

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文の題目 ヒト B 細胞初期分化に対する IL-3 の抑制作用の検討

指導教官 浅野 茂隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 6 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 宮本 光一郎

造血幹細胞由来の未分化な B 細胞は、表面抗原、再構成活性化遺伝子、プレ B 細胞受容体、サイトカイン要求性等の変化を伴って分化していく。こうした B 細胞の分化を解析するために、B 細胞の分化過程を *in vitro* で再現するための培養系が考案されてきた。マウスでは、Whitlock & Witte が骨髄間質細胞を使った B 細胞の長期培養系を開発して以来、Dexter 培養と組み合わせて B 細胞の増殖と分化の研究が進められてきた。その結果、マウス B 細胞発生へのサイトカインの影響は、サイトカイン添加実験およびノックアウトマウスの実験により、B 細胞発生の初期に作用するもの、あるいは後期に作用するものが明らかになってきた。しかし、ヒトの系については、B 細胞分化の後期段階での制御は比較的詳細に研究されてきたが、抗原に依存しない初期の B 細胞分化は Whitlock-Witte 共培養法に相当する生体外培養系がないため十分に解明されていなかった。しかし、Rawlings らが臍帯血 CD34⁺ 細胞から CD19⁺ B 細胞の産生に成功して以来、いくつかのヒト B 細胞培養系が報告されてきた。その中でもマウス骨髄由来ストローマ細胞株 MS-5 はヒト B 前駆細胞の分化増殖を支持し、stem cell factor (SCF) と granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) の添加により臍帯血 CD34⁺ 細胞からの B 細胞の産生が著しく増加することが明らかになった。

interleukin (IL)-3 は、活性化 T 細胞、単球/マクロファージ、ストローマ細胞によって産生される多系統造血因子で、リガンド結合性 α 鎖とシグナル伝達性 β

鎖からなる IL-3 レセプター (IL-3R) を介してその機能を発揮する。IL-3 は好中球、好酸球、好塩基球、巨核球、赤血球等様々な系統の造血細胞の増殖分化を刺激するばかりでなく、B 細胞の分化にも影響を与えることが報告されている。マウスの系では IL-3 はプレ B 細胞の増殖を刺激することが報告されているが、一方リンパ造血前駆細胞からの B 細胞の初期分化は IL-3 によって阻害されることが示されている。しかしヒトの系については、IL-3 は B 細胞分化の後期には B 細胞増殖因子として作用することが報告されているものの、その初期分化に及ぼす影響についてはほとんどわかっていない。本研究では、MS-5 との共培養による臍帯血 CD34⁺ 細胞からのヒト B 細胞分化誘導法を用いて、IL-3 のヒト B 細胞分化、特にその初期分化に及ぼす影響について検討した。

[研究方法]

臍帯血 CD34⁺ 細胞は臍帯血単核球から磁気ビーズ法で精製した。臍帯血 CD34⁺ CD38⁺ or ⁻ 細胞、CD34⁺ IL-3R α ⁺ or ⁻ 細胞は FACSVantage で分取し、各々使用した。

臍帯血 CD34⁺ 細胞の B 細胞への分化能は MS-5 との共培養系により解析した。2x10³ 個の臍帯血 CD34⁺ 細胞を、10 % 牛胎仔血清、100 ng/ml SCF、10 ng/ml G-CSF を含む α -MEM とともに、MS-5 がほぼコンフルエントな状態となったプレートに播種して 4 週間共培養した。一部の実験では、10 ng/ml macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)、あるいは各種濃度の IL-3 を共培養系に加えた。myeloid 系への分化能を評価するためにはメチルセルロース培養をした。メチルセルロース培養は、細胞を 0.9 % メチルセルロース、30 % 牛胎仔血清、1 % 牛血清アルブミン、5x10⁻⁵ mol/l 2-メルカプトエタノール、10 ng/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、20 ng/ml IL-3、100 ng/ml IL-6、100 ng/ml SCF、10 ng/ml G-CSF、10 ng/ml thrombopoietin (TPO)、2 U/ml erythropoietin を含む α -MEM 1ml とともに浮遊培養用培養皿に播種することにより行われ、2 週間後に形成されたコロニーを倒立顕微鏡下で観察した。

単細胞培養は、単細胞分離された CD34⁺CD38⁻ 細胞を、100 ng/ml SCF、100 ng/ml IL-6、1 μ g/ml soluble IL-6 receptor (sIL-6R)、10 ng/ml TPO、あるいはこれに 20 ng/ml IL-3 を添加した 10 % 牛胎仔血清を含む α -MEM 100 μ l にて、1 週間 96 穴プレートで培養した。任意に選ばれた一次コロニー構成細胞の半分は MS-5 との共培養系により、残り半分はメチルセルロース培養により各々 B 細胞への分化能、

myeloid 系への分化能を評価した。

培養細胞の CD19 発現は免疫細胞化学的に、あるいはフローサイトメトリーで検出した。

[結果及び考察]

1 臍帯血 CD34⁺細胞と MS-5 との共培養において、サイトカイン無添加の条件下では4週間の培養後少数の細胞が認められたのみであったが、100 ng/ml の SCF と 10 ng/ml の G-CSF を添加することにより、多数の CD45⁺CD19⁺B 細胞の出現が認められた。共培養中の細胞における表面マーカーの発現の経時的推移をフローサイトメトリーで観察したところ、14日目にはリンパ球ゲート中の細胞の20~25%が CD34⁺細胞、約5%が CD19⁺細胞であったが、28日目には大部分の培養細胞は CD19⁺細胞となり、CD34⁺細胞はほとんど認められなかった。

2 IL-3 (20ng/ml)を臍帯血 CD34⁺細胞と MS-5 の共培養に添加すると、IL-3 が添加された培養中の CD19⁺B 細胞は大幅に減少し、IL-3 添加により臍帯血 CD34⁺細胞からの CD19⁺B 細胞の産生は抑制された。B 細胞の産生に対する IL-3 の抑制効果を確認するために MS-5 との共培養系に種々の濃度の IL-3 を添加したところ、IL-3 は濃度依存的に B 細胞の産生を抑制した。さらに、IL-3 と同様にマクロファージの増殖分化を促進する M-CSF を MS-5 との共培養系に添加して、B 細胞およびマクロファージの産生を比較した。SCF と G-CSF のみに比べて IL-3 または M-CSF を添加した系はともに CD14⁺マクロファージ産生量は3倍以上に増加したが、B 細胞産生量は IL-3 を添加した系では減少したが、M-CSF を添加した系では減少しなかった。この結果より、IL-3 の臍帯血 CD34⁺細胞からの B 細胞産生抑制作用は、マクロファージを介する作用ではなく、IL-3 の直接作用と推測された。

3 臍帯血 CD34⁺細胞の IL-3R α 陽性分画と IL-3R α 陰性分画を分取した。IL-3R α ⁻細胞を SCF, G-CSF 存在下で MS-5 と共培養しても、わずかな CD19⁺B 細胞しか産生されなかったが、対照的に IL-3R α ⁺細胞は大量の CD19⁺B 細胞を産生した。さらに、IL-3R α ⁺細胞と MS-5 の共培養系へ IL-3 (20ng/ml)を添加すると B 細胞産生は抑制された。この結果は IL-3R α ⁺細胞は MS-5 との共培養系で SCF と G-CSF に反応して CD19⁺B 細胞を産生するが、IL-3 存在下では IL-3 受容体を介する刺激によりその B 細胞産生は抑制されることを示唆すると考えられた。

4. IL-3 が CD34⁺細胞からの B 細胞の産生に関して抑制因子として働く時期

を特定するために、時差添加実験を行った。臍帯血 CD34⁺ 細胞と MS-5 の共培養系において、IL-3 が培養 7 日目あるいは 14 日目に添加された場合には、IL-3 の抑制効果は認められたが、培養 21 日目に IL-3 を添加しても B 細胞産生に影響はなかった。さらに MS-5 との共培養の最初の 3 日間 SCF と G-CSF に加えて IL-3 を添加し、その影響を調べた。培養初期における IL-3 への短期曝露によっても、臍帯血 CD34⁺ 細胞からの B 細胞産生は抑制された。B 細胞産生能を有する臍帯血 CD34⁺ 細胞は IL-3 R α を発現していること、また、培養 14 日目には培養細胞の約 20% は CD34⁺ 細胞であるが CD19⁺ 細胞は 5% にすぎないという観察結果と合わせて、これらの結果から IL-3 は CD34⁺ 細胞からの B 細胞発生の初期の CD19⁺ B 細胞の出現前にその抑制作用を発揮することが示唆された。

5. MS-5 との共培養系における臍帯血 CD34⁺ 細胞からの B 細胞産生に対する IL-3 の抑制効果は、培養初期においてその効果を発揮することより、マウスと同様にヒトでも、IL-3 は未分化なリンパ造血幹細胞／前駆細胞からの B 細胞の初期分化を抑制する可能性が示唆された。そこで、FACS にて単細胞分離された臍帯血 CD34⁺ CD38⁻ 細胞を、TPO+ SCF+ IL-6+ 可溶性 IL-6 レセプター存在下で 7 日間単細胞培養し、IL-3 添加群、非添加群で、B 細胞産生能を比較検討した。IL-3 無添加で培養されたコロニーには B 細胞、myeloid 系への分化能が認められたが、IL-3 を添加して培養されたコロニーには B 細胞分化能は認められなかった。この結果から、CD34⁺ CD38⁻ 細胞はリンパ造血幹細胞／前駆細胞を含んでおり、IL-3 はそれらの B 細胞系への分化に抑制効果を有すると考えられた。

以上の研究結果より、IL-3 はヒト B 細胞の初期分化、特にリンパ造血幹細胞／前駆細胞の B 細胞系への分化に対して抑制的に作用することが示された。