTPO受容体作動薬であるエルトロンボパグ (eltrombopag, ETP)、TPOを添加し、液体培養、巨核球系コロニーアッセイ (Clony-forming unit assays of megakaryocyte progenitors : CFU-Mk)、連続継代コロニーアッセイを行うことで、LTPがMDS患者のCD34⁺細胞の増殖、分化、長期自己複製能に及ぼす影響をTPO、ETPと比較した。また、LTPが、MDS患者のCD34⁺細胞のサイトカイン分泌に及ぼす影響をサイトカイン抗体アレイを用いて解析した。本研究は本医学部の倫理委員会の承認 (承認番号 : 26-087) のもとで行った。

【結果】

LTPは、健常人ドナー、MDS患者から採取したCD34⁺細胞に対して、TPOと同程度に増殖と巨核球分化を促した。ETPは高濃度 (10 μ M) で添加すると正常およびMDS患者由来のCD34⁺細胞にアポトーシスを誘導したが、同濃度のLTPにはこの作用はなかった。また、LTPはMDS/AML患者のCD34⁺芽球細胞 (AML細胞) の増殖を促進しなかった。さらに、TPO、ETP、LTPはCD34⁺細胞からのFGF-7、bFGF、EGFなどのサイトカイン放出誘導において異なった作用を示すことが明らかとなった。

【考察】

LTPは、MDS患者における芽球細胞の増殖を促進することなく、CD34⁺細胞からの巨核球への分化を促進すると考えられた。

【結論】

LTPは、MDS患者における血小板減少に対する治療薬となりうる可能性が示唆された。

2) 審査結果の要旨

佐野圭吾氏の学位論文に対する最終試験は、令和4年1月5日の17時から第8講義室で開始された。

まず、佐野圭吾氏が本研究を行うに至った背景、方法と対象、結果と考察を口頭で発表し、主査である中澤学、副査である池上博司、伊藤彰彦両教授がいくつかの疑問点を質した。

伊藤彰彦教授からは、LTPには、多能性HSCの増殖、分化のいずれを支持するのかが問われた。池上博司教授からは、MDS患者においては血中TPO濃度が高くなっていることが予測されるが、その中でTPO受容体作動薬の投与により血小板増加が期待できるのか、研究結果から人体に投与しても問題ないといえるのかについて質問がなされた。更に中澤学からは、生体におけるTPO受容体の発現組織と予測される副作用とその対応について、LTP投与により産生された血小板は正常血小板と同様の機能を持つと予測されるのかが問われた。

これらの質問に対し、佐野氏は実験結果等に基づき極めて的確に回答した。まずは、培養細胞において一部の分化抗原しか調べていないことから増殖した細胞の分化度については断言できないものの、少なくとも増殖した細胞におけるCD34陽性細胞の割合が減少していることから、LTPの刺激では、TPO以上に多能性HSCの自己複製を維持することは不可能と推測されると説明した。また、本実験の結果からは血小板産生を促進する効果が期待できるものの、本実験はin vitroの前臨床試験でありMDS患者に対する効果については、実際の患者に投与する臨床試験において評価されるべきであること、本研究からは腫瘍細胞を明らかに増殖させる結果は認めず、臨床試験を実施するに値する結果であることを説明した。加えて、TPO受容体は血液系の組織のみに発現しており、他組織への影響は少ないことが予想されること、ETPや他のTPO受容体作動薬であるロミプロスチム (romiplostim) においては過度の血小板数増加による血栓症や骨髄線維化などの副作用が

報告されているものの、実際投与することを想定した場合には血小板数に注意しながら薬剤の減量、休薬を行うことで副作用を極力回避できると応答した。また、LTP投与により産生された血小板の機能については、健康成人ではおそらく正常であることが予測されるものの、MDS患者においてはHSCの異常によりそもそも正常な機能を持つ血小板が産生されていないことから、患者によっては正常血小板と同様の機能を持たない可能性を考慮する必要があると返答した。

上記の審査を総合的に判断し、主査・副主査は合議の上、提出された学位論文が確かに佐野圭吾氏の研究成果であること、また、佐野圭吾氏が学位授与にふさわしい基礎研究手法ならびに科学的思考能力と研究指導能力を併せ持つものと判断し、最終試験を合格と判定した。

3) 最終試験の結果：
合格

4) 学位授与の可否：
可