

学位論文題名

Synergistic effects of murine stem cell factor
in combination with a variety of cytokines
on the expansion of murine hematopoietic progenitor
cells in short term suspension cultures

(短期液体培養による造血前駆細胞増幅における
murine stem cell factor および
種々のサイトカインの相乗作用)

学位論文内容の要旨

目 的

最近, ストローマ細胞由来の新たな造血因子が精製され, stem cell factor (SCF), mast cell growth factor (MGF), c-kit ligand と命名された。SCF は *in vitro* で 5-FU 処理を受けたマウス骨髄細胞のコロニーを形成させるが, 今回の研究では, 筆者は SCF と種々のサイトカインの組み合わせによる造血前駆細胞の増幅を液体培養で検討した。

材料および方法

- 1) マウス: 8-12週齢の近交系雄性 BALB/c マウスを用いた。
- 2) 造血因子: Stem cell factor (SCF), (COS cell conditioned medium), recombinant human interleukin-1 β (rhIL-1 β), recombinant murine interleukin-3 (IL-3), recombinant human interleukin-6 (IL-6) と natural human macrophage colony stimulating factor (M-CSF) を用いた。
- 3) 骨髄単核細胞浮遊液の作製: 頸椎脱臼でマウスを殺し, 1×10^6 個/ml の骨髄単核細胞浮遊液を作製した。

- 4) 液体培養：骨髓単核細胞浮遊液を24 well tissue culture plate に1 mlずつ植えた後、IL-1 β 50ng/ml, IL-3 100U/ml, SCF 5% (V/V), IL-6 100ng/ml, M-CSF 1000U/mlを単独あるいはSCFと他のサイトカインを組み合わせで添加し、培養液の交換をせずに5日間培養した。培養後よく pipetting して、細胞を harvest し、CFU-HPP (high proliferative potential colony forming unit) assay, 造血前駆細胞 assay, CFU-S (colony forming unit in spleen) assay を行なった。
- 5) CFU-HPP assay : 1×10^5 個の新鮮骨髓細胞あるいは上記サイトカインを用いて液体培養した細胞を FCS 30% と 0.3% agar 添加 IMDM 培養液 1 ml に入れ、直径35mm tissue culture dish に植え込んだ。刺激因子として IL-1 β 50ng/dish, IL-3 50U/dish と M-CSF 5000U/dish とを加えて11-14日間培養した。直径0.5mm以上のコロニーを CFU-HPP として算出した。
- 6) CFU-GM (colony forming unit-granulocyte/macrophage), BFU-E (burst forming unit-erythroid) assay : 1×10^5 個の新鮮骨髓細胞あるいは上記サイトカインを用いて液体培養した細胞を FCS 30%, BSA 1%, 2×10^{-5} M 2 ME と0.3% agar 添加 IMDM 培養液 1 ml に入れ、直径35mm tissue culture dish に植え込んだ。刺激因子として IL-3 200U/dish と Epo 10U/dish を加えて14日間培養した。50個以上の顆粒球とマクロファージを含んだコロニーを CFU-GM, 200個以上の赤芽球を含んだコロニーを BFU-E として算出した。
- 7) CFU-S assay : 8.0Gy の致死性的 X 線照射を受けた BALB/c マウスに 5×10^4 個の上記サイトカインを用いて液体培養した細胞を尾静脈より注入した。対照群として新鮮骨髓細胞を注入した。注入後14日目にマウスを殺し、脾臓を摘出し直ちに Bouin 固定液に入れ、翌日、脾臓表面にできたコロニー数を数えた。

結 果

1) SCF 単独による造血前駆細胞の増幅

未熟な造血前駆細胞 CFU-HPP は SCF 単独では2.5倍の増加しか示さなかったが、成熟した造血前駆細胞 CFU-GM と BFU-E は11.4倍と18.3倍の増加を示した。

2) SCF と他のサイトカインとの組み合わせによる造血前駆細胞の増幅

CFU-HPP では、SCF を IL-1 β , IL-3, IL-6 あるいは M-CSF と組み合わせたところ、SCF 単独群より1.4-3.8倍の増幅を示した。さらに、IL-1 β , IL-3 と SCF を一緒

に添加したところ、SCF 単独群より IL-1 β +IL-3+SCF 群では CFU-HPP は6.4倍、BFU-E は1.6倍の増加を示し、最も著しい増幅作用が認められた。

3) Day14 CFU-S の増幅：5% SCF 単独群と IL-1 β +IL-3 群とでは CFU-S の増幅を認めなかったが、IL-1 β +IL-3+SCF の組み合わせで、CFU-S は2.2倍に増幅された。

考 察

骨髄移植の生着及び造血能回復は移入造血前駆細胞数に依存するとされており、これまでも GM-CSF, IL-3, IL-1 と IL-3, IL-3 と IL-6 などを用いて、in vitro における造血前駆細胞の増殖が試みられている。今回の実験系で、in vitro で短期液体培養にて、SCF 単独では成熟した造血前駆細胞 (CFU-GM, BFU-E) の増幅しか得られなかったが、SCF, IL-1 β , IL-3 を組み合わせたところ、未熟な造血前駆細胞 (CFU-S, CFU-HPP) の増幅も得られた。従って、白血病、再生不良性貧血、免疫不全症などに幅広く使われている骨髄移植においてもこの培養系応用の可能性を示唆するものと考えられる。このような造血前駆細胞増幅が可能であれば、自家骨髄移植の際に donor の骨髄血あるいは末梢血からの幹細胞の採取量を軽減できるものとする。しかし、SCF あるいは他のサイトカインによる自家血に混在している可能性のある腫瘍細胞の増殖に注意しなければならない。

結 語

IL-1 β +IL-3+SCF の組み合わせにより、造血前駆細胞の in vitro における増幅が可能となり、自家骨髄移植ひいては同種骨髄移植の際の骨髄血あるいは末梢血からの幹細胞の採取量の軽減化に有用であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保
副 査 教 授 小野江 和 則
副 査 教 授 皆 川 知 紀

研究目的

最近, sl マウスで異常があるとされる sl locus の産物で, 未熟な造血前駆細胞の増殖を刺激する stem cell factor (SCF) という新たな造血因子が同定された。そこで, SCF と種々のサイトカインとの組み合わせにより造血前駆細胞の増幅の可能性を液体培養で検討し, 骨髄移植の際の骨髄血あるいは末梢血採取量の軽減化ができるかどうかを窺った。

材料及び方法

10^6 個/ ml の BALB/c 雄性マウス骨髄細胞浮遊液を作製し, 骨髄細胞浮遊液を 24well plate に $1 ml$ ずつ植え, 培養液の交換をせずに 5 日間培養した。造血因子として stem cell factor (SCF), interleukin- 1β (IL- 1β), interleukin-3 (IL-3), interleukin-6 (IL-6), macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) を単独あるいは SCF と他のサイトカインを組み合わせで添加した。液体培養によって, 各種前駆細胞が増加しているか否かを確認するために, 液体培養後の細胞を harvest し, CFU-S (colony forming unit in spleen) assay, CFU-HPP (high proliferative potent colony forming unit) assay, CFU-GM (colony forming unit-granulocyte and/or macrophage) assay, BFU-E (burst forming unit-erythroid) assay などを行なった。

結 果

1) SCF 単独による造血前駆細胞の増幅

低濃度の SCF 単独での液体培養により, 成熟した造血前駆細胞 (CFU-GM, BFU-E) の著しい増幅を示し, CFU-GM は液体培養前より約11倍, BFU-E は約18倍の増幅を示した。しかし, 未熟な造血前駆細胞 CFU-HPP は10%SCF で液体培養前より2.5倍の増幅しか得られなかった。

2) SCF と他のサイトカインとの組み合わせによる造血前駆細胞の増幅

未熟な造血前駆細胞 CFU-HPP のより効率のよい増幅を得るために、SCF と種々サイトカインとの組み合わせによる効果的増幅が可能か否かを検討した。IL-1, IL-3, IL-6 と M-CSF 単独では CFU-HPP の増幅が認められなかったが、SCF と組み合わせたところ、SCF 単独より効果的な CFU-HPP の増幅が得られた。IL-1+SCF 群では SCF 単独群より約 4 倍の CFU-HPP 増幅が得られた。さらに、IL-1, IL-3 と SCF 三者を一緒に組み合わせたと、SCF 単独群より 6 倍、IL-1+SCF 群より 1.5 倍の増幅が認められた。

3) Day14 CFU-S の増幅

5% SCF 単独群と IL-1 β +IL-3 群とでは CFU-S の増幅を認めなかったが、IL-1 β +IL-3+SCF の組み合わせで、CFU-S は 2.2 倍に増幅された。

考 察

骨髄移植の生着及び造血能回復は移入造血前駆細胞数に依存するとされており、これまでも GM-CSF, IL-3, IL-1 と IL-3, IL-3 と IL-6 などを用いて、*in vitro* における造血前駆細胞の増殖が試みられている。今回の実験系で、*in vitro* 短期液体培養にて、SCF 単独では成熟した造血前駆細胞 (CFU-GM, BFU-E) の増幅しか得られなかったが、SCF, IL-1 β , IL-3 を組み合わせたと、未熟な造血前駆細胞 (CFU-S, CFU-HPP) の増幅も得られた。従って、白血病、再生不良性貧血、免疫不全症などに幅広く使われている骨髄移植においてもこの培養系の応用の可能性があることを示唆するものと考えられる。このような造血前駆細胞増幅が可能であれば、自家骨髄移植の際に donor の骨髄血あるいは末梢血からの幹細胞の採取量を軽減できるものと考えられる。しかし、SCF あるいは他のサイトカインによる自家血に混在している可能性のある腫瘍細胞の増殖に注意しなければならない。

結 語

IL-1, IL-3, SCF の三者組み合わせにより、未熟な造血前駆細胞の *in vitro* における増幅が可能となり、自家骨髄移植ひいては同種骨髄移植の際の骨髄血あるいは末梢血の採取量の軽減に有用であることが示唆された。

以上により本研究は博士の学位論文として妥当なものと判断される。