

## 小児好中球減少症に対する新しい治療法の開発

—G-CSFに代わる顆粒球産生サイトカインの基礎的検討—

(分担研究：効果的な小児慢性特定疾患治療研究事業の推進に関する研究)

研究協力者：小宮山淳

共同研究者：沢井信邦、稲葉雄二、木下達也、小池健一

要旨：小児好中球減少症に対して G-CSF が臨床応用され、多数症例において著明な臨床効果が得られた。しかしながら G-CSF 受容体の異常などにより治療効果が望めない症例や、長期投与による二次癌の発生頻度の増加が報告され、新しい治療法の開発が望まれている。最近、単離された thrombopoietin (TPO) は、巨核球産生のみならず多能性造血幹細胞の初期分化にも深くかかわっていることが報告されている。われわれは、臍帯血造血幹細胞を SCF と TPO の共存下で無血清液体培養をおこなったところ、長期に顆粒球産生が維持されることを見出した。その結果から、G-CSF、GM-CSF に依存しない顆粒球産生機構の存在が示唆された。今後、好中球減少症において、この顆粒球産生系を活性化することにより感染症のコントロールが可能であるか検討していく予定である。

見出し語：小児好中球減少症、granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)、thrombopoietin (TPO)、stem cell factor (SCF)、サイトカイン療法

研究目的：小児好中球減少症に対して G-CSF が臨床応用されたが、G-CSF 受容体の異常などにより治療効果が望めない症例や、長期投与による二次癌の発生頻度の増加が報告されている。本研究は G-CSF に代わる新たな治療法の開発を目的として、他のサイトカインによる臨床応用の可能性を明らかにする。

研究方法：顆粒球単球産生は、G-CSF、GM-CSF および M-CSF などの顆粒球/単球系細胞の増殖分化に特異的に作用するサイトカインと、stem cell factor (SCF)、Interleukin (IL)-3、IL-6 などの造血幹細胞の初期分化に重要な働きを示すサイトカインより制御されている。最近、単

離された thrombopoietin (TPO) は、巨核球産生のみならず多能性造血幹細胞の初期分化にも深く関与していることが報告されている。これらのサイトカインを単独または組み合わせて用いて、臍帯血造血幹細胞から好中球が誘導できるか無血清液体培養法を用いて検討した。

結果：臍帯血 CD34 陽性細胞を SCF と TPO の共存下で長期間無血清液体培養を行った。図 1 に、SCF 単独、TPO 単独、SCF と TPO の共存下での生細胞数の推移を示す。SCF 単独では、約1ヶ月を越えてから急激に細胞増殖が認められた。TPO 単独では、培養 12 日までに 90% 以上が巨核球に分化し、2 週間を越えると細胞は死滅した。—

方、SCF + TPO の存在下では、SCF 単独、TPO 単独と比較し、有意に培養早期から細胞増殖が認められ、2ヶ月を越えて増殖が維持された。これらの長期培養により誘導された細胞の分画を図2に示す。tryptase 染色をマスト細胞の、peroxidase 染色を顆粒球/単球系細胞の同定に用いた。SCF 単独では、1ヶ月後には、マスト細胞が大多数をしめ、少数の顆粒球と単球がみられた。一方、SCF と TPO の共存下では、2ヶ月をこえて顆粒球/単球系細胞の産生が維持された。これらの細胞の FACSscan 解析を図3に示す。SCF 単独では、約1ヶ月を越えると、c-kit、CD13 陽性で、CD11b、CD14 および CD15 陰性のマスト細胞が誘導された。SCF と TPO の共存下では、マスト細胞に加えて、CD11b およ

び CD15 陽性の顆粒球/単球系細胞がみられた。つぎに、SCF と TPO の共存下で、2ヶ月間長期培養して得られた細胞を、SCF + TPO、SCF + TPO + G-CSF、SCF + TPO + GM-CSF の存在下に、再培養した。1週間後および2週間後の生細胞数を示す(図4)。G-CSF、あるいは GM-CSF を添加すると、SCF + TPO に比べて、有意に細胞数の増加がみられた。1週間後に形成された細胞は、SCF + TPO 存在下では、未熟な骨髓球から桿状核球までがみられた。一方、SCF + TPO + G-CSF 存在下では、骨髓球から分葉核球がほとんどであった。SCF + TPO + GM-CSF 存在下では、骨髓球から桿状核球に加えて単球、マクロファージが誘導された。

図 1

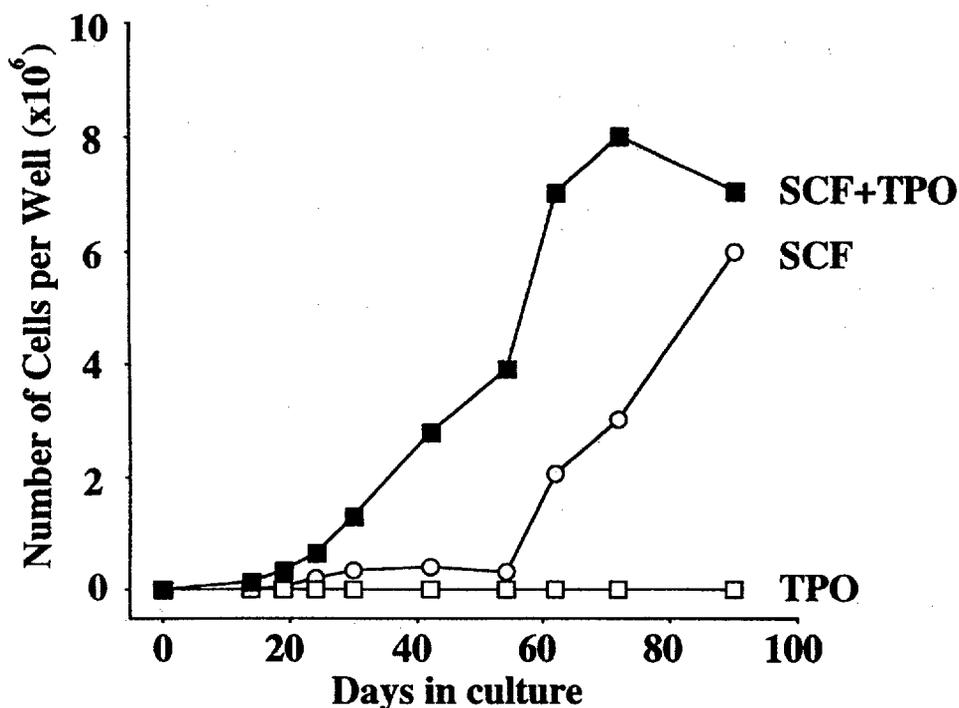


图 2

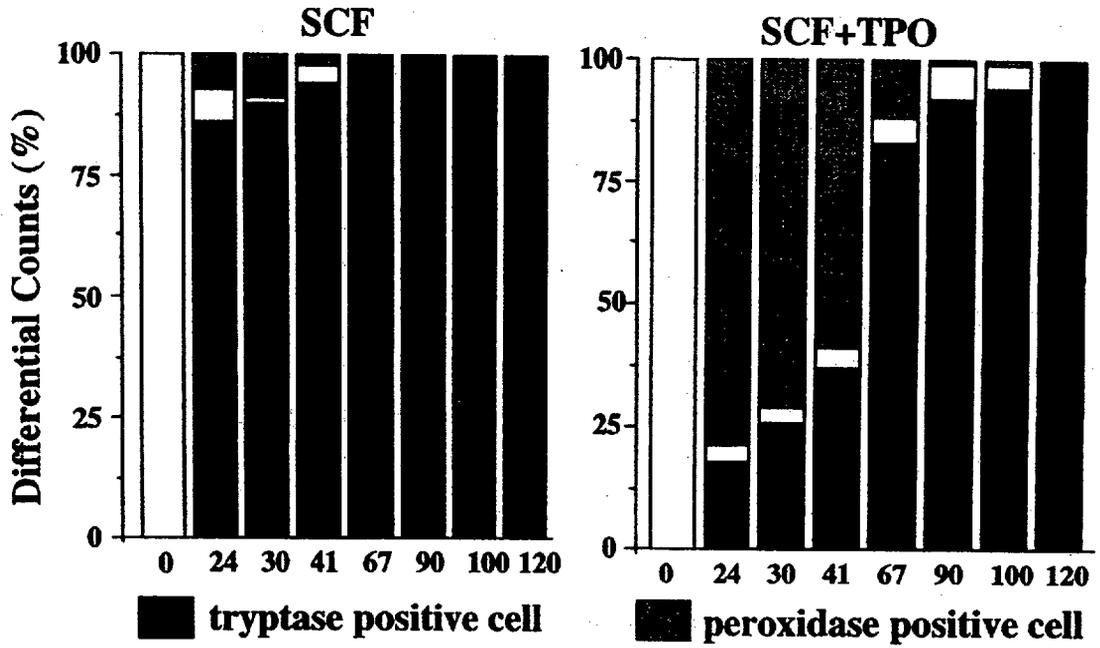
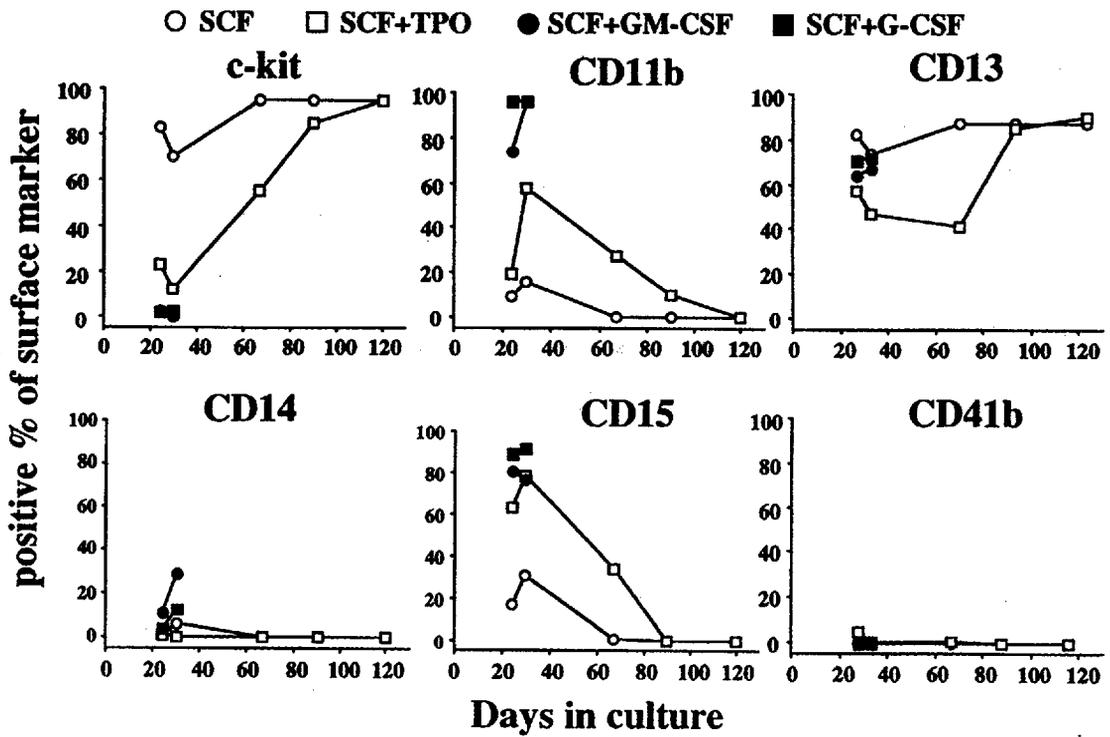


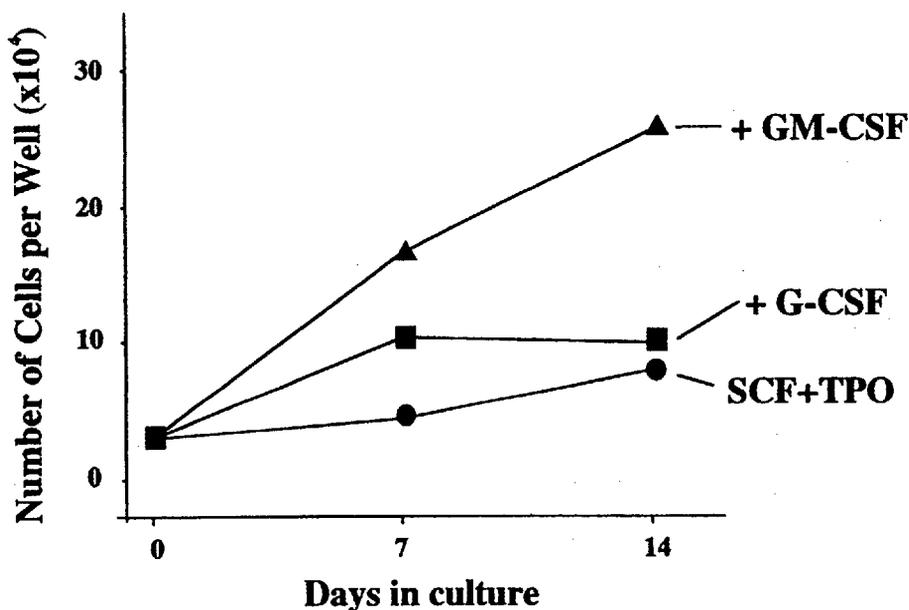
图 3



考察：最近、単離された TPO は、巨核球産生のみならず多能性造血幹細胞の初期分化にも深くかかわっていることが報告されている。われわれは、臍帯血 CD34 陽性造血幹細胞を SCF と TPO の共存下で無血清液体培養を行ったところ、長期に顆粒球産生が維持されることを見出した。その結果から、G-CSF、GM-CSF に依存しない顆粒球産生機構の存在が示唆され

た。TPO receptor (c-mpl) ノックアウトマウスでは、末梢血白血球数、分画に異常がみられないことから、SCF-TPO による顆粒球産生機構は、顆粒球減少時の代償性機構である可能性がある。今後、好中球減少症において、この顆粒球産生系を活性化するにより感染症のコントロールが可能であるか検討していく予定である。

図 4





## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要旨:小児好中球減少症に対して G-CSF が臨床応用され、多数症例において著明な臨床効果が得られた。しかしながら G-CSF 受容体の異常などにより治療効果が望めない症例や、長期投与による二次癌の発生頻度の増加が報告され、新しい治療法の開発が望まれている。最近、単離された thrombopoietin (TPO)は、巨核球産生のみならず多能性造血幹細胞の初期分化にも深くかかわっていることが報告されている。われわれは、臍帯血造血幹細胞を SCF と TPO の共存下で無血清液体培養をおこなったところ、長期に顆粒球産生が維持されることを見出した。その結果から、G-CSF、GM-CSF に依存しない顆粒球産生機構の存在が示唆された。今後、好中球減少症において、この顆粒球産生系を活性化することにより感染症のコントロールが可能であるか検討していく予定である。