

総 説

トロンボポエチンの将来展望

宮崎 洋

キリンビール(株) 医薬事業本部

FUTURE PROSPECT OF THROMBOPOIETIN

Hiroshi Miyazaki

Key words : thrombopoietin, platelet, megakaryocyte, PEG-MGDF

はじめに

トロンボポエチン(thrombopoietin ; TPO)は血小板産生を促進する主要な造血因子である。1994年に筆者らと米国の3つのグループがそれぞれ独自の方法でTPOのクローニングに成功してから6年が経過した^{1)~5)}。クローニング以降に活発に行われた基礎研究によってTPOの造血系に対する作用、分子構造、産生調節機構、シグナル伝達機構などについてさまざまな基本的知見が得られ、TPOに関する理解が急速に進んだ。並行してTPOの医薬品化を目指して遺伝子組換え型因子の臨床試験が進められてきた。開発型の1つは、大腸菌で作製した組換えヒトTPOの活性領域(recombinant human megakaryocyte growth and development factor, rHuMGDF)をポリエチレングリコール(polyethylene glycol ; PEG)で化学修飾してin vivo活性を向上させたPEG-rHuMGDFである。本稿では、in vitroおよび動物実験で得られた結果をベースにして、これまでに報告された臨床試験成績も考慮しながら、PEG-rHuMGDFの血小板減少症治療薬としてのポテンシャルについて考察してみたい。

TPOの構造

ヒトTPOcDNA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(図1)⁵⁾。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レセプター(c-MPL)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。MGDFはこのN末端側ドメインを大腸菌で作製した組換え型因子である。また、N末端側ドメインは赤血球増多因子であるエリスロポエチン(erythropoietin ; EPO)と最も高いホモロジーを示す。一方、C末端側ドメインは6つのすべて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TPOcDNA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、ヒトの体内で産生されるTPOは糖鎖を有しており、おそらく全長サイズであることが明らかになっている⁶⁾。

TPOの生物活性

(i) 巨核球-血小板系への作用

図2に示すように、造血幹細胞から派生する巨核球系前駆細胞(colony-forming unit of megakaryocyte ; CFU-MK)は細胞分裂を行いながら未熟な巨核球へと分化し、未熟巨核球は細胞分裂せずに核の倍数性(ploidy)を増加させ(核が2nから4n, 8n, 16n, 32n, 64nとふえる)、細胞質成熟を遂げる。In vitroにおいて成熟巨核球はさらに細胞質が細長く伸展したproplateletへと劇的に形態を変え、さらに培養を継続すると、pro-

においては、TPO は巨核球コロニー刺激因子として CFU-MK を刺激し、巨核球コロニー形成を誘導する。その活性はインターロイキン-3 (interleukin-3 ; IL-3) や幹細胞因子 (stem cell factor ; SCF) の存在下で増強される⁷⁾。TPO の巨核球コロニー刺激活性は、主に GpIIb/IIIa (CD41) の発現量が多い分化後期の CFU-MK (GpIIb/IIIa⁺ CFU-MK) に対して発揮される⁸⁾。液体培地の中でラットの骨髓から精製した GpIIb/IIIa⁺CFU-MK を TPO 存在下に培養すると、ploidy が増加した大型の成熟巨核球が数多く生産され (256n の巨核球まで観察される)、一部の巨核球は proplatelet にまで変化する⁹⁾。一方、成熟巨核球に TPO を添加しても proplatelet の形成は促進されるどころかむしろ抑制される。すなわち、血小板産生を促進する TPO の作用は CFU-MK レベルで発揮される⁹⁾。

ヒト CFU-MK の TPO に対する反応性はその由来 (骨髓、末梢血、臍帯血) によって異なる。CD34⁺細胞画分に含まれる TPO に反応性の CFU-MK の割合は臍帯血で高く、臍帯血の CFU-MK からは TPO 刺激で数多くの巨核球から構成される大型のコロニーが形成される¹⁰⁾。つまり、臍帯血の CFU-MK は TPO に対して高い増殖能を示す。一方、骨髓や末梢血の CFU-MK からは TPO の刺激で小型の巨核球コロニーが形成される。また、TPO 存在下の培養で臍帯血の CFU-MK からは比較的 ploidy の低い巨核球が生成され、骨髓や末梢血の CFU-MK からは ploidy の高い巨核球が生成される¹⁰⁾。Proplatelet の形成能を調べると、臍帯血の CFU-MK が TPO 刺激を受けてから proplatelet へ分化するまでには末梢血の CFU-MK よりも長い培養期間が必要である。この現象は臍帯血移植後の血小板回復の遅延を説明しているかもしれない。

(ii) 他の血球系への作用

TPO は単独では前期赤芽球系前駆細胞 (burst-forming unit of erythroid ; BFU-E) や後期赤芽球系前駆細胞 (colony-forming unit of erythroid ; CFU-E) への増殖刺激は認められないが、EPO と協同してこれらの赤芽球系前駆細胞の増殖、分

化を促進する¹¹⁾。TPO はさらに未分化造血前駆細胞、造血幹細胞へも作用することが明らかになっている。たとえば、SCF, IL-3, あるいは flk2/flt3 リガンド (flk2/flt3 ligand ; FL) の共存下に TPO は造血幹細胞を含むヒト骨髓 CD34⁺/c-kit^{low}/CD38^{neg/low} 画分からさまざまな造血前駆細胞を誘導する¹²⁾。また、TPO は SCF や IL-3 と協同して休止期の造血幹細胞を細胞周期へと導く。このような in vitro の実験から TPO レセプターである c-MPL が造血幹細胞に発現していることが示唆されるが、実際、造血幹細胞画分から抗 c-MPL 抗体を用いて分離した c-MPL⁺画分は c-MPL⁻画分に比べて高い長期骨髓再構築能を有することが明らかになっている¹³⁾。加えて、最近発見された CD34^{neg/low} の造血幹細胞にも c-MPL の発現が認められている。また、c-MPL ノックアウトマウスでは造血前駆細胞だけでなく、長期骨髓再構築能を示す造血幹細胞も著明に減少している¹⁴⁾。このような結果から、TPO が造血幹細胞の制御に深く関与している可能性が考えられる。

正常動物における PEG-rHuMGDF の作用

正常動物において PEG-rHuMGDF は PEG で修飾していない rHuMGDF に比べてはるかに強い血小板増加作用を示す。これは PEG が付加することによって rHuMGDF の血中滞留時間が延長したことに起因する。正常マウスへ PEG-rHuMGDF を投与すると、血小板の動きに先立ってまず骨髓巨核球のサイズ、ploidy、細胞数が一過性に増加し、その後に血小板の上昇が認められる¹⁵⁾。すなわち、PEG-rHuMGDF によって骨髓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される。PEG-rHuMGDF によって産生された血小板は形態的にも機能的にも正常である。PEG-rHuMGDF 投与で骨髓や脾臓においては CFU-MK だけでなく、BFU-E、顆粒球/マクロファージ系前駆細胞 (colony-forming unit of granulocyte/macrophage ; CFU-GM)、多分化能を示す未分化前駆細胞が増加するが、末梢の赤血球や白血球の変化はほとんど認められない¹⁵⁾。脾臓における前駆細胞の増加は骨髓で増幅した前駆細胞の末梢への移行を示唆しているが、実際に

PEG-rHuMGDF は造血前駆細胞や幹細胞を末梢血中へ動員させる作用を持っている¹⁶⁾その効果は顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor ; G-CSF) や抗癌剤 cyclophosphamide との組合せで増強される。このような結果から、末梢血造血幹細胞のハーベストにこれらの薬剤と PEG-rHuMGDF の併用が有用であることが示唆される。

血小板減少動物における PEG-rHuMGDF の効果

化学療法や放射線照射による骨髄抑制に伴う血小板減少を PEG-rHuMGDF は著明に改善する^{17)~19)}。すなわち、マウスに骨髄抑制処置を施した翌日から PEG-rHuMGDF を連日投与すると、血小板 nadir が軽減され、血小板回復が促進される¹⁷⁾¹⁹⁾。また、多くの骨髄抑制動物モデルにおいて好中球減少、貧血も改善される。末梢血中の各種血球の回復に先立って、骨髄では CFU-MK や巨核球の回復、また多能性造血前駆細胞、BFU-E、CFU-GM の回復が促進される¹⁸⁾。このように PEG-rHuMGDF の効果が巨核球・血小板系だけでなく他の系統へも広範囲に渡っているメカニズムは不明であるが、in vitro での実験結果を考慮すると、in vivo においても投与された PEG-rHuMGDF と他の内因性サイトカインが協同して造血幹細胞や各種造血前駆細胞の増殖、分化を刺激した可能性が考えられる。貧血改善を例に挙げれば、PEG-rHuMGDF によって増幅した赤芽球系前駆細胞が貧血に伴って増量した EPO に反応し、赤血球回復が促進されたと考えられる。

骨髄抑制処置を施してから PEG-rHuMGDF の投与開始が遅れるほどその効果は減弱するので、骨髄抑制処置後速やかに投与を開始すれば PEG-rHuMGDF の十分な血小板改善効果が得られる¹⁸⁾¹⁹⁾。これは、骨髄抑制後の早期であれば、CFU-MK などの PEG-rHuMGDF の標的となる前駆細胞がより多く生き残っているためと考えられる。PEG-rHuMGDF の効果でもう 1 つ特徴的なことは連日投与でなくても、ある程度投与量を多くすれば単回投与でも十分に効果があるということである¹⁸⁾。このような持続性の効果は、PEG-rHuMGDF の血中半減期が長いことに関連して

いると考えられる。

マウスを用いた骨髄移植や末梢血造血幹細胞移植モデルにおいて、移植後の PEG-rHuMGDF の投与では血小板 nadir の軽減はほとんど認められないが、血小板回復が促進され、血小板減少期間が短縮される²⁰⁾。また、筆者らの最近の検討ではマウス臍帯血移植モデルでは臨床に類似して血小板減少が遷延するが、PEG-rHuMGDF によって血小板回復が促進されることがわかっている。

PEG-rHuMGDF の効果は他の血小板減少動物モデルにおいても調べられている。2 種類の系統のマウスをかけ合わせて作製される (NZWxBXSB) F₁♂マウスはヒトの特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura ; ITP) によく似た病気を自然発症し、抗血小板抗体の発現によって極度の血小板減少に陥る。しかし、そのような血小板が減少したマウスでは骨髄の造血は影響を受けていないので、PEG-rHuMGDF を投与すると巨核球造血が促進され、著明に血小板減少が改善される²¹⁾。したがって、PEG-rHuMGDF が ITP 患者の血小板回復に有用であることが示唆される。また、human immunodeficiency virus (HIV) を感染させて慢性の血小板減少を発症させたチンパンジーにおいて PEG-rHuMGDF は骨髄巨核球、血小板を増加させる²²⁾。この結果を受けて実施された HIV 患者を対象とした臨床試験において、PEG-rHuMGDF の血小板回復効果が認められている。

PEG-rHuMGDF の clinical potential

これまでに報告された固型癌や急性骨髄性白血病患者を対象とした臨床試験を振り返って見ると、化学療法後に行われた PEG-rHuMGDF の皮下投与では、生物活性は認められたものの血小板減少改善効果はわずかであった^{23)~25)}。上記した動物実験の結果を考慮すると、PEG-rHuMGDF の化学療法後の適用においては重篤な血小板減少になる前の投与開始が有効と考えられ、化学療法にオーバーラップした投与やさらには化学療法前の投与など、有効な投与プロトコルの探求が今後の重要な検討課題と思われる。

造血幹細胞移植後の使用に関しては、自己骨髄

移植後の PEG-rHuMGDF の皮下投与で有意な血小板減少期間の短縮が認められている（中間成績）。しかし、自己末梢血幹細胞移植の移植前、あるいは移植後の PEG-rHuMGDF の皮下投与では血小板減少改善効果は認められていない。これは、そもそも末梢血幹細胞移植では血小板回復が早いためかもしれない。一方、今後ますます盛んになると予想される臍帯血移植では血小板回復の遅延が問題となっており、その解決手段として PEG-rHuMGDF の投与が考えられる。筆者らの臍帯血移植マウスモデルでの検討結果はこの期待を支持している。また、臍帯血を用いる場合には移植細胞数に限りのあることが問題であるが、PEG-rHuMGDF を始めとする各種サイトカインの組み合わせで臍帯血に含まれる造血幹細胞、造血前駆細胞を *ex vivo* で増幅できることが明らかになっており、今後、そのように増幅させた臍帯血の移植への応用が検討されると思われる。

慢性の血小板減少を伴う血液疾患も PEG-rHuMGDF の対象と考えられる。PEG-rHuMGDF の作用メカニズムや ITP モデルマウスでの結果を考慮すると、骨髄が低形成でない ITP 患者においては PEG-rHuMGDF による血小板減少改善効果が期待される。また、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群に関しては、*in vitro* の実験で一部の患者から採取した骨髄細胞に PEG-rHuMGDF を添加して培養すると巨核球の増殖が認められることから有用性が示唆されている。ただ、血小板輸血を必要とするような重度の血小板減少症では PEG-rHuMGDF の標的細胞が激減していると考えられ、そのような患者で PEG-rHuMGDF の投与が有効かどうかのポイントと思われる。

ところで、すでに医薬品になっている EPO や G-CSF とは異なり、TPO には分子に内在する性質としての抗原性という問題があり、PEG-rHuMGDF の開発に大きな妨げとなっている。しかし、筆者らが動物実験で抗原性を解析した結果から、静脈内投与では皮下投与に比べてはるかに抗原性が低いことが明らかになっており、現在、PEG-rHuMGDF の臨床試験は静脈内投与で進められている。

おわりに

PEG-rHuMGDF の臨床上の有用性は、血小板輸血を代替できること、加えて血小板減少に伴う出血症状を改善することにあると考えられる。今後、そのような観点から、抗原性に関する安全性に十分に配慮しながら、上記したさまざまな領域において PEG-rHuMGDF の有効性が評価されることになるう。

文 献

- 1) de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, et al : Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-MPL ligand. *Nature*, 369 : 533—538, 1994.
- 2) Lok S, Kaushansky K, Holly RD, et al : Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production *in vivo*. *Nature*, 369 : 565—568, 1994.
- 3) Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, et al : Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor MPL. *Cell* 77 : 1117—1124, 1994.
- 4) Sohma Y, Akahori H, Seki N, et al : Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett*, 353 : 57—61, 1994.
- 5) Kato T, Ogami K, Shimada Y, et al : Purification and characterization of thrombopoietin. *J. Biochem*, 118 : 229—236, 1995.
- 6) Matsumoto A, Tahara T, Morita H, et al : Characterization of native human thrombopoietin in the blood of normal individuals and patients with hematological disorders. *Thromb. Haemost*, 82 : 24—29, 1999.
- 7) Broudy VC, Lin, NL, Kaushansky K : Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy *in vitro*. *Blood*, 85 : 1719—1726, 1995.
- 8) Kato T, Horie K, Hagiwara T, et al : GpIIb/IIIa⁺ subpopulation of rat megakaryocyte progenitor cells exhibits high responsiveness to human thrombopoietin. *Exp. Hematol*, 24 : 1209—1214, 1996.
- 9) Horie K, Miyazaki H, Hagiwara T, et al : Action of thrombopoietin at the megakaryocyte progenitor level is critical for the subsequent proplatelet production. *Exp. Hematol*, 25 : 169—176, 1997.
- 10) Hagiwara T, Kodama Y, Horie K, et al : Prolifera-

- tive properties of human umbilical cord blood megakaryocyte progenitor cells to human thrombopoietin. *Exp. Hematol*, 26 : 228—235, 1998.
- 11) Kobayashi M, Laver JH, Kato T, et al : Recombinant human thrombopoietin (Mpl ligand) enhances proliferation of erythroid progenitors. *Blood*, 86 : 2494—2499, 1995.
 - 12) Kobayashi M, Laver JH, Kato T, et al : Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin-3. *Blood*, 88 : 429—436, 1996.
 - 13) Solar GP, Kerr WG, Zeigler FC, et al : Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood*, 92 : 4—10, 1998.
 - 14) Alexander WS, Roberts AW, Nicola NA, et al : Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietin receptor c-Mpl. *Blood*, 87 : 2162—2170, 1996.
 - 15) Kabaya K, Akahori H, Shibuya K, et al : In vivo effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor on hematopoiesis in normal mice. *Stem Cells*, 14 : 651—660, 1996.
 - 16) Torii Y, Nitta Y, Akahori H, et al : Mobilization of primitive haemopoietic progenitor cells and stem cells with long-term repopulating ability into peripheral blood in mice by pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor. *Br. J. Haematol*, 103 : 1172—1180, 1998.
 - 17) Akahori H, Shibuya K, Ozai M, et al : Effect of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor on thrombocytopenia induced by a new myelosuppressive chemotherapy regimen in mice. *Stem Cells*, 14 : 678—689, 1996.
 - 18) Shibuya K, Akahori H, Takahashi K, et al : Multilineage hematopoietic recovery by a single injection of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor in myelosuppressed mice. *Blood*, 91 : 37—45, 1998.
 - 19) Akahori H, Ozai M, Ida M, et al : Further examination of various administration protocols of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor on thrombocytopenia in myelosuppressed mice. *Ther. Apher*, 2 : 58—64, 1998.
 - 20) Kabaya K, Shibuya K, Torii Y, et al : Improvement of thrombocytopenia following bone marrow transplantation by pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor in mice. *Bone Marrow Transplant*, 18 : 1035—1041, 1996.
 - 21) Shibuya K, Akahori H, Tahara E, et al : Pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor effectively improves thrombocytopenia in a murine model of idiopathic thrombocytopenic purpura, (NZW x BXSB) F1. *Blood*, 92 (suppl 1) : 376, 1998.
 - 22) Harker LA, Marzec UM, Novembre F, et al : Treatment of thrombocytopenia in chimpanzees infected with human immunodeficiency virus by pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor. *Blood*, 91 : 4427—4433, 1998.
 - 23) Bassier RL, Rasko JEJ, Clarke K, et al : 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*, 89 : 3118—3128, 1997.
 - 24) Fanucchi M, Glaspy J, Crawford J, et al : Effects of polyethylene glycol-conjugated recombinant human megakaryocyte growth and development factor on platelet counts after chemotherapy for lung cancer. *N. Engl. J. Med*, 336 : 404—409, 1997.
 - 25) Archimbaud E, Ottelman OG, Liu Yin JA, et al : A randomized, double-blind, placebo-controlled study with pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHuMGDF) as an adjunct to chemotherapy for adults with de novo acute myeloid leukemia. *Blood*, 94 : 3694—3701, 1999.
-