

博士論文概要

論文題目

リンパ造血細胞の増殖分化機構に関する研究
Study on the mechanisms controlling cell
proliferation during lympho-hematopoietic
cell differentiation

申請者

須藤 哲央

Tetsuo Sudo

生命理工学専攻

2010年11月

リンパ造血細胞は、骨髄中に存在する造血幹細胞より増殖・分化し、その制御は、骨髄中の骨髄微小環境を形成するストローマ細胞によって調節されていることが知られている。ストローマ細胞は、骨髄中に存在する付着性の細胞で、細胞外マトリックスやサイトカインを産生することにより、造血細胞の増殖と分化の制御に関与すると考えられており、これまでに数多くのストローマ細胞株が樹立され、その機能について研究されている。

第1章では、ストローマ細胞依存性のB細胞の分化過程におけるインターロイキン7 (IL-7) の役割について明らかにした。IL-7は、プレB細胞増殖因子として、ストローマ細胞株よりクローニングされた分子であることから、IL-7はB細胞分化過程で機能的に作用している可能性が示唆された。しかし、B細胞の増殖・分化の場である骨髄では、ほとんど発現が見られないことから、IL-7のB細胞分化における役割に疑問が投げかけられていた。そこで、もしIL-7がB細胞の分化に必須な分子であるならば、B細胞分化支持機能のあるストローマ細胞株ST2細胞とB細胞分化支持機能のないストローマ細胞株PA6細胞との違いをIL-7の産生能力の差として捕らえることができると考えた。その仮説の下に、2つのストローマ細胞株のIL-7産生能を比較したところ、ST2細胞はIL-7を発現していたのに対し、PA6細胞はいかなる刺激を加えても発現しなかった。さらに、PA6細胞上で骨髄細胞を培養する際に、IL-7を添加して培養すると、ST2細胞上で培養したときと同じくB細胞が出現した。これらの結果から、B細胞の分化にIL-7は必須であることが明らかとなった。さらに、B細胞分化の過程は、それぞれが異なる増殖要求性を有する4段階、すなわち(1)ストローマ細胞株PA6細胞上で支持されるB220⁻の未熟な前駆細胞、(2)IL-7とPA6細胞上の未同定の分子の存在下で増殖する前駆細胞、(3)IL-7単独で増殖する細胞、(4)IL-7に反応しないsIgM⁺の成熟B細胞、に分かれると考えられた。これは、B細胞初期分化過程の増殖調節に関する最初のモデルである。

第2章では、ストローマ細胞のサイトカイン産生の仕組みについて明らかにした。B細胞分化支持機能に差異のある2種類のストローマ細胞株、PA6細胞とST2細胞のサイトカインのmRNAの発現能力を比較した。本研究でテストしたサイトカインのなかで、IL-1 β 、IL-6、IL-7、M-CSF、G-CSF、LIFおよびTGF- β は、2種類のストローマ細胞において、構成的または誘導的に発現するサイトカインであった。IL-7はB細胞の分化を支持する能力を持つST2細胞に発現し、一方、G-CSFはB細胞の分化を指示しないPA6細胞のみに検出された。本研究で使用した2種類の刺激剤であるLPS/TPAとヒト組換え型IL-1 α のストローマ細胞株に対するサイトカイン誘導能は異なっていた。IL-7はLPS/TPAよりIL-1 α で効率的に誘導されるが、IL-1 β 、IL-6、G-CSFおよびLIFはIL-1 α よりLPS/TPAにより効率的に誘導された。次に、T細胞株、B細胞株および骨髄細胞株をST2細胞と共培養した

ときの各細胞株のサイトカイン誘導能を調べた。興味深いことに、B細胞株は IL-1 α と類似した活性を持ち、一方、T細胞株および骨髄細胞株は、LPS/TPA とほとんど同一であった。次に、DW34細胞により IL-7 が誘導される仕組みについて調べるために、トランスウエルメンブレンを用いて、ST2細胞と DW34細胞を非接触で培養したところ、IL-7を誘導することができなかった。さらに、パラホルムアルデヒドで固定した DW34細胞でも ST2細胞から IL-7を誘導できることから DW34細胞の細胞表面分子により IL-7が誘導される可能性が示唆された。次に、ST2細胞との共培養では増殖できないが、この共培養系に IL-5または IL-7を添加すると増殖する B細胞株 J1細胞の IL-7誘導能を調べた。その結果、J1細胞は IL-7を誘導できなかった。この結果から、DW34細胞は IL-1を産生するのに対し、J1細胞は IL-1を産生していないのではないかとこの仮説があがってくる。そこで、2つの B細胞株の IL-1の発現を調べた結果、DW34細胞は IL-1 β を発現しているのに対し、J1細胞は発現していなかった。これらの結果から、ストローマ細胞株は、サイトカイン産生能力に差異があり、種々の細胞または非細胞に対して、異なるサイトカインを産生することにより、異なった反応をすることが明らかとなった。さらに、DW34細胞の IL-7誘導作用は、DW34細胞の産生する膜型 IL-1 β もしくは膜に結合した IL-1 β を介している可能性が示唆された。以上、ストローマ細胞株のサイトカイン産生誘導に必要なシグナルについて検討し、ストローマ細胞と造血細胞の関係が一方方向性のものでなく、相互に作用しあう関係であることを明らかにした。

第3章では、マウスリンパ球における IL-7レセプター (IL-7R) の発現と機能について明らかにした。高親和性の IL-7Rを認識し、IL-7との結合を阻害するモノクローナル抗体 A7R34を作製した。A7R34抗体で細胞染色を行ったところ、IL-7Rは、B細胞系列および T細胞系列ともに発現していた。骨髄内では、sIgMを発現していない未成熟な B細胞が IL-7Rを発現していた。胸腺においては、IL-7Rは CD4⁻CD8⁻細胞および CD4⁺、CD8⁺シングルポジティブ細胞に発現していたが、CD4⁺CD8⁺細胞には発現していなかった。末梢血においては、CD4⁺、CD8⁺シングルポジティブ細胞が主な IL-7R発現細胞であった。また、長期 B前駆細胞培養系に A7R34抗体を加えると、B系列の細胞の増殖は阻害された。このことは、IL-7は *in vitro* の B細胞の増殖に必須であることを示している。この *in vitro* の結果と対照的に、成獣マウスへの A7R34抗体の投与により、B前駆細胞と胸腺細胞の数は減少したが、末梢において、一定量の成熟 B細胞と成熟 T細胞が2週間以上存在した。一方、胎生14日から投与を開始したときには、B細胞欠損マウスを作ることができた。これらの結果から、IL-7は、マウス骨髄および胸腺において、それぞれ Bおよび T細胞の増殖に必須の分子であることが明らかとなった。以上から、IL-7Rはリンパ球の分化増殖過程を制御する唯一の受容体であると考えられる。

第4章では、骨髄内のマクロファージコロニー形成細胞 (CFU-M) の増殖における c-kit と c-fms の機能的な階層性について明らかにした。M-CSF/CSF-1 とその受容体である c-fms の性状はよく解析されているが、骨髄内造血でのそれらの実際の役割ははっきり分かっていなかった。その理由は、このシグナル伝達系が破壊されると、骨髄腔が極めて狭小化し、骨髄内造血が消失する大理石病マウスを生じるため、造血の場が形成されないことによる。そこで、造血における c-fms の役割を解明するために、筆者は、マウス c-fms を認識し、その機能を阻害するモノクローナル抗体 AFS98 を作製し、正常骨髄内におけるその発現と機能について研究した。c-fms⁺細胞は、成熟および未成熟な両方の血液細胞に検出された。形態学的には、c-kit⁺c-fms⁻、c-kit⁺c-fms⁺、c-kit⁻c-fms⁺細胞は、それぞれ、中型の芽球、アズール顆粒を持つ前骨髄球、成熟単球であった。CFU-M は c-kit⁺c-fms⁺細胞画分より、c-kit⁺c-fms⁻細胞画分に10倍濃縮されていた。さらに、AFS98抗体のマウス固体への投与は、骨髄中の CFU-M の増殖に影響しなかった。一方、抗 c-kit 抗体のマウス固体への投与により、CFU-M の増殖が抑制された。c-kit⁺c-fms⁺細胞は、c-kit⁺c-fms⁻細胞の培養中に自然に生じるので、骨髄中のほとんどの CFU-M は、実際、c-fms⁻細胞で、培養中に c-fms⁺細胞に分化する細胞である。これらの観察は、骨髄中に明らかに、c-kit と c-fms の機能的階層があることを示している。すなわち、c-kit は、CFU-M の増殖・維持に主要な役割を果たしており、一方、c-fms は、培養中に c-kit と共発現し、M-CSF の受容体として機能するが、骨髄中の c-fms⁺細胞の増殖には、わずかに係っているにすぎないことが明らかとなった。

第5章では、本研究によって得られた結論についてまとめている。本研究により、IL-7 はストローマ細胞依存性の B 細胞の分化過程で必須の分子であることが明らかになった。また、ストローマ細胞と B 細胞の共培養によりストローマ細胞から IL-7 が誘導され、B 細胞増殖が起こることを見出した。この関係は一方方向性のものではなく、相互に作用しあうことが必要であることが明らかになった。さらに、IL-7R の機能を阻害する抗体をマウスに投与することにより、B 細胞の増殖がほぼ完全に阻害されたことから、IL-7 は *in vivo* でも B 細胞増殖に必須の分子であることが明らかになった。また、M-CSF の受容体である c-fms の機能阻害抗体を用いた実験から、c-kit と c-fms の機能について検討し、c-kit 系は、CFU-M の増殖・維持に主要な役割を果たしているのに対し、c-fms 系は CFU-M の増殖・維持にわずかにかかわっているにすぎなく、全ての血液系列細胞に共通の自己再生維持システムである c-kit 系を維持するために必要な場を骨髄内に準備するシステムであることが明らかとなった。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 須藤 哲央 印

(2010年 11月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文 ○	<ol style="list-style-type: none"> <li data-bbox="288 450 1447 555">1. Functional hierarchy of c-kit and c-fms in intramarrow production of CFU-M. Oncogene.1995,21:2469-2476. T. Sudo, S. Nishikawa, M. Ogawa, H. Kataoka, N. Ohno, A. Izawa, S.Hayashi, SI.Nishikawa <li data-bbox="288 584 1447 689">2. Differential expression of colony-stimulating factor (CSF) in murine macrophage clones: Interferon-g-mediated inhibition of CSF production. Cell. Struct. Funct.1994,19:49-56. Y. Ogawa, N. Ohno, K. Kameoka, S. Yabe, T. Sudo <li data-bbox="288 719 1447 824">3. Functional participation of the IL-2 receptor gamma chain in IL-7 receptor complexes. Science.1994,263:1453-1454. M. Kondo, T. Takeshita, M. Higuchi, M. Nakamura, T. Sudo, SI. Nishikawa, K. Sugamura <li data-bbox="217 853 1447 958">○ 4. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA.1993,90:9125-9129. T. Sudo, S. Nishikawa, N. Ohno, N. Akiyama, M. Tamakoshi, H. Yoshida, SI. Nishikawa <li data-bbox="288 987 1447 1160">5. Expression and function of c-Kit in fetal hemopoietic progenitor cells: transition from the early c-Kit-independent to the late c-Kit-dependent wave of hemopoiesis in the murine embryo.Development.1993,117:1089-1098. M. Ogawa, S. Nishikawa, K. Yoshinaga, S. Hayashi, T. Kunisada, J. Nakao, T. Kina, T. Sudo, H. Kodama, SI. Nishikawa <li data-bbox="288 1189 1447 1339">6. Generation of functional murine macrophage lines employing a helper-free and replication-defective SV40-retrovirus: cytokine-dependent growth. Cell Struct Funct. 1991,16:467-474. Y. Ogawa, N. Ohno, M. Ito, M. Iizuka, S. Kobayashi, T. Sudo <li data-bbox="288 1368 1447 1473">7. Interleukin 7 preferentially supports the growth of gamma delta T cell receptor-bearing T cells from fetal thymocytes in vitro. Int Immunol. 1991,3:1067-1075. Y. Watanabe, T. Sudo, N. Minato, A. Ohnishi, Y. Katsura <li data-bbox="288 1503 1447 1608">8. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. J Exp Med. 1991,74:63-71. M. Ogawa, Y. Matsuzaki, S. Nishikawa, S. Hayashi, T. Kunisada, T. Sudo, T. Kina, H. Nakauchi, SI. Nishikawa <li data-bbox="288 1637 1447 1787">9. Support of early B-cell differentiation in mouse fetal liver by stromal cells and interleukin-7. Blood.1991,77:2612-2617. Y. Gunji, T. Sudo, J. Suda, Y. Yamaguchi, H. Nakauchi, SI. Nishikawa, N. Yanai, M. Obinata, M. Yanagisawa, Y. Miura <li data-bbox="288 1816 1447 1944">10. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. Nature.1990,345:442-444. H. Yoshida, S. Hayashi, T. Kunisada, M. Ogawa, S. Nishikawa, H. Okamura, T. Sudo, LD. Shultz, SI. Nishikawa

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文 (続き)	<p>11. Stepwise progression of B lineage differentiation supported by interleukin 7 and other stromal cell molecules. J Exp Med. 1990,171:1683-1695. S.Hayashi, T. Kunisada, M.Ogawa, T. Sudo, H. Kodama, T. Suda, S.Nishikawa, SI.Nishikawa</p> <p>12. A stimulatory effect of recombinant murine interleukin-7 (IL-7) on B-cell colony formation and an inhibitory effect of IL-1 alpha. Blood.1989,74:1936-1941. T. Suda, S. Okada, J. Suda, Y. Miura, M.Ito, T. Sudo, S. Hayashi, SI. Nishikawa, H. Nakauchi</p> <p>13. IL-7 promotes thymocyte proliferation and maintains immunocompetent thymocytes bearing alpha beta or gamma delta T-cell receptors in vitro: synergism with IL-2. J Immunol. 1989,143:2917-2922. H. Okazaki, M. Ito, T. Sudo, M. Hattori, S. Kano, Y. Katsura, N. Minato</p>
○	<p>14. Interleukin 7 production and function in stromal cell-dependent B cell development. J Exp Med. 1989,170:333-338. T. Sudo, M. Ito, Y. Ogawa, M. Iizuka, H. Kodama, T. Kunisada, S. Hayashi, M. Ogawa, K. Sakai, SI. Nishikawa</p>
総説	<p>1. How B-precursor cells are driven to cycle. Immunol Rev. 1994,37:35-51. T. Era, S. Nishikawa, T. Sudo, FH. Wang, M. Ogawa, T. Kunisada, S. Hayashi, SI. Nishikawa</p> <p>2. Early B cell differentiation from hematopoietic stem cells in the presence of stromal cells and interleukin-7 (IL-7). Experimental Hematology Today-1989, 45-52. T. Suda, A. Ohara, J. Suda, N. Tokuyama, Y. Miura, T. Sudo, SI. Nishikawa, H. Nakauchi</p> <p>3. Defect of scid mouse revealed in in vitro culture systems. Curr Top Microbiol Immunol. 1989,152:39-46. SI. Nishikawa, S.Hayashi, S.Nishikawa, M.Ogawa, T. Kunisada, T. Sudo, H.Kodama, T. Suda</p> <p>4. Control of cell growth and differentiation during early B-cell development by stromal cell molecules. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1989,54 Pt 1:171-174. SI.Nishikawa, S.Hayashi, M.Ogawa, T.Kunisada, S.Nishikawa, T.Sudo, H. Nakauchi, T.Suda</p>
講演	<p>1. Cellular interaction in the regulation of growth factor production of stromal cell clones. 19th annual meetings, UCLA Symposia on molecular & cellular biology, B lymphocyte development(Park City, Utah) March 31-April 6, 1990 T. Sudo, Y. Ogawa, M. Ito, M. Iizuka, T. Kunisada, M. Ogawa, SI. Nishikawa</p>
著書	<p>1. アレルギーと I L- 7. アレルギーとサイトカイン、(宮本昭正 石川喙 飯倉洋治 編)、医薬ジャーナル社 (1996) 須藤哲央</p> <p>2. I L- 7. 造血因子研究の潮流、(三浦恭定 編)、中外医学社 (1991) 西川伸一 國貞隆弘 須藤哲央</p>
その他	<p>特許</p> <p>1. モノクローナル抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ及びその利用、 特開平 9-67400 西川 里美 須藤 哲央</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
その他 (続き)	<p>2. モノクローナル抗体、その製造方法およびその使用、 再公表 94-28160 西川 里美 <u>須藤 哲央</u> 岡野 清 伊澤 明子 中村 紀子 秋山 直子</p> <p>業界誌</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. インターロイキン7- リンパ球の生成過程における役割. 医学のあゆみ 174 : 1035-1039 (1995) : <u>須藤哲央</u> 中村紀子 : 2. IL-7 レセプターの発現と機能. Annual Review 免疫 1995 : 84-91 (1995) <u>須藤哲央</u> 3. B細胞生成における IL-7 と IL-7 レセプターの役割. Biotherapy 8 : 1113-1119 (1994) <u>須藤哲央</u> 4. IL-7. カレントセラピー 10 : 204-209 (1992) <u>須藤哲央</u> 5. インターロイキン7. 日本臨牀 50 : 1811-1815 (1992) <u>須藤哲央</u> 6. IL-7. 治療学 25 : 49-52 (1991) <u>須藤哲央</u> 7. IL-7 と B細胞の分化. 造血因子 2 : 38-45 (1991) <u>須藤哲央</u> 8. インターロイキン7. 免疫薬理 8 : 453-460 (1990) <u>須藤哲央</u> 9. インターロイキン7 : リンパ球の分化過程における役割. Medical Immunology 20 : 199-205 (1990) <u>須藤哲央</u> 10. ストロマ細胞の機能発現とサイトカイン. Medical Immunology 19 : 31-35 (1990) <u>須藤哲央</u> 伊藤雅代 西川伸一 11. Bリンパ球に必須なストローマ細胞. 細胞工学 8 : 671-678 (1989) 林 眞一 <u>須藤哲央</u> 西川伸一 <p>学位論文に直接関係のない論文</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Long-Lived Colitogenic CD4+ Memory T Cells Residing Outside the Intestine Participate in the Perpetuation of Chronic Colitis. J.Immunol.2009,183:5059 -5068. Y. Nemoto, T. Kanai, K. Kameyama, T. Shinohara, N. Sakamoto, T. Totsuka, R. Okamoto, K. Tsuchiya, T. Nakamura, <u>T. Sudo</u>, S. Matsumoto, M. Watanabe 2. Selective inhibition of NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo. Nat Med. 2004,10:617-624. E. Jimi, K. Aoki, H. Saito, F. D'Acquisto, MJ. May, I. Nakamura, <u>T. Sudo</u>, T. Kojima, F. Okamoto, H. Fukushima, K. Okabe, K. Ohya, S. Ghosh 3. dlk inhibits stem cell factor-induced colony formation of murine hematopoietic progenitors: Hes-1-independent effect. Stem Cells. 2001,19:71-79. N. Ohno, A. Izawa, M. Hattori, R. Kageyama, <u>T. Sudo</u> 4. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp 130-mediated signaling pathway. Cell. 1994,77:63-71. S. Akira, Y. Nishio, M. Inoue, X-J. Wang, S. Wei, T. Matusaka, K.Y oshida, <u>T. Sudo</u>, M.Naruto, T. Kishimoto 5. Effect of CaCl₂ on production of interferon and synthesis of its mRNA in Human MG-63 cells J Interferon Res.1981,1:421-426. <u>T.Sudo</u>, J.Suzuki, S.Kobayashi <p>その他 51 報</p>