

東医大誌 53(4): 461~467, 1995

## プロテオグリカンのマウス巨核球造血に及ぼす影響

東京医科大学内科学教室 (指導: 伊藤久雄主任教授)

方波見恵子 代田常道

**【要旨】** 骨髄の造血微小環境の一員であり、細胞外マトリックスを構成する重要な要素であるプロテオグリカンのマウス巨核球造血に及ぼす影響について無血清培養法を用いて検討した。

マウス大腿骨髄細胞  $2 \times 10^5$  個/ml にインターロイキン 3 (IL-3)、インターロイキン 6 (IL-6) の共存下でコンドロイチン硫酸 A, B 及びヒアルロン酸をそれぞれ添加し巨核球コロニー数、コロニーサイズ、核 DNA 量 (ploidy) を測定した。コンドロイチン硫酸 A, B, ヒアルロン酸をそれぞれ加えた系ではコロニー数は IL-3 と IL-6 のみを添加した系にくらべて有意に増加した。この増加の程度はプロテオグリカンの濃度を変えても不変であった。しかしコロニーを構成する巨核球数に有意な増加は認められず、巨核球の ploidy も増加しなかった。

これらの結果よりプロテオグリカンには巨核球コロニー刺激因子としての作用があることが判明した。

### はじめに

骨髄の細胞外マトリックスは造血前駆細胞が増殖と分化を行うために欠くことのできない因子である<sup>1)</sup>。この細胞外マトリックスは主に骨髄間質細胞 (ストロマ細胞) で産生され、骨髄内に蓄積されて作用を発揮しており、造血微小環境の重要な一員として近年注目を集めている<sup>2)</sup>。骨髄間質細胞が産生する様々な細胞外マトリックスの中で、プロテオグリカンは硫酸化された繰り返し二糖類からなる多糖類 (グリコサミノグリカン, 以下 GAG) が共有結合したコア蛋白の存在を特徴とする不均一で巨大な分子の総称である。

プロテオグリカンは GAG 鎖付加という修飾を受ける以外には特に共通性のない蛋白の集団なのでその作用も多様である。造血における主な作用は造血前駆細胞とストロマ細胞や細胞外マトリックスとの接着、造血因子との結合などが報告されているが<sup>3-7)</sup>、プロテオグリカンそのものが造血幹細胞の増殖と成熟に直接的にどの様にかかわっているかについては殆んど判っていない。そこで著者らは今回プロテオグリカンのマウス巨核球造血に及ぼす影響について検討し、若干の知見を得たので報告する。

### 材料および方法

#### 1. マウス

雄性 BALB/c, 4-8 週齢を使用した。尚東京医科大学動物実験指針 (東医大誌第 51 巻 3 号) に基づいて実験を行なった。

#### 2. 造血因子 (サイトカイン) 及びプロテオグリカン

インターロイキン 3 (以下 IL-3)、インターロイキン 6 (以下 IL-6) は Genzyme 社 (米国) より購入し、コンドロイチン硫酸 A, B 及びヒアルロン酸は生化学工業 (東京) より購入した。実験に用いたそれぞれの造血因子とプロテオグリカンの概要と量は次の通りである。IL-3: マウス T cell lymphoma cell line である LBRM-33 細胞の cDNA を用い得られたリコンビナントマウス IL-3 を用いた。IL-6: ヒト胎児腎細胞より作製された IL-6 cDNA を chinese hamster ovary (CHO) 細胞にトランスフェクトし得られたリコンビナントヒューマン IL-6 を用いた。コンドロイチン硫酸 A: Schiller らの色層分析法を用い<sup>8)</sup>、チョウザメの脊索から作製されたものを用いた。コンドロイチン硫酸 B: Meyer らの方法を用い<sup>9)</sup>、更には Schiller らの色層分析法

1995年2月4日受付, 1995年2月14日受理

キーワード: 巨核球造血, 細胞外マトリックス, プロテオグリカン.  
(別刷請求先: 〒311-24 茨城県行方郡牛堀町牛堀 60-1 方波見恵子)

にて精製されたものを用いた。

ヒアルロン酸: グルクロン酸と N-アセチルグルコサミンで組成された酸性ムコ多糖体で、ブタ皮から作製されたものを用いた。

各サイトカインは IL-3 100 U/ml, IL-6 50 ng/ml の濃度で使用し、コンドロイチン硫酸 A, B 及びヒアルロン酸は各種濃度で以下の 10 系の実験を行った。

(1) 100 U/ml IL-3 と 50 ng/ml IL-6 のみを加えた系

(2) 100 U/ml IL-3, 50 ng/ml IL-6 に 10  $\mu$ g/ml のコンドロイチン硫酸 A を加えた系

(3) 100 U/ml IL-3, 50 ng/ml IL-6 に 50  $\mu$ g/ml のコンドロイチン硫酸 A を加えた系

(4) 100 U/ml IL-3, 50 ng/ml IL-6 に 100  $\mu$ g/ml のコンドロイチン硫酸 A を加えた系

(5) 100 U/ml IL-3, 50 ng/ml IL-6 に 10  $\mu$ g/ml のコンドロイチン硫酸 B を加えた系

(6) 100 U/ml IL-3, 50 ng/ml IL-6 に 50  $\mu$ g/ml のコンドロイチン硫酸 B を加えた系

(7) 100 U/ml IL-3, 50 ng/ml IL-6 に 100  $\mu$ g/ml のコンドロイチン硫酸 B を加えた系

(8) 100 U/ml IL-3, 50 ng/ml IL-6 に 10  $\mu$ g/ml のヒアルロン酸を加えた系

(9) 100 U/ml IL-3, 50 ng/ml IL-6 に 50  $\mu$ g/ml のヒアルロン酸を加えた系

(10) 100 U/ml IL-3, 50 ng/ml IL-6 に 100  $\mu$ g/ml のヒアルロン酸を加えた系

### 3. 無血清培養法及びコロニー測定法

#### 培養材料

1) プラスチック培養皿 (LUX5221)

2) 培養液

以下の条件の培養液をあらかじめ作製しておく。

① IMDM (ISCOVE's modified DULBECCO's medium) (Gibco 社, 米国)

IMDM 17.7 g を 1000 ml の蒸留水に溶解し、炭酸水素ナトリウム 3.0 g を加えたものを 1 倍濃度、IMDM 17.7 g を 500 ml の蒸留水に溶解し、炭酸水素ナトリウム 3.0 g を加えたものを 2 倍濃度の IMDM とした。

② ウシ血清アルブミン (Sigma 社, 米国)

Fraction V のウシ血清アルブミン 10 g を 40 ml の蒸留水で溶解し 4°C で 24 時間暗所で静置し、レジンを 1 g を加え 1 時間放置する。その間 15 分毎に泡を

立てない様にガラス棒でゆっくり攪拌する。それをガーゼで濾過し更に同じ過程をもう一度繰り返す。ガーゼで再度濾過しレジンを除き液量を測定し、同量の 2 倍濃度の IMDM を加え、ミリポアフィルターを通し滅菌して -20°C で保存する。

③ トランスフェリン (Boehringer 社, ドイツ)

30 ng/ml のトランスフェリンを 4°C で保存する。

④ コレステロール

3.9 mg のコレステロールに 0.4 ml の無水アルコールを加え、50°C で 1 時間かけて溶解する。それに前述したウシ血清アルブミン 5 ml と 7% 炭酸水素ナトリウム 0.2 ml, 1 倍濃度の IMDM 45 ml を加え最終濃度 78  $\mu$ g/ml とし 4°C にて保存する。

⑤ 寒天 (Difco 社, 米国)

寒天 0.3 g を蒸留水 25 ml とともにフラスコに入れ、水を沸騰させた中に 15 分間温浴して寒天を溶解し、1.2% 軟寒天を作製後 41°C の恒温槽で保存する。

3) 骨髓細胞

BALB/c マウスを頸椎脱臼で屠殺後大腿骨を取り出し両骨端を切り、1 倍濃度 IMDM 1 ml で骨髓を試験管の中に流し出す。その細胞浮遊液 100  $\mu$ l をトリパンブルー 900  $\mu$ l と混和し、生細胞をカウントし 2000 個/ $\mu$ l となるよう細胞浮遊液を調節する。

4) 無血清培養法

前述した細胞浮遊液に、先に用意したトランスフェリン 0.1 ml, ウシ血清アルブミン 0.5 ml, コレステロール 0.5 ml, 各種サイトカイン, 1 倍濃度の IMDM を加え総量 2.5 ml となるようにする。更に 1.2% 軟寒天 1.25 ml, 2 倍濃度の IMDM 1.25 ml を加え合計 5 ml とし、その 1 ml ずつを培養皿に分注する。最終的には骨髓細胞  $2 \times 10^5$  個/ml, ウシ血清アルブミン 1%, トランスフェリン 600  $\mu$ g/ml, コレステロール 7.8  $\mu$ g/ml と各種濃度のサイトカインを 0.3% 軟寒天に埋め込むことになる。これを 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で 7 日間培養する。

5) 巨核球コロニー測定法

培養終了後寒天ごと乾燥固定し、マウス巨核球に特異的マーカーであるアセチルコリンエステラーゼ (AchE) 染色を施し、3 個以上の AchE 陽性細胞からなる細胞集塊を巨核球コロニー (Fig. 1,  $\times 100$ ) として算定した。Fig. 1 には AchE 陽性の巨核球数個の集塊からなるコロニーを示す。

4. 巨核球 DNA 含量の測定法

培養終了後寒天ごと乾燥固定しフォイルゲン染色

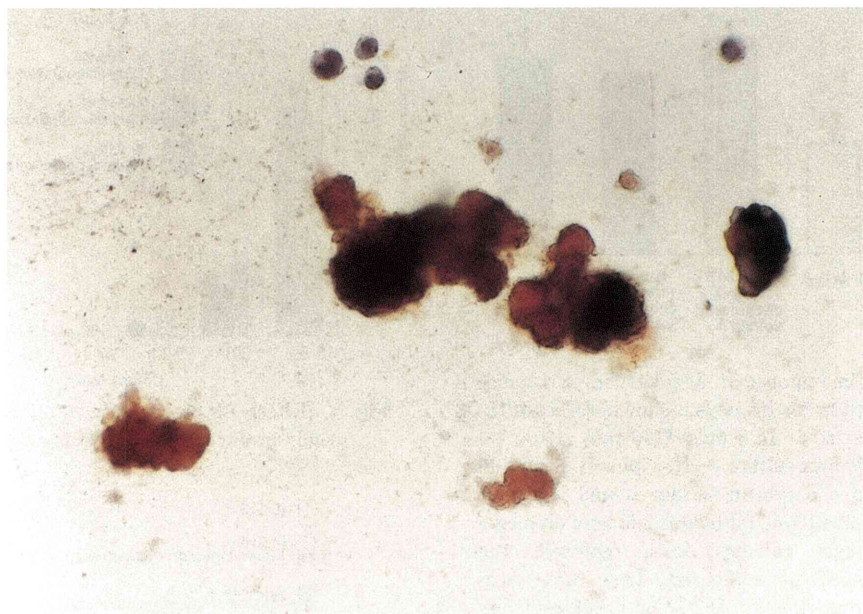


Fig. 1 Megakaryocyte colony

を施し, CAS200R (Cell Analysis System 社, 米国)にて巨核球 DNA 量を測定した。コントロールとして同じ標本上にある成熟顆粒球の DNA 量を 10 回測定し, その平均を 2N とした。

## 結 果

### IL-3, IL-6, コンドロイチン硫酸 A, B, ヒアルロン酸の巨核球コロニー形成, コロニーサイズに与える影響

IL-3 と IL-6, IL-3 と IL-6 に各種濃度のコンドロイチン硫酸 A, B, ヒアルロン酸をそれぞれ無血清培養下で加えた時の巨核球コロニー数を Fig. 2, 3 に示す。即ち IL-3 と IL-6 の系に比べ, コンドロイチン硫酸 A, B, ヒアルロン酸それぞれを加えた系で巨核球コロニー数は有意に増加した。しかし Fig. 3 に示す様にコンドロイチン硫酸 A, B, ヒアルロン酸とも 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で巨核球コロニー数は有意に増加したが, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と濃度を変えても巨核球コロニー数の増加に有意差は認められなかった。

各系のコロニーサイズを Fig. 4 に示す。IL-3 と IL-6 の系に比べ, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のコンドロイチン硫酸 A, B, ヒアルロン酸をそれぞれ加えた系ではコロニーサイズの増加傾向がみられたが有意ではなかつ

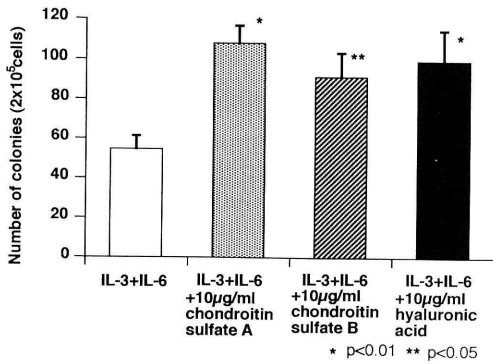
た。これはコンドロイチン硫酸 A, B, ヒアルロン酸の濃度を 50  $\mu\text{g}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に増加しても同様であった。

### IL-3, IL-6, コンドロイチン硫酸 A, B, ヒアルロン酸の巨核球 DNA 量に与える影響

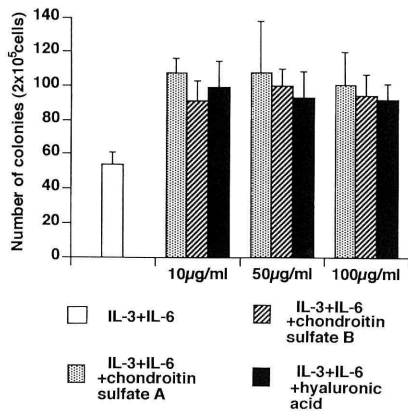
IL-3 と IL-6, IL-3 と IL-6 と 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  コンドロイチン硫酸 A, IL-3 と IL-6 と 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  コンドロイチン硫酸 B, IL-3 と IL-6 と 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ヒアルロン酸の系において DNA 量を測定した (Fig. 5)。IL-3 と IL-6 の系では最大が 16N であるのに対し, コンドロイチン硫酸 A, B それぞれを加えた系では最大が 32N と増加したが, 統計的に有意差は認めなかった。ヒアルロン酸を加えた系では最大が 16N と差は認められなかった。それぞれの平均は IL-3 と IL-6 では 8.24 N  $\pm$  4.36, IL-3 と IL-6 とコンドロイチン硫酸 A では 11.64 N  $\pm$  7.08, IL-3 と IL-6 とコンドロイチン硫酸 B では 10.12 N  $\pm$  7.32, IL-3 と IL-6 とヒアルロン酸では 6.96 N  $\pm$  3.93 であった。

## 考 察

近年血液幹細胞の分化, 増殖過程の研究が進み, 造血機構が次第に明らかにされつつあるが, 巨核球の分化成熟及び血小板産生の過程はまだ完全に解明されていない。巨核球の増殖と分化の初期の段階に

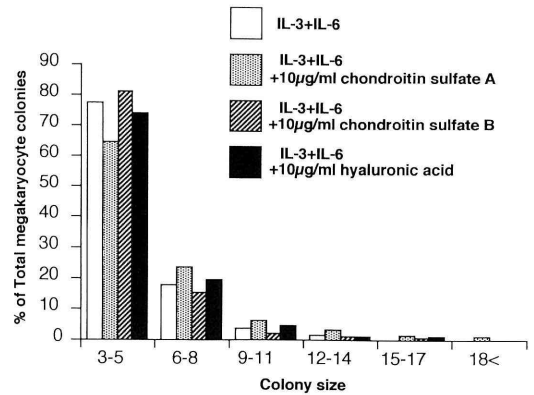


**Fig. 2** The number of megakaryocyte colonies formed by  $2 \times 10^5$  cells is shown. Effect of IL-3 plus IL-6, IL-3 plus IL-6 plus 10 µg/ml chondroitin sulfate A, IL-3 plus IL-6 plus 10 µg/ml chondroitin sulfate B and IL-3 plus IL-6 plus 10 µg/ml hyaluronic acid on megakaryocyte colonies. Data represent the mean±SD of pooled data from three separate experiments. Differences between colony numbers are analyzed using the non-parametric Wilcoxon test.

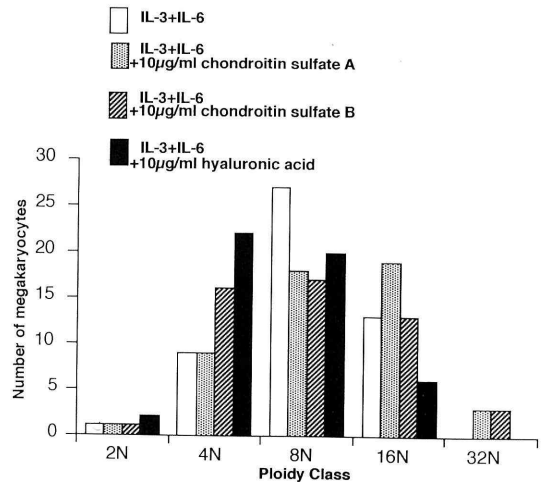


**Fig. 3** The number of megakaryocyte colonies formed by  $2 \times 10^5$  cells is shown. Effect of IL-3 plus IL-6, IL-3 plus IL-6 plus 10, 50, 100 µg/ml chondroitin sulfate A, IL-3 plus IL-6 plus 10, 50, 100 µg/ml chondroitin sulfate B and IL-3 plus IL-6 plus 10, 50, 100 µg/ml hyaluronic acid on megakaryocyte colonies. Differences between colony numbers are analyzed using non-parametric Wilcoxon test.

は幹細胞刺激因子(stem cell factor), IL-3, IL-6などのサイトカインが関与しているとされるが, それらの刺激因子がどの様にかかわりあっているのか,



**Fig. 4** Effect of proteoglycans on number of megakaryocyte colony forming cells.



**Fig. 5** Ploidy distribution of megakaryocyte colonies stimulated by IL-3 plus IL-6, IL-3 plus IL-6 plus 10 µg/ml chondroitin sulfate A, IL-3 plus IL-6 plus 10 µg/ml chondroitin sulfate B and IL-3 plus IL-6 plus 10 µg/ml hyaluronic acid.

あるいは巨核球の増殖と分化を抑制する因子(negative regulator)も推測されているが, その存在の証明はまだされていない。これは巨核球の分化成熟と血小板産生には他の血球の系統にはみられない複雑な機構が存在すること, 巨核球が他の造血細胞に比べて非常に少なく, その分離, 定量が困難であることなどがあげられる。巨核球が分化成熟し血小板が産生されるには2種類の因子が必要であるとされている<sup>10)</sup>。その第一の因子はそれを加えるだけで巨核球コロニーが形成される巨核球コロニー刺激因子

(megakaryocyte colony-stimulating factor: Meg-CSF) であり、第二の因子はそれだけ加えても巨核球コロニーを形成させる活性はないが、Meg-CSF とともに加えると巨核球のサイズ、核 DNA 量 (ploidy) を増加させたり、成熟を促進させる作用のある巨核球増幅因子 (megakaryocyte potentiator: Meg-POT) である。

今回の実験からコンドロイチン硫酸 A, B やヒアルロン酸の巨核球造血に及ぼす影響は Fig. 2 で示す様に、IL-3 と IL-6 のみの系に比較して、巨核球コロニー数は約 2 倍と増加したことから Meg-CSF 作用が主体であると考えられた。そしてその作用の強さはコンドロイチン硫酸 A, ヒアルロン酸, コンドロイチン硫酸 B の順であった。またこの 3 種類のプロテオグリカンの Meg-CSF 活性は Fig. 3 で示すとおり、10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  とそれらの濃度を変えても不変であった。コロニーサイズの比較については Fig. 4 に示すように IL-3 と IL-6 の系よりもコンドロイチン硫酸 A, B, ヒアルロン酸をそれぞれ 10  $\mu\text{g/ml}$  加えた系の方が増加傾向は認められたが有意ではなかった。更に Fig. 5 の結果より巨核球の核 DNA 量 (ploidy) については、IL-3 と IL-6 の系が最大 16N に対して、コンドロイチン硫酸 A, B は最大 32N, ヒアルロン酸は最大 16N と有意な増加は認められず、これらのプロテオグリカンの Meg-POT 作用はないか、あっても軽度であると考えられる。

プロテオグリカンは骨髄では静脈洞内皮細胞や線維芽細胞などのストロマ細胞が産生しており、造血における作用は最近までおもに血液前駆細胞とストロマ細胞との接着の際のメディエーターという観点から検討されてきた<sup>5-7)</sup>。また近年はプロテオグリカンがインターロイキン 3 や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を捕捉し、これらの造血因子の局所での濃度を高めることによって造血幹細胞の分化と増殖に関与しているとされている<sup>3)4)</sup>。

今回の著者らの研究ではプロテオグリカンは巨核球の増殖に、Meg-CSF 作用という形で直接的に関与していることが明らかとなったが、その作用がいかなる機序によるのかは今のところ明らかではない。プロテオグリカンを培養系に添加することにより、上に述べた様な巨核球系前駆細胞とストロマ細胞との接着を増強させたり、造血因子の局所濃度を増加させることにより Meg-CSF 作用が発揮されるのか、あるいはこれらとは異なった機序によるのか

は興味深いところである。

また多能性造血幹細胞や巨核球及び血小板自体がプロテオグリカンを産生しており、その種類はコンドロイチン硫酸であることが判明している<sup>11-14)</sup>。この様な血液細胞自身が産生しているプロテオグリカンの生理的作用もまだよく判っていない。今回の研究ではプロテオグリカンの Meg-POT 作用は明らかではなかったが、巨核球が成熟する際の細胞突起形成をグリコサミノグリカンが調節しているとの報告があり<sup>15)</sup>、この様な血小板生成過程の比較的後期におけるプロテオグリカンの作用については更に今後の研究が必要である。

ごく最近 c-mpl レセプターに結合するリガンド (ML リガンド) がクローニングされた。この因子には強い血小板増加作用があり、トロンボポエチンではないかと注目されている<sup>16)-19)</sup>。この ML リガンドの研究はまだその端緒をひらいたばかりであり、プロテオグリカンとの関係も今後重要な課題であると思われる。

以上述べた様に、今回の研究からプロテオグリカンには巨核球コロニー刺激因子としての作用があることが明らかとなったが、巨核球のプロテオグリカンに対するレセプターの有無をはじめとして解決すべき疑問点が多々残されており、今後の更なる検討が必要である。

## 結 語

マウス巨核球造血に及ぼすプロテオグリカンの影響を *in vitro* で検討し、次の様な結論が得られた。

1. インターロイキン 3, 6 の共存下でマウス巨核球コロニー数を増加させ、Meg-CSF 作用を示した。
2. この作用は濃度依存的ではなく、少量でも大量でも巨核球コロニーの増加率は一定であった。
3. 巨核球の核 DNA 量は増加させず、Meg-POT 作用は明らかではなかった。
4. Meg-CSF 活性発現の機序については明らかではなく、今後の更なる検討が必要である。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました伊藤久雄教授に深甚なる謝意を表します。また核 DNA 定量について便宜を図って下さいました本学外科学教室加藤治文教授、小中千守助教授、ならびに実験に御協力頂きました内科学教室第三講座林治博士、原田芳巳博士、並びに実験助手野本さい子氏



に感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Zuckerman KS, Wicha MS: Extracellular matrix production by the adherent cells of long-term murine bone marrow cultures. *Blood* **61**: 540~547, 1983
- 2) Gallagher JT, Spooncer E, Dexter TM: Role of the cellular matrix in haemopoiesis. I. Synthesis of glycosaminoglycans by mouse bone marrow cell cultures. *J Cell Sci* **63**: 155~171, 1983
- 3) Gordon MY, Riley GP, Watt SM, Greaves MF: Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* **326**: 403~405, 1987
- 4) Roberts R, Gallagher G, Spooncer E, Allen TD, Bloomfield F, Dexter TM: Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature* **332**: 376~378, 1988
- 5) Gordon MY, Riley GP, Clarke D: Heparan sulfate is necessary for adhesive interactions between human early hemopoietic progenitor cells and the extracellular matrix of the marrow microenvironment. *Leukemia* **2**: 804~809, 1988
- 6) Siczkowski M, Clarke, Gordon MY: Binding of primitive hematopoietic progenitor cells to marrow stromal cells involves heparan sulfate. *Blood* **80**: 912~919, 1992
- 7) Coombe DR, Watt SM, Parish CR: Mac-1 (CD11b/CD18) mediate the adhesion of hematopoietic progenitor cells to stromal cell elements via recognition of stromal heparan sulfate. *Blood* **84**: 739~752, 1994
- 8) Schiller S, Slover GA, Dorfman A: A method for the separation of acid mucopolysaccharides: its application to the isolation of heparin from the skin of rats. *J Biol Chem* **236**: 983~987, 1961
- 9) Meyer K, Chaffee E: The mucopolysaccharides of skin. *J Biol Chem* **138**: 491~499, 1941
- 10) Williams N: Two-factor requirement for murine megakaryocyte colony formation. *J Cell Physiol* **110**: 101~104, 1982
- 11) Okayama M, Oguri K, Fujiwara Y, Nakanishi H, Yonekura H, Kondo T, Ui N: Purification and characterization of human platelet proteoglycan. *Biochem J* **233**: 73~81, 1986
- 12) Schick BP, Walsh CJ, Jenkins-West T: Sulfated proteoglycans and sulfated proteins in guinea pig megakaryocytes and platelets *in vivo*. *J Biol Chem* **263**: 1052~1062, 1988
- 13) Mas-Oliva J, Arnold KS, Wagner WD, Phillips DR, Pitas RE, Innerarity TL: Isolation and characterization of a platelet-derived macrophage-binding proteoglycan. *J Biol Chem* **269**: 10177~10183, 1994
- 14) Shirota T, Tavassoli M: Expression of chondroitin sulfate as a unique type of proteoglycan on the cell membrane of multipotential and committed hemopoietic progenitor cells. *Biochim Biophys Acta* **1136**: 17~22, 1992
- 15) Hunt P, Hokom MM, Wiemann B, Leven RM, Arakawa T: Megakaryocyte proplatelet-like process formation *in vitro* is inhibited by serum prothrombin, a process which is blocked by matrix-bound glycosaminoglycans. *Exp Hematol* **21**: 372~381, 1993
- 16) Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JS, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM, Bell LA, Sprecher CA, Blumberg H, Johnson R, Prunkard D, Ching AFT, Mathewes SL, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Osborn SG, Evans SJ, Sheppard PO, Presnell SR, O'hara PJ, Hagen FS, Roth GJ, Foster DC: Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production *in vivo*. *Nature* **369**: 565~568, 1994
- 17) Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Brailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, Roth GJ, Papayannopoulou T, Foster DC: Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* **369**: 568~571, 1994
- 18) Wendling F, Maraskovsky E, Debili N, Florindo C, Teepe M, Titeux M, Methia N, Breton-Gorius J, Cosman D, Vainchenker W: c-Mpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* **369**: 571~574, 1994
- 19) de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ, Oles KJ, Hultgren B, Solberg Jr LA, Goeddel DV, Eaton DL: Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* **369**: 533~538, 1994

## Effect of Proteoglycans on Mouse Megakaryopoiesis

Keiko KATABAMI, Tsunemichi SHIROTA

Department of Internal Medicine, Tokyo Medical College  
(Director : Prof. Hisao ITO)

Establishment of an extracellular matrix in the bone marrow is essential for the proliferation and differentiation of hemopoietic progenitor cells. Among various extracellular matrix components, proteoglycans are increasingly implicated as a major factor in the regulation of hemopoiesis.

Whether proteoglycans stimulate hemopoiesis directly or not is an unsolved question. We therefore studied the effect of proteoglycans on mouse megakaryopoiesis *in vitro*.

Bone marrow cells of mouse femur were cultured with chondroitin sulfate A, B and hyaluronic acid in the presence of interleukin 3 and 6, then the number and the size of megakaryocyte colonies and the ploidy of megakaryocytes were examined. Chondroitin sulfate A, B and hyaluronic acid increased the number of megakaryocyte colonies but not the colony size nor the ploidy of megakaryocytes. Increase of the number of megakaryocyte colonies was most prominent in the experiment with chondroitin sulfate A. Concentration of proteoglycans did not affect the rate of increase of the number of megakaryocyte colonies. These data indicate that proteoglycans have potential as megakaryocyte colony-stimulating factors (Meg-CSF). The activity of proteoglycans as megakaryocyte potentiators (Meg-POT) was not proved. The mechanisms through which proteoglycans act as a Meg-CSF in mouse megakaryopoiesis remain unclear.

---

<Key words> Megakaryopoiesis, Extracellular matrix, Proteoglycan.

---