

学 位 論 文 題 名

Synergistic effects of interleukin - 1 β and interleukin - 3 on the expansion
of human hematopoietic progenitor cells in liquid cultures

（液体培養系におけるヒト造血前駆細胞増幅に対する
インターロイキン-1 β とインターロイキン-3 の相乗効果）

学位論文内容の要旨

目 的

すべての血球細胞は、多能性幹細胞から赤芽球、巨核球、顆粒球／マクロファージ系などの各種細胞への分化・増殖によって供給されている。これらの分化・増殖は種々の因子の複雑な組み合わせによって調節され、細胞系統、分化段階によって異なる調節因子が存在するとされている。これらの因子の中で、インターロイキン-1 β とインターロイキン-3 はともに多能性幹細胞の増殖を支持すると報告されている。筆者はこれまで液体培養系を用いて増殖因子の前駆細胞増幅を支持する能力を測定しようと試みてきた。今回の研究では、インターロイキン-3 とコロニー形成法にて相乗的に働くと報告されているインターロイキン-1 β の液体培養系における相乗効果について検討した。

材料および方法

- 1) 造血因子および抗体：造血因子として recombinant の human interleukin-1 β (IL-1), recombinant human interleukin-3 (IL-3), recombinant human interleukin-6 (IL-6), recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), recombinant human granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) を用いた。細胞純化には抗 HPCA-1 抗体 (CD34) を用い、直接効果なのか間接効果なのかを判定するために抗 IL-1 抗体、抗 IL-6 抗体、抗 G-CSF 抗体、抗 GM-CSF 抗体を用いた。
- 2) ヒト骨髓細胞の調整：正常ヒト骨髓を採取後、フィコール・コンレイに重層し比重遠沈に

て単核細胞を得た。培養皿にて1時間培養し、非付着細胞を集めた。この操作を2回繰り返して非付着細胞分画を得た。非付着細胞分画からニューラミニデース処理羊赤血球とのロゼット形成細胞を除去し、T細胞除去・非付着細胞分画を得た。CD34陽性細胞はT細胞除去・非付着細胞分画より抗 HPCA - 1 抗体と抗マウス IgG をコートした immunobeads を用いて分離した。

3) 液体培養：細胞を6-well plate に5 mlずつ植え込み、IL-1 100 ng/ml, IL-3 100 u/ml, IL-6 100 ng/ml, GM-CSF 100 ng/ml, G-CSF 100 ng/ml を単独あるいは組み合わせて添加し一週間培養した。一部の実験系では抗 IL-1 抗体, 抗 IL-6 抗体, 抗 G-CSF 抗体, 抗 GM-CSF 抗体を培養系に加えた。培養後付着細胞をも含めて全細胞を回収し、コロニー形成法にて前駆細胞数の増減を検討した。

4) コロニー形成法： 2×10^4 個の新鮮骨髓細胞および上記サイトカインを用いて液体培養した細胞を、30%牛胎児血清, 1%牛血清アルブミン, 1×10^{-4} M 2-メルカプトエタノールと0.3%軟寒天を添加した培養液に入れ、白血球遊走プレートの各wellに0.4 mlずつ植え込んだ。刺激因子として IL-3 100 u/ml, EPO 2 u/ml を加えて14日間培養した。40個以上の顆粒球とマクロファージを含むコロニーを CFU-GM (顆粒球/マクロファージコロニー形成細胞), 100個以上の赤芽球を含むコロニーおよび3個のクラスターよりなるコロニーを BFU-E (赤芽球バースト形成細胞), 赤芽球と赤芽球以外の細胞よりなるコロニーを CFU-Mix (混合コロニー形成細胞) として算定した。

5) 限界希釈液体培養法：CD34陽性細胞を段階希釈して(各wellあたり1, 5, 25, 125個), 96-well plate に植え IL-3 および IL-1 と IL-3 の存在下で一週間培養した。一週間後, 8個以上の生細胞を含むwell を陽性として各希釈段階における陽性率を算定した。

結 果

1) 骨髓単核細胞を用いての造血前駆細胞増幅

CFU-GM, BFU-E, CFU-Mix いずれにおいても単独で添加された場合には IL-3 が最も効率良く前駆細胞を増幅した。IL-3 との組み合わせでは IL-1 のみが IL-3 単独と比較してより効率良く増幅した。IL-1 と IL-3 の組み合わせにて, CFU-GM は約4-11倍に, BFU-E は13-20倍に, CFU-Mix は20-40倍に増幅された。

2) 骨髓非付着細胞, 骨髓T細胞除去・非付着細胞を用いての造血前駆細胞増幅

IL-1 の相乗効果が直接効果か間接効果を調べるために, サイトカイン産生細胞である T

細胞およびマクロファージを除去した細胞分画で同様の実験を行ったところ、IL - 1 の IL - 3 に対する相乗効果は CFU - GM を除いて同様に認められた。

3) 抗サイトカイン抗体の効果

IL - 1 と IL - 3 の相乗効果に対する各種抗サイトカイン抗体の効果を検討するために IL - 1 と IL - 3 を添加した培養系に各種抗サイトカイン抗体を添加したところ、抗 IL - 1 抗体では IL - 1 の相乗効果は完全に消去され、抗 GM - CSF 抗体の添加によって部分的に消去された。

4) CD34陽性細胞を用いての造血前駆細胞増幅

CD34陽性細胞を用いて一週間培養すると、同様に IL - 3 単独に比べて IL - 1 と IL - 3 によってより多くの前駆細胞が維持された。単核細胞、非付着細胞、T細胞除去・非付着細胞を用いた時とは異なり、IL - 1 と IL - 3 によっても増幅されなかった。

5) 限界希釈液体培養における IL - 1 と IL - 3 の効果

CD34陽性細胞中で IL - 3 単独にたいしては24個中1個が反応して増殖し、IL - 1 と IL - 3 に対しては16個中1個が反応して増殖した。

考 案

今回の研究では in vitro 造血前駆細胞の増幅には試みた組み合わせの中では IL - 1 と IL - 3 が最も良かった。また IL - 1 の相乗効果は、一部T細胞やマクロファージ以外の骨髓ストローマ細胞からの GM - CSF 産生によるものと考えられた。しかしながら、相乗効果の主要な部分は直接効果によることが示唆された。CD34陽性細胞分画で IL - 1 と IL - 3 によっても増幅されなかったが、この結果は CD34陽性分画に骨髓ストローマ細胞さえ除去されてしまったためと考えられた。今回の研究では未熟前駆細胞である CFU - Mix を数十倍にまで増幅できたが、実際の骨髓移植に应用するためには真の骨髓幹細胞の増幅を確認することが必要であり、ヒトにおいても何らかの幹細胞確認法の開発が必要であろう。さらに今後の研究によって、より効率良く増幅する方法が開発され、ヒトでの幹細胞確認法が開発される必要があるが、今回の研究の試みは今後の骨髓移植に新しい展望をみたらす可能性があると考えられる。

結 語

IL - 1 と IL - 3 の組み合わせは液体培養系におけるヒト造血前駆細胞の増幅に対して有効であり、IL - 1 の効果は直接効果と間接効果との両方によ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 皆 川 知 紀

副 査 教 授 川 上 義 和

I 研究目的

すべての血球細胞の分化・増殖は種々の因子の複雑な組み合わせによって調節され、細胞系統、分化段階によって異なる調節因子が存在するとされている。これらの因子の中で、インターロイキン-1 β とインターロイキン-3はともにマウス多能性幹細胞の増殖を支持すると報告されている。筆者はこれまで液体培養系を用いて増殖因子のヒト前駆細胞増幅を支持する能力を検索しようとしてきた。今回の研究では、インターロイキン-1 β とインターロイキン-3との液体培養系における相乗効果について検討した。

II 材料および方法

- 1) 造血因子および抗体：造血因子として recombinant の human interleukin-1 β (IL-1), human interleukin-6 (IL-6), human granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), human granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) を用いた。細胞純化には抗 HPCA-1 抗体 (CD34) を用い、一部の実験では抗 IL-1 抗体、抗 IL-6 抗体、抗 G-CSF 抗体、抗 GM-CSF 抗体を用いた。
- 2) ヒト骨髓細胞の調整：正常ヒト骨髓を採取後、フィコール・コンレイに重層し比重遠沈にて単核細胞を得た。培養皿にて2回、1時間培養し、非付着細胞分画を得た。非付着細胞分画から羊赤血球とのロッゼット形成細胞を除去し、T細胞除去・非付着細胞分画を得た。CD34陽性細胞はT細胞除去・非付着細胞分画より抗 HPCA-1 抗体と抗マウス IgG をコートした immunobeads を用いて分離した。
- 3) 液体培養：細胞を6-well plate に5 ml ずつ植え込み、IL-1 100 ng/ ml , IL-3 100 u/ ml , IL-6 100ng/ ml , GM-CSF 100ng/ ml , G-CSF 100ng/ ml を単独あるいは組み合わせて添加し一週間培養した。一部の実験系では抗 IL-1 抗体、抗 IL-6 抗体、抗 G-CSF 抗体、抗 GM-CSF 抗体を培養系に加えた。培養後付着細胞をも含めて全細胞を回収し、コロニー形成法にて前駆細胞数の増減を検討した。

- 4) コロニー形成法： 2×10^4 個の新鮮骨髄細胞および液体培養した細胞を、30%牛胎児血清、1%牛血清アルブミン、 1×10^{-4} M 2-メルカプトエタノールと0.3%軟寒天を添加した培養液に入れ、白血球遊走プレートの各 well に0.4mlずつ植え込んだ。刺激因子として IL-3 100 u/ml 、EPO 2 u/ml を加えて14日間培養した。
- 5) 限界希釈液体培養法：CD34陽性細胞を段階希釈して（各 well あたり 1, 5, 25, 125 個）、96-well plate に植え IL-3 および IL-1 と IL-3 の存在下で一週間培養した。一週間後、8 個以上の生細胞を含む well を陽性として各希釈段階における陽性率を算定した。

結 果

1) 骨髄単核細胞を用いての造血前駆細胞増幅

造血因子単独で添加された場合には IL-3 が最も効率良く前駆細胞を増幅した。IL-3 との組み合わせでは IL-1 のみが IL-3 単独と比較してより効率良く増幅した。

2) 骨髄非付着細胞、骨髄T細胞除去・非付着細胞を用いての造血前駆細胞増幅

IL-1 の相乗効果が直接効果が間接効果を調べるために、サイトカイン産生細胞である T 細胞およびマクロファージを除去した細胞分画で同様の実験を行ったところ、IL-1 の IL-3 に対する相乗効果は CFU-GM を除いて同様に認められた。

3) 抗サイトカイン抗体の効果

IL-1 と IL-3 を添加した培養系に各種抗サイトカイン抗体を添加したところ、抗 IL-1 抗体では IL-1 の相乗効果は完全に消去され、抗 GM-CSF 抗体の添加によって部分的に消去された。

4) CD34陽性細胞を用いての造血前駆細胞増幅

CD34陽性細胞を用いて一週間培養すると、同様に IL-3 単独に比べて IL-1 と IL-3 によってより多くの前駆細胞が維持された。

5) 限界希釈液体培養における IL-1 と IL-3 の効果

CD34陽性細胞中で IL-3 単独にたいしては24個中1個が反応して増殖し、IL-1 と IL-3 に対しては16個中1個が反応して増殖した。

IV 考案および結語

1. インターロイキン 1β とインターロイキン 3 とは相乗的に骨髄単核細胞、非付着細胞、および T 細胞除去非付着細胞を用いた造血前駆細胞の生体外での増幅を支持した。

2. 限界希釈液体培養法において純化した CD34陽性細胞に対しても、インターロイキン 1 β とインターロイキン 3 とがインターロイキン 3 単独に比較して効率良く増殖を支持した。
3. インターロイキン 1 β とインターロイキン 3 との相乗効果の一部は抗 GM - CSF 抗体によって消去された。
4. 純化した細胞分画を用いるとインターロイキン 1 β とインターロイキン 3 によっても前駆細胞の増幅は支持されず、造血因子以外の骨髓間質細胞との相互作用などが必要であることが示唆された。

これらの検討の結果、インターロイキン 1 β とインターロイキン 3 とによってヒト造血前駆細胞の生体外増幅が最も効率良く支持され、その効果の大部分は直接効果により、一部は間接効果によることが示唆された。