

氏 名（本籍） さ とう あき よし  
佐 藤 彰 直

学 位 の 種 類 博 士（医 学）

学 位 記 番 号 医 第 2850 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 8 年 3 月 8 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 60 年 3 月 7 日  
東邦大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 急 性 白 血 病 に お け る 骨 髄 支 持 細 胞 の コ ロ ニ ー 形 成  
能 と ク ロ ー ン 化 し た 支 持 細 胞 の 機 能 に つ い て の 検  
討

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教 授 阿 部 圭 志 教 授 今 野 多 助

教 授 帯 刀 益 夫

# 論文内容要旨

## 研究目的

未治療の急性白血病での骨髄支持細胞の機能を明らかにするため、まずヒト血漿加メチルセルロース培養による骨髄細胞の骨髄支持細胞コロニー形成能を検討し、次に、IL-1 $\alpha$ 添加培養で骨髄支持細胞コロニーを形質転換せずにクローン化し、その形質、白血病細胞添加による骨髄支持細胞コロニー形成能の変化およびコロニー形成細胞の支持能、接着能さらに長期維持能について検討した。

## 研究方法

- 1) 未治療急性骨髄性白血病 (AML) 17 例, 急性リンパ性白血病 (ALL) 9 例計 26 例を対象とした。
- 2) 未治療急性白血病の骨髄支持細胞コロニー形成能の検討は、急性白血病患者の骨髄単核球をヒト AB 型血漿加メチルセルロース法にて培養し、骨髄支持細胞コロニー数を算定した。さらにメチルプレドニゾロン (MP) 添加の有無により
  - a. 骨髄支持細胞コロニー形成能,
  - b. 骨髄支持細胞の脂肪滴形成率,について検討した。
- 3) IL-1 $\alpha$ を増殖刺激因子として得た形質転換しない急性白血病骨髄由来の骨髄支持細胞 (AL-SC) クローンの樹立法は、患者の骨髄単核球に IL-1 $\alpha$ を添加し、前述の方法で培養した。骨髄支持細胞コロニーをピックアップし、液体培養による継代を行った。
- 4) AL-SC クローンの形態および形質は、得られた骨髄支持細胞クローンを細胞生化学およびモノクロナール抗体を用いた蛍光抗体法にて検討した。
- 5) AL-SC クローンの急性白血病細胞添加による骨髄支持細胞コロニー形成能への影響は、得られた AL-SC クローンに患者の骨髄白血病細胞を加え、IL-1 $\alpha$ を添加してヒト AB 型血漿加メチルセルロース培養を行った。
- 6) AL-SC クローンの健常人コロニー形成細胞の接着・支持能は、骨髄支持細胞クローンを培養し、その上に健常ヒト骨髄非付着細胞を上層し、メチルセルロース培養にて CFU-GM および BFU-E コロニー数について検討した。
- 7) 長期培養法による AL-SC クローンの健常人コロニー形成細胞に対する長期維持能は、 $2 \times 10^{-6}$  M MP, 15% FCS, 15% horse serum を含む IMDM を用い、各々の支持細胞クローンに臍帯血非付着細胞を加え培養した。培養 7, 14, 21, 28, 35 日後に、それぞれ細胞を回収して

細胞数, CFU-GM, BFU-E コロニー数を測定した。

- 8) AL-SC クローンによるサイトカイン産生能は, 骨髄支持細胞クローンを培養して得た培養上清中の G-CSF, GM-CSF, および IL-3, IL-6, IL-11 について ELISA キットで測定した。

## 研 究 結 果

### 1) 未治療急性白血病の骨髄支持細胞コロニー形成能

- a. コロニー形成能は, MP 無添加で, AML 症例では約半数で骨髄支持細胞コロニー形成能は正常以上に認められ, 他は低下した。ALL 症例では 1/3 でコロニー形成能は正常域にはば保たれたが, 他は著しく低下した。また, MP 添加によるコロニー形成能の変化は AML 症例の多くは健常者と異なりほとんど増加を認めず, ALL 症例では全く増加を認めなかった。FAB 分類, 骨髄所見, 末梢血所見と骨髄支持細胞コロニー形成能とは有意な相関を認めなかった。
- b. 骨髄支持細胞コロニーの脂肪滴形成率は MP 無添加でも, AML 症例ではほとんどが健常者レベル以上に増加し, ALL 症例でも同様であった。MP 添加では, AML, ALL 症例とも軽度の増加にとどまった。

- 2) AL-SC クローンの性状は May-Giemsa 染色, Acid phosphatase 染色, Alkaline phosphatase 染色, Esterase 染色, Oil red O 染色では陽性で, Collagen I, III, IV, Actin, Fibronectin は陽性, Factor VIII は陰性であり, 健常者由来骨髄支持細胞と一致した。

- 3) AL-SC クローンに対する急性白血病細胞添加によるコロニー形成能への影響は抑制傾向を示すクローンが認められた。

- 4) AL-SC クローンのコロニー形成細胞の接着, 支持能の検討では, 健常者と同等以上であったが, 各々の SC クローン間に多様性を認めた。

- 5) 長期培養法による AL-SC クローンのコロニー形成細胞に対する長期維持能は, 細胞数, CFU-GM, BFU-E コロニーにおいて健常者と同等の機能を認めた。

## 考 察

急性白血病における骨髄支持細胞の機能についてコロニー形成より, 数的にも質的にも健常者と異なると考えられた。骨髄支持細胞をクローン化する新たな手段を導入して解析した結果, これら機能異常は白血病細胞に起因することが推察された。また本研究で得られた AL-SC クローンが造血幹細胞の分化, 成熟に直接関わる機能を有する骨髄支持細胞であり, 急性白血病においても骨髄支持細胞の機能は多様性が存在すると考えられた。骨髄支持細胞をクローン化する事により各造血病態での骨髄支持細胞の機能を明らかにできる可能性があり, 各種の血液疾患の病態解明に有用な手法と考えられた。

## 審査結果の要旨

骨髄造血における造血幹細胞の分化・増殖は、骨髄支持細胞が中心的な機能を担い、細胞外マトリックスや種々のサイトカインなどがネットワークを形成して複雑な相互作用を介して営まれており、これらの機能を総称して造血微小環境と呼称される。ヒトの骨髄支持細胞の研究手段としては、コロニー形成能、Dexter 培養法、SV-40 により形質転換したクローン細胞での検討などがある。しかし、急性白血病の骨髄支持細胞の機能については、コロニー形成による増殖能についていくつか報告されているにすぎず、その結果として、低下していたとする報告が多いが異論も多い。

本研究では、急性白血病における骨髄支持細胞の機能を詳細に検討する目的で、骨髄支持細胞コロニー形成について増殖能だけでなく脂肪滴形成能も検討した。その結果、骨髄支持細胞コロニー形成の増殖能、脂肪滴形成能は、ともに健常人とは異なった態度を示した。また、急性白血病骨髄より形質転換せずに骨髄支持細胞のクローン化に成功し、単純化した実験系を用いてクローン化骨髄支持細胞の性状、機能を検討した。すなわち、急性白血病の骨髄細胞より  $1L-1\alpha$  を添加したメチルセルロース培養で、形質転換せずに骨髄支持細胞クローンを得た。このクローンは新鮮骨髄支持細胞分画と同様の形態・形質を保ち、健常人骨髄造血幹細胞の接着・支持能、および長期支持能を備えていた。この急性白血病骨髄由来支持細胞クローンの培養系に急性白血病細胞を添加するとその増殖は抑制された。

本研究成績から、急性白血病で今までに想定されていた骨髄支持細胞の異常は、従来の実験系に混在する白血病患者細胞による二次的な変化と想定され、少なくとも支持細胞のクローンレベルでは本来の機能を保持しているものが存在することが明らかになった。また、このようなクローン化骨髄支持細胞による検討法は、より単純化された骨髄造血モデルとして各種血液疾患の造血微小環境における骨髄支持細胞の役割の解明に有力な手段となることを明らかにした。従って、本論文は十分学位論文に値するものと認める。