



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Inhibition Against CFU-C and CFU-E Colony Formation by Soluble Factor (s) Derived from Hairy Cells  |
| Author(s)    | 谷口, 信博  |
| Citation     | 大阪大学, 1989, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/36736">https://hdl.handle.net/11094/36736</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#"></a> をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 【28】

|         |   |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 谷口信博  |
| 学位の種類   | 医学博士  |
| 学位記番号   | 第 8753 号  |
| 学位授与の日付 | 平成元年6月9日  |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当  |
| 学位論文題目  | Inhibition Against CFU-C and CFU-E Colony Formation by Soluble Factor (s) Derived from Hairy Cells<br>(有毛細胞に由来する可溶性因子による CFU-C および CFU-E コロニー形成の抑制) |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授 木谷 照夫<br>(副査)<br>教授 垂井清一郎 教授 北村 幸彦   |

## 論文内容の要旨

## (目的)

有毛細胞白血病 (Hairy Cell Leukemia : HCL) 患者には、しばしば好中球減少や貧血がみられ、その原因は白血病細胞浸潤の結果としての mass effect による骨髓機能不全や血球の巨脾への取り込みによるといわれている。しかし、Hairy cell (HC) が造血幹細胞の分化・増殖を直接抑制することによって、好中球減少や貧血をひきおこす事については、未だ明らかにされていない。

本研究は、この点を明確にすると共に、その抑制因子の物理化学的性状について検討する事を目的としたものである。

## (方法)

HCL患者4例、慢性B細胞性白血病 (B・CLL) 患者3例、および正常2例より末梢単核球を分離した後、10,000/cmmの細胞濃度に10%FCS加RPMI 1640で調整し4日間培養した上清を conditioned medium (CM) として用いた。一部のHCL例では、非貧食性・T細胞除去末梢単核球を、10,000/cmmと1,000/cmmの濃度で培養した。別に、RPMI 1640に3.5%ヒトアルブミン・2.4%HEPES・2v/v%必須アミノ酸 (x50)・1v/v%非必須アミノ酸 (x100)・0.15%NaHCO<sub>3</sub>を添加した無血清培地で4日間培養したHCのCMをも作製した。

CFU-Cコロニーアッセイは、メチルセルロース法にておこなった。即ち、suspended medium (0.9%メチルセルロース・20%FCS・1,000u./mlCSF-Chugai・200/ml正常貧食細胞除去骨髓単核球および20%CMを添加したIscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)) 1mlを35mmの培養シャーレに入れ、37°Cで7日間培養した。またCSF-ChugaiにかえてPHA-LCM, recombinant (r) G-

CSF, rGM-CSFやrIL-3などColony Stimulating Factor (CSF)で誘導されるコロニー形成に対するHC-CMの効果についても検討した。BFU-EおよびCFU-Eに与える影響については、suspended medium (0.9%メチルセルロース・30%FCS・1%ウシ血清アルブミン・ $10^{-4}$ M 2-メルカプトエタノール・0.5%PHA-LCM・1IU/mlエリスロポエチン・200/ml正常貧食細胞除去骨髄単核球及び10%CMを添加したIMDM) 1mlを用いてCFU-Cと同様に培養し、7日目にCFU-E、14日目にBFU-Eを算定した。

判定は倒立顕微鏡を用いて行い、CFU-Cは40個以上、CFU-Eは8個以上の細胞集塊をコロニーとし、BFU-Eは100個以上の細胞集塊をバーストとした。

コロニー形成抑制率は、以下の式より算出した。

%抑制率 =  $(1 - \text{実験コロニー数} / \text{コントロールコロニー数}) \times 100$

HC-CMの分画は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や超ろ過膜を用いて行い、おのおのCFU-C抑制活性を検討した。抑制因子の熱安定性は、 $60^{\circ}\text{C} \cdot 10$ 分と $100^{\circ}\text{C} \cdot 5$ 分処理にて、プロテアーゼ感受性はトリプシン処理にて未処理HC-CMの抑制率と比較した。

Transferring Growth Factor (TGF)- $\beta$ , Tumor Necrosis Factor (TNF), Lymphotoxin (LT) および Interferon (IFN) 活性は、既知の方法を用いて測定した。

また、抗TNF単クローン抗体をHC-CM添加コロニーアッセイ系に加えてその影響を検討した。

#### (結 果)

末梢好中球数は、HLC患者では630-1,480/cmmで、B・CLLの2,040-5,230/cmmより明らかに低値であった。CFU-Cコロニー形成に対し、HC-CMは36-76%抑制しその効果は濃度依存性であったが、B・CLLと正常単核球のCMは抑制しなかった。(0-6%)。その抑制効果は、CM作製時のHC細胞濃度に比例した。しかし、CSF-ChugaiのかわりにPHA-LCMをCSFとして用いると、0-5%と抑制がみられなかった。そこで、crudeなCSFにかえてrecombinant (r)G-, GM-CSFおよびrIL-3を用いて検討したところ、各抑制率はrG-CSF 65%・rGM-CSF 12%・rIL-3 14%と、rG-CSFに刺激されたコロニー形成のみが抑制された。赤芽球系幹細胞に対してHC-CMは、CFU-Eを抑制したが、BFU-Eは抑制しなかった。

CFU-C抑制因子は、透析前46%・後48%と透析されず、熱に対しては $60^{\circ}\text{C} \cdot 10$ 分処理で40%、 $100^{\circ}\text{C} \cdot 5$ 分処理で24%と比較的安定であった。またトリプシン処理により抑制率は4%と失活した(コントロール26%)。HC-CMをHPLCにて分画すると、分子量4,000-8,000に抑制活性を認め、超ろ過膜を通してのちにHPLCで分画すると5,000-6,000に抑制活性を有する蛋白ピークを認めた。

HC-CMに既知の抑制物質が含まれているか否かを検討したが、TGF- $\beta$ , TNF, LTやIFNは含まれておらず、HC-CMを添加したCFU-Cの系に抗TNF単クローン抗体に加えても、その抑制効果はかわらなかった。

#### (総 括)

1) HCは、白血球系のうちの好中球系コロニー形成を特異的に抑制する因子を産生し、この因子がHCLの好中球減少の一因であると考えられる。

- 2) HCは、赤芽球のコロニー形成をも抑制する。
- 3) この抑制因子は、造血幹細胞の比較的分化した段階でコロニー形成を抑制する。
- 4) この抑制因子は、分子量5,000-6,000の熱に比較的安定な蛋白であり、既知の抑制因子とは異なった新しいB細胞系細胞に由来するリンホカインである。

### 論文の審査結果の要旨

本研究は、Hairy Cell Leukemia 患者に見られる好中球減少や貧血が Hairy Cell の持つ造血抑制作用によるものではないかと考え、その培養上清を用いてコロニー法で検討したものである。その結果、Hairy Cell は顆粒球系ならびに赤血球系の分化段階の進んだ幹細胞である CFU-G・CFU-E のコロニー形成を抑制する因子を産生することを明らかにした。しかし、より未分化な CFU-GM・BFU-E は抑制しない。この抑制因子は、分子量5,000-6,000の熱に比較的安定なタンパクで既知の抑制因子とは異なった新しい物質である。このことは Hairy Cell のこれまで知られていない機能を見出したばかりでなく、その生理的な対応細胞である B細胞が造血調節に関与していることを示唆するものである。

故に、本論文は血液学・腫瘍学上有意義な研究であり、学位に値すると考える。