

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 宮 本 光 一 郎

本研究は、種々の血液細胞の増殖分化の刺激因子として知られている IL-3 のヒト B 細胞の初期分化に対する影響を、SCF、G-CSF 存在下でのマウスストローマ細胞株 MS-5 との共培養系を用いて検討し、以下の結果を得ている。

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 の直接作用と考えられた。
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-3R 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、本論文はマウスストローマ細胞株MS-5との共培養系において、IL-3がヒト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を明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかったヒトB細胞の初期分化における調節機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。