

学位論文題名

IL-6 とホルボルエステルによるマウス未分化造血前駆細胞の
コロニー形成とそのシグナル伝達

学位論文内容の要旨

〔目的〕

造血幹細胞に作用するサイトカインの中でインターロイキン-6 (IL-6)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、IL-11、IL-12、Leukemia inhibitory factor、Stem cell factorはG₀期にある未分化造血前駆細胞に働き、細胞周期へと移行させる共通の作用を有する。一方、IL-3と顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)には上記のような作用はないが、細胞周期へ移行した前駆細胞の活発な増殖を支持する能力を有する。最近、IL-6とprotein kinase C(PKC)の活性化剤の一つである12-O-tetra-decanyl-phorbol-13-acetate(TPA)との併用により顆粒球-マクロファージコロニー形成細胞の増殖が刺激されることが報告された。もしこの組み合わせが未分化造血前駆細胞の増殖を刺激するとすれば、まだ十分には解明されていないサイトカインによる未分化造血前駆細胞の増殖におけるシグナル伝達機構の解明の一助になることが想定される。そこで、私はIL-6とTPAとが未分化造血前駆細胞の増殖を支持できるか否か、その増殖のシグナル伝達はどのようなものであるかについて検討した。

〔対象および研究方法〕

1. TPA とIL-6による未分化造血前駆細胞のコロニー形成：無菌環境下に飼育したBDF₁雄性マウスを10ないし15週齢で用いた。未分化造血前駆細胞の濃縮のため、150 mg/kgの5-FUを尾静脈より注入し、48時間後に大腿骨を採取して、骨髓細胞浮遊液を得た。この細胞を種々のサイトカインとともに2週間培養し、倒立顕微鏡下に50個以上の細胞から成る細胞集塊をコロニーとしてコロニー型に従って算定した。
2. Delayed addition: IL-6とTPAとの併用によるコロニー形成においてIL-6とTPAは同時に存在しなければならないか否かを、delayed additionによって検討した。培養開始時にIL-6、あるいはTPAを添加しておき、培養2・4・8日目にTPAまたはIL-6

を添加した。

3. PKC の down regulation のコロニー形成におよぼす影響 : TPA と細胞との慢性的接触はPKC の down regulation をきたすと報告されている。そこでIL-6とTPA とによるコロニー形成がPKC の活性化を介するものか否かを検討するため 2×10^{-8} MのTPA 存在下に骨髓細胞を48時間培養して洗浄後、IL-6+TPA と培養した。

4. 蛋白質リン酸化酵素阻害剤のコロニー形成におよぼす影響 : IL-6+TPA によるコロニー形成が蛋白質リン酸化酵素阻害剤によって抑制されるか否かをPKC阻害剤としてカルフォスチンC、チロシンキナーゼ阻害剤としてゲニステインとハービマイシンAを用いて検討した。

5. Delayed additionと阻害剤の組み合わせによるコロニー形成におよぼす影響 : PKCとチロシンキナーゼはTPAあるいはIL-6のみによって活性化されるか否かは不明である。そこで、IL-6単独または阻害剤とともに培養を開始し、培養2日目にTPAを添加してコロニー形成を観察した。次にIL-6とともに培養を開始して、2日目にTPAを単独、または阻害剤とともに添加した。

〔結果〕

1. TPAとIL-6による未分化造血前駆細胞のコロニー形成 : TPAおよびIL-6単独ではコロニー形成はほとんど認められなかった。IL-6とTPA とを併用すると14日目には11個のコロニーが形成された。コロニー形成を経時的に観察するとIL-3によるコロニー形成に比較して形成されるコロニー数は少なかったが、経時的増加傾向はほぼ平行した。IL-6とTPA とにより形成されるコロニーは、GMコロニー、GEMMコロニー、Blastコロニーであった。

2. Delayed addition : 培養開始時にIL-6を添加しておくことコロニー数は比較的保たれ、TPAの添加がおくれるほどコロニー数は減少する傾向にあった。一方、TPAを培養開始時に添加しておきIL-6をおくって添加した場合にはコロニーはほとんど形成されなかった。

3. PKC の down regulationのコロニー形成におよぼす影響 : TPA 溶液と同一濃度のDMSOを用いたコントロールでは、骨髓細胞の 10^5 個あたり6個のコロニーが形成されたのに対し、TPA と48時間培養したものではコロニーは全く形成されなかった。

4. 蛋白質リン酸化酵素阻害剤のコロニー形成におよぼす影響 : カルフォスチンCは100nM (PKC に対するIC₅₀の2倍の濃度) 以上の濃度でIL-3およびIL-6+TPA によるコロニー形成を完全に抑制した。ゲニステインは1 μ g / ml (EGF レセプターのIC₅₀に当たる) 以上の濃度でIL-6+TPA によるコロニー形成を完全に抑制した。ハービマイシンA 100-200ng/mlの濃度でIL-3によるコロニー形成は完全に抑制され、IL-6+TPA によるコロニー形成は75

%抑制された。

5. Delayed additionと阻害剤の組み合わせによるコロニー形成におよぼす影響：IL-6単独では5-6個のコロニーが形成されたが、これにカルフォスチンCまたはハービマイシンAを併用するとそれぞれの添加100nM以上、200ng/ml以上でコロニー形成が抑制された。IL-6とともに培養を開始して、2日目にTPAを単独または阻害剤とともに添加すると、TPAによるコロニー形成の増強効果は阻害剤によって打ち消された。

〔考 按〕

IL-6とTPA とによるコロニー形成はIL-3のそれにはわずかにおよばないものの、GMコロニーのみでなく、GEMMコロニーと芽球コロニーをも含むことからGMコロニー形成細胞よりも未分化な前駆細胞由来のものであることが示唆された。IL-6とTPA との併用による最大のコロニー形成には両者が培養開始時から存在することが必要で、TPA の添加がおくれるにつれコロニーは減少し、IL-6が培養開始時から2日間存在しないと、TPA を後から添加してもコロニーはほとんど形成されないことから、未分化造血前駆細胞のコロニー形成にはIL-6の必須なことが示唆された。TPA と細胞との長時間接触によるPKC のdown regulation によってIL-6+TPA のコロニー形成作用が打ち消された事からIL-6とTPA の併用作用はPKC を介していることが強く示唆された。PKC 阻害剤であるカルフォスチンCあるいは、チロシンキナーゼ阻害剤であるゲニステイン、ハービマイシンAによりIL-6+TPAのコロニー形成作用が抑制されたことからIL-6+TPA のシグナル伝達経路にはPKC、およびチロシンキナーゼの存在することが示唆された。

〔結 論〕

マウス未分化造血前駆細胞のコロニー形成に及ぼすIL-6とTPA との作用について検討した。

1. 両者は単独ではコロニーの形成を支持できないが、併用によって相乗的にコロニー形成を支持した。
2. コロニー形成はPKC のdown regulation および特異的PKC 阻害剤あるいはチロシンキナーゼ阻害剤によって抑制された。以上の結果から、このコロニー形成におけるIL-6とTPA とのシグナル伝達には、PKC の活性化、チロシンキナーゼの活性化が必要であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 川上 義和
副査 教授 小野江 和則
副査 教授 上出 利光

学位論文題名

IL-6 とホルボルエステルによるマウス未分化造血前駆細胞の コロニー形成とそのシグナル伝達

I. 研究目的

サイトカインによる未分化造血前駆細胞の増殖におけるシグナル伝達機構は、未だ明らかにされていない。そこでインターロイキン-6 (IL-6) と protein kinase C (PKC) の活性化剤であるホルボルエステルの TPA とが、未分化造血前駆細胞の増殖を支持できるか否か、その増殖のシグナル伝達はどのようなものであるかについて検討することを目的とした。

II. 材料および方法

- 1) IL-6 と TPA による未分化造血前駆細胞のコロニー形成: 10~15週齢の BDF₁ 雄性マウスに 5-FU を静注し、48時間後に大腿骨を採取して骨髓細胞浮遊液を得た。この細胞を種々のサイトカインとともに 2週間培養し、50個以上の細胞から成る細胞集塊をコロニーとして算定した。
- 2) Delayed addition: 培養開始時に IL-6、あるいは TPA を添加しておき、培養 2、4、8 日目に TPA または IL-6 を添加した。
- 3) 骨髓細胞と TPA との 48時間の前培養 (PKC の down regulation): $2 \times 10^{-8} M$ の TPA の存在下に骨髓細胞を 48時間培養して洗浄後、IL-6 + TPA と培養した。
- 4) 蛋白質リン酸化酵素阻害剤の検討: IL-6 + TPA によるコロニー形成が、PKC 阻害剤のカルフォスチン C、チロシンキナーゼ阻害剤のゲニステイン、ハービマイシン A によって抑制されるか否かを検討した。
- 5) Delayed addition と阻害剤の組み合わせによる検討: IL-6 単独または阻害剤とともに培養を開始し、培養 2 日目に TPA を添加した。次に IL-6 とともに培養を開始して、2 日目に TPA を単独、または阻害剤とともに添加した。さらに、IL-6 単独あるいは阻害剤と共に骨髓細胞を 48時間前培養し洗浄後、IL-6 と TPA とを加えて培養した。

III. 結果

- 1) 未分化造血前駆細胞のコロニー形成: IL-6 単独、TPA 単独ではコロニー形成がほとんど認められなかったが、IL-6 と TPA との併用によりコロニーが形成された。形成されたコロニーは GM コロニー、GEMM コロニー、芽球コロニーであった。
- 2) Delayed addition: 培養開始時に IL-6 を添加しておくこととコロニー数は比較的に維持されたが、TPA を培養開始時に添加しておき IL-6 をおくだけで添加した場合にはコロニーはほとんど形成されなかった。
- 3) PKC の down regulation のコロニー形成に及ぼす影響: TPA 溶液と同一濃度の DMSO を用いたコントロールでは、IL-6 + TPA により 6 個のコロ

ニーが形成されたがTPAと48時間の前培養したものではコロニーが全く形成されなかった。

4) 蛋白質リン酸化酵素阻害剤のコロニー形成に及ぼす影響：カルフォスチンCは100nM (PKCに対するIC50の2倍の濃度) 以上の濃度でIL-3およびIL-6+TPAによるコロニー形成は完全に抑制された。ゲニステインは1 μ g/ml (EGFレセプターのIC50に当たる) 以上の濃度でIL-6とTPAとによるコロニー形成を完全に抑制し、ハービマイシンAは100~200 ng/mlの濃度で75%抑制した。

5) Delayed additionと阻害剤の組み合わせによるコロニー形成に及ぼす影響：IL-6単独では5~6個のコロニーが形成されたが、これにカルフォスチンC又はハービマイシンAを併用するとそれぞれの添加100nM以上、200 ng/ml以上でコロニー形成が抑制された。IL-6とともに培養を開始して、2日目にTPAを単独または阻害剤とともに添加すると、TPAによるコロニー形成の増強効果は阻害剤によって打ち消された。さらに、IL-6単独あるいは阻害剤と共に骨髓細胞を48時間前培養した系でも、コロニー形成が両阻害剤によって抑制された。

IV. 考察及び結語

1) IL-6とTPAは単独ではコロニー形成を支持できないが、併用によって相乗的にコロニー形成を支持した。

2) コロニー形成はGMコロニーのみでなく、GEMMコロニーと芽球コロニーをも含むことからGMコロニー形成細胞よりも未分化な前駆細胞由来のものであることが示唆された。

3) コロニー形成は、PKCのdown regulation および特異的PKC阻害剤、あるいはチロシンキナーゼ阻害剤によって抑制された。

以上の結果から、このコロニー形成におけるIL-6とTPAとのシグナル伝達には、PKCの活性化とチロシンキナーゼの活性化とが必要であることが示唆された。

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。