

## ヒト巨核球・血小板造血に対する液晶関連化合物の作用

寺澤 梨絵,<sup>a</sup> 柏倉 幾郎,<sup>\*,b</sup> 吉澤 篤<sup>a</sup>

## Effects of Liquid Crystal-related Compounds on Human Megakaryocytopoiesis and Thrombopoiesis

Rie TERASAWA,<sup>a</sup> Ikuo KASHIWAKURA,<sup>\*,b</sup> and Atsushi YOSHIZAWA<sup>a</sup><sup>a</sup>Department of Materials Science and Technology, Faculty of Science and Technology, Hirosaki University, 3 Bunkyo-cho, Hirosaki City 036-8561, Japan, and <sup>b</sup>Department of Radiological Technology, Hirosaki University School of Health Sciences, 66-1 Hon-cho, Hirosaki City 036-8564, Japan

(Received January 22, 2006; Accepted March 28, 2006; Published online April 10, 2006)

In the present study, the effects of liquid crystal-related compounds on the megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis were evaluated *in vitro* using CD34<sup>+</sup> cells prepared from human placental and umbilical cord blood (CB). About 20 kinds of compounds were tested for their effects on the clonal growth of CB CD34<sup>+</sup> megakaryocytic progenitor cells (CFU-Meg) in plasma clot culture. The compounds, dissolved in DMSO, were added to the cultures within a concentration range of 10–100 nM. When used alone, none of the compounds supported the clonal growth of CFU-Meg. However, when thrombopoietin (TPO) was used as a growth factor, three compounds increased CFU-Meg clonal growth significantly, producing approximately 1.3–1.4 fold increases in the total number of megakaryocyte colonies in comparison with the control. These compounds promoted mainly mature CFU-Meg-derived small colonies, suggesting that their target is relatively mature CFU-Meg. These effective compounds were examined in liquid culture supplemented with TPO alone for 14 days. Although there was no evident promotion of the total number of cells harvested from the culture, two compounds suppressed cell growth significantly. Only one compound enhanced the generation of CFU-Meg in the harvested cells. Although these results do not indicate a strong correlation between the chemical structure of each compound and biological effectiveness, the incorporation of phenylpyridine and phenylpyrimidine and binding of a hydroxyl residue into the structure may play an important role in the activity. Thus, liquid crystal-related compounds whose biological action was previously unknown have been shown to act as regulators of hematopoiesis.

**Key words**—liquid crystal-related compounds; megakaryocytopoiesis; thrombopoiesis; CD34<sup>+</sup> cells

## 緒 論

造血システムは、一定の寿命を有する各種血球を絶えず産生する再生能の高い系であり、多能性造血幹細胞の自己複製能と多分化能に支えられている。<sup>1)</sup> このシステムは、サイトカインと呼ばれる糖タンパク質によって制御され、特定の血球系へ方向付けられた造血前駆細胞を経て、各種血球が産生される。<sup>2)</sup> このうち血液凝固に働き、血管壁の修復を助ける血小板は、造血幹細胞から巨核球前駆細胞 (colony-forming unit megakaryocyte, CFU-Meg) を経て産生された巨核球から産生放出される。<sup>3)</sup> この

とき巨核球は、核の多倍体化を伴いながら成熟し、最終的に自己崩壊した結果、血小板を産生放出する。これまで巨核球・血小板産生の調節には、interleukin-3, interleukin-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, erythropoietin 等の関与が報告されてきたがその調節機序は不十分であった。<sup>4)</sup> 1994年に巨核球・血小板産生を促進する主要な因子として thrombopoietin (TPO) がクローニングされ、<sup>5–7)</sup> 様々な基本的知見の解明とともに臨床治験も開始されたが、治療薬としての臨床応用には多くの問題が残されている。<sup>8)</sup> したがって、現在血小板減少症に対する治療薬はなく、濃厚血小板製剤の輸注療法に頼っている。また、医療応用されているサイトカインは遺伝子組換え糖タンパク質であるため、人体に投与した際の抗原性や、医療コストがしばしば問題と

<sup>a</sup>弘前大学工学部物質理工学機能素材工学講座、<sup>b</sup>弘前大学医学部保健学科医用放射線科学講座

\*e-mail: ikashi@cc.hirosaki-u.ac.jp

なる。非タンパク質性低分子化合物による血小板造血の刺激が可能になれば、これらの問題解決に繋がることが期待される。

疎水基と親水基の両方を有する両親媒性化合物は、水存在下で溶液の濃度に依存してリオトロピック液晶を形成する。生態系において形成されている組織の多くは、リオトロピック液晶構造を有し、外部からの刺激に敏感に応答するため、生態系における選択的なエネルギー及び情報の伝達との関係に関心が集まっている。<sup>9)</sup> 本研究では、これまで生物・薬理作用に関しては報告がない多彩な化合物からなる液晶関連化合物の新たな機能評価を行う目的で、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を用いて、巨核球・

血小板造血に対する作用について検討を行った。

## 実験方法

**1. 試料及び試薬** 本研究では、Table 1 に示した液晶関連化合物のうち、No. 1, 3, 4, 5, 6, 12, 17 はみどり化学株 (Tokyo, Japan) より入手した。No. 15 は BDH Chemicals Ltd. 製のものを関東化学株 (Tokyo, Japan) より購入し、それ以外の化合物は、市販の原料を用いて株ジャパンエナジー (Tokyo, Japan) にて合成されたものを用いた。化合物は dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解し、サンプルとした。遺伝子組換え型ヒト thrombopoietin (TPO) 及び遺伝子組換え型ヒト stem cell factor

Table 1. Structural Formula of Liquid Crystal-related Compounds

Sample number	Structural formula	Sample number	Structural formula
No. 1		No. 10	
No. 2		No. 11	
No. 3		No. 12	
No. 4		No. 13	
No. 5		No. 14	
No. 6		No. 15	
No. 7		No. 16	
No. 8		No. 17	
No. 9		No. 18	

(SCF) は, Biosource (Tokyo, Japan) より購入した.

蛍光抗体試薬は, Beckman Coulter Immunotech のモノクローナル抗体 Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human CD34 (FITC-CD34), FITC-CD41, FITC-CD42a を使用した.

**2. 臍帯血採取法** 母親からインフォームド・コンセントが得られた正期産, 正常妊娠分娩を対象とした. 富士助産所 (五所川原市) にて娩出後の胎盤及び臍帯から, 抗凝固剤 citrate-phosphate-dextrose 液入りの採血バッグ (CBC-20, ニッショー, 大阪) を用いて採取した.

### 3. CD34 陽性細胞の分離

**3-1. Light-Density Cells 回収法** 採取後 48 時間以内の臍帯血を, 4°C, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)/phosphate buffered saline (PBS) (-) で約 2 倍に希釈し, Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) 15 ml 上に希釈臍帯血 20 ml を重層し, 遠心分離 (1600 rpm, 30 min) した. Buffy-coat を回収 (1 本当たり 20 ml 以下) し, 4°C, 5 mM EDTA/PBS (-) で 50 ml まで希釈した. 転倒混和後, 洗浄遠心 (4°C, 900 rpm, 10 min) により, 血小板を除去した. 4°C, 5 mM EDTA/PBS (-) で再懸濁後, チュルク液により細胞数をカウントした.

**3-2. CD34 陽性細胞分離法** 得られた light-density 細胞より, MACS 磁気ビーズカラム法 (Miltenyi Biotec, Germany) により CD34 陽性細胞を分離・精製した. Light-density 細胞懸濁液にブロッキング試薬, CD34 抗体を添加し, 4°C で 15 分間インキュベートした. 0.5% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) -5 mM EDTA-PBS (-) を用いて洗浄・遠心 (4°C, 1200 rpm, 5 min) 後, マイクロビーズ溶液を添加し, インキュベート (4°C, 15 min) した. 終了後, 同様に洗浄, 再懸濁し磁気ビーズカラムにかけ非吸着細胞を溶出した. プランジャーを用いて吸着細胞を回収し, 再度, 新しいカラムを用いて非吸着細胞を除去した. カラムに吸着, 回収された細胞を CD34 陽性細胞とした. トリパンプルを用い血球算定盤にて, 生細胞数を計数した.

**4. CFU-Meg の測定** CFU-Meg の測定は, human AB platelet poor plasma (ヒト血漿) を用い

た plasma clot 法で行った. 100 U/ml ペニシリン (Gibco BRL, NY), 100 µg/ml ストレプトマイシン (Gibco BRL), 1 mM MEM ピルビン酸ナトリウム (Gibco BRL), 1% MEM ビタミン混液 (Gibco BRL), 1% MEM nonessential アミノ酸 (Sigma, MO),  $1 \times 10^{-3}$  M チオグリセロール (Sigma), 0.2 mg/ml L-アスパラギン (和光純薬株, 東京), 7.4 mg/ml 塩化カルシウム (和光純薬株), 0.2% BSA (Sigma) を含むイスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM, Gibco BRL) 混液に, 造血因子として 50 ng/ml TPO, 2% アプロチニン (Trasyol, バイエル薬品株, 大阪) 及び 10—15% ヒト血漿を含む培地に, CD34 陽性細胞を  $1 \times 10^3$  個/ml になるように懸濁した. この混合液を, 24 wells のプレート (Falcon, Becton Dickinson Labware, NJ) に 0.3 ml/well になるように播き, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下 11—12 日間培養した. Sample 溶液は液量として 0.1% 加え, コントロールには DMSO を用いた. 培養後, プレートを冷却 (4°C, 30 min) し, 各 well に冷 acetone-methanol (2:1) 溶液 0.6 ml/well を添加し, 15 分間固定した. 溶液を捨て, 室温保存の固定液 0.6 ml/well を添加し, 10 分間固定した. 溶液を捨て, 一度精製水で洗浄後, さらに精製水を添加し, 5 分間洗浄した. ドラフト内で風乾後, 染色まで -20°C で保存した.

**5. 巨核球コロニー染色法** 固定処理後の各 well に, 0.5% BSA-PBS 0.4 ml/well を加え, 10 分後, 溶液を捨て, 0.5% BSA-PBS 溶液で 120—150 倍に希釈した FITC-CD41 抗体溶液 0.2 ml/well を添加後, 室温遮光下で 60 分間インキュベートした. 抗体溶液を捨て, PBS で 2 回洗浄した. 0.1% クエン酸ナトリウム溶液で 3000 倍に希釈調製した propidium iodide (PI, Sigma) 溶液 0.2 ml/well を添加し, 2 分間インキュベートした. PI 溶液を捨て, PBS と精製水で, 各 1 回ずつ洗浄し, 室温遮光下にて乾燥させた. 処理後, 蛍光顕微鏡 (Olympus, 東京) 下, FITC 陽性細胞 3 個以上 50 個未満の小型コロニーと 50 個以上の大型コロニーをそれぞれ計数した.

**6. 液体培養法** CD34 陽性細胞  $2—3 \times 10^3$  個/ml を, TPO 50 ng/ml 及び 2% ヒト血清 (コスモ・バイオ, 東京) を含む IMDM 混液に懸濁し, 24 wells のプレートに 0.5 ml/well になるように播き,

37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下 13—14 日間培養した。培養後、細胞を回収し、トリパンブルー法を用いて生細胞数を計数した。

**7. 免疫学的表面抗原の測定法** 培養前の CD34 陽性細胞及び液体培養後回収された細胞の懸濁液を、それぞれ FITC-CD34, FITC-CD42a の抗体溶液に添加し、暗所室温にて 20 分間インキュベート後、フローサイトメーター (Beckman-Coulter, Epics XL, Fullerton, CA) を用いて表面抗原の解析を行った。

**8. 統計処理** 得られた各群の結果より棄却検定を行い、5% レベルにおいて棄却した。コントロール群と処理群間の有意差検定は、Student の *t* 検定で行った。

## 結 果

**1. CFU-Meg 由来巨核球コロニー形成に対する液晶関連化合物の作用** 臍帯血 CD34 陽性細胞を、TPO 存在下 plasma clot 法により培養を行い、形成される巨核球コロニーに対する液晶関連化合物の作用を検討した (Figs. 1, 2)。化合物濃度 10 nM においては (Fig. 1), No. 4, 11 の化合物が、コントロールに比べ 1.27 倍及び 1.33 倍と有意に巨核球コロニーを増加させた。また、100 nM では (Fig. 2), No. 8 の化合物で、1.44 倍と有意なコロニー数の増加が認められた。データには示していないが、1 nM では、いずれの化合物においてもコロニー数に有意な変化は観察されなかった。このとき、TPO 非存在下ではコロニーは形成されず、またいずれの化合物単独でもコロニー形成を支持しなかった。

次に、形成された巨核球コロニーについて、構成細胞数の違いより、未熟 CFU-Meg 由来の大型巨核球コロニーと成熟 CFU-Meg 由来の小型巨核球コロニーにそれぞれ分類して比較した (Tables 2, 3)。未熟 CFU-Meg 由来の大型巨核球コロニー形成に対して (Table 2), いずれの化合物もコントロールに比べて有意な増加を示さなかったが、10 nM における No. 16, 18 及び 100 nM における No. 12, 17 の化合物において有意な低下が観察された。一方、成熟 CFU-Meg 由来の小型巨核球コロニーに対して (Table 3), 10 nM では、No. 3, 6, 7, 11 及び 14 の化合物が、コントロールに比べ、1.61 倍, 1.50 倍, 1.75 倍, 1.69 倍及び 1.18 倍と有意に巨核球コロ

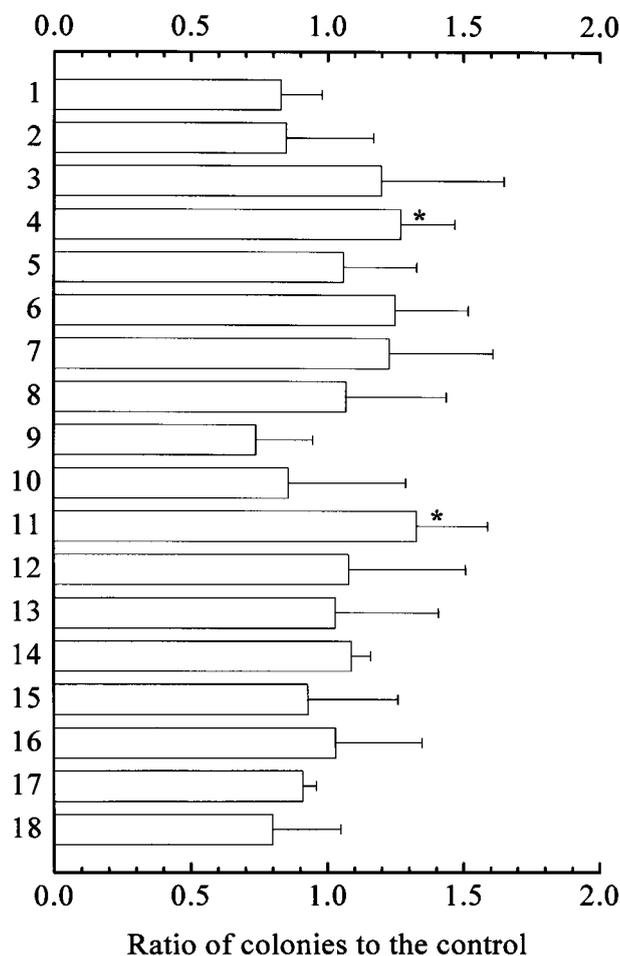


Fig. 1. Effects of Liquid Crystal-related Compounds (10 nM) on the Clonal Growth of CB CD34<sup>+</sup> CFU-Meg

Purified CB CD34<sup>+</sup> cells ( $1 \times 10^3$  cells/ml) were assayed for CFU-Meg by plasma clot culture containing 10—15% human platelet-poor AB plasma with TPO (50 ng/ml) plus 10 nM each compound. Each value was shown by mean  $\pm$  S.D. of 3—10 separate experiments. \* $p < 0.05$  compared to TPO alone by Student's *t*-test.

ニーを増加させていた。また、100 nM では、No. 3, 4, 8, 11, 12, 14 及び 17 の化合物において、それぞれ、1.38 倍, 1.29 倍, 1.66 倍, 1.50 倍, 1.54 倍, 1.69 倍及び 1.39 倍と小型巨核球コロニーの有意な増加が認められた。

## 2. 液晶関連化合物の液体培養における作用

CFU-Meg 由来コロニー形成を有意に促進した No. 4, 8, 11 の化合物について、その作用をさらに詳しく検討する目的で、液体培養を行った。14 日間培養後、細胞を回収し、トリパンブルーにより生細胞数を計数した。その結果、コントロールでは細胞数が培養開始時の 123 倍に有意に増加したのに対し、No. 8 及び No. 11 の添加で細胞数は 68 倍及び 110 倍とコントロールに及ばず、コントロールに比

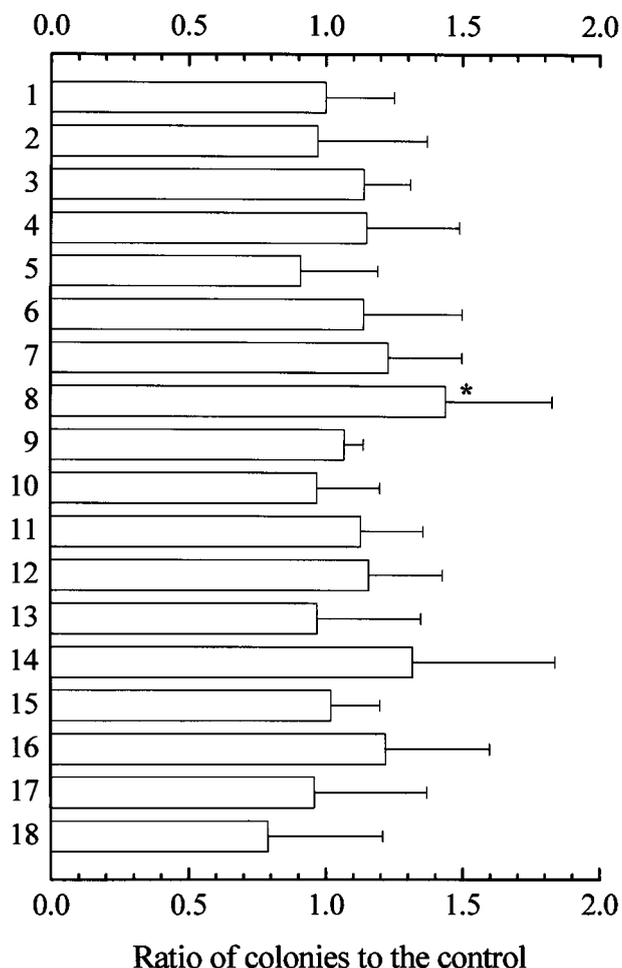


Fig. 2. Effects of Liquid Crystal-related Compounds (100 nM) on the Clonal Growth of CB CD34<sup>+</sup> CFU-Meg

Purified CB CD34<sup>+</sup> cells (1 × 10<sup>3</sup> cells/ml) were assayed for CFU-Meg by plasma clot culture containing 10–15% human platelet-poor AB plasma with TPO (50 ng/ml) plus 100 nM each compound. Each value was shown by mean ± S.D. of 3–7 separate experiments. \**p* < 0.05 compared to TPO alone by Student's *t*-test.

べて有意な抑制を示した (Fig. 3). このとき回収された細胞中の CD34 陽性細胞数は培養開始時の 92% から 0.3–0.5% と急激に低下するが, コントロールと化合物添加群との間に有意な差は認められなかった (Fig. 4). また, 回収された細胞数に含まれる CFU-Meg 数を計数したところ, No. 4 の添加では, コントロールに比べて 1.25 倍と有意な増加が示された (Fig. 5). 一方, フローサイトメータによる CD42a の陽性率の解析結果から, 巨核球数を測定したところ, No. 4 ではコントロールに比べて有意な差は認められなかったが, No. 8 及び No. 11 の添加で有意な低下がみられた (Fig. 6).

Table 2. Effects of Liquid Crystal-related Compounds on the Growth of CB CD34<sup>+</sup> Immature CFU-Meg

Sample number	Ratio of colonies to the control	
	10 nM	100 nM
No. 1	1.42 ± 0.91	1.00 ± 0.42
No. 2	1.09 ± 0.62	0.84 ± 0.76
No. 3	0.95 ± 0.37	0.89 ± 0.20
No. 4	1.34 ± 0.46	0.96 ± 0.27
No. 5	0.98 ± 0.32	1.09 ± 0.57
No. 6	1.09 ± 0.43	0.78 ± 0.52
No. 7	0.93 ± 0.26	1.07 ± 0.66
No. 8	1.18 ± 0.49	1.02 ± 0.41
No. 9	1.24 ± 1.01	0.76 ± 0.32
No. 10	0.71 ± 0.44	1.04 ± 0.86
No. 11	1.29 ± 0.43	0.88 ± 0.39
No. 12	0.65 ± 0.24	0.73 ± 0.17*
No. 13	0.97 ± 0.35	1.09 ± 0.47
No. 14	0.93 ± 0.13	1.62 ± 0.83
No. 15	1.31 ± 0.25	1.38 ± 0.90
No. 16	0.75 ± 0.07*	1.64 ± 0.48
No. 17	1.30 ± 0.51	0.45 ± 0.07*
No. 18	0.57 ± 0.17*	1.51 ± 1.14

Purified CB CD34<sup>+</sup> cells (1 × 10<sup>3</sup> cells/ml) were assayed for CFU-Meg by plasma clot culture containing 10–15% human platelet-poor AB plasma with TPO (50 ng/ml) plus 10 nM or 100 nM of each compound. Each value was shown by mean ± S.D. of 3–10 separate experiments. \* *p* < 0.05 compared to TPO alone by Student's *t*-test.

Table 3. Effects of Liquid Crystal-related Compounds on the Growth of CB CD34<sup>+</sup> Mature CFU-Meg

Sample number	Ratio of colonies to the control	
	10 nM	100 nM
No. 1	1.04 ± 0.32	1.25 ± 0.41
No. 2	1.11 ± 0.15	1.07 ± 0.51
No. 3	1.61 ± 0.62*	1.38 ± 0.13*
No. 4	1.49 ± 0.56	1.29 ± 0.07*
No. 5	1.20 ± 0.29	1.29 ± 0.19
No. 6	1.50 ± 0.37*	1.26 ± 0.48
No. 7	1.75 ± 0.53*	1.40 ± 0.52
No. 8	1.51 ± 0.53	1.66 ± 0.39*
No. 9	1.15 ± 0.76	1.85 ± 0.82
No. 10	1.26 ± 0.19	1.46 ± 0.55
No. 11	1.69 ± 0.43*	1.50 ± 0.43*
No. 12	1.34 ± 0.51	1.54 ± 0.11*
No. 13	1.55 ± 0.87	1.40 ± 0.38
No. 14	1.18 ± 0.07*	1.69 ± 0.54*
No. 15	1.21 ± 0.33	1.51 ± 0.54
No. 16	1.60 ± 0.64	1.63 ± 0.36
No. 17	1.47 ± 0.67	1.39 ± 0.32*
No. 18	0.90 ± 0.44	0.90 ± 0.28

Purified CB CD34<sup>+</sup> cells (1 × 10<sup>3</sup> cells/ml) were assayed for CFU-Meg by plasma clot culture containing 10–15% human platelet-poor AB plasma with TPO (50 ng/ml) plus 10 nM or 100 nM of each compound. Each value was shown by mean ± S.D. of 3–10 separate experiments. \* *p* < 0.05 compared to TPO alone by Student's *t*-test.

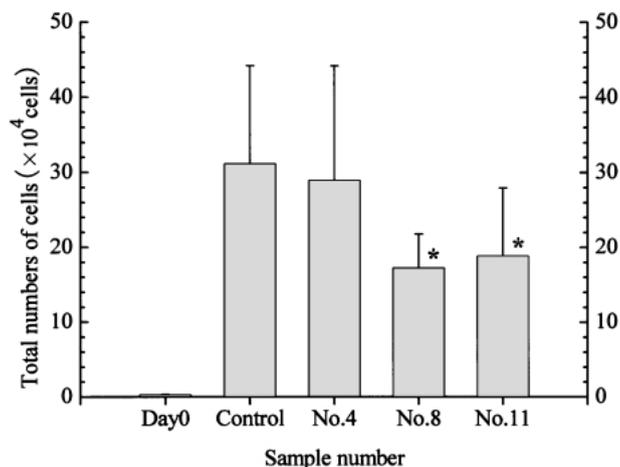


Fig. 3. Effects of Liquid Crystal-related Compounds on the Generation of Human Placental/Umbilical CB CD34<sup>+</sup> Cells

Prepared CB CD34<sup>+</sup> cells ( $2-3 \times 10^3$  cells/ml) were cultured in IMDM supplemented with rhTPO (50 ng/ml), 2% human serum and tested compounds (No. 4, No. 11; 10 nM, No. 8; 100 nM) for 13–14 days at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Total numbers of cells generated in the liquid culture were counted by trypan blue dye exclusion. Each value was shown by mean  $\pm$  S.D. of 3–4 separate experiments. \* $p < 0.05$  compared to TPO alone by Student's *t*-test.

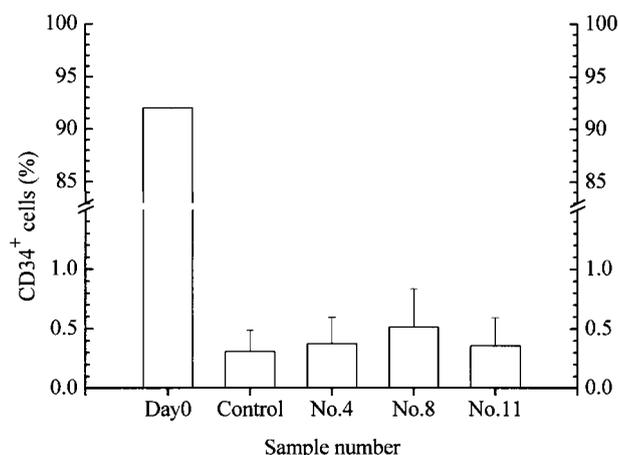


Fig. 4. Flow Cytometric Analysis of Purified CB CD34<sup>+</sup> Cells after the Liquid Culture

CD34<sup>+</sup> cells generated in the liquid culture were analyzed by a flow cytometer. Each value was shown by mean  $\pm$  S.D. of 3–4 separate experiments. \* $p < 0.05$  by Student's *t*-test.

## 考 察

本研究において、TPO 存在下ヒト臍帯血 CD34 陽性 CFU-Meg 由来の巨核球コロニー形成に対する液晶関連化合物の作用を検討したところ、3 種類の化合物が有意な巨核球コロニー形成促進作用を示した (Figs. 1, 2). 特に成熟 CFU-Meg 由来の小型コロニー形成に注目すると、上記 3 種類を含んだ 9 種類の化合物がこれらを促進させたことから (Table

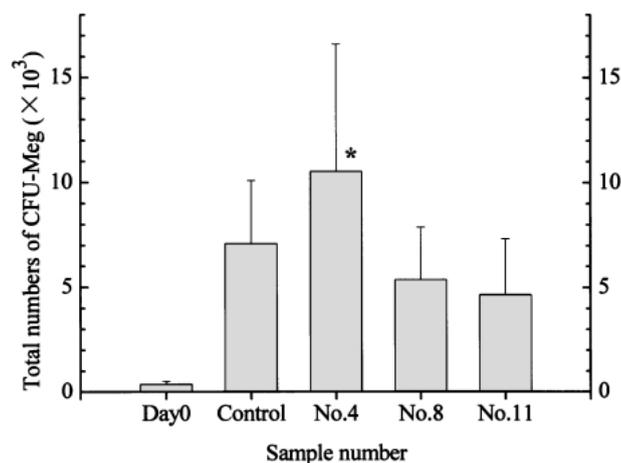


Fig. 5. Total Number of CFU-Meg Generated in the Liquid Culture

On day 14, the cells harvested from each culture were assayed for the number of CFU-Meg using the plasma clot culture supplemented with TPO plus SCF. Each value was shown by mean  $\pm$  S.D. of 3–4 separate experiments. \* $p < 0.05$  by Student's *t*-test.

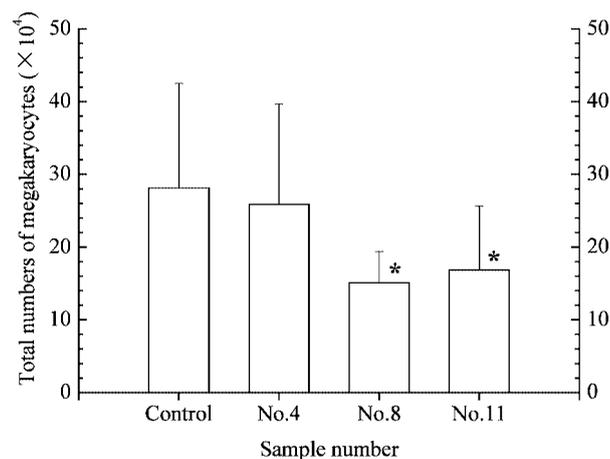


Fig. 6. Effect of Liquid Crystal-related Compounds on the Clonal Growth of CB CD34<sup>+</sup> CFU-Meg-derived Megakaryocyte Colony Formation

Prepared CB CD34<sup>+</sup> cells ( $2-3 \times 10^3$  cells/ml) were cultured in IMDM supplemented with rhTPO (50 ng/ml), 2% human serum and tested compounds (No. 4, No. 11; 10 nM, No. 8; 100 nM) for 13–14 days at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Total numbers of megakaryocytes generated in the liquid culture were counted by a flow cytometer. Each values were shown by mean  $\pm$  S.D. of 3–4 separate experiments. \* $p < 0.05$  by Student's *t*-test.

3), 標的細胞は成熟した CFU-Meg である可能性が示唆された。一方で、促進活性を示さなかった化合物の多くは、大型巨核球コロニーを形成する未熟 CFU-Meg の増殖を有意に抑制したことも特徴的な性質として示された (Tables 2, 3). これらの結果から、構造と活性に強い相関を得ることはできなかったが、フェニルピリジン若しくはフェニルピリミジンを基本構造とし、水酸基が結合している化合物

が CFU-Meg 増殖促進作用を示すと考えられた。

1994 年にクローニングされた TPO は、巨核球・血小板産生を刺激するサイトカインとして直ちに臨床治験が行われたが、投与個体での抗体生成のために現在その臨床応用は困難な状況にある。<sup>8)</sup> こういった経緯の中で、サイトカインを中心とした高分子の糖タンパク質を避け、その活路を低分子に見出そうという試みも最近増えてきている。<sup>10-14)</sup> Kimura et al. は、TM41 ((±)-1-(4-aminobutyl)-1,3-dihydro-3-[(4-hydroxy-phenyl)methyl]-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one) が TPO 依存性ヒト巨核球細胞株 UT7 の増殖を刺激し、rhTPO よりも生物学的活性が弱いものの、c-Mpl への作用物質として機能することを示している。<sup>10)</sup> Duffy et al. は、(5-oxo-1,5-dihydropyrazol-4-ylidene)hydrazines 1—20 nM がヒト骨髓 CD34 陽性細胞から巨核球への増殖を促進することを示した。さらに、TPO 依存性 BAF3 細胞の JAK と MAP キナーゼの活性化と、STAT5 のリン酸化を促進することを明らかにした。<sup>11)</sup> また、Inagaki et al. は、JTZ-132 ((S)-7-hydroxyimino-3-(3-methyl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-5-propyl-4,5,6,7-tetrahydrohydrobenzo[c]thiophene-1-sulfonamide) 0.43 μM (EC<sub>50</sub>) が、TPO と同等の巨核球前駆細胞の増殖刺激活性を示すこと、*in vivo* で血小板減少性マウスの血小板回復を促進することを報告している。<sup>12)</sup> Erickson-Millar et al. は、低分子 SB394725 が EC<sub>50</sub> 値約 0.02 μM で TPO 様活性を示し、その活性がヒトとチンパンジーでも示されることを報告している。<sup>13)</sup> さらに、Sakai et al. は、海生菌類から 4 つの xanthocillin を単離し、そのうちの 1 つが 1—100 nM において TPO レセプターを活性化し、その応答が TPO に匹敵することを報告している。<sup>14)</sup> 本研究で活性が認められた化合物は、これらのいずれとも基本骨格が異なるが、その作用濃度が数十 nM—数百 nM である点は一致した。

現在、血小板減少症に対する治療方法は、血小板輸血以外有効な手立てはなく、依然としてウイルス感染のリスクや頻回投与による応答不応や高額医療費の問題を抱えている。<sup>15-17)</sup> 一方、骨髓抑制をもたらす化学療法を受けているがん患者に対する TPO の Phase I/II の臨床治験において、動物実験にて得られたほどの効果は得られていない。<sup>18,19)</sup> そこで血小板減少症を解決する 1 つのアプローチとし

て、CFU-Meg 及び巨核球あるいは血小板そのものを生体外で増幅する試みがなされている。<sup>20-22)</sup> 本研究における液体培養において、TPO 刺激の CFU-Meg のコロニー形成促進作用を示したいずれの化合物も、コントロールに比べ総細胞数及び巨核球数を増加させたものはなく、No. 8 及び No. 11 では有意な抑制が観察され、促進作用は認められなかった (Figs. 3, 6). Iscove et al. は、半固形培養と液体培養とではサイトカインに応答する細胞が異なることを示唆している。また、同様の液体培養において、CD34<sup>+</sup> 細胞や産生された成熟細胞が多種類の細胞増殖因子、サイトカインやケモカインを分泌することが報告されている。<sup>23)</sup> 本実験においても、14 日間の培養で細胞数は 100—150 倍へと急激に増加し、そのおよそ 90% が巨核球で占められていた。これまでのいくつかの研究では、臍帯血 CD34<sup>+</sup> 細胞が抑制性のサイトカインである macrophage inflammatory protein (MIP)-1α, MIP-1β, transforming growth factor β1 (TGF-β1) や platelet factor-4 (PF-4) を産生する報告がなされている。<sup>24-26)</sup> また Janowska-Wieczorek et al. は、巨核球も TGF-β1 や PF-4 を産生することを報告している。<sup>27)</sup> このことから、No. 8 や No. 11 の化合物による液体培養での抑制作用は、これらの抑制性の因子の産生が関与した可能性が考えられる。さらに臍帯血に含まれる CD34<sup>+</sup> 細胞は末梢血や骨髓中のものに比べ未熟な集団が多いことや、<sup>28)</sup> 化合物が比較的成熟した CFU-Meg に作用している (Table 3) なども細胞数の増加に繋がらなかった理由として考えられるが、現時点でその詳細は不明である。一方、No. 4 が有意な CFU-Meg 数の増加をもたらしており、TPO との併用による CFU-Meg の *ex vivo expansion* への応用に 1 つの可能性を示唆するものである。一方で *in vivo* での巨核球造血への応用には、細胞選択性、代謝や毒性等解決すべき問題が多く、今後の検討課題である。

本研究では、液晶関連化合物の巨核球造血への作用の可能性について検討したが、今後化合物の構造と活性の相関やその作用メカニズムの解明からより高い活性を示す化合物の創生を進めたいと考えている。

謝辞 本研究において、臍帯血の採取・供与に

ご協力頂きました五所川原市・福士助産所の福士レイ子先生，福士千恵子先生並びに臍帯血を提供して頂きましたすべての方々に感謝申し上げます。

#### REFERENCES

- 1) Tsuji K., Yang F. C., *Mol. Med.*, **35**, 156–164 (1998).
- 2) Ishida Y., Kuriya S. I., *Mol. Med.*, **35**, 166–177 (1998).
- 3) Miyazaki H., *Jpn. J. Transfu. Med.*, **46**, 311–316 (2000).
- 4) Teramura M., Mizoguti H., *Rinsyo Ketueki*, **33**, 613–618 (1992).
- 5) de Sauvage F. J., Hass P. E., Spencer S. D., Malloy B. E., Gurney A. L., Spencer S. A., Darbonne W. C., Henzel W. J., Wong S. C., Kuang W. J., Oles K. J., Hultgren B., Solberg Jr. L. A., Goeddel D. V., Eaton D. L., *Nature*, **369**, 533–538 (1994).
- 6) Lok S., Kaushansky K., Holly R. D., Kuijper J. L., Lofton-Day C. E., Oort P. J., Grant F. J., Heipel M. D., Burkhead S. K., Kramer J. M., Bell L. A., Sprecher C. A., Blumberg H., Johnson R., Prunkard D., Ching A. F. T., Mathewes S. L., Bailey M. C., Forstrom J. W., Buddle M. M., Osborn S. G., Evans S. J., Sheppard P. O., Presnell S. R., O'Hara P. J., Hagen F. S., Roth G. J., Forest C. D., *Nature*, **369**, 565–568 (1994).
- 7) Bartley T. D., Bogenberger J., Hunt P., Li Y. S., Lu H. S., Martin F., Chang M. S., Samal B., Nichol J. L., Swift S., Johnson M. J., Hsu R. Y., Parker V. P., Suggs S., Skrine J. D., Merewether L. A., Clogston C., Hsu E., Hokom M. M., Hornkohl A., Choi E., Pangelinan M., Sun Y., Mar V., McNinch J., Simonet L., Jacobsen F., Xie C., Shutter J., Chute H., Basu R., Selander L., Trollinger D., Sieu L., Padilla D., Trail G., Elliott G., Izumi R., Covey T., Crouse J., Garcia A., Xu W., Del Castillo J., Biron J., Cole S., Hu M. C. T., Pacifici R., Ponting I., Saris C., Wen D., Yung Y. P., Lin H., Bosselman R. A., *Cell*, **77**, 1117–1124 (1994).
- 8) Vadhan-Raj S., Cohen V., Bueso-Ramos C., *Curr. Hematol. Rep.*, **4**, 137–144 (2005).
- 9) Ujiie S., “Ekishou Binran,” ed. by Ekishou Binran, Maruzen Co., Ltd., Tokyo, 2000, p. 2.
- 10) Kimura T., Kaburaki H., Tsujino T., Ikeda Y., Kato H., Watanabe Y., *FEBS Lett.*, **428**, 250–254 (1998).
- 11) Duffy K. J., Darcy M. G., Delorme E., Dillon S. B., Eppley D. F., Erickson-Miller C., Giampa L., Hopson C. B., Huang Y., Keenan R. M., Lamb P., Leong L., Liu N., Miller S. G., Price A. T., Rosen J., Shah R., Shaw T. N., Smith H., Stark K. C., Tian S. S., Tyree C., Wiggall K. J., Zhang L., Luengo J. I., *J. Med. Chem.*, **44**, 3730–3745 (2001).
- 12) Inagaki K., Oda T., Naka Y., Shinkai H., Komatsu N., Iwamura H., *Blood*, **104**, 58–64 (2004).
- 13) Erickson-Millar C. L., DeLorma E., Tian S. S., Hopson C. B., Stark K., Giampa L., Valoret E. I., Duffy K. J., Luengo J. L., Rosen J., Miller S. G., Dillon S. B., Lamb P., *Exp. Hematol.*, **33**, 85–93 (2005).
- 14) Sakai R., Nakamura T., Nishino T., Yamamoto M., Miyamura A., Miyamoto H., Ishiwata N., Komatsu N., Kamiya H., Tsuruzoe N., *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 6388–6393 (2005).
- 15) Vaickus L., Breitmeyer J. B., Schlossman R. L., Anderson K. C., *Stem Cells*, **13**, 588–596 (1995).
- 16) Webb I. J., Anderson K. C., *Leuk. Lymphoma*, **34**, 71–84 (1999).
- 17) McCullough J., *Semin. Hematol.*, **37**, 3–10 (2000).
- 18) Shibuya K., Akahori H., Takahashi K., Tahara E., Kato T., Miyazaki H., *Blood*, **91**, 37–45 (1998).
- 19) Vadhan-Raj S., *Semin. Hematol.*, **37**, 28–34 (2000).
- 20) Kratz-Albers K., Scheduling S., Mohle R., Buhring H. J., Baum C. M., Mc Kearn J. P., Buchner T., Kanz L., Brugger W., *Exp. Hematol.*, **28**, 335–346 (2000).
- 21) Ratajczak M. Z., Ratajczak J., Machalinski B., Mick R., Gewirtz A. M., *Blood*, **91**, 353–359 (1998).
- 22) Pick M., Nagler A., Grisaru D., Eldor A., Deutsch V., *Br. J. Haematol.*, **103**, 639–650 (1998).
- 23) Iscove N. N., Shaw A. R., Keller G., *J. Immunol.*, **142**, 2332–2337 (1989).

- 24) Cardoso A. A., Li M. L., Batard P., Hatzfeld A., Brown E. L., Levesque J. P., Sookdeo H., Panterne B., Sansilvestri P., Clark S. C., Hatzfeld J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 8707–8711 (1993).
- 25) Xi X., Caen J. P., Fournier S., Schlegel N., Amiral J., Sibony O., Blot P., Han Z. C., *Br. J. Haematol.*, **93**, 265–272 (1996).
- 26) Majka M., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak J., Ehrenman K., Pietrzkowski Z., Kowalska M. A., Gewirtz A. M., Emerson S. G., Ratajczak M. Z., *Blood*, **97**, 3075–3085 (2001).
- 27) Janowska-Wieczorek A., Majka M., Ratajczak J., Ratajczak M. Z., *Stem Cells*, **19**, 99–107 (2001).
- 28) Wu A. G., Michejda M., Mazumder A., Meehan K. R., Menendez F. A., Tchabo J. G., Slack R., Johnson M. P., Bellanti J. A., *Pediatr. Res.*, **46**, 163–169 (1999).