

氏名	ねめふばやる ばーたるつおくと Nemekhbayar Baatartsogt
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第581号
学位授与年月日	平成31年3月20日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第2項該当
学位論文名	乱流下で血小板を産生する巨核球におけるミトコンドリアの断片化
論文審査委員	(委員長) 教授 花園 豊 (委員) 教授 遠藤 仁司 准教授 大嶺 謙

論文内容の要旨

1 研究目的

Platelet transfusion is a crucial lifesaving treatment to stop for bleeding in patients who suffer various disease conditions. Currently, platelet resource is donor dependent in clinics. This limits the stable supply of platelets to patients in urgent situations, remote areas, and in developing countries. To establish a robust pipeline for supplying platelets in the clinic, an induced pluripotent stem cell (iPSC)-based strategy has emerged. However, the recent progress of the iPSC-based strategy has successfully established a concept for clinical-scale generation of platelets, generation of fully functional platelets is still challenging due to a lack of understanding regarding the molecular mechanisms underlying platelets biogenesis from megakaryocytes (MKs). Mitochondria are an indispensable organelle to maintain cellular activities. However, the functions of mitochondria in platelet biogenesis are largely unknown. To this end, a major bottleneck is the lack of platforms to recapitulate the cellular processes of *in vivo* platelet biogenesis for *in vitro* multifaceted studies using various biochemical and biophysical analytical techniques. In this study, we developed an easy-to-use turbulence generator system (TGS) that recapitulates the cellular process of *in vivo* platelet biogenesis in typical cell culture dishes.

2 研究方法

In vivo, using two-photon microscopy, bone marrow MKs are visualized in CAG-GFP mice. Mitotracker red FM dye is possible to label mitochondria morphology either *in vivo* and *in vitro*. The imaging technique combines with particle imaging velocity (PIV) analysis enable to measure fluid force and direction during the thrombopoietic process in *in vitro* and *in vivo*. Analyzing bone marrow physiological thrombopoietic condition, newly turbulence flow is mimicked by TGS in the cell culture scale. Taking this advantage, we cultured MKs from fetal liver and iPSC-derived MKs under turbulence stimulation in *in vitro*.

3 研究成果

Previously, we have revealed that not laminar, turbulent flow accelerated platelet release from MKs in living mice bone marrow. In this study, our intravital imaging observed that turbulent flow triggered mitochondria fragmentation in thrombopoietic MKs in the murine bone marrow. Further, the fragmented mitochondria in platelets are crucial to maintaining activation capabilities of circulating platelets in mice. To link these findings, we developed the TGS that is inspired with the native setting of platelet biogenesis in MKs under turbulent blood flow. The TGS can be attached to typical cell culture dishes and efficiently trigger platelet biogenesis from isolated murine MKs. By using TGS, we successfully visualized the dynamics of mitochondrial fragmentation in iPSC-derived MKs and active transfer processes of fragmented mitochondria from MKs to platelets.

4 考察

On the conventional cultured conditions, turbulent and laminar flows are difficult to be analyzed and controlled. However, our TGS system is enabled to visualize the response of the cell to each mechanical factor, and regulate force determination independently. We reproduced similar flow conditions to physiological ones in living bone marrow, and under such turbulence stimulation, the thrombopoietic process was physically and genetically upregulated. This study would provide further opportunities to understand the biological machinery of platelet biogenesis toward achieving an improved quality of platelets into clinical applications.

5 結論

In this study, we revealed that mitochondrial dynamic is a key player in the production of functional platelets from MKs stimulated with the turbulent flow. High spatiotemporal intravital imaging evidenced mitochondrial fragmentation in thrombopoietic MKs in the bone marrow of mice. Furthermore, the detailed process of mitochondria fragmentation was visualized in proplatelet production in MKs under turbulent flow stimulation in a cell culture system with the TGS. These findings suggested a feedback loop for promoting platelet biogenesis via mechano-stimulated mechanism and transportation of fragmented mitochondria into functional platelets.

論文審査の結果の要旨

論文表題：乱流下で血小板を産生する巨核球におけるミトコンドリアの断片化

人工血小板を産生できないか、医学上の大きな課題の一つになっている。京都大学・江藤教授らは、ヒト iPS 細胞から巨核球細胞株を作成し、同細胞から血小板を産出し、臨床応用に供する計画を進めている。しかし、この巨核球から必ずしも効率よく血小板が産生されないこと、また産生された血小板が成熟しきってないことが課題となっている。本研究はこの課題に果敢に挑戦した。その結果、申請者らは、骨髄巨核球から血小板への分化過程には、ある力学的な因子、すなわち乱流効果が発与することを見出した。そして、生体骨髄内で見られる乱流効果の *in vitro* に

おける再現を目指して、Turbulence-Generating System (TGS) を作製した。江藤教授からヒト iPS 細胞由来巨核球細胞株を入手し、同細胞から乱流刺激によって血小板をより効率よく生成させることに成功した。この結果は、非常に優れている。さらに、乱流刺激で分断化されたミトコンドリアは新規合成された血小板のなかにパッケージングされることを二光子顕微鏡画像により明確に示した。

論文はやや冗長の気味があった。例えば、Introduction の 1.6 Aim of this study の後に 1.7 Brief of conclusion の記載があるが、この 2 節はまとめられるであろう。

論文は誤記、誤植が散見され修正を必要とした。例えば、ミトコンドリア膜電位は、mitochondrial voltage と記載されているが、このような用語は存せず、正しくは mitochondrial membrane potential である。

修正すべきところは修正した結果、本論文は学位論文としてふさわしいと全員一致で認められた。

最終試験の結果の要旨

論文表題：乱流下で血小板を産生する巨核球におけるミトコンドリアの断片化

申請者は、学位論文の内容のとおり英語で発表を行った。内容の骨子は「論文審査の結果」にまとめたとおりである。審査員からは、実験の方法、データの解釈、考察内容に至るまで、多くの質問が出されたが、いずれの質問に対しても返答が得られ、全体として有意義な質疑応答が行われた。質疑応答は以下の通りである（抜粋）。

- ・ミトコンドリア機能と血小板の活性化の機構について検討した。脱共役剤である FCCP を用いてミトコンドリアの膜電位を消失させたところ、トロンビン誘導性の活性酸素の生成、GPIIb/alpha3 の活性化は、全て阻害された。そこにタンパク分解酵素阻害剤を添加したところ、GPIIb/alpha3 の分解は抑制されたが、その他は影響がなかった。即ち、ミトコンドリア活性は、alphaIIb/alpha3 の上流のシグナルを刺激すると考えられるがどうか、という質問に対し、上流のカスケードについて説明し、現在のところ不明であるとの回答があった。また、血小板活性化シグナルの一つである ADP 濃度に関しても測定していないとのことであった。

- ・分子メカニズムの検討として、乱流刺激により発現が増加するミトコンドリア分裂因子 Drp1 の阻害により、血小板の生成に影響を与えるか聞いたところ、文献にて影響があると回答があった。また、p62 や Drp1 の上昇により、マイトファジーが促進しているか聞いたところ、Parkin や Pink1 などが上昇しておらず、マイトファジーは生じていないと考えられる旨の回答であった。

- ・ヒトにおいて p62 と機能を同じくする HDAC6 に対する阻害薬は既に臨床の現場で用いられている。HDAC 阻害薬の投与時に観察される血小板減少に、血小板中のミトコンドリアの局在が関わっている可能性についての言及は興味深かった。この可能性について質したところ、検討したいとの回答があった。

- ・定量 PCR において対象サンプル数が 2 しかないにも関わらず、t 検定を行ったことに関し質問したところ、検定数が少ないという回答だったので、このデータは削除となった。

以上、申請者の発表および質疑応答から、審査員全員が最終試験に合格と判断した。