

# ラット造血器官の DNA 合成能に与えるエリスロポエチンの影響

鈴木敏恵<sup>1</sup>, 工藤秀機<sup>1</sup>, 中山亜紀<sup>1</sup>, 左雨秀治<sup>2</sup>, 菊池宏幸<sup>3</sup>, 坂本 忍<sup>1</sup>

<sup>1</sup>文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科

<sup>2</sup>東京医科歯科大学 難治疾患研究所

<sup>3</sup>東京医科大学 衛生学公衆衛生学大学院

## 要旨

造血器官の DNA 合成能に与えるエリスロポエチンの影響を検討する目的で、ラット骨髄および脾臓の造血細胞において DNA 合成系酵素であるチミジル酸合成酵素活性およびチミジンキナーゼ活性を測定し、プロモデオキシウリジン陽性細胞を免疫組織化学法により検出した。エリスロポエチンは、骨髄細胞の DNA 合成系酵素活性を僅かに上昇させ、赤芽球系細胞数を顕著に増加させた。また、脾臓重量を僅かに、また S 期脾細胞を顕著に増加させ、末梢血の赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値を有意に増加させた。以上の結果、エリスロポエチンは、造血系において DNA 合成を促進し、骨髄赤芽球系細胞および S 期脾細胞を増加させ、末梢血赤血球数を増加させることが示唆された。

## キーワード

エリスロポエチン, ラット造血細胞, DNA 合成能

## 緒言

慢性腎疾患を伴う貧血症患者は、肝炎、エイズなどの感染症の危険を伴いながらも、時として輸血を余儀なくされる場合がある。貧血の原因は多種多様であるが、赤血球寿命の短縮やエリスロポエチン (EPO) 産生減少も一因である。EPO は、循環血中赤血球の生理学的維持に重要なホルモンであり、主に成人腎および胎児肝で生産され、EPO 感受性細胞は成人骨髄、脾臓および胎児肝臓に存在する。Miyake らは<sup>1)</sup>、再生不良性貧血患者の尿から EPO を精製し、遺伝子レベルでの解析を行った<sup>2)</sup>。さらに遺伝子工学の発展により、リコンビナントエリスロポエチンを合成することを可能にした<sup>3,4)</sup>。

チミジル酸合成酵素 (TS: EC 2.1.1.45) およびチミジンキナーゼ (TK: EC 2.7.1.21) は、それぞれピリミジン

代謝のデノボ経路およびサルベージ経路に位置する DNA 合成律速酵素であり (図 1)、共に胎児組織や腫瘍組織などの増殖の盛んな細胞でその酵素活性の増加していることが知られている<sup>5-8)</sup>。また、プロモデオキシウリジン (BrdU) 取り込み細胞は S 期細胞として認められている<sup>9,10)</sup>。

私どもは以前、低形成期からの骨髄細胞の再増殖過程を観察する目的で、ラットにシクロフォスファミド (Cy: エンドキサン) を投与して動物実験モデルを作製した。このモデル実験において、DNA 量解析をフローサイトメトリー (FCM) を用いて行ったところ、Cy 投与後 5 日目までの骨髄低形成期では、殆ど全ての細胞が G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期に属し、S、G<sub>2</sub>/M 期細胞は認められなかったが、NCC の増加し始める Cy 投与後 7 日目では、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 43.0%, S 42.8%, G<sub>2</sub>/M 14.2% となり、S + G<sub>2</sub>/M 期細胞は、Cy 投与前 (27.9%)

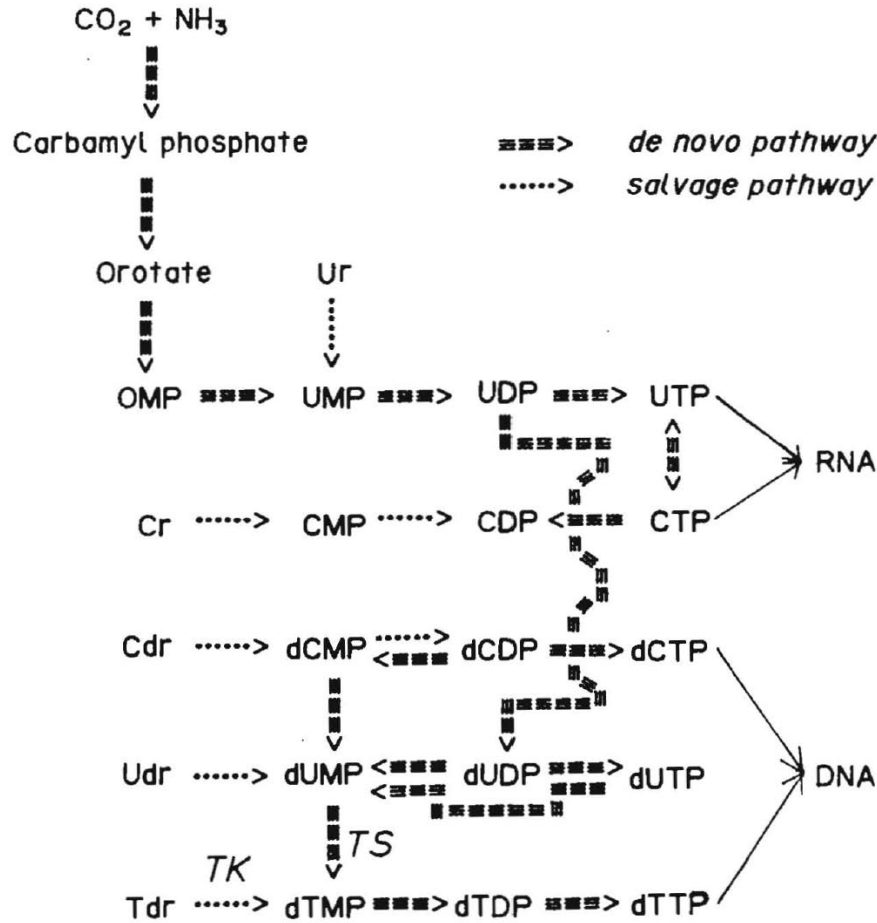


図1 ピリミジン代謝マップ  
 TS：チミジル酸合成酵素（デノボ経路）  
 TK：チミジンキナーゼ（サルベージ経路）

の約2倍に増加していた。Cy投与後14日目のDNAヒストグラムはCy投与前とほぼ同じ形態を示していた<sup>11)</sup>。また、TS活性、TK活性についても検討したところ、骨髓細胞増殖過程では、まずTS活性増加で示されるように、デノボ経路のDNA合成が駆動され、次いで、TK活性増加で示されるようなサルベージ経路主体のDNA合成に引き継がれ、S期細胞、NCCの増加が認められた<sup>12)</sup>。

そこで今回、造血器官に与える組み替えヒトEPO(rEPO)の影響を明らかにする目的で、雄ラットにrEPOを連日7日間投与して、骨髓細胞のTS、TK活性、脾細胞へのBrdU取り込み率および末梢血について検討したので報告する。

## 材料および方法

12週齢オスSprague-Dawleyラット(三協ラボサービス、東京)を用い、9匹ずつの2群に分けた。東京医科歯科大

学実験動物施設内において、実験期間中は採光、温度、湿度は一定に保たれ、実験動物用普通飼料(オリエンタル酵母、東京)および水道水は自由摂取とした。実験計画および動物取扱いは、東京医科歯科大学実験動物取り扱い基準および指針に従った。

実験群には、連日7日間rEPO(10.0 U/100 g体重: Eposin<sup>®</sup>, COA34, 中外製薬, 東京)を皮下注射した。対照群には同様に生食水を皮下注射した。両群とも9匹中3匹には、実験終了2時間前にBrdU(1.0 ml/100 g体重: アマーシャム, 細胞増殖キットNK 9043, 英国)を、尾静脈より1回静注した。

ウレタン(150 mg/100 g体重: メルク, ドイツ)麻酔下で、心臓穿刺法により採血後、頸椎脱臼により屠殺し、脾臓および大腿骨を摘出した。採取した末梢血から、赤血球数、ヘモグロビン(Hb)濃度、ヘマトクリット(Ht)値を測定した。

採取された大腿骨から、3 mM EDTAを含むリン酸バッ

ファー (PBS) 液を用いて骨髓細胞を洗い出し、ナイロンメッシュ (70  $\mu\text{m}$  ナイロン, バクトン・ディッキンソン, 米国) を通して PBS で 3 回洗浄し、酵素活性測定用に  $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存した。骨髓細胞の TS 活性, TK 活性の測定には、それぞれ Dunlap ら<sup>5)</sup> の方法, Taylor ら<sup>6)</sup> の方法に準じた。酵素活性は有核細胞数 (NCC) を用いて標準化して  $\text{pmol}/\text{NCC} \times 10^{-6}/\text{min}$  で表した。

BrdU 処理ラットからの摘出脾臓は、直ちに 10% 緩衝ホルマリン液 (pH 7.2) で固定され、免疫染色は手引きの指示に従った。一脾臓からは、それぞれ 6 組織標本を無作為抽出し、約 200 細胞当たりの BrdU 陽性細胞数を測定した。

統計処理には、one-way analysis of variance (ANOVA) および unpaired t-test を用い、 $p < 0.05$  をもって有意差ありとした。

## 結果

### 1) 末梢血に与えるリコンビナントエリスロポエチンの影響

末梢血では、rEPO 投与により、赤血球数が 27.9% 増加し ( $p < 0.05$ )、Hb が 10.4% 増加し ( $p < 0.05$ )、Ht が 24.3% 増加していることが認められた ( $p < 0.01$ ) (表 1)。

### 2) 骨髓細胞のチミジル酸合成酵素 (TS) 活性およびチミジンキナーゼ (TK) 活性に与えるリコンビナントエリスロポエチンの影響および赤芽球系細胞数の変化

骨髓細胞では、rEPO 投与により、有意ではないものの TS 活性, TK 活性のわずかな上昇が認められた。し

かしながら、赤芽球系細胞には、66.5% もの増加が認められた ( $p < 0.01$ )。

### 3) 脾臓湿重量およびプロモデオキシウリジン (BrdU) 陽性細胞 (S 期細胞) 率に与えるリコンビナントエリスロポエチンの影響

脾臓では、rEPO 投与により、湿重量は変わらないものの、BrdU 陽性細胞 (S 期細胞) は、顕著に 4 倍近く増加していた ( $p < 0.01$ )。

## 考察

急性白血病や悪性リンパ腫のような血液疾患をはじめ、他臓器癌などのサルベージ療法として大量化学療法、大量放射線療法が行われるようになった。その結果、低形成となる骨髓細胞が問題となってきた。

以前、私どもは、その低形成となった骨髓細胞の再増殖過程を観察する目的で、ラットにシクロフォスファミド (Cy: エンドキサン) を投与したところ、Cy 投与後 5 日目までの骨髓低形成期では、殆ど全ての細胞が  $G_0/G_1$  期に属し、S,  $G_2/M$  期細胞は認められなかったが、NCC の増加し始める Cy 投与後 7 日目では、 $G_0/G_1$  43.0%, S 42.8%,  $G_2/M$  14.2% となり、S +  $G_2/M$  期細胞は、Cy 投与前 (27.9%) の約 2 倍に増加していた。Cy 投与後 14 日目の DNA ヒストグラムは Cy 投与前とほぼ同じ形態を示していた<sup>11)</sup>。また、骨髓細胞増殖過程では、デノボ経路の DNA 合成が駆動され、次いで、サルベージ経路主体の DNA 合成に引き継がれ、S 期細胞、NCC の増加することが示唆された<sup>12)</sup>。

表 1 末梢血中赤血球数, ヘモグロビン (Hb) 濃度, ヘマトクリット (Ht) 値, 骨髓赤芽球系細胞数, 骨髓細胞 TS・TK 活性, 脾臓湿重量, 脾臓細胞中 BrdU 陽性率 (S 期細胞) に与える rEPO の影響

		対照群	rEPO 投与群
末梢血	赤血球 ( $\times 10^{12}/\text{L}$ )	6.1 $\pm$ 0.5	7.8 $\pm$ 0.4*
	ヘモグロビン (Hb) (g/dL)	15.4 $\pm$ 0.3	17.0 $\pm$ 0.5*
	ヘマトクリット (Ht) (%)	50.2 $\pm$ 0.8	62.4 $\pm$ 0.6**
骨髓	TS 活性 ( $\text{pmol}/\text{NCC} \times 10^{-6}/\text{min}$ )	1.46 $\pm$ 0.17	1.67 $\pm$ 0.12
	TK 活性 ( $\text{pmol}/\text{NCC} \times 10^{-6}/\text{min}$ )	1.77 $\pm$ 0.05	1.98 $\pm$ 0.25
	赤芽球系細胞数 ( $\times 10^{-6}/$ 大腿骨)	26.6 $\pm$ 1.3	44.3 $\pm$ 3.8**
脾臓	湿重量 (mg)	745 $\pm$ 30	767 $\pm$ 46
	BrdU 陽性 (S 期細胞) 率 (%)	2.26 $\pm$ 0.27	8.53 $\pm$ 1.76**

Mean  $\pm$  SEM

BrdU: プロモデオキシウリジン, rEPO: 組み替えヒト・エリスロポエチン

\* および \*\*: それぞれ,  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  をもって有意差あり。

今回の結果から、rEPO 連日7日間投与は、骨髄赤芽球系細胞およびS期脾細胞を顕著に増加させ、末梢血赤血球数、Hb、Htを増加させたところから、骨髄細胞増殖過程においても、先ず、デノボ経路のDNA合成が駆動され、次いで、サルベージ経路主体のDNA合成に引き継がれ、骨髄赤芽球系細胞およびS期脾細胞を増加させ、末梢血赤血球を増加させることが示唆された。

## 文献

- 1) Miyake T, Kung CK-H, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977; 252: 5558-5564.
- 2) Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, Kawakita M, Shimizu T, Miyake T. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985; 313: 806-810.
- 3) Winearls CG, Olivier DO, Pippard MJ, Reid C, Downing MR, Cotes PM. Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet* 1986; 2: 1175-1178.
- 4) Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II trial. *N Engl J Med* 1987; 316: 73-78.
- 5) Dunlap RB, Harding NGL, Huennekens FM. Thymidylate synthetase from amethopterin-resistant *Lactobacillus casei*. *Biochemistry* 1971; 10: 88-97.
- 6) Taylor AT, Stafford MA, Jones OW. Properties of thymidine kinase partially purified from fetal and adult tissue. *J Biol Chem* 1972; 247: 1930-1935.
- 7) Sakamoto S, Abe A, Kudo H, Yamada N, Seki K, Okamoto R. Effects of estrogen and progesterone on thymidine kinase activity in the immature rat uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 145: 711-715.
- 8) Sakamoto S, Kuwa K, Tsukada K, Sagara T, Kasahara N, Okamoto R. Relative activities of thymidylate synthetase and thymidine kinase in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinomas in rats. *Carcinogenesis* 1987; 8: 405-408.
- 9) Suzuki S, Sakamoto S, Kudo H, Sassa S, Sugiura Y, Kuwa K, Kasahara N, Mori T, Nagasawa H. Effects of Danazol on endometrial DNA synthesis in rats. *Steroids* 1993; 58: 551-553.
- 10) Okayasu I, Ohkusa T, Kajiura K, Kanno J, Sakamoto S. Promotion of colorectal neoplasia in experimental murine ulcerative colitis. *Gut* 1996; 39: 87-92.
- 11) 工藤秀機, 神白和正, 佐藤和子, 坂本 忍, 鈴木敏恵, 桑克彦: ラット骨髄細胞増殖過程におけるDNA合成系酵素活性の消長とDNA量解析. *FCM-Cell Biology* 1990; 2: 90-95.
- 12) 鈴木敏恵, 坂本 忍, 工藤秀機: 骨髄細胞増殖過程におけるDNA合成能解析—DNA合成系酵素活性と免疫組織化学的検討—. *臨床病理* 1991; 39 (5): 531-535.

## Effects of Recombinant Human Erythropoietin on DNA Synthesis in Rat Hematopoietic Organs

Satoe Suzuki<sup>1</sup>, Hideki Kudo<sup>1</sup>, Aki Nakayama<sup>1</sup>, Shuji Sassa<sup>2</sup>,  
Hiroyuki Kikuchi<sup>3</sup>, Shinobu Sakamoto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Health Science, Technology,  
Bunkyo Gakuin University

<sup>2</sup>Medical Research Institute, Tokyo Medical & Dental University

<sup>3</sup>Department of Preventive Medicine and Public Health, Tokyo Medical University

### Abstract

In an attempt to define the effects of recombinant human erythropoietin on DNA synthesis in hematopoietic organs, we investigated DNA-synthesizing enzyme activities, i.e., thymidylate synthase and thymidine kinase activities, and bromodeoxyuridine-immunohistochemistry in hematopoietic cells of bone marrow and spleen in rats. Treatment with recombinant human erythropoietin slightly increased enzyme activities, and markedly enhanced cell number of erythroid series in bone marrow cells; it also slightly increased organ weight, and remarkably enhanced S-phase cells in the spleen, followed by an augmentation of the number of erythrocytes and a rise in the hemoglobin and hematocrit levels in peripheral blood.

**Key words** — erythropoietin, rat hematopoietic cells, DNA synthesis

Bunkyo Journal of Health Science Technology vol.3: 41-45