

原 著

癌化学療法における血小板減少症に対する 血小板増加因子の併用による克服 —ラット及びマウスを用いた研究—

東京医科大学産科婦人科学教室

齊藤 俊雄 鈴木 康伸 高山 雅臣

Study on Overcoming Thrombocytopenia by Combining Thrombopoietin with Chemotherapy in Mice and Rat Models

Toshio SAITO, Yasunobu SUZUKI and Masaomi TAKAYAMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Medical University, Tokyo

概要 Thrombopoietin (TPO) は、血小板減少時に血中で増加し巨核球の増殖及び成熟を促進し血小板を回復させる直接的造血因子と考えられている。近い将来癌化学療法の血小板減少症に対し TPO 併用による安全で強力な化学療法確立のため、ラット及びマウスを用いて in vitro, in vivo に検討し以下の結果を得た。

1. in vitro において、マウス骨髄細胞への TPO の添加は巨核球系細胞の増殖、成熟を濃度及び時間依存性に促進した。また、他のサイトカイン添加と比べ骨髄巨核球の増殖を有意に促進した ($p < 0.01$)。
2. in vivo において carboplatin (CBDCA) による骨髄抑制マウスを作成し、TPO 投与による比較検討を行った。TPO 投与によりマウス血小板数は減少することなく nadir の底上げ効果が認められた。
3. 化学療法により引き起こされる汎血球減少症を阻止、抑制できる可能性があるか paclitaxel + CBDCA を用い骨髄抑制ラットを作成し、Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) + TPO を投与することにより血小板減少抑制効果を認めた。また、顆粒球減少に対しても相乗的効果を認めた。

TPO の登場により化学療法の副作用である汎血球減少症が G-CSF + TPO などの併用により克服される可能性が示唆された。

Abstract Objective : Thrombopoietin (TPO) is recognized as a hemopoietic factor that functions specifically in the megakaryocyte-platelet system. To establish a safe and intensive anticancer chemotherapy by combined treatment with TPO, the effects of TPO in inhibiting thrombocytopenia were examined in vitro and in vivo.

Methods : 1) In the in vitro study, mouse bone marrow cells were collected and the effects of the addition of TPO or other cytokines were compared. 2) In the in vivo study, bone marrow suppressed mice and rats were produced by administering chemotherapeutic agents, and the effects of TPO administration in inhibiting thrombocytopenia were examined and compared with controls.

Results : 1) In the in vitro study, the addition of TPO enhanced the proliferation and maturation of megakaryocytes in a dose and time dependent manner. The addition of TPO induced significantly higher proliferation of megakaryocytes compared to other cytokines ($p < 0.01$). 2) In the in vivo study, the administration of TPO to chemotherapy-induced bone marrow suppressed mice and rats resulted in no thrombocytopenia, showing an increase in platelets in the nadir.

Conclusion : Our findings suggested that pancytopenia, a common adverse effect of chemotherapy, may be overcome by combined treatment with TPO and G-CSF.

Key words : Thrombopoietin · Megakaryocyte · Thrombocytopenia · Chemotherapy

緒 言

1994年血小板増加因子 Thrombopoietin (TPO) が発見されその遺伝子も同定された^{1)~5)}。TPO は巨核球—血小板系に特異的に作用する造血因子と考えられており、巨核球系前駆細胞からの増殖・

成熟の促進、巨核球系細胞の分裂時間の短縮、巨核球からの血小板の放出促進の作用をもつといわれている。

癌化学療法の多様な副作用のなかで最も重要な課題として残されているのは骨髄抑制の対策であ

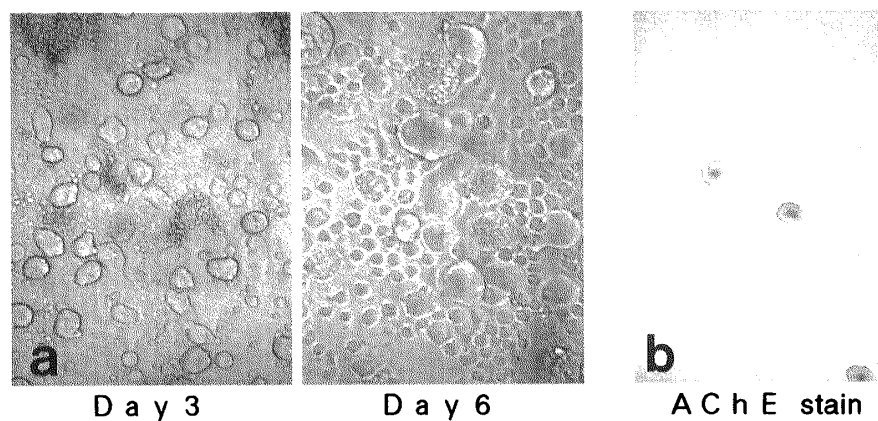


Fig. 1 Mouse bone marrow culture and AChE staining after TPO administration.

- a) In a day 6 culture, the number and size of megakaryocytes had increased.
- b) AChE stained megakaryocytes are shown.

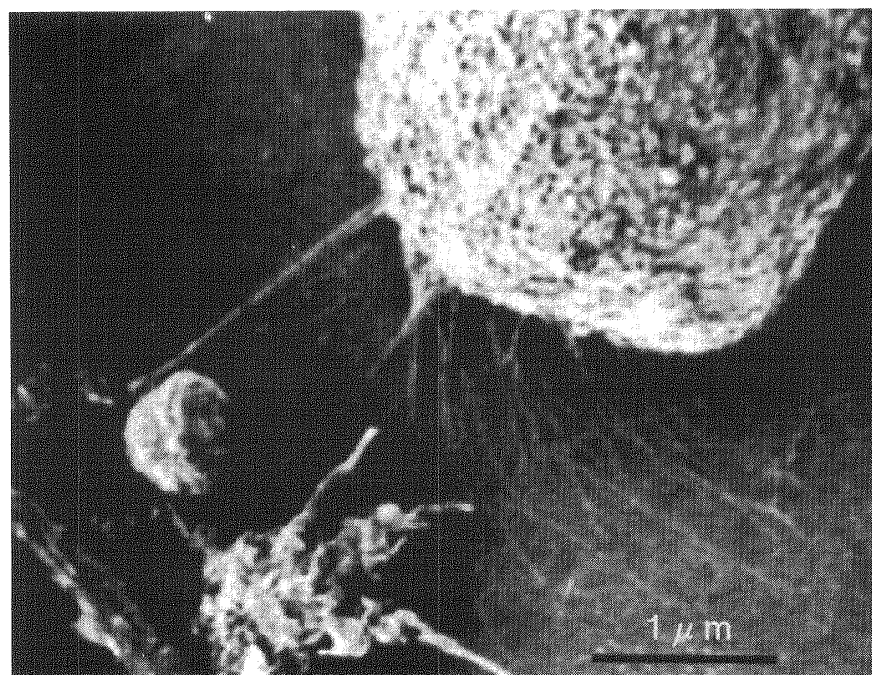


Fig. 2 Transmission electron micrograph of mouse bone marrow cells after TPO addition.

Megakaryocyte with a smooth surface and cells with a rough surface due to pseudopodia formation are observed.

る。顆粒球減少症に対しての Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), 赤血球減少症に対しての Erythropoietin (EPO), の登場により克服さ

れた感はあるが血小板減少症に関しては, 血小板輸血しかないのが現状である。婦人科悪性腫瘍に対し TPO 併用による安全で強力な化学療法確立

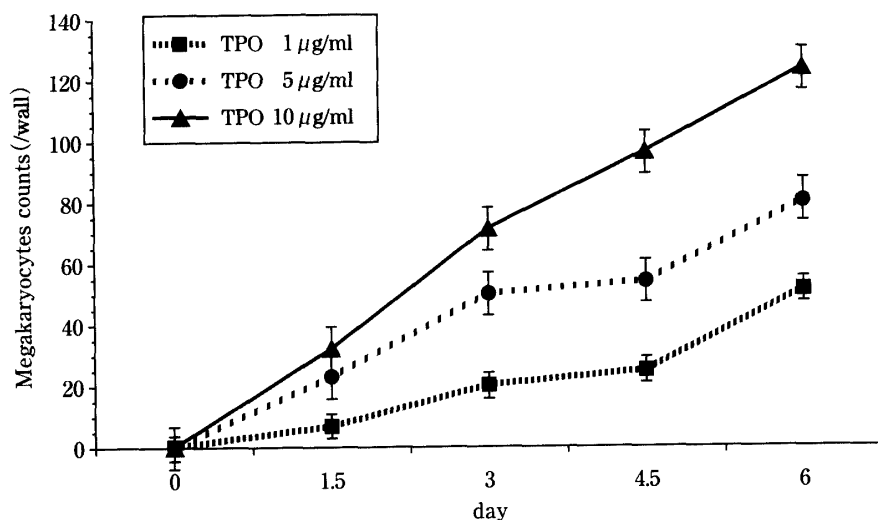


Fig. 3 Proliferation and formation capability of megakaryocytes after addition of TPO.

Dose and time dependent increase are observed after addition of TPO, All data are presented as the mean $\pm$ SD, $p < 0.01$ vs TPO 1 µg/ml, $n=15$.

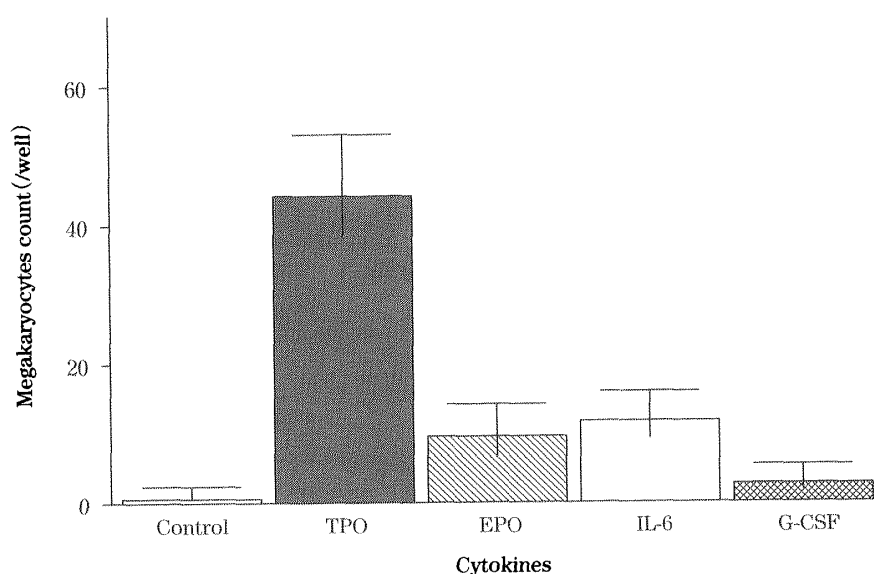


Fig. 4 Effect of addition of various cytokines on the number of colonies of megakaryocytes.

On day 6, the number of AChE stained megakaryocyte colonies is significantly increased by the addition of TPO compared with other cytokines, All data are presented as the mean $\pm$ SD, $p < 0.01$ vs Control and other cytokines, $n=25$.

のため TPO を用い巨核球—血小板の増殖・成熟作用の臨床的応用の可能性の予備実験として次の事項につき検討を行った。

1. TPO が in vitro で巨核球の増殖・成熟能を促進するか、またその機能を他のサイトカインと比較検討する。

2. TPO が in vivo で血小板の増加をどのように促進するか確認する。

3. TPO が化学療法剤により引き起こされる血小板減少症を阻止・抑制できる可能性があるか確認する。

方 法

1. TPO 添加実験

6～8週齢の Balb/c マウスより骨髓細胞を採取し、RPMI 1640+10% FCS の培養液中に TPO を添加して、37℃ 5% CO₂ の条件下で培養し倒立顕微鏡下で巨核球の成熟・増加を観察した。巨核球系細胞は、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) で特異的に染色されることより発育した巨大細胞を AChE 染色を行った。また、発育した巨核球を走査電子顕微鏡にて観察を行った。

TPO を1, 5, 10 μ g/ml の濃度で添加し、経時的

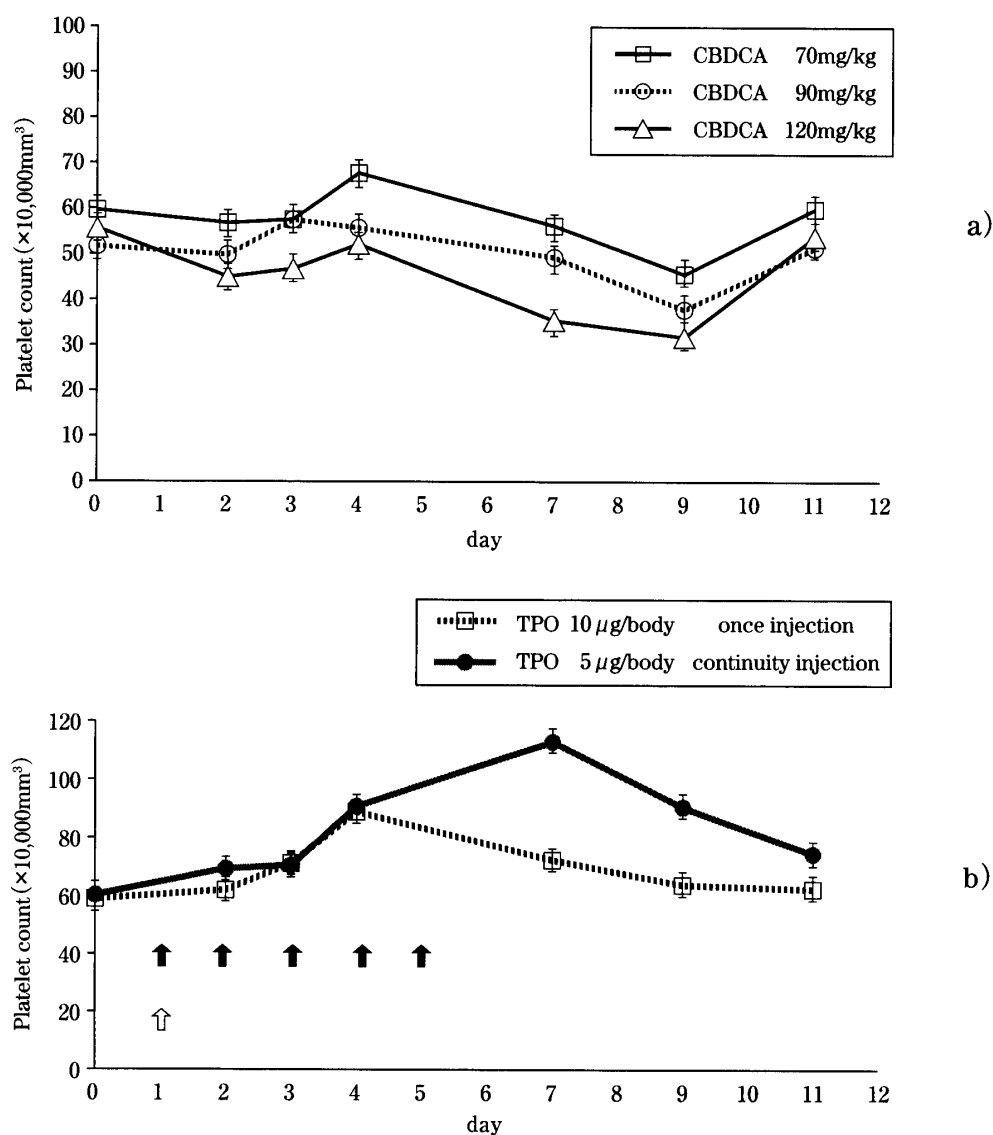


Fig. 5 a) Changes in platelet count in CBDCA-induced bone marrow suppressed mice.

b) Effects of various methods and doses of TPO on platelet count.

All data are presented as the mean $\pm$ SD, n=25.

に巨核球数を算定した。巨核球数の算定は Shandon 社の Cytospin 3集細胞遠心装置を使用した。

2. TPO と他のサイトカインとの比較

マウス骨髄細胞培養中に各サイトカインを添加し (TPO $1\mu\text{g}/\text{ml}$, EPO $1\text{IU}/\text{ml}$, IL-6 $40\text{ng}/\text{ml}$, G-CSF $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$)^{6)~8)} 6日間培養後 AChE 染色を行い3個以上の AChE 陽性細胞よりなる巨核球コロニー数を算定し TPO との比較検討を行った。

3. 抗癌剤投与による in vivo の実験

a) carboplatin (CBDCA) 投与

6~8週齢の Balb/c マウス腹腔内に70, 90, 120 mg/kg の CBDCA を投与 day 0として骨髄抑制マウスを作成し、経時的に血小板数を計測した。TPO の投与方法・投与量を決めるため TPO $10\mu\text{g}/\text{body}$ 1回投与と $5\mu\text{g}/\text{body}$ 5日間連日投与群に分け経時的に血小板数を計測した。血小板数の計測は、マウス内眼角の静脈層からヘパリンコートした毛細管で1回 $100\mu\text{l}$ ずつ採血した。

b) paclitaxel + CBDCA 投与

現在施行している化学療法に類似させるため paclitaxel $20\text{mg}/\text{kg}$ ⁹⁾ + CBDCA $90\text{mg}/\text{kg}$, paclitaxel $10\text{mg}/\text{kg}$ + CBDCA $70\text{mg}/\text{kg}$ 腹腔内投与の2種類の骨髄抑制ラットを作成し (day 0に pacli-

taxel, day 1に CBDCA 腹腔内投与) day 2より G-CSF ($2\mu\text{g}/\text{kg}$) 5日間と G-CSF + TPO ($2\mu\text{g}/\text{kg}$) 5日間皮下注投与群を作成しその効果の比較検討を行った。

paclitaxel $10\text{mg}/\text{kg}$ + CBDCA $70\text{mg}/\text{kg}$ の骨髄抑制ラットにおける血小板数、顆粒球数の経時的变化を検討した (paclitaxel の投与量は添加物としてのポリオキシエチレンヒマシ油のため腹腔内投与では副作用としての下痢を認めたため $10\text{mg}/\text{kg}$, $20\text{mg}/\text{kg}$ とした)。

生存率曲線は Kaplan-Meier 法を用い、有意差検定には Log-rank 法を用いた。

実験成績の統計学的検討は、Student-t 検定で行った。またこれらのマウス及びラットを用いた本実験は東京医科大学動物実験施設の承認のもとに行われた。

結 果

1. 倒立顕微鏡下における液体培地培養像では TPO 添加3日目より他の単核球と比べ有意に大きな巨核球系細胞がその数及び大きさは増加し形態的に成熟する巨核球増幅因子活性 (Megakaryocyte potentiator; Meg-POT) をもつと考えられる。AChE 染色ではオレンジ色に染まった巨核球が認

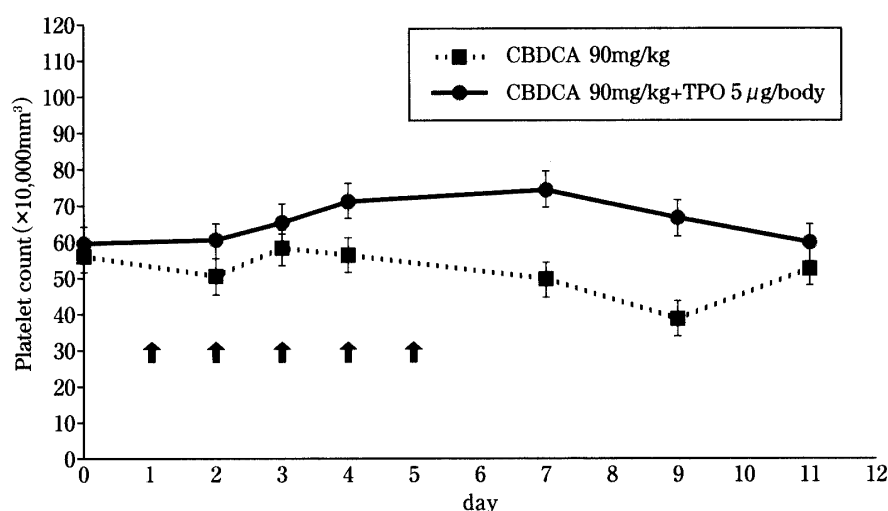


Fig. 6 Inhibition of thrombocytopenia by TPO administration to bone marrow suppressed mice.

In the TPO group, the platelet count was preserved even at the nadir, showing an increase in platelets in the nadir. All data are presented as the mean $\pm$ SD, $n=20$.

められた (Fig. 1). 走査電子顕微鏡 (TEM) で観察すると, 培養5日目頃より表面平滑な巨核球を認め, 巨核球よりの血小板放出と思われる偽足 (pseudopodia) の形成による凹凸細胞が観察された (Fig. 2).

TPO の1, 5, 10 μ g/ml の添加では巨核球数が

用量依存性にまた培養時間に比例して増加を認めた. このことより巨核球コロニーの形成を惹起する巨核球刺激因子活性 (Megakaryocyte colony stimulating factor; Meg-CSF) をもつと考えられる (Fig. 3).

2. 各サイトカイン添加による巨核球コロニー

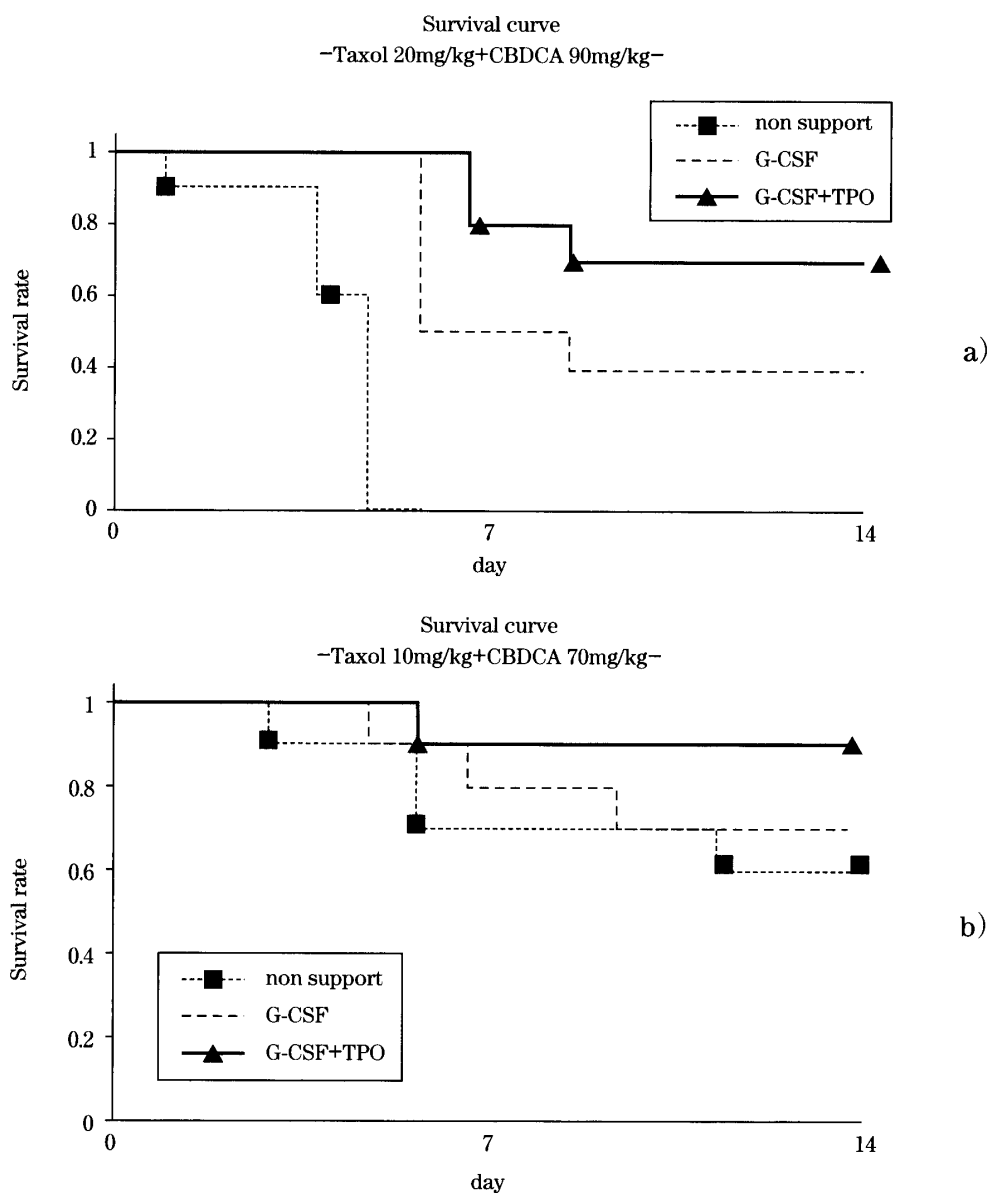


Fig. 7 Survival curves of rats with bone marrow suppression induced by paclitaxel and CBDCA administration.

a) In rats given paclitaxel 20mg/kg and CBDCA 90mg/kg, a significant difference in mortality was observed between the non support group and the G-CSF + TPO group, $p < 0.01$ vs non support group, $n=15$.

b) In rats given paclitaxel 10mg/kg and CBDCA 70mg/kg, no significant difference was observed, $n=15$.

数では TPO は, EPO, IL-6, G-CSF などの他のサイトカインに比べ有意に増加しており単独で Meg-CSF 活性を示すと考えられる (Fig. 4).

3. マウスの血小板数の nadir は day 9 で CBDCA 90mg/kg 投与群が安定した骨髄抑制効果が得られた. TPO の投与方法では, 1回投与において血小板数は day 3 に 1.5 倍程度増加し, 連日投与では day 7 に 2 倍の増加を認めた (Fig. 5).

以上より CBDCA 90mg/kg + TPO 5 μ g/body 連日投与群において血小板減少阻止・抑制効果の比較検討を行った. CBDCA 90mg/kg 投与群の骨髄抑制マウスでは nadir は day 9 で, 血小板数最低値が約 25% 減少していたが TPO 5 μ g/body 連日投与群では nadir においても血小板数は保たれており減少は認められなかった. 両者では統計的に有意差は認められなかったが, 明らかな nadir の底

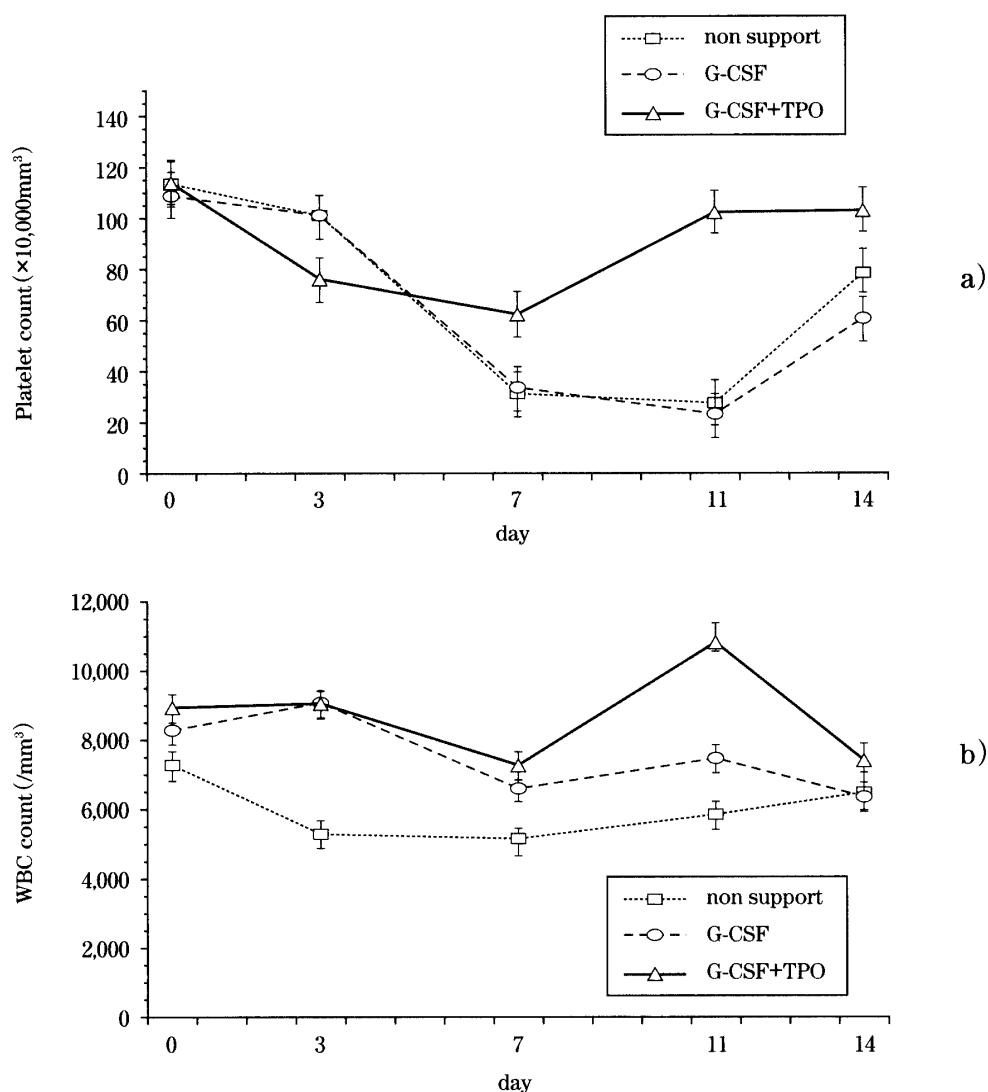


Fig. 8 Changes in platelet count and granulocyte count in rats with bone marrow suppression induced by the administration of paclitaxel 10mg/kg and CBDCA 70mg/kg.

a) At the nadir of the platelet count, an increase in the level was observed in the G-CSF + TPO group on day 11, $p < 0.01$ vs other group, $n=30$.

b) At the nadir of the granulocyte count, an increase in the granulocyte count was observed in the G-CSF + TPO group on day 7, showing a synergistic effect, $n=30$. All data are presented as the mean $\pm$ SD.

上げ効果が認められた (Fig. 6).

4. paclitaxel 20mg/kg + CBDCA 90mg/kg ラットにおいて non support 群では, 生存率は day 5 に0%, G-CSF 投与群では day 14に40%, G-CSF + TPO 投与群では70%であり有意差が認められた. paclitaxel 10mg/kg + CBDCA 70mg/kg ラットにおいては明らかな有意差は認められなかったが, G-CSF + TPO 投与群において90%の生存率を認めた (Fig. 7).

paclitaxel 10mg/kg + CBDCA 70mg/kg の 骨 髄抑制ラットの血小板数の nadir は day 11で non support 群・G-CSF 群において血小板数は約21~24%減少していたが, G-CSF + TPO 投与群においてその数は保たれており, 他の群との有意差が認められ, また明らかな nadir の底上げ効果も認められた (Fig. 8a).

顆粒球数の nadir は day 7で, 3者において有意差は認められなかったが, G-CSF + TPO 投与群において day 7以降増加を認め相乗的效果が認められた (Fig. 8b).

考 察

TPO の概念は1960年代~70年代にかけて発表されそれより30年以上を経て, TPO がクローニングされた^{1)~5)}. in vitro において巨核球系造血には単独でも巨核球コロニーの形成を成熟させる

Meg-CSF と, 単独では巨核球コロニー形成能はないものの Meg-CSF 活性を促進させたり, 巨核球の成熟を促進する Meg-POT の両者が作用するとされている (Fig. 9). TPO は従来の間接的増加因子としての IL-3, IL-11などのサイトカインとは異なり Meg-CSF, Meg-POT 両者の作用を有し巨核球前駆細胞から完全な巨核球分化さらに血小板様粒子の産生を促す能力があるとされている¹⁰⁾. 我々の実験でも TPO 添加で巨核球系細胞が大きさと数を増加し (Fig. 1) 偽足形成 (Fig. 2) するのを観察したが, 巨核球数増加は TPO の用量及び時間依存性である (Fig. 3). TPO は単独でも EPO, IL-6, G-CSF に比べ極めて高い Meg-CSF 活性をもつことを明らかにした (Fig. 4).

in vivo においてマウス腹腔内に TPO を投与すると血小板数は約4倍に上昇し, これは IL-6や IL-11が1.5倍程度しか上昇させる効果しかないことと対照的であると Kaushansky et al.によって報告¹¹⁾されて以来数々の TPO の検討が進んでいる. 本研究では CBDCA 投与及び paclitaxel + CBDCA 併用で惹起した骨髄抑制マウス及びラットは, TPO 投与下で血小板数減少の抑制 (Fig. 6, 8) と生存率の改善 (Fig. 7) を認め, 婦人科癌化学療法での TPO の臨床的応用の有効性を示した.

1995年第37回米国血液学会で正常骨髄機能を有

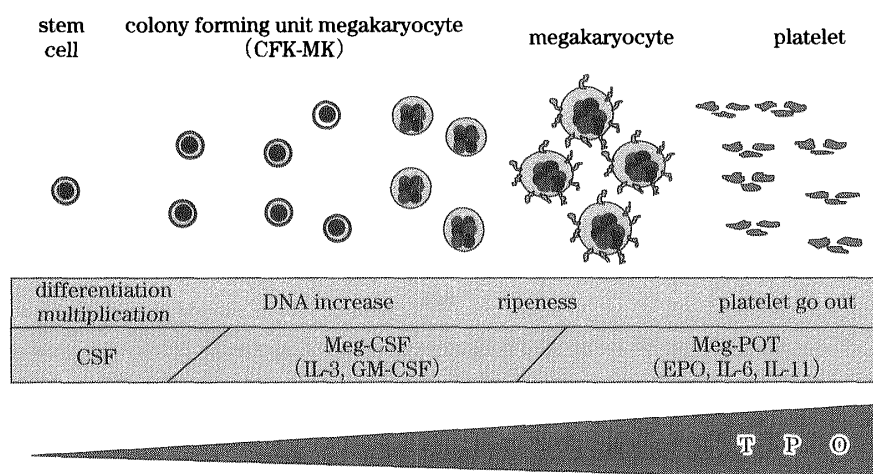


Fig. 9 Actions of cytokines and TPO in the differentiation of colony forming unit of megakaryocytes.

する進行癌患者（肺癌、腎臓癌、卵巣癌等）13例であるがヒトに対する TPO の投与効果が Bassar et al.によって初めて報告されたが¹²⁾、それによると TPO は IL-3, IL-6, IL-11などのサイトカインとは異なり、血中フィブリノーゲン濃度や体温の上昇, performance status や vital sign の変化を伴わずに血小板数を用量0.03~1.0 μ g/kg/day で約2~8倍に増加させる効果があることが明らかにされた。

Fanucchi et al.は化学療法後の肺癌患者を TPO 投与、非投与群に分け血小板増加作用を比較検討し、TPO 投与群では有意な血小板減少抑制及び回復促進作用が認められたと報告している¹³⁾。

Crawford et al.は肺癌患者の CBDCA, paclitaxel による化学療法後に TPO を投与し、血小板減少の軽減、血小板輸血量の減少、プロトコルどおりに化学療法を施行できた患者数の増加が認められたと報告している¹⁴⁾。

また、TPO と G-CSF の併用により化学療法後の血小板減少、顆粒球数減少を改善しようという試みが Harker et al.により報告されている¹⁵⁾。アカゲザルを用いた検討で、化学療法剤投与後に TPO 7日間単独投与後 G-CSF 14日間併用投与すると血小板数も顆粒球数も減少が認められなかった。

今後の問題点として血小板凝固能による影響や血栓形成の懸念があるが¹²⁾、TPO 投与下で産生された血小板は一般の血小板と同様の機能を有することも明らかにされており¹¹⁾¹⁶⁾¹⁷⁾、癌患者に対する TPO の臨床試験の結果では血小板凝集亢進作用は認められていない¹⁸⁾。また、TPO 投与後の副作用として自覚症状では紅斑、寝汗、振戦がみられたがいずれも軽度であり、表在性血栓性静脈炎、深部静脈血栓症の報告もあるが、自然に消退を認め¹²⁾¹³⁾、重篤な合併症は報告されていない。

婦人科癌化学療法は、paclitaxel, プラチナ製剤を中心とした combination chemotherapy, high dose chemotherapy また末梢血幹細胞輸血を併用した超大量化学療法により total cell kill を目指す時代に入ってきている。これらの化学療法による副作用として汎血球減少症が問題となっている

が、今日の臨床では血小板減少症に関しては血小板輸血しかなく、輸血による肝炎・抗体産生・GVHD の発生が問題となっている。しかし TPO の登場で他のサイトカインとの併用により癌化学療法の骨髄抑制を克服する可能性がより現実となりつつあり、副作用との戦いであった癌化学療法に極めて明るい希望がもてたと思われる。婦人科領域での TPO の研究及び臨床応用の報告はまだ発表されていないが、肺癌患者等婦人科化学療法と同様の regimen での報告はなされており¹⁴⁾今後、癌化学療法の rescue の regimen の一環となれば幸いである。

なお、本稿の要項は第51回日本産科婦人科学会学術講演会にて発表した。

文 献

1. Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuiper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kuramer JM, Bell LA, Sprecher CA, Blumberg H, Johnson R, Purnkard D, Ching AFT, 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 c-DNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 1994 ; 369 : 565—568
2. Kuter DJ, Rosenberg RD. Appearance of a megakaryocyte growth-promoting activity, megakaryopoietin, during acute thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* 1994 ; 84 : 1464—1472
3. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li Y-S, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S, Johnson MJ, Hsu R-Y, Parker VP, Suggs S, Sikurin JD, Merether LA, Clogston C, Hsu E, Hokom MM, Horunkohl A, Choi E, Pangerinan M, Sun Y, Mar V, Mc-Ninch J, Simonet L, Jacobsen F, Xie C, Shutter J, Chute H, Basu R, Selander L, Trolliger D, Sieu L, Padilla D, Torail G, Elliot G, Iumi R, Covey T, Crose J, Garcia A, Xu W, Del Castillo J, Biron J, Cole S, Hu MC-T, Pacifici R, Ponting I, Saris C, Wen D, Yung YP, Lin H, Bosselman 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
4. Miyazaki H, Kato T, Ogami K, Iwamatsu A, Shimada Y, Souma Y, Akahori H, Hori K, Kokubo A, Kudo Y, Maeda E, Kawamura K, Sudo T. Isola-

- tion and cloning of a novel human thrombopoietic factor. *Exp Hematol* 1994 ; 22 : 838
5. *de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Dabonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang W-J, Oles KJ, Hultgren B, Solberg LA, Goeddel DV, Eaton DL.* Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994 ; 369 : 533—538
 6. *Robert DL, Linda AG, Theda BD, Zuhair A, Albert TI.* Effects of microgravity and increased gravity on bone marrow of rats. *Aviat Space Environ Med* 1994 : 730—735
 7. *Donald M.* The cellular basis for enhancement interaction between stem cell factor and the colony stimulating factor. *Stem Cells* 1993 ; 11 : 1—11
 8. *Thomas JM, Ann MF, Myra LP, Laurie AM.* Therapeutic efficacy recombinant IL-6 alone and combined with recombinant human IL-3 in a nonhuman primate model of high-dose, Sublethal radiation induced marrow aplasia. *Blood* 1994 ; 84 : 2515—2522
 9. *Yamori T, Sato S, Chikazawa H, Kadota T.* Anti-tumor efficacy of paclitaxel against human lung cancer xenografts. *Jpn J Cancer Res* 1997 ; 88 : 1205—1210
 10. *Kaushansky K, Broudy VC, Lin N, Jorgensen MJ, McCarty J, Fox N, Zucker-Franklin D, Lofton-Day C.* Thrombopoietin, the Mpl ligand, is essential for full megakaryocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 3234—3239
 11. *Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, Fortom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, Roth GJ, Papayannpouou T, Foster DC.* Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 1994 ; 369 : 568—571
 12. *Basser RL, Rasko JEL, Cebon J, Green MD, Hussein S, Alt C, Menchaca D, Tomita D, Martty J.* Thrombopoietic effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu-MGDF) in patients with advanced cancer. *Lancet* 1996 ; 348 : 1279—1281
 13. *Fanucchi M, Glaspy J, Crawford J, Garust J, Figlin R, Sheridan W, Menchaca D, Tomita D, Ozer H, Harker.* Effects of polyethylene glycol conjugated recombinant human megakaryocyte growth and development factor on platelet counts after chemotherapy for lung cancer. *N Engl J MED* 1997 ; 336 : 404—409
 14. *Crawford J, Glaspy J, Belani C.* A randomized, placebo-controlled, blinded, dose scheduling trial of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (PEG-RHUMGDF) with filgrastim support in non-small cell lung cancer patients treated with paclitaxel and carboplatin during multiple cycles of chemotherapy. *Proc ASCO* 1988 ; 17 : 73—80
 15. *Harker L, Marzec UM, Kelly AB, Cheung E, Tomer A, Nichol JL, Hanson SR, Stead RB.* Prevention of thrombocytopenia and neutropenia in a non human primate model of marrow suppressive chemotherapy by combining pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor and recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Blood* 1997 ; 89 : 155—165
 16. *Kobayashi E, Laver JH, Kato T, Miyazaki H, Ogawa M.* Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cell in synergy with steel factor and/or interleukin-3. *Blood* 1996 ; 88 : 429—436
 17. *Debili N, Wendling F, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Hunt P, Vainchenker W.* The Mpl-receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets. *Blood* 1995 ; 85 : 391—401
 18. *O'Malley CJ, Rasko JEJ, Basser RL, McGrath KM, Cebon J, Grigg AP, Hopkins W, Cohen B, O'Byrne J, Green MD.* Administration of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor to humans stimulates the production of functional platelets that show no evidence of in vivo activation. *Blood* 1996 ; 88 : 3288—3298
(No. 8104 平11・9・3受付, 平12・3・16採用)