

Title	Promoted Megakaryocytic Differentiation of Megakaryoblastic Cell Lines for Platelet Production In Vitro
Author(s)	Nurhayati, Retno Wahyu
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/53953">http://hdl.handle.net/11094/53953</a>
DOI	
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

## Abstract of Thesis

Name ( Retno Wahyu Nurhayati )	
Title	Promoted Megakaryocytic Differentiation of Megakaryoblastic Cell Lines for Platelet Production <i>In Vitro</i> ( <i>in vitro</i> 血小板生産を目指した巨核球系細胞株の分化促進)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Megakaryoblastic cell lines provide abundant and inexpensive materials for production of a platelet substitute. The current study summarizes several approaches to promote megakaryocytic (MK) differentiation of megakaryoblastic cells for platelet production <i>in vitro</i>. K562 and CHRF cell lines were employed to represent the early and late stages of MK differentiation, respectively, upon phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) induction. The efficiency of each approach for MK differentiation was examined in terms of polyploidization, surface marker expression, and platelet-like fragment formation. In Chapter 1, the role of oxidative stress in MK differentiation was investigated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. The addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significantly increased the polyploidization of PMA-induced K562 cells. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment at the beginning of MK differentiation had the greatest effect on polyploidization, suggesting that the early period of MK differentiation is the most important stage for oxidative stress induction. The increased polyploidization by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not associated with an increase in MK commitment, as determined by CD41 expression. Therefore, near ultraviolet (near-UV) irradiation was employed in Chapter 2 to induce endogenous generation of various reactive oxygen species (ROS). Pre-treatment with near-UV promoted intracellular ROS accumulation in PMA-induced K562 cells. Consequently, the elevation in ROS content by near-UV treatment promoted polyploidization and CD41 expression of PMA-induced K562 cells. In contrast, the MK differentiation of PMA-induced CHRF cells was not affected by near-UV treatment. It is likely that oxidative stress is not effective to promote differentiation of CHRF cells because these cells were derived from more mature megakaryocytes than the parental cells of the K562 cell line. In addition, CHRF cells are p53 positive and prone to apoptosis in response to oxidative stress. Therefore, in Chapter 3, a multi-kinase inhibitor, designated as BMS-777607, was used to specifically target the signaling pathways of polyploidization. As a result, BMS-777607 strongly promoted polyploidization and MK commitment of PMA-induced K562 and CHRF cells. The effect of BMS-777607 on platelet-like fragment formation of CHRF cells was investigated further in Chapter 4. BMS-777607 treatment significantly improved the CD41 expression of platelet-like fragments without decreasing the fragment yield per cell. Based on the aforementioned findings, this study is expected to fundamentally contribute to the development of platelet substitute production <i>in vitro</i>.</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( Retno Wahyu Nurhayati )			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教 授	田谷 正仁
	副 査	教 授	馬越 大
	副 査	教 授	紀ノ岡 正博

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、*in vitro*血小板生産を念頭において、巨核球系細胞の分化プロセスを促進する培養システムについて研究した。

まず初めに、巨核球分化における酸化ストレスの役割について、過酸化水素に焦点を当て解析した。過酸化水素の添加がphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) によって分化誘導されたK562細胞の倍数性を大幅に増加させることを示した。特に分化誘導初期においてその効果が顕著であることを明らかにした。しかしながら、倍数性の増加はCD41細胞表面マーカーの発現量によって評価される巨核球分化の成熟化には直接結びつかなかった。次に、種々の活性酸素種を細胞内において内在的に発生させるため、近紫外光の細胞への照射効果を調査した。PMAによる分化誘導の有無に関わらず、近紫外光照射はK562細胞の細胞内の活性酸素種量を増加させることを発見した。同時に高倍数化と表面マーカーの高発現を確認した。しかし、巨核球分化の後期を表現するCHRF細胞については近紫外光照射による巨核球分化の促進は確認できなかった。そこで次の検討では、CHRF細胞の高倍数化に焦点を当て、新規なマルチキナーゼ阻害剤であるBMS-777607を使用して、高倍数化に関連するシグナル経路の特異的な活性化を試みた。結果としてBMS-777607は細胞増殖の抑制を伴い、高倍数化を促進するとともに、表面マーカーであるCD41の発現も増加することを明らかにした。最後に、BMS-777607によって巨核球分化が促進されたCHRF細胞より産生した血小板様体について、量的ならびに質的な評価を行った。得られた血小板様体は、BMS-777607を添加しなかった場合のものと比較して、細胞1個あたりの産生数が低下することなく高いCD41発現量を示し、血小板としての機能が向上することを明らかにした。

以上、本論文は、巨核球系細胞株の巨核球分化の促進を達成するとともに、得られた血小板様体の詳細な解析を実施し、*in vitro*血小板生産のための基礎的知見を与えるものである。博士(工学)の学位論文として価値のあるものと認める。