
ヒト巨核球造血の調節機序に関する
基礎的ならびに臨床的研究

<研究課題番号> 01480302

平成2年度科学研究費補助金（一般研究B）

研究成果報告書

平成3年3月

研究代表者 溝 口 秀 昭

（東京女子医科大学医学部教授）

課題番号 01480302

研究課題 ヒト巨核球造血の調節機序に関する基礎的ならびに臨床的研究

研究組織 研究代表者 溝口秀昭 (東京女子医科大学医学部教授)
研究分担者 押味和夫 (東京女子医科大学医学部助教授)
山田 修 (東京女子医科大学医学部助手)
寺村正尚 (東京女子医科大学医学部助手)

研究経費	平成元年度	2,300千円
	平成2年度	1,000千円
	計	3,300千円

研究発表

1. 学会誌等

1. Motoji T, Takanashi M, Fuchinoue M, Masuda M, Oshimi K, Mizoguchi H: Effet of recombinant GM-CSF and recombinant G-CSF on colony formation of blast progenitors in acute myeloblastic leukemia. *Exp Hematol* 17:56-60, 1989
2. Masuda M, Takanashi M, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H: Effect of recombinant interferons on hairy cell leukemia progenitors. *Int J Cell Cloning* 7:120-128, 1989
3. Hoshino S, Teramura M, Takahashi M, Motoji T, Oshimi K, Ueda M, Mizoguchi H: Expression and characterization of erythro-poietin receptors on normal human bone marrow cells. *Int J Cell Cloning* 7:156-167, 1989
4. Sato T, Fuse A, Eguchi M, Hayashi Y, Ryo R, Adachi M, Kishimoto Y, Teramura M, Mizoguchi H, Shima Y, Komori I, Sunami S, Okimoto Y, Nakajima H: Establishment of a human leukaemic cell line (CMK) with megakaryocytic characteristics from a Down's syndrome patient with acute megakaryoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 72:184-190, 1989

5. 寺村正尚、横田仁子、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭、岡田美智子：
t(7;14)(q15;q32)の染色体異常を認めた悪性リンパ腫の1例。 免疫薬理
7:455-458、1989
6. 菊池りか、山下典子、肥田野信、溝口秀昭：成人に発症した全身性肥満細
胞症の1例。 皮膚科の臨床 31:829-830,929-934、1989
7. Teramura M, Katahira J, Hoshino S, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi
H: Effect of recombinant hemopoietic growth factors on human
megakaryocyte colony formation in serum free cultures.
Exp Hematol 17:1011-1016, 1989
8. 屋代庫人、長廻紘、田中俊夫、佐藤秀一、斎藤博、押味和夫、溝口秀昭、
丸山正隆：急性GVHD (graft-versus-host-disease)の腸病変の1例。
胃と腸 24:1137-1143、1989
9. Mori N, Yokota J, Oshimura M, Cavenee WK, Mizoguchi H, Noguchi M,
Shimosato Y, Sugimura T, Terada M: Concordant deletions of chromo-
some 3p and loss of heterozygosity for chromosomes 13 and 17 in
small cell lung carcinoma. Cancer Res 49:5130-5135, 1989
10. Motoji T, Teramura M, Takahashi M, Oshimi K, Okada M, Kusakabe
K, Mizoguchi H: Successful treatment of refractory anemia with

high-dose methylprednisolone. Am J Hematol 33:8-12, 1990

11. Oshimi K, Shinkai Y, Okumura K, Oshimi Y, Mizoguchi H:
Perforin gene expression in granular lymphocyte proliferative disorders. Blood 75:704-708, 1990

12. Motoji T, Okada M, Takanashi M, Masuda M, Tanaka K, Oshimi K, Mizoguchi H: Induction of eosinophilic colonies by interleukin-5 on acute myeloblastic leukaemic cells. Br J Haematol 74:169-172, 1990

13. Kaneko T, Ogawa Y, Hirata Y, Hoshino S, Takahashi M, Oshimi K, Mizoguchi H: Agranulocytosis associated with granular lymphocyte leukaemia: Improvement of peripheral blood granulocyte count with human recombinant granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). Br J Haematol 74:121-122, 1990

14. Mizoguchi M, Kawa Y, Minami T, Nakayama H, Mizoguchi H: Cutaneous extramedullary hematopoiesis in myelofibrosis. J Am Acad Dermatol 22:351-355, 1990

15. Takahashi M, Oshimi K, Mizoguchi H: Inhibition of human granulocyte-macrophage colony formation by interleukin 2-treated lymphocytes is mediated by interferon γ and tumor necrosis factor α .

16. Oshimi K, Oshimi Y, Yamada O, Wada M, Hara T, Mizoguchi H:
Cytotoxic T lymphocyte triggering via CD16 is regulated by CD3 and
CD8 antigens: Studies with T cell receptor (TCR)- $\alpha\beta^+$ /CD3⁺16⁺ and
TCR- $\gamma\delta^+$ /CD3⁺16⁺ granular lymphocytes. J Immunol 144:3312-3317,
1990

17. Masuda M, Hoshino S, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H: Effects of
various cytokines on proliferation of acute lymphoblastic leukemia
cells. Leukemia Res. 14:533-543, 1990

18. 泉二登志子、高梨美乃子、増田道彦、瀧之上真澄、押味和夫、溝口秀昭：
急性骨髄性白血病細胞に対する各種コロニー形成刺激因子の作用。東京女
子医科大学雑誌 60:556-563, 1990

19. Teramura M, Mizoguchi H: The effect of cytokines on the ploidy
of megakaryocytes. Int J Cell Cloning 8:245-252, 1990

20. Motoji T, Hoshino S, Ueda M, Takanashi M, Masuda M, Nakayama K,
Oshimi K, Mizoguchi H: Enhanced growth of clonogenic cells from
acute myeloblastic leukaemia by erythropoietin. Br J Haematol
75:60-67, 1990

21. Hoshino S, Oshimi K, Tsudo M, Miyasaka M, Teramura M, Masuda M, Motoji T, Mizoguchi H: Flow cytometric analysis of expression of interleukin-2 receptor β chain (p70-75) on various leukemic cells. Blood 76:767-774, 1990
22. Takanashi M, Motoji T, Masuda M, Oshimi K, Mizoguchi H: A new serum-free culture system for leukemic colony assay. Exp Hematol 18:868-872, 1990
23. Masuda M, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H: Effects of interleukin-7 on proliferation of hematopoietic malignant cells. Exp Hematol 18:965-967, 1990
24. Saito H, Oshimi K, Nagasawa K, Yashiro K, Tanaka T, Toyoda C, Mizoguchi H: Endoscopic appearance of the colon and small intestine of a patient with hemorrhagic enteric graft-vs.-host disease. Disease of The Colon & Rectum 33:695-697, 1990
25. Motoji T, Takanashi M, Masuda M, Nakayama K, Oshimi K, Mizoguchi H: Colony stimulating activities of GM-CSF, G-CSF and IL-3 on blast progenitors from acute myeloblastic leukemia. Leukemia and Lymphoma 2:407-414, 1990
26. Sameshima Y, Akiyama T, Mori N, Mizoguchi H, Toyoshima K,

- Sugimura T, Terada M, Yokota J: Point mutation of the p53 gene resulting in splicing inhibition on small cell lung carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 173:697-703, 1990
27. Mori N, Yokota J, Akiyama T, Sameshima Y, Okamoto A, Mizoguchi H, Toyoshima K, Sugimura T, Terada M: Variable mutations of the RB gene in small-cell lung carcinoma. Oncogene 5:1713-1717, 1990
28. Motoji T, Watanabe M, Uzumaki H, Kusaka M, Fukamachi H, Shimosaka A, Oshimi K, Mizoguchi H: Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptors on acute myeloblastic leukaemia cells and their relationship with the proliferative response to G-CSF in clonogenic assay. Br J Haematol 77:54-59, 1991
29. 丹波さ織、高山幹子、石井哲夫、溝口秀昭：難聴、顔面神経麻痺を伴った急性骨髄性白血病の2症例。耳鼻咽喉科・頭頸部外科 63:67-71、1991
30. Saito H, Oshimi K, Akahoshi M, Yamauchi K, Yamada O, Mizoguchi H: Contrasuppressor T cell leukemia: Clonal proliferation of contrasuppressor T cells in a patient with granular lymphocyte-proliferative disorder. Br J Haematol in press

2. 口頭発表

1. 寺村正尚、片平順一、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：無巨核球性血小板減少症における細胞性免疫の関与について． 第86回日本内科学会講演会、1989
2. 溝口秀昭：宿題講演 造血と免疫系． 第51回日本血液学会総会、1989
3. 増田道彦、星野茂、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：各種サイトカインの急性リンパ性白血病細胞の増殖能に与える影響． 第51回日本血液学会総会、1989
4. 高梨美乃子、泉二登志子、増田道彦、押味和夫、溝口秀昭：白血病細胞コロニー法における無血清培養法の検討． 第51回日本血液学会総会、1989
5. 宮坂昌之、長坂安彦、押味和夫、溝口秀昭、通堂満：正常人顆粒リンパ球(GL)および顆粒リンパ球増多症(GLPD)におけるIL-2受容体 β 鎖の発現． 第51回日本血液学会総会、1989
6. 柴原直利、野崎修、斎藤康栄、佐藤重明、平沢晃、王伯銘、張ヶ谷健一、寺村正尚、溝口秀昭：赤芽球系の低形成を合併した周期性血小板減少症の1例． 第51回日本血液学会総会、1989
7. 杉本耕一、中島紀子、天野正道、戸川敦、宮園浩平、高久史磨、溝口秀昭、

- 兵頭行夫：周期性好中球減少症に対するrhG-CSF投与の試み． 第51回日本血液学会総会、1989
8. 押味和夫、溝口秀昭：T細胞レセプター γ/δ 鎖、MHC非拘束性キラー活性を有する顆粒リンパ球性白血病． 第17回日本臨床免疫学会総会、1989
9. 北村聖、高久史麿、押味和夫、溝口秀昭、真貝洋一、奥村康：顆粒リンパ球増多症におけるperforin RNAの発現． 第17回日本臨床免疫学会総会、1989
10. Mizoguchi H, Motoji T, Oshimi K, Teramura M: Cell-mediated suppression of megakaryocytic progenitors in acquired amegakaryocytic thrombocytopenic purpura. 18th International Society for Experimental Hematology Meeting, 1989
11. Teramura M, Katahira J, Hoshino S, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H: Effect of recombinant hemopoietic growth factors on human megakaryocyte colony formation in serum-free cultures. Third International Conference on Megakaryocytes "Megakaryocytes: Cellular and Molecular Biology", 1989
12. 押味和夫、溝口秀昭、原寿郎： γ/δ T細胞クローンのキラー活性におけるCD3分子の抑制作用． 第31回日本臨床血液学会総会、1989

13. 泉二登志子、高梨美乃子、増田道彦、押味和夫、溝口秀昭：白血病性幹細胞の増殖因子に関する研究 — インターロイキン4及びインターロイキン5の作用 — 第31回日本臨床血液学会総会、1989
14. 高橋正知、押味和夫、溝口秀昭：顆粒リンパ球増多症に合併する赤芽球癆におけるシクロスポリンの有効性に関する *in vitro*での検討 第31回日本臨床血液学会総会、1989
15. 赤星雅、押味和夫、溝口秀昭、原寿郎： $\gamma\delta$ T細胞クローンの微細構造と *emperipolesis*. 第31回日本臨床血液学会総会、1989
16. 増田道彦、鮫島勇一、和田真紀夫、斎藤博、寺村正尚、星野茂、赤星雅、山田修、高橋正知、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：悪性リンパ腫に対するMACOP-B療法の効果. 第31回日本臨床血液学会総会、1989
17. 星野茂、押味和夫、寺村正尚、増田道彦、泉二登志子、溝口秀昭、通堂満、宮坂昌之：各種白血病細胞におけるIL-2レセプター β 鎖(p75)の発現. 第31回日本臨床血液学会総会、1989
18. 寺村正尚、鮫島勇一、三浦健寿、星野茂、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：各種造血因子のヒト巨核球ploidyに与える影響. 第31回日本臨床血液学会総会、1989
19. 鮫島勇一、寺村正尚、三浦健寿、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：骨髓

- 異形成症候群および悪性貧血患者における骨髓巨核球核DNA量の検討． 第31回日本臨床血液学会総会、1989
20. 川内喜代隆、安山雅子、鈴木真美、森治樹、渡辺晴雄、杉山始、押味和夫、溝口秀昭：多発性骨髓腫および形質細胞性白血病におけるVAD療法の効果． 第31回日本臨床血液学会総会、1989
21. 竹田津文俊、宮園浩平、高久史麿、押味和夫、溝口秀昭：再生不良性貧血および純赤芽球癆患者におけるTGF- β 活性の変動． 第31回日本臨床血液学会総会、1989
22. 押味和夫、真貝洋一、奥村康、溝口秀昭：顆粒リンパ球性白血病におけるキラー活性とperforin mRNAレベルとの相関． 第48回日本癌学会総会、1989
23. 長坂安彦、宮坂昌之、押味和夫、溝口秀昭、通堂満：Leu19⁺細胞、TCR γ / δ ⁺細胞をはじめとする各リンパ球亜群および顆粒球、単球におけるIL-2R β 鎖の発現． 第48回日本癌学会総会、1989
24. 溝口秀昭：血小板産生の調節． 第87回日本内科学会総会、1990
25. 押味和夫、溝口秀昭：正常成人末梢血より得られたCD4⁺ γ δ T細胞クローン． 第52回日本血液学会総会、1990

26. 泉二登志子、星野茂、高梨美乃子、増田道彦、押味和夫、溝口秀昭、上田正次：白血病性幹細胞の増殖因子に関する研究 — エリスロポエチンの作用について — 第52回日本血液学会総会、1990
27. 増田道彦、星野茂、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：リンパ系悪性細胞の増殖に及ぼすインターロイキン7の作用。 第52回日本血液学会総会、1990
28. 星野茂、押味和夫：顆粒リンパ球性白血球細胞の増殖機転。 第52回日本血液学会総会、1990
29. 寺村正尚、三浦健寿、星野茂、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：各種造血因子のヒト巨核球産生に与える影響。 第52回日本血液学会総会、1990
30. 三浦健寿、寺村正尚、溝口秀昭、佐藤武幸：TNF- α による巨核芽球細胞株(CMK)の増殖促進。 第52回日本血液学会総会、1990
31. Oshimi K, Seto T, Inagawa S, Mizoguchi H: Anti-CD3 and anti-CD10 bispecific monoclonal antibody induces T-cell clone-mediated cytolytic activity against CD10-positive leukemic cells. 2nd Japan-China Symposium on Hematology under The Cooperation of Two Societies, 1990
32. Motoji T, Hoshino S, Ueda M, Takanashi M, Masuda M, Oshimi K,

- Mizoguchi H: Colony enhancing activity of erythropoietin on acute myeloblastic leukemia progenitor cells. 2nd Japan-China Symposium on Hematology under The Cooperation of Two Societies, 1990
33. Mizoguchi H, Masuad M, Motoji T, Oshimi K: Effect of interleukin-7 on hematopoietic malignant cells. 19th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology Meeting, 1990
34. Motoji T, Hoshino S, ueda M, Takanashi M, Masuda M, Nakayama K, Oshimi K, Mizouguchi H: Enhanced growth of clonogenic cells from acute myeloblastic leukemia by erythropoietin. 19th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology Meeting, 1990
35. 押味和夫、溝口秀昭、勢藤隆：キターT細胞とbispecific抗体の併用による特異的白血病細胞障害作用。第32回日本臨床血液学会総会、1990
36. 泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭、渡辺正彦、渦巻浩也、日下多、深町弘見：白血病細胞における顆粒球コロニー形成刺激因子受容体の検索とコロニー形成能。第32回日本臨床血液学会総会、1990
37. 高橋正知、押味和夫、溝口秀昭：再生不良性貧血および赤芽球癆におけるシクロスポリリンAの幹細胞に対する影響。第32回日本臨床血液学会総会、1990

38. 赤星雅、増田道彦、押味和夫、溝口秀昭：CD7⁺4⁻8⁻急性白血病の電顕細胞化学による酸性ホスファターゼ．第32回日本臨床血液学会総会、1990
39. 山田修、泉二登志子、高橋正知、押味和夫、溝口秀昭：シクロホスファミド投与により貧血が改善し、TCR遺伝子再構成を認めなくなった赤芽球癆を伴う顆粒リンパ球増多症の一例．第32回日本臨床血液学会総会、1990
40. 増田道彦、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：各種サイトカインのT細胞系急性リンパ性白血病細胞増殖に与える影響．第32回日本臨床血液学会総会、1990
41. 星野茂、押味和夫、寺村正尚、溝口秀昭：顆粒リンパ球増多症細胞のCD16を介した増殖機構．第32回日本臨床血液学会総会、1990
42. 寺村正尚、小林祥子、三浦健寿、星野茂、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：各種造血因子のヒト巨核球産生に与える影響（続報）．第32回日本臨床血液学会総会、1990
43. 斎藤博、森直樹、小林祥子、和田真紀夫、寺村正尚、星野茂、増田道彦、赤星雅、山田修、高橋正知、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：急性リンパ性白血病、悪性リンパ腫に対するL17M療法．第32回日本臨床血液学会総会、1990

44. Oshimi K, Seto T, Mizoguchi H: Specific lysis of patient CD10-
positive leukemic cells by T cells coated with anti-CD3 Fab'
antibody cross-linked to anti-CD10 Fab' antibody.

The International Society of Hematology 23rd Congress, 1990

研究成果

以下のとおり

研究目的

赤血球の産生を調節する因子としてエリスロポエチン(EPO)、顆粒球系細胞の産生を調節する因子として、GM-CSF、G-CSF、M-CSFなどが明らかになった。しかし、巨核球・血小板産生を調節する因子は未だ明らかでない。

それを明らかにする方法の一つとして、巨核球コロニー法を用いる方法がある。コロニーの基になる細胞は巨核球コロニー形成細胞(megakaryocyte colony-forming units、CFU-Meg)と呼ばれ、巨核球系幹細胞と考えられている。このような巨核球コロニー法を用いて巨核球コロニー形成に必要な因子として2種類あることが明らかになった。1つは巨核球コロニー刺激因子(megakaryocyte colony-stimulating factor、Meg-CSF)であり、他の1つは単独添加では巨核球コロニーは形成させないが、Meg-CSFと共に加えるとコロニー数を増やし、巨核球のploidyを増し、巨核球の成熟を促す巨核球増幅因子(megakaryocyte potentiator、Meg-POT)の存在が考えられている。また、血小板産生の刺激因子と考えられるトロンボポエチンはin vitroではMeg-POTとして作用する可能性があると考えられる。

我々は最近、ヒト巨核球コロニーの無血清培養法を開発し、ヒトにおいてIL-3とGM-CSFがMeg-CSFとして作用することを明らかにした。さらに、巨核球のploidyの測定も可能になった。一方で、種々の造血因子やサイトカインが純化されている。本研究の一つの大きな目的はそれらのうちにMeg-POTとして

作用するもの、つまりトロンボポエチンである可能性のあるものがそれらの中にあるかどうかを本培養系を用いて明らかにすることである。さらに、ヒト巨核芽球性白血病の細胞株であるCMKを用い、その増殖を刺激する活性がそれらの造血因子、あるいはサイトカインにあるかどうかを明らかにすることを目的としている。さらに、血小板減少患者の尿中にCMKの増殖を刺激する因子があるかどうか、あるとすれば既知の造血因子あるいはサイトカインとの異同を明らかにすることを目的とした。さらに、本培養系を用いて巨核球系幹細胞のサイトカインに対する反応性を検討したり、患者血漿中のサイトカインの測定を行うことで、種々の血小板増加症あるいは減少症の病態を明らかにすることを目的とした。

研究方法

1. 造血因子あるいはサイトカインの巨核球・血小板産生に与える影響

(1) 巨核球コロニー形成に与える造血因子あるいはサイトカインの影響

ヒト巨核球コロニー無血清培養法を用い、種々造血因子あるいはサイトカインの巨核球造血に与える影響を検討した。方法を簡単に述べるとヒト骨髓細胞を骨髓穿刺で採取し、フィコールコンレーによる比重遠心法で単核細胞を分離し、さらに付着細胞とT細胞を除去し、非付着非T細胞を採取した。その細胞 $1\sim 2\times 10^5$ 個を、1%ウシ血清アルブミン、 $200\mu\text{g/ml}$ のトランスフェリン、 $2\times 10^{-5}\text{M}$ の2メルカプトエタノール(2-ME)、種々の造血因子あるいはサイトカインを含むASF101培養液に浮遊させ、0.3%の寒天に埋め込み培養した。培養

器は酸素濃度と炭酸ガス濃度の両方をコントロールできる培養器を用い、酸素濃度5%、炭酸ガス濃度5%に調節し、通常14日間培養した。培養終了後、寒天を乾燥させ、血小板糖蛋白IIb/IIIaを同定するモノクロナル抗体であるP-2を添加し、その反応陽性細胞をAPAAP(alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase)法で同定し巨核球とした。3個以上の巨核球の集塊を巨核球コロニーとして算定した。標準のMeg-CSFとしてヒト組換え型インターロイキン3(rIL-3)を用いた。

検討した造血因子あるいはサイトカインは、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、EPO、IL-1、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、stem cell factor (SCF)である。それらの単独の効果からMeg-CSF活性の有無を検討し、IL-3と組み合わせで投与しその効果からMeg-POT活性を検討した。いずれも遺伝子組み換え型のものである。

(2)巨核球コロニー構成細胞のploidyの検討

巨核球コロニーを無血清で培養後、APAAP法で巨核球を染色し、さらにDAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindol)染色でDNAを染色した。APAAP法で巨核球と同定された細胞の核DNA量を顕微蛍光側光装置で測定した。

(3)ヒト巨核芽球性白血病株細胞に対する種々造血因子、サイトカインおよび血小板減少症患者尿の作用

佐藤らと共に我々が樹立した急性巨核芽球性白血病株細胞(CMK)(Br J Haematol)を用い、それに対する種々造血因子あるいはサイトカインの影響を検討し、正常巨核球系幹細胞に対するそれと比較した。CMK細胞 10^5 個に種々の造血因子あるいはサイトカインを加え、48時間培養し、培養終了4時間前に

1 μ Ciの³H標識チミジンを加え培養終了後細胞への取り込みを測定した。

血小板減少を伴う一人の患者(SY)の尿に巨核球・血小板産生に關与する物質の有無を検討する目的で、患者尿を硫酸分画を行って(図1)CMKに加え、その増殖を刺激する活性の有無を上述の³H標識チミジンの取り込みの測定にて検討した。

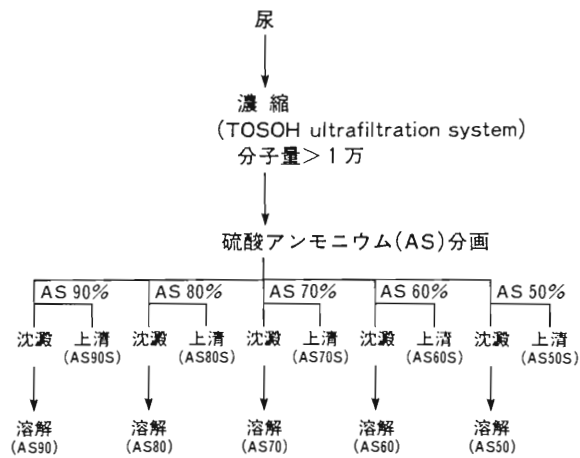


図1.血小板減少患者尿の部分精製法

2. 血小板減少症あるいは血小板増加症患者血漿のIL-6濃度

血小板減少のある再生不良性貧血患者、不応性貧血患者、血小板増加のある真正赤血球増加症患者、本態性血小板血症患者、高 γ グロブリン血症のある多発性骨髄腫患者および免疫芽球性リンパ節腫症患者からヘパリンを加えて採血した。それから血漿を分離し、IL-6活性をELISA法を用いて測定した。

3. 骨髄増殖性疾患における巨核球系幹細胞の性状の検討

8例の慢性骨髄増殖性疾患患者の末梢血をヘパリンを加えて採取し、フィコール・コンレイを用いた密度勾配遠心法で単核細胞を採取する。患者は2例の慢性骨髄性白血病(CML)、5例の本態性血小板血症(ET)、1例の本態性骨髄線維症(MF)である。単核細胞から非付着性細胞を採取し、前述のヒト巨核球コロニー培養法で培養する。刺激因子として、種々の濃度のIL-3を添加した。対照として、正常ヒト末梢血から非付着性細胞を培養したものをを用いた。

4. トロンボポエチン遺伝子が局在すると考えられる3番遺伝子長腕の解析

血小板増加を示す種々の骨髄増殖性疾患で、下記の検索を行った。つまり、患者末梢血または骨髄液より、フィコール・コンレイ比重遠心法を用いて単核細胞を単離して、パルスフィールドゲル電気泳動で巨大DNAレベルでの染色体異常を検索した。染色体3qの異常を伴うMDSの症例を含んでいる。用いるプローブは種々の染色体上に位置するマーカーDNAで、染色体3q上に位置するいくつかのプローブ(トランスフェリン遺伝子、ソマトスタチン遺伝子)を含めた。

結果および考察

1. 造血因子あるいはサイトカインの巨核球・血小板産生に与える影響

(1) 巨核球コロニー形成、コロニー中の巨核球数、および構成巨核球のploidyに与える造血因子あるいはサイトカインの影響

これまで我々はIL-3とGM-CSFにMeg-CSF活性のあること、EPOとM-CSFにMeg-POT活性があることを報告した。今回はそれ以外のサイトカインの巨核球コロニー形成に与える影響を検討した。

①IL-6の作用

IL-6を1 ng/ml～100 ng/ml単独で添加しても巨核球コロニーは形成されなかった。次に、IL-6をIL-3と共に添加し培養すると、巨核球コロニー数、コロニーサイズについては、有意な変化は認められなかったが、ploidyの増加が認められた(図2、3、4)。以上より、IL-6はMeg-CSF活性はないが、Meg-POT活性を有すると考えられる。マウスではIL-6がMeg-CSF活性を有するとする報告と、Meg-POT活性を有するとする報告があり定まっていない。ヒトにおいてもLongらはIL-6は単独で加えてもIL-3と共に加えても巨核球コロニーは増加しないと報告している。また、Brunoは無処置の骨髄単核細胞をIL-6と共に培養すると巨核球コロニーを形成するが、付着細胞とT細胞を除去するとコロニーは形成されないことから、IL-6は付着細胞あるいはT細胞に作用し、Meg-CSFを産生させると報告している。このようにIL-6の巨核球産生に対する作用については報告者によって異なった点が多い。最近、Vainchenkerのグループは巨核球はIL-6を産生しかつIL-6のレセプターを有するのでIL-6のオー

トクラインの機構があると報告している。そのIL-6の作用でploidyも増すとのことである。このような巨核球のIL-6の産生が外から加えたIL-6の作用を分かりにくくしているのであろう。

最近、サルに注射すると血小板数が増加すると報告されたり、抗血小板抗体の注射で血小板数を減少させたマウスでは脾のIL-6のmRNAの増加と血漿中のIL-6の僅かの増加があることが報告され、トロンボポエチンである可能性がある。さらに、WilliamsらがMeg-POTとして純化していたものもMcDonaldらがTSPとして純化したものもIL-6の抗体で消失したとのことで、トロンボポエチンはIL-6である可能性がある。しかし、後で述べるように血小板減少患者の血漿中のIL-6濃度が高値でないことが合致しない。

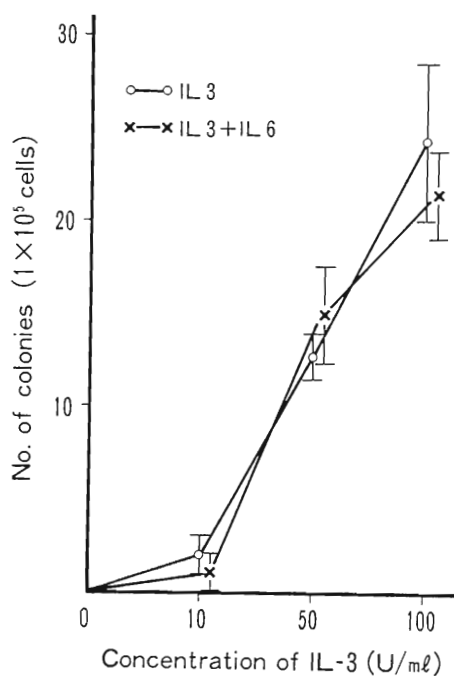


図2. IL-3とIL-6のヒト巨核球コロニー形成に与える影響

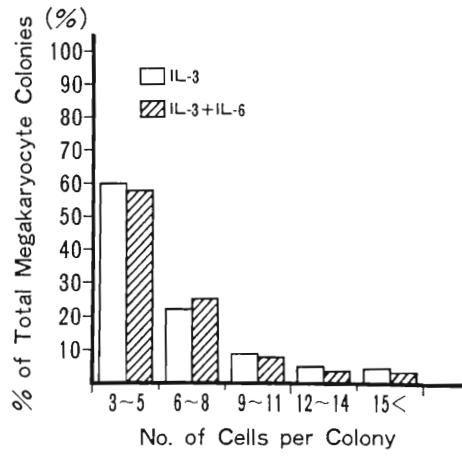


図3. IL-3とIL-6のコロニー構成巨核球数に与える影響

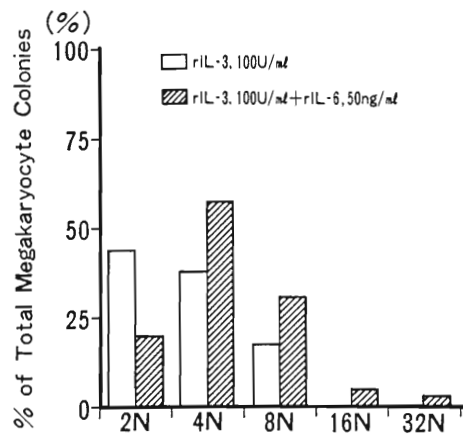


図4. IL-6添加によるコロニー構成巨核球のploidyの変化

②IL-7の作用

IL-7はpre-B細胞の増殖を指標に精製された骨髄ストローマ細胞由来の因子である。IL-7を1 U/ml \sim 5 \times 10³U/ml添加しても巨核球コロニーは全く形成されなかった。次に、IL-7を至適濃度以下(25U/ml)あるいは至適濃度(100U/ml)のIL-3と共に添加し培養するとコロニー数は増加し、コロニーサイズも増大した(図5、6)。さらに、IL-7とIL-3の同時添加で形成された巨核球のploidyの増加も認められた(図7)。

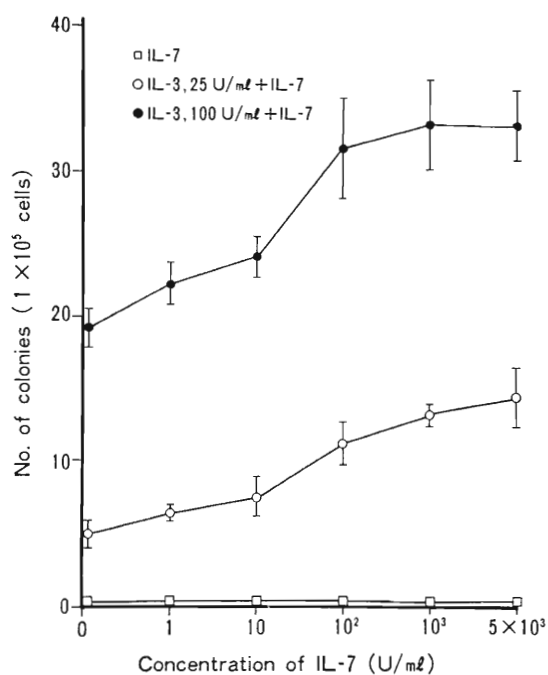


図5. IL-3とIL-7のヒト巨核球コロニー形成に与える影響

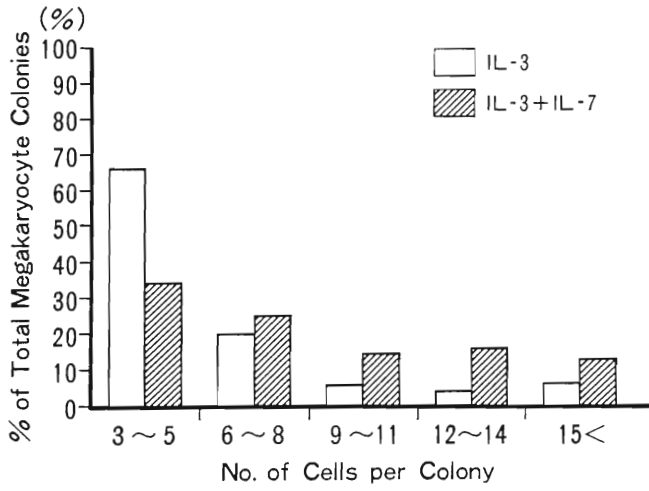


図6. IL-3とIL-6のコロニー構成巨核球数に与える影響

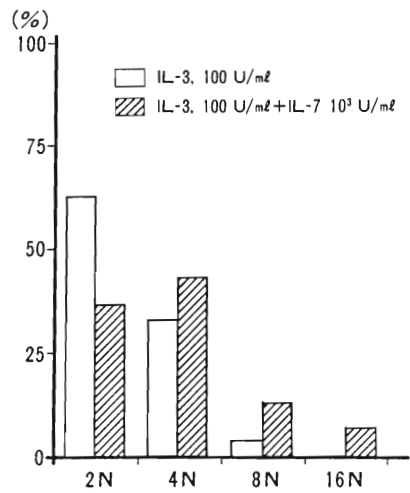


図7. IL-7添加によるコロニー構成巨核球のploidyの変化

以上より、IL-7は未熟なB細胞の増殖やT細胞の増殖に関与するだけでなく、Meg-POT活性も有すると考えられる。このIL-7の作用が直接的作用であるか否かについては確定はできないが、ヒト巨核芽球性白血病株であるEST-IUにIL-7を加えると血小板糖蛋白Ibの発現が増加すると報告もみられ、直接作用の可能性が考えられる。また、マウスの系では、Williamsらは、IL-7を骨髓細胞に加え、3日間液体培養するとAch-E陽性細胞が増加すると報告している。今後、in vivoでの血小板産生に対する影響の検討が期待される。

③IL-11の作用

IL-11はprimateの骨髓由来ストローマ細胞株よりマウスのIL-6依存性形質細胞腫株の増殖を刺激する因子としてクローニングされたものである。この因子はマウスにおいて抗体産生B細胞の増殖刺激作用を有し、さらに造血系においては単独ではマウスのマクロファージ系前駆細胞増殖刺激作用を有し、IL-3の存在下でマウス巨核球コロニー刺激作用および芽球コロニー形成を促進する作用を持つと報告されている。ヒトのIL-11もクローニングされ、我々はそれを用いて検討を行った。

IL-11を1~100 ng/ml添加し培養しても、巨核球コロニーは全く形成されなかった。次に、IL-11を至適濃度以下(25 U/ml)あるいは至適濃度(100 U/ml)のIL-3と共に添加するといずれの場合も、巨核球コロニー数は添加したIL-11濃度依存性に増加した(図8)。またIL-11とIL-3を共に加えた場合にはIL-3単独添加の場合と比べて、コロニーサイズも増大した(図9)。さらに、IL-3とIL-11の同時添加により巨核球コロニーの巨核球を構成している細胞のploidyの増加も認められた(図10)。以上より、IL-11はMeg-CSF活性はないが、Meg-POTを有すると考えられる。

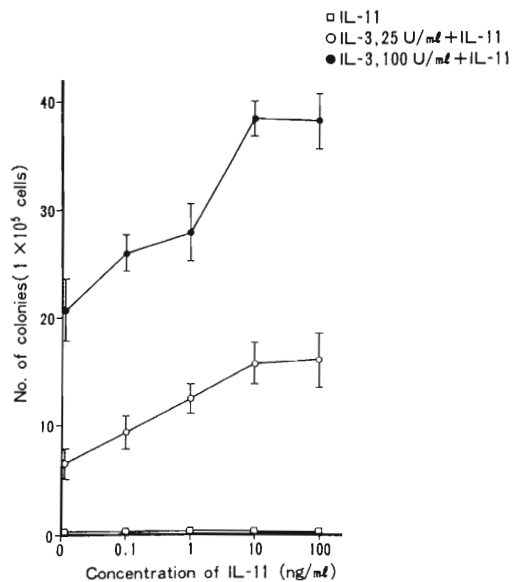


図8. IL-3とIL-11のヒト巨核球コロニー形成に与える影響

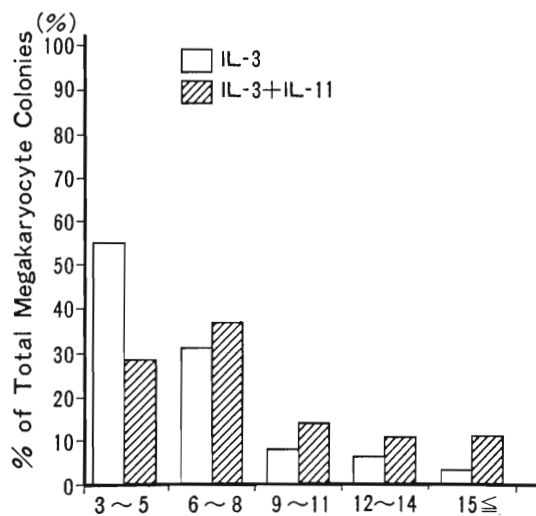


図9. IL-3とIL-11のコロニー構成巨核球数に与える影響

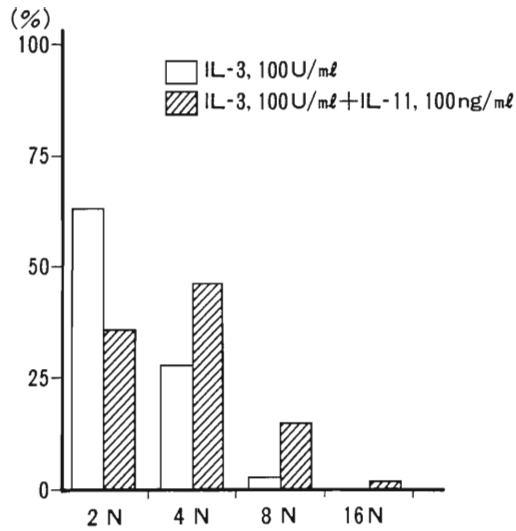


図10. IL-11添加によるコロニー構成巨核球のploidyの変化

④SCFの作用

SCFはc-kitのリガンドとして、ストローマ細胞からクローニングされた。その主な作用は多能性幹細胞の増殖、メラノサイトの移動、生殖細胞の分化に関係する。

SCF単独投与では巨核球コロニーの形成は観察されない。しかし、25 U/ml または100 U/mlのIL-3と共に添加するとIL-3単独添加の場合に比べて有意に高い巨核球コロニー形成が観察される(図11)。100 U/mlのIL-3で巨核球コロニー形成は最大となるので、SCF添加でさらにコロニー数が増加することは、SCFの作用がIL-3を介するものではないことを示している(図12)。

これらの事実はSCFにはMeg-CSF活性はないが、Meg-POT活性があることを示

している。さらに、MSFが先天的に欠損しているSteelマウスではSCFの注射で血小板数が約2倍に増加する。このことはSCFにはトロンボポエチンの活性がある可能性がある。SCFを正常サルに注射したところ僅かに血小板も増加したと報告されている。

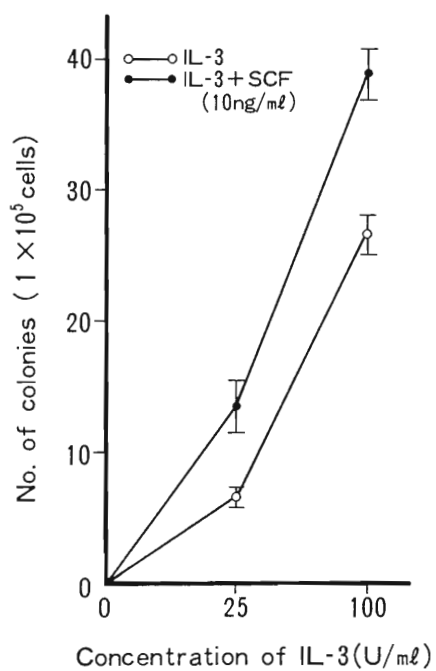


図11. IL-3とSCFのヒト巨核球コロニー形成に与える影響

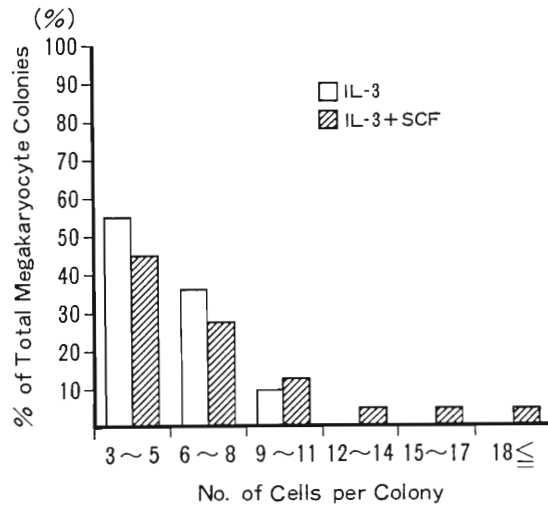


図12. IL-3とSCFのコロニー構成巨核球数に与える影響

(2)ヒト巨核芽球性白血病株細胞CMKに対する種々造血因子およびサイトカインの作用

①種々造血因子およびサイトカインの作用

これまで我々はIL-3、GM-CSFはCMKの増殖刺激作用を有し、EPOにはそのような作用はないことを報告した。今回はさらにIL-7、IL-9、IL-11、SCF、leukemia inhibitory factor (LIF)のCMKに対する影響について検討した。図に示すようにIL-6、IL-11、SCFは単独添加でもIL-3と共に添加しても用量依存性にCMKの³H-TdRの取り込みを促進する(図13、14、15)。したがって、このような造血因子あるいはサイトカインはin vivoにおいて巨核球・血小板産生を刺激する可能性がある。事実、IL-6、IL-11、SCFはいずれもin vivoに

注射し血小板が増加したという報告がある。

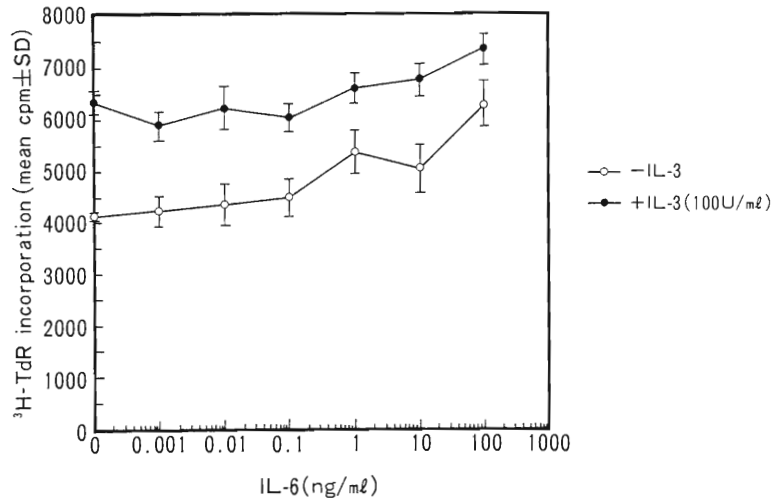


図13. IL-6およびIL-3のCMKの増殖に与える影響

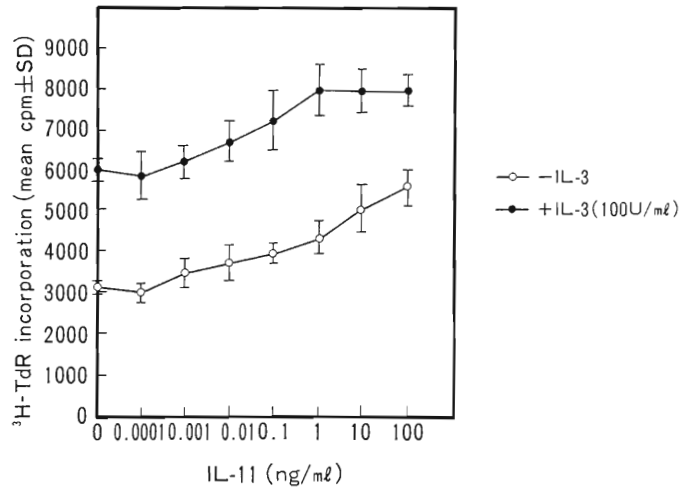


図14. IL-11およびIL-3のCMKの増殖に与える影響

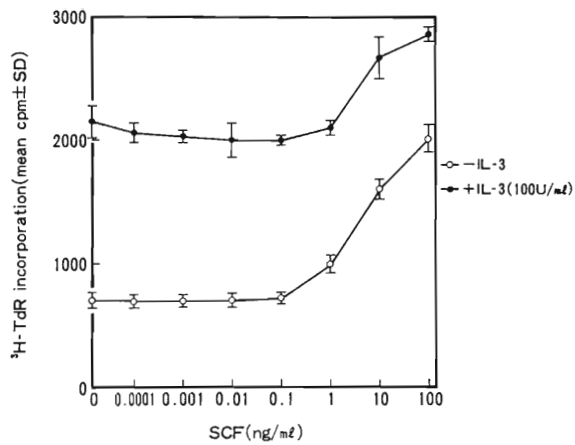


図15. SCFおよびIL-3のCMKの増殖に与える影響

なお、IL-7、IL-9、LIFにはCMKに対する増殖刺激作用は認められない（図16、17、18）。LIFについてはマウスに注射すると血小板産生を刺激すると報告されている。このようにCMKにたいする作用とin vivoの血小板産生刺激とは必ずしも一致しない。しかし、LIFのin vivoの作用が直接巨核球系幹細胞を刺激するのではなく、他の細胞を介する可能性も否定は出来ない。

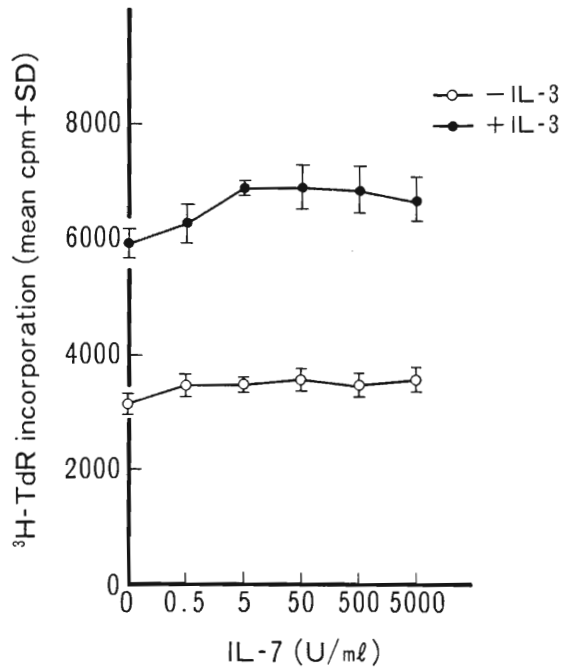


図16. IL-7のCMKの増殖に与える影響

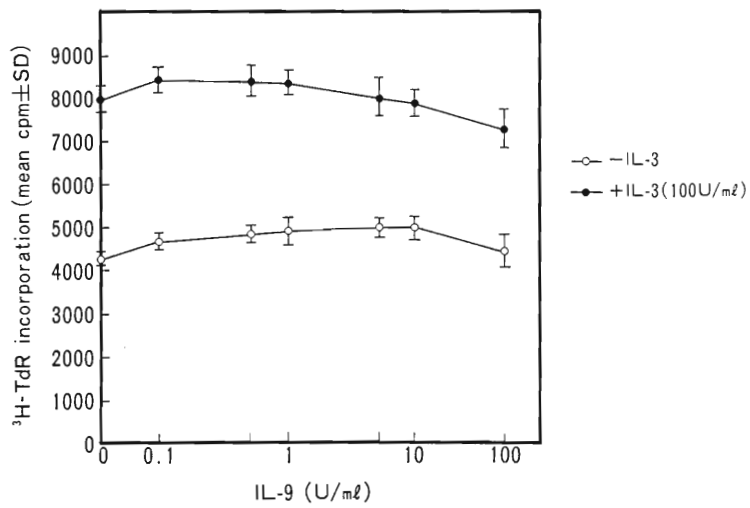


図17. IL-9およびIL-3のCMKの増殖に与える影響

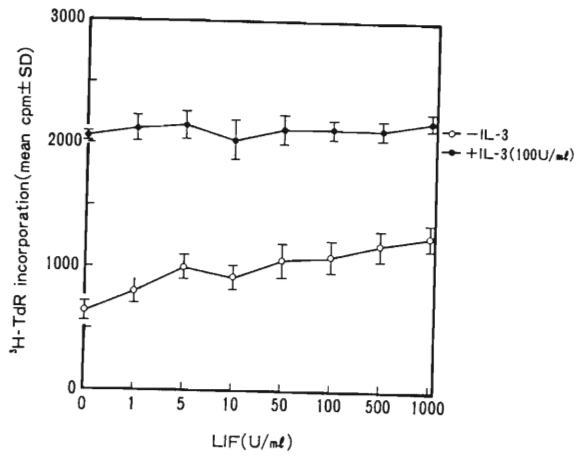


図18. LIFのCMKの増殖に与える影響

②血小板減少患者尿の作用

幼児期から周期性血小板減少症を呈し、現在は持続的に血小板減少を呈する患者(SY)の尿を種々の濃度の硫酸アンモニウムで分画し、その沈澱物と上清のCMKの増殖に与える影響を検討した(表1)。

表1に示すようにAS50、AS60、AS70にCMKの増殖を刺激する活性を認めた。それらの分画は100 U/mlのIL-3と共に添加してもさらにその増殖を促進した。

表1. 部分精製尿のCMKに対する影響

部分精製尿(10%)	³ H-TdR 取り込み(mean cpm±SD)	
	-IL-3	+IL-3(100U/ml)
—	2994±218	4771±329
AS50	7796±172	10046±435
60	7792±334	10489±558
70	6205±360	8922±331
80	4818±293	7432±252
90	1559±143	7035±300
AS50S	3846±109	5814±109
60S	3939±352	6052±282
70S	4044±251	5881±333
80S	3942±260	5851±281
90S	4011±311	5911±401

AS50についてその中に含まれる種々のサイトカインの量を測定したところ、表2に示すようであったが、CMKにこれらの濃度のサイトカインを添加しても増殖は刺激されなかった。IL-3は含まれている可能性があるが、最大刺激をする100 U/mlのIL-3と共にAS50を添加してもさらに増殖を刺激するのでIL-3以外に活性のある因子が含まれている可能性がある。EPOは1 U/ml以上含まれているが、CMKはEPOには反応しない。

表2. AS50のサイトカイン濃度

IL-1 α	< 10 pg/ml
IL-1 β	< 20 pg/ml
GM-CSF	< 100 pg/ml
IL-6	<1000 pg/ml
TNF- α	< 5 pg/ml

以上より、患者SYの尿の部分精製画分(AS50)にはCMKの増殖をもたらす新物質の存在が示唆された。そこで、現在、AS50画分をさらにQ-セファローズ（陰イオン交換）、S-セファローズ（陽イオン交換）、hydroxyapatite（吸着）などの種々のカラム操作で精製を進めている。

なおCMKの増殖を刺激することがその後判明したIL-11やSCFがあるか否かについても今後検討する予定である。

2. 血小板減少症あるいは血小板増加症患者血漿のIL-6濃度

正常人50名の血漿IL-6濃度の正常範囲は20 pg/ml以下であった。それに対し、血小板減少を伴う再生不良性貧血患者あるいは不応性貧血患者の血漿IL-6濃度は全例図19に示すように5 pg/ml以下であり、増加していた例は1例も

なかった。IL-6は我々の研究でもMeg-POT活性を有している。また、CMKの増殖も単独あるいはIL-3と共に加えても刺激する。これらのことはIL-6がトロンボポエチンである可能性を示している。さらに、IL-6をマウスあるいはサルに注射すると血小板が増加することが報告されている。ただし、CRPが強陽性になったり、 γ グロブリンが増加したりする。さらに最近、抗血小板抗体をマウスに注射し、血小板が減少する時期に脾細胞のIL-6mRNAの発現が増加し、さらに血漿中のIL-6濃度が有意に上昇すると報告された。このようなことはIL-6がトロンボポエチンとして作用している可能性を示している。もしそうであるならば、我々の結果で血小板減少患者では血漿IL-6の上昇がみられないことは、血小板減少がIL-6の産生刺激となっているのではないことを示している。つまり、抗原抗体反応のような免疫反応の際におこる血小板減少にはIL-6がトロンボポエチンとして作用している可能性があるが、血小板減少そのものがそれらの産生を刺激するとは考えにくいわけである。確かに、エリスロポエチンは赤血球の減少に反応して産生が増加するが、顆粒球あるいはマクロファージの減少が刺激となって、CSFの産生が高まるという証拠は少なく、むしろ感染などの炎症が刺激となっている可能性の方が大きい。トロンボポエチンがあるとすればCSF型の産生の調節も考えておく必要がある。ただし、IL-6以外に血小板減少に反応して増加する因子がある可能性はある。例えば、IL-11やLIFもその可能性があり、血小板数の変動に伴う血漿中のLIFやIL-11濃度の変動も今後検討する必要がある。

真正赤血球増加症あるいは本態性血小板血症患者の血漿IL-6濃度は正常範囲内でありこれらの疾患における血小板増加はIL-6の産生の亢進によるものでないことが示唆される。さらに、免疫芽球性リンパ節症では血漿のIL-6は検索した2例で高値であり（図19）、本症の高 γ グロブリン血症の原因として

はIL-6の過剰産生が関与していると考えられる。

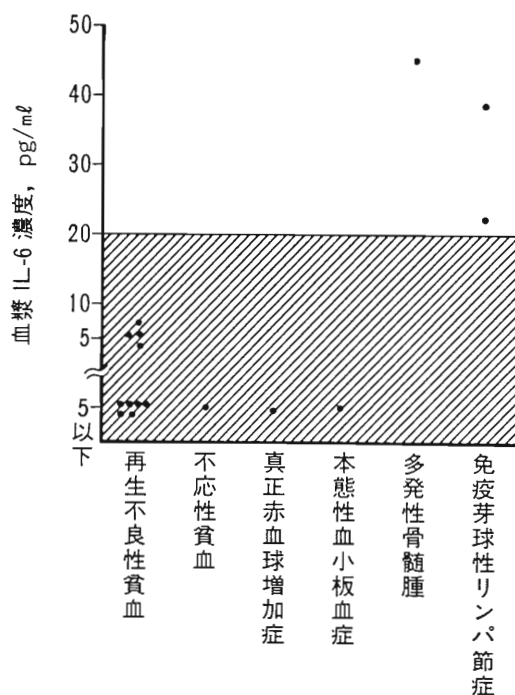


図19. 各種血液疾患における血漿IL-6濃度

3. 骨髄増殖性疾患における巨核球系幹細胞の性状の検討

慢性の骨髄増殖性疾患にはよく血小板増加を伴うが、その機序は明かでない。8例の慢性骨髄増殖性疾患患者（表3）の末梢血の非付着性細胞をIL-3と共に培養すると、血小板増加を認める7例では全例10 U/ml以下のIL-3濃度で最大の巨核球コロニー形成を認める。それに対し、血小板数が正常である骨髄線維症患者1例では、100 U/mlのIL-3濃度で最大の巨核球コロニー形成を認

める。また、正常者の末梢血の非付着性細胞では100 U/mlのIL-3濃度で最大の巨核球コロニー形成を認める（図20、21）。このことは血小板増加を伴う骨髓増殖性疾患では巨核球系幹細胞のIL-3に対する感受性が高いことを示している。このことが骨髓増殖性疾患の血小板増加と関係がある可能性がある。

さらに、8例中6例でIL-3無添加で巨核球コロニーが形成された。付着細胞は除去しているので、それを介する可能性は少ない。しかし、それ以外の細胞の関与は否定できない。いずれにしても同様の処置をした正常ヒト末梢単核球は巨核球コロニーを形成しないのでこのようなことも血小板増加に関係している可能性がある。

表3. 対象とした慢性骨髓増殖性疾患患者の臨床データ

	症例名	年齢/性別	原疾患	WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Hb (g/dl)	Plt ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	治療
1	H.O.	56 / F	E.T.	25.8	16.5	84.6	(-)
2	M.S.	59 / M	E.T.	18.6	14.2	93.4	Hydroryurea
3	T.T.	59 / F	E.T.	9.0	13.8	112.0	Hydroryurea
4	T.O.	66 / M	E.T.	12.5	13.0	99.5	(-)
5	H.U.	55 / M	E.T.	13.9	12.4	260.0	(-)
6	A.Y.	75 / F	CML	17.4	10.5	150.0	Hydroryurea
7	S.N.	65 / M	CML	60.6	13.9	68.8	(-)
8	S.H.	70 / F	MF	6.1	7.3	13.7	(-)

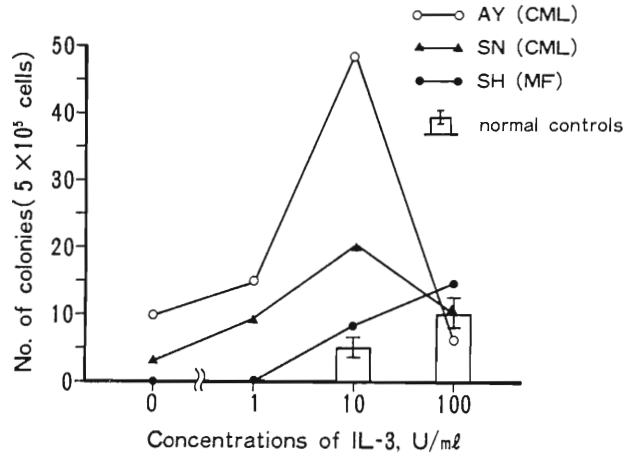


図20. IL-3の巨核球コロニー形成に与える影響

—慢性骨髄性白血病と骨髄線維症—

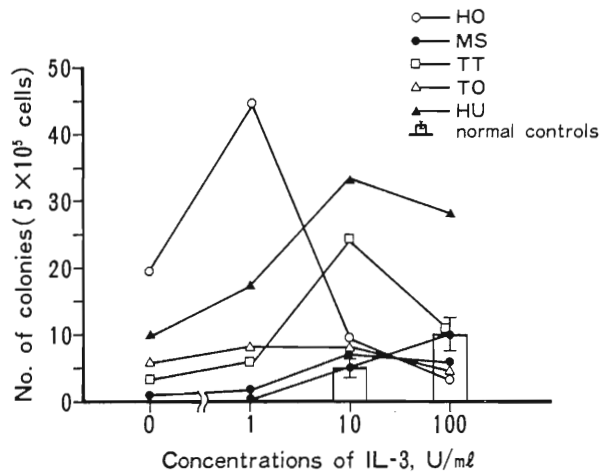


図21. IL-3の巨核球コロニー形成に与える影響

—真正赤血球増加症—

4. トロンボポエチン遺伝子が局在すると考えられる3番遺伝子長腕の解析
慢性記CML 2例、CML急性転化 1例、巨核芽球性白血病 1例、培養細胞（K562、Raji）について検索を行ったが、現時点では染色体異常は検出されていない。

今後、血小板増加と染色体3qの異常を伴う症例を集積し、染色体3q上に位置する他のいくつかのプロープを用いて検索を行う予定である。