

氏名	たか くら のぶ ゆき 高 倉 伸 幸
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 1878 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Preferential proliferation of murine colony-forming units in culture in a chemically defined condition with a macrophage colony-stimulation factor-negative stromal cell clone (M-CSF 産生能を欠くストロマ細胞株 OP9 上での無血清培養による骨髓前駆細胞の選択的増殖)
論文調査委員	(主 査) 教 授 桂 義 元 教 授 伊 藤 和 彦 教 授 西 川 伸 一

論 文 内 容 の 要 旨

(目的と方法) Dexter, Whitlock & Witte により開発された培養法により, 骨髓細胞の長期培養が可能となり, 血液細胞の増殖分化の機構を *in vitro* で解析可能となった。その結果, 血液幹細胞から各種細胞系列への分化, 増殖のシグナルはストロマ細胞が産生する各種サイトカイン, 接着因子がその主役を担っていることが次第に明らかにされてきた。しかし従来の長期骨髓培養法ではいずれも血清の使用を必須としており, 増殖分化を外来液性因子によるシグナル伝達として捉える場合に幾つかの欠点がある。つまり血清成分には血液細胞の分化を制御すると考えられる未知な因子が過剰に含まれていること, まして, 増殖に負の働きをする分子の含有も示唆されており, サイトカインなどの生物活性を解析する際に, 選択される血清のロット間でデータのばらつきを生じる可能性が高い。その問題を克服する目的で無血清培地による長期骨髓培養法を開発した。使用した無血清培地 (mSFO2) の組成としては RPMI-1640/DMEM/F-12 をベースにしており, 蛋白成分としてはトランスフェリン, インシュリンを含むのみでアルブミンは含まない。また本培地は B 細胞系の増殖分化に関わる 2-ME も含有しない。現在のところ骨髓細胞を長期に培養維持するためにストロマ細胞が必要であるが, 今回 M-CSF 産生能を欠く *op/op* マウス由来のストロマ細胞, OP9 を従用した。通常のストロマ細胞は M-CSF を産生するため, 培養中の骨髓細胞はマクロファージ ($M\phi$) への分化増殖を促進させられる。 $M\phi$ はストロマ細胞に対し直接的な障害をもたらす培養系を破壊させるだけでなく, 種々のサイトカインを分泌し血液細胞を分化させる。分化した血液細胞は長期には生存不可能で, 最終的には $M\phi$ のみが培養下に残存するという結果に至る。その点 OP9 を使用することで, 少なくとも $M\phi$ の優勢な増殖は抑制され, 骨髓細胞はさらに長期に培養可能となると考えられた。OP9 は mSFO2 培地のみでは生存不可能であったが, bFGF, EGF の添加により OP9 の長期維持が可能となった。そこで mSFO2 培地下 bFGF, 或いは EGF で刺激した OP9 上にストロマ及び接着細胞を除去した骨髓細胞を 10^5 個の *stem cell factor/kit ligand* (SCF/KL)

を添加し培養した。

(結果と考察) bFGFによって刺激した OP9 上で増殖する骨髄細胞は、血清を含む培地下 OP9 上で増殖する細胞の表現型とほぼ一致し、 $\text{Mac-1}^+\text{c-Kit}^-$ の分化した骨髄球系の細胞が優勢で、 c-Kit^+ の未分化な細胞はごく一部に過ぎなかった。しかし EGF で刺激した OP9 上で増殖する骨髄細胞の大半は $\text{Mac-1}^{\text{dull}}\text{c-Kit}^+$ で、形態的にも未分化な細胞の選択的な増幅であることが認められた。これらの表現型をさらに詳しく解析すると、CD4, CD8, TER119, B220 等のいわゆる lineage marker はすべて陰性であり、また Thy-1^{lo} , IL-7R^- , c-Fms^- , $\text{IL2R}\gamma^+$, $\text{common}\beta^+$, gp130^+ であった。これらの細胞は、IL-3, Epo を含むメチルセルロースの半固形培地上で約半数がコロニーを形成し、致死量放射線照射したマウスにおける脾コロニー形成率は、CFU-S day 8, day 12 でそれぞれ約 1%, 0.5% であった。つまりこれら $\text{Mac-1}^{\text{dull}}\text{c-Kit}^+$ 細胞は、Weissman らのいう骨髄前駆細胞に一致することが示された。次に、本培養で増殖する骨髄前駆細胞と EGF との直接的な結合が認められないことから、この前駆細胞の選択的な増殖には EGF の刺激により OP9 を介した何らかの分子の存在が推測された。そこで OP9 に細胞質領域に恒常的リン酸化部位を持つ v-erbB2 を導入し、EGF の非存在下でも無血清培地下で生存可能な OP9 の subline (OP9/erbB2) を作成した。erbB2 は EGF の直接のレセプターではないが、リガンドである HRG/NDF が erbB2 に結合すると EGFR もリン酸化されることが報告されている。そこで OP9/erbB2 をストロマ細胞として使用し、mSFO2 培地下 SCF の添加のみ行い骨髄細胞を培養したところ、OP9 を EGF で刺激した際と同様の前駆細胞の選択的な増殖が認められた。以上のことから EGF は前駆細胞に対し直接的に作用するのではなく、OP9 から何らかの分子の産生誘導に作用しているものと考えられた。今回開発した培養法は骨髄移植における ex vivo での血液幹細胞の増幅に貢献することが期待される他、同一のストロマ細胞を使用してもそれらを刺激する成長因子によって異なる培養系が展開されることから、感染、担癌、アレルギーなどの際の骨髄におけるサイトカインを介した免疫応答のメカニズムはこのような無血清培養によってさらに詳細に解析可能となると考えられた。

論文審査の結果の要旨

従来の長期骨髄培養法では血清の使用を必須としており、増殖因子などの生物活性を解析する際、選択される血清のロット間でデータのばらつきを生じる可能性が高い。その問題を克服する目的で無血清培地 (mSFO2) による長期骨髄培養法を開発した。M ϕ の増殖を抑制する為、M-CSF 産生能を欠く op/op マウス由来のストロマ細胞、OP9 を使用した。OP9 の生存には、bFGF, EGF が有効であった。mSFO2 培地下 bFGF, 或いは EGF で刺激した OP9 上に骨髄細胞をのせ SCF を添加し培養した。bFGF で刺激した OP9 上では、分化した骨髄球系細胞の増殖が優勢であったが、EGF で刺激した OP9 上では、骨髄前駆細胞 (CD4^- , CD8^- , TER119^- , B220^- , $\text{Mac-1}^{\text{dull}}\text{c-Kit}^+$) の選択的な増殖を認めた。これらの細胞は、IL-3, Epo を含む半固形培地上で約 50% がコロニーを形成し、脾コロニー形成率は、CFU-S day 8, day 12 でそれぞれ約 1%, 0.5% であった。本培養で増殖する前駆細胞と EGF との直接的な結合は認めず、前駆細胞の選択的な増殖には OP9 を介した何らかの分子の存在が推測された。これは OP9 に v-erbB2 を導入し、EGF の非存在下でも生存可能な OP9 の subline (OP9/erbB2) 上でも上記と同様の

前駆細胞の選択的な増殖が認められることから間接的に証明された。

以上の研究は骨髄移植における *ex vivo* での血液幹細胞の増幅に貢献することが期待される他、本培養法は感染、担癌、アレルギーなどの際の骨髄におけるサイトカインを介した免疫応答のメカニズムの解析に有用と考えられた。

従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成9年1月24日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。