

学 位 論 文 題 名

CD 7 陽性白血病細胞の細胞生物学的特性に関する研究

—樹立せる HSM 911株化細胞による検討—

学位論文内容の要旨

目的

白血病は未熟な造血前駆細胞レベルでの腫瘍化と考えられている。最近、T細胞に特徴的と考えられてきたCD7を表現しているCD7陽性急性白血病という亜型が報告され、リンパ球系と骨髄球系とに分化する以前の未熟な多能性幹細胞の腫瘍化で、化学療法に抵抗性とされている。CD7 陽性白血病細胞株に関する報告はわずかに散見されるのみで、詳細な検討は認められていない。今回、私は急性骨髄性白血病（AML）の患者より CD7 陽性白血病細胞株を樹立し、CD7 陽性白血病細胞の特徴を明らかにするために、その細胞生物学的特性、抗癌剤に対する反応性などを検討した。

材料と方法

1. 患者

1986年発症のAML(M1)の2回目の再発と診断され、1990年7月、当科に入院した。白血病細胞はペルオキシダーゼ染色陽性で、表面形質ではCD2, CD13, CD33が認められた。

2. 細胞株の樹立

1991年1月14日の末梢血（白血球数 $6,900/\mu\text{l}$, 白血病細胞90%）より比重遠沈法によって単核球を分離し、20%FBS加Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)と種々のサイトカインとを加えて培養した。GM-CSFで培養していた細胞より、細胞株が得られHSM911と命名した。

3. 細胞学的特徴

(1)細胞化学：メイギムザ(MG), periodic-acid Schiff(PAS), ペルオキシダーゼ(PO), スダンブラックB(SBB), α -naphthyl butyrate esterase(α -NBE),

naphthol AS-D chloroacetate esterase(NACE)染色を施行した。

(2)細胞表面マーカー：FACScanにて検討した。モノクローナル抗体はOKT6 (CD1), OKT11(CD2), OKT3(CD3), OKT4(CD4), Leu1(CD5), T55(CD7), OKT8(CD8), J5 (CD10), My7(CD13), My4(CD14), B4(CD19), B1(CD20), My9(CD33), HPCA-1(CD34), OKT10(CD38), OKIa1(HLA-DR), 抗GP II b/III a抗体(CD41a), 17F11(抗c-*kit* 抗体), 抗VLA1~VLA5抗体, BBA3(抗ICAM1抗体), SPV-L7(抗LFA1抗体), Leu44(抗CD44抗体), Leu8(抗LAM1抗体)を用いた。

(3)T細胞受容体(TCR),免疫グロブリン(Ig)遺伝子再構成の検討：細胞より高分子DNAを抽出後,サザンブロット法により解析した。

4. サイトカイン反応性の検討

細胞増殖は3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)を用いて検討した。リコンビナントヒトインターロイキン-1 (rhIL-1), rhIL-2, rhIL-3, rhIL-4, rhIL-5, rhIL-6, 顆粒球コロニー刺激因子 (rhG-CSF), 顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(rhGM-CSF), マクロファージコロニー刺激因子(nhM-CSF), stem cell factor(rhSCF), エリスロポエチン(rhEpo), インターフェロン- γ (IFN- γ), transforming growth factor- β (TGF- β), ポリクローナル抗ヒトGM-CSF抗体, 抗ヒトG-CSF抗体, 抗ヒトIL-3抗体を用いた。

5. サイトカインレセプターの検討

(1) 125 I GM-CSF (または 125 I IL-3) を, 50倍濃度のGM-CSF (またはIL-3) 存在下または非存在下に加えて培養後, シリコンオイルに重層・遠沈し, 上清・細胞を γ -カウンターにて測定した。

(2)fluorescein isothiocyanate(FITC)標識G-CSF, GM-CSF, IL-3を用いてFACScanにて検索した。

6. 分化能の検討

Dimethyl sulfoxide(DMSO), 12-o-tetradecanoyl phorbol 13-acetate(TPA), bovine hemin chloride, Cytosine arabinoside, G-CSF, M-CSF, IL-2を添加して培養した後種々の染色をし, 光学顕微鏡にて観察した。さらに, GM-CSF存在下にTPAを加え培養後, FACScanにて表面抗原の変化を検討した。

7. 抗癌剤に対する反応

細胞増殖におよぼす抗癌剤の影響をMTT法を用いて検討した。抗癌剤は, Daunorubicin, Doxorubicin, Mitoxantron, Etoposide, Cytosine arabinoside, Amethopterin, Vindesineを用いた。

結果

1. 細胞学的特徴

MG染色では、ほぼ円形で中型のN/C比が中等度の細胞と、大型で多核の巨核球様細胞とが混在していた。PAS, PO, SBB, α -NBE, NACE染色は陰性で、GP II b/III a染色では陽性細胞が巨核球様細胞だけでなく中型の細胞にも認められた。細胞表面マーカーでは、患者白血病細胞で認められたCD2, CD13, CD33の他にCD7, CD34, CD38, CD41a, HLA-DRが陽性で、TdT活性も陽性であり、骨髓球系だけでなく、Tリンパ球系、巨核球系の形質をも有していることが示唆された。TCR, Ig geneはgerm lineを示した。接着因子発現は、検討し得た接着因子は全て陽性であったが、VLA1, VLA2, VLA3の発現は低かった。

2. サイトカイン反応性

MTT法を用いた細胞増殖の検討では、GM-CSF, IL-3及びSCFに濃度依存性に増殖を示したが、他のサイトカインには反応を示さず、GM-CSF, IL-3あるいはSCFとの相加・相乗作用は認められなかった。GM-CSF, IL-3による細胞増殖は、それぞれ抗GM-CSF抗体、抗IL-3抗体によって濃度依存性に阻害されたが、抗G-CSF抗体や異なる抗体では阻害されなかった。GM-CSF, IL-3, SCFの間で相加・相乗効果は認められなかった。TGF- β , IFN- γ は濃度依存的にHSM911のGM-CSF依存性増殖を抑制した。

3. サイトカインレセプターの検討

GM-CSF, IL-3のレセプターはscatchard解析により2相性を示し、レセプター数解離定数(Kd)はGM-CSFで高親和性約30個, 10pM, 低親和性約1,900個, 900pM, IL-3で高親和性約50個, 40pM, 低親和性約1,600個, 1,900pMと考えられた。FACSscanを用いたレセプターの検討では、GM-CSF, IL-3レセプターはGM-CSF, IL-3によって発現の低下を認め、SCFによりIL-3レセプターのみその発現が低下した。一方c-kitは、SCFにより著明に発現の低下を、GM-CSF, IL-3によって若干の抑制を認めた。G-CSFレセプターはほとんど発現していなかった。

4. 分化能

TPAによりMG染色で形態学的にはマクロファージ様細胞に分化したが、 α -NBE染色陰性であった。さらにTPA処理により、CD13, CD34, CD38の発現が増加しCD7が低下したが、CD14には変化が認められなかった。

5. 抗癌剤に対する反応

各種抗癌剤に対しては濃度依存性に増殖抑制が認められた。AML(M1)患者より得た白血病細胞とPh⁺陽性急性リンパ性白血病(ALL)細胞株(HSM931)を用いて比較検討したが、LD50はAML細胞の2~10倍以上であり、HSM931とは薬剤による感受性の差が認められたものの、HSM911の方が高かった。

考案

本研究で用いた細胞株は、3系統にまたがる表面形質を発現し、TCRの再構成を認めず、LFA1, LAM1, CD44, VLA4, VLA5が強陽性で、G-CSFレセプターを発現せず、未熟な造血前駆細胞の増殖を刺激するIL-3, GM-CSF, SCFに反応し、比較的成熟した前駆細胞の増殖を刺激するG-CSF, M-CSF, Epoには反応しないなどの点から、幼若な前駆細胞の腫瘍化であることが示唆された。本細胞株において、SCF 処理による IL - 3 レセプターの発現低下、あるいは GM - CSF, IL - 3 処理による SCF レセプターの発現低下が認められたが、シグナル伝達において3者ともチロシンキナーゼを介していることが知られており、レセプター間での何らかの制御機構の存在が示唆されるが、その詳細は不明である。抗癌剤に対する反応性は、新鮮 AML 細胞や治療抵抗性とされる Ph⁺ 陽性 ALL 由来細胞株と比較して耐性を示した。本細胞株は、IFN - γ , TGF - β によってその増殖が濃度依存的に抑制され、CD7 陽性白血病の治療にこれらのサイトカインが有効である可能性が示唆された。

結語

GM-CSF, IL-3, SCFに依存して増殖するCD7陽性白血病細胞株を樹立し、

1. 多能性造血前駆細胞の腫瘍化と考えられた。
2. 各種抗癌剤に対する反応性が悪く、臨床的にCD7陽性白血病が治療抵抗性であるとする報告に矛盾しないことが示唆された。
3. IFN- γ によって濃度依存的に増殖が抑制され、CD7陽性白血病のIFN- γ による治療の可能性が示唆された。

以上の結果から、CD7陽性白血病の治療法のみならず、白血病細胞の増殖と分化とを検討する上で有用な細胞株と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

CD 7 陽性白血病細胞の細胞生物学的特性に関する研究

－樹立せる HSM 911株化細胞による検討－

目的

白血病は造血前駆細胞の腫瘍化と考えられている。最近、CD7陽性急性白血病という亜型が報告され、多能性幹細胞の腫瘍化で、化学療法に抵抗性とされている。CD7陽性白血病細胞株の報告は少なく、詳細は検討されていない。本研究では、CD7陽性白血病細胞の特徴を明らかにするために、急性骨髄性白血病(AML)患者より樹立されたCD7陽性白血病細胞株の細胞生物学的特性を検討した。

材料と方法

1)患者：AML(M1)の2回目の再発で、白血病細胞はペルオキシダーゼ(P0)染色陽性で、表面形質ではCD2、CD13、CD33陽性であった。

2)細胞株の樹立：末梢血より単核球を分離・培養し、GM-CSF依存性細胞株が樹立され、HSM911と命名した。

3)細胞学的特徴：(1)細胞表面マーカー：FACScanにて測定した。(2)T細胞受容体(TCR)、免疫グロブリン(Ig)遺伝子再構成の検討：細胞より高分子DNAを抽出後、サザンブロット法により解析した。

・4)細胞増殖の検討：MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)法にて測定した。リコンビナントヒトインターロイキン-1(rhIL-1)、rhIL-2、rhIL-3、rhIL-4、rhIL-5、rhIL-6、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(rhGM-CSF)、rhG-CSF、rhM-CSF、stem cell factor(rhSCF)、エリスロポエチン(rhEpo)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、transforming growth factor- β (TGF- β)、Daunorubicin(DM)、Doxorubicin(ADR)、Mitoxantron(Mit)、Etoposide(ETP)、Cytosine arabinoside(CA)、Amethopterin(MTX)、Vindesine(VDS)を用いた。

5)サイトカインレセプター：(1) 125 I GM-CSF (または 125 I IL-3) を、50倍濃度のGM-CSF (またはIL-3) 存在下または非存在下に加えて培養後、シリコンオイルに重層・遠沈し、上清・細胞を γ -カウンター(アロカ社製、東京)にて測定し、scatchard解析を行った。(2)fluorescein isothiocyanate(FITC)標識サイトカインにて染色後、FACScanにて検討した。

6)分化能：Dimethylsulfoxide(DMSO)、12-o-tetradecanoyl phorbol 13-acetate(TPA)、bovine hemin chloride、CA、G-CSF、M-CSF、IL-2と共に3日間培養後、種々の染色を施行して検討した。

結果

1)細胞学的特徴：メイギムザ(MG)染色では、中型でほぼ円形のN/C比が中等度の細胞と、大型で多核の巨核球様細胞とが混在していた。periodic-acid Schiff(PAS)、PO、ズダンブラックB(SBB)、 α -naphthyl butyrate esterase(α -NBE)、naphthol AS-D chloroacetate esterase(NACE)染色陰性で、GP II b/III a陽性細胞は巨核球様細胞のほかに中型の細胞にも認められた。表面マーカーは、CD2、CD7、CD13、CD33、CD34、CD38、CD41a、HLA-DRが陽性であった。TCR、Ig遺伝子はgerm lineを示した。接着因子は、CD11a、CD44、CD54、LAM1、VLA4、VLA5が強陽性であった。

2)サイトカイン反応性：GM-CSF、IL-3及びSCFに濃度依存性に増殖を示したが、3者間で相加・相乗効果は認められなかった。他のサイトカインには反応を示さず、GM-CSFなどとの相加・相乗作用も認められなかった。TGF- β 、IFN- γ は濃度依存性に、GM-CSF依存性増殖を抑制した。

3)サイトカインレセプター：ヨードラベルサイトカインを用いた検討では、GM-CSFレセプター(GM-CSF/R)、IL-3/Rは2相性を示し、高親和性及び低親和性レセプターの存在が示された。FACScanを用いた検討では、GM-CSF/R、IL-3/RはGM-CSF、IL-3によって発現の低下を認めた。G-CSF/Rは殆ど発現していなかった。

4)分化能：TPAにより、MG染色で形態学的にはマクロファージ様細胞に分化したが、 α -NBE染色陰性で、CD14には変化が認められなかった。

5)抗癌剤に対する反応：AML(M1)患者の白血病細胞とPh⁺陽性急性リンパ性白血病細胞株(HSM931)とを用いて比較検討した。本細胞のLD50はAML細胞より高く、HSM931とはCA、MTX以外はHSM911の方が高く、薬剤抵抗性と考えられた。

考案及び結語

1)本細胞株は、骨髓球系、Tリンパ球系、巨核球系の3系統の表面形質を有し、TCRの再構成を認めず、幼若な造血前駆細胞に発現している接着因子が強陽性で、未熟な造血前駆細胞に作用するIL-3、GM-CSF、SCFに反応し、比較的成熟した前駆細胞に作用するG-CSF、M-CSF、Epoには反応しないなどの点から、幼若な前駆細胞の腫瘍化であることが示唆された。

2)各種抗癌剤に対する反応性が悪く、臨床的にCD7陽性白血病が治療抵抗性であるとする報告と一致していた。

3)IFN- γ によって濃度依存的に増殖が抑制され、CD7陽性白血病のIFN- γ による治療の可能性が示唆された。

以上の結果から、CD7陽性白血病の治療法のみならず、白血病細胞の増殖と分化とを検討する上で有用な細胞株と考えられた。

以上より、本研究は博士(医学)の学位論文として妥当なものと判断される。