

氏 名（本籍） 加 藤 正 人

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 2 1 1 1 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 元 年 2 月 22 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 56 年 3 月
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Pokeweed mitogen活性化末梢血単核細胞の性状
およびヒトIL-3・IL-4に対する反応性

(主 査)
論 文 審 査 委 員 教 授 橋 本 保 彦 教 授 菅 村 和 夫
教 授 橋 武 彦

論文内容要旨

目 的

ヘルパーT細胞が抗原刺激をうけて産生するリンフォカインにインターロイキン3 (IL-3) とインターロイキン4 (IL-4) がある。IL-3はmulti-colony stimulating factor (multi-CSF) と呼ばれ骨髄幹細胞を種々の細胞に分化させるほか、未熟T細胞や肥満細胞の分化・増殖をも調節すると理解されている。IL-4はB cell stimulatory factor-1 (BSF-1) と同一でB細胞の分化・増殖を調節するほか、B細胞以外のより未熟な細胞にも作用することが知られている。しかし現在、ヒトIL-3/IL-4活性を検出する簡便で確実な検出法はみつかっていない。本研究は、未熟細胞のIL-3, IL-4に対する反応性を知るために各種マイトージェンによる幼若化細胞の性状とサイトカイン反応性を調べ、ヒト末梢血単核球 (PBMC) をT細胞依存性B細胞マイトージェンであるpokeweed mitogen (PWM) で刺激した幼若化細胞 (PWM blast) がヒトIL-3とIL-4に反応するという有用性をもつことを明らかにした。

材 料 と 方 法

①PWMおよび各種マイトージェンとサイトカイン PWM, Phytohemagglutinin (PHA), Concanavalin A (Con-A) をマイトージェンとして用いた。IL-3, IL-4, インターロイキン5/6 (IL-5/IL-6) はGenetics Instituteより分与されたヒト型リコンビナント製品を使用した。インターロイキン2 (IL-2) とインターフェロン (IFN) は塩野義製薬より分与されたヒト型リコンビナントIL-2とIFN₂ をそれぞれ用いた。抗ヒトIL-3単クローン抗体 (anti IL-3) と抗ヒトIL-2単クローン抗体 (anti IL-2) はそれぞれGenetics Instituteと塩野義製薬から供与された。②ヒト単核細胞 ヒトPBMCは、健康成人からヘパリン採血し、Ficoll-Isopaque法にて分離後洗浄し、10%非働化自己血清加RPMI 1640培地に浮遊した。③各種マイトージェンによる幼若化細胞の作製とサイトカイン反応性 PBMCにPWM (0.5%), PHA-P (0.025%), ConA (5 μ g/ml) およびStaphylococcus aureus Cowan I株 (SAC-1 : 5%) をそれぞれ加えて5日間培養後に回収・再調整し、各種・各濃度のサイトカインを加え、さらに3日間培養後 ³H-thymidineを16時間パルスし、放射活性にてDNA合成を測定した。④ナイロンウールカラムとPercollによる各比重分画細胞の分離 PBMCのナイロンウール非吸着細胞をPercoll不連続密度勾配法により低比重分画と高比重分画に分離した。さらに低比重分画に抗CD2抗体あるいは抗CD4+抗CD8抗体を加え補体処理により、CD2⁻細胞とCD4⁻CD8⁻細胞を得た。これらの細胞のr/lc IL-3に対する反応性を

調べた。⑤膜蛍光抗体法 細胞膜上の各種マーカーは、単クローン抗体と蛍光標識抗マウスIg抗体で染色しFACSCANにて解析した。⑥細胞傷害活性の測定 PWM blastの細胞傷害活性を4時間の⁵¹Cr遊離法で測定した。

結 果

①T細胞マイトージェン (PHA・ConA) により得た幼若化細胞はr/lc IL-2に著しく反応したが、r/lc IL-3とr/lc IL-4に対して殆ど反応しなかった。②T細胞依存性B細胞マイトージェン (PWM・SAC-1) により得た幼若化細胞はr/lc IL-2に加えてr/lc IL-3とr/lc IL-4に対して著明なDNA合成を示した。特にPWM blastはr/lc IL-3とr/lc IL-4に著しく反応した。③1.0および0.1%のPWMにより得たPWM blastは4～5日目の幼若化細胞で、r/lc IL-3とr/lc IL-4に対しdose-dependentなDNA合成を示した。④PWM blastはr/lc IL-1, IFN γ , GM-CSF, G-CSF, M-CSFなどのCSF群, r/lc IL-5, r/lc IL-6に対しては反応せず, IL-2, IL-3, IL-4, TNF α , lymphotoxinに反応して増殖した。⑤r/lc IL-2とr/lc IL-3によるPWM blastの増殖は、anti IL-2とanti IL-3により、それぞれ特異的に抑制された。⑥CTLL-2細胞はヒトr/lc IL-3とr/lc IL-4にまったく反応しなかった。⑦ナイロンウール処理とPercoll比重遠心法により得たPBMC分画のうち、低比重分画細胞がIL-3とIL-4に対して強く反応した。⑧低比重分画細胞を抗CD 4 +抗CD 8 および抗CD 2 処理してIL-3を加えると、抗CD 4 +抗CD 8 処理はIL-3反応性を抑制しなかったが抗CD 2 処理は反応を著しく抑制した。⑨PWM blastはCD 2が強陽性で、強い非特異的キラー活性を有していた。

結 論 と 考 察

T細胞依存性B細胞マイトージェンであるPWMによりPBMCを刺激して得たPWM blastはr/lc IL-3およびr/lc IL-4に対して著明に増殖反応を示すことを、本論文は明らかにした。PWM blastにはCD 2強陽性でCD 4⁻ CD 8⁻のdouble negative細胞が約30%存在した。またPWM blastは非常に強い非特異的キラー活性を有しており、未熟T細胞と共通の性質を示した。このような細胞がIL-3/IL-4反応性の主体をなすと思われる。この論文で初めて、末梢血中のIL-3/IL-4反応性未熟T細胞の存在が示されたと考えられる。

審査結果の要旨

インターロイキン3 (IL3) とインターロイキン4 (IL4) は、いずれもヘルパーT細胞が抗原刺激をうけて産生するリンフォカインであり、免疫担当細胞の分化と増殖を調節する重要な因子である。しかし、ヒトでIL3/IL4活性を検出する簡便かつ信頼性のある方法は知られていない。またIL3/IL4に対するヒト末梢血リンパ球の反応性についても、殆ど報告がない。本研究は、各種マイトージェンによりヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を幼若化させた細胞の性状とサイトカイン反応性を検討し、ヒト末梢血中のIL3/IL4反応性細胞について解析している。

研究方法としては、マイトージェンとしてPokeweed mitogen (PWM), Phytohemagglutinin (PHA), Concanavalin A (Con-A), Sta Aureus Cowan I 株 (SAC-1) を用い、PBMCを刺激し幼若化細胞を得て、各種サイトカインに対する反応性を検討した。

次のような結果が得られた。

T細胞マイトージェンであるPHAとCon-AによりPBMCを刺激して得た幼若化細胞は、IL2に著しく反応したが、IL3とIL4に対しては反応しなかった。これに対してT細胞依存性B細胞マイトージェンであるPWMとSAC-1により得た幼若化細胞は、IL2に加えてIL3とIL4に著明な反応を示した。至適濃度・培養期間で作製したPWM幼若化細胞 (PWM blast) は、ヒトIL3とIL4に対しdose-dependentなDNA合成を行ったが、他のサイトカインにはTNF α とlymphotoxinを除き反応しなかった。IL3に対するPWM blastの反応は抗IL3抗体により抑制されるspecificなものであり、この反応系とCTLL-2によるIL2アッセイを組み合わせることで、ヒトIL2活性とIL3/IL4活性を鑑別することができた。ヒト末梢血中には、Percoll比重遠心法により得られる低比重分画の中にIL3反応性細胞が存在し、その反応性は抗CD2処理により抑制されたが、抗CD4+抗CD8処理にては抑制されなかった。

本研究は、PWMによりヒト末梢血単核球を刺激して得られるPWM blastがヒトIL3とIL4に対して著明に反応して増殖することを示し、その反応性の主体を、CD2⁺ CD4⁻ CD8⁻の所謂double negative immature T cellであろうと考察している。インターロイキン2 (IL2) の関与する反応系より未成熟な骨髄幹細胞からの免疫担当細胞の分化・増殖を調節するIL3とIL4を、正常ヒト末梢血単核球を用いて簡便にアッセイできることと、T細胞がIL3反応性の主体をなすことを解析した点で、本研究は新しい知見を得ている。従って本研究は学位授与に値するものと認める。