



Title	Regulation of human B lymphopoiesis by the TGF β superfamily in a newly established co-culture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment
Author(s)	一井, 倫子
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48863
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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

氏名	いち い みち こ 井 倫 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 2 1 8 2 6 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Regulation of human B lymphopoiesis by the TGF β superfamily in a newly established co-culture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment (ヒト間葉系幹細胞を用いたヒト B リンパ球新規共培養系の確立と TGF β スーパーファミリーによる B リンパ球分化調整機構の検討)
論文審査委員	(主査) 教 授 金 倉 謙 (副査) 教 授 平 野 俊 夫 教 授 竹 田 潔

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

今までに文献的に報告されたヒト B リンパ球培養系は、ほとんどがマウスの支持細胞を用いており、異種細胞を用いない B リンパ球培養系は、未だに確立されていない。しかし、interleukin-7 (IL-7) の必要性などがヒトとマウスで異なるなど、マウスの研究での理解をそのままヒトのリンパ球分化に適応できない点も明らかにされており、ヒト独自の B リンパ球産生機構に焦点を当てた培養系の確立が求められている。

本研究において、私は、成人ヒト骨髄由来の培養間葉細胞 (hMSC) を支持細胞として用いることにより、異種細胞を用いないヒト B リンパ球培養系を確立した。さらに、確立された培養系を用いて、TGF β スーパーファミリーのヒト B リンパ球産生への関与について検討を行った。

【方法ならびに成績】

hMSC のヒト B リンパ球分化支持能を検討するために、ヒト血管内皮細胞 (HUVEC)、マウス支持細胞である MS-5 との比較を行った。hMSC を支持細胞とした共培養系において、臍帯血 CD34 陽性細胞から CD19 陽性細胞が最も効率良く出現した。次に、至適 cytokine の組み合わせを検討するため、IL-7、flt-3 ligand (FL)、stem cell factor (SCF) を組み合わせて共培養を行った。その結果、複数の cytokine、特に SCF の添加によって細胞増殖が向上することが判明した。培養 2-3 週にかけて、骨髓球系、CD33 陽性細胞がピークを迎え、その後培養 4 週以降に CD10 陽性の B リンパ球系細胞が出現することも確認できた。本培養系で生じた細胞は、CD19 陽性であり、一部は CD20 や IgM 陽性を示した。IL-7 を加えた場合、IgM 陽性細胞の出現が著明に低下した。以上より、SCF と FL 存在化で hMSC を支持細胞として用いた共培養系がヒト B リンパ球支持機構の解析に優れていると考えられた。実際、本培養系では、2000 個の臍帯血 CD34 陽性細胞から、約 5×10^5 個の CD10 陽性細胞、IgM 陽性細胞に関しては、最大で、CD19 陽性細胞の 10.7%、実数にして 1.9×10^5 個が産生された。

本共培養系にマウス B リンパ球産生に関わるとされる分子の阻害剤を添加し、産生される B リンパ球を解析したと

ころ、Wntの賦活剤である BIO を添加すると、CD10 陽性細胞優位に産生が抑制された。また、ALK4/5/7 阻害剤である SB 431542 により、約 11 倍の B リンパ球が産生された。さらに、TGF β ファミリーのヒト B リンパ球産生への関与について解析を進めたところ、TGF β 1 蛋白添加により、CD10 陽性細胞の産生は有意に抑制された。また、Activin A 中和抗体や Activin A の生理的阻害分子 follistatin を添加すると、CD33 陽性細胞の産生は特に影響を受けなかったのに対し、CD10 陽性細胞の出現が著明に促進された。この TGF β ファミリーによるヒト B リンパ球特異的産生抑制作用は、CD34 陽性細胞の中でもより幼弱な細胞群に認められると考えられた。即ち、CD34 陽性細胞を、CD38(-)・CD38(+)CD10(-)・CD38(+)CD10(+) 細胞に分割し、培養を行ったところ、CD38(-)・CD38(+)CD10(-) 細胞群で、CD10 陽性細胞の Activin A 中和抗体による CD10 陽性細胞産生促進が認められた。さらに、限界希釈法を用いた解析から、TGF β ファミリーの B リンパ球産生抑制原因の 1 つが B リンパ球を産生するクローン数の減少であることが確認された。一方、immature B 細胞の分化に関しては、TGF β ファミリーによる影響は認められなかった。以上より、TGF β ファミリー分子がヒト B リンパ球初期分化の段階で負の制御を示すと考えられた。

RT-PCR、ELISA を用いた検討から、hMSC や骨髄で Activin A・TGF β 1 の発現が認められること、CD34 陽性細胞が TGF β 受容体を発現していることが確認された。

[総括]

異種細胞を用いない新しいヒト B リンパ球共培養系を確立した。この共培養系を用いて、TGF β スーパーファミリーのヒト B リンパ球産生抑制作用を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本論文では、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を支持細胞とし、異種細胞を用いない新たなヒト B リンパ球培養系を確立した。この培養系を用いて、TGF β スーパーファミリー (Activin A、TGF β 1、BMP4) のヒト B リンパ球産生抑制作用についての検討を行い、B リンパ球抑制作用は、Activin A が TGF β 1 より強く、BMP4 は影響を示さないことを明らかにした。

本培養系では、十分な B リンパ球産生が容易であり、血球幹細胞レベルから、immature B 細胞までの分化の過程の検討が可能である。今後、この培養系を用いて、新規薬剤の B リンパ球産生への影響の評価や、正常 B リンパ球初期分化の解析だけでなく、白血病や多発性骨髄腫など B リンパ球系悪性疾患の癌幹細胞の解析にも有用な培養系として活用できると考えられる。

本研究により確立された培養系の学術的意義は高く、またその応用範囲は極めて広いため、学位の授与に値すると考えられる。