

氏名(本籍)	しぶやあきら 渋谷 彰 (秋田県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第1,224号
学位授与年月日	平成8年10月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Lymphokine Requirement for the Generation of Natural Killer Cells from CD 34 ⁺ Hematopoietic Progenitor Cells (CD 34 陽性造血前駆細胞からNK細胞への分化を誘導するリンフォカイン)
主査	筑波大学教授 医学博士 小山 哲夫
副査	筑波大学教授 医学博士 大塚 藤男
副査	筑波大学教授 医学博士 山本 雅之
副査	筑波大学教授 医学博士 渡邊 照男
副査	筑波大学助教授 医学博士 山根 一秀

論文の内容の要旨

ナチュラルキラー (NK) 細胞はウイルス感染細胞や腫瘍細胞に結合しこれらの細胞を直接的に細胞傷害死させる細胞であり、細胞傷害性 T 細胞とともに免疫防御に一次的な役割を担っている。また種々のサイトカインを分泌することにより造血や免疫反応ネットワークにも重要な役割をもっていると考えられている。NK 細胞は末梢血液単核細胞のうち10~15%を占めており、他の血液細胞と同様に骨髓造血幹細胞より分化すると考えられている。しかし、その分化の機構については不明な点が多い。ヒト造血幹細胞は CD 34 抗原を有しており、ヒト骨髓 CD 34 陽性細胞より骨髓系、巨核芽球系、およびリンパ球系の細胞が分化することが知られている。また骨髓間質細胞は造血の初期分化に深く関わっていると考えられる stem cell factor (SCF) を分泌することも知られている。著者らはヒト骨髓 CD 34 陽性細胞から NK 細胞も分化するか否か、また分化する場合、骨髓間質細胞を除いた培養系を用いて、NK 細胞の分化に及ぼす SCF ならびに種々のサイトカインの影響について検討した。

(対象と方法)

正常人より得た骨髓細胞を Ficoll-Hypaque を用いた遠心法にて単核球を分離した。これを各種標識モノクローナル抗体を用いて染色し、細胞分離装置 (FACS) を用いて CD 34 陽性かつ各種分化抗原 (CD 3, CD 16, CD 56) 陰性細胞 ([CD 34⁺Lin⁻] 細胞) を分離した。SCF を含め、各種サイトカインを添加、無添加、特定の培養期間のみの添加という各培養条件で、CD 34⁺Lin⁻細胞を28日間培養し、NK 細胞のマーカーである CD 3⁻CD 56⁺細胞を測定するとともに、NK 活性を K 562 腫瘍細胞に対する cytotoxicity により測定した。

(結果)

1. CD 34⁺Lin⁻細胞を IL-2 と SCF の存在下で4週間培養すると SCF の濃度依存性に細胞表面マーカーおよび NK 活性を有する NK 細胞の生成が認められた。
2. CD 34⁺Lin⁻細胞をさらに CD 33⁺細胞、および CD 33⁻細胞に分離し、IL-2 と SCF の存在下に4週間培養すると CD 34⁺CD 33⁺Lin⁻細胞からのみ NK 細胞の生成が認められ、CD 34⁺CD 33⁻Lin⁻細胞からは認められなかった。
3. 種々のリンフォカインをこの培養系に加え、リンフォカインの影響について検討したところ、IL-2 と SCF

に加え、IL-3がCD 34⁺CD 33⁻Lin⁻細胞からNK細胞への分化に必須であることが明らかとなった。

4. CD 34⁺CD 33⁻Lin⁻細胞からのNK細胞の分化誘導には、その培養初期1週間にはIL-3とSCFの組み合わせのみが必要であり、IL-2は不要であった。しかしその後はIL-2単独でもNK細胞の分化誘導が認められた。CD 34⁺CD 33⁺Lin⁻細胞からはその培養初期の1週間はSCF単独添加で、その後はIL-2単独添加でNK細胞の分化誘導が認められた。

(考察)

著者らは以前に骨髓造血幹細胞からNK細胞の分化にはIL-2の他に骨髓間質細胞が重要であることを報告した。骨髓間質細胞は造血の初期分化に関与していると考えられるstem cell factor (SCF) や種々のサイトカインを分泌することが知られている。著者らが開発した骨髓間質細胞を除いた培養系を用いて、NK細胞の分化におよぼすSCFやその他のサイトカインの影響について検討した。骨髓単核細胞よりCD 34⁺Lin⁻細胞をFACSを用いて分離し、IL-2とSCFの存在下に4週間培養するとSCFの濃度依存性にNK細胞の生成が認められ、NK細胞もまた他の造血細胞と同様にCD 34⁺造血幹細胞より分化することが明らかとなった。

CD 34⁺CD 33⁻Lin⁻細胞はCD 34⁺CD 33⁺Lin⁻細胞より未分化な細胞であると考えられていることにより、CD 34⁺CD 33⁺Lin⁻細胞からNK細胞への分化にはIL-2とSCFが必須であるが、より未分化な段階ではさらに他の因子が必要であることが示唆された。

そこで種々のリンフォカインについて検討したところ、IL-2とSCFに加え、IL-3がCD 34⁺CD 33⁻Lin⁻細胞からNK細胞への分化に必須であることが明らかとなった。さらにCD 34⁺CD 33⁻Lin⁻細胞からのNK細胞の分化誘導には、その培養初期1週間IL-2は不要であり、IL-3とSCFとの組み合わせのみが必要であった。その後の培養(7日~28日)ではIL-2単独でも充分であった。CD 34⁺CD 33⁻Lin⁻細胞からはその培養初期の1週間SCF単独で、その後はIL-2単独でNK細胞の分化誘導が認められた。

(結論)

NK細胞は骨髓造血幹細胞より段階的に分化する。NK前駆細胞である未分化のCD 34⁺CD 33⁻Lin⁻細胞からのNK細胞分化誘導には、その培養初期ではIL-3とSCFの組み合わせのみが必要であるが、2週以降はIL-2単独でも分化し、CD 34⁺CD 33⁺Lin⁻細胞からはその培養初期の1週間はSCF単独で、その後はIL-2単独でNK細胞の分化誘導が認められる。骨髓造血幹細胞からNK細胞系列への分化の段階に応じ、初期にはIL-3+SCFまたはSCF、後期にはIL-2が必要である。

審査の結果の要旨

骨髓間質細胞を除いた骨髓造血幹細胞培養系を開発し、NK細胞も骨髓造血幹細胞より由来することを直接的に証明した。さらに骨髓造血幹細胞からNK細胞への分化にはその分化段階、すなわち多能性造血幹細胞からNK細胞系列への分化とその後の機能的成熟の過程に応じて、IL-3, stem cell factor, IL-2の順でそれぞれ必要であることを明らかにした論文で価値が高い。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。