

論文の内容の要旨

論文題目 リンパ造血前駆細胞から T 細胞前駆細胞への分化に必要なサイトカインのクローンレベルでの解析

(CYTOKINE REQUIREMENT FOR THE DEVELOPMENT OF T-LYMPHOID LINEAGE POTENTIAL IN CLONAL LYMPHOHEMATOPOIETIC PROGENITORS *IN VITRO*)

氏名 馬 峰

1 背景

T 細胞前駆細胞は、胎生期は卵黄嚢、あるいは胎仔肝に、出生後は骨髄中に存在するリンパ造血前駆細胞を起源とし、胸腺に遊走した後、そこで T 細胞として分化成熟する。マウス T 細胞前駆細胞の胸腺内の分化成熟過程の詳細な解析は、胎仔胸腺器官培養法 (FTOC; fetal thymus organ culture) により可能となったが、リンパ造血前駆細胞から T 細胞前駆細胞への分化については、適当な解析法がないために、十分に検討されていなかった。

本研究において私は、まずこの問題を解析するために、造血細胞のクローン培養法と FTOC を組合せて、マウスリンパ造血前駆細胞からの T 細胞の誘導法を確立した。さらに、この方法を用いて、マウスリンパ造血前駆細胞から T 細胞前駆細胞への分化に必要なサイトカインについて、クローンレベルで解析した。

2 方法

①マウス造血細胞のクローン培養法

C57BL/6 マウスに 5-fluorouracil (5FU) (150 mg/kg)を尾静脈より注射した後、48 時間後にその骨髓細胞を採取し、採取された細胞から比重 1.063-1.085 の細胞分画を得た。これらの細胞を、 α メディウム、メチルセルロース(1.2%)、ウシ胎仔血清(30%)、ウシ血清アルブミン(1%)、2-メルカプトエタノール ($1 \times 10^{-4} \text{M}$)、種々に組合せたサイトカインの存在下で、37°C、5%CO₂ の条件で培養した。

②胎仔胸腺器官培養法(FTOC)

FTOC は、Jenkinson らの方法によった。FTOC 培養液としては、ウシ胎仔血清(20%)、2-メルカプトエタノール($5 \times 10^{-5} \text{M}$)、L-グルタミン(200 mM)、非必須アミノ酸含有 MEM(x1)、ビタミン含有 MEM(x1)、重炭酸ナトリウム(2 mg/ml)、ペニシリン(100 U/ml)、ストレプトマイシン(100 mg/ml)を含む RPMI-1640 を用いた。胎生 15 日のマウス胎仔より胎仔胸腺を取り出し、1.35mM 2-デオキシグアノシン処理により内因性の T 細胞を除去した。胸腺と細胞を、30ml の FTOC 培養液とともに、テラサキプレートに付置した後に、37°C、7%CO₂ の条件下で 48 時間倒立培養した。その後、胸腺を FTOC 培養液を浸透させたスポンジに上層したフィルター上に付置し、同様の培養条件下で、3 日毎に FTOC 培養液を交換しつつ、3 週間培養を継続した。培養終了後、胸腺内の細胞は、カバーガラスにより圧出、採取された。採取された細胞の細胞表面マーカーは、フローサイトメトリーにて検討した。

③単細胞培養

5FU 処理されたマウス骨髓細胞から、未分化な造血幹細胞/前駆細胞である lineage (Lin)⁻c-kit⁺Sca-1⁺ 細胞を、蛍光活性化細胞分離装置 (FACS; fluorescence activated cell sorter)を用いて単細胞分離し、96 穴平底プレートにて、20%胎仔ウシ血清、1%ウシ血清アルブミン、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 2-メルカプトエタノール、stem cell factor (SCF) (100ng/ml)、interleukin (IL)-6 (100ng/ml)、IL-7 (100ng/ml)を含む α メディウム(200ml)中で、37°C、5%CO₂ の条件下で単細胞培養した。1 週間後に形成された個々のコロニーは分割され、10%は構成細胞の形態学的観察、10%は二次コロニーの形成能の検討、80%は FTOC による T 細胞分化能の検討に用いた。

3 結果

①マウスリンパ造血前駆細胞からの T 細胞誘導法の確立

未分化なマウス造血幹細胞/前駆細胞は、SCF と IL-6 の組合せにより増殖す

ることが知られている。そこで、5FU 処理したマウス骨髄細胞を SCF(100ng/ml)、IL-6(100ng/ml)存在下で1週間クローン培養し、形成されたコロニーを採取した。採取された細胞の30-60%の細胞は未分化な芽球様細胞で、20-40%の細胞が二次コロニー形成能を有していたが、CD4、CD8、CD3 は発現していなかった。これらの細胞(1×10^4 個)を FTOC にて培養したところ、培養21日には胸腺中に $1-3 \times 10^5$ 個のリンパ球が存在した。これらの細胞は、47%が CD4/CD8 を、48%が CD3 を、12%が TCR $\alpha\beta$ を、15%が TCR $\gamma\delta$ を発現する T 細胞であった。このように、クローン培養法と FTOC を組合せることにより、マウスリンパ造血前駆細胞から T 細胞の誘導が可能となった。

②マウスリンパ造血前駆細胞から T 細胞前駆細胞への分化に必要なサイトカインの検討

SCF、IL-6、IL-3 の協同作用により、マウスの未分化な造血細胞の増殖が誘導されることが報告されている。そこで、5FU 処理されたマウス骨髄細胞を、これらのサイトカインを種々に組合せてクローン培養した後、形成されたコロニー構成細胞を FTOC にて培養することにより、その T 細胞への分化能を検討した。その結果、いずれの組合せで形成されたコロニーも T 細胞への分化能を有していた。さらに、同じくマウスの未分化な造血細胞に作用すると報告されている Flt3/Flk2 リガンド(FL)、IL-11 について検討したところ、各々 SCF、IL-6 に類似した作用を有していた。T 細胞分化に重要な役割を担っていると報告されている IL-7 は、胸腺中のリンパ球を増加させる傾向が認められたものの、リンパ造血前駆細胞から T 細胞前駆細胞への分化には大きな影響を及ぼさなかった。

③単細胞分離されたリンパ造血前駆細胞から T 細胞前駆細胞への分化の解析

リンパ造血前駆細胞から T 細胞前駆細胞への分化をさらに詳細に検討するために、5FU 処理されたマウス骨髄細胞から単細胞分離された Lin⁻c-kit⁺Sca-1⁺細胞を、SCF、IL-6、IL-7 存在下で単細胞培養したところ、384 個の Lin⁻c-kit⁺Sca-1⁺細胞のうち 361 個(94%)がコロニーを形成した。これらのうちの 71 個のコロニーを無作為に抽出し、二次コロニー形成能と T 細胞への分化能を検討した。二次コロニーとして、顆粒球・マクロファージコロニーのみを形成したコロニーは 28 個で、これらには T 細胞への分化能は認められなかった。一方、顆粒球・マクロファージコロニー以外に赤芽球バースト、巨核球コロニー、混合コロニーを形成した 43 個のコロニーのうち 10 個で T 細胞への分化能が認められた。

4 考察

未分化な造血幹細胞/前駆細胞の分化増殖は、種々のサイトカインの協同作用により制御されている。特に SCF、IL-6、IL-3 は、マウスの未分化な造血幹細胞/前駆細胞に作用するサイトカインとしてよく知られているが、今回の研究により、これらのサイトカインは、いずれの組合せでもリンパ造血前駆細胞から T 細胞前駆細胞への分化を支持できることが示された。さらに、FL、IL-11 も他のサイトカインとの組合せによりリンパ造血前駆細胞から T 細胞前駆細胞への分化を支持した。このように、リンパ造血前駆細胞の増殖を支持可能なサイトカインの組合せは、今回検討した全ての組合せで T 細胞前駆細胞への分化を支持できたことより、リンパ造血前駆細胞から T 細胞前駆細胞への分化は特異的な刺激により誘導されるものではなく、むしろ増殖に伴い内的因子により決定されている可能性が示唆された。

またこれまで、リンパ造血前駆細胞の分化過程において、T 細胞前駆細胞への分化がいずれの段階で起こるかは不明であった。今回の単細胞レベルでの解析において、T 細胞への分化能は多能性を有する造血前駆細胞の 14%に認められたが、骨髄球系細胞への分化能のみを有する造血前駆細胞では認められなかったことより、リンパ造血前駆細胞から T 細胞前駆細胞への分化決定はその分化の早期に起こると推測された。

このように、本研究において、マウス造血細胞のクローン培養法と FTOC を組合せることにより、私が確立したマウスリンパ造血前駆細胞から T 細胞への *in vitro* 分化誘導法は、マウス T 細胞の初期分化の解析に非常に有用であると考えられた。