

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

2011 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

須藤 哲央

目次

	ページ
略語一覧	5
概要	7
第1章 ストローマ細胞依存性の B 細胞分化過程におけるインターロイキン 7 の 産生と機能	11
1.1 序論	12
1.2 材料と方法	14
1.2.1 動物	
1.2.2 細胞株と細胞培養	
1.2.3 IL-7 遺伝子と組換え型 IL-7	
1.2.4 プローブの標識化	
1.2.5 ノーザンブロット解析	
1.2.6 フローサイトメトリー解析	
1.2.7 IL-7 の力価測定	
1.2.8 コロニー形成試験	
1.3 結果	17
1.3.1 マウス IL-7 cDNA の分子クローニングとその発現	
1.3.2 ストローマ細胞における IL-7 遺伝子の発現解析	
1.3.3 B 細胞はストローマ細胞において IL-7 遺伝子の発現を誘導する	
1.3.4 IL-7 はストローマ細胞依存的な B 細胞の増殖・分化において必須な 分子である	
1.4 考察	22
1.5 要約	26
第2章 ストローマ細胞株におけるサイトカイン産生制御：細胞間相互作用による サイトカイン遺伝子の差別的発現	27
2.1 序論	28
2.2 材料と方法	29
2.2.1 サイトカイン	
2.2.2 細胞株	
2.2.3 ストローマ細胞でのサイトカインの誘導	
2.2.4 トランスウエルメンブレンチャンバーによる培養	
2.2.5 DW34 細胞のパラホルムアルデヒドによる固定	

2.2.6	mRNA の調製とノーザンブロット解析	
2.2.7	プローブ	
2.2.8	RT-PCR	
2.3	結果	32
2.3.1	ストローマ細胞のサイトカイン mRNA の発現能	
2.3.2	サイトカインの誘導における細胞間相互作用	
2.3.3	非接触培養系における ST2 細胞の IL-7mRNA の発現解析	
2.3.4	J1 細胞株と共培養した ST2 細胞における IL-7 mRNA の発現解析	
2.4	考察	38
2.5	要約	42
第 3 章	マウスリンパ球におけるインターロイキン 7 受容体の発現と機能	43
3.1	序論	44
3.2	材料と方法	45
3.2.1	マウス IL-7R の cDNA クローニング	
3.2.2	マウス IL-7R-ヒト IgGFc キメラタンパク質の発現ベクターの作製	
3.2.3	動物細胞でのマウス IL-7R-ヒト IgG キメラタンパク質の発現	
3.2.4	キメラタンパク質による DW34 細胞の増殖阻害活性の測定	
3.2.5	抗 IL-7R モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製	
3.2.6	モノクローナル抗体のスクリーニング	
3.2.7	ハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体の精製	
3.2.8	モノクローナル抗体	
3.2.9	マウス IL-7 の ¹²⁵ I による放射標識	
3.2.10	IL-7 結合試験	
3.2.11	A7R34 による DW34 細胞の増殖阻害活性の測定	
3.2.12	A7R34 による骨髄細胞からの B 細胞誘導阻害活性の測定	
3.2.13	A7R34 による免疫沈降試験	
3.2.14	A7R34 のマウスへの投与	
3.3	結果	51
3.3.1	マウス IL-7R-ヒト IgGFc キメラタンパク質の生産と性状解析	
3.3.2	抗マウス IL-7R モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの選別	
3.3.3	モノクローナル抗体 A7R34 の特異性	
3.3.4	リンパ造血組織における IL-7R の発現	
3.3.5	リンパ球の増殖分化における IL-7R の役割	
3.4	考察	58
3.4.1	B 細胞の増殖分化における IL-7R の機能	

3.4.2	T細胞の増殖分化における IL-7R の機能	
3.5	要約	61
第4章	骨髄内のマクローファージコロニー形成細胞の増殖における KIT と FMS の機能的階層性	63
4.1	序論	64
4.2	材料と方法	66
4.2.1	動物と細胞	
4.2.2	拮抗的抗マウス FMS モノクローナル抗体 AFS98 の作製	
4.2.3	モノクローナル抗体と細胞染色	
4.2.4	免疫沈降とウエスタンブロット	
4.2.5	J774.1 細胞に対する標識化 M-CSF の結合試験	
4.2.6	細胞培養、コロニーアッセイおよびサイトカイン	
4.3	結果	69
4.3.1	抗マウス FMS モノクローナル抗体 AFS98 の特異性	
4.3.2	マウス骨髄における FMS の発現	
4.3.3	CFU-M は KIT ⁺ FMS ⁺ 集団より KIT ⁺ FMS ⁻ により濃縮されている	
4.3.4	KIT ⁺ FMS ⁻ 細胞から FMS ⁺ 細胞への分化	
4.3.5	抗 FMS 抗体でなく、抗 KIT 抗体が骨髄中の CFU-M の維持を抑制する	
4.4	考察	75
4.5	要約	78
第5章	結語	79
	謝辞	85
	引用文献	87
	研究業績	103

略語一覽

B220: B cell isoform of 220 kDa
BCR: B cell receptor
B-pro-I: B progenitor I
B-pro-II: B progenitor II
BSA: bovine serum albumin
CFU-IL-7: colony forming unit-IL-7
CFU-M: colony forming unit-macrophage
CHO: chinese hamster ovary
CSF-1: colony-stimulating factor-1
DHFR: dihydrofolate reductase
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
FCS: fetal calf serum
 γ c: common cytokine receptor gamma
G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor
IgG: immunoglobulin G
IL-1 α : interleukin-1 alpha
IL-1 β : interleukin-1 beta
IL-2: interleukin-2
IL-3: interleukin-3
IL-5: interleukin-5
IL-6: interleukin-6
IL-7: interleukin-7
IL-7R: interleukin 7 receptor
JAK1: janus kinase 1
JAK3: janus kinase 3
KL: kit-ligand
LIF: leukemia inhibitory factor
LP-1: lymphopoietin-1
LPS: lipopolysaccharide
LTBM-W: Whitlock-Witte type long-term bone marrow culture
mAb: monoclonal antibodies
Mac1: Macrophage-1 antigen
M-CSF: macrophage colony-stimulating factor
MEM: minimum essential medium

MTT: methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide
PCR: polymerase chain reaction
PDGF: platelet-derived growth factor
PE: phycoerythrin
PI3K: phosphatidylinositol-3-kinase
preBCR: pre-B cell receptor
RAG: recombination activating gene
RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction
SCF: stem cell factor
SDS-PAGE: SDS-polyacrylamidegel electrophoresis
sIgM: surface immunoglobulin M
SSC: saline-sodium citrate
SSPE: Saline sodium phosphate EDTA
STAT5: signal Transducer and Activator of Transcription 5
TGF β : transforming growth factor-beta
TNF: tumor necrosis factor
TPA: 4-phorbol-12-myristate-13-acetate
TSLP: thymic stromal lymphopoietin
X-SCID: X-linked severe combined immunodeficiency

概要

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と考えられている。ストローマ細胞は、骨髄中に存在する付着性の細胞で、これらを分類すると、線維芽様細胞、マクロファージ、前脂肪細胞の3つのタイプに分類することができる。マウスでは、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きた。そして、造血支持能のあるストローマ細胞とはどのような細胞であるかを明らかにするために、形態学的、組織化学的探索[Zippori *et al.*, 1985]および細胞表面抗原の解析[Pietrangelic *et al.*, 1988]がなされたが、明確な結果は得られておらず、造血支持能のあるストローマ細胞は、共通して脂肪細胞へ分化し得る細胞であることが分かったにすぎない。

マウスにおいて、ストローマ細胞は、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ることから、ストローマ細胞のサイトカイン産生能についても調べられている。造血細胞の増殖・分化を支持できるストローマ細胞株 PA6 細胞には、未分化な血液前駆細胞に作用するインターロイキン 3 (interleukin-3; IL-3) や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF) の mRNA は検出されないことから [Kodama *et al.* 1986]、骨髄細胞と PA6 細胞の共培養系における造血支持能は、未知のサイトカインか細胞接触によるものと考えられ、骨髄微小環境の実体をサイトカインだけでは説明できなかった。その後、ストローマ細胞は、インターロイキン 1 (interleukin-1; IL-1) やリポ多糖類 (lipopolysaccharide; LPS) 刺激で顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF) や GM-CSF を産生することが明らかになったが [Rennick *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 1988]、これらの報告は1種類のストローマ細胞株について調べられているだけで、機能の異なるストローマ細胞の比較はなされていなかった。しかし 1989 年に、種々のストローマ細胞株のサイトカインや接着分子の mRNA の発現解析がなされたが、それらのストローマ細胞の造血支持能は不明である上、ストローマ細胞間で類似しているという結果で、明確な相違は見出されなかった [Gimbel *et al.*, 1989]。そこで、筆者は造血指示能の異なるストローマ細胞のサイトカイン産生能の比較を手がかりとして、リンパ造血細胞の増殖・分化がどのように制御されているかについて研究を行った。

第1章では、ストローマ細胞依存性のマウス B 細胞の分化過程におけるインターロイキン 7 (interleukin-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 [Namen *et al.*, 1988a]。しかし、B 細胞の増殖・分化の場である骨髄では、ノーザンブロット解析で、IL-7 mRNA の発現が検出されないことから、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 細胞分化支持能のあるストローマ

細胞株 ST2 細胞[Nishikawa *et al.*, 1988]と B 細胞分化支持能のないストローマ細胞株 PA6 細胞[Kodama *et al.*, 1982]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、ST2 細胞と PA6 細胞の B 細胞分化支持機能の差は IL-7 産生能の差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、マウスストローマ細胞株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 、インターロイキン 6 (interleukin-6; IL-6)、IL-7、マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor; M-CSF)、G-CSF、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor; LIF) および形質転換増殖因子 (transforming growth factor-beta; 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、LPS と 4-phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA) の混合物 (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 細胞株および骨髄球系細胞株を 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、この共培養系にインターロイキン 5 (interleukin-5; IL-5) または IL-7 を添加すると増殖する B 細胞株 J1 細胞[Katoh *et al.*, 1990]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、サイトカインまたは化合物に対して、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向性のもではなく、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[Goodwin *et al.*, 1990]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 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、細胞表面免疫グロブリン M (surface immunoglobulin M; 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、Whitlock-Witte 長期骨髄細胞培養系に A7R34 を加えると、B 系列の細胞の増殖はほぼ完全に阻害された。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、成獣マウスに A7R34 を 2 週間投与することにより、B 前駆細胞と胸腺細胞の数は減少したが、末梢リンパ組織において、一定量の成熟 B 細胞と成熟 T 細胞が存在した。一方、B 細胞が出現する前の胎生 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、B 細胞の寿命は 2 週間以上であること、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 KIT と 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 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 FMS の役割を解明するために、マウス 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。KIT⁺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、KIT⁺FMS⁻、KIT⁺FMS⁺、KIT⁻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 KIT⁺FMS⁺細胞画分より、KIT⁺FMS⁻細胞画分に 10 倍濃縮されていた。さらに、AFS98 のマウス個体への投与は、骨髄中の

CFU-M の増殖に影響しなかった。一方、抗 KIT 抗体のマウス個体への投与により、CFU-M の増殖が抑制された。KIT⁺FMS⁺細胞は、KIT⁺KIT⁻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、FMS⁻細胞で、培養中に 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、KIT と FMS の機能的階層があることを示している。すなわち、KIT は、CFU-M の増殖・維持に主要な役割を果たしており、一方、FMS は、培養中に KIT と共発現し、M-CSF の受容体として機能するが、骨髄中の 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。この関係は一方向性のもではなく、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 FMS の機能阻害抗体を用いた実験から、KIT と FMS の機能について検討し、KIT シグナル伝達系は、CFU-M の増殖・維持に主要な役割を果たしているのに対し、FMS シグナル伝達系は CFU-M の増殖・維持にわずかにかかわっているにすぎなく、全ての血液系細胞に共通の自己再生維持システムである KIT シグナル伝達系を維持するために必要な造血の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。

第1章

ストローマ細胞依存性の B 細胞分化過程における インターロイキン7の産生と機能

1.1 序論

マウスにおいて、ストローマ細胞は骨髄内における造血細胞の増殖・分化に主要な役割を演じていることはよく知られている [Kincade, 1987]。実際、単一のストローマ細胞株から構成されるストローマ細胞層は、造血前駆細胞から B 細胞への増殖・分化を支持することが知られている [Muller-Sieburg *et al.*, 1986]。1988 年に、マウスストローマ細胞株から新規の分子として、プレ B 細胞増殖因子、リンポポイエチン 1 (lymphopoietin-1; LP-1) / インターロイキン 7 (interleukin 7; IL-7) の cDNA がクローン化された [Namen *et al.*, 1988a]。しかしながら、これまでの研究から [Whitlock *et al.*, 1987; Landreth *et al.*, 1988; Nishikawa *et al.*, 1988]、ストローマ細胞依存的な B 細胞の増殖・分化は、ストローマ細胞に発現した分子群を必要とするプロセスであることが強く主張されている。このことから、IL-7 の実際の作用を知るためには、B 細胞の増殖・分化が起こっている場所で適切に評価される必要がある。

ストローマ細胞	PA6細胞	ST2細胞
由来	マウス頭蓋冠	マウス骨髄
培養条件	α MEM, 10% FCS	RPMI1640, 5%FCS, 5×10^{-5} M 2ME
共培養で増殖してくる細胞	骨髄球系細胞(顆粒球、マクロファージ、巨核球)	リンパ球(B細胞)、骨髄球系細胞

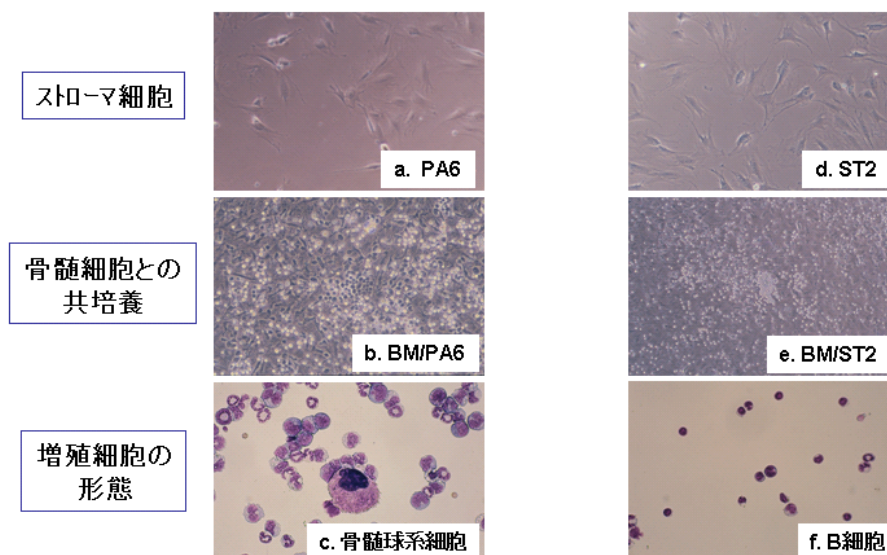


図 1 ストローマ細胞株、PA6 細胞と ST2 細胞の性状と機能

PA6 細胞は、B 細胞を除いたすべての血液細胞の分化を支持できる。一方、ST2 細胞は B 細胞を含め、すべての血液細胞の分化を支持できる。(a) PA6 細胞 (b) PA6 細胞と骨髄細胞との共培養 (c) PA6 細胞上で増殖した血液細胞。顆粒球、マクロファージ、巨核球が認められる。(d) ST2 細胞 (e) ST2 細胞と骨髄細胞との共培養 (f) ST2 細胞上で増殖した血液細胞。B 細胞が認められる。

ここでは、筆者は B 細胞の分化支持能の異なる 2 つのストローマ細胞株、ST2 細胞 [Nishikawa *et al.*, 1988; Ogawa *et al.*, 1988] と PA6 細胞 [Kodama *et al.*, 1982] (前者は B 細胞分化を支持でき、後者はできない) を比較して (図 1)、IL-7 が B 細胞の分化を支持するストローマ細胞の能力を決めている必須の因子であることを実証した。

1.2 材料と方法

1.2.1 動物

BALB/c および BDF1 マウスは日本 SLC (株) から購入した。

1.2.2 細胞株と細胞培養

ストローマ細胞株は ST2 細胞[Nishikawa *et al.*, 1988; Ogawa *et al.*, 1988]) と PA6 細胞[Kodama *et al.*, 1982]を使用した。それぞれ西川博士、小玉博士より分与された。ST2 細胞は 5%FCS (Gibco 社)、50U/mL ペニシリン、50 μ g/mL ストレプトマイシン、50 μ M 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地 (Gibco 社) で培養した。PA6 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FCS, Gibco 社)、50U/mL ペニシリン、50 μ g/mL ストレプトマイシンを含む α MEM 培地 (Gibco 社) で培養した。ストローマ細胞依存性プレ B 細胞株 DW34 細胞[Nishikawa *et al.*, 1988]は ST2 細胞と同じ培地で、コンフルエントになった状態の ST2 細胞と共培養した。ストローマ細胞と骨髄細胞の共培養には、5%FCS (lot no. 1115741 ; HyClone Laboratories 社)、50U/mL ペニシリン、50 μ g/mL ストレプトマイシン、50 μ M 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地 (Gibco) を使用した[Nishikawa *et al.*, 1988; Ogawa *et al.*, 1988]。

1.2.3 IL-7 遺伝子と組換え型 IL-7

Poly(A)⁺RNA は 1 μ g/mL の LPS (E. coli 055:B5, Difco Laboratories 社) と 1ng/mL の 4-phorbol-12-myristate-13-acetate(TPA; Sigam 社)で 3 日間培養した ST2 細胞から調製し、Aruffo と Seed の方法[Aruffo and Seed, 1987]に従った cDNA 発現ライブラリーの構築のために使用した。約 4 μ g の Poly(A)⁺RNA から 2 \times 10⁶個の独立した形質転換体を得られた。公表されたマウス IL-7 の cDNA 配列[Namen *et al.*, 1988a]に基づいて、下記の 2 種類の合成オリゴヌクレオチドを合成した。

- (1) 5'-AGCTTTTCTAAATCGTGCTCGCAAGTTGAAGCAATTTCTTAAAATGAATATC
AGTGAAG-3'
- (2) 5'-AATTCTTCACTGATATTCATTTTAAGAAATTGCTTCAACTTGCAGCAGCAC
GATTTAGAAA-3'

次に、2つのプローブを用いて、ST2 細胞の cDNA をクローン化した 1.6 \times 10⁵個の大腸菌コロニーを Whatman541 フィルター上に写しとり、DNA をフィルターに固定した。ハイブリダイゼーションの条件は、³²P で標識化したオリゴヌクレオチド、0.1% SDS、50 μ g 変性サケ精巢 DNA を含む 6 \times SSC で 50 $^{\circ}$ Cにて行った。陽性クローンのうち cDNA インサートがもっとも長いクローンを CDMmIL7 と呼んだ。IL-7 cDNA クローン CDMmIL7(図 1)から *Pst*I/*Xmn*I 断片を切り出して、発現ベクター-pCDL-SR α [Yokota *et al.*, 1987]にサブクローニングした。このクローンを pSR α IL-7 と呼んだ。pSR α IL-7 をリン酸カルシウム法にて COS-1 細胞に導入した 3 日後の培養上清を組換え型 IL-7 として使用した。

1.2.4 プローブの標識化

ノーザンブロットハイブリダイゼーションに使用した ^{32}P 標識プローブは、CDMmIL7 から *Pvu* II で消化した断片(図 2c)を切り出して、ニックトランスレーション法 (Nick Translation Kit ; Amersham 社)にて作製した。

1.2.5 ノーザンブロット解析

トータル細胞 RNA は種々の細胞からグアニジン-セシウムクロライド法にて調製し、Poly(A)+RNA は oligo-dT セルロースカラムクロマトによって精製した。各 2 μg の Poly(A)+RNA を 1%アガロース/ホルムアルデヒドゲルにて電気泳動し、ナイロンメンブラン (Gene screen, New England Nuclear 社) に転写後、IL-7 プローブでハイブリダイズした。ストリンジェントな条件で洗浄し、乾燥させたフィルターを X-Omat-AR フィルム (Kodak 社) に感光した。次に同じフィルターを IL-6 プローブ [Van Snick *et al.*, 1988] (J. van Snick 博士より分与) またはコントロールとして $\text{C}\mu$ プローブでハイブリダイズさせた。

1.2.6 フローサイトメトリー解析

ストローマ細胞上で増殖した細胞中の骨髓球系細胞 (ミエロイド細胞) およびリンパ球の区別は、フローサイトメトリー (Epics Profile) にて、前方角光散乱および直角光散乱を測定することにより行った。また、これらの細胞の細胞表面解析は、細胞を抗 B220 抗体 (RA3-6B2) [Coffman, 1983]、抗マウス IgM 抗体 (Bet1) [Kung *et al.*, 1981] および抗 C3b1 受容体抗体 (Mac1) [Springer *et al.*, 1979] で染色して、2 次抗体として FITC で標識した抗ラット κ 鎖モノクローナルで検出することにより行った。

1.2.7 IL-7 の力価測定

IL-7 の活性はストローマ細胞依存性プレ B 細胞株 DW34 細胞を用いて MTT 法により行った。手順を簡単に述べれば、2 倍段階希釈したサンプルに、 10^4 個の細胞/ウエル (96 ウエルプレート) となるように DW34 細胞を加え、最終容量を 100 μL (10%FCS 含有 RPMI1640) とし、37 $^{\circ}\text{C}$ の CO_2 インキュベーターにて 18 時間培養した。培養後、5mg/mL の MTT 溶液を各ウエルに 10 μL 加え、引き続き、37 $^{\circ}\text{C}$ にて 4 時間培養を続けた。その後、0.04N の HCl を含むイソプロパノールを 150 μL 加え、形成されたホルマザンを溶解して、Titertek Multiscan (Titertek 社) にて 620nm の波長で吸光度を測定した。

1.2.8 コロニー形成試験

メチルセルロース培養は既報に従った [Suda *et al.*, 1989]。具体的には、 5×10^4 個の骨髓細胞を 1mL の 0.88%メチルセルロース、30% FCS、1% 脱イオン化 BSA、0.1mM 2-メル

カプトエタノールおよび各種の濃度の pSR α IL7 をトランスフェクトした COS-1 細胞の培養上清を含む α MEM に懸濁し、37°Cの CO₂ インキュベーターにて培養した。培養後7日目に、50 個以上の細胞からなる細胞塊をコロニーとして計測した。IL-7 に反応して増殖する細胞を IL-7 コロニー形成細胞 (colony forming unit-IL-7; CFU-IL-7) と呼称した。コロニー数を計測した後、メチルセルロース培養からエッペンドルフピペットを用いて顕微鏡下にてコロニーをつり上げ、0.1mL の FCS に懸濁した。細胞懸濁液をサイトスピンにて遠心し、メイ・グリュンワルド・ギムザ染色液にて染色して細胞の形態を観察した。

1.3 結果

1.3.1 マウス IL-7 cDNA の分子クローニングとその発現

IL-7 遺伝子をコードする cDNA クローンを得るために、筆者は LPS と TPA で刺激した ST2 細胞から CDM8 発現ベクターを用いて、cDNA ライブラリーを作製した。Namen ら [Namen *et al.*,1988a]により報告されたマウス IL-7 のコーディング配列に基づいて作製した合成オリゴヌクレオチドを ^{32}P で標識化したプローブを用いてライブラリーをスクリーニングした。その結果、 1.6×10^5 のコロニーから 2 種類のプローブで陽性のクローンを 4 個単離した。最も長い 2.6-kb のインサートを持つクローンである CDMmIL7 をその後の実験に使用した。このクローンは、3'非翻訳領域が 1-kb 長いことを除いて、Namen ら [Namen *et al.*,1988a]により報告されたクローンと同一であった (図 2)。

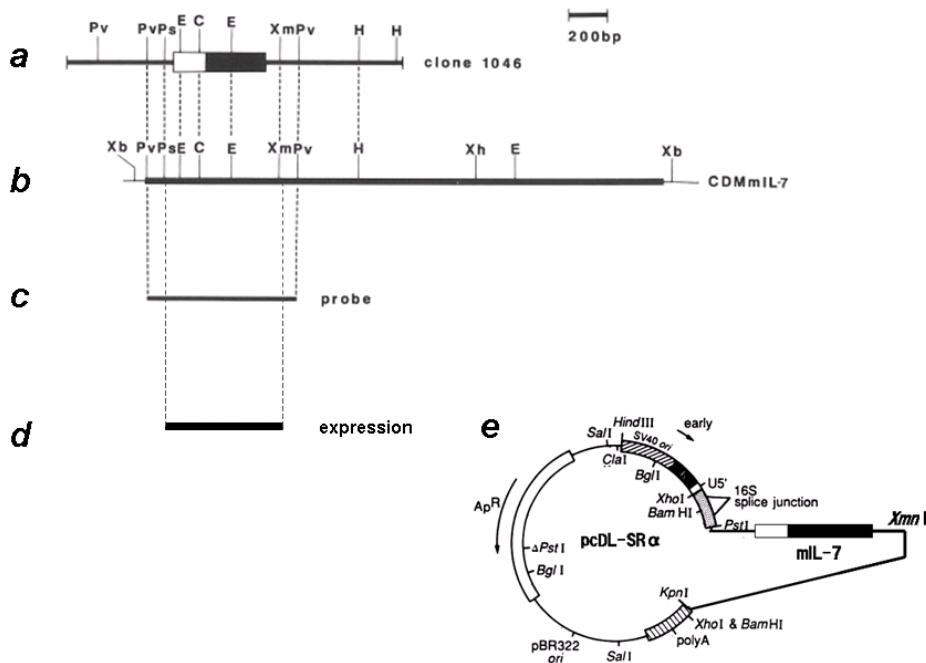


図2 マウスインターロイキン7の cDNA のマップ、プローブおよび発現ベクター

(a) Namen によって単離されたマウス IL-7 cDNA クローン、clone 1046、白色ボックスは IL-7 のリーダー配列であり、黒塗りボックスは IL-7 のタンパク質コード領域である。Clone 1046 の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとして、ST2 細胞より作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングした。(b) CDMmIL7 は ST2 cDNA ライブラリーより取得したマウス IL-7cDNA をクローン化したベクターである。(c) IL-7 の mRNA のノーザンブロット解析用のプローブである。CDMmIL-7 の Pvu II 切断断片を使用した。(d) IL-7 を動物細胞に発現させるための断片である。Pst I/Xmn I 断片を使用した。(e) IL-7 発現ベクター-pSRαmIL-7 である。Pv;Pvu II, Ps;Pst I, E;Eco RI, C;Cla I, Xm;Xmn I, H;HindIII, Hh;Xho I, Xb;Xba I [Sudo *et al.*, 1983]

次に、図2に示した *Pvu* II 断片を IL-7プローブとしてマウスの種々の組織における IL-7 遺伝子の発現を調べた (図3)。その結果、IL-7 遺伝子は胸腺、肺、脾臓、腎臓に発現していたが、脳、骨髄、心臓には発現していなかった。また、複数の IL-7 mRNA 分子が観察されたが、これは、オルタナティブスプライスまたは複数の Poly-A 付加シグナルの存在によると考えられる。

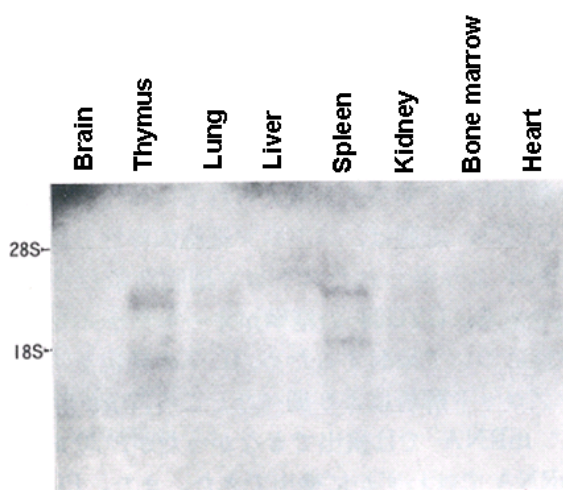


図3 マウス臓器における IL-7 mRNA の発現解析

脳、胸腺、肺、肝臓、脾臓、腎臓、骨髄、腎臓から調整した2 μ gの PolyA⁺RNAをホルムアルデヒド-アガロースゲルにて電気泳動し、RNAをナイロンメンブレンに転写し、³²Pで標識したIL-7プローブでハイブリダイゼーションを行った。IL-7 mRNAは胸腺、肺、脾臓で検出された。腎臓にはわずかに検出されたが、B細胞の分化の場である骨髄では検出されなかった。

さらに筆者は IL-7 のコーディング領域を含む *Pst* I/*Xmn* I 断片を発現ベクター pCDL-SR α にリクローニングした (図2e)。このベクターを pSR α mIL-7 と名づけた。ベクターを COS-1 細胞にトランスフェクトし、培養上清中の IL-7 活性をストローマ細胞依存性のプレ B 細胞株、DW34 細胞を用いて測定した。同時に、正常骨髄細胞を用いてコロニー形成試験を行い、そのコロニーはリンパ系細胞からなっていることが示された (図4)。これらの結果から、pSR α mIL-7によって生産される因子はIL-7であると結論付けられた。

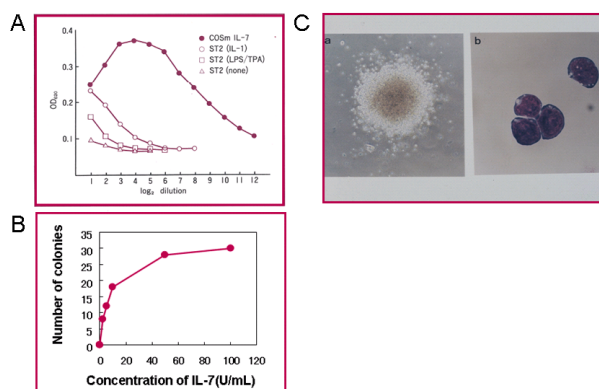


図4 インターロイキン7の生物活性

(A)IL-7 発現ベクターpSR α mIL7を COS-1 細胞に導入し、培養後3日後に細胞培養上清を回収し、組換え型 IL-7(COS mIL-7)とした。この上清の活性を DW34 細胞の増殖を指標に測定した。(B)骨髄細胞を用いたコロニー形成試験にて、組換え型 IL-7 の活性を評価した。IL-7 は濃度に依存して、コロニー形成を促進した。(C)(B)で形成されたコロニー(a)と細胞(b)の形態を示す。

1.3.2 ストローマ細胞における IL-7 遺伝子の発現解析

2つのストローマ細胞株である ST2 細胞と PA6 細胞における IL-7 および IL-6 遺伝子の発現を調べた (図 5)。非刺激の条件では、2つのストローマ細胞株とも IL-7 mRNA を発現していなかったが (図 5 レーン 1、5)、LPS/TPA または組換え型ヒト IL-1 α で刺激した ST2 細胞では IL-7 mRNA が検出された (図 5 レーン 2、3)。一方、PA6 細胞では LPS/TPA または組換え型ヒト IL-1 α で刺激においても IL-7 mRNA は検出されなかったが (図 5 レーン 6、7)、同じフィルターで、IL-6 mRNA の発現を解析した結果、両ストローマ細胞とも、LPS/TPA の刺激で誘導されることが分かった。以上の結果は、IL-7 の産生は、B 細胞の分化を支持する能力に相関していることを示している。さらに、B 細胞の分化を支持する能力を持つ ST2 細胞であっても、IL-7 の産生は構成的でなく誘導的であることに注目すべきである。

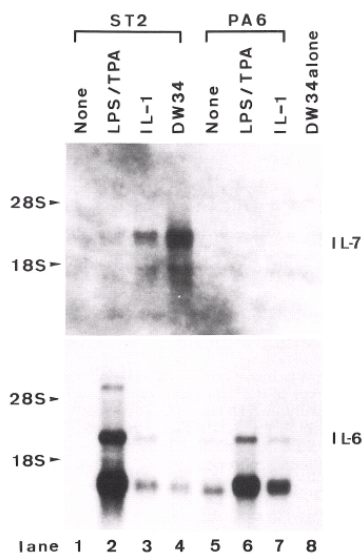


図 5 種々の条件で培養したストローマにおける IL-7 mRNA の発現解析

ST2 細胞および PA6 細胞を 75cm² の培養フラスコにてコンフルエントになるまで培養した。次に、無添加の条件 (レーン 1,5)、1 μ g/mL の LPS と 5ng/mL の TPA を加えた条件 (レーン 2,6)、1U/mL のヒト IL-1 α を加えた条件 (レーン 3,7) で 3 日間培養した。また、ST2 細胞については、フラスコ当たり 2 \times 10⁶ 個の DW34 細胞と 3 日間共培養した (レーン 4)。培養 3 日後、DW34 細胞を ST2 細胞上からピペッティングにより回収した (レーン 8)。DW34 細胞と共培養した ST2 細胞 (レーン 4) には、約 25% の DW34 mRNA が混入していた。この見積もりは B 細胞に特異的に発現する C μ プローブで同じフィルターをハイブリダイズすることにより行った。ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動には 2 μ g の PolyA⁺RNA を使用した [Sudo *et al.*, 1983]。

1.3.3 B 細胞はストローマ細胞において IL-7 遺伝子の発現を誘導する

以上の観察結果は、なぜ DW34 細胞が構成的に IL-7 を産生しない ST2 細胞上で増殖できるのかという疑問を問いかける。最も簡単な説明は、DW34 細胞自身が IL-7 産生を活性化することである。この可能性をテストするために、筆者は 2×10^6 個の DW34 細胞を ST2 細胞上で 3 日間培養し、ピペッティングにより DW34 細胞を接着した ST2 細胞から分離し、それぞれの細胞から Poly A⁺ RNA を調製して、IL-7 mRNA の発現レベルをノーザンブロットにより解析した。

図 5 レーン 4 に示すように、DW34 細胞は IL-1 で刺激する以上に ST2 細胞において IL-7 mRNA を誘導した。一方、同一培養中の DW34 細胞は IL-7 mRNA を発現していなかった (図 5 レーン 8)。DW34 細胞に特異的な C μ mRNA の発現量を測定し、接着性 ST2 細胞中の RNA の 25% が DW34 細胞からのコンタミであると見積もられた (データを示さない)。したがって、実際に DW34 細胞で誘導された IL-7 mRNA のレベルは、ここで見積もられたよりも高いと考えられる。

以上の結果はストローマ細胞と造血細胞との作用は一方向でなくて、相互に作用しあう関係であることを示しており、細胞間相互作用は、造血の制御様式として存在していることが示唆された。

1.3.4 IL-7 はストローマ細胞依存的な B 細胞の増殖・分化において必須な分子である

もし IL-7 が実際に B 細胞の分化を支持するストローマ細胞の能力を決定する唯一の因子であるなら、PA6 細胞に IL-7 を加えれば、*in vitro* で B 細胞の分化を支持できる環境になると考えられる。この可能性を検証するために適した細胞集団として、筆者は 2 週間 PA6 細胞上で培養した骨髄細胞を用いた。この細胞集団は、B 細胞の分化を支持するストローマ細胞の ST2 細胞上に移し変えるまで、B 細胞に分化することはない [Nishikawa *et al.*, 1988]。

そこで、この細胞集団を下記の各条件で移し変えて 3 週間培養を続けた: (1) IL-7 単独、(2) PA6 細胞とコントロール培養上清 (モックトランスフェクタント)、(3) PA6 細胞 + IL-7、(4) ST2 細胞単独。その結果、IL-7 単独の場合、PA6 細胞上で前培養した骨髄細胞の増殖を誘導しなかった (図 6A)。PA6 細胞での培養では、リンパ球系細胞は出現しなかった (図 6B)。同じ細胞を IL-7 存在下にて PA6 細胞上で培養すると、細胞の増殖が増強され、成熟 sIgM⁺細胞を含む B220⁺細胞が増殖してきた [Coffman, 1983]。また、ST2 細胞上で培養して増殖してきた細胞集団は、成熟 sIgM⁺細胞を含む B220⁺の B リンパ球系であった (図 6C)。

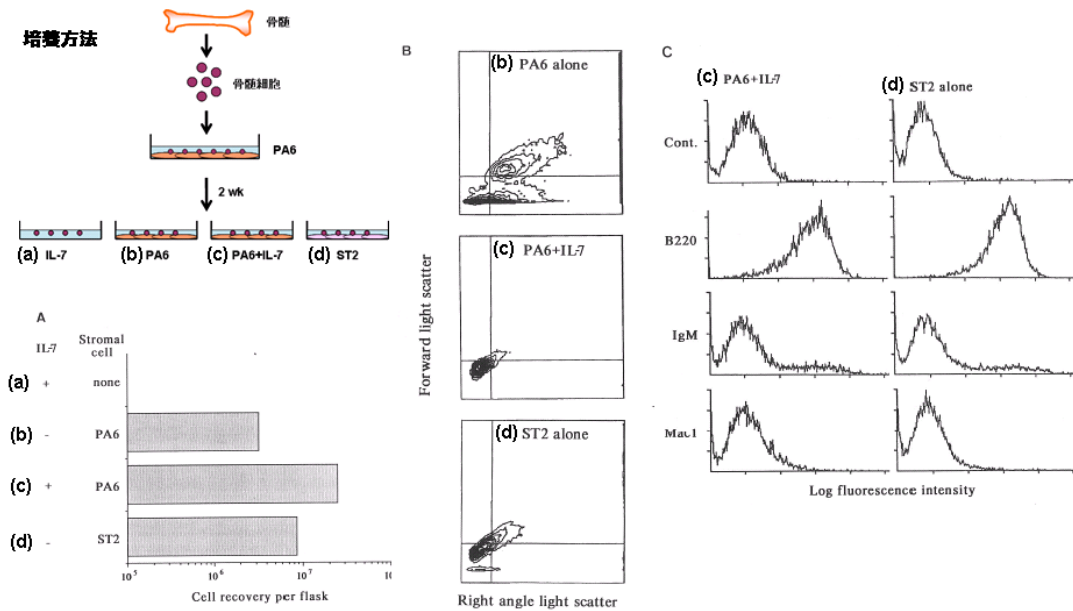


図 6 IL-7 の添加によるストローマ細胞株 PA6 細胞上での成熟 B 細胞の誘導

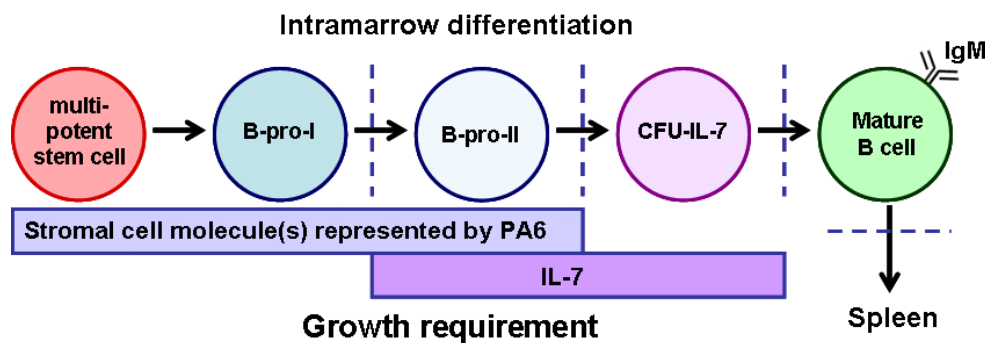
2×10^6 個の正常 Balb/c マウスの骨髄細胞を PA6 細胞と共培養し、2 週間後、増殖した細胞を回収し、その 1×10^6 個の細胞を以下の4条件で培養する; (a)IL-7 単独で培養 (pSR α mIL7 を導入した COS 1 細胞の培養上清 5% 使用)、(b)pCDL-SR α (IL-7 cDNA を含まないベクター) を導入した COS 1 細胞の培養上清 5% 存在下にて PA6 細胞と共培養、(c)IL-7 存在下にて PA6 細胞と共培養、(d)ST2 細胞と共培養。(A) 2 回目の培養を行い、3 週間後にそれぞれの培養条件で増殖した細胞数を測定した結果を示す。(B) 各培養で増殖した細胞の light scatter 解析をフローサイトメトリーにて行った結果を示す。リンパ球の大部分が左隅 (lymphocyte gate) に分布する。IL-7 単独での培養では、細胞が回収できず、フローサイトメトリーでの解析を行わなかった。(C) IL-7 存在下での PA6 細胞との共培養および ST2 細胞との共培養で増殖した細胞の細胞表面抗原の解析結果を示す。細胞表面抗原の検出には、RA3-6B2 (抗 B220 抗体)、Bet1 (抗 Igh6.3 抗体) および Mac1 (抗 C3b1 受容体抗体) を用いた [Sudo *et al.*, 1983]。

1.4 考察

マウスストローマ細胞には B 細胞の分化を支持できる能力のあるものと、B 細胞に分化できる前駆細胞の増殖は支持できるが、それ以降の分化段階に進むために必要な分子を欠けているストローマ細胞に分けることができることが報告されている[Nishikawa *et al.*, 1988]。もし IL-7 が B 細胞の分化に必須不可欠なものであるならば、この 2 種類のストローマ細胞の機能の違いを IL-7 の産生能の差として捉えることができると考え、まず筆者は、Namen らによって報告された IL-7 cDNA を LPS と TPA で刺激した ST2 細胞よりクローニングした。ST2 細胞よりクローニングした IL-7 cDNA は Namen らが報告したクローンより約 1-kb 長い 3' 非翻訳領域を有していた。Namen らの報告では、胸腺、脾臓、腎臓で、2.9、2.6、1.7、1.5kb の複数の mRNA 産物が報告されており、ST2 細胞由来の IL-7 と Namen らの IL-7 との大きさの違いは、RNA のプロセッシングの違いと考えられる。現在では、マウス IL-7 遺伝子の 5'領域の構造が解析されており[Lupton *et al.*, 1990]、プロモーターには特徴的な TATA box および CAAT box が存在しない。これらのプロモーターを持つ遺伝子として、house keeping 型の遺伝子が知られている。このプロモーターの特徴は、複数の転写開始点が存在することであるが、マウス IL-7 の転写も複数の転写開始点が認められている[Lupton *et al.*, 1990]。このことから、IL-7 遺伝子の複数の転写産物には転写開始点の違いによるものも含まれていると考えられる。

Namen らは B 細胞の分化の場である骨髄における IL-7 mRNA の発現について言及していなかった[Namen *et al.*, 1988a]。そこで、骨髄での IL-7 mRNA の発現を解析した結果、驚くべきことに、発現していなかった (図 3)。この結果から、IL-7 の B 細胞分化における役割について疑問を投げかけることができる。本研究で示したように、B 細胞の分化支持能を持つ ST2 細胞は、何らかの刺激を受けないと IL-7 を産生しない。さらに興味深いことに、B 細胞株は ST2 細胞と共培養されることにより、IL-7 の産生を強く誘導する。この結果が骨髄内での現象を反映しているとすれば、骨髄中のストローマ細胞が IL-7 を産生していなくても、B 細胞とストローマ細胞が接触する場所では十分な量の IL-7 が産生されることになる。さらに、IL-6 の発現量を比較して、IL-7 の発現量は低いこと (図 5)、ストローマ細胞は、骨髄全体の細胞数に比べてその数が少ないことから、骨髄全体から mRNA を調製した場合、IL-7 mRNA のシグナルをノーザンブロットで検出することは困難であると考えられる。

PA6 細胞に IL-7 を加えて骨髄細胞を培養した実験結果は (図 6)、明らかに IL-7 がストローマ細胞依存的な B 細胞の分化過程に必須であることを示しており、IL-7 を産生できないストローマ細胞は、B 細胞分化を支持できないと断定できる。既に、IL-7 は他のシグナルの助けを必要としないで、プレ B 細胞の増殖を誘導する能力を持っていることが示されている[Namen *et al.*, 1988a,b]。IL-7 単独で、PA 6 細胞上で前培養した骨髄細胞の増殖を誘導することはできないという結果は、IL-7 と他のストローマ細胞のシグナルの両方を必要とするより未分化な B 細胞が存在することを物語っている。



B-pro-I: 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
B-pro-II: 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
CFU-IL-7: IL-7単独で増殖する細胞
Mature B cell: IL-7に反応しないsIgM⁺の成熟B細胞

図7 ストローマ細胞由来の増殖シグナル要求性に基づいたB細胞初期分化のモデル

ストローマ細胞依存的なB細胞の分化は、それぞれが異なる増殖要求性を有する4つのステージに分類できる。第1ステージは、プロB細胞のステージで、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(B-pro-I)、第2ステージは、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(B-pro-II)、第3のステージは、IL-7単独で増殖する細胞(CFU-IL-7)、(4)第4ステージは、IL-7に反応しないsIgM⁺の成熟B細胞(Mature B cell)である。

以上から、ストローマ細胞依存的なB細胞の分化は、それぞれが異なる増殖要求性を有する4つのステージに分類できる(図7)。第1ステージは、プロB細胞のステージで、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(B-pro-I)、第2ステージは、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(B-pro-II)、第3のステージは、IL-7単独で増殖する細胞(CFU-IL-7)、第4ステージは、IL-7に反応しないsIgM⁺の成熟B細胞(Mature B cell)である。特に興味深いのは、IL-7の添加は、IL-7産生能のないPA6細胞で培養した骨髓細胞からsIgM⁺B細胞を誘導するのに十分であることである。本研究に続いての研究で、半固形メチルセルロース培地による骨髓細胞の培養で生じたIL-7に応答する個々の細胞集団の5-20%の細胞がsIgM⁺であることが示された[Suda *et al.*, 1989]。これらの結果は、一旦B前駆細胞がストローマ細胞上でIL-7応答性ステージになると、細胞増殖の間に、自律的にさらに分化が進むことを示している。

この結果から、B細胞の分化を増殖要求性の面からみたモデルを示したが、B細胞の分化の最終段階は、免疫グロブリンを細胞表面に発現し(B細胞受容体)、抗原抗体反応機能を獲得することである。この観点に立って、免疫グロブリン遺伝子の構造変化を指標として、B細胞の分化段階が詳しく調べられている[Alt *et al.*, 1986]。免疫グロブリン遺伝子の

構造変化を指標とした従来のモデル (図 8) と筆者が示した B 細胞の増殖要求性の面からみたモデル (図 7) とを照らし合わせてみると、免疫グロブリン L 鎖の再構成が終了して、細胞表面に B 細胞受容体が発現される段階の細胞では、IL-7 に対する反応性を失っている。このことは、機能的な L 鎖遺伝子の発現は IL-7 受容体の発現を抑制することを示唆している。一方、機能的な H 鎖遺伝子の発現と、増殖要求性の関係については、免疫グロブリン遺伝子再構成に関する機構に欠陥があり、機能的な H 鎖遺伝子の発現ができない SCID マウスの骨髄細胞では、B-Pro-II までの分化は正常であるが、CFU-IL-7 が分化してこないことが明らかになっている [Nishikawa *et al.*, 1989; Era *et al.*, 1991]。従って、B-Pro-II から CFU-IL-7 の分化段階が機能的な H 鎖遺伝子の発現と密接に関連していることが示されている。

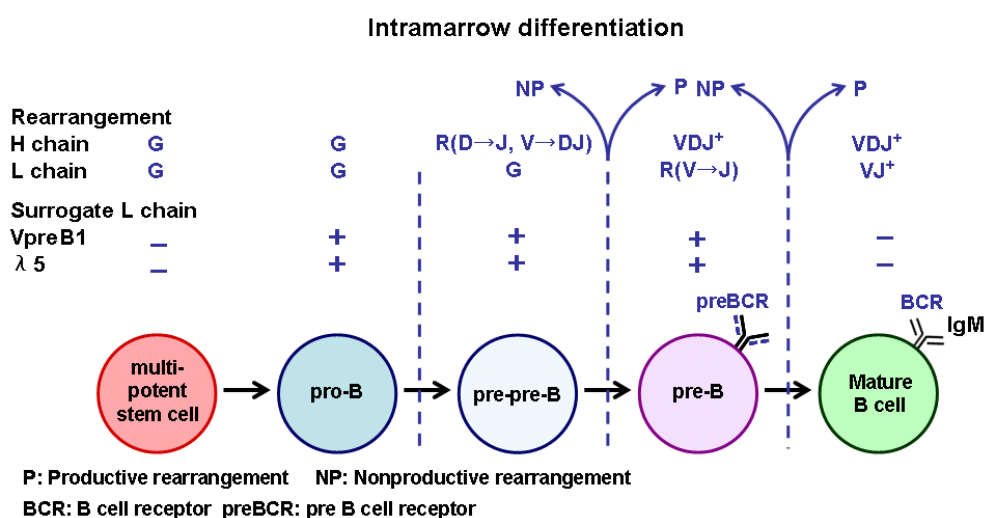


図 8 B 細胞分化における免疫グロブリン遺伝子の再構成

B 細胞の分化は免疫グロブリン遺伝子の再構成により特徴づけられる多くの段階を経て進行する。骨髄中の多能性幹細胞およびプロ B 細胞では免疫グロブリン遺伝子の再構成はしておらず、生殖細胞型の遺伝子構成を示す (G)。免疫グロブリン遺伝子 H 鎖 D 断片と J 断片の再構成 (R) はプレプレ B 細胞で起こる。一方代替 L 鎖 (surrogate L chain) である VpreB1 と λ 5 はプロ B 細胞から発現しており、機能的な免疫グロブリン H 鎖の発現に成功すると (VDJ⁺)、複合体を形成しプレ B 細胞受容体 (preBCR) として細胞表面に発現する。最後に L 鎖遺伝子が再構成に成功すると (VL⁺)、代替 L 鎖の発現は抑制され、B 細胞受容体 (BCR) として細胞表面に発現し、その後、未熟 B 細胞、成熟 B 細胞へと分化し、骨髄内から末梢 (脾臓) にリクルートする。

すなわち、B-pro-I は、代替 L 鎖である VpreB1 と λ 5 を発現している細胞集団であり、H 鎖遺伝子の再構成中の細胞集団が B-pro-II である。次段階では、H 鎖遺伝子の再構成に成功して、機能的な免疫グロブリン H 鎖が産生されると代替 L 鎖と複合体を形成し細胞表

面に発現される（プレB細胞受容体）。この細胞集団が、CFU-IL-7である。機能的なH鎖遺伝子の発現に成功すると、PA6細胞の分子は増殖に不要となる。現在では、B細胞分化に関連するPA6細胞上の分子の一つが幹細胞因子（stem cell factor; SCF）であることが分かっている [Era *et al.*, 1994]。機能的なH鎖遺伝子の発現に成功し、プレB細胞受容体が発現すると、その細胞の増殖にSCF受容体からのシグナルが不要となると考えられる。さらに、CFU-IL-7の段階の細胞はSCF受容体を発現していないことが知られている [Era *et al.*, 1994]。このことから、プレB細胞受容体からのシグナルがSCF受容体の発現を制御している可能性が示唆される。

マウスにおいて、IL-6は成熟B細胞に作用して、抗体産生を誘導するだけでなく、成熟B細胞の増殖も誘導することが報告されている [Vink *et al.*, 1988]。従って、B細胞分化過程でのIL-6の作用についても興味を持たれる。プレB細胞株であるDW34細胞によるST2細胞からのIL-6 mRNAの発現誘導は、図5に示したように、IL-7 mRNAの発現誘導と比較して強くない。しかし、第2章で示すように、T細胞株や骨髓球系細胞株によるサイトカイン誘導作用は、DW34細胞による誘導作用と異なり、LPS/TPAで刺激したと同等に強くIL-6 mRNAの発現を誘導する。もし、成熟B細胞株がDW34細胞とは異なって、IL-6 mRNAをより強く誘導するのであれば、成熟B細胞を選択的に増殖させるシステムとして働いている可能性が考えられ興味深い。

以上本研究から、免疫グロブリン遺伝子の構造変化を指標としたマウスB細胞の分化段階モデルとB細胞の分化を増殖要求性の面からみたモデルとは相関しており、免疫グロブリン遺伝子の再構成の失敗に起因して非機能的なB細胞が多数生じる分化過程で、機能的な再構成に成功した細胞のみがいかに選択的されるかという問題について、機能的な免疫グロブリンの再構成に成功した細胞のみが次の段階で必要な増殖要求性を獲得することにより最終的に成熟B細胞のみが脾臓にリクルートされるという説明が可能と考えている。

結論として、IL-7はストローマ細胞依存的なB細胞分化過程に必須の分子であることが明らかとなった。さらに、本研究によって、B細胞の初期分化において、IL-7以外に分化に必要なストローマ細胞の分子が存在することを示している。また、本研究戦略は、機能の異なった幾つかのストローマ細胞株と組換え型サイトカインを組み合わせ、これらの分子を一つずつ解き明かしていくための有用なシステムになるだろう。

1.5 要約

ストローマ細胞依存性の B 細胞分化過程での IL-7 の役割を機能の異なる 2 つのストローマ細胞、ST2 細胞と PA6 細胞を用いて検討した。ST2 細胞は B 細胞の増殖・分化を支持し、PA6 細胞は支持しない。その結果、(1) ストローマ細胞の IL-7 産生能とストローマ細胞の B 細胞増殖・分化支持とは相関している、(2) ST2 細胞による IL-7 の産生は構成的でなく、誘導的である、(3) IL-7 依存性の B 細胞自身が ST2 細胞から IL-7 を誘導する能力を持っている、(4) PA6 細胞に IL-7 を添加すると B 細胞の増殖・分化を支持することができる、(5) 初期 B 細胞前駆細胞からプレ B 細胞への分化には IL-7 と他の未同定のストローマ細胞由来分子（群）が必要であることがわかった。

第2章

ストローマ細胞株におけるサイトカイン産生制御：
細胞間相互作用によるサイトカイン遺伝子の差異的発現

2.1 序論

遺伝子工学の進歩によって、種々の造血細胞の系統に働くサイトカインの cDNA がクローン化され、純化された組換え型増殖因子が、造血の制御を研究するため、現在広く使用されている[Balkwill and Burke, 1989]。この進歩に先立って、Dexter と彼の同僚らは、増殖因子を培養系に加えないで造血を維持できる長期骨髄細胞培養系を開発した[Dexter *et al.*, 1977]。これは、*in vitro* で形成された骨髄微小環境が、造血前駆細胞の増殖と分化を維持するために要求されるすべての必要な分子を供給できることを示している。

これまでに、この微小環境を形成するストローマ細胞が数多くクローン化されている[Lanotte *et al.*, 1982; Kodama *et al.*, 1982; Zipori *et al.*, 1985; Collins and Dorshkind 1987; Hunt *et al.* 1987; Whitlock *et al.*, 1987; Ogawa *et al.*, 1988; Pietrangeli *et al.*, 1988]。これらの細胞株を用いることにより、均質なストローマ細胞層の上で造血のプロセスを研究することが可能となった。これらの研究から明らかとなった重要な結論は、ストローマ細胞の B 細胞分化支持能に差異があることである[Collins and Dorshkind 1987; Whitlock *et al.*, 1987; Nishikawa *et al.*, 1988]。この B 細胞分化支持能の差異は、骨髄内のストローマ細胞の実際の相違を現しているのか、ストローマ細胞が樹立されたときに起こる *in vitro* の人工的なことなのかという新しい問題を提起する。この問題に答えるために、ストローマ細胞の活性を分子レベルで調べることは重要であり、実際に骨髄内に存在するストローマ細胞のタイプを順々に明確にすることができる。

筆者は、第 1 章に示したように、これまでに 2 種類のストローマ細胞株、PS6 細胞と ST2 細胞[Nishikawa *et al.*, 1988; Sudo *et al.*, 1989]について研究を行ってきた。前者のストローマ細胞は、骨髄球系細胞の分化は支持するが、B 細胞の分化を支持しない。一方後者は両方の細胞の分化を支持する。第 1 章で、筆者は B 細胞の分化を支持する能力におけるこれらのストローマ細胞の機能的な違いは、ストローマ細胞の IL-7 を産生する能力の違いであること、さらに ST2 細胞による IL-7 の産生は構成的でなく誘導的であり、ストローマ細胞と B 細胞系列の細胞との相互作用が、ストローマ細胞の IL-7 産生に重要な役割であることを示した[Sudo *et al.*, 1989]。

本研究では、これらのストローマ細胞の IL-7 以外のサイトカイン mRNA を発現する能力の特徴について調べ、サイトカインを発現させるために必要なシグナルについて研究した。さらに、この研究から、B 細胞系列の細胞がストローマ細胞から IL-7 を誘導する仕組みについてのモデルを提案することができた。

2.2 材料と方法

2.2.1 サイトカイン

精製組換え型ヒト IL-1 α は湊博士より分与された。組換え型マウスインターロイキン 2 (interleukin-2;IL-2)、インターロイキン 3 (interleukin-3;IL-3) およびインターロイキン 5 (interleukin-5;IL-5) は既報に従って作製した[Hattori *et al.*, 1987]。

2.2.2 細胞株

2種類のストローマ細胞株、PA6細胞とST2細胞の由来と性質は第1章に記載されている[Kodama *et al.*, 1982; Nishikawa *et al.*, 1988]。簡単に述べれば、PA6細胞は新生仔C57BL/6マウス頭蓋冠から樹立された前脂肪細胞 (preadipocyte) であり、10% FCS (Gibco社)、を含む α MEM 培地 (Gibco社) にて培養した。ST2細胞はBC8マウスのWhitlock-Witteの長期骨髄培養系[Whitlock and Witte, 1982]から樹立され、5% FCS、50 μ M 2-メルカプトエタノールを含むRPMI1640培地 (Gibco社) にて培養した。また、本実験には、継代数が10から25回のPA6細胞およびST2細胞を使用した。細胞の維持は、4日毎に1:5で新しいフラスコに継代培養することで行った。

ストローマ細胞依存性プレB細胞株DW34細胞[Nishikawa *et al.*, 1988]およびJ1細胞株[Katoh *et al.*, 1990]は、それぞれ、ST2細胞およびST2細胞+IL-5で培養した。IL-3依存性未分化骨髄細胞株FDC-P2細胞およびIL-2依存性細胞傷害性T細胞株CTLL-2細胞は既報に記載の方法で培養した[Dexter *et al.*, 1980; Gillis and Smith, 1977]。マクロファージ細胞株TME細胞は[Ogawa *et al.*, 1991]、SV40のTおよびt抗原の遺伝子を含む初期遺伝子を含むレトロウイルスベクターを胎生9日の胎仔肝臓細胞に感染させて樹立した細胞株であり、原報に従って培養した。

2.2.3 ストローマ細胞でのサイトカインの誘導

コンフルエントに増殖したストローマ細胞を1 μ g/mLのリポポリサッカライド (LPS; *E. coli* 055:B5, Difco laboratories社) と5ng/mLの12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA; Sigma社)、または1U/mLの組換え型ヒトIL-1 α と3日間培養した。造血細胞の系統の異なる3種類のDW34細胞、FDC-P2細胞およびCTLL-2細胞もまたストローマ細胞でのサイトカインの誘導に使用した。2 \times 10⁵個のIL-3依存性細胞株FDC-P2またはIL-2依存性細胞株CTLL-2細胞を100mmのディッシュにコンフルエントになったST2細胞層上に、10mLの5% FCS、50 μ M 2-メルカプトエタノール、100 U/mLのIL-3またはIL-2を含むRPMI1640培地にて培養した。DW34細胞およびJ1細胞は、それぞれ、2 \times 10⁶個/ディッシュで、コンフルエントになったストローマ細胞層上に、10mLの5%FCS、50 μ M 2-メルカプトエタノールを含むRPMI1640培地にて培養した。J1細胞の培養には、50U/mLのIL-5を添加した。共培養3日後に、造血細胞をストローマ細胞層から0.025% EDTA-PBS

にてピペッティングで回収した。その後、ストローマ細胞を **Trypsin-EDTA** で処理して回収した。

2.2.4 トランスウエルメンブレンチャンバーによる培養

ST2 細胞を 6 ウエル培養プレート (Costar 社) にコンフルエントになるように培養し、この上に、0.4 μ m のポアの膜を有したトランスウエルメンブレンチャンバー (Transwell membrane chamber; Costar 社) をのせ、 1×10^6 個の DW34 細胞をトランスウエルメンブレンチャンバー中に加え、5% CO₂ インキュベーター中で、37°C、3 日間培養した。培養後、ST2 細胞と DW34 細胞を回収し、ノーザンブロット解析に使用した。

2.2.5 DW34 細胞のパラホルムアルデヒドによる固定

DW34 細胞のパラホルムアルデヒドによる固定は既報に従った [Kurt-Jones *et al.*, 1985]。簡単に述べれば、DW34 細胞 (2×10^8 個) を PBS で 3 回洗浄し、1%パラホルムアルデヒドを含む PBS に懸濁し、室温に 15 分間置いた。次に、PBS で 3 回洗浄し、100mL の培養液に再懸濁し、5% CO₂ インキュベーター中で、37°C、18 時間培養した。培養後、再び細胞を PBS で 3 回洗浄した。パラホルムアルデヒドで固定した 1×10^7 個の DW34 細胞を 10-cm ディッシュで培養した ST2 細胞層上にシードして、引き続き培養を続けた。

2.2.6 mRNA の調製とノーザンブロット解析

PolyA+RNA はグアニジン/CsCl 法にて全 RNA を調製し [Chirgwin *et al.*, 1979]、引き続きオリゴ dT セルロースカラムにて分離した。ノーザンブロット解析には、2 μ g の PolyA+RNA を 2.2M のホルムアルデヒドを含む 50%フォルムアミドに溶解し、55°C で 10 分間変性させ、1% アガロースゲルにて電気泳動を行った [Lehrach *et al.*, 1977]。電気泳動後、RNA をナイロンメンブレンフィルターに転写した。このフィルターを 50%フォルムアミド、5 \times SSPE、5 \times デンハルト溶液、0.02mg/mL サケ精巣 DNA (熱変性済み)、0.1% SDS を含む緩衝液中で ³²P プローブと 42°C にて一夜、ハイブリダイゼーションさせた。2 \times SSC で洗浄後、42°C で 0.1%SDS を含む 0.1 \times SSC にて洗浄し、X 線フィルムに露光した。³²P プローブの除去は、沸騰させた 0.1%SDS を含む 0.1 \times SSC にフィルターを入れ 1 分間処理することにより行った。

2.2.7 プローブ

インターロイキン類のプローブとして、IL-1 α プローブは CDMmIL-1 α を *Sau3A1* で消化した 0.74kb の DNA 断片を、IL-1 β プローブは CDMmIL-1 β を *Xho I* で消化した 1.3kb の DNA 断片を、IL-2 プローブは pcDmIL-2 を *PvuII-Ssp I* で消化した 0.4kb の DNA 断片を、IL-3 プローブは pcDmIL-3 [Hattori *et al.*, 1987] を *HindIII-Xba I* で消化した 0.36kb の DNA 断片を、IL-4 プローブは平野博士と岸本博士より分与された pSP6BSF [Nakajima

et al., 1987]を *Sac*I-*Sca*I で消化した 0.23kb の DNA 断片を、IL-5 プローブは本庶博士より分与された pSP6KmTRF23[Kinashi *et al.*, 1986]を *Eco*47III-*Esp*I で消化した 0.43kb の DNA 断片を、IL-6 プローブは Van Snick 博士より分与された pH1B5[Van Snick *et al.*, 1988]を *Eco*RI で消化した 1.1kb の DNA 断片を、IL-7 プローブは CDMmIL-7[Sudo *et al.*, 1989]を *Puv* II で消化した 0.76kb の DNA 断片を使用した。造血因子のプローブとして、GM-CSF プローブは pHSmGM-CSF[Kajigaya *et al.*, 1986]を *Ava*II-*Hinf*I で消化した 0.43kb の DNA 断片を、G-CSF プローブは CDMmG-CSF を *Hind*III で消化した 0.6kb の DNA 断片を、M-CSF プローブは Rajvashisth 博士と Luisis 博士に分与された pMCSF-1[Rajavashisth *et al.*, 1987]を *Pst*I-*Eco*RI で消化した 0.15kb の DNA 断片を使用した。TNF プローブは pcDHuTNF-7 の *Ava*II-*Eco*RI で消化した 0.67kb の DNA 断片を、Ly-5 プローブは湊博士より分与された pLy5-68[Shen *et al.*, 1985]を *Bam*HI で消化した 2.3kb の DNA 断片を用いた。TGF β と LIF プローブはそれぞれ、cDNA[Derynck *et al.*, 1986; Gearing *et al.*, 1988]の核酸配列番号 352-1527、12-630 に相当する領域を PCR[Saiki *et al.*, 1988]にて増幅して得た DNA 断片を用いた。アクチンプローブは Oncor 社から購入した 0.77kb の DNA 断片を用いた。すべてのプローブはニックトランスレーション法により ^{32}P で標識した。

2.2.8 RT-PCR

RT-PCR によるマウス IL- β の発現の確認は以下のように行った。1 μg の PolyA⁺RNA を鋳型とし、oligo-dT をプライマーを用いて、Superscript(Invitrogen 社)にて cDNA を合成した。その 1/50 量の cDNA を用いて、PCR 反応を行った。PCR 反応には Taq polymerase (Takara 社) と IL- β の遺伝子情報に基づいて作製したプライマー (sense primer : 5'-ATGGCAACTGTTCTTGA ACTCAA -3', anti-sense primer : 5'-GGAAGACACGGATTCCATGGTG -3') を用いて行った。反応は、まず 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分間で DNA を変性させ、次に 95 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分、60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分、72 $^{\circ}\text{C}$ 、3 分間を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。増幅された DNA 断片は 1.2%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色する事により検出した。

2.3 結果

2.3.1 ストローマ細胞のサイトカイン mRNA の発現能

まずはじめに、筆者は ST2 細胞と PA6 細胞のサイトカイン mRNA の発現能を調べた。ST2 細胞または PA6 細胞を 10cm ディッシュにてコンフルエントになるまで培養し、その後、LPS/TPA または IL-1 α を含む培地で培養した。3 日間刺激した後、細胞を回収し、mRNA を調製した。2 μ g の RNA をホルムアルデヒドゲルにて電気泳動し、RNA をナイロンフィルターに転写した。3 つのフィルターを作製し、それぞれ、コントロールの mRNA として、WEHI-3 細胞、EL-4 細胞および TME 細胞の mRNA を使用した。

第 1 のフィルターは、IL-1 α 、IL-3、IL-5、IL-6、M-CSF および TNF をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。第 2 のフィルターは、IL-2、IL-4 および GM-CSF をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。第 3 のフィルターは、IL-1 β 、IL-7、LIF、G-CSF および TGF- β をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。標準化のためのコントロールとしてアクチンをプローブとしてすべてのフィルターでハイブリダイゼーションを行った。

これらの結果を図 1 に示した。M-CSF および TGF- β は両方のストローマ細胞で構成的に発現している因子であった。IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、GM-CSF または TNF の mRNA は、どちらのストローマ細胞でも、ノーザンブロットの解析レベルでは検出できなかった。しかしながら、LPS/TPA で刺激した ST2 細胞では、長時間露光すると、GM-CSF mRNA を検出することができた（データを示さず）。IL-1 β 、IL-6、IL-7 および LIF は、ST2 細胞において誘導される因子であり、一方、IL-6、LIF および G-CSF は PA6 細胞において誘導される因子である。IL-6 プローブは 2 つの転写産物を検出した。メインバンドは、1.3kb の mRNA であり、マイナーバンドは 2.4 kb mRNA である。1.3 Kb の mRNA は既に報告されている[Van Snick *et al.*, 1988]。2.4 Kb の mRNA がオルタナティブスプライスか Poly A 付加部位の違いかは分からないが、ラット IL-6 の mRNA では、1.2-1.3 と 2.4kb の 2 種類の mRNA が PolyA 付加部位の違いとして報告されている[Northemann *et al.*, 1989]。

IL-7 プローブは、2.9 kb、2.6 kb、1.7 kb および 1.5 kb の複数の転写産物を検出した。これの複数の転写産物は、転写開始点の違い、オルタナティブスプライスあるいは複数の Poly A 付加部位による差と考えられた[Namen *et al.*, 1988a; Sudo *et al.*, 1989]。M-CSF のプローブは、複数の mRNA(4.5 kb、3.8kb、2.3 kb および 1.5 kb)を検出した。これらの転写産物は、オルタナティブスプライスと複数の Poly A 付加シグナルによることが報告されている[Rajavashisth *et al.*, 1987]。既に報告されているように、TGF- β プローブを使用すると、2.5 kb、1.9 kb および 1.5 kb の mRNA が検出された。2.5 kb の mRNA は、種々の細胞で検出されており[Derynck *et al.*, 1986; Akhurst *et al.*, 1988; Braun *et al.*, 1988; Thompson *et al.*, 1988]、1.5 kb の mRNA は内皮細胞で検出されている[Braun *et al.*, 1988]。さらに、3' および 5'非翻訳領域の長さのポリモロフィズムとして説明されている

[Derynck *et al.*, 1986].

ST2 細胞において、IL-1 β 、IL-6 および LIF は、IL-1 α より LPS/TPA でより強く誘導される。一方、IL-7 は LPS/TPA より IL-1 α でより強く誘導される。同様に、G-CSF は PA6 細胞において、LPS/TPA によってのみ誘導される。これらの結果は、1) ストローマ細胞のサイトカイン産生能は種々多様であり、2) 同一のストローマ細胞で、異なったシグナルにより、異なったサイトカインが誘導されることを示している。

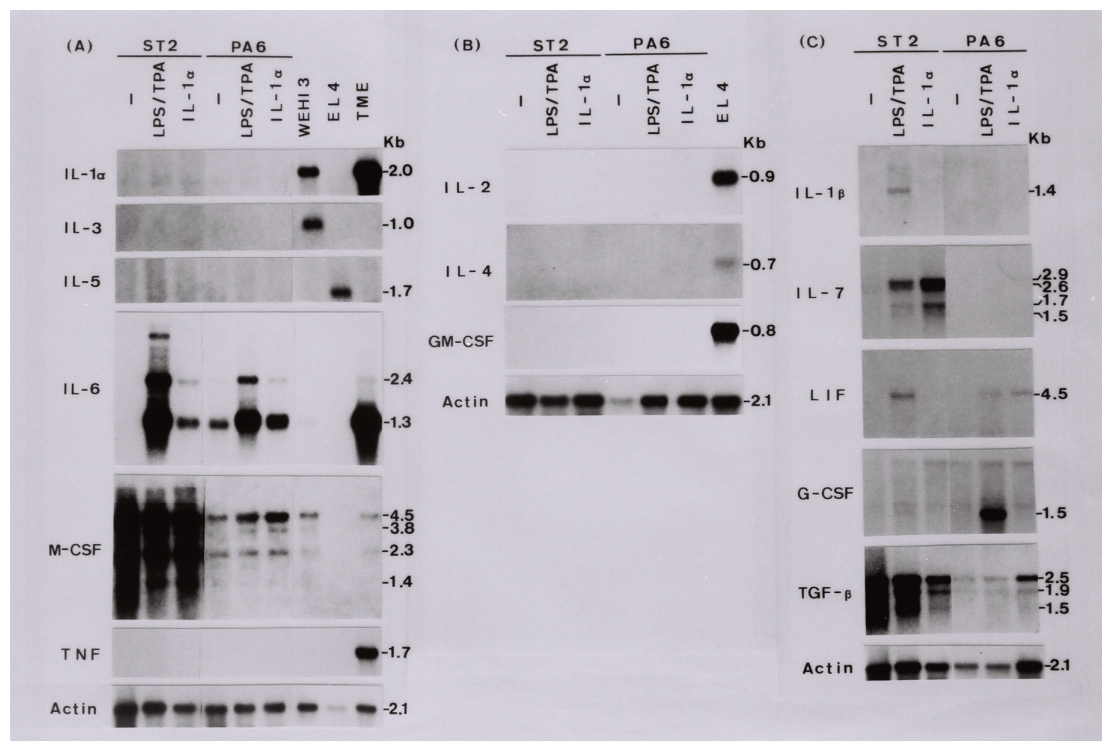


図1 ストローマ細胞株におけるサイトカイン mRNA の発現

ヒト組換え型 IL-1 α または LPS/TPA 存在または非存在下で培養した ST2 細胞および PA6 細胞から mRNA を調製した。WEHI-3 細胞、EL-4 細胞および TME 細胞からも同様に陽性コントロールとして RNA を調製した。mRNA をホルムアルデヒドアガロースゲルにて電気泳動し、ナイロンメンブレンフィルターに転写し、図に記載のプロンプを用いてハイブリダイズした。

2.3.2 サイトカインの誘導における細胞間相互作用

前記で、筆者は IL-1 β 、IL-6、IL-7 および LIF は ST2 細胞において誘導的な因子であることを見出した。興味深いことに、これらの因子は、さらに 2 つのグループに分けることができる。第 1 のグループは、IL-1 β 、IL-6 および LIF であり、IL-1 α よりも LPS/TPA でより効果的に誘導される。第 2 のグループは、IL-7 であり、IL-1 α によりより効果的に誘導される。しかしながら、LPS/TPA は、ストローマ細胞に対する自然の活性化剤とは言いがたい。そこで、次に筆者は、LPS/TPA と同等な自然界の活性化剤の探索を試みた。

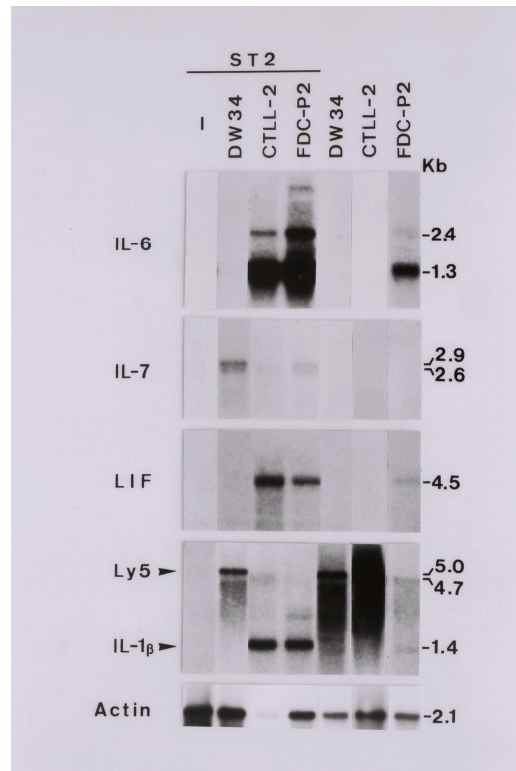


図2 種々の系統の細胞株による ST2 細胞からのサイトカイン mRNA の誘導

ST2 細胞を ST2 細胞依存性プレ B 細胞株 DW34、IL-2 依存性細胞傷害性 T 細胞株 CTLL-2 細胞あるいは IL-3 依存性未分化骨髄球系細胞株 FDC-P2 細胞と共培養し、培養 3 日後に接着性の ST2 細胞を回収し mRNA を調製した。共培養に用いた血液細胞も ST2 細胞と分けて回収し、mRNA を調製した。次いで、mRNA をホルムアルデヒドアガロースゲルにて電気泳動し、ナイロンメンブレンフィルターに転写し、図に記載のプロープを用いてハイブリダイズした。Ly-5 と IL-1 β プロープでのハイブリダイゼーションは同時に行った。その他のプロープは別々にハイブリダイゼーションに用いた。Ly-5 mRNA のサイズが異なるのは、オルタナティブスプライスによる。

ストローマ細胞はリンパ造血系細胞と接触しその増殖分化を制御すと考えられるので、ST2 細胞にこれらの因子を誘導させる自然の活性化剤が、近傍のリンパ造血系細胞であると考えるのは合理的なことである。そこで、筆者は、T 細胞、B 細胞および骨髄球系細胞の ST2 細胞に対するサイトカイン誘導能を調べた。各細胞の系統として、非リンパ腫細胞である CTLL-2(IL-2 依存性細胞傷害性 T 細胞株)、DW34(ストローマ細胞依存性プレ B 細胞株)および FDC-P2(IL-3 依存性未分化骨髄球系細胞株)を選択した。これらの細胞株をそれぞれ、細胞の増殖に必要なインターロイキンを含む培養液で、10-cm ディッシュに培養したコンフルエントのストローマ細胞層上で共培養した。培養 3 日後に、できるだけ穏やかにピペッティングして、ストローマ細胞層から造血細胞を除き、接着細胞を回収した。CTLL-2 細胞と FDC-P2 細胞は、細胞層からほぼ完全に除去することが可能であったが、

DW34 細胞は、ST2 細胞層の下に潜り込む傾向があるので、完全に除去することは困難であった。ST2 細胞の mRNA 中の造血系細胞の mRNA の混入の割合は、造血系細胞特異的な Ly-5 プローブでハイブリダイゼーションを行うことにより見積もった。造血細胞とストローマ細胞を別々に回収して、PolyA⁺RNA を調製した。2 μ g の PolyA⁺RNA をホルムアルデヒド-アガロースゲルにて電気泳動し、RNA をナイロンメンブランに転写し、³²P で標識した IL-6、IL-7、LIF、IL-1 β +Ly-5 およびアクチンプローブでハイブリダイゼーションを行った。リプロービングは、各プローブによるハイブリダイゼーションの前に、沸騰させた 0.1%SDS を含む 0.1 \times SSC にフィルターを入れ 1 分間処理することにより前の ³²P プローブを除去して行った。これらの結果を図 2 にまとめた。FDC-P2 細胞および CTLL-2 細胞は増殖にそれぞれ IL-3 および IL-2 を必要としているので、ST2 細胞をこれらの 2 つの因子の単独で刺激したコントロール実験を行ったが、無刺激と比較して、サイトカインの mRNA の発現に影響しなかった (データを示さず)。

ST2 細胞 mRNA 中の造血系細胞の mRNA の混入の割合は、Ly-5 のバンドの濃さで見積もって、DW34 細胞が約 40% であり、FDC-P2 および CTLL-2 細胞が 10% 以下であった。興味深いことに、B 細胞株、DW34 細胞は効果的に IL-7 を誘導するが、IL-1 β 、IL-6 または LIF を誘導しなかった。以前の実験では、DW34 細胞はわずかに IL-6 を誘導した [Sudo *et al.*, 1989]。さらに、ST2 細胞で DW34 細胞が IL-7 mRNA を誘導するデータは、4 回の独立した実験で確かめられている。一方、T 細胞および骨髄球系細胞は、これらのすべての因子を誘導する。これらの結果は、ST2 細胞のサイトカイン産生能に関して、DW34 細胞は IL-1 α に、CTLL-2 細胞と FDC-P2 細胞は LPS/TPA に相同であることを示している。

2.3.3 非接触培養系における ST2 細胞の IL-7 mRNA の発現解析

前記で、筆者はサイトカインの誘導には細胞間相互作用が必要であることを述べた。次に、DW34 細胞による IL-7 の誘導には、接触が必要かを調べた。ST2 細胞単独 (図 3 レーン 1)、細胞同士を接触させた場合の ST2 細胞 (図 3 レーン 2)、メンブランで仕切って DW34 細胞と接触しなかった ST2 細胞 (図 3 レーン 3) およびそれぞれの条件で培養したときの DW34 細胞 (図 3 レーン 4、5) の IL-7 mRNA の発現をノーザンブロットにて解析した。その結果、DW34 細胞が ST2 細胞から IL-7 を誘導させるには、細胞同士の接触は必要であることが明らかとなった。

以上から、DW34 細胞の IL-7 誘導分子は、DW34 細胞上の膜分子である可能性が示唆されるが、もし DW34 細胞が微量な液性の IL-7 誘導分子を分泌していた場合、メンブランで仕切るにより、誘導に十分な量の液性因子が ST2 細胞に到達しないことになり、その結果 IL-7 を誘導できない場合が考えられる。そこで、DW34 細胞の IL-7 誘導分子が膜分子なのかを確認するために、パラホルムアルデヒドで固定した DW34 細胞に IL-7 を誘導する能力があるかについて検討した。

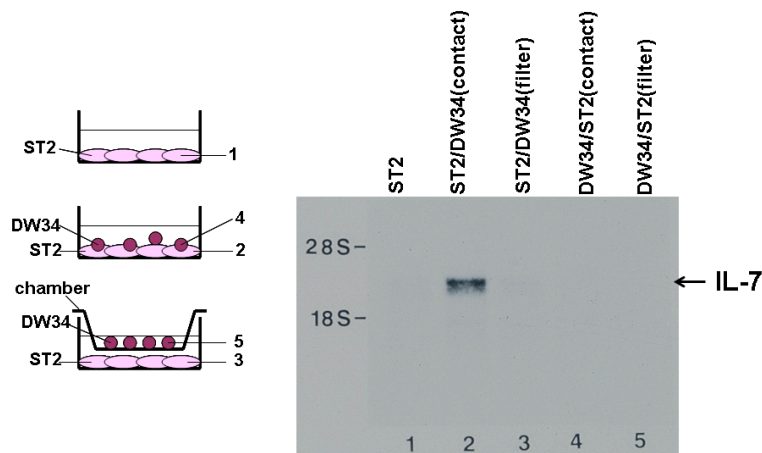


図 3 非接触培養系における ST2 細胞の IL-7mRNA の発現解析

DW34 細胞による IL-7 の誘導には、ストローマ細胞との接触が必要かを調べた。ST2 細胞単独(レーン 1)、細胞同士を接触させた場合の ST2 細胞(レーン 2)、メンブレンで仕切って DW34 細胞と接触しなかった ST2 細胞(レーン 3)およびそれぞれの条件で培養したときの DW34 細胞(レーン 4、5)の IL-7mRNA の発現をノーザンブロットにて解析した。

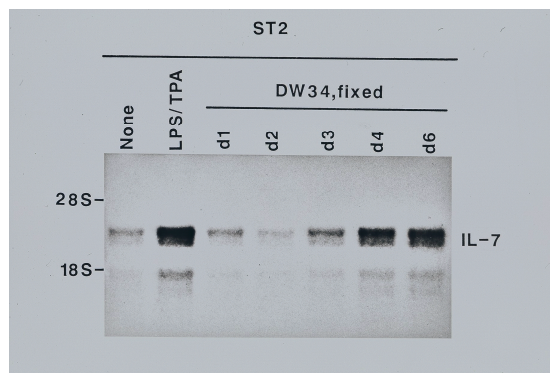


図 4 パラホルムアルデヒドで固定した DW34 細胞による IL-7mRNA の誘導

パラホルムアルデヒドで固定した DW34 細胞で ST2 細胞を刺激し、経時的に ST2 細胞を回収し IL-7mRNA の発現をノーザンブロットにより解析した。

DW34 細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、3 回の洗浄と 18 時間の前培養で、パラホルムアルデヒドの影響を極力除いた後、ST2 細胞を刺激した。経時的に ST2 細胞を回収し IL-7mRNA の発現をノーザンブロットにより解析した。図 4 に示すように、パラホルムアルデヒドで固定した DW34 細胞は ST2 細胞から IL-7mRNA の発現を誘導することが示された。興味深いことに、IL-7mRNA の発現は誘導後、4 日、6 日目と強くなっていた。

2.3.4 J1 細胞株と共培養した ST2 細胞における IL-7 mRNA の発現解析

IL-7 を誘導する能力のある細胞のスクリーニングから、増殖に ST2 細胞との共培養に IL-5 を必要とする B 細胞株である J1 細胞は、IL-7 を誘導しないことが分かった (図 5)。前項で、ST2 細胞からサイトカインの産生を誘導する分子 (群) について、DW34 細胞

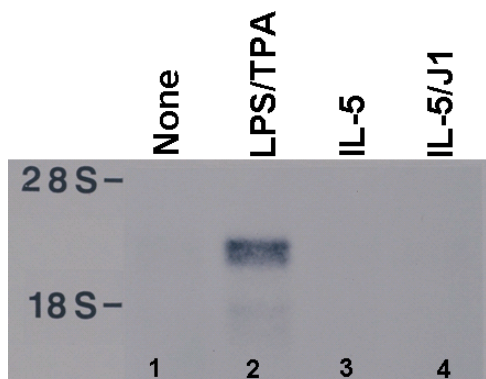


図 5 J1 細胞株と共培養した ST2 細胞における IL-7 mRNA の発現解析

J1 細胞 (増殖に ST2 細胞との共培養に IL-5 を必要とする B 細胞株) を ST2 細胞 + IL-5 で培養し、3 日後に ST2 細胞を回収した (レーン 4)。また、コントロールとして、ST2 細胞 (レーン 1)、LPS/TPA (レーン 2) または IL-5 (レーン 3) で 3 日間刺激した ST2 細胞を用意し、それぞれの細胞から PolyA⁺RNA を調製し、ノーザンブロットにより IL-7 mRNA の発現を解析した。

は IL-1 α に相同であることを示した。このことと合わせて考えれば、ST2 細胞から IL-7 を誘導することのできる DW34 細胞は IL-1 を発現しているのに対し、誘導能のない J1 細胞は IL-1 を発現していないと考えられる。そこで、ST2 細胞と DW34 細胞、ST2 細胞と J1 細胞 + IL-5 の共培養系において、それぞれの細胞の IL-1 β の発現を RT-PCR にて検討した。その結果、DW34 細胞は IL-1 β mRNA を発現していたのに対し、J1 細胞は発現していなかった (図 6)。一方、IL-1 α mRNA はどの細胞も発現していなかった (データを示さず)。以上から、DW34 細胞の IL-7 誘導分子は、膜型もしくは膜に結合した IL-1 β であることが示唆された。DW34 細胞は DW34 細胞が産生する IL-1 β により、ST2 細胞から IL-7 を誘導して増殖するというパラクラインシステムにより増殖していると考えられる。

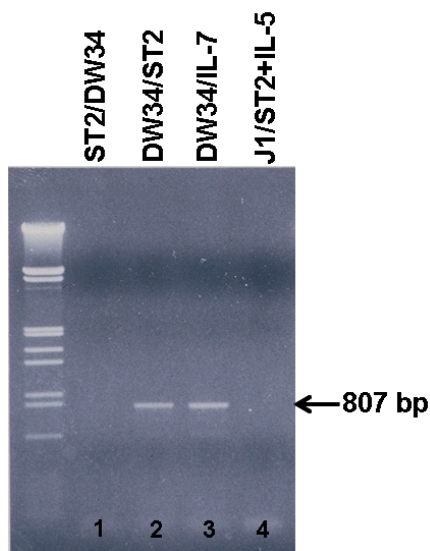


図 6 B 細胞株における IL-1 β mRNA の発現

ST2 細胞 (レーン 1)、ST2 細胞依存性プレ B 細胞株 DW34 細胞 (レーン 2)、IL-7 細胞依存性 B 細胞株 DW34 細胞 (レーン 3) および ST2 細胞 + IL-5 依存性プレ B 細胞株 J1 細胞 (レーン 4) から PolyA⁺RNA を調製し、PCR 法により IL-1 β mRNA の発現を解析した。DW34 細胞は IL-1 β mRNA を発現していたのに対し、J1 細胞は発現していなかった。マーカーには λ ファージを HindIII および EcoRI で切断した断片を用いた。

2.4 考察

ストローマ細胞株の多種多様な機能について多くの研究報告がなされている[Lanotte *et al.*, 1982; Kodama *et al.*, 1982; Zipori *et al.*, 1985; Collins and Dorshkind 1987; Hunt *et al.* 1987; Whitlock *et al.*, 1987; Ogawa *et al.*, 1988; Pietrangeli *et al.*, 1988; Nishikawa *et al.*, 1988; Sudo *et al.*, 1989; Landreth *et al.*, 1988; Kodama *et al.*, 1986; Rennick *et al.*, 1987; Witte *et al.*, 1987; Gimble *et al.*, 1989]。一方、種々の造血細胞の増殖と分化を支持するのに十分なストローマ細胞株についても研究されている[Collins *et al.*, 1987; Whitlock *et al.*, 1987; Ogawa *et al.*, 1988; Nishikawa *et al.*, 1988]。それゆえ、造血支持能の異なるストローマ細胞株のサイトカイン産生能を比較することは重要であり、これは、骨髄に存在するストローマ細胞を明らかにすることに繋がる。

本研究で、著者は B 細胞分化支持能に明らかな違いのある 2 つのストローマ細胞株、PA6 細胞と ST2 細胞を選定し、それらのサイトカイン産生能を比較した。どちらのストローマ細胞にも検出されたサイトカインの mRNA は、これまでの報告で観察されたもの[Gimble *et al.*, 1989]と比較して、発現量ははるかに低い、本質的に発現パターンは同一であった。簡単に言えば、M-CSF、GM-CSF、G-CSF、IL-6、IL-7 および TGF- β は、造血を支持することのできるストローマ細胞で構成的または誘導的に産生される。この研究で、筆者は、ストローマ細胞によって産生される因子として、新たに LIF と IL-1 β を挙げることができた。LIF が、以前に記載された造血細胞に対する活性[Hilton *et al.*, 1988]に加えて、骨芽細胞刺激因子活性を持っているという注目すべきレポートがある [Metcalf and Gearing, 1989]。これは、骨髄内のストローマ細胞が、造血と造骨の 2 つの役割を果たしている可能性を示唆している。

他のストローマと同様に、筆者が使用したストローマ細胞は、前脂肪細胞としての共通な性質を持っている。これらの組織学的な形態の類似性を除いて、明らかに、いくつかのサイトカインの産生に起因すると考えられる B 細胞の分化を支持する能力に明らかに違いがある。B 細胞分化を支持する ST2 細胞は IL-7 と IL-1 β を産生し、一方、B 細胞分化を支持できないストローマ細胞は IL-7 と IL-1 β を産生しない。さらに、ST2 細胞は TGF- β を構成的に高発現しているが、PA6 細胞は TGF- β の産生は低い。対照的に、G-CSF の mRNA は PA6 細胞のみで検出された。このような多数の違いが、PA6 細胞と ST2 細胞の樹立時の *in vitro*での培養の間に起きてしまうとは考えにくいので、筆者は、これらの違いは、ストローマ細胞の本来の活性の違いを反映していると考えられるほうが良いと考えた。しかしながら、本研究の結果は、種々のストローマ細胞のサイトカインの発現を解析した Gimble の報告[Gimble *et al.*, 1989]と比較して、明らかに対照的であった。Gimble の結果は、ストローマ細胞間でサイトカインの遺伝子の発現が類似していた。この矛盾を説明することは難しいが、Gimble によって解析されたストローマ細胞は、Thy1 陽性であるが、筆者が使用した ST2 細胞は、Thy1 陰性であり、PA6 細胞が Thy1 陽性である。Kinkade の総説には[Kinkade *et al.*, 1989]、ストローマ細胞のリストがあげられている。そこにあげられ

たストローマ細胞株の中で、3種類の細胞株が、ST2細胞と同様にThy1陰性である。興味深いことに、3種類のストローマ細胞株は、接触阻害がかかり、正常マウス骨髄細胞のB細胞の分化を効果的に支持する。さらに、Witteらは、長期骨髄B細胞培養系での主なストローマ細胞は、Thy1陰性であることを実証している[Witte *et al.*, 1987]。これらの結果は、Thy1の発現は、ここで記載した2つのストローマ細胞株を区別するマーカーとなると推測できる。このThy1に加え、IL-1 β 、IL-7およびG-CSFの発現を、新たに調製したストローマ細胞株を用いて解析する必要がある。

本結果から明らかになった重要な知見は、これらのストローマ細胞で誘導的なサイトカインは、特にST2細胞において、さらに2つのグループに分けられる。第1のグループはIL-7で、LPS/TPAよりもIL-1 α でより有効に誘導される。第2のグループは、IL-1 β 、IL-6、LIFでIL-1 α でよりLPS/TPAでより効果的に誘導される。現時点で、この現象はST2細胞に特異的なことなのか、B細胞の分化を支持するストローマ細胞株に共通なことかは明確ではない。もしこの現象が、S17 [Collins *et al.*, 1987]またはAC4 [Whitlock *et al.*, 1987]のようなB細胞の分化を支持するストローマ細胞株に一般化できるなら、この特徴はストローマ細胞のタイプを区別するためにも利用されるであろう。ST2細胞で誘導されるサイトカインのうち、IL-6とIL-1 β のプロモーター領域が解析されている[Clark *et al.*, 1986]。実際、既存の転写因子に共通した配列が両遺伝子の上流領域に見出され、おそらく、同じシグナルに対する応答するこれらの因子の共誘導の役割を果たしているのだろう。IL-6やIL-1 β と発現様式が違っているIL-7遺伝子のプロモーター領域の解析は、IL-7遺伝子の発現を誘導する細胞内の分子の理解に繋がるだろう。

IL-1は骨髄内で産生されることが証明されており、ストローマ細胞依存性B細胞の増殖・分化においては種々な効果があるが[Dorshkind 1988; Suda *et al.*, 1989]、サイトカインの遺伝子の発現を誘導するためにしばしば使用されるLPS/TPAは骨髄内のストローマ細胞に対する自然の刺激剤ではない。TPAはプロテインキナーゼCを直接活性化することにより、膜受容体からのシグナル伝達経路をバイパスすることがよく知られている[Nishizuka, 1984]。興味深いことに、本研究で、ST2細胞と造血細胞とを共培養したとき、造血細胞自身によりST2細胞から、LPS/TPAで刺激したときと同様なサイトカイン類を誘導されることを示した。すなわち、IL-2依存性細胞傷害性T細胞株CTLL-2細胞およびIL-3依存性未分化骨髄球系細胞株FDC-P2細胞はIL-1 β 、IL-6およびLIFをIL-7より効果的に誘導した。一方、ストローマ細胞依存性プレB細胞株DW34細胞は、ST2細胞において、IL-1 α で刺激したときと同様に、IL-1 β 、IL-6およびLIFでなくてIL-7を誘導する効果を示した。ST2細胞と造血細胞との相互作用の分子基盤は解かれていないが、本研究の結果は、T細胞または未成熟骨髄球系細胞によるST2細胞の刺激は、LPS/TPAによって活性化されるプロテインキナーゼCを含むパスウェイを通して伝達されることを示唆している。これに対し、リンパ球特異的な因子であるIL-7は、多能的な因子であるIL-1、IL-6、LIFの誘導に必要な経路とは異なった情報伝達経路を使用して誘導されると考えられる。現在では、

マウス IL-7 遺伝子の 5'領域の構造が解析されており [Lupton *et al.*, 1990]、IL-6 遺伝子と異なり、プロモーターには特徴的な TATA box および CAAT box が存在しなかった。これらのプロモーターを持つ遺伝子として、house keeping 型の遺伝子が知られている。このプロモーターの特徴は、複数の転写開始点が存在することであるが、マウス IL-7 の転写も複数の転写開始点が認められている [Lupton *et al.*, 1990]。これらの報告も、IL-7 の発現と IL-6 の発現様式は異なることを支持している。

ST2 細胞と DW34 細胞の相互作用の仕組みを考えるために、両者の細胞をメンブレンで仕切って培養を行った結果、メンブレンで ST2 細胞と DW34 細胞の接触を断つと、ST2 細胞から IL-7 が誘導されないことが示された。このことから、DW34 細胞の IL-7 誘導分子は膜タンパク質もしくは微量に分泌されるタンパク質であることが示唆された。そこで、このどちらかを明らかにするために、パラホルムアルデヒドで固定した DW34 細胞に IL-7 誘導能があるかを検討した。DW34 細胞より微量に分泌された液性因子によって IL-7 が誘導されるのであれば、パラホルムアルデヒドで固定すれば、誘導されないと考えてよい。その結果、パラホルムアルデヒドで固定された DW34 細胞では IL-7 を誘導できなかったことから、DW34 細胞の IL-7 誘導分子は、膜型もしくは膜に結合した分子であると考えられた。

ST2 細胞から IL-7 を誘導する B 細胞株をスクリーニングした結果、J1 細胞のみが IL-7 を誘導することができなかった。J1 細胞は ST2 細胞との共培養に加え IL-5 が必要である [Kato *et al.*, 1990]。DW34 細胞の刺激は、IL-1 α の刺激に類似していることから、ST2 細胞から IL-7 を誘導できる DW34 細胞には IL-1 が発現しているのではないかと想到した。そこで、ST2 細胞上で増殖している DW34 細胞と ST2 細胞+IL-5 で増殖している J1 細胞の IL-1 の発現を調べたところ、IL-1 α はいずれの細胞も発現していなかったが、IL-1 β は DW34 細胞には発現し、J1 細胞には発現していなかった。このことから、DW34 細胞の IL-7 誘導分子は IL-1 β であることが示唆された。しかし、IL-1 β には膜型での存在様式が知られていない。このことから、筆者は、DW34 細胞から産生された IL-1 β は細胞膜上のタンパク質と結合していること推測している。

以上から、ST2 細胞に依存した DW34 細胞の増殖は、DW34 細胞が産生する膜型もしくは膜に結合した IL-1 β により ST2 細胞から IL-7 が誘導されパラクライン機構により起こると考えられる (図 7)。このパラクライン機構がストローマ細胞依存性の B 細胞増殖・分化に一般化されるかについて、たとえば、Whitlock-Witte の長期骨髄細胞培養系 [Whitlock and Witte, 1982] で抗 IL-1 β 抗体を加えることにより B 細胞の増殖・分化が影響されるかを検討する必要がある。

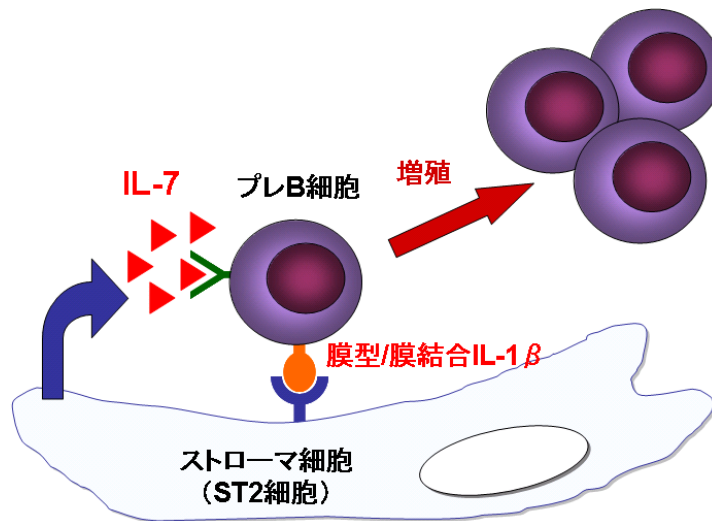


図 7 ストローマ細胞と相互作用による B 細胞の増殖のモデル

ST2 細胞に依存した DW34 細胞の増殖は、DW34 細胞が産生する膜型もしくは膜に結合した IL-1 β により ST2 細胞から IL-7 が誘導されパラクライン機構により起こると考えられる。

2.5 要約

B細胞の分化支持能に差異のある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。本研究で調べ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細胞の分化増殖を支持しない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 はストローマ細胞株のサイトカイン産生を誘導する能力は異なっていた。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細胞株および骨髓球系細胞株を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細胞株および骨髓球系細胞株は、LPS/TPAとほとんど同一であった。これらの結果は、(1)ストローマ細胞株は、サイトカイン産生能に差異があり、(2)ストローマ細胞株は、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。ことを示している。

さらに、DW34細胞によるIL-7誘導能について、IL-7誘導能のないJ1細胞と比較したところ、DW34にはIL-1 β が発現していたのに対し、J1細胞はIL-1 β を発現していなかった。このことから、ST2細胞に依存したDW34細胞の増殖は、DW34細胞が産生する膜型もしくは膜に結合したIL-1 β によりST2細胞からIL-7が誘導されパラクライン機構により起こると考えられた。

第3章

マウスリンパ球におけるインターロイキン7受容体の 発現と機能

3.1 序論

成獣マウスにおける B 細胞の増殖分化は、骨髄中の骨髄微小環境を形成するストローマ細胞群によって制御されている [Kincade *et al.*, 1987; Osmond, 1990]。多能性造血幹細胞から B 細胞増殖分化過程を支持することのできるストローマ細胞が樹立されたことによって [Hunt *et al.*, 1987; Whitlock *et al.*, 1987; Collins *et al.*, 1987; Ogawa *et al.*, 1988]、この過程に必要な分子の同定が可能となった。ストローマ細胞に発現している数多くの分子の中で、IL-7 は、B 前駆細胞の増殖を誘導することができることが示された最初の分子である [Namen *et al.*, 1988a,b]。組換え型 IL-7 を用いた研究で、IL-7 はプレ B 細胞の増殖を誘導することができることが示された [Namen *et al.*, 1988a; Lee *et al.*, 1989; Suda *et al.*, 1989]。さらに IL-7 は、ストローマ細胞や SCF と合わせて使用した時、B 前駆細胞の初期分化過程に作用することが示された [Sudo *et al.*, 1989; Hayashi *et al.*, 1990; Cumanò *et al.*, 1990; McNiece *et al.*, 1991; Rolink *et al.*, 1991; Hirayama *et al.*, 1992; Era *et al.*, 1994]。また IL-7 は、B 前駆細胞に対する増殖活性に加え、成熟および未成熟のマウス T 細胞の増殖を誘導することが報告された [Morrissey *et al.*, 1987; Grabstein *et al.*, 1990; Chantry *et al.*, 1989; Conlon *et al.*, 1989; Murray *et al.*, 1989; Suda and Zlotnik, 1991]。実際に、IL-7 が継続的に投与されたマウスや IL-7 トランスジェニックマウスの研究では、IL-7 は、T 細胞および B 細胞を劇的に増殖させるという結果が示されている [Morrissey *et al.*, 1991; Samaridis *et al.*, 1991; Damia *et al.*, 1992; Faltynek *et al.*, 1992]。

第 1 章で示した結果をはじめとして、IL-7 がリンパ球の増殖分化に関与していることを示すこのようなポジティブな結果があるにもかかわらず、IL-7 が *in vivo* でのリンパ球の増殖分化における必須なサイトカインであるか、不明であった。この問題に答えるために、筆者は高親和性 IL-7 受容体 (interleukin-7 receptor; IL-7R) [Goodwin *et al.*, 1990; Armitage *et al.*, 1992] に対する機能阻害モノクローナル抗体作製し、IL-7R の発現と機能を解析した。本研究で、IL-7R は sIgM 陰性の B 前駆細胞と CD4⁻8⁻、CD4⁻CD8⁺ の T 細胞に発現していることを見出した。さらに、このモノクローナル抗体を用いた *in vivo* での投与実験によって、筆者は、IL-7 が T 細胞および B 細胞の増殖分化において、実際に機能的に必需なサイトカインであることを示した。

3.2 材料と方法

3.2.1 マウス IL-7R の cDNA クローニング

マウス IL-7R の cDNA として報告されている塩基配列から [Goodwin *et al.*, 1990]、IL-7R のコーディング領域の 5' 末端および 3' 末端の塩基配列をもとに、5'-AATCA-TTTGTTTTGGGATGGCTCTGGG-3' および 5'-AATTCATTTGTTTTGGTAAAACTAGACAT-3' の 2 種類のプライマーを合成した。各プライマーを 20pmol、IL-7 依存性プレ B 細胞株 DW34 細胞 [Nishikawa *et al.*, 1988] の mRNA より得られた cDNA、0.2 μ g を 0.5mL のマイクロ遠心チューブに取り、20mM Tris-HCl (pH8.3)、1.5mM MgCl₂、25mM KCl、100 μ g/mL ゼラチン、50 μ M 各 dNTP、4 単位 TaqDNA ポリメラーゼとなるように試薬を加え全量を 100 μ L とした。DNA の変性条件を 94 $^{\circ}$ C、1 分、プライマーのアニーリング条件を 56 $^{\circ}$ C、2 分、プライマーの伸長条件を 72 $^{\circ}$ C、4 分の各条件で、DNA サーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus 社) を用い、40 サイクル反応させた。この反応液に T4 DNA ポリメラーゼを 2 単位加え、37 $^{\circ}$ C、30 分間反応させた。その後、これを 1% アガロースゲルにて電気泳動し、約 1.4kb のマウス IL-7R cDNA を常法に従って調製した。上記の操作で得られたマウス IL-7R cDNA 断片を常法に従って、T4 DNA キナーゼでリン酸化し、あらかじめ制限酵素 *Sma* I で消化し、アルカリフォスファターゼで脱リン酸化しておいた pUC19 に T4 DNA リガーゼで連結した。これを用いて、常法に従い大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体よりプラスミド DNA を常法により調製した。次にこのプラスミド DNA を制限酵素 *Bam* HI で消化することにより、目的のマウス IL-7R cDNA が組み込まれていることを確認し、このプラスミド DNA を pUCmIL-7R と名づけた。

3.2.2 マウス IL-7R-ヒト IgGFc キメラタンパク質の発現ベクターの作製

pUCmIL-7R を制限酵素 *Kpn* I で消化し、T4 DNA ポリメラーゼにて平滑末端として、T4 DNA リガーゼにて、*Xho* I リンカーを連結した。次に制限酵素 *Xho* I および *Bam* HI にて消化し、マウス IL-7R の細胞外領域に相当する塩基配列を含む約 0.7kb の DNA 断片を 1% アガロースゲルにて電気泳動することにより分離精製した。一方、B. Seed より分与されたヒト CD4-ヒト IgGFc キメラタンパク質発現ベクター、CD4Rg [Aruffo *et al.*, 1990] を制限酵素 *Xho* I と *Bam* HI で消化し、ヒト IgG1 遺伝子のヒンジ領域 (H)、定常領域部分 (CH2 および CH3) を含む DNA 断片を 1% アガロースゲルにて電気泳動することにより分離精製した。この断片と上記の操作で得たマウス IL-7R の細胞外領域の塩基配列を含む DNA 断片を T4DNA リガーゼにて連結した。これを用いて、常法に従い大腸菌 (MC1061/P3) を形質転換し、得られた形質転換体よりプラスミド DNA を調製した。次にこのプラスミド DNA を制限酵素 *Xho* I と *Bam* HI で消化することにより目的のマウス IL-7R cDNA 断片が組み込まれていることを確認し、このプラスミドを CDMmIL-7R-IgG と名づけた。図 1A に動物細胞発現用マウス IL-7R-ヒト IgGFc キメラタンパク質発現ベクター CDMmIL-7RIg の構築図を示す。

3.2.3 動物細胞でのマウス IL-7R-ヒト IgG キメラタンパク質の発現

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞のジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 欠損株である CHO clone DUKXB11 (コロンビア大学 Chasin 博士より分与) [Urlaub and Chasin, 1980] を 12 ウェルプレートに、ウェル当たり 1×10^5 個となるように 10% ウシ胎児血清 (FCS; Gibco 社) と核酸含有 α -MEM 培地 (Gibco 社) にて一夜培養した。1 μ g の CDMmIL-7RIg と 0.1 μ g の DHFR 発現ベクター、pAD26SV(A)-3 [Scahill *et al.*, 1983] を混合し、リポフェクチン (BRL 社) に加えた。これを先に用意した細胞に加え、一夜培養した。細胞を 20 倍希釈して、10% FCS と核酸不含 α -MEM 培地 (Gibco 社) にて 10 日間培養して形質転換体を得た。これらの形質転換体を 0.1 μ M のメソトレキセートおよび 10% FCS を含む核酸不含 α -MEM 培地にて培養し、マウス IL-7R-ヒト IgGFc キメラタンパク質の発現が高いクローン CHOIL7-RIg-1-1M を得た。CHOIL7-RIg-1-1M をコンフルエントになるまで培養し、1% Nutridoma-NS (Boehringer Mannheim 社) を含む D-MEM/F-12 培地 (Gibco 社) と交換し、さらに培養を続けた。3 日後に、培養上清を集め、ろ過した培養上清を PBS で平衡化した Procep-A (Bioprocessing 社) に添加した。カラム容量の 15 倍の PBS で未吸着物質を洗浄後、10 倍容の 10mM 塩酸溶液で溶出した。溶出液に直ちに 0.1 容の 0.2M のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0) を加え中和した。これをマウス IL-7R-ヒト IgG1Fc キメラタンパク質として実験に用いた。

3.2.4 キメラタンパク質による DW34 細胞の増殖阻害活性の測定

IL-7 依存性プレ B 細胞株 DW34 細胞 [Nishikawa *et al.*, 1988] は、10U/mL の IL-7、50 μ M 2-メルカプトエタノール、100 単位/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシンおよび 10% FCS を含む RPMI1640 培地 (Gibco 社) で培養した。2 倍段階希釈したキメラタンパク質に、IL-7 を最終濃度が 10 単位/mL となるように加え、さらに 10^4 個の細胞/ウェル (96 ウェルプレート) となるように DW34 細胞を加え、最終容量を 100 μ L (10% FCS 含有 RPMI1640) とし、37°C の CO₂ インキュベーターにて 18 時間培養した。培養後、5mg/mL の MTT 溶液を各ウェルに 10 μ L 加え、引き続き、37°C にて 4 時間培養を続けた。その後、0.04N の HCl を含むイソプロパノールを 150 μ L 加え、形成されたホルマザンを溶解して、Titertek Multiscan (Titertek 社) にて 590nm の波長で吸光度を測定した。

3.2.5 抗 IL-7R モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

精製マウス IL-7R-ヒト IgGFc キメラタンパク質をマウス IL-7R の抗原として用いた。マウス IL-7R-ヒト IgGFc キメラタンパク質 100 μ g を完全 freund's アジュバントと混合し、ウイスターラットに皮下投与した [Ogawa *et al.*, 1991]。約 30 日後、PBS で調製した 50 μ g のマウス IL-7R-ヒト IgGFc キメラタンパク質を静脈内投与した。3 日後に、脾臓細胞を取り出し、常法に従って、ミエローマ細胞株 X63.Ag8.653 と融合させた。融合細胞を 100 単

位/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、50 μ M 2-メルカプトエタノールおよび 10%FCS を含む RPMI1640 培地に懸濁し、これを 96 ウェルプレートに 100 μ L/mL の割合で加え、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ インキュベーター中で培養した。翌日、2 倍濃度の HAT 培地 (Boehringer Mannheim 社) を 100 μ L 加え、ハイブリドーマ細胞を選別した。

3.2.6 モノクローナル抗体のスクリーニング

ハイブリドーマの培養上清を 3 種類の異なる評価系でスクリーニングを行った。第一の評価方法は、ハイブリドーマの培養上清中の抗体が IL-7 依存性プレ B 細胞株 DW34 細胞の IL-7 レセプターに結合するか否かを、ハイブリドーマ上清と DW34 細胞とを反応させ、2 次抗体として FITC 標識抗ラット IgG 抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーで解析した。第二の評価法は、96 ウェルプレートに固相化したマウス IL-7R-ヒト IgGFc キメラタンパク質にハイブリドーマ培養上清中の抗体が結合するか否かを EIA にて測定した。詳細には、PBS で調整した 1 μ g/mL のマウス IL-7R-ヒト IgGFc キメラタンパク質を 50 μ L ずつ 96 ウェル EIA 用マイクロプレート (Nunc 社) の各ウェルに加え、4 $^{\circ}$ C にて一晩置いた。キメラタンパク質を除去し、5% スキムミルクを各ウェルに 250 μ L ずつ加え、2 時間置き、スキムミルクを除去後、0.1% Tween20 を含む PBS で 3 回洗浄後、ハイブリドーマ上清を 50 μ L 加え、1 時間反応させた。次に、0.1% Tween20 を含む PBS で 3 回洗浄後、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識した抗ラット IgG 抗体を加え、1 時間反応させ、0.1% Tween20 を含む PBS で 3 回洗浄後、基質溶液を加え、EIA 用リーダーにて吸光度を測定した。第三の評価方法は、DW34 細胞の IL-7 依存性の増殖をハイブリドーマの培養上清が阻害するか否かを調べた。DW34 細胞を PBS で 2 回洗浄し、10% FCS、50 μ M 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地に懸濁した。24 ウェルプレートに 1 \times 10⁵ 個/0.5mL/ウェル加え、次にハイブリドーマ培養上清を 100 μ L 加えた。1 時間後、IL-7 を 5 単位/mL となるように加え、2 日間培養後、細胞数を計測し、ハイブリドーマ培養上清中の IL-7 依存性増殖阻害活性を調べた。

3.2.7 ハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体の精製

抗マウス IL-7R 抗体 A7R34 は、A7R34 産生ハイブリドーマを GIT 培地(日本製薬)または完全無血清培地 (日水製薬) にて高密度連続培養装置 Verax System One(Verax 社)を用いて培養することにより調製した。精製は 50%アンモニウムにより塩析した後、PBS に透析し、Procep-G(Bioprocessing 社)カラムにより精製した。

3.2.8 モノクローナル抗体

ビオチン化 A7R34、FITC ラベル化 RA-6B2(抗 B220 抗体)[Coffman, 1982]、FITC ラベル化抗 Mac1 抗体[Springer *et al.*, 1979]、は既報に従って調製した[Ogawa *et al.*, 1991]。FITC ラベル化抗 S7 抗体[Hardy *et al.*, 1991]は W. Muller 博士より分与された。FITC ラ

ベル化抗 Thy1.2 抗体、FITC ラベル化抗 Lyt2 抗体、PE ラベル化 L3T4 は BRL 社より購入した。A7R34 の Apophycocyanin 化は R H. Hardy 博士が調製したものを使用した。PE ラベル化ストレプトアビジンは Becton Dickinson 社より購入した。

3.2.9 マウス IL-7 の ^{125}I による放射標識

1 個のヨードビーズ (Pierce 社) を 500 μL の 100mM リン酸ナトリウム緩衝溶液 (pH6.5) で洗浄後、ワットマン 3MM の上に置き、余分な水を除き、新しい 1.5mL のエッペンドルフマイクロ遠心管に入れ、これに 100 μL の 100mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5) および 0.2mCi(2 μL) の Na^{125}I を加えた。5 分間、室温で反応させ、次に、100mM リン酸ナトリウム緩衝溶液 (pH6.5) に 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ となるように溶解したマウス組換え型 IL-7 (Intergen 社) を 40 μL 加え、さらに室温にて 15 分反応させた。この反応物を 1%BSA-PBS で平衡化した PD-10 カラム (Pharmacia 社) に添加し、1%BSA-PBS を加え、0.5mL ずつ溶出液を集め、各画分の放射活性をガンマーカウンターにて測定し、放射活性の前半のピークをプールし、放射標識マウス IL-7 とした。

3.2.10 IL-7 結合試験

DW34 細胞を RPMI1640 培地で 3 回洗浄し、 1×10^7 個/mL となるように、20mM Hepes(pH7.2)、2%BSA を含む RPMI1640 培地に懸濁し、これをマイクロ遠心管に 50 μL ずつ入れ、さらに種々の濃度の精製抗 IL-7R モノクローナル抗体 (A7R34)、または 0.2 μg の非標識 IL-7 を加え、全量を 75 μL とした。37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間培養し、 ^{125}I -IL-7 を加えさらに 15 分間培養した。この反応物を n-buthylphthalate とオリーブオイルの比が 4 : 1 の割合で混合された混合液 200 μL の上に重層し、7000 回転で 2 分間遠心し、細胞と培養液とを分離した。混合液層の部分で切って、細胞部分 (ペレット) をガンマーカウンターで放射活性を測定することによって、細胞に結合した IL-7 の割合を求めた [Park *et al.*, 1986]。

3.2.11 A7R34 による DW34 細胞の増殖阻害活性の測定

DW34 細胞を RPMI1640 培地で 3 回洗浄し、10% FCS、50 μM 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地に 2×10^5 個/mL となるように懸濁した。一方、A7R34 を 96 ウェルプレートで 2 倍段階希釈しておき、先に用意した細胞を 50 μL 、次に IL-7 を最終濃度が 10 単位/mL となるように加え、全量を 100 μL とした。2 日間、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 インキュベーターで培養した。次いで、MTT 試薬 (MTT を 5mg/mL となるように PBS に溶解) を各ウェルに 10 μL 加え、さらに 5 時間培養した。これに 0.04N 塩酸添加イソプロパノールを 150 μL 加えて色素を抽出し、590nm の吸光度を EIA 用リーダーにて測定した。A7R34 を添加していないウェルの吸光度の値を 100% として 50% の増殖阻害を示す抗体の濃度を求めた。

3.2.12 A7R34 による骨髄細胞からの B 細胞誘導阻害活性の測定

C57BL/6 マウスの骨髄細胞を 5% FCS、50 μ M 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地に懸濁し、6 ウエルプレートに 1 \times 10⁶ 個/3 mL/ウエルで加え、37°C で 5% CO₂ インキュベーターにて 4 週間培養した。培養後 20 μ g の A7R34 またはコントロール抗体として、20 μ g の Mac1 抗体を加えた。さらに 4 日間培養を続け、各ウエルの全細胞を集め、フローサイトメトリーにて B220 陽性細胞の数をカウントした。

3.2.13 A7R34 による免疫沈降試験

細胞表面タンパク質のビオチン化は、Ingalls らの方法に従って行った [Ingalls *et al.*, 1986]。簡単に記載すれば、プレ B 細胞株 70Z/3 細胞を 0.5mg/mL の sulfosuccinimidyl 6-(biotinamido) hexanoate (Pierce 社) を含む HEPES 緩衝食塩水 (0.1M HEPES, pH8.0, 0.15M NaCl) で 30 分間、室温にて反応させた。細胞を RPMI1640 培地にて遠心洗浄後、細胞を溶解バッファー (50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/mL leupeptin, 5 mM EDTA, 0.1% NaN₃) に懸濁し、氷中に 4 5 分間置いた。細胞抽出液 (細胞溶解物) を遠心し、その上清に 100 μ L のヤギ抗ラット抗体を結合させた磁気ビーズ (Dynal 社) を加え、4°C にて、一夜、ローテーターで回転させながら、ヤギ抗ラット抗体に非特異的に結合するタンパク質を除去した。次に、ビーズをマグネットで除去し、ヤギ抗ラット抗体で吸収した細胞抽出液を回収し、二つに分け、一つに A7R34 を、もう一つに抗ラット IgG を結合させたビーズを加え、4°C、1 時間反応させた。マグネットにてビーズを回収し、ビーズを洗浄後、ビーズに結合したタンパク質を還元下で 7.5% のゲルにて SDS-PAGE を行った。電気泳動後、タンパク質をニトロセルロース膜 (Hybond-C, Amersham 社) に転写し、5% skim milk および 1% ウシ血清アルブミンを含有する PBS でブロッキングを行い、horseradish peroxidase で標識化したアビジン (Bio-Rad 社) と反応させ、ECL 検出溶液 (Amersham 社) で検出した。

3.2.14 A7R34 のマウスへの投与

(1) 成獣マウスへの A7R34 の投与

In vivo でのマウスリンパ球の増殖分化における IL-7R の役割を調べるために、2mg の A7R34 を 1 日おきに 8 週齢のマウスに静脈内投与し、14 日後にこのマウスのリンパ組織の細胞数を測定し、それらの細胞表面抗原を調べた。コントロールとしては、正常リンパ球に反応しないクラスマッチコントロール抗体 C2-7 (IgG2a κ) を A7R34 と同様のスケジュールで投与し、リンパ組織の細胞数と細胞表面抗原をしらべた。

(2) 妊娠マウスへの A7R34 の投与

妊娠 14 日目のマウスに 4mg の A7R34 を 2mg ずつ静脈内および皮下へ一日おきに投与した。さらに、新生仔の誕生後、異なった親マウスの新生仔 2 匹の腹腔内に 100 μ g の A7R34 を投与した。12 日後に、2 匹のマウスから骨髄細胞を採取し、プールしてその細胞表面抗

原をフローサイトメトリーにて解析した。

(3) 新生仔マウスへの A7R34 の投与

IgG が産生される前の生後 4 週目のマウスに 2mg の A7R34 を一日おきに静脈内投与した。投与前 (0 日)、投与後 3 日目、7 日目に各 2 匹のマウスから骨髄細胞を採取し、プールしてその細胞表面抗原をフローサイトメトリーにて解析した。

3.3 結果

3.3.1 マウス IL-7R-ヒト IgGFc キメラタンパク質の生産と性状解析

6L の CHOIL-7RIg-1-1-M の無血清培養上清を 1mL の Prosep-A カラムに 2L/日の流速で添加した後、15mL の PBS でカラムを洗浄した。次に、10mL の 10mM HCl 溶液を添加し、キメラタンパク質を溶出させた。溶出液に直ちに 1mL の 0.2M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0) を加え中和した。この操作で 10mg の精製マウス IL-7R-ヒト IgGFc キメラタンパク質を得た。このキメラタンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析した結果、図 1B に示すように、分子量は非還元下では 140kD、還元下では 66kD であった。このことから、キメラタンパク質は、IgG と同様、ダイマーであることが示された。

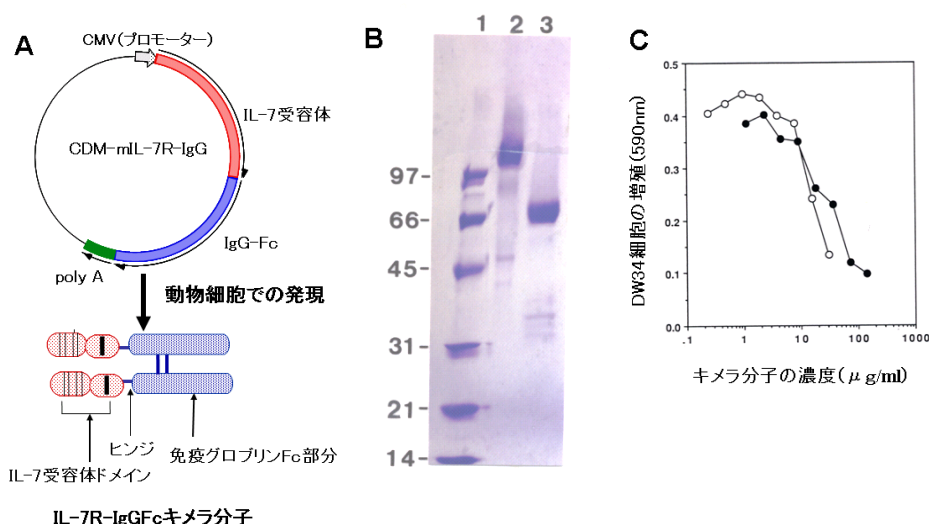


図 1 IL-7R-IgGFc キメラ発現ベクターとキメラタンパク質

(A)IL-7R-IgGFc キメラ発現ベクターのマップとそのベクターから発現されるキメラタンパク質の模式図を示す。(B)IL-7R-IgGFc キメラ発現ベクターを導入した CHO 細胞株、CHOIL-7R-Ig-1-1-M の培養上清を Prosep-A カラムで精製したタンパク質を 5-20%の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した結果を示す。レーン1:分子量マーカー、レーン2:IL-7R-IgGFc キメラタンパク質(非還元)、レーン3:IL-7R-IgGFc キメラタンパク質(還元)(C)IL-7R-IgGFc キメラタンパク質による IL-7 依存性増殖細胞株 DW34 の増殖阻害活性を示す。2 倍段階希釈したキメラタンパク質に、IL-7 を最終濃度が 10 単位/mL、DW34 細胞を 10^4 個/ウエル、最終容量を 100 μ L (96 ウエルプレート)とし、37°Cの CO₂ インキュベーターにて 18 時間培養した。培養後、5mg/mL の MTT 溶液を各ウエルに 10 μ L 加え、引き続き、37°Cにて 4 時間培養を続けた。その後、0.04N の HCl を含むイソプロパノールを 150 μ L 加え、形成されたホルマザンを溶解して、Titertek Multiscan (Titertek 社) にて 590nm の波長で吸光度を測定した。

次に、このキメラタンパク質が IL-7 と結合する能力を持つ機能的な IL-7R であるかを確認するために、IL-7 依存性 DW34 細胞の増殖を阻害する活性を持っているかを測定した。

図 1C に示すように、キメラタンパク質は濃度依存的に IL-7 依存性 DW34 細胞の増殖を阻害した。10 単位/mL の IL-7 により DW34 細胞が増殖するのを 50% 阻害するキメラタンパク質の濃度は、約 10 μ g/mL であった。

3.3.2 抗マウス IL-7R モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの選別

ハイブリドーマの培養上清中の抗体が DW34 細胞を認識するか否かをフローサイトメトリーにて解析した。その結果、A7R16、A7R24、A7R34、A7R50、A7R51 および A7R59 を得た。次に、これらの抗体がプレートに固相化したキメラタンパク質に結合するか否かを EIA により測定した。その結果、全ての抗体が結合した。次に、これらの抗体が、DW34 細胞の IL-7 依存性の増殖を阻害するか否かを調べた。その結果、A7R34 のみが DW34 細胞の増殖を阻害した。このハイブリドーマを限界希釈法で 2 回クローニングし、単一細胞集団からなるハイブリドーマを得た。また、A7R34 のサブクラスは、IgG2a であり、軽鎖は κ であった。

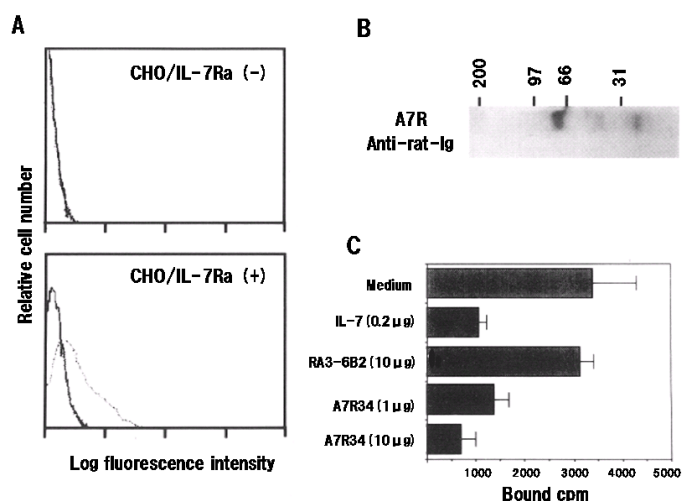


図 2 抗 IL-7R モノクローナル抗体 A7R34 の性状解析

(A) IL-7R 受容体の N 末端から 281 アミノ酸残基までの領域を発現するベクターを CHO 細胞に導入して得た IL-7R 安定発現細胞 CHO/IL-7Ra(+) およびコントロールベクターを導入した CHO 細胞 CHO/IL-7Ra(-) を A7R34+FITC 標識化抗ラット IgG (破線) または FITC 標識化抗ラット IgG (実線) で染色し、フローサイトメトリーで解析した。(B) プレ B 細胞株 70Z/3 の細胞表面タンパク質をビオチン化し、その細胞溶解液に A7R34 を固定化したマグネットビーズを加えて免疫沈降した。分子量は kDa で示した。(C) DW34 細胞 (5×10^5 細胞/サンプル) を 10 μ g または 1 μ g の A7R34、10 μ g のコントロール抗体 (RA3-6B2)、または 0.2 μ g の IL-7 を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間培養する。 125 I-IL-7 (1.2×10^4 cpm, 2.2ng) を加え、37 $^{\circ}$ C で 15 分間培養する。細胞に結合した 125 I-IL-7 をガンマーカウンターにて測定した。データは 3 回の実験の平均値と標準偏差で示した [Sudo *et al.*, 1993]。

3.3.3 モノクローナル抗体 A7R34 の特異性

A7R34 の特異性を調べるために、IL-7R の N 末端から 218 アミノ酸残基までのタンパク質をコードする DNA を SR α 発現ベクターに導入した CHO 細胞とコントロールプラスミドを導入した CHO 細胞を用いて、A7R34 が IL-7R を発現している細胞のみを認識するかどうかについて、フローサイトメトリーで解析した。図 2A に示す様に、A7R34 は IL-7R 遺伝子導入 CHO 細胞のみを染色した。次に A7R34 が認識する細胞表面抗原を明らかにするために、免疫沈降を行った。その結果、A7R34 陽性のプレ B 細胞株 70Z/3 から A7R34 固定化ビーズを用いて、分子量約 75kDa のタンパク質を沈降させることができた(図 2B)。このタンパク質の分子量は、標識化 IL-7 を用いたクロスリンクの実験で報告されている 65-75kDa と 150-160kDa (2 量体) と一致した[Goodwin *et al.*, 1990; Armitage *et al.*, 1992]。しかしながら、本実験で検出された低分子のバンドの分子が IL-7R に結合した分子か分解物かについてはまだ明らかにしていない。次に A7R34 は IL-7 が IL-7R に結合するのを阻害するかについて、¹²⁵I-IL-7 を用いて検討した。その結果、A7R34 は ¹²⁵I-IL-7 が DW34 細胞に結合するのを効果的に阻害した (図 2C)。

A7R34 は IL-7 依存性プレ B 細胞株 DW34 細胞の増殖抑制を指標に取得された抗体である。そこで、DW34 細胞が 10 単位/mL の IL-7 により増殖するのを 50%阻害する A7R34 の濃度を測定した。その結果、図 3 に示すように、その値は、約 10 μ g/mL であった。以上の結果から、A7R34 は、IL-7R の IL-7 結合部位を認識しかつ IL-7 の作用を阻害する中和抗体であることが判明した。

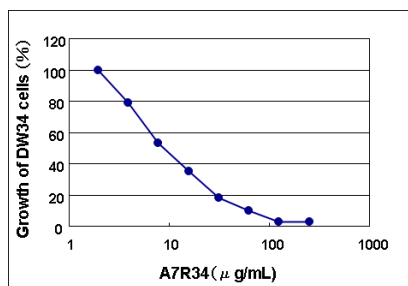


図 3 A7R34 による IL-7 依存性増殖細胞株 DW34 細胞の増殖阻害活性

DW34 細胞を RPMI1640 培地で 3 回洗浄し、10%FCS、50 μ M 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地に 2×10^5 個/mL となるように懸濁した。一方、A7R34 を 96 ウェルプレートで 2 倍段階希釈しておき、先に用意した細胞を 50 μ L、次に IL-7 の最終濃度が 10 単位/mL となるように加え、全量を 100 μ L とし、2 日間、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ インキュベーターで培養した。次いで、MTT (5mg/mL) を各ウェルに 10 μ L 加え、さらに 5 時間培養した。これに 0.04N の塩酸添加イソプロパノールを 150 μ L 加えて色素を抽出し、590nm の吸光度を Titertek Multiscan (Titertek 社) で測定した。A7R34 を添加していないウェルの吸光度を 100%として各ウェルの吸光度を%に換算し、DW34 細胞の増殖率(%)を算出した。

3.3.4 リンパ造血組織における IL-7R の発現

筆者は次に IL-7R を発現する細胞を明らかにすることを試みた。IL-7R の mRNA の発現解析から、IL-7R は脾臓、胸腺およびプレ B 細胞に発現することが報告されている [Goodwin *et al.*, 1990]。mRNA の解析では組織中のどの細胞が IL-7R を発現するのかを知ることは難しい。しかし、A7R34 を用いてフローサイトメトリーによる解析を行えば、このことを明らかにすることができる。その結果、胸腺では、 $CD4^-CD8^-$ 、 $CD4^-CD8^+$ 、 $CD4^+CD8^-$ の T 細胞集団の一部が IL-7R⁺ であった。一方 $CD4^+CD8^+$ の集団には IL-7R⁺ 細胞は検出できなかった (図 4A)。脾臓とリンパ節において、IL-7R⁺ 細胞は $CD4^-CD8^+$ 、 $CD4^+CD8^-$ の集団であった (図 4B)。骨髄細胞において、B220⁺ 細胞に IL-7R が発現しているが、IL-7R が高発現している細胞は、B220^{dull} (B220 弱陽性) 細胞であった。一方、成熟 B 細胞である sIgM⁺ 細胞には IL-7R は発現していなかった (図 4C)。

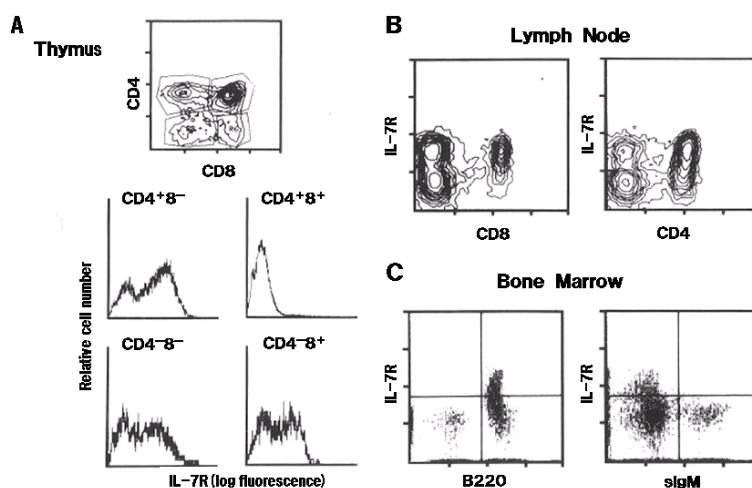


図4 マウスリンパ組織細胞における IL-7R の発現

(A) 4週齢マウス胸腺細胞における IL-7R の発現を調べるために、FITC-抗 Lyt2(CD8)、PE-抗 L3T4 (CD4) および apophycocyanin-A7R34 にて染色しフローサイトメトリーにて解析を行った。IL-7R は $CD4^+CD8^-$ 、 $CD4^-CD8^+$ 、 $CD4^-CD8^-$ の胸腺細胞には発現しているが、 $CD4^+CD8^+$ 細胞には発現していない。(B) 4 週齢マウスの鼠径部リンパ節の細胞を胸腺細胞の染色と同様な方法で3カラー染色した。(C) 8 週齢のマウス骨髄細胞をビオチン化 A7R34 と FITC-抗 B220 または FITC-抗 IgM とを組合わせて染色した後、PE-アビジンと反応させ、フローサイトメトリーにて解析した [Sudo *et al.*, 1993]。

3.3.5 リンパ球の増殖分化における IL-7R の役割

A7R34 は IL-7 の IL-7R への結合を阻害するので、この抗体は全ての IL-7R 依存性の分化過程を阻害できることが期待される。そこでまず、Whitlock-Witte の長期骨髄培養系 (LTBM-W) [Whitlock and Witte, 1982] における B 細胞の増殖分化が、IL-7 依存性か否かを調べた。図 5 に示すように、B 系細胞の増殖は完全に阻害された。このことから、LTBM-W における B 細胞の増殖分化は完全に IL-7R 依存性であることが示された。

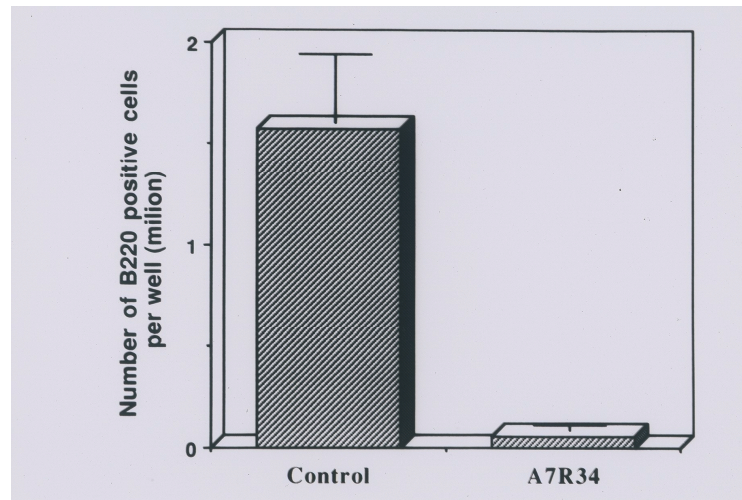


図5 Whitlock-Witteの長期骨髄細胞培養系におけるA7R34の効果

3週齢のC57BL/6マウスの骨髄細胞(1×10^6 個)を3mLの培地で培養し(6ウェルプレート)、4週間後、20 μ gのA7R34を添加した。4日目に全細胞数を回収し、B220⁺細胞の数をフローサイトメトリーにより測定した。また、対照の培養系には、20 μ gのMac1を添加した。データは3回の実験の平均値と標準偏差で示した。

リンパ球の増殖分化におけるIL-7Rの*in vivo*における役割について明らかにするために、研究方法に示したように、A7R34をマウスに投与し、リンパ組織の細胞数と細胞表面抗原について解析した。その結果を図6にまとめた。A7R34の投与により、骨髄中のB220⁺細胞と胸腺細胞が著しく減少した。また、脾臓およびリンパ節のリンパ球はわずかに減少した。それぞれの細胞集団の数は全体に減少しているが、特に骨髄中のB220^{dull}、sIgM⁻細胞およびB220^{dull}、sIgM⁺細胞、胸腺中のCD4⁺CD8⁺細胞は著しく減少した。これらの結果から、IL-7RはB細胞とT細胞の初期分化に関わっていることが明らかとなった。興味深いことに、骨髄および胸腺からのリンパ球の補充が阻害されるにも関わらず、かなりの数のT細胞とB細胞がリンパ組織中に残った。

図6に示したように、明らかにIL-7Rは*in vivo*のB細胞の増殖分化に作用しているが、もし、IL-7Rが必ず必用であるならば、A7R34投与マウスの骨髄中に残ったsIgM⁺細胞の存在が問題となる。この問題を解決するために、成熟B細胞が出現する前にA7R34を投与することを試みた。A7R34はIgG2aであり、このアイソタイプの抗体は胎盤を通過することが知られている。そこで、妊娠14日目のマウスに研究方法に記載したようにA7R34を投与し、得られた新生仔マウスの骨髄細胞を解析した。その結果、図7Aに示すように、成熟B細胞のマーカーであるB220⁺、sIgM⁺細胞は存在しなかった。興味深いことに、わずかに残ったB220⁺細胞は、S7(CD43)⁺であった(データを示さず)。このことは、わずかな数の未分化のB細胞がIL-7Rシステムを用いずに出現することが示唆された。この実

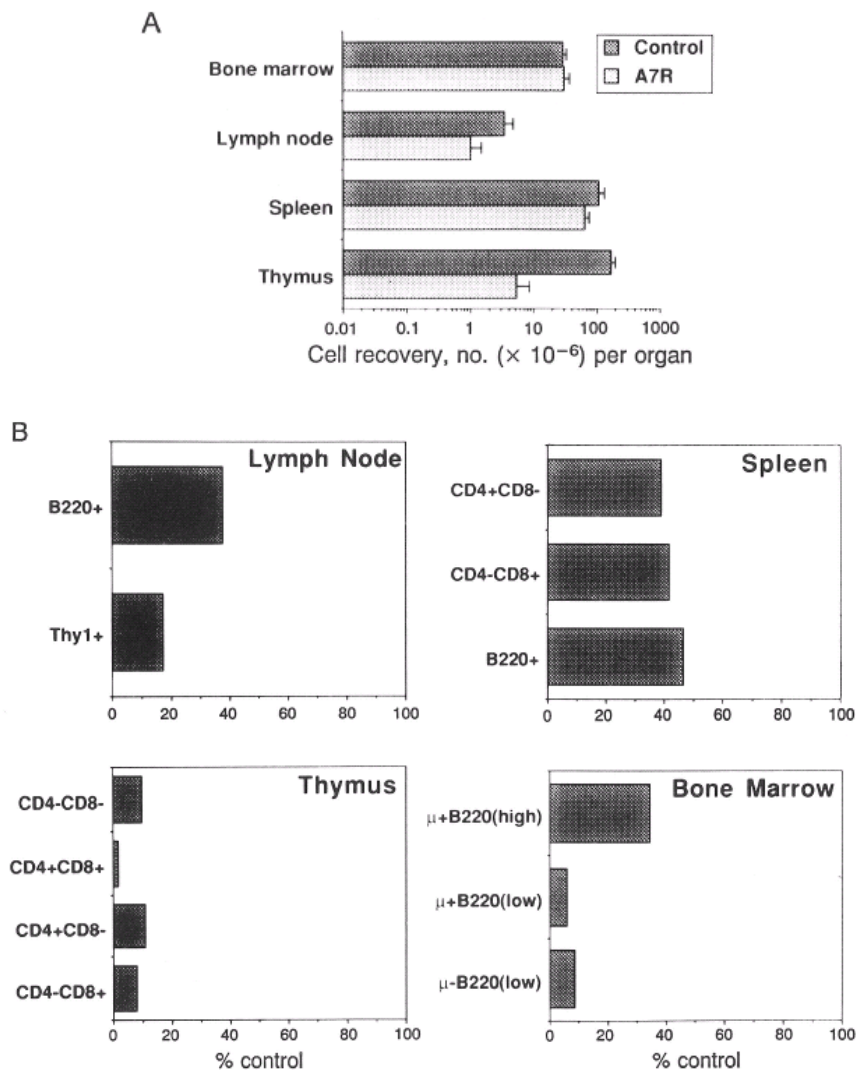


図 6 成獣マウスへの A7R34 投与によるリンパ球増殖抑制効果

C57BL/6 マウスに A7R34 またはクラスマッチコントロール抗体 (C2-7; IgG2a κ) を 1 日おきに静脈内投与し、14 日後に、鼠径部リンパ節、脾臓、胸腺および骨髄から細胞を調製した。3 匹の別々の個体から 2 対のリンパ節、脾臓、胸腺および 1 本の大腿骨中の細胞数を測定した後、細胞を組織別に集めて細胞表面抗原の解析を行った。(A) 各組織の細胞数を 3 匹のマウスからの平均値と標準偏差で示した。(B) フローサイトメトリー解析後の各組織のリンパ球のサブポピュレーションの数値はコントロールマウスに対する%で示してある[Sudo *et al.*, 1993]。

験に用いた個体のマウスの胸腺中には、 1×10^7 個の細胞が存在することから、この時期には、IL-7 の非存在下でも T 細胞の増殖分化が起こることが示唆された。また、成熟 B 細胞の少ない生後 4 週目から、A7R34 の投与を開始することで、完全ではないが、B 細胞の増殖分化を阻害することができた (図 7B)。A7R34 の投与 3 日目で、B220⁺、sIgM⁻細胞は

非常に早く消失した。これは、この早く消滅する細胞の集団が IL-7R システムを使用して増殖していることを示している。さらに、B220^{dull}、sIgM⁺細胞は、A7R34 投与後7日目ではほぼ完全に消失した。また、この実験でも骨髄中に B220⁺sIgM⁻細胞がわずかに残るが、この細胞集団は S7(CD43)⁺細胞であった。

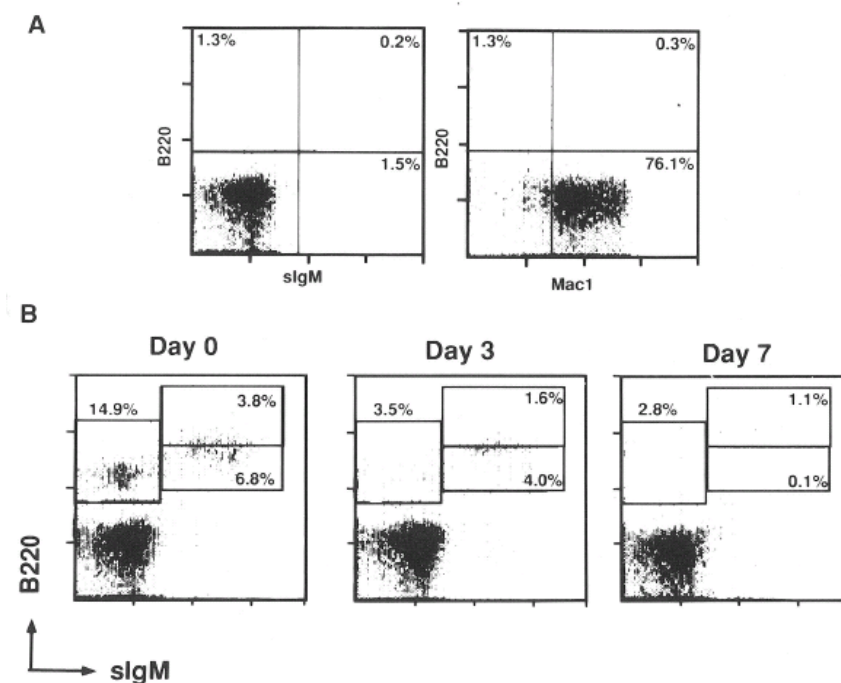


図7 新生児マウスへの A7R34 投与における B 細胞増殖抑制効果

(A) 2 匹の C57BL/6 妊娠マウスに妊娠 14 日目から誕生まで 4mg の A7R34 を 1 日置きに投与し、誕生後、1 日置きにその新生仔マウスの腹腔に 100 μ g の A7R34 を投与した。2 週間後、別々の親から誕生した 2 匹の新生仔マウスから骨髄細胞を集め、B220、sIgM および Mac1 抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析した。(B) 4 週齢の C57BL/6 マウスに 2mg の A7R34 抗体を 1 日置きに投与し、投与開始後、0、3 および 7 日目に 2 匹のマウスから骨髄細胞を集め、B220 および sIgM 抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析した[Sudo *et al.*, 1993]。

3.4 考察

3.4.1 B細胞の増殖分化における IL-7R の機能

本研究で IL-7R は B 系細胞の分化の初期過程で発現され機能していることを明らかにした。IL-7 は s IgM⁺ 成熟 B 細胞に作用しないというこれまでの研究[Namen *et al.*, 1988a,b; Hardy *et al.*, 1991]と一致して、成熟 B 細胞での IL-7R の発現は検出限界以下であった。遺伝子組換え活性化遺伝子(recombination activating gene, RAG)や代替 L 鎖(surrogate light chain)のように[Schatz *et al.*, 1992; Rolink and Melchers, 1991]、IL-7R は、プレ B 細胞から s IgM⁺ 成熟 B 細胞への段階で、発現が減少する分子のグループに属する。

LTBM-W における B 細胞の増殖分化は完全に A7R34 により阻害された。抗体の添加 24 時間後には B 細胞のサイズは小さくなり、LTBM-W のストローマ細胞上で死滅した。この結果は、IL-7R は LTBM-W における B 細胞分化に必須であることを示しており、B 細胞の分化を支持するストローマ細胞は、IL-7 を産生し、B 細胞の分化を支持できないストローマ細胞は IL-7 を産生しないという第 1 章で示した実験結果と一致する[Sudo *et al.*, 1989]。In vitro の実験結果と同様に、A7R34 の成獣マウスへの投与は、B 細胞の増殖分化を阻害する。その阻害効果は成熟 B 細胞 (B220^{high}, sIgM⁺) より未熟 B 細胞画分 (B220^{dull}, sIgM⁻ および B220^{dull}, sIgM⁻) に著しい。A7R43 投与による B 細胞の末梢リンパ組織への集積欠損の結果として、末梢リンパ組織における B 細胞の絶対数が、対照群と比較して 50% 減少した (図 6B)。しかしながら、骨髄においてできえ、B220^{high}, sIgM⁺ の成熟 B 細胞集団は、この実験の期間中残ってしまった。この結果から、IL-7R 非依存性の B 細胞が存在するのか、B 細胞の寿命は 2 週間以上 (A7R34 を投与した期間) であるかが示唆された。しかし、A7R34 投与し続けることにより B 細胞の欠損したマウスを得ることができるまで、最初の可能性を排除することはできない。実際、A7R34 を長期間投与することで、成熟 B 細胞が残るか否かをはっきりさせることは興味深い。このような A7R34 の成獣マウスへの長期間の投与は、種々の条件下での B 細胞の寿命を考えることができる。一方、図 7 に示したように、胎生期に A7R34 を投与することにより B 細胞欠損マウスを作製することができる。このように少なくとも、発生初期において、IL-7 と IL-7R との相互作用が B 細胞増殖分化には必須である。もし、成獣マウスにおいても、これと同様なことが示されれば、図 7 の結果から、脾臓 B 細胞の約半分は 2 週間以上生き残ることが示唆される。A7R34 投与によって作製された B 細胞欠損マウスに、少数の B220⁺S7⁺ 細胞が一定量生じてくることは興味深い。IL-7 反応性の B 前駆細胞は、B220⁺S7⁺ 細胞から誘導されるので [Hardy *et al.*, 1991]、これらのことは、多能性幹細胞から IL-7 反応段階に至る最も初期の B 細胞分化段階の細胞は、IL-7R に依存しないで生じてくることを示している。

Hardy らは、B 細胞の分化段階を B220、S7 (CD43; leukosialin)、HSA (heat-stable antigen)、BP-1/6C3 (aminopeptidase A) の細胞表面分子の発現様式で分類している [Hardy *et al.*, 1991]。この方法に従えば、フラクション A (B220⁺, S7⁺, HAS⁻, BP-1⁻)、フラクション B (B220⁺, S7⁺, HAS⁺, BP-1⁻)、フラクション C (B220⁺, S7⁺, HAS⁺,

BP-1⁺)、フラクシオン C' (B220⁺、S7⁺、HAS^{high}、BP-1⁺)、フラクシオン D (B220⁺、S7⁻、HAS⁺、BP-1⁺)、E (B220⁺、S7⁻、HAS⁺、BP-1⁺、sIgM⁺)、に分類することができる。これらのフラクシオンの細胞は、A、B、C、C'、D、E という順で分化が進み、免疫グロブリン遺伝子の再構成についても調べられている。さらに、各フラクシオンの細胞集団を ACK2 (抗 KIT 抗体) と A7R34 を用いて、KIT と IL-7R の発現を解析した結果と各フラクシオンの PA6+IL-7 によって増殖する細胞の頻度が調べられている[Era *et al.*, 1994]。これらの結果に基づいて、B 細胞分化過程の細胞の細胞表面分子の発現と第 1 章で示した増殖要求性の B 細胞分化モデルを合わせて図示した (図 8)。A7R34 投与マウスでは、Hardy らの B 細胞の分化段階の A まで進み、B には進めない。この結果は、IL-7R ノックアウトマウスの解析結果[Peschon *et al.*, 1994]とも一致している。

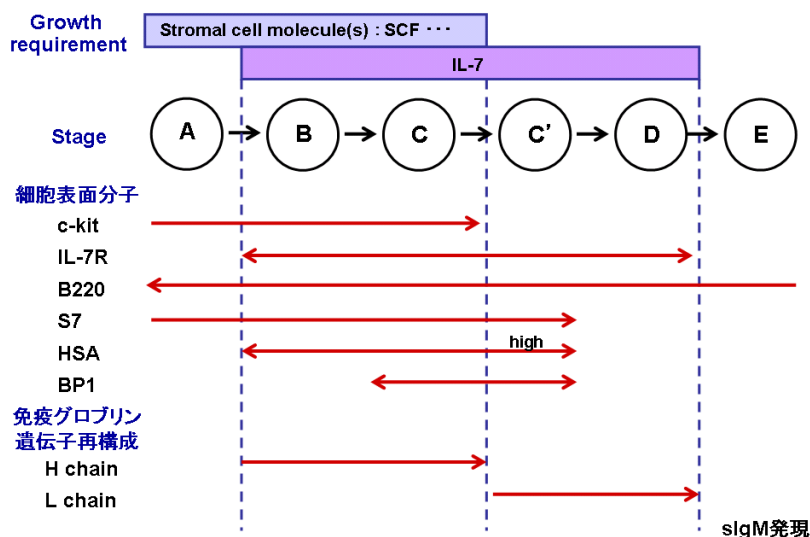


図 8 B 細胞の分化過程:細胞表面分子の発現と増殖要求性

Hardy らは、B 細胞の分化段階を B220、S7(CD43; leukosialin)、HSA (heat-stable antigen)、BP-1/6C3 (aminopeptidase A)の細胞表面分子の発現様式で分類している[Hardy *et al.*, 1991]。この方法に従えば、フラクシオン A (B220⁺、S7⁺、HAS⁻、BP-1⁻)、フラクシオン B (B220⁺、S7⁺、HAS⁺、BP-1⁻)、フラクシオン C (B220⁺、S7⁺、HAS⁺、BP-1⁺)、フラクシオン C' (B220⁺、S7⁺、HAS^{high}、BP-1⁺)、フラクシオン D (B220⁺、S7⁻、HAS⁺、BP-1⁺)、E (B220⁺、S7⁻、HAS⁺、BP-1⁺、sIgM⁺)、に分類することができる。これらのフラクシオンの細胞は、A、B、C、C'、D、E という順で分化が進み、免疫グロブリン遺伝子の再構成と関連している。さらに、各フラクシオンの細胞集団を ACK2 (抗 c-kit 抗体) と A7R34 を用いて、c-kit と IL-7R の発現を解析した結果と各フラクシオンの PA6+IL-7 によって増殖する細胞の頻度が調べられている[Era *et al.*, 1994]。これらの結果に基づいて、B 細胞分化過程の細胞の細胞表面分子の発現と第 1 章で示した増殖要求性の B 細胞分化モデルを合わせて図示した。A7R34 投与マウスでは、Hardy らの B 細胞の分化段階の A まで進み、B には進めない。この結果は、IL-7R ノックアウトマウスの解析結果[Peschon *et al.*, 1994]とも一致している。

以上をまとめると、IL-7R は B 前駆細胞の機能的な細胞表面マーカーである。さらに、A7R34 はリンパ組織への B 細胞の流入をコントロールすることができる。また、ここで示した B 細胞の補充を制御する新しい方法は、リンパ組織へのホーミング後の B 細胞集団の働きを説明するためにも有用である。

3.4.2 T 細胞の増殖分化における IL-7R の機能

IL-7R を発現する主な T 細胞集団は $CD4^-CD8^-$ の未分化な胸腺細胞と $CD4^-CD8^+$ および $CD4^+CD8^-$ のシングルポジティブの抹消リンパ球である。しかしながら、IL-7R の発現レベルは、各分化段階で異なっていた (図 4)。T 細胞画分における IL-7R の発現レベルは、分化段階の違いを反映しているのか、機能的な状態を反映しているのか、重要な問題である。T 細胞における IL-7R 発現に関する本研究の結論は、IL-7 が $CD4^-CD8^-$ の未成熟胸腺細胞の増殖を誘導することおよび $CD8^+$ のリンパ球の細胞障害活性を誘導するというこれまでに報告された結果と一致する [Morrissey *et al.*, 1987; Grabstein *et al.*, 1990; Chantry *et al.*, 1989; Conlon *et al.*, 1989; Murray *et al.*, 1989; Suda and Zlotnik, 1991]。本実験で IL-7R は胸腺中の T 細胞の産生に機能していることが明らかにされた。A7R34 の投与により胸腺細胞は約 1/30 に減少した。この値は末梢 T 細胞が 20 から 40% に減少したのに相当する。しかしながら、IL-7R が末梢組織において IL-7R⁺ 細胞を維持する役割を果たしているかどうかの問題には、末梢器官への T 細胞の集積過程において、A7R34 が強力な効果を示すため、答えることはできない。しかし、 $CD4^+$ 細胞および $CD8^+$ 細胞の両方が、A7R34 を長期間投与した後、末梢組織に残ったという実験結果は、末梢組織における IL-7R の役割は小さいかもしれないことを示唆している。

胸腺における IL-7R の発現パターンを考慮して、IL-7 は胸腺の $CD4^-CD8^-$ 細胞の増殖に必須の役割を果たしていることは明らかである。しかしながら、2 週間の A7R34 の投与でも、有意な数の $CD4^+CD8^+$ T 細胞と成熟シングルポジティブ細胞 ($CD4^+$ T 細胞および $CD8^+$ T 細胞) が残ること、さらに胎生 14 日目から A7R34 を投与する実験において、B 細胞は完全に消失するのに対し (図 7A)、約 1×10^7 個の胸腺細胞が存在することから (データを示さず)、もし全ての IL-7R⁺ 細胞が、A7R34 投与によってその作用が阻害されているのなら、T 細胞の増殖分化における IL-7 の役割は他のサイトカインによって置き換えることができることを示唆している。

3.5 要約

高親和性の IL-7 受容体を認識し、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 で細胞の免疫染色を行ったところ、IL-7 受容体は、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⁻T 細胞および CD4⁺、CD8⁺シングルポジティブ T 細胞に発現していたが、CD4⁺CD8⁺T 細胞には発現していなかった。末梢リンパ組織においては、CD4⁺、CD8⁺シングルポジティブ T 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 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 細胞の増殖分化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 の投与は、B 前駆細胞と胸腺細胞の減少を導くが、末梢において、2 週間の実験期間の間、かなりの成熟 B 細胞と成熟 T 細胞の細胞が残った。しかし、B 細胞が出現する前の時期である胎生 14 日から投与を開始したとき、B 細胞欠損マウスを作ることができる。これらの結果は、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 細胞の増殖分化に必須の分子であることを示している。さらに、IL-7R はこれらの過程を制御する唯一の受容体であることを示している。

第4章

骨髄内のマクロファージコロニー形成細胞の増殖における

KIT と FMS の機能的階層性

4.1 序論

数多くの突然変異マウスの分子遺伝学的研究から、Ⅲ型チロシンキナーゼ受容体[Ullrich and Schlessinger, 1990]とそのリガンドはマウスの骨髄内造血において必須な役割を果たしていることが明らかになった。機能的な *Kit* 遺伝子と KIT のリガンド (kit-ligand:KL, SCF の別名) をコードする遺伝子の欠損である *W* と *Sl* マウスは重篤な貧血により致死となる [Wong *et al.*, 1987; Bernstein *et al.*, 1991; Galli *et al.*, 1994]。CSF-1/M-CSF(M-CSF)遺伝子を欠損する大理石病マウスは、正常マウスにおいて造血が維持される機能的な骨小腔ができない [Yoshida *et al.*, 1990; Wiktor-Jedrzejczak *et al.*, 1990; Naito *et al.*, 1991]。これらの突然変異は、骨髄内造血において壊滅的な効果を示すため、分子遺伝学的手法だけでは、成獣マウスの骨髄内造血におけるこれらのシグナル伝達の役割を解析するのは難しい。たとえば、M-CSF を例にあげれば、その生物学的な活性は、1977 年に見出され [Stanley and Heard, 1977]、分子遺伝学的には、1985 年にその cDNA がクローン化され [Kawasaki *et al.*, 1985]、最後に、大理石病マウス (*Op* マウス) は、M-CSF の機能が完全に破壊された突然変異であることが示された [Yoshida *et al.*, 1990; Wiktor-Jedrzejczak *et al.*, 1990]。これらの研究から、未成熟および成熟造血細胞における M-CSF の多面的な作用、たとえば、破骨細胞を誘導する活性やマクロファージ前駆細胞の増殖を誘導する能力が明らかにされたが、大理石病マウスでは、骨髄腔が極めて狭小化し、造血の場が形成されないため貧血になることから、実際の骨髄内造血における M-CSF の役割は依然として不明である。増殖因子受容体の細胞の分化段階での発現と系統特異的発現は、血液細胞の系統へのコミットメントが確率論的であろうが、決定論的であろうが、それぞれの系統の血液細胞の産生を制御する中心的な仕組みであることは間違いない [Miyajima *et al.*, 1992]。この研究の中で、M-CSF に反応するコロニー形成細胞の単位 (colony forming unit-macrophage; CFU-M) を M-CSF に反応しマクロファージ系列の細胞にコミットした前駆細胞と表した。しかしながら、本研究で、すべての CFU-M は KIT⁺画分にあり、CFU-M は KIT と M-CSF 受容体 (FMS) [Sherr *et al.*, 1985] を発現した未分化な細胞であることが実証された。もしそうであるなら、これら 2 つの構造的に類似な受容体が、CFU-M の増殖と分化において、異なった役割をするのかを知ることが重要となる。

そこでⅢ型チロシンキナーゼ受容体である KIT と FMS の成獣マウスの骨髄内造血における機能的階層性を研究した。ここでいう階層性とは、造血幹細胞から成熟細胞への分化段階の階層性であり、造血細胞と造血支持細胞の階層性である。また、機能的とは単に細胞を分別するマーカー分子でなく、マーカー分子の機能と造血機能が相関している場合に機能的という。筆者は 2 つのモノクローナル抗体 (mAb)、一つは KIT の機能を抑制する抗 KIT mAb である ACK2 [Nishikawa *et al.*, 1994; Ogawa *et al.*, 1991]、もう一つは本研究で新たに作製した拮抗的な抗 FMS mAb である AFS98 を用いた。これら 2 つの mAb は、KIT と FMS を発現する分化段階の細胞を検出することができる。これらの mAb を用いた細胞のソーティングから、CFU-M が FMS⁺画分より FMS⁻画分に濃縮されることが明らか

かにされた。さらに、これらのmAbを成獣マウスに投与した結果は、FMSではなく、KITが骨髄内のCFU-Mの産生に必須の役割を果たしていることを示した。以上の結果から、KITとFMSの機能的な役割には階層があることを示している。

4.2 材料と方法

4.2.1 動物と細胞

Wister ラットおよび C57BL/6 マウスは日本 SLC (株) より購入した。NSF-60 細胞 [Holmes *et al.*, 1985] は、マウス GM-CSF を含有する RPMI1640 で培養し、M-CSF に依存した増殖試験に使用した。マクロファージ細胞株である J774.1 [Ralph and Nakoinz, 1977] は、免疫沈降試験に使用した。

4.2.2 拮抗的抗マウス FMS モノクローナル抗体 AFS98 の作製

マウス FMS [Rothwell and Rohrschneider, 1987] の細胞外領域タンパク質 (コドン 76-1605 に相当) をコードする遺伝子は PCR によって増幅し、CD4Rg [Aruffo *et al.*, 1990] の *Xho* I-*Bam* HI の CD4 遺伝子断片を除去したベクター DNA 断片中に挿入した。このベクター、CDMm-c-fms-hIgG1Fc はマウス FMS の細胞外領域とヒト IgG1 のヒンジから C3 までの領域のキメラタンパク質をコードする遺伝子をクローン化している。CDMm-c-fms-hIgG1Fc を COS-1 細胞に一過的に導入し、1% Nutridoma-NS (Behringer Mannheim 社) を含むダルベッコ MEM/F12 培地にて 1 週間培養し、この培養上清から Prosep-A (Bioprocessing 社) を用いてキメラタンパク質を精製した。500 μ g のキメラタンパク質、マウス FMS/hIgG1 をフロイントの完全アジュバント (Difco Laboratories 社) とともに Wister ラットの皮下に投与した。1 ヶ月後、生理食塩水に溶解した 50 μ g のキメラタンパク質を免疫ラットに腹腔内投与することでブーストした。4 日後、脾臓を摘出し、調製した脾細胞とミエローマ細胞株 X63.Ag8.653 と融合した [Sudo *et al.*, 1993]。M-CSF 依存性 NSF60 細胞の増殖を抑制する抗体を分泌するハイブリドーマをスクリーニングし、サブクローニングした。1,200 のスクリーニングから、NSF60 細胞の M-CSF 依存性増殖を抑制するハイブリドーマクローン AFS98 を得た。AFS98 の特異性は結果に記載した。

4.2.3 モノクローナル抗体と細胞染色

抗 B220 mAb (RA3-6B2) [Coffman, 1982]、抗 Mac1 mAb (M1/70) [Springer, 1979]、Ter119 [Ikuta *et al.*, 1990]、抗ラット κ 鎖 mAb (MAR18.5) [Lanier *et al.*, 1982]、抗 KIT mAb (ACK2 および ACK4) [Nishikawa *et al.*, 1991; Ogawa *et al.*, 1991]、抗 FMS mAb、AFS98 は腹水から 50% 硫酸沈殿に続いて DE52 イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。精製抗体は FITC またはビオチンで標識し、細胞表面の染色に使用した。フィコシアニン標識アビジンは Becton-Dickinson より購入した。染色には、 10^6 個の細胞を 25 μ l の正常ウサギ血清で 20 分間処理し、次にモノクローナル抗体の混合物で処理した。引き続いて、細胞を洗浄し、PE-アビジンで再び処理した。Propidium iodide で死細胞を染色し、生細胞のみを EPICS-XL にて解析した。いくつかの実験では、染色した細胞を EPICS-ELITE (Coulter 社) でソートした。

4.2.4 免疫沈降とウエスタンブロット

J774.1 細胞の細胞表面分子のビオチン化は、既報に従った[Sudo *et al.*, 1993]。標識した細胞を免疫沈降緩衝液：50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM phenyl-methylsulfonyl fluoride, leupeptin(1 µg/mL), 5mM EDTA 0.1% NaN₃に懸濁し、氷中に 45 分間置き、溶解した。溶解液を遠心し、その上清に、AFS98 または 11B11 (抗マウス IL-4 mAb ; Pharmingen 社) のいずれかを加え、次に 100µL のヤギ抗ラット IgG を結合させた Dynabeads(Dynal 社)を加えて一晩反応させた。次に、Dynabeads をマグネット で回収し、洗浄後、沈降物を還元下で 7.5% のゲルにて SDS-PAGE を行った。電気泳動後、タンパク質をニトロセルロース膜 (Hybond-C ; Amersham 社) に転写し、5% skim milk および 1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含有する PBS でブロッキングを行い、horseradish peroxidase で標識化したアビジンと反応させ、ECL 検出溶液 (Amersham 社) で検出した。

AFS98 で免疫沈降したタンパク質のチロシンのリン酸化は、4G10 mAb によってウエスタンブロットにより検出した。免疫沈降緩衝液は、1mM orthovanadate が加えられていることを除いて同じ組成である。

4.2.5 J774.1 細胞に対する標識化 M-CSF の結合試験

組換え型ヒト M-CSF は Nishida 博士 (大塚製薬) より分与された。M-CSF は ¹²⁵I で標識化した[Sudo *et al.*, 1993]。最初に、J774.1 細胞 (5×10⁵ 個) と培地、M-CSF(0.5µg)、抗 Mac-1 mAb (10µg) あるいは AFS98(1µg)のいずれかと 30 分間、氷中にてインキュベーションし、各チューブに ¹²⁵I で標識化した M-CSF を加えた。15 分、氷中でインキュベーションした後、細胞を 3 回ウシ胎児血清に重層し、遠心洗浄し、細胞のペレットをカウントした。

4.2.6 細胞培養、コロニーアッセイおよびサイトカイン

全ての細胞株およびハイブリドーマは 5% FCS、50µM 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地にて維持した。組換え型マウス IL3 およびマウス GM-CSF は既報に従って作製した[Hayashi *et al.*, 1990]。組換え型マウス KIT リガンド (KL) は以下のようにして作製した。KL の細胞外領域 (1-185 アミノ酸) に相当する cDNA を RT-PCR によって増幅し、イースト発現ベクター pYG10 に連結した。このコンストラクトは、培地中に直接組換え型 KL を分泌する。イーストの培養液を限外ろ過膜により濃縮し、MonoQ 陰イオンカラムクロマト (Pharmacia 社)、フェニルセファロース疎水カラムクロマト (Pharmacia 社) により精製した。無血清条件での骨髄細胞の培養には無血清培地 mSF02(三光純薬)を使用した。メチルセルロース培養は、マウス組換え型 IL-3, GM-CSF およびヒト組換え型 M-CSF を用いて記載した方法で行った[Hayashi *et al.*, 1990; Suda *et al.*, 1989]。5 日または 7 日後に、40 細胞以上の細胞からなる塊をコロニーとしてカウントした。

NFS60 細胞の増殖は、MTT 法で測定した。NFS60 細胞 (10^4 個) を M-CSF または AFS98 の存在、非存在下で 2 日間培養し、細胞に $20\mu\text{L}$ の MTT を加え 4 時間後、生成されたホルマザンを 0.04N HCl を含むイソプロパノールで溶解し、 $OD_{620\text{nm}}$ で吸光度を測定した。

4.3 結果

4.3.1 抗マウス FMS モノクローナル抗体 AFS98 の特異性

抗マウス FMS モノクローナル抗体 AFS98 の樹立については、材料と方法に記載した。まず、筆者は、種々のサイトカイン受容体の細胞外領域とヒト IgG1Fc 領域との組換え型キメラタンパク質に対する AFS98 の反応性を ELISA に基づいた結合試験で評価した。AFS98 はマウス FMS/h-IgG1 に結合し、ヒト FMS/h-IgG1 に弱く結合した。一方、マウス PDGF α 受容体/h-IgG1、マウス flk1/h-IgG1、マウス flk2/h-IgG1 およびマウス IL-7R/h-IgG1 とはいずれも結合しなかった。AFS98 はマウスマクロファージ細胞株 J774.1 から 170kDa のタンパク質を免疫沈降し、その沈降したタンパク質は M-CSF により特異的にチロシンがリン酸化された (図 1A)。AFS98 単独でもこの 170kDa タンパク質をリン酸化したことから、この抗体はアゴニストであることが示唆された。しかしながら、AFS98 は、機能的には C57BL/6 マウスの骨髄細胞の M-CSF によるコロニー形成を阻害したが、GM-CSF や IL-3 の作用は阻害せず (図 1B)、J774.1 細胞への M-CSF の結合を阻害した (図 1C)。AFS98 は J774.1 の FMS の自己リン酸化を誘導するが、M-CSF 依存性細胞株 NFS60 を評価した全ての濃度で増殖を誘導しなかった (図 1D)。一方、NFS60 細胞の M-CSF 依存性増殖を阻害した (図 1E)。これらの結果から、AFS98 は、マウス FMS に対するアゴニスト抗体でなく、アンタゴニストとして機能する抗体であると結論づけられた。

4.3.2 マウス骨髄における FMS の発現

^{125}I 標識化 M-CSF を用いた研究から、M-CSF は骨髄細胞の約 4% の細胞に結合することが示されている [Stanley and Heard, 1977; Guilbert and Stanley, 1980; Byrne *et al.*, 1984]。この値は、骨髄細胞中の FMS⁺細胞の割合とほぼ同一であった (図 2)。AFS98 を用いて、FMS⁺細胞の割合を、他の細胞表面マーカーとの関連で比較することができる。図 2 に C57BL/6 マウスの骨髄細胞の KIT、B220、Ter119 あるいは Mac1 を発現する細胞で FMS を発現する細胞を 2-カラー解析した結果をまとめた。B220⁺、Ter119⁺の極わずかな細胞で FMS が発現されているのが認められたが、FMS⁺の細胞のほとんどが Mac1⁺の成熟ミエロイド・単球の集団に含まれていた。しかしながら、FMS⁺細胞は側方散乱光強度の高い多形核白血球には検出されなかったことから、FMS の発現は単核球に限定されていることが示唆された (データ示さず)。またわずかに、全骨髄細胞の 0.3-0.5% が KIT⁺FMS⁺であった。

4.3.3 CFU-M は KIT⁺FMS⁺集団より KIT⁺FMS⁻により濃縮されている

FMS⁺細胞の性状を詳細に解析するために、筆者は KIT⁺FMS⁺、KIT⁺FMS⁻および KIT⁻FMS⁻集団をソーティングし、それらの形態と M-CSF に対するコロニー形成活性を評価した。形態学的には、KIT⁻FMS⁺は、成熟単核球であり、この集団には、CFU-M は存在しなかった (図 3 および図 4A)。*in vitro* でコロニー形成可能な造血前駆細胞は、KIT⁺の細

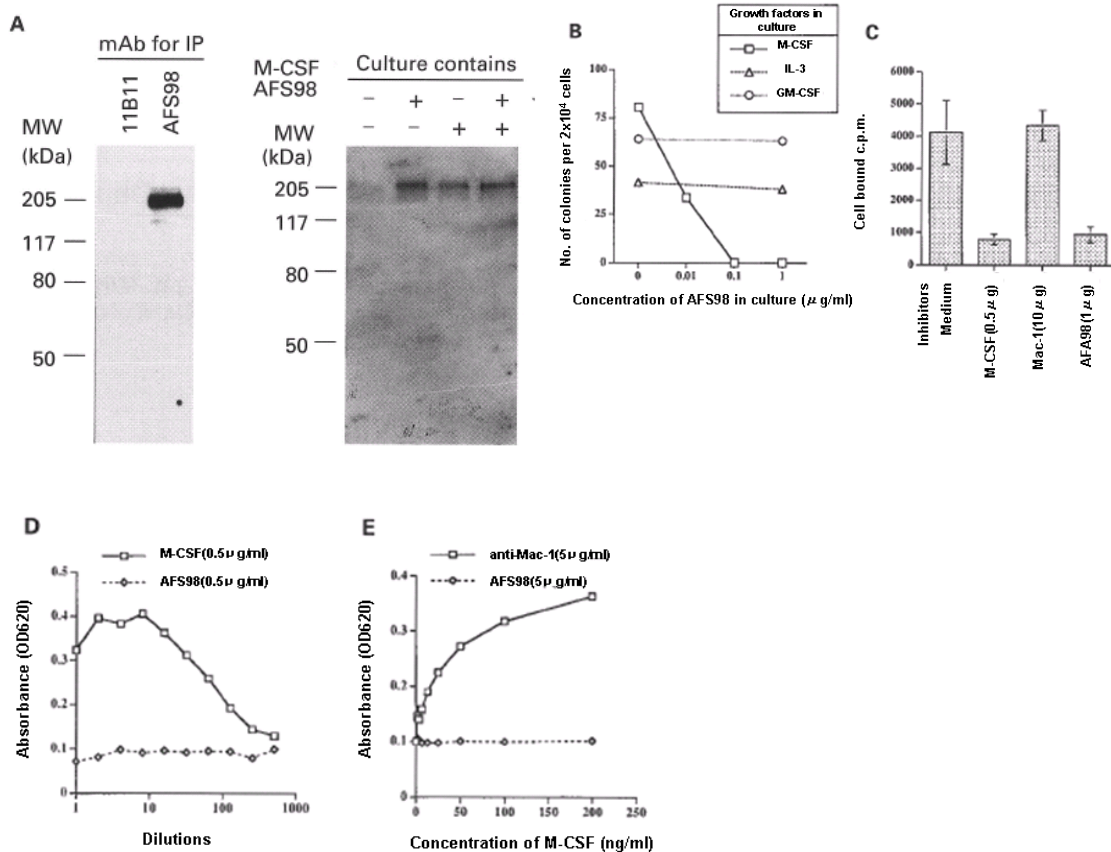


図1 抗 FMS 抗体 (AFS98) の性状解析

(A) 左、ビオチン化細胞表面タンパク質の免疫沈降: Sulfo-NHS-biotin で 30 分間標識した J774.1 細胞を界面活性剤で溶解し、AFS98 または 11B11 (抗マウス IL-4mAB) のどちらかで免疫沈降した。免疫沈降物を洗浄し、還元条件で SDS-PAGE を行った。電気泳動産物をニトロセルロース膜に転写し、免疫沈降タンパク質をストレプトアビジン化ホースラディッシュペルオキシダーゼによって検出した。右、AFS98 で免疫沈降したタンパク質のウエスタンブロットによるチロシン残基のリン酸化解析: J774.1 細胞を FCS 不含培地にて 16 時間培養後回収した。細胞は 20 μg の AFS98 の存在または非存在下で水中にて 15 分間インキュベーションし、その後 M-CSF の刺激または非刺激の条件で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分間インキュベーションした後、その細胞を界面活性剤で溶解した。溶解物を AFS98 で免疫沈降し、還元条件で SDS-PAGE を行った。電気泳動産物をニトロセルロース膜に転写し、免疫沈降タンパク質を抗リン酸化チロシン抗体 4G10 によって検出した。(B) AFS98 によるマウス骨髄細胞のコロニー形成阻害作用: 正常マウスの骨髄細胞 (2×10^4 個) を種々の濃度の AFS98 の存在下で、ヒト M-CSF (10ng/ml)、マウス GM-CSF (100U/ml) またはマウス IL-3 (100U/ml) と共に培養した。7 日後に形成されたコロニーの数を計測した。値は 2 回の実験の平均値を示す。(C) AFS98 による J774.1 細胞への ^{125}I 標識化 M-CSF の結合阻害作用: 5×10^5 個の J774.1 細胞と培地、M-CSF (0.5 μg)、抗 Mac-1 抗体 (10 μg) あるいは AFS98 (1 μg) のいずれかと水中にて 30 分間インキュベーションし、各チューブに ^{125}I で標識化した M-CSF (2 $\times 10^5$ c.p.m.) を加えた。水中で 15 分間インキュベーションした後、細胞を遠心洗浄し、細胞の

ペレットをカウントした。値は 3 回の実験の平均値と標準偏差を示す。(D) AFS98 の NFS60 細胞の増殖誘導能欠如: 1×10^4 個の NFS60 細胞を種々の濃度の M-CSF または AFS98 の存在下で 2 日間培養し、細胞の増殖を MTT 法で測定した。AFS98 の 0.5mg/mL から 97ng/mL までの濃度で、NFS60 細胞は増殖しなかった。一方、M-CSF では増殖が誘導された。値は 3 回の実験の平均値を示す。(E) AFS98 による NFS60 細胞の M-CSF 依存性増殖の阻害: 1×10^4 個の NFS60 細胞を種々の濃度の M-CSF の存在下で、AFS98 (5 μ g/mL) または Mac1 (5 μ g/mL) と共に 2 日間培養し、細胞の増殖を MTT 法で測定した。値は 3 回の実験の平均値を示す[Sudo *et al.*, 1995]。

胞集団にだけ含まれているという既報と一致する[Ogawa *et al.*, 1991]。一方、KIT⁺FMS⁺の細胞は、アズール顆粒を含んだ典型的なプロミエロサイトであり、KIT⁺FMS⁻は小型の細胞で、ほんの少しだけ、プロミエロサイトを含んでいる(図 3)。M-CSF に応答してコロニーが形成される細胞は、FMS⁺の集団に濃縮されるという、筆者の当初の予想と違って、CMU-M は、KIT⁺FMS⁺の集団より KIT⁺FMS⁻の集団に 10 倍以上多く存在していた(図 4)。しかしながら、CFU-M は、ソーティングしていない骨髄細胞より、KIT⁺FMS⁺の集団ほうが、2 倍近く高かった。この事実は、骨髄中のほとんどの CFU-M は、FMS⁻の細胞が、評価培養中に FMS⁺細胞になることを示している。一方、KIT⁺FMS⁻画分中の CFU-M は増殖能が非常に高く、裸眼で見えるくらい大きなコロニーを形成するのに対し、KIT⁺FMS⁺画分中の半分だけが、大きなコロニーを形成する(図 4)。このように、FMS⁻画分の CFU-M は FMS⁺画分の CFU-M よりより未分化な段階であることを示している。コロニーの形から考えて、実質的に、コロニー中の細胞はマクロファージである (図 4B, a)。

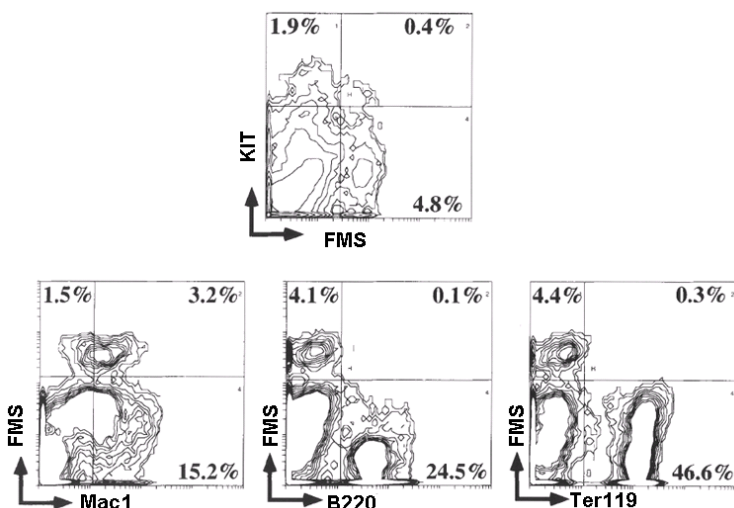


図 2 骨髄細胞の各種分画における FMS の発現

C57BL/6 マウスの骨髄細胞をビオチン化 ACK4(抗 KIT-mAB)および FITC-AFS98 またはビオチン化 AFS98 と FITC-抗 Mac1-mAB または FITC-抗 B220-mAB、FITC-抗 Ter119-mAB で染色した。細胞を洗浄後、フィコエリスリン-アビジンを添加し、フローサイトメトリーにて解析した[Sudo *et al.*, 1995]。

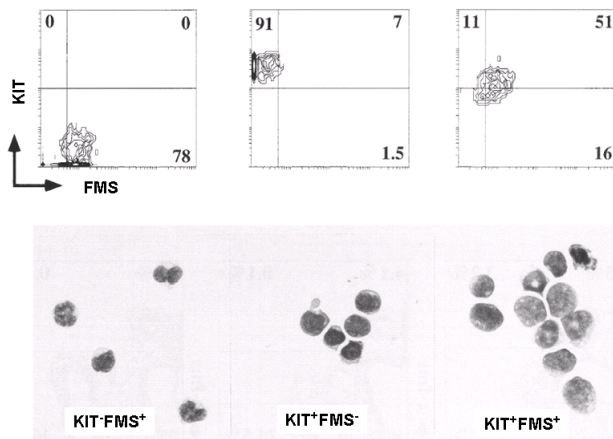


図 3 KIT^-FMS^+ , KIT^+FMS^- ,
 KIT^+FMS^+ 細胞の形態

C57BL/6 マウスの骨髄細胞をビオチン化 ACK4 および FITC-AFS98 で染色し、フィコエリスリン-アビジンを添加し、セルソーター (EPICS-ELITE) で KIT^-FMS^+ , KIT^+FMS^- および KIT^+FMS^+ の細胞を分取した。分取した各細胞画分の結果を図の上段に示す。下段には、メイ・グリュンワルド・ギムザ染色した各画分の細胞の形態を示した。細胞の大きさを比較するために、各写真は同じサイズにしてある[Sudo *et al.*, 1995]。

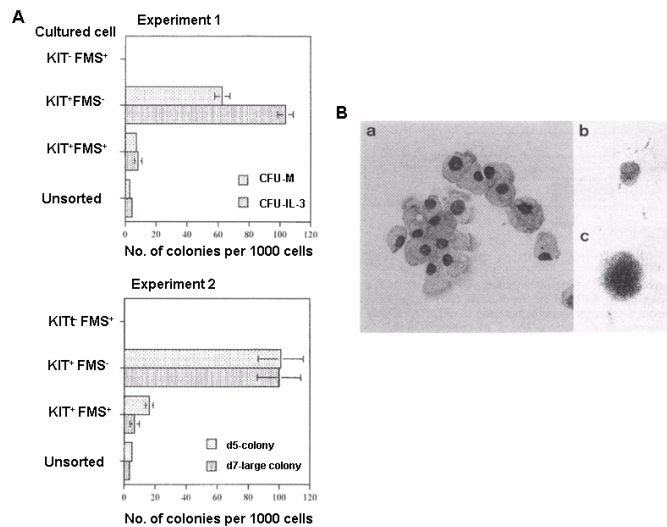


図 4 骨髄細胞の各種分画における CFU-M 活性

C57BL/6 マウスの骨髄細胞をビオチン化 ACK4 および FITC-AFS98 で染色し、フィコエリスリン-アビジンを添加し、セルソーター (EPICS-ELITE) で KIT^-FMS^+ , KIT^+FMS^- および KIT^+FMS^+ の細胞を分取した。(A) ソートした各画分の 1,000 個の細胞および 10,000 個のソートしていない骨髄細胞のコロニー形成能を試験した。実験 1 では、培養 7 日後の CFU-M と CFU-IL-3 を測定した。実験 2 では、培養 5 日後に CFU-M の数を測定し、さらに 2 日間培養した後に再び CFU-M の数を測定した。値は 3 回の実験の平均値と標準偏差を示す。(B) a、実験 2 に示した実験で得られたコロニーの形態を示す。 KIT^+FMS^- または KIT^+FMS^+ 細胞由来のコロニーを 10 個集め、それぞれ別々にメイ・グリュンワルド・ギムザ染色した。ここには 1 個のコロニーの形態を示したが、10 個全てのコロニーは図に示したように、純粋なマクロファージであった。b と c にそれぞれ KIT^+FMS^+ および KIT^+FMS^- 細胞由来の最大の大きさのコロニーを示す。最も大きなコロニーは KIT^+FMS^+ 画分の細胞からより KIT^+FMS^- 画分由来の細胞であった[Sudo *et al.*, 1995]。

4.3.4 KIT⁺FMS⁻細胞から FMS⁺細胞への分化

増殖因子でのコロニー形成アッセイは、その増殖因子に関連する受容体を発現している細胞が増殖した結果であるという現在の考え方において、前項の結果は、混乱している。なぜなら、CFU-M は、定義によれば、FMS を発現しているべきであるが、KIT⁺FMS⁺画分よりも KIT⁺FMS⁻画分により濃縮されている。この観察結果の一つの理論的説明は、評価培養中に、KIT⁺FMS⁻細胞は自発的に、FMS を発現し、その結果、M-CSF で刺激されて増殖するというものである。この考え方をテストするために、筆者は、KIT⁺FMS⁻細胞をソートし、無血清培地 mSFO2 を用いて、KL, M-CSF または KL+M-CSF の存在下で 48 時間培養し、フローサイトメトリーにて FMS と KIT の発現を測定した (表 1)。KL または KL+M-CSF で培養した細胞の約 50-60% が回収できたのに対し、M-CSF で培養した場合は、細胞の 30% が回収された。M-CSF が培養中に産生されようとなかろうと、FMS⁺細胞は 48 時間以内に生成された。このように、KIT⁺FMS⁻細胞は自立的に M-CSF に応じてコロニーを形成する KIT⁺FMS⁺細胞に分化する。M-CSF で培養した約 30% の細胞が、KIT⁻FMS⁺細胞であった。この知見は、KIT⁺FMS⁻細胞は、KIT⁺FMS⁺細胞の中間状態を経て KIT⁻FMS⁺細胞に分化することを示している。KIT⁺FMS⁻細胞数は M-CSF で培養した全細胞の 10% に減少したのに対し、KL で培養した細胞の 30% が未分化な KIT⁺FMS⁻の細胞表面抗原を維持していた。

表 1 *In vitro* における KIT⁺FMS⁻細胞から KIT⁺FMS⁺細胞への分化

Cytokines in culture	Cell recovery	Production of the surface phenotypes recovered			
		KIT ⁺ FMS ⁻	KIT ⁺ FMS ⁺	KIT ⁻ FMS ⁺	KIT ⁻ FMS ⁻
M-CSF	4500	10.7%	54.7%	27.7%	6.9%
KL(SCF)	9500	24.3%	71.7%	3.3%	0.8%
M-CSF+KL	7000	29.7%	61.8%	6.9%	1.5%

C57BL/6 マウスの骨髄からソートした 1×10^4 個の KIT⁺FMS⁻細胞 (純度 90%) を 1mL の無血清培地 mSFO2 を用いて、24 ウェルディッシュ中で、M-CSF、KL または M-CSF+KL のそれぞれの存在下で 2 日間培養した。各群は n=2 で行い、細胞をピペッティングによって回収し、2 のウェルの細胞をプール後、ビオチン化 ACK4 および FITC-AFS98 で染色し、フローサイトメトリーにて解析した[Sudo *et al.*, 1995]。

4.3.5 抗 FMS 抗体でなく、抗 KIT 抗体が骨髄中の CFU-M の維持を抑制する

前項の 4.3.2 の結果は、骨髄中で生成された KIT⁺FMS⁺細胞は急速に増殖性を失っていくことを示している。もしそうであれば、M-CSF は骨髄内の CFU-M 産生に必須な役割を

果たしているという考え方は、否定されるであろう。骨髄内の CFU-M 産生における M-CSF の機能を検証するために、FMS の機能を阻害する抗体、AFS98 を成獣マウスに投与した。AFS98 または ACK2(2mg)を 0 日と 2 日目に静脈内投与し、3 日目に骨髄細胞を回収し、CFU-M と CFU-IL3 の数を解析した。AFS98 の投与量が骨髄細胞の細胞表面上の全ての FMS を占有するのに十分かを調べた。実際、ビオチン化した AFS98 は、AFS98 投与マウスからの骨髄細胞を染色できなかった。一方、FITC 標識化抗ラット κ モノクローナル抗体は上記の同じ細胞の約 3%を染色した。これは、骨髄中に FMS⁺細胞が存在することを示している（データを示さず）。FMS の機能が、3 日間、AFS98 の飽和容量の投与で阻害されたにもかかわらず、AFS98 投与骨髄細胞における CFU-M は優位に減少しなかった。対照的に、ACK2 投与マウスでは、Ogawa らの報告と完全に一致して[Ogawa *et al.*, 1991]、骨髄細胞中の CFU-M の数は減少した(図 5)。これらの結果は、KL/KIT シグナル経路は、CFU-M の産生に必須な役割を果たしているが、一方 M-CSF/FMS シグナル経路は *in vivo* における CFU-M の維持としての役割は少ないことを示している。

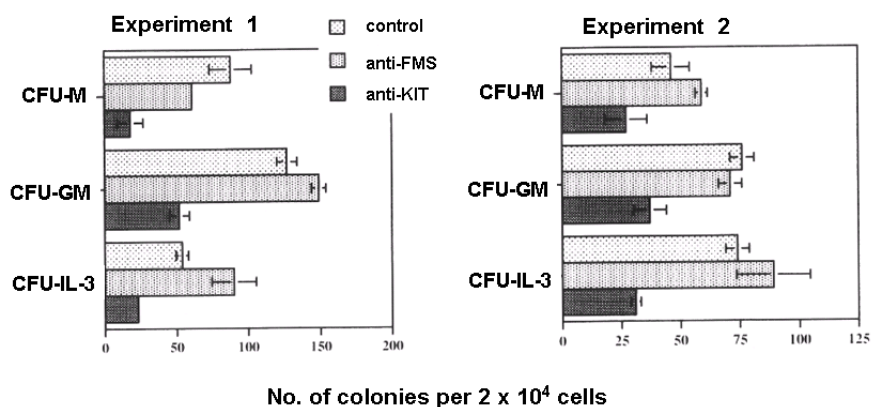


図 5 抗 FMS 抗体または抗 KIT 抗体投与マウスの骨髄細胞における CFU-M の産生

C57BL/6 マウスに AFS98 (抗 FMS mAb) または ACK2 (抗 KIT mAb) をそれぞれ 0 日目、2 日目に静脈内投与し (2mg/マウス)、3 日目に骨髄細胞を回収し、半固形培地にて培養し、CFU-M、CFU-GM、CFU-IL-3 の数を測定した。コントロールには PBS を投与したマウスを使用した。値は 3 回の実験の平均値と標準偏差を示す[Sudo *et al.*, 1995]。

4.4 考察

この研究において、FMS を認識し、その機能を阻害するモノクローナル抗体 AFS98 を作製した。この抗体は、他の細胞表面マーカーの発現と関連させて、骨髄細胞の FMS 発現細胞の正確な解析を行うことができる。骨髄中の M-CSF 結合細胞のオートラジオグラムによる見積もりと一致して [Guilbert and Stanley, 1980; Byrne *et al.*, 1981]、全骨髄細胞の約 5% が FMS⁺ であり、そのほとんどが Mac1⁺ の単球であった。一方、KIT⁺FMS⁺ 細胞の頻度が低かった。驚くべきことに、CFU-M は、その 10 倍以上が FMS⁺ 画分より FMS⁻ 画分に存在した。従って、ほとんどの CFU-M は、FMS⁻ または少なくとも FMS^{dull} から由来し、小さなコロニーを形成する CFU-M は、FMS⁺ 画分に存在する。Bicknell らは、FMS は、造血前駆細胞が多く濃縮された集団に発現することを示し [Bicknell *et al.*, 1988]、間接的に FMS は CFU-M に発現することを示している。

本研究の結論は、彼らの結果と全く違っているが、彼らの研究の結果は、本研究の結果と一致しないわけではない。事実、幹細胞濃縮画分に相当する KIT⁺ 細胞の 1/4 が、FMS を発現する。筆者の理解の限りでは、M-CSF に応答するコロニー形成活性を評価するのに FMS⁺ 細胞を分離する試みはこれまでにないが、FMS の機能を阻害することのできる他の抗マウス FMS モノクローナル抗体が、Greenberger や Shadduck らによって既に報告されていた [Greenberger *et al.*, 1992; Shadduck *et al.*, 1993]。このように、この研究は、マウス骨髄中の CFU-M の FMS の発現解析を最初に検出したものである。それにもかかわらず、この研究に示すように、ほとんどの CFU-M は KIT⁺FMS⁻ 細胞であり、短期間の培養で FMS⁺ 細胞を生成する能力を持ち、おそらく細胞外からの分化誘導シグナルなしで、コロニーを形成するために M-CSF に反応するようになる。これらの知見は、培養系で、ヒト CD34⁺ 造血前駆細胞において FMS の発現が誘導されることを示しているレポートと矛盾しない [Panterne *et al.*, 1993]。一まとめに考えてみると、CFU-M アッセイは、実際上の問題として、直接的に、FMS⁺ 細胞の数を反映するより M-CSF に応答する能力を持つ細胞の機能的な評価である。

それゆえ、提起する問題は、なぜ FMS⁻ 細胞が M-CSF に応答できるのかでなく、なぜ、多くの CFU-M が骨髄中の KIT⁺FMS⁺ より KIT⁺FMS⁻ 画分に存在するのかである。実際この問題は、クラス III 型チロシンキナーゼ受容体の使用における階層を理解するというこの研究の主要な目的に密接に関連している。この発見の最も単純な説明は、KIT⁺FMS⁺ 細胞の集団は限られた増殖能を持ったより成熟した系統にコミットした前駆細胞に相当する。以下の 3 つの知見がこの考えを支持している。すなわち、(1) KIT⁺FMS⁺ 細胞は、形態的には、プロミエロサイトであり、KIT⁺FMS⁻ 細胞より、より成熟しているように見える (図 3)、(2) KIT⁺FMS⁺ 細胞集団における CFU-M は KIT⁺FMS⁻ 細胞集団よりより小さいコロニーを形成する (図 4 B,b,c)、(3) KIT⁺FMS⁻ 細胞は *in vitro* で KIT⁺FMS⁺ 細胞になる (表 1)。最後の (3) は、血清成分由来の増殖因子類が混入しないように、BSA、インスリン、トランスフェリンのみを含む組成が明らかにされた培地で行っており [Nishikawa *et al.*,

1994]、添加した増殖因子の効果のみを見ている。ここに示されたように、M-CSF および KL の両方が、KIT⁺FMS⁻細胞から KIT⁺FMS⁺細胞への分化を支持することは、これはどんな特異的な分化シグナルにも依存しない自立的な過程であり、この細胞集団は既にマクロファージ系列にコミットしているが、まだ FMS を発現していない細胞を含んでいることを示している。すなわち、マクロファージ細胞系列は、KIT⁺FMS⁻細胞から KIT⁺FMS⁺ の中間の前駆細胞を経て分化する。KIT⁺FMS⁻細胞の数は、M-CSF 単独で短期間培養したとき、10%に減少するが、KIT⁺FMS⁺ および KIT⁻FMS⁺ の両方の集団の細胞数 (%) から、分化の順が KIT⁺FMS⁻ から、KIT⁺FMS⁺、最後に KIT⁻FMS⁺ であると考えられる。さらにまた、FMS⁺細胞は、M-CSF 単独の培養条件下で選択的に維持されることを示している。

AFS98 の *in vivo* 投与実験において、飽和量の AFS98 の投与後の 3 日目の骨髄における FMS の機能を阻害しても、骨髄における CFU-M の産生を阻害することはできなかった。AFS98 の長期投与は、大理石病を引き起こすので、このモノクローナル抗体は *in vivo* で FMS の機能を抑制する。理論的には、もし、M-CSF が、骨髄内で 1 回の分裂を誘導するため、新しく形成された KIT⁺FMS⁺細胞に働き、生じた娘細胞が CFU-M 活性を残しているなら、AFS98 の投与によるその効果は容易に検出されるだろう。従って、この実験から、M-CSF/FMS シグナル伝達システムは、*in vitro* で機能しているが (図 1B、図 4)、骨髄内での CFU-M の増幅においては、少ししか役割を果たしてないことを示唆している。この結論は、抗 M-CSF ポリクローナル抗体を成獣マウスの造血に影響を与えなかったことを示した Boegel らの結果と一致している [Boegel *et al.*, 1985]。また、もし M-CSF 遺伝子が膜型と分泌型の両方を作っているなら [Wong *et al.*, 1987; Rettenmier *et al.*, 1987]、2 つの分子の間の分化と増殖誘導能の違いは、AFS98 処理の *in vitro* と *in vivo* の矛盾を説明できるかもしれない。この考えに基づいて、これらの 2 つの型の M-CSF を別々に示す培養系で実験することは重要である。

M-CSF/FMS シグナル伝達システムと対照的に、KL/KIT シグナル伝達システムは、多能性幹細胞のプールから CFU-M の一定の流出を維持するために完全に必要である。KIT⁺FMS⁻細胞は KL 単独での培養で KIT⁺FMS⁺細胞を生成することができるので、KL が、それらの細胞の増殖を支持するために KIT⁺FMS⁻細胞のみに働くか、両方の細胞に働くか明らかでない。

抗 IL-7 受容体 (IL-7R) および抗 KIT の mAb を用いて、筆者らは、B 系統分化に関する KIT⁺IL7R⁺ の中間の前駆細胞の存在を観察した [Sudo *et al.*, 1993; Era *et al.*, 1994]。B 細胞もマクロファージ系統の両方とも、前駆細胞は、KIT の発現のダウンレギュレーションで増殖能を失うように見える [Era *et al.*, 1994, 図 4]。この規則が他の系統にも適応できる規則かを知ることは興味深いことである。

系統にコミットした KIT⁺FMS⁺ の中間の前駆細胞における M-CSF の役割と対照的に、IL-7R は、KIT より KIT⁺IL-7R⁺ の B 細胞の増殖において、より重要な役割をしている。

AFS98 と異なって、抗 IL-7R mAb の投与は、*in vivo* で完全に B 細胞系列の細胞の増殖を抑制している[Sudo *et al.*, 1993]。KIT⁺IL-7R⁺の B 前駆細胞の細胞周期関する最近の研究は、IL-7R が細胞周期の進展 (progression) のために必要なシグナルを伝達することを示している。一方 KIT のシグナルはこのサイクルを円滑に維持することに関与している[Yasunaga *et al.*, 1995]。

このように、それぞれの血液細胞の系統の分化が、KIT と系統特異的な増殖因子受容体とが共に発現している中間状態の細胞の過程を通して進行するなら、KIT と増殖因子受容体との間の階層は、細胞の系統間で変わっていると考えられる。B 細胞とマクロファージの系統に関して、系統特異的な増殖因子受容体、一つはクラス III 型チロシンキナーゼ受容体でもう一つがサイトカインレセプターファミリーであるが、これらには分子構造に違いがあり、これらの機能的な違いの説明になる。

KIT⁺FMS⁺細胞も KIT⁺IL-7R⁺細胞も多能性幹細胞から誘導され[Era *et al.*, 1994, 表 1]、各々のサブセットは本研究と他の我々の研究で樹立された mAb のセットにより、容易に区別することができ[Nishikawa *et al.*, 1991; Ogawa *et al.*, 199; Sudo *et al.*, 1993]、B 細胞とマクロファージ系統は、系統へのコミットメントと増殖因子受容体の発現との間の相関を理解するための有用なツールを提供する。コミットメントと受容体との相関は、多くのテキストに記載されているが、この問題が注意深く研究されていないことを強調したい。このことは、これらの増殖因子受容体を検出するための良い抗体を得ることの難しさ、骨髄内の各々前駆細胞集団の頻度が低いことが理由かもしれない。事実、造血幹細胞を決定するための最も汎用されている方法は、機能的な役割があいまいな細胞表面マーカーのセットが使用されている[Spangrude, 1991]。このように、増殖因子受容体の発現の点から血液細胞の系統図の再評価は、近年の実験血液学において重要な問題である。事実、我々は、本研究および以前の研究に示したように、*in vitro* における多能性幹細胞から中間状態の前駆細胞への分化は、2、3 日で達成されるという非常に早いプロセスであると思われる。さらに、遺伝子破壊技術の進展により、系統へのコミットメントのプロセスを含む転写因子のセットが見出されている[Ness and Engel, 1994]。したがって、筆者は、これらの 2 つの研究は、各々血液細胞の系統へのコミットメントが *in vitro* で研究できる実験系を構築するために併合されるだろうと確信している。

4.5 要約

M-CSF/CSF-1 とその受容体である FMS の性状はよく解析されているが、骨髄内造血の実際の役割は曖昧のままである。これは、このシグナル伝達の破壊は、造血に必要な骨小腔を欠損した大理石病マウスを生じるためである。造血における FMS の役割を解明するために、筆者は、マウス FMS に対して機能を阻害する mAb を作製し、正常骨髄内のその発現と機能について研究した。

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、KIT⁺FMS⁻、KIT⁺FMS⁺、KIT⁻FMS⁺細胞は、それぞれ、中間の大きさのプラスト、アズール顆粒を持つプロミエロサイト、成熟単球であった。CFU-M は KIT⁺FMS⁺細胞画分より、KIT⁺FMS⁻細胞画分に 10 倍濃縮されていた。さらに、抗 FMS mAb の投与は、骨髄中の CFU-M の産生に影響しなかった。一方、抗 KIT mAb の投与は、それらを著しく減少させた。KIT⁺FMS⁺細胞は、KIT⁺FMS⁻細胞の培養中に自立的に生じる。骨髄中のほとんどの CFU-M は、実際、FMS⁻細胞が、培養中に KIT⁺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、KIT と FMS の機能的階層があることを示している。すなわち、KIT は、CFU-M の産生と維持に関する主要な役割を果たしており、一方、FMS は、培養中に KIT と M-CSF の増殖受容体としての機能とを共発現して、骨髄中の FMS⁺細胞の増殖に関して最小限の役割を担っている。

第 5 章

結 語

本研究の目的は、骨髄内でのリンパ造血細胞の増殖分化機構を固体レベル、細胞レベル、および分子レベルで明らかにすることである。この目的を達成するために、まず、ストローマ細胞依存性の B 細胞の分化過程に必要な分子を造血支持機能に差異のあるストローマ細胞を比較することにより明らかにし、その分子の受容体に対する機能阻害抗体を作製し、その分子の細胞レベルおよび個体レベルでの機能を解析する戦略をとった。

本研究では、1. ストローマ細胞依存性の B 細胞分化過程に必要な分子の解明、2. ストローマ細胞株におけるサイトカイン産生機構の解析、3. IL-7/IL-7R シグナル伝達システムの固体レベルおよび細胞レベルでの機能、4. M-CSF/FMS シグナル伝達システムの固体レベルおよび細胞レベルでの機能についての解析を行い、以下の結果を得た。

1 については以下の事柄を明らかにした。

- (1) ストローマ細胞依存性の B 細胞の分化に IL-7 は必須である。
- (2) IL-7 はストローマ細胞から誘導的に産生され、B 細胞が IL-7 を誘導する。
- (3) ST2 細胞と PA6 細胞の B 細胞分化支持機能の差は IL-7 産生能の差である。
- (4) 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以下の 4 段階に分けることができる。
 - (a) 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
 - (b) 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
 - (c) IL-7 単独で増殖する細胞
 - (d) IL-7 に反応しない sIgM⁺ の成熟 B 細胞

2 については以下の事柄を明らかにした。

(1) M-CSF と TGF- β は PA6 と ST2 の両方のストローマ細胞に発現するが、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、G-CSF および TNF は両方のストローマ細胞で発現していなかった。一方、IL-1 β 、IL-6、IL-7 および LIF は ST2 細胞で、LIF および G-CSF は PA6 細胞で誘導的に発現していた。

(2) B 細胞株 DW34 細胞は、ST2 細胞において、効率的に IL-7 を誘導したが、IL-1 β 、IL-6 および IL-13 を誘導しなかった。一方、T 細胞株 CTLL-2 細胞と骨髄細胞株 FDC-P2 細胞は、これら全てのサイトカインの発現を誘導した。ST2 細胞のサイトカイン産生を誘導する能力は、DW34 細胞は IL-1 に相当し、CTLL-2 と FDC-P2 が LPS/TPA に相当することが示された。

(3) メンブレンフィルターとパラホルムアルデヒド固定化 DW34 細胞を用いた実験から IL-7 の効果的な誘導には、DW34 細胞と ST2 細胞の直接的な接触が必要である。

(4) 増殖に ST2 との共培養に加え、IL-5 を必要とする J1 細胞は、IL-7 を誘導することができなかった。

(5) ST2 から IL-7 を誘導する能力のある DW34 は IL-1 β を発現していたのに対し、IL-7 誘導能のない J1 は IL-1 β を発現していなかった。このことから、B 細胞株の IL-7 誘導分子は膜型もしくは膜に結合した IL-1 β であることが示唆された。

3 については以下の事柄を明らかにした。

(1) 75kDa の IL-7 受容体を認識し、IL-7 機能を阻害するモノクローナル抗体 A7R34 を得た。

(2) A7R34 を用いたフローサイトメトリー解析の結果、IL-7 受容体は、胸腺においては、CD4⁻CD8⁻、CD4⁺CD8⁻、CD4⁻CD8⁺の T 細胞に発現し、骨髄においては、B220⁺sIgM⁻の細胞であることが明らかとなった。

(3) *in vivo*における IL-7/IL-7R の機能を明らかにするために、A7R34 を成獣マウスに投与した結果、骨髄中の B220⁺細胞と胸腺細胞が著しく減少した。一方、末梢リンパ組織であるリンパ節と脾臓では、かなりの数の T 細胞と B 細胞が残った。このことは、リンパ球の寿命が 2 週間以上であるか、IL-7 に依存しないリンパ球増殖過程が存在することを示唆している。

(4) B 細胞に焦点を当て、成熟 B 細胞が出現する前に A7R34 を投与する実験を行った。妊娠マウスに A7R34 を投与し、IL-7 受容体の機能を阻害した結果、成熟 B 細胞 (B220⁺sIgM⁺) はほとんど存在しなかった。

(5) 以上から、*in vivo*において、IL-7 はリンパ球の増殖分化に必須の分子であることが示された。

4 について以下の事柄を明らかにした。

(1) M-CSF 受容体である FMS を認識し、M-CSF の機能を阻害するモノクローナル抗体 AFS98 を得た。

(2) AFS98 を用いたフローサイトメトリー解析の結果、FMS は、骨髄細胞中の 4.5% の細胞に検出され、Mac1⁺細胞の 3.2%、KIT⁺細胞の 0.4% の血液細胞に検出された。

(3) KIT⁺FMS⁺、KIT⁻FMS⁺細胞は形態学的に、それぞれアズール顆粒を持つ前骨髄球、成熟単球であった。

(4) CFU-M は KIT⁺FMS⁺細胞画分より KIT⁺FMS⁻細胞画分に 10 倍濃縮されていた。

(5) 骨髄中のほとんどの CFU-M は、実際、KIT⁺FMS⁻細胞で、培養中に FMS⁺細胞に分化する細胞である。

(6) AFS98 抗体のマウス個体への投与は、骨髄中の CFU-M の増殖に影響しなかった。一方、抗 KIT 抗体のマウス個体への投与により、CFU-M の増殖が著しく抑制された。

(7) これらの観察は、骨髄中に明らかに、KIT と FMS に機能的階層があることを示している。すなわち、KIT は、CFU-M の増殖・維持に主要な役割を果たしており、一方、FMS は、培養中に KIT と共発現し、M-CSF の増殖受容体として機能するが、骨髄中の 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。

以上、本研究成果は IL-7 および M-CSF のリンパ造血細胞に対する増殖分化に関する作用の一面を明らかにした。また、本研究で開発した抗サイトカイン受容体抗体を用いた実験系は、マウスリンパ造血細胞の増殖分化機構を明らかにするための有用な手法となると考えられる。

最後に、IL-7/IL-7R の機能について、本研究の結果と最近の知見とを比較して考察する。IL-7R は高親和性 IL-7R (IL-7R α 鎖と呼称する) と IL-2R γ 鎖から構成されるヘテロダイマーであり [Kondo *et al.*, 1994]、IL-7 が IL-7R に結合するとチロシンキナーゼの JAK1 (janus kinase 1) と JAK3 (janus kinase 3) が活性化され、IL-7R α 鎖の 449 番目のチロシンをリン酸化し、STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) や PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) をリクルートする [Leonard WJ and O'Shea JJ, 1998]。これらの分子はさらに JAK3 によりリン酸化され、STAM (signal transducing adaptor molecule) の活性を介して標的遺伝子の発現を誘導する。一方、IL-2R γ 鎖は、IL-4R、IL-7R、IL-9R、IL-15R の受容体に機能的に共有される γ c (common cytokine receptor gamma) 鎖であることが知られており [Noguchi *et al.*, 1993; Russelle *et al.*, 1993]、ヒトにおいて X 連鎖重症複合性免疫不全症 (X-linked severe combined immunodeficiency; X-SCID) の原因遺伝子である。

マウス IL-7 ノックアウトマウスの解析 [von Freeden-Jeffry *et al.*, 1995] では、末梢血およびリンパ組織で極度にリンパ球が減少しており、B 細胞の分化は、プロ B 細胞の段階からプレ B 細胞の段階で止まっていること、T 細胞については、胸腺 T 細胞は 1/10 に減少したが、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞のサブセットの分布は変化しないことが報告されている。この結果に対し、本研究では、CD4⁺、CD8⁺ダブルポジティブ細胞が著しく減少していた。これは、T 細胞において、IL-7R に作用するサイトカインが別に存在することを示唆している。このサイトカインは現在では、TSLP (thymic stromal lymphopoietin) [Sims *et al.*, 2000] として知られている。

一方、IL-7R α ノックアウトマウス [Peschon *et al.*, 1994] の解析では、B 細胞は、B220⁺、s IgM⁻、CD43(S7)⁺、HSA^{dull} の細胞が残っていることが示されており、これは本研究で、A7R34 を投与し続けても残る細胞と一致している。T 細胞においては、IL-7 ノックアウトマウスの結果と異なり、本研究の結果と同様に、CD4⁺、CD8⁺ダブルポジティブ細胞が著しく減少していた。このことは、T 細胞の増殖分化に係るサイトカインが IL-7R α 鎖を使用していることを示唆している。事実、胸腺ストローマ細胞が産生するサイトカイン TSLP 受容体は IL-7R α 鎖とのヘテロダイマーを形成することが報告されている [Park *et al.*, 2000]。別のグループの IL-7R α ノックアウトマウス [Maki *et al.*, 1996] の解析では、 $\gamma\delta$ T 細胞が胸腺、脾臓、皮膚上皮、小腸上皮、肝臓などの組織から完全に消失していることが示されている。この結果から、特に $\gamma\delta$ T 細胞の増殖分化には不可欠であることが分かる。

さらに、 γ c 鎖ノックアウトマウスにおいても、IL-7R α 鎖ノックアウトマウスと同様に、B 細胞および T 細胞の増殖分化が著しく障害されている [Nakajima *et al.*, 1997]。

上述のように IL-7 は B 細胞および T 細胞の増殖分化に必須のサイトカインであり、IL-7R は前駆細胞の段階で発現している (第 3 章、図 8) ことから、Kondo らは [Kondo *et al.*, 1997]、B 細胞と T 細胞の共通な前駆細胞は IL-7R を発現しているという仮説の元にマウス骨髄中の IL-7R 陽性細胞をさらに分画し、IL-7R⁺、Lin⁻、Thy-1⁻、Sca-1^{low}、KIT^{low}

の細胞集団がリンパ球共通前駆細胞であることを示した。この細胞は B 細胞と T 細胞の 2 つの系統のみに分化することができるのか、骨髄球系への細胞にも分化できるのか不明であったが、最近 Kawamoto と Katsura は [Kawamoto and Katsura, 2009; Kawamoto *et al.*, 2010]、リンパ造血細胞の分化段階は、骨髄球系細胞、B 細胞および T 細胞の共通前駆細胞の下流に、B 細胞と T 細胞の共通の前駆細胞が存在するのではなくて、骨髄球系細胞および B 細胞共通前駆細胞と骨髄球系細胞および T 細胞共通前駆細胞が位置することを示している。

以上、本研究の結果は、IL-7 および IL-7R ノックアウトマウスの解析結果と一致していることが確認された。また、本研究では、ノックアウトマウスの解析では得られない B 細胞の寿命を推定することができたことを強調したい。

謝 辞

本論文は筆者が東レ株式会社基礎研究所および株式会社バイオマテリアル研究所（出向）に在職中の研究成果をまとめたものです。研究を進めるにあたって、お世話になった方々に、この場を借りて感謝の意を表したいと思います。

本研究をまとめるにあたり、終始有益なご助言ならびにご指導を賜りました早稲田大学大学院先進理工学研究科教授 筒井和義博士に心から感謝申し上げます。

本学位論文審査の副査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を賜りました早稲田大学大学院先進理工学研究科教授 並木秀男博士、同教授 加藤尚志博士に心から感謝申し上げます。

本論文を完成させるにあたり、終始ご支援賜りました東レ株式会社先端融合研究所副所長・理事 米原徹博士、北里大学薬学部教授 長瀬博博士に心から感謝申し上げます。

本研究の共同研究者として、終始多大なるご支援賜りました理化学研究所発生・再生科学総合研究センター副センター長 西川伸一博士、慶応義塾大学医学部教授 須田年生博士、理化学研究所 小玉博明博士、鳥取大学医学部教授 林眞一博士、熊本大学発生医学研究所教授 小川峰太郎博士、岐阜大学大学院医学研究科教授 國貞隆弘博士、熊本大学発生医学研究所教授 江良択実博士、理化学研究所発生・再生科学総合研究センター 西川里美氏に心から感謝申し上げます。

また、東レ株式会社および株式会社バイオマテリアル研究所の同じ研究室で本研究を進めるにあたり、苦楽を共にいたしました共同研究者である東レ株式会社医薬研究所主任研究員 中村紀子氏に心から感謝申し上げます。

また、本研究の共同研究者で既に東レ株式会社を退社されました茨城大学農学部教授 小川恭喜博士、飯塚雅彦氏、伊藤雅代氏、東京薬科大学生命科学部准教授 玉腰雅忠博士、秋山直子氏に心から感謝申し上げます。

また本研究の第 4 章の造血評価の一部を担当していただきました東レ株式会社医薬研究所 伊澤明子氏に心から感謝申し上げます。

また、本研究に対して、ご意見ご助言ご協力を賜りました京都大学医学部教授 湊長博博士、北里大学理学部教授、服部雅一博士、金沢大学大学院医学研究科教授 横田崇博士に心から感謝申し上げます。

また、本研究を遂行するに当たって、貴重な研究材料をいただきました Brian Seed 博士 (CDM8 および CD4Rg ベクター)、Jacques Van Snick 博士 (IL-6 cDNA)、本庶佑博士 (IL-5 cDNA)、岸本忠三博士 (IL-4 cDNA)、平野俊夫博士 (IL-4 cDNA) に心から感謝申し上げます。

また、学位論文作成の書式、提出書類に関して、ご支援、ご協力をいただきました早稲田大学大学院先進理工学研究科 原口省吾博士に心から感謝申し上げます。

また、研究を進めるにあたり、ご支援、ご協力を頂きながら、ここにお名前を記すことが出来なかった多くの方々に心より感謝申し上げます。

最後になりますが、私が在籍した東京都臨床医学総合研究所、東レ株式会社基礎研究所
および株式会社バイオマテリアル研究所の上司として、終始暖かく研究を見守り、支援賜
りました故小林茂保博士に謹んで感謝申し上げます。

文 献

Akhurst RJ, Fee F, Balmain A. (1988) Localized production of TGF-beta mRNA in tumour promoter-stimulated mouse epidermis. *Nature*. 331:363-365.

Alt FW, Blackwell TK, DePinho RA, Reth MG, Yancopoulos GD. (1986) Regulation of genome rearrangement events during lymphocyte differentiation. *Immunol Rev*. 89:5-30.

Armitage RJ, Ziegler SF, Friend DJ, Park LS, Fanslow WC. (1992) Identification of a novel low-affinity receptor for human interleukin-7. *Blood*. 79:1738-1745.

Aruffo A, Seed B. (1987) Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:8573-8577.

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. 61:1303-1313.

Balkwill FR, Burke F. (1989) The cytokine network. *Immunol Today*. 10:299-304.

Bernstein A, Forrester L, Reith AD, Dubreuil P, Rottapel R. (1991) The murine *W/c-kit* and *Steel* loci and the control of hematopoiesis. *Semin Hematol*. 28:138-142.

Bicknell DC, Williams DE, Broxmeyer HE. (1988) Correlation between CSF-1 responsiveness and expression of (CSF-1 receptor) c-fms in purified murine granulocyte-macrophage progenitor cells (CFU-GM). *Exp Hematol*. 16:240-243.

Boegel F, Pigoli G, Shadduck RK, Waheed A. (1985) Effect of anti-CSF on in vivo hemopoiesis. *Exp Hematol*. 13:912-918.

Braun L, Mead JE, Panzica M, Mikumo R, Bell GI, Fausto N. (1988) Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:1539-1543.

Byrne PV, Guilbert LJ, Stanley ER. (1981) Distribution of cells bearing receptors for a colony-stimulating factor (CSF-1) in murine tissues. *J Cell Biol*. 91:848-853.

Chantry D, Turner M, Feldmann M. (1989) Interleukin 7 (murine pre-B cell growth factor/lymphopoietin 1) stimulates thymocyte growth: regulation by transforming growth factor beta. *Eur J Immunol.* 19:783-786.

Chazen GD, Pereira GM, LeGros G, Gillis S, Shevach EM. (1979) Interleukin 7 is a T-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:5923-5927.

Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* 18:5294-5299.

Clark BD, Collins KL, Gandy MS, Webb AC, Auron PE. (1986) Genomic sequence for human prointerleukin 1 beta: possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin 1 alpha gene. *Nucleic Acids Res.* 14:7897-7914.

Coffman RL. (1982) Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunol Rev.* 69:5-23.

Collins LS, Dorshkind K. (1987) A stromal cell line from myeloid long-term bone marrow cultures can support myelopoiesis and B lymphopoiesis. *J Immunol.* 138:1082-1087.

Conlon PJ, Morrissey PJ, Nordan RP, Grabstein KH, Prickett KS, Reed SG, Goodwin R, Cosman D, Namen AE. (1989) Murine thymocytes proliferate in direct response to interleukin-7. *Blood.* 74:1368-1373.

Cumano A, Dorshkind K, Gillis S, Paige CJ. (1990) The influence of S17 stromal cells and interleukin 7 on B cell development. *Eur J Immunol.* 20:2183-2189.

Damia G, Komschlies KL, Faltynek CR, Ruscetti FW, Wiltrot RH. (1992) Administration of recombinant human interleukin-7 alters the frequency and number of myeloid progenitor cells in the bone marrow and spleen of mice. *Blood.* 79:1121-1129.

Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Goeddel DV. (1986) The murine transforming growth factor-beta precursor. *J Biol Chem.* 261:4377-4379.

Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. (1977) Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol.* 91:335-344.

Dexter TM, Garland J, Scott D, Scolnick E, Metcalf D. (1980) Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines. *J Exp Med.* 152:1036-1047.

Dorshkind K. (1988) IL-1 inhibits B cell differentiation in long term bone marrow cultures. *J Immunol.* 141:531-538.

Era T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamoto M, Honjo T, Akagi K, Miyazaki J, Yamamura K. (1991) Differentiation of growth signal requirement of B lymphocyte precursor is directed by expression of immunoglobulin. *EMBO J.* 10:337-342.

Era T, Nishikawa S, Sudo T, Wang FH, Ogawa M, Kunisada T, Hayashi S, Nishikawa S. (1994) How B-precursor cells are driven to cycle. *Immunol Rev.* 137:35-51.

Faltynek CR, Wang S, Miller D, Young E, Tiberio L, Kross K, Kelley M, Kloszewski E. (1992) Administration of human recombinant IL-7 to normal and irradiated mice increases the numbers of lymphocytes and some immature cells of the myeloid lineage. *J Immunol.* 149:1276-1282.

Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. (1994) The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol.* 55:1-96.

Gearing DP, King JA, Gough NM. (1988) Complete sequence of murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *Nucleic Acids Res.* 16:9857.

Gillis S, Smith KA. (1977) Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature.* 268:154-156.

Gimble JM, Pietrangeli C, Henley A, Dorheim MA, Silver J, Namen A, Takeichi M, Goridis C, Kincade PW. (1989) Characterization of murine bone marrow and spleen-derived stromal cells: analysis of leukocyte marker and growth factor mRNA transcript levels. *Blood.* 74:303-311.

Goodwin RG, Friend D, Ziegler SF, Jerzy R, Falk BA, Gimpel S, Cosman D, Dower SK,

March CJ, Namen AE, Park LS. (1990) Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell.* 60:941-951.

Grabstein KH, Namen AE, Shanebeck K, Voice RF, Reed SG, Widmer MB. (1990) Regulation of T cell proliferation by IL-7. *J Immunol.* 144:3015–3020.

Greenberger J, Leif J, Crawford D, Anklesaria P, English D, Sakakeeny M, Rubin J, Pierce J, Shaddock R, FitzGerald TJ. (1992) Humoral and cell surface interactions during gamma-irradiation leukemogenesis in vitro. *Exp Hematol.* 20:92-102.

Guilbert LJ, Stanley ER. (1980) Specific interaction of murine colony-stimulating factor with mononuclear phagocytic cells. *J Cell Biol.* 85:153-159.

Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. (1991) Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med.* 173:1213-1225.

Hattori M, Sudo T, Iizuka M, Kobayashi S, Nishio S, Kano S, Minato N. (1987) Generation of continuous large granular lymphocyte lines by interleukin 2 from the spleen cells of mice infected with Moloney leukemia virus. Involvement of interleukin 3. *J Exp Med.* 166:833-849.

Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Sudo T, Kodama H, Suda T, Nishikawa S, Nishikawa S. (1990) Stepwise progression of B lineage differentiation supported by interleukin 7 and other stromal cell molecules. *J Exp Med.* 171:1683-1695.

Hilton DJ, Nicola NA, Gough NM, Metcalf D. (1988) Resolution and purification of three distinct factors produced by Krebs ascites cells which have differentiation-inducing activity on murine myeloid leukemic cell lines. *J Biol Chem.* 1988 263:9238-9243.

Hirayama F, Shih JP, Awgulewitsch A, Warr GW, Clark SC, Ogawa M. (1992) Clonal proliferation of murine lymphohemopoietic progenitors in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:5907-5911.

Holmes KL, Palaszynski E, Fredrickson TN, Morse HC 3rd, Ihle JN. (1985) Correlation of cell-surface phenotype with the establishment of interleukin 3-dependent cell lines from wild-mouse murine leukemia virus-induced neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:6687-6691.

Hunt P, Robertson D, Weiss D, Rennick D, Lee F, Witte ON. (1987) A single bone marrow-derived stromal cell type supports the in vitro growth of early lymphoid and myeloid cells. *Cell.* 48:997-1007.

Ikuta K, Kina T, MacNeil I, Uchida N, Peault B, Chien YH, Weissman IL. (1990) A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell.* 62:863-874.

Ingalls HM, Goodloe-Holland CM, Luna EJ. (1986) Junctional plasma membrane domains isolated from aggregating *Dictyostelium discoideum* amoebae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:4779-4783.

Kajigaya S, Suda T, Suda J, Saito M, Miura Y, Iizuka M, Kobayashi S, Minato N, Sudo T. (1986) A recombinant murine granulocyte/macrophage (GM) colony-stimulating factor derived from an inducer T cell line (IH5.5). Functional restriction to GM progenitor cells. *J Exp Med.* 164:1102-1113.

Katoh S, Tominaga A, Migita M, Kudo A, Takatsu K. (1990) Conversion of normal Ly-1-positive B-lineage cells into Ly-1-positive macrophages in long-term bone marrow cultures. *Dev Immunol.* 1:113-125.

Kawamoto H, Ikawa T, Masuda K, Wada H, Katsura Y. (2010) A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: the essence of the myeloid-based model. *Immunol Rev.* 238:23-36.

Kawamoto H, Katsura Y. (2009) A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. *Trends Immunol.* 30:193-200.

Kawasaki ES, Ladner MB, Wang AM, Van Arsdell J, Warren MK, Coyne MY, Schweickart VL, Lee MT, Wilson KJ, Boosman A, Stanley ER, Ralph P, Mark DF. (1985)

Molecular cloning of a complementary DNA encoding human macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1). *Science*. 230:291-296.

Kinashi T, Harada N, Severinson E, Tanabe T, Sideras P, Konishi M, Azuma C, Tominaga A, Bergstedt-Lindqvist S, Takahashi M, Masuda M, Yaoita Y, Takatsu K, Honjo T. (1986) Cloning of complementary DNA encoding T-cell replacing factor and identity with B-cell growth factor II. *Nature*. 324:70-73.

Kincade PW. (1987) Experimental models for understanding B lymphocyte formation. *Adv Immunol*. 41:181-267.

Kincade PW, Lee G, Pietrangeli CE, Hayashi S, Gimble JM. (1989) Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow. *Annu Rev Immunol*. 7:111-143.

Kodama HA, Amagai Y, Koyama H, Kasai S. (1982) A new preadipose cell line derived from newborn mouse calvaria can promote the proliferation of pluripotent hemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol*. 112:89-95.

Kodama H, Hagiwara H, Sudo H, Amagai Y, Yokota T, Arai N, Kitamura Y. (1986) MC3T3-G2/PA6 preadipocytes support in vitro proliferation of hemopoietic stem cells through a mechanism different from that of interleukin 3. *J Cell Physiol*. 29:20-26.

Kondo M, Takeshita T, Higuchi M, Nakamura M, Sudo T, Nishikawa S, Sugamura K. (1994) Functional participation of the IL-2 receptor gamma chain in IL-7 receptor complexes. *Science*. 263:1453-1454.

Kondo M, Weissman IL, Akashi K. (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 91:661-672.

Kung JT, Sharrow SO, Sieckmann DG, Lieberman R, Paul WE. (1981) A mouse IgM allotypic determinant (Igh-6.5) recognized by a monoclonal rat antibody. *J Immunol*. 127:873-876.

Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, Unanue ER. (1985) Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82:1204-1208.

- Landreth KS, Dorshkind K.** (1988) Pre-B cell generation potentiated by soluble factors from a bone marrow stromal cell line. *J Immunol.* 140:845-852.
- Lanier LL, Gutman GA, Lewis DE, Griswold ST, Warner NL.** (1982) Monoclonal antibodies against rat immunoglobulin kappa chains. *Hybridoma.* 1:125-131.
- Lanotte M, Scott D, Dexter TM, Allen TD.** (1982) Clonal preadipocyte cell lines with different phenotypes derived from murine marrow stroma: factors influencing growth and adipogenesis in vitro. *J Cell Physiol.* 111:177-186.
- Lee G, Namen AE, Gillis S, Ellingsworth LR, Kincade PW.** (1989) Normal B cell precursors responsive to recombinant murine IL-7 and inhibition of IL-7 activity by transforming growth factor-beta. *J Immunol.* 142:3875-3883.
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtke H.** (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry.* 16:4743-4751.
- Leonard WJ, O'Shea JJ.** (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol.* 16:293-322.
- Lupton SD, Gimpel S, Jerzy R, Brunton LL, Hjerrild KA, Cosman D, Goodwin RG.** (1990) Characterization of the human and murine IL-7 genes. *J Immunol.* 144:3592-3601.
- Maki K, Sunaga S, Komagata Y, Kodaira Y, Mabuchi A, Karasuyama H, Yokomuro K, Miyazaki JI, Ikuta K.** (1996) Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:7172-7177.
- McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM.** (1991) The role of recombinant stem cell factor in early B cell development. Synergistic interaction with IL-7. *J Immunol.* 146:3785-3790.
- Metcalf D, Gearing DP.** (1989) A myelosclerotic syndrome in mice engrafted with cells producing high levels of leukemia inhibitory factor (LIF). *Leukemia.* 3:847-852.

Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K. (1992) Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol.* 10:295-331.

Morrissey PJ, Goodwin RG, Nordan RP, Anderson D, Grabstein KH, Cosman D, Sims J, Lupton S, Acres B, Reed SG. (1987) Recombinant interleukin 7, pre-B cell growth factor, has costimulatory activity on purified mature T cells. *J Exp Med.* 169:707-716.

Morrissey PJ, Conlon P, Braddy S, Williams DE, Namen AE, Mochizuki DY. (1991) Administration of IL-7 to mice with cyclophosphamide-induced lymphopenia accelerates lymphocyte repopulation. *J Immunol.* 146:1547-1552.

Muller-Sieburg CE, Whitlock CA, Weissman IL. (1986) Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1^{lo} hematopoietic stem cell. *Cell.* 44:653-662.

Murray R, Suda T, Wrighton N, Lee F, Zlotnik A. (1989) IL-7 is a growth and maintenance factor for mature and immature thymocyte subsets. *Int Immunol.* 1:526-531.

Naito M, Hayashi S, Yoshida H, Nishikawa S, Shultz LD, Takahashi K. (1991) Abnormal differentiation of tissue macrophage populations in 'osteopetrosis' (op) micedefective in the production of macrophage colony-stimulating factor. *Am J Pathol.* 139:657-667

Nakajima K, Hirano T, Koyama K, Kishimoto T. (1987) Detection of receptors for murine B cell stimulatory factor 1 (BSF1): presence of functional receptors on CBA/N splenic B cells. *J Immunol.* 139:774-779.

Nakajima H, Shores EW, Noguchi M, Leonard WJ. (1997) The common cytokine receptor gamma chain plays an essential role in regulating lymphoid homeostasis. *J Exp Med.* 185:189-195

Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, Wignall J, Mochizuki DY, Schmierer A, Mosley B, March CJ, Urdal D, Gillis S. (1988a) Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature.* 333:571-573.

Namen AE, Schmierer AE, March CJ, Overell RW, Park LS, Urdal DL, Mochizuki DY. (1988b) B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *J Exp Med.* 167: 988-1002.

Ness SA, Engel JD. (1994) Vintage reds and whites: combinatorial transcription factor utilization in hematopoietic differentiation. *Curr Opin Genet Dev.* 4:718-724.

Nishikawa S, Ogawa M, Nishikawa S, Kunisada T, Kodama H. (1988) B lymphopoiesis on stromal cell clone: stromal cell clones acting on different stages of B cell differentiation. *Eur J Immunol.* 18:1767-1771.

Nishikawa S, Hayashi S, Nishikawa S, Ogawa M, Kunisada T, Sudo T, Kodama H, Suda T. (1989) Defect of scid mouse revealed in in vitro culture systems. *Curr Top Microbiol Immunol.* 152:39-46. PubMed PMID: 2805796.

Nishikawa S, Kusakabe M, Yoshinaga K, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Era T, Sakakura T, Nishikawa S. (1991) In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development. *EMBO J.* 10:2111-2118.

Nishikawa S, Nakasato M, Takakura N, Ogawa M, Kodama H, Nishikawa S. (1994) Stromal cell-dependent bone marrow culture with a nearly protein-free defined medium. *Immunol Lett.* 40:163-169.

Nishizuka Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature.* 308:693-698.

Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, Ziegler SF, Tsang M, Cao X, Leonard WJ.(1993) Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science.* 262:1877-1880.

Northemann W, Braciak TA, Hattori M, Lee F, Fey GH. (1989) Structure of the rat interleukin 6 gene and its expression in macrophage-derived cells. *J Biol Chem.* 264:16072-16082.

Ogawa M, Nishikawa S, Ikuta K, Yamamura F, Naito M, Takahashi K, Nishikawa S.

(1988) B cell ontogeny in murine embryo studied by a culture system with the monolayer of a stromal cell clone, ST2: B cell progenitor develops first in the embryonal body rather than in the yolk sac. *EMBO J.* 7:1337-1343.

Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, Hayashi S, Kunisada T, Sudo T, Kina T, Nakauchi H, Nishikawa S. (1991) Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med.* 174:63-71.

Ogawa Y, Ohno N, Ito M, Iizuka M, Kobayashi S, Sudo T. (1991) Generation of functional murine macrophage lines employing a helper-free and replication-defective SV40-retrovirus: cytokine-dependent growth. *Cell Struct Funct.* 16:467-474.

Osmond DG. (1990) B cell development in the bone marrow. *Semin Immunol.* 2:173-180.

Panterne B, Zhou YQ, Hatzfeld J, Li ML, Levesque JP, Clark SC, Hatzfeld A. (1993) CSF-1 control of C-FMS expression in normal human bone marrow progenitors. *J Cell Physiol.* 155:282-289.

Park LS, Friend D, Gillis S, Urdal DL. (1986) Characterization of the cell surface receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem.* 261:4177-4183.

Park LS, Martin U, Garka K, Gliniak B, Di Santo JP, Muller W, Largaespada DA, Copeland NG, Jenkins NA, Farr AG, Ziegler SF, Morrissey PJ, Paxton R, Sims JE. (2000) Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J Exp Med.* 192:659-670.

Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, Park LS, Ziegler SF, Williams DE, Ware CB, Meyer JD, Davison BL. (1994) Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med.* 180:1955-1960.

Pietrangeli CE, Hayashi S, Kincade PW. (1988) Stromal cell lines which support lymphocyte growth: characterization, sensitivity to radiation and responsiveness to

growth factors. *Eur J Immunol.* 18:863-872.

Rajavashisth TB, Eng R, Shaddock RK, Waheed A, Ben-Avram CM, Shively JE, Lulis AJ. (1987) Cloning and tissue-specific expression of mouse macrophage colony-stimulating factor mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:1157-1161.

Ralph P, Nakoinz I. (1977) Direct toxic effects of immunopotentiators on monocytic, myelomonocytic, and histiocytic or macrophage tumor cells in culture. *Cancer Res.* 37:546-550.

Rennick D, Yang G, Gemmell L, Lee F. (1987) Control of hemopoiesis by a bone marrow stromal cell clone: lipopolysaccharide- and interleukin-1-inducible production of colony-stimulating factors. *Blood.* 69:682-691.

Rettenmier CW, Roussel MF, Ashmun RA, Ralph P, Price K, Sherr CJ. (1987) Synthesis of membrane-bound colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and downmodulation of CSF-1 receptors in NIH 3T3 cells transformed by cotransfection of the human CSF-1 and c-fms (CSF-1 receptor) genes. *Mol Cell Biol.* 7:2378-2387.

Rolink A, Streb M, Nishikawa S, Melchers F. (1991) The c-kit-encoded tyrosine kinase regulates the proliferation of early pre-B cells. *Eur J Immunol.* 21:2609-2612.

Rolink A, Melchers F. (1991) Molecular and cellular origins of B lymphocyte diversity. *Cell.* 66:1081-1094.

Rothwell VM, Rohrschneider LR. (1987) Murine c-fms cDNA: cloning, sequence analysis and retroviral expression. *Oncogene Res.* 1:311-324.

Russell SM, Keegan AD, Harada N, Nakamura Y, Noguchi M, Leland P, Friedmann MC, Miyajima A, Puri RK, Paul WE, Leonard WJ (1993) Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science.* 262:1880-1883.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-491.

Samaridis J, Casorati G, Traunecker A, Iglesias A, Gutierrez JC, Müller U, Palacios R. (1991) Development of lymphocytes in interleukin 7-transgenic mice. *Eur J Immunol.* 21:453-460.

Scahill SJ, Devos R, Van der Heyden J, Fiers W. (1983) Expression and characterization of the product of a human immune interferon cDNA gene in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:4654-4658.

Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS. (1992) V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol.* 10:359-383.

Shadduck RK, Waheed A, Mangan KF, Rosenfeld CS. (1993) Preparation of a monoclonal antibody directed against the receptor for murine colony-stimulating factor-1. *Exp Hematol.* 21:515-520.

Shen FW, Saga Y, Litman G, Freeman G, Tung JS, Cantor H, Boyse EA. (1985) Cloning of Ly-5 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:7360-7363.

Sherr CJ, Rettenmier CW, Sacca R, Roussel MF, Look AT, Stanley ER. (1985) The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell.* 41:665-676.

Spangrude GJ. (1991) Hematopoietic stem-cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 3:171-178.

Sims JE, Williams DE, Morrissey PJ, Garka K, Foxworthe D, Price V, Friend SL, Farr A, Bedell MA, Jenkins NA, Copeland NG, Grabstein K, Paxton RJ. (2000) Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. *J Exp Med.* 192:671-680.

Springer T, Galfré G, Secher DS, Milstein C. (1979) Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol.* 9:301-306

Stanley ER, Heard PM. (1977) Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium

conditioned by mouse L cells. *J Biol Chem.* 252:4305-4312.

Suda T, Okada S, Suda J, Miura Y, M.Ito, Sudo T, Hayashi S, Nishikawa SI, Nakauchi H. (1989) A stimulatory effect of recombinant murine interleukin-7 (IL-7) on B-cell colony formation and an inhibitory effect of IL-1 alpha. *Blood.* 74:1936-1941.

Suda T, Zlotnik A. (1991) IL-7 maintains the T cell precursor potential of CD3-CD4-CD8⁻ thymocytes. *J Immunol.* 146:3068-3073.

Sudo T, Ito M, Ogawa Y, Iizuka M, Kodama H, Kunisada T, Hayashi S, Ogawa M, Sakai K, Nishikawa S. (1989) Interleukin 7 production and function in stromal cell-dependent B cell development. *J Exp Med.* 170:333-338.

Sudo T, Nishikawa S, Ohno N, Akiyama N, Tamakoshi M, Yoshida H, Nishikawa S. (1993) Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:9125-9129.

Sudo T, Nishikawa S, Ogawa M, Kataoka H., Ohno N, Izawa A, Hayashi S, Nishikawa S.(1995) Functional hierarchy of c-kit and c-fms in intramarrow production of CFU-M. *Oncogene.* 11: 2469-2476.

Thompson NL, Bazoberry F, Speir EH, Casscells W, Ferrans VJ, Flanders KC, Kondaiah P, Geiser AG, Sporn MB. (1988) Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats. *Growth Factors.* 1:91-99.

Ullrich A, Schlessinger J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 61:203-212.

Urlaub G, Chasin LA. (1980) Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:4216-4220.

von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE and Murray R.(1995) Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J.Exp.Med.* 181:1519-1526.

Wong GG, Temple PA, Leary AC, Witek-Giannotti JS, Yang YC, Ciarletta AB, Chung M,

Murtha P, Kriz R, Kaufman RJ, Ferenz CR, Sibley BS, Turner KJ, Hewick RM, Clark SC, Yanai N, Yokota H, Yamada M, Saito M, Motoyoshi K, Takaku F. (1987) Human CSF-1: molecular cloning and expression of 4-kb cDNA encoding the human urinary protein. *Science*. 235:1504-1508.

Whitlock CA, Witte ON. (1982) Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79:3608-3612.

Whitlock CA, Tidmarsh GF, Muller-Sieburg C, Weissman IL. (1987) Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule. *Cell*. 48:1009-1021.

Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW Jr, Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, Stanley ER. (1990) Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 87:4828-4832.

Witte PL, Robinson M, Henley A, Low MG, Stiers DL, Perkins S, Fleischman RA, Kincade PW. (1987) Relationships between B-lineage lymphocytes and stromal cells in long-term bone marrow cultures. *Eur J Immunol*. 17:1473-1484.

Yang YC, Tsai S, Wong GG, Clark SC. (1988) Interleukin-1 regulation of hematopoietic growth factor production by human stromal fibroblasts. *J Cell Physiol*. 134:292-296.

Yasunaga M, Wang F, Kunisada T, Nishikawa S, Nishikawa S. (1995) Cell cycle control of c-kit+IL-7R+ B precursor cells by two distinct signals derived from IL-7 receptor and c-kit in a fully defined medium. *J Exp Med*. 182:315-323.

Yokota T, Coffman RL, Hagiwara H, Rennick DM, Takebe Y, Yokota K, Gemmell L, Shrader B, Yang G, Meyerson P, Luh J, Hoy P, Pene J, Briere F, Spits H, Banchereau J, Vries D, Lee FD, Arai N, Arai K. (1987) Isolation and characterization of lymphokine cDNA clones encoding mouse and human IgA-enhancing factor and eosinophil colony-stimulating factor activities: relationship to interleukin 5. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84:7388-7392.

Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T,

Shultz LD, Nishikawa S. (1990) The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*. 345:442-444.

Van Snick J, Cayphas S, Szikora JP, Renauld JC, Van Roost E, Boon T, Simpson RJ. (1988) cDNA cloning of murine interleukin-HP1: homology with human interleukin 6. *Eur J Immunol*. 18:193-197.

Vink A, Coulie PG, Wauters P, Nordan RP, Van Snick J. (1988) B cell growth and differentiation activity of interleukin-HP1 and related murine plasmacytoma growth factors. Synergy with interleukin 1. *Eur J Immunol*. 18:607-612.

Zipori D, Duksin D, Tamir M, Argaman A, Toledo J, Malik Z. (1985) Cultured mouse marrow stromal cell lines. II. Distinct subtypes differing in morphology, collagen types, myelopoietic factors, and leukemic cell growth modulating activities. *J Cell Physiol*. 122:81-90.

研究業績

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"> 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 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 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 ○ 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 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 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 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 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 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 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

研究業績

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 石川哮 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>

研究業績

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. Yoshida, <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>