The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	B細胞初期分化を調節するストローマ細胞膜表面上分子（P55）の同定
Author(s)	長澤, 丘司
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3065810
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

B細胞初期分化を調節するストローマ細胞膜表面上分子(p55)の同定

Identification of a 55-kDa Stromal Cell Surface Protein Which is Involved in Regulation of B Lymphopoiesis

長澤　丘司
Takashi Nagasawa

大阪大学細胞生体工学センター多細胞生体系研究部門
Institute for Molecular and Cellular Biology

Key Words : B Lymphopoiesis, Stromal Cell, Monoclonal Antibody

抄録

B細胞骨髄培養を支持するストローマ細胞株ST2よりモノクロナール抗体、R4を作成した。R4は、分子量5万5千の細胞表面タンパク(p55)を認識した。p55は、ストローマ細胞株、B細胞株で発現し、T細胞株、正常骨髄細胞、脾細胞、胸腺細胞では発現していなかった。R4はストローマ細胞株依存性のB細胞増殖を抑制したが、骨髄球系細胞増殖を抑制しなかった。R4はストローマ細胞株やストローマ細胞株非依存性B細胞株の増殖を抑制しなかった。骨髄B細胞は、ストローマ細胞との接触がない条件でもストローマ細胞依存性に増殖し、R4は、この増殖をも抑制した。R4を妊娠マウスに注射すると、子マウスの骨髄B細胞が減少した。

緒言

B細胞は、骨髄で骨髄幹細胞より成熟B細胞に分化する。Whitlock-WitteによるB細胞の骨髄培養法の確立(1)以来、この分化過程にB細胞とストローマ細胞との相互作用が重要であることが示されてきた。更に、B細胞の分化増殖を支持できるストローマ細胞株が樹立され(2)(3)、B細胞初期分化を分子レベルで解析するための材料となった。これにより、ストローマ細胞由来のIL-7(4)や、SCF(6,7)などの増殖因子に加え、いくつかの接着分子(9,10)が同定され、B細胞初期分化に重要であることが示されてきた(5,8)。本研究では、このB細胞とストローマ細胞との相互作用の分子機構の解析を進める目的で、B細胞初期分化に関与するストローマ細胞膜表面分子の同定を試みた。

材料と方法

＜細胞株＞

ストローマ細胞株（ST2[3], *op/op* fibroblast line[11], PA6)とストローマ細胞株依存性プレB細胞株Dw8は熊本大学の西川教授より供与された。Dw8(3)はST2のモノレーヤー上でRPMI1640, 5% FCS, 50μM 2-MEを用いて培養した。他の細胞株はRPMI1640, 10% FCS, 50μM 2-MEを用いて培養した。

＜ハイブリドーマ作成＞

SDラットを数百万個のST2細胞を２週間ごとに腹腔内注射して免疫した。このラットの脾細胞とP3U1とのハイブリドーマをPEG5000を用いて作成し、その培養上清のST2との反応性をFACSにてスクリーニングした。ST2と反応性がみられた抗体を産生するハイブリドーマをクローン化し、その上清を濃縮して、ST2依存性B細胞骨髄培養に加えて、その影響を観察した。

＜*in vitro* 骨髄培養＞

ストローマ細胞株依存性B細胞骨髄培養はWhitlock-Witteの条件で行なった。直径3.5cmのディッシュに作成しておいたストローマ細胞株のモノレーヤーの上で、3週齢のBALB/cマウスから採取した5万個の骨

髄細胞をRPMI1640, 5% FCS(lot no 1115741; Hyclone Lab.)、50μM 2-ME中で培養した。ストローマ細胞として*op/op* fibroblast lineを用いたときは、IL-7を加えた。上清およびR4抗体(50μg/ml)は、骨髄細胞と同時に加えた。ST2を用いたときは6日間、*op/op* fibroblast lineを用いたときは10日間37℃で培養後、浮遊細胞を採取し、細胞数を測定した後、FACSで解析した。B細胞数は、全細胞数にlymphocyte gate内の細胞比を乗じて算出した。

B細胞と、ストローマ細胞との直接の接触を阻害するために、メンブランフィルター（Millicell CM)を、*op/op* fibroblast lineのモノレーヤー上におき、その上でIL-7を加え骨髄細胞を培養した。R4抗体(50μg/ml)は、骨髄細胞と同時に加えた。13日間37℃で培養後、浮遊細胞を採取し、細胞数を測定した後、FACSで解析した。

ST2依存性骨髄球系細胞培養は、Dexterの条件(2, 12)で行なった。直径3.5cmのディッシュに作成しておいたストローマ細胞株のモノレーヤーの上で、8週齢のBALB/cマウスから採取した5万個の骨髄細胞を培養した。培養液はα-MEM, 20% horse serum を用い、33℃で培養した。R4抗体（50μg/ml)は、骨髄細胞と同時に加えた。8日後、浮遊細胞を採取し、細胞数を測定した。

＜細胞株の増殖へのR4の影響の検討＞

Dw8はST2のモノレーヤー上でRPMI1640, 5%FCS、50μM 2-ME を用いて培養し、ST2, *op/op* fibroblast line, M12, 70Z/3はRPMI1640, 10% FCS、50μM 2-ME を用いて培養した。R4抗体（50μg/ml)を加えてから、4日後の細胞数を測定した。

＜R4による免疫沈降＞

IODO-BEADS(Pierce Chemical Co., Rockford. IL)を1mCiの$Na^{125}I$と5分間混合し、4千万個の細胞と更に室温で30分間混合した。洗浄後、digitonin extraction buffer（1% digitonin, 10mM triethanolamine pH7.8, 150mM NaCl, 10mM iodoacetamide, and 1mM PMSF) で可溶化した。遠心後、上清をラットIgGと、protein G Sepharose (Pharmacia, Piscalaway, NJ)でプレクリアした後、10μgのR4,またはラットIgGを加え、protein G Sepharoseと4℃で1時間混合した。この溶液を7回洗浄し、SDS

sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 62.5mM Tris-HCl pH6.8) 中で、5% 2-MEの存在下または非存在下で煮沸し、遠心した。上清をSDS-PAGEで解析した。

＜FACS解析＞

細胞を、2% FCSを含んだphosphate-buffered salineで洗浄し、FITC-labeled anti-B220 mAb (RA3-6B2), anti-mouse IgM mAb, anti-mouse Mac-1 mAbと、氷上で15分間混合した。一部の解析では、2μg/mlのR4と15分間混合し、洗浄後、更にFITC-labeled mouse anti-rat IgG mAbと混合した。最後に、propidium iodideと混合し、死細胞を除いて、FACS tar plusで解析した。

＜妊娠マウスへの抗体の投与＞

生食水及び3mgのR4, R26抗体を妊娠したBALB/cマウスに、妊娠14, 15, 16, 17, 18日目に、腹腔内注射した。R26抗体は、ST2を免疫してえられたモノクロナール抗体で、ST2依存性B細胞骨髄培養への影響が認められず、対照抗体として用いた。生まれた子マウスにも生食水及びこれらの抗体800μgを生後10日目に腹腔内注射し、生後16日目に骨髄細胞、脾細胞、胸腺細胞をFACSにて解析した。

結果

＜ストローマ細胞株依存性骨髄B細胞増殖に対するR4の作用＞

上清がST2と反応したラットのハイブリドーマ30クローンのうち、1クローンの上清がST2依存性のB前駆細胞増殖を抑制したため、これを精製し、R4抗体と命名、更なる解析に用いた。

3週令のBALB/cマウスより採取した骨髄細胞をWhitlock-Witteの培養条件で、ST2のモノレーヤー上で培養すると、骨髄由来の細胞の増殖が認められた。大部分がB前駆細胞($B220^+$, $sIgM^-$, $Mac1^-$)で、一部マクロファージ様骨髄球系細胞（$B220^-$, $sIgM^-$, $Mac1^+$)が増殖した。これにR4を加えると、B前駆細胞の増殖が抑制された（Fig. 1)。この抑制作用は、R4溶液をprotein G Sepharoseで吸収すると消失し，かつR4抗体濃度に依存していた。R4の添加により、ストローマ細胞の形態に影響は認められなかった。

ST2のモノレーヤー上で、8週齢のBALB/cマウスから採取した骨髄細胞をDexterの条件下で培養すると、骨髄球系細胞の増殖が認められた。図で示していないが、R4はこの増殖を抑制しなかった。これらの結果は、R4が、ストローマ細胞株依存性骨髄B細胞増殖を、特異的に抑制することを示す。

R4の抑制作用がマクロファージ様骨髄球系細胞を介したものである可能性を除外するため、R4の作用を、遺伝的にM-CSFを欠損したマウスより樹立された*op/op* fibroblast lineを用いて検討した。*op/op* fibroblast lineモノレーヤー上で、3週令のBALB/cマウスより採取した骨髄細胞をWhitlock-Witteの培養条件で、IL-7を添加して培養すると、B前駆細胞の増殖のみが観察され、マクロファージ様骨髄球系細胞の増殖は観察されなかった。このB前駆細胞の増殖をも、R4は抑制した (Fig. 2)。

＜各種細胞株の増殖へのR4の作用＞

図で示していないが、R4はストローマ細胞株依存性プレB細胞株Dw8のST2及び*op/op* fibroblast line依存性増殖を、抑制した。しかし、R4は、ストローマ細胞株非依存性プレB細胞株70Z/3やM12、ストローマ細胞株ST2及び*op/op* fibroblast lineの増殖に影響しなかった。

＜骨髄細胞とストローマ細胞とが、直接接触しない条件下でのB前駆細胞の増殖に対するR4の作用＞

R4が骨髄細胞とストローマ細胞との直接接触を阻害することによりB前駆細胞の増殖を抑制するのか否かを検討した。

op/op fibroblast lineのモノレーヤーをメンブランフィルターで骨髄細胞との直接接触を阻害しても、IL-7の存在下で、フィルターがないときより弱いがB前駆細胞の増殖が観察された。R4はこの条件下でもB前駆細胞の増殖を抑制した (Fig. 3)。この結果は、R4が骨髄細胞とストローマ細胞との直接接触を阻害することによりB前駆細胞の増殖を抑制するのではないことを示す。

＜*in vivo*でのR4の作用＞

*In vivo*でのR4の作用を検討するため、3mgのR4, R26抗体を妊娠したBALB/cマウスに、妊娠14, 15, 16, 17, 18日目に、腹腔内注射した。生後16日目に子マウスの骨髄細胞、脾細胞、胸腺細胞をFACSにて解析

したところ、R4を腹腔内注射したマウスの子マウスの10匹中6匹の骨髄中のリンパ球分画内の細胞数が減少していた（Table 1)。これらのマウスは、体重も他より少なかった（Table 1)。しかし、脾細胞、胸腺細胞の細胞数、細胞構成は他と差異が認められなかった。

＜R4抗原の発現と性状＞

FACS解析によると、R4抗原は、線維芽細胞、ストローマ細胞株（ST2, PA6, *op/op* fibroblast line, NIH3T3, L929)、B細胞株(70Z/3, M12, WEHI231, Dw8)で発現し、T細胞株（EL4, LSTRA, YAC-1)、正常骨髄細胞、正常脾細胞、正常胸腺細胞では発現していなかった(Table 2)。

R4抗原を多く発現していたM12細胞で、免疫沈降し、SDS-PAGE解析を行った結果、R4抗原は、還元、非還元条件下共に、55kDaの単一バンドとして認められた。

考察

R4による骨髄B細胞増殖の抑制機構について、いくつかの可能性が考えられる。まず、R4が細胞を、非特異的に傷害した可能性がある。これは、R4がストローマ細胞の形態や、R4抗原を発現する70Z/3の増殖に影響しないこと、R4が、ストローマ細胞依存性骨髄球系細胞増殖を抑制しないことより否定的である。つぎに、R4がB細胞と、ストローマ細胞との接着を阻害した可能性がある。これは、R4が、B細胞と、ストローマ細胞との直接接触を阻害した条件でのB前駆細胞増殖を抑制すること、R4抗原が、B細胞と、ストローマ細胞との接着に関与する分子と分子量が異なることより否定的である(9,10)。3番目に、R4抗原(p55)が、B前駆細胞増殖に関与する、または、ストローマ細胞の、B前駆細胞増殖支持能を変化させるサイトカインのレセプターである可能性がある。SCFおよび、IL-7は、B前駆細胞増殖を支持するサイトカインである。IL-7レセプターは、分子量、LSTRA細胞株での発現(13)、SCFレセプターは、分子量がp55と異なる。B前駆細胞増殖を抑制するTGF-βは、ストローマ細胞依存性骨髄球系細胞増殖をも抑制し、R4の作用と異なり、p55は、TGF-βレセプターと異なると考えられる。B前駆細胞増殖を抑制すると報告されているG-CSF, M-CSF, IL-4のレ

セプターは、分子量、GM-CSFのレセプターはLSTRAでの発現(14)、IL-1のレセプターは70Z/3、fibroblast細胞株での発現(15)が、p55と異なる。4番目に、p55は、B前駆細胞増殖を支持するサイトカインの膜型である可能性がある。p55は、B細胞初期分化に関与する膜型サイトカインであるSCFと分子量が異なる。最後に、R4のストローマ細胞との結合が、SCFやIL-7の分泌を抑制したり、TGF-β、IL-1, IL-4, CSFなどのB前駆細胞増殖を抑制する分子の分泌を誘導する可能性がある。

R4を腹腔内注射したマウスの子マウスの10匹中6匹の骨髄中のリンパ球分画内の細胞数が減少していた。この結果は、R4がin vivoでもB前駆細胞増殖を抑制することを示す。しかし、これらのマウスは、体重も他より少なかったことより、R4が他の臓器にも作用することが示唆される。

以上より、p55は、B細胞初期分化に関与する新しい分子である可能性がある。

Summary

We produced a mAb, R4, to a stromal cell line, ST2 which could support *in vitro* B lymphopoiesis. R4 recognized a 55 kDa cell-surface protein(p55). FACS analysis with R4 revealed that p55 is expressed on several stromal cell lines, fibroblast cell lines and some B cell lines, but not on freshly isolated bone marrow cells, spleen cells, thymus cells, and T cell lines. R4 inhibited the generation of B cell progenitors from bone marrow supported by some stromal cell lines, but not stromal cell-dependent myelopoiesis. R4 inhibited the growth of a stromal cell-dependent pre-B cell line but not stromal cell-independent B cell lines expressing R4 antigen. R4 did not affect the growth of those stromal cell lines. The proliferation of B cell progenitors was observed even under the condition in which bone marrow cells were separated from stromal cells with a membrane filter and R4 also inhibited B lymphopoiesis in this condition. Furthermore, treatment of pregnant mice by R4 resulted in reduction of B cell progenitors in the bone marrows of newborn mice.

Reference

1. Whitlock, C. A., and O. N. Witte. Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow. Proc. Natl. Acad.Sci. USA. 79:3608-3612, 1982.
2. Whitlock, C. A., G. F. Tidmarsh, C. Muller-Sieburg, and IL. Weissman. Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule. Cell 48:1009-1021, 1987.
3. Nishikawa, S. I., M. Ogawa, S. Nishikawa, T. Kunisada, and H. Kodama. B lymphopoiesis on stromal cell clone: stromal cell clones acting on different stages of B cell differenciation. Eur. J. Immunol. 18:1767-1771, 1988.
4. Namen, A. E., S. Lupton, K. Hjerrild, J. Wagnall, D. Y. Mochizuki, A. Schmierer, B. Mosley, C. March, D. Urdal, S. Gillis, D. Cosman, and R. G. Goodwin. Stimulation of B cell progenitors by cloned murine interleukin-7. Nature 333:571573, 1988.

5. Sudo, T., M. Ito, Y. Ogawa, M. Iizuka, H. Kodama, T. Kunisada, S. I. Hayashi, M. Ogawa, K. Sakai, S. Nishikawa, and S. I. Nishikawa. Interleukin 7 production and function in stromal cell-dependent B cell developement. J. Exp. Med. 170:333-338, 1989.

6. Zsebo, K. M., J. Wypych, I.K. Mcniece, H. S. Lu, K. A. Smith, S. B. Karkare, R. K. Sachdev, V. N. Yuschenkoff, N. C. Birkett, L. R. Williams, V. N. Satyagal, W. Tung, R. A. Bosselman, E. A. Mendiaz, and K. E. Langley. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. Cell 63:195-201, 1990.

7. Anderson, D. M., S. D. Lyman, A. Baird, J. M. Wignall, J. Eisenman, C. Rauch, C. J. March, H. S. Boswell, S. D. Gimpel, D. Cosman, and D. E. Williams. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. Cell 63:235-243, 1990.

8. Mcniece, I. K., K. E. Langley, and K. M. Zsebo. The role of recombinant stem cell factor in early B cell development: synergistic interaction with IL-7. J. Immunol. 146:3785-3790, 1991.

9. Miyake, K., C. B. Underhill, J. Lesley, and P. W. Kincade. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. J. Exp. Med. 172:69-75, 1990.

10. Miyake, K., I. L. Weissman, J. S. Greenberger, and P. W. Kincade. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. J. Exp. Med. 173:599-607, 1991.

11 Yoshida, H., S. I. Hayashi, T. Kunisada, M. Ogawa, S. Nishikawa, H. Okamura, T. Sudo, L. D. Shultz, and S. I. Nishikawa. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. Nature 345:442-444, 1990.

12. Dexter, T. M., T. D. Allen, and L. G. Lajtha. Conditions controlling the proliferation of

haemopoietic stem cells in vitro. J. Cell. Physiol. 91:335-344, 1976.

13. Park, L. S., D. J. Friend, A. E. Schmierer, S. K. Dower, and A. E. Namen. Murine interleukin 7 (IL-7) receptor: characterization on an IL-7-dependent cell line. J. Exp. Med. 171:1073-1089, 1990.

14. Park, L. S., D. Friend, S. Gillis, and D. L. Urdal. Characterization of the cell surface receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J. Biol. Chem. 261:4177-4183, 1986.

15. Chizzonite, R., T. Truitt, P. L. Kilian, A. S. Stern, P. Nunes, K. P. Parker, K. L. Kaffka, A. O. Chua, D. K. Lugg, and U. Gubler. Two high-affinity interleukin 1 receptors represent separate gene products. Proc. Natl. Acad.Sci. USA. 86:8029-8033, 1989.

Table 1. *In vivo* effect of R4.

Mother	Treatment	Offspring	Body Weight (g)	B Cells in B. M. (%)
1	Saline	1	7.0	48
		2	7.0	50
		3	7.0	44
2	R26	1	10.0	42
		2	9.0	44
		3	10.0	46
		4	10.0	45
		5	10.0	42
3	R4	1	6.0	**5**
		2	6.0	**6**
		3	7.0	**4**
		4	8.0	25
		5	8.0	35
4	R4	1	5.0	**8**
		2	6.0	**7**
		3	7.0	**12**
		4	10.0	37
		5	10.0	39

Table 2. FACS analysis of various cells and cell lines with R4.

Cells	Type	staining
ST2	Stromal	+
op/op fibroblasts	Stromal, Fibroblast	+
PA6	Stromal	+
L929	Fibroblast	+
NIH-3T3	Fibroblast	+
70Z/3	Pre-B	+
DW8	Pre-B	+
M12	B	+
WEHI231	B	+/-
EL4	T	-
LSTRA	T	-
YAC-1	T	-
Bone marrow cells	---	-
Spleen cells	---	-
Thymus cells	---	-

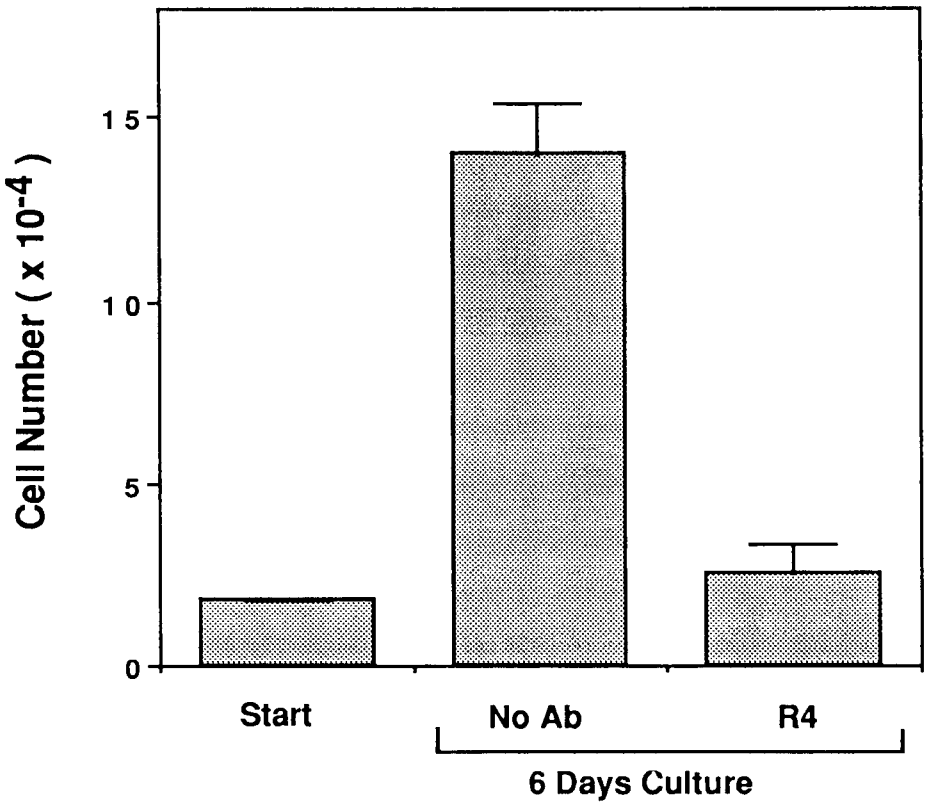

Figure 1. Effect of R4 on B lymphopoiesis supported by ST2.

Data are presented as cell numbers of $B220^{+}$ $Mac1^{-}$ cells.

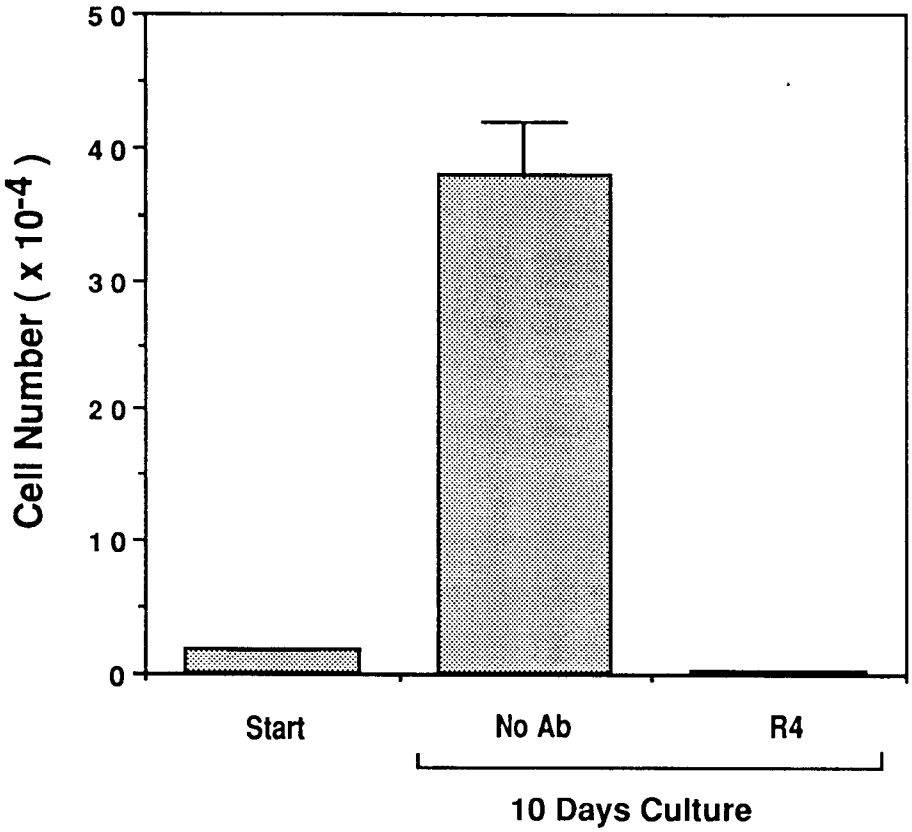

Figure 2. Effect of R4 on B lymphopoiesis supported by *op/op* fibroblast line with IL-7. Data are presented as total cell numbers.

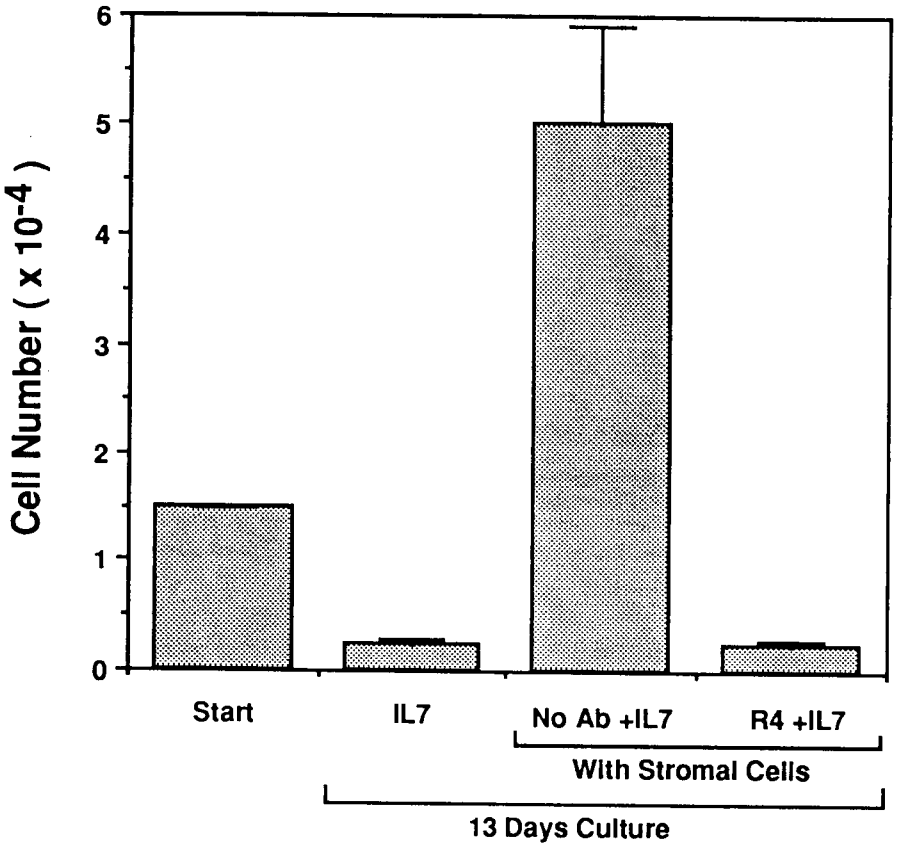

Figure 3. Effect of R4 on generation of B cell progenitors on *op/op* fibroblast line layers which were physically separated from bone marrow cells by the membranes. Data are presented as total cell numbers.