

論文の内容の要旨

論文題目 慢性骨髄単球性白血病由来 CD34 陽性細胞株の樹立と樹状細胞への分化

指導教官 平井 久丸 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 正田絵里子

慢性骨髄単球性白血病(CMML)は骨髄異形成症候群(MDS)の一型で、MDSは多能性幹細胞のクローン増殖による疾患である。従ってMDSにおける血球異常は各系統にみられる。感染症はMDS患者に頻繁にみられ、死因の約35%を占める。易感染性は好中球減少と好中球機能異常がその主な原因であると考えられているが、単球系の機能異常が関与しているという見方もある。しかしMDSにおける単球・マクロファージ系の機能異常についてはほとんど報告がない。

マクロファージ(MΦ)は食食、殺菌、抗原提示、腫瘍細胞傷害、分泌、骨の形成と吸収、脂質の代謝作用など多様な機能を持ち、生体の防御機能や恒常性の維持に重要な役割を担っている。これら全身に存在するすべてのMΦは骨髄内の前駆細胞から分化成熟した血中単球(Mo)に由来すると考えられている。

ヒトMoをgranulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)やmacrophage colony-stimulating factor(M-CSF)存在下で培養すると、MΦへの分化が誘導される。GM-CSFとM-CSFで誘導されたMΦ(それぞれGM-MΦ、M-MΦと称す)は形態や細胞表面抗原の発現が異なる。GM-MΦはヒト肺胞MΦと形質が似ており、一方M-MΦはその形質からヒトの腹腔MΦに似ている。

また樹状細胞(DC)は抗原提示のプロフェッショナル細胞として免疫応答に重要な細胞である。とくに一次免疫応答におけるT細胞活性化はDCのみで誘導

され、MΦやB細胞では誘導されない。ヒト Mo を GM-CSF と interleukin-4 (IL-4) 共存下で培養すると、DC の分化が誘導される。この細胞は細胞突起を有する浮遊性の細胞で、骨髄球系 DC に特徴的である CD1a を強く発現している。

さらに単核の Mo や MΦ が融合して形成される多核巨細胞はさまざまな感染、異物反応、癌、サルコイドーシス、リウマチなどの炎症の場や骨吸収にかかわる破骨細胞として存在する。ヒト Mo を M-CSF と IL-4 共存下に培養すると 2~3 核から 10 数個の核を有する多核巨細胞(MGC)が形成されることがわかっている。

ヒト Mo は分化能において柔軟性のある細胞であり、種々の炎症の場で形質の異なる MΦ、DC、あるいは MGC に分化し免疫応答の調節や病態の発現にかかわっている。第一部では CMML-Mo について、その分化能や機能について調べる。

MDS は後に高率に白血病化することが知られている。その多くは骨髄性白血病であるが、骨髄性白血病は骨髄球系分化過程の早い段階で分化が止まっているものと定義されている。近年正常な DC の分化過程がわかってきて、DC と Mo は monocyte-DC colony-forming unit (mono-DC-CFU)と呼ばれる前駆細胞から GM-CSF と tumor necrosis factor- α (TNF α)の影響下で分化することが証明された。また白血病細胞から DC ができることが知られるようになり、白血病細胞由来 DC は通常の DC と同様の形質と機能を有し、同種 T 細胞の活性化だけでなく自己 T 細胞を活性化して細胞障害活性を誘導できることがわかり、腫瘍免疫療法の開発に役立つものと期待されている。さらに CD34⁺白血病細胞からの DC への誘導や細胞株の樹立により、DC の免疫における機能や骨髄球系分化の早い段階での DC 前駆細胞の追求と、この DC 前駆細胞から最終分化段階に至る経路を詳細に解析できる可能性がある。

今回 mono-DC-CFU と同様の方法で CD34⁺白血病細胞から白血病細胞由来 DC を得ることができた。そしてこの CD34⁺白血病細胞から細胞株を樹立することに成功した。第二部では CMML 経過中に白血病化した患者の CD34⁺白血病細胞から樹立した細胞株を用いて、白血病細胞および細胞株の DC への分化について検討する。

1. CMML の Mo/MΦ系細胞の分化や機能について

末梢血から単核球(PBMC)を分離し、磁気細胞分離システム(MACS)で CD14 ポジティブセレクションをして Mo を分離した。CMML-Mo の細胞表面抗原の

発現は、正常 Mo と同様に CD13、CD33、HLA-DR、Fc γ R I、Fc γ R II を認め
た。しかし正常 Mo では約 10%程度 Fc γ R III(CD16)が発現しているが、この
CMML-Mo は Fc γ R IIIがほとんど発現していなかった。CD14⁺/CD16⁺Mo はより
分化した形質を有しているといわれており、従って CMML-Mo は未分化な細胞
といえる。CMML -Mo は正常 Mo と同様に M Φ や DC に分化したが、MGC 形
成は全く認めなかった。また分化した M Φ も正常のそれと形態が大きく異なっ
ていた。CMML の場合異常クローン由来であること、それによるサイトカイン
産生の違いや産生量の多少が影響を及ぼしている可能性がある。

M Φ の細胞表面抗原は、CMML-M-M Φ は正常 M-M Φ と同様 HLA-DR⁺CD14⁺
だが正常と異なり CD71 が発現し、CMML-GM-M Φ は正常と異なり CD14 の発
現が高い。両 M Φ とも正常 M Φ と比べて Fc γ レセプター(Fc γ R)の発現が異な
り、両 M Φ で Fc γ R I の発現が弱く、Fc γ R IIIの発現がほとんど認められな
かった。しかし Fc γ R が不完全であるにもかかわらず、感作ヒツジ赤血球の貪食
が認められ Fc γ R 相互の役割を示唆するものと考えられる。

Mo/M Φ の感染防御に対して重要なエフェクター分子である活性酸素(O₂⁻)産生
能を PMA と zymosan 刺激で調べた。正常 Mo では PMA 優位の O₂⁻産生を認め
たが、CMML-Mo は産生が低く、M-M Φ は正常でも Mo より産生は低いが、
CMML-M-M Φ ではほとんど認めなかった。この O₂⁻産生は細胞内蛋白の p47phox
と p67phox に依存しているので、これらを Western blot analysis で Mo と M-M Φ
について調べたところ正常、CMML とも検出された。CMML の O₂⁻産生障害は
個体差もあるが、NADPHoxidase を構成する他の分子の欠損や活性化シグナル
の異常が考えられる。

DC の細胞表面抗原の発現は正常 DC と CMML-DC でほとんど変化がなく、
その大部分が CD1a⁺、HLA-DR⁺で、共刺激分子の CD80 や CD86 陽性、正常 DC
と同様 T 細胞を活性化した。正常 CD14⁺Mo のうち CD2⁺のもの(約 3 分の 1)
が DC に分化することが知られている。CMML-Mo はそのほとんどが CD2⁺で DC
前駆細胞といえる。

2. 白血病細胞の DC への分化と細胞株の樹立

白血病細胞が CD 34 陽性であることを利用して、PBMC を MACS で CD 34
ポジティブセレクションした。CD 34 陽性白血病細胞はそのほとんどが c-kit⁺で
多能性幹細胞としての形質を有したが、同時に HLA-DR、CD71、CD38、CD33、
CD13 も発現し骨髓球系へのコミットメントを示した。骨髓球系 DC に発現す

る CD1a は陰性で、また幼若細胞に発現している CD7 は陽性、ヒト末梢血の DC 前駆細胞の抗原といわれる CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen) や CD11c、CD11b は陽性で前駆細胞の形質を有していると考えられた。

この白血病細胞を GM-CSF と TNF- α 共存下に DC へ分化誘導した。14 日後に得られた DC は培養開始時の 20~35% だった。この DC は HLA-DR、CD1a が強発現し、CD80、CD86、CD40、CD54、CD83、E-cadherin およびランゲルハンス細胞の Birbeck 顆粒に反応する Lag 抗体も陽性だった。

次にこの白血病細胞を細胞株を樹立する目的で様々なサイトカインを添加して培養したが増殖しなかった。このためこの白血病細胞を OP9 をストローマ細胞として共培養した。この際サイトカイン無添加のものと、GM-CSF を添加した条件で培養を開始した。増殖した細胞を限界希釈法で 11 週後に細胞株を得た。これらの細胞の形態はサイトカイン無添加の細胞が円形~涙形で、GM-CSF 添加の細胞の方がやや大きく円形であった。二倍増殖時間はそれぞれ 130 時間、144 時間だった。この細胞株はもとの白血病細胞と同様に CD34、c-kit、HLA-DR、CD71、CLA の発現は保持されているものの、CD38、CD11c は陰性化した。これらの結果より樹立した細胞株はもとの白血病細胞と比較した場合分化段階が若干違ってきていると考えられた。

しかしこれらの細胞株はもとの白血病細胞と同じ分化誘導条件で DC に分化した。どちらの細胞株も分化誘導開始時の細胞より得られた DC の方が少なく、他の細胞は死んでいた。すなわちこの細胞株の中のある一群が DC の前駆細胞であることが予想された。

現在までに DC の前駆細胞はマウスで c-kit⁺ 骨髄造血前駆細胞、ヒトで末梢血の CD34⁺CLA⁺細胞、CD34⁺ 33⁺ 11b⁺ 14⁺細胞、CD1a⁺CD11c⁺細胞、ヒト骨髄中の CD34⁺86⁺細胞などが知られている。今回樹立した細胞株からは CD7⁺分画よりも CD7⁺分画からより多くの DC が得られることがわかった。

また stem cell factor や Flt3/flk2-ligand は GM-CSF と TNF- α による DC の分化誘導を増強し、TGF β -1 がランゲルハンス DC への分化誘導に重要な役割を担うことが示されている。今後 DC 前駆細胞を細胞表面抗原で分画し限定していく作業やサイトカイン付加条件を変えていくことにより、大量の DC を得る方法および DC 分化の分子機構を検討する予定である。