

博士論文審査報告書

論 文 題 目

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

申 請 者

須藤	哲央
Tetsuo	Sudo

--

マウスリンパ造血細胞は、骨髄中に存在する造血幹細胞より増殖・分化し、その制御は、骨髄中の骨髄微小環境を形成するストローマ細胞によって調節されていることが知られている。ストローマ細胞は、骨髄中に存在する付着性の細胞で、細胞外マトリックスやサイトカインを産生することにより造血細胞の増殖と分化の制御に関与すると考えられているが、ストローマ細胞の造血支持機構の詳細は不明であった。

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 (IL-7) の役割について明らかにされている。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ていた。もし IL-7 が B 細胞の分化に必須な分子であるならば、B 細胞分化支持機能のあるストローマ細胞株 ST2 細胞と B 細胞分化支持機能のないストローマ細胞株 PA6 細胞との違いを IL-7 の産生能力の差として捕らえることができるという仮説の下に、2 つのストローマ細胞株の IL-7 産生能を比較し、ST2 細胞は IL-7 を発現しているのに対し、PA6 細胞はいかなる刺激を加えても発現しなかったこと、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 細胞が出現することを見出した。これらの結果から、マウス 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を明らかにした。

第2章では、マウスストローマ細胞のサイトカイン産生の仕組みについて明らかにしている。B 細胞分化支持機能に差異のある2種類のストローマ細胞株、PA6 細胞と ST2 細胞のサイトカインの mRNA の発現能力を比較した。本研究で評価したサイトカインのなかで、IL-1 β 、IL-6、IL-7、M-CSF、G-CSF、LIF および TGF- β は、2 種類のストローマ細胞において、構成的または誘導的に発現するサイトカインであった。IL-7 は B 細胞の分化を支持する能力を持つ ST2 細胞に発現し、一方、G-CSF は B 細胞の分化を支持しない PA6 細胞のみに検出され、サイトカインの発現と造血支持能に相関があることが示唆された。さらに、本研究で使用した2種類の刺激剤である LPS/TPA とヒト組換え型 IL-1 α のストローマ細胞株に対するサイトカイン誘導能は異なっており、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ることが示された。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、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ることが示された。さらに、DW34 細胞により IL-7 が誘導される仕組みについて調べ、メンブレンで仕切ることにより、ST2 細胞と DW34 細胞を非接触で培養した場合、IL-7 を誘導することができないこと、パラホルムアルデヒドで固定した DW34 細胞でも ST2 細胞から IL-7 を誘導できるこ

とから DW34 細胞の細胞表面分子により IL-7 が誘導される可能性が示唆された。次に、ST2 細胞との共培養では増殖できないが、この共培養系に IL-5 または IL-7 を添加すると増殖する B 細胞株 J1 細胞の IL-7 誘導能を調べ、その結果、J1 細胞は IL-7 を誘導できなかった。B 細胞株は IL-1 α と類似した活性を持つことから、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いう仮説の下に、2 つの B 細胞株の IL-1 の発現を調べた。その結果、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とから、DW34 細胞の IL-7 誘導作用は、DW34 細胞の産生する膜型 IL-1 β もしくは膜に結合した IL-1 β を介している可能性が示唆された。以上、ストローマ細胞株のサイトカイン産生誘導に必要なシグナルについて検討し、ストローマ細胞と造血細胞の関係が一方方向性のものでなく、相互に作用しあう関係であることを明らかにした。

第 3 章では、マウスリンパ球における IL-7 レセプター (IL-7R) の発現と機能について明らかにしている。高親和性の IL-7R を認識し、IL-7 との結合を阻害するモノクローナル抗体 A7R34 を作製し、A7R34 で細胞染色を行ったところ、骨髄内では、sIgM を発現していない未成熟な B 細胞が IL-7R を発現していた。胸腺においては、IL-7R は CD4⁻CD8⁻細胞および CD4⁺、CD8⁺ シングルポジティブ細胞に発現していたが、CD4⁺CD8⁺細胞には発現していなかった。末梢血においては、CD4⁺、CD8⁺ シングルポジティブ細胞が主な IL-7R 発現細胞であった。また、長期 B 前駆細胞培養系に A7R34 抗体を加えると、B 系列の細胞の増殖は阻害された。この結果から、IL-7 は *in vitro* の B 細胞の増殖に必須であることが示唆された。成獣マウスへの A7R34 の投与により、*in vivo* における IL-7 の機能を評価した。A7R34 を 2 週間投与した結果、B 前駆細胞と胸腺細胞の数は減少したが、末梢において、一定量の成熟 B 細胞と成熟 T 細胞が存在した。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製することができた。これらの結果から、リンパ球の寿命は 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 はリンパ球の増殖分化過程を制御する唯一の受容体であることを明らかにした。

第 4 章では、マウス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ている。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調べた。その結果、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、それぞれ中型芽球、アズール顆粒含有前骨髄球、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が、抗 KIT 抗体のマウス個体への投与は、CFU-M の増殖を抑制した。KIT⁺FMS⁺細胞は、KIT⁺FMS⁻細胞の培養中に自律的に生じたことから、骨髄中のほとんどの CFU-M は、FMS⁻細胞であり培養中に FMS⁺細胞に分化する細胞であることを見出した。これらの結果は、骨髄中に KIT と FMS の機能的階層があることを示唆しており、KIT は CFU-M の増殖・維持に主要な役割を果たし、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を明らかにした。

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り、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。さらに 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、全ての血液系列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示唆された。

以上のように本論文は、今まで不明であったストローマ細胞依存性のリンパ造血細胞の増殖分化機構の実体を明らかにした点で高く評価される。さらに本研究で開発した機能阻害サイトカイン受容体抗体を用いた *in vitro* および *in vivo* のサイトカインの機能検証方法は、マウスリンパ造血細胞の増殖分化機構やその調節機構をさらに明らかにするための有用な実験系であり、この分野の発展に寄与するものとして高く評価される。よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

2011 年 2 月

主査	早稲田大学教授	理学博士	(早稲田大学)	筒井	和義
	早稲田大学教授	理学博士	(早稲田大学)	並木	秀男
	早稲田大学教授	博士(理学)	早稲田大学	加藤	尚志