

Requirement of Interleukin 3 for the Differentiation and Growth of Murine NK Lineage Cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8024

マウス natural killer 細胞の分化誘導におけるインターロイキン 3 (IL3) の役割 : IL3, IL2 相互作用の解析

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

犀 川 太

(昭和63年2月20日受付)

マウス骨髄細胞及び脾細胞からヒト組み換えインターロイキン 2 (human recombinant interleukin 2, IL2) によって誘導される細胞障害活性に対する高純化マウスインターロイキン 3 (mouse interleukin 3, IL3) の影響について検討し, さらに, 免疫不全マウスを用いて, その作用機序についても検討した。まず, CB-17 マウス (正常マウス), 重症複合免疫不全マウス (mice with severe combined immunodeficiency, SCID マウス) 及びヌードマウス (Nude mice, Nude マウス) の骨髄細胞を IL2 及び IL3 の存在下で 5 日間培養し, 培養後の骨髄細胞の表面マーカーを検索した。IL2 の添加により, Thy-1 陽性細胞および asialo-GM₁ (aGM₁) 陽性細胞の比率が増加し, IL2+IL3 の添加ではさらにその比率が増加した。増加した細胞はその表面マーカーの特徴からナチュラル・キラー細胞 (natural killer cell, NK 細胞) と考えられた。つぎに IL2 および IL3 添加培養後の骨髄細胞および脾細胞の細胞障害活性を 4 時間 ⁵¹Cr-release 法にて検討した。すべてのマウス骨髄細胞から, IL2 の添加により細胞障害活性が誘導され, その活性は IL2 の濃度依存性に増強した。IL2 (50 U/ml) の存在下に IL3 を添加すると, 誘導される細胞障害活性は IL2 単独添加に比し有意 ($p < 0.05$) に増強し, その増強は IL3 濃度依存性であった。しかし, IL3 単独添加では細胞障害活性は誘導されなかった。一方, 脾細胞ではいずれのマウスにおいても IL2 により増強された細胞障害活性は IL3 の添加によって影響されなかった。次に脾臓内の成熟 NK 細胞を除去する目的で, 前処置として抗 aGM₁ 血清を *in vivo* 投与したマウス脾細胞を用いて検討した。抗 aGM₁ 血清投与群では, いずれのマウス脾細胞においても IL2 により誘導された細胞障害活性は IL3 の添加によって増加傾向を示し, その増加は IL3 濃度依存性であった。さらに, 5-fluorouracil (5-FU) を *in vivo* 投与したマウス骨髄細胞を用いて, より未熟な段階の骨髄細胞からの細胞障害活性誘導を検討した。5-FU 投与後 1 日目および 2 日目の骨髄細胞からは, 高濃度の IL2 を添加培養しても細胞障害活性は誘導されなかったが, IL2 の存在下に IL3 を添加することによりはじめて細胞障害活性が誘導された。5-FU で処理した SCID マウスの骨髄細胞を用いても同じ結果が得られた。IL3 の細胞障害活性増強の作用機序を解明する目的で, T・B 両リンパ球の影響を認めない SCID マウスの骨髄細胞を IL2 及び IL3 存在下に培養し, ラット抗マウス IL2 レセプター単クローン抗体 (7D4) を用いて IL2 レセプターの発現を経時的に調べた。IL2 単独添加では, 培養開始 36 時間後より IL2 レセプター陽性細胞の比率が増加したのに対して, IL2+IL3 添加では培養開始 24 時間後にはすでに明らかな IL2 レセプター陽性細胞の増加が認められた。また, 単独添加にても, IL2 単独添加より早期に IL2 レセプター陽性細胞の増加が認められた。以上の結果から, IL2 により骨髄細胞から細胞障害活性が誘導され, その活性を有する細胞は表面マーカーの特徴より NK 細胞と考えられた。そして, IL3 は骨髄および脾に存在する NK 前駆細胞に作用し, IL2 レセプターを発現させ, その結果として NK 細胞の増殖・分化に対する IL2 の作用を増強させることが示唆された。この増強作用は T 及び B リンパ球を介した二次的作用の可能性は少ないと考えられた。

Key words interleukin 2, interleukin 3, differentiation of natural killer cells, mice with immunodeficiency disease, IL2 receptor

Abbreviations: aGM₁, asialo-GM₁; BM, bone marrow; CM, complete medium; CTLL-2, murine IL2-dependent cytotoxic T cell line; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay;

インターロイキン 3 (interleukin 3, IL3) は、はじめ Ihle ら¹⁾によってヌードマウス脾臓中に 20- α -hydroxysteroid dehydrogenase (20- α -SDH) を誘導する分子量 28000 の糖蛋白として精製された²⁾³⁾が、後に造血系の多能性幹細胞や造血前駆細胞の増殖、分化を促す重要な因子であることが認められ⁴⁾, multi-colony stimulating factor (multi-CSF) または IL3 の名称が与えられるようになった。IL3 の標的細胞は、多能性幹細胞および顆粒球、マクロファージ、好酸球、好塩基球、肥満細胞、巨核球や赤血球の前駆細胞であり⁵⁾、これまで主として造血系細胞の増殖因子として注目されてきたが、さらに最近ではマウスにおいて、Miura⁶⁾、Hattori ら⁷⁾によりナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞の分化にも IL3 が関与することが明らかにされている。一方、骨髓細胞を *in vitro* でインターロイキン 2 (interleukin 2, IL2) の存在下に培養すると、細胞障害活性を有する NK 細胞が誘導されることが報告されている^{8)~10)}。Kalland¹¹⁾は、この IL2 の NK 細胞誘導作用に対し IL3 が抑制的に働くと報告した。Miura らが用いた幹細胞コロニー法による NK 細胞の分化⁶⁾あるいは NK 細胞株の樹立⁷⁾には IL3 は必要因子であり、他方、Kalland によると細胞障害活性の誘導に対しては IL3 は抑制因子である¹¹⁾という互いに反する作用が報告されている。これは、NK 細胞が T リンパ球、B リンパ球、およびマクロファージ等の免疫担当細胞と並んで相互に複雑なネットワークを形成している¹²⁾¹³⁾ことに起因するものかもしれない。いずれにしても、IL3 の NK 細胞に対する作用機序として一定の結論が得られていない。今回、IL3 がマウス骨髓細胞からの細胞障害活性の誘導にどのように関与しているかを追求した。さらに、その作用機序に及ぼす T・B リンパ球の影響を調べるために、成熟 T リンパ球を欠如した Nude マウス、あるいは T・B 両リンパ球を欠く重症複合免疫不全マウス¹⁴⁾ (SCID マウス) を用いて検討し、新しい知見を得たので報告する。

材料および方法

I. マウス

Bosma 博士 (The Institute for Cancer Research, Philadelphia, PA) より供与された CB-17+/+ (CB-17) および、その mutant である CB-17 scid/scid (重

症複合免疫不全マウス, mice with severe combined immunodeficiency, SCID)¹⁴⁾は金沢大学動物実験施設のアイソレーションケージにて無菌的に飼育し、8-16 週齢のものを使用した。また、BALB/c nu/nu (Nude) (静岡動物実験農業協同組合より購入) は 8 週齢のものを使用した。

II. SCID マウスの同定

マウス血清中の免疫グロブリンを enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によって測定し、2 μ g/ml 以下のマウスを SCID マウスとしてもちいた。まず、マウス尾静脈より毛細管にて採血遠心し血清を得た。次に、pH 9.6 の 0.02% アジ化ナトリウム含有 0.05 M 炭酸緩衝液でヤギ抗マウス免疫グロブリン (IgG+IgA+IgM) 抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD) を 1/2000 に希釈し、E.I.A. 用 96 穴平底マイクロタイトレーションプレート (Flow laboratories Inc., McLean, VA) に 0.15 ml ずつ加えて室温で 2 時間 coating した。ついで、0.02% アジ化ナトリウム含有リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBSA) に 0.05% Tween 20 (Sigma) を加えた PBSA-Tween で 3 回洗浄し、1% FBS 加 PBSA-Tween で段階希釈したマウス被検血清を 0.1 ml ずつ加えて 2 時間室温で反応させた。反応終了後 PBSA-Tween で 3 回洗浄し、さらに、1% FBS 加 PBSA-Tween で 1/200 希釈したフォスファターゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン (IgG+IgA+IgM) 抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) を 0.1 ml ずつ加えて室温で 2 時間反応させた。その後、PBSA-Tween で 3 回洗浄し、最後に pH 9.8 のジエタノールアミン緩衝液で p-nitrophenyl phosphate (Sigma) を 1 mg/ml に調整し、0.1 ml ずつ加えて室温で 8-12 時間反応発色させた。呈色反応を吸光度計 EAR400 (Sit-labinstruments, Austria) により波長 492 nm で測定し、既知濃度の標準血清 (マウス IgG 抗体) (Sigma) より被検マウス血清免疫グロブリン濃度を算出した。

III. 骨髓細胞及び脾細胞の分離

骨髓細胞は、まず上記マウスをエーテル麻酔下に頸椎脱臼法にて屠殺し、その後大腿骨及び脛骨を取り出し、21G の針を用いてこの針先を回しながら骨の両端に穴をあけた。ここよりプラスチック試験管内へ以下に記す、complete medium (CM) を、骨を通して強

E/T, effector to target ratio; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; 5-FU, 5-fluorouracil; IL2, interleukin 2; IL3, interleukin 3; NK, natural killer; PBS, phosphate buffered saline; sIg, surface immunoglobulin; SCID, severe combined immunodeficiency.

く押し出し骨髓細胞塊を得た。これにさらに CM を加えてプラスチック試験管を強く振盪し、またはパストゥールピペットにてピペッティングし、細胞塊をほぐした後、CM にて 2 回洗浄後再浮遊して用いた。脾細胞は、マウス脾臓を無菌下にステンレスメッシュ上で細切濾過し、CM にて 2 回洗浄後再浮遊して用いた。一部の実験では抗 asialo-GM₁ (aGM₁) 血清 (和光純薬, 大阪) 30 μ l をマウス尾静脈より 3 日間連続静注し、その翌日取り出した脾細胞、及び 5-fluorouracil (5-FU, 協和酸酵, 東京) 150 mg/kg を一回静注後のマウス骨髓細胞を用いた。CM はペニシリン (200 U/ml), ゲンタマイシン (10 μ g/ml), 0.02 M HEPES 緩衝液 (GIBCO, Grand Island, NY), 50 μ M 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol, 2-ME), 10% 非動化牛胎児血清 (heat-inactivated fetal bovine serum, FBS, GIBCO) を含む RPMI 1640 (GIBCO) 培養液である。

IV. 培養条件

2.5-5 \times 10⁶/ml の骨髓細胞及び脾細胞浮遊液を 96 穴丸底マイクロプレート (Corning Glass Works, Corning, NY) に 0.2 ml ずつ分注し、ヒト組換えインターロイキン 2 (recombinant interleukin 2, IL2) (塩野義製薬, 大阪) (最終濃度 10-5000 U/ml) 及び高純化マウスインターロイキン 3 (highly purified mouse interleukin 3, IL3) (Ihle 博士, National Cancer Institute, より供与) (最終濃度 50-100 U/ml) を添加し、炭酸ガス培養器 (37°C, 5% CO₂) 内にて 3-7 日間培養し、エフェクター細胞とした。また、培養に際しては 2-3 日毎に半量 (0.1 ml) ずつ新しいリンホカイン添加 CM と交換した。

V. 細胞障害活性の測定

細胞障害活性は標的細胞として NK 感受性細胞であるマウスリンパ腫由来の YAC-1 細胞 (大日本製薬株式会社より購入) を用い 4 時間 ⁵¹Cr-release assay¹⁵⁾ にて行った。まず、標的細胞を Na₂⁵¹Cr O₄ (New England Nuclear, Boston, MA) でラベルした後、CM で 5 \times 10⁴/ml に調節した。上記のエフェクター細

胞 (0.2 ml) のはいった 96 穴丸底マイクロプレートの各穴より 0.06 ml ずつ上清を静かに吸い上げて捨て、軽くピペッティングした後、そこに標的細胞を 0.1 ml ずつ分注し、エフェクター細胞:標的細胞比を 100:1 または 200:1 とした。25 \times G, 5 分間遠心後 37°C, 5% CO₂ 下で 4 時間培養し、ハーベスティングフレーム (Skatron, Norway) に吸収された上清中の ⁵¹Cr 放出量をガンマシンチレーションカウンター ARC-501 (アロカ, 東京) で測定した。%細胞傷害能 (% Cytotoxicity) は以下の式で算出した。

$$\% \text{Cytotoxicity} = \frac{[\text{cpm}(\text{experimental release}) - \text{cpm}(\text{spontaneous release}) / \text{cpm}(\text{maximum release}) - \text{cpm}(\text{spontaneous release})]}{\text{cpm}(\text{maximum release}) - \text{cpm}(\text{spontaneous release})} \times 100$$

maximum release は 1% トリトン X 0.1 ml を標的細胞 0.1 ml に添加した時の ⁵¹Cr 最大放出量を、spontaneous release は CM 0.1 ml を添加した時の ⁵¹Cr 自然放出量を示した。

VI. リンホカインに対する反応

2.5 \times 10⁶/ml の骨髓細胞及び脾細胞浮遊液を 96 穴平底マイクロプレート (Corning) に 0.2 ml ずつ分注し、IL2 (500 U/ml) 及び IL3 (50-100 U/ml) を添加し 72 時間または 96 時間培養した。培養終了 24 時間前に ³H 標識チミジン (tritiated thymidine, ³H-TdR) (New England Nuclear) を 0.2 μ Ci 添加し、液体シンチレーションカウンター LPS-700 (アロカ) にて ³H-TdR の取り込みを測定した。

VII. 細胞表面マーカーの検索

骨髓細胞及び脾細胞を下記に示すフルオレセイン・イソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗体を用いた直接及び間接免疫蛍光法で解析した。直接免疫蛍光法は FITC 標識の抗 Thy-1.2 (マウス T 細胞抗原)¹⁶⁾, 抗 Lyt-1 (マウス T 細胞分化抗原)¹⁶⁾¹⁷⁾, 抗 Lyt-2 (マウス T 細胞分化抗原)¹⁶⁾¹⁷⁾ 抗体 (以上 Becton Dickinson, Mountain View, CA) および FITC 標識ヒツジ抗マウス免疫グロブリン抗体 (Janssen, Beerse, Belgium) を用いた。間接蛍

Table 1. Surface phenotype of bone marrow cells

mice	% Positive cells ^a						
	Thy-1	aGM ₁	Lyt-1	Lyt-2	L3T4	sIg	Mac-1
CB-17	2.8	5.3	1.6	1.0	0.8	9.1	70.9
SCID	2.6	5.7	0.1	0.3	0.4	0.1	89.5
Nude	1.1	6.4	0.3	0.1	ND	20.0	60.0

^a The percentage of cells expressing surface antigen was analyzed by a flow cytometry. SCID, severe combined immunodeficiency; aGM₁, asialo-GM₁; sIg, surface immunoglobulin; ND, not determined.

光抗体法は一次抗体として抗 L3T4 抗体¹⁸⁾ (マウスヘルパー-T 細胞分化抗原) (Becton Dickinson), 抗 asialo-GM₁¹⁹⁾ (マウス NK 細胞関連抗原) 血清 (和光純薬), 抗 Mac-1²⁰⁾ (マクロファージ, 顆粒球, 骨髄細胞, NK 細胞関連抗原) 抗体 (Hybritech Incorporated, San Diego, CA) およびラット抗マウス IL-2 レセプター抗体²¹⁾ (7D4 抗体, 湊博士, 自治医科大学, より供与) を用い, 二次抗体に FITC 標識ヒツジ抗ラット IgG および IgM 抗体および FITC 標識ヒツジ抗ウサギ (IgG+IgA+IgM) 抗体 (以上 Cappel, Malvern, PA) を用いた。解析は, レーザーフローサイトメーター-Spectrum III (Ortho Diagnostic Systems Inc., Westwood, Mass) を使用した。

VIII. 統計学的処理

細胞障害活性の比較検討に際して, 得られた成績の正規性が不明なため, その平均値の差の検定には 2 群の場合は順位和検定法 (Wilcoxon ranksum test) を用い, 3 群以上の場合は Kruskal-Wallis 検定法を用いた。危険率 5% 以下を有意差ありとし, 危険率 10% 以下を傾向ありと判定した。

成 績

I. マウス骨髄細胞及び脾細胞の表面マーカー

CB-17, SCID および Nude マウスの骨髄細胞及び脾

細胞の表面マーカーを検索した (表 1, 2)。CB-17 マウス骨髄中には, 僅かながら, T リンパ球のマーカーをもつ Lyt-1, Lyt-2, L3T4 陽性細胞と, 約 10% 程度の成熟 B リンパ球のマーカーである細胞表面免疫グロブリン (surface immunoglobulin, sIg) 陽性細胞が存在したが, SCID マウスではその両方を欠如し, Nude マウスでは T リンパ球の欠如により相対的な B リンパ球の増加が認められた。成熟 NK 細胞を示す aGM₁ 陽性細胞は, いずれのマウスとも約 5% に認められた。一方, 脾臓では, CB-17 マウスでは大部分を T リンパ球及び B リンパ球が占め, aGM₁ 陽性細胞は 7.2%, SCID マウスでは T, B 両リンパ球を欠き, aGM₁ 陽性細胞は 26.3%, Nude マウスでは T リンパ球を欠き大部分が B リンパ球で, aGM₁ 陽性細胞は 25.9% であった。SCID および Nude マウスでは, 脾臓中の aGM₁ 陽性細胞の比率は相対的に高かったが, SCID, Nude マウスの脾臓より得られた細胞数は CB-17 に比して少なく, 絶対数はいずれのマウスも同程度と考えられた。

II. IL2 による骨髄細胞及び脾細胞からの細胞障害活性の誘導

まず, IL2 非刺激によるマウス新鮮骨髄細胞及び脾細胞の YAC-1 細胞に対する細胞障害活性を測定した (表 3)。骨髄細胞ではいずれのマウスも細胞障害活性は低く, 10% 以下であった。脾細胞では, SCID および

Table 2. Surface phenotype of spleen cells

mice	% Positive cells ^a				
	Thy-1	aGM ₁	Lyt-1	Lyt-2	sIg
CB-17	32.1	7.2	28.8	9.8	57.0
SCID	13.7	26.3	0.3	0.8	0.9
Nude	5.5	25.9	0.9	0.8	75.3

^a The percentage of cells expressing surface antigen was analyzed by a flow cytometry. SCID, severe combined immunodeficiency; aGM₁, asialo-GM₁; sIg, surface immunoglobulin.

Table 3. Cytotoxic activity of fresh bone marrow cells and spleen cells

mice	% Cytotoxicity ^a	
	Bone marrow cells ^b	Spleen cells ^c
CB-17	2.5	6.8
SCID	9.2	18.5
Nude	4.5	20.2

^a Percent cytotoxicity was measured by a 4-hr ⁵¹Cr-release assay using YAC-1 cells as targets. Effector: target ratio=100:1.

^{b, c} Bone marrow cells and spleen cells were prepared from pooled bone marrow or spleens of two or three mice.

SCID, severe combined immunodeficiency.

Nude マウスにおいては CB-17 マウスよりも有意に細胞障害活性は高く、脾臓中の aGM₁ 陽性細胞の比率の高さを反映しているものと考えられた。

つぎに、 5×10^5 /well の骨髄細胞 (2.5×10^6 /ml, 0.2 ml/well) に 10 U/ml-5000 U/ml の濃度の IL2 を添加して 7 日間培養し、培養 3 日, 5 日, 7 日目の骨髄細胞より誘導される細胞障害活性を調べた (図 1)。同様に脾細胞にも IL2 を添加し、IL2 による細胞障害活性の増強を調べた。いずれのマウスにおいても、細胞障害活性は骨髄細胞、脾細胞ともに IL2 濃度依存性に増強し、培養 3-5 日目で最高を示し、以後低下した。しかし、IL2 の濃度が 500 U/ml 以上では、5000 U/ml まで高濃度の IL2 を加えても活性はそれ以上増強されず、プラトーまたはやや減少の傾向を示した。以上の結果より以後の実験は IL2 を最終濃度 50 U/ml とし、5 日間培養で行った。

III. リンホカイン刺激によるチミジンの取り込み

IL2 及び IL3 に対する反応性を調べるために、 5×10^6 個の骨髄細胞または脾細胞に、IL2 及び IL3 を添加し 3 日間培養後のチミジンの取り込みを検討した (表 4)。CB-17 および SCID マウス骨髄細胞では、IL2 あるいは IL3 の添加によりチミジンの取り込みは増加し、IL2+IL3 添加で最も高い取り込みを示した。また、SCID マウスの脾細胞でも IL2 あるいは IL3 の添加によりチミジンの取り込みは増加し、SCID マウスの脾臓には T, B リンパ球以外にも IL2 あるいは IL3 に反応する細胞群の存在が示唆された。

IV. IL2 により誘導される細胞障害活性に対する IL3 の影響

5×10^5 /well (2.5×10^6 /ml, 0.2 ml/well) の骨髄細胞または脾細胞を IL2 (50 U/ml) 存在下に 50-100 U/ml の濃度の IL3 を添加し、5 日間培養後の細胞障

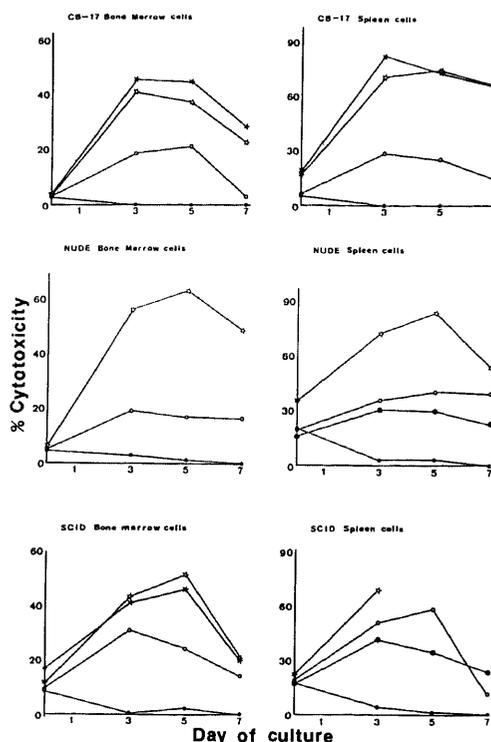


Fig. 1. Kinetics of recombinant human interleukin 2 (IL2) on the cytotoxic activity of cultured bone marrow cells and spleen cells from CB-17, Nude, and SCID mice. Bone marrow or spleen cells from each mouse were cultured for 3 to 7 days without (●-● medium alone) or with the four different concentrations of IL2 (*-*, 10 U/ml; ○-○, 50 U/ml; ☆-☆, 500 U/ml; ★-★, 5000 U/ml). At the point of 0, 3, 5, and 7 days of culture, percent cytotoxicity was measured by a 4-hr ⁵¹Cr-release assay using YAC-1 cells as targets. Effector to target ratio was 100:1. SCID, severe combined immunodeficiency.

Table 4. Proliferation of bone marrow cells(BMCs) and spleen cells(SPLs)

	Incorporated [³ H]thymidine (cpm)			
	medium	IL2	IL3	IL2+IL3
CB-17 BMCs	3738 ± 313	7169 ± 979	11832 ± 731	13554 ± 978
SCID BMCs	2441 ± 200	8956 ± 709	8606 ± 770	11865 ± 1305
CB-17 SPLs	368 ± 199	4255 ± 796	ND	ND
SCID SPLs	380 ± 120	5101 ± 892	740 ± 80	4692 ± 346

BMCs or SPLs (5×10^6 cells) were cultured for 3 days in microculture plates with IL2 (500 U/ml), IL3 (50 U/ml), or both. At 24 hr before harvest, $0.2 \mu\text{Ci}$ [³H]thymidine was added and the uptake of [³H]thymidine/well was measured. The data are shown as the mean ± S.D. of triplicate cultures.

IL2, recombinant human interleukin 2; IL3, highly purified mouse interleukin 3; SCID, severe combined immunodeficiency; ND, not determined.

害活性を調べた(図2)。CB-17 マウス骨髄細胞では、IL2 により誘導される細胞障害活性は IL3 の添加により有意に増強され ($p < 0.05$)、その増強は IL3 濃度依存性であった。Nude および SCID マウス骨髄細胞でも同様な傾向が認められた。一方、脾細胞では IL3 による増強は認められなかった(図3)。尚、IL3 単独では骨髄細胞および脾細胞から細胞障害活性を誘導できなかった。

V. IL2 及び IL3 添加培養における骨髄細胞表面マーカーの変化

各マウス骨髄細胞を細胞障害活性誘導と同じ条件下で培養後の細胞表面マーカーの変化を調べた(表5)。いずれのマウスにおいても、リンホカイン非添加培養では5日間培養後も細胞表面マーカーに有意な変化は認められなかった。IL2 の添加により、すべてのマウス骨髄細胞で Thy-1 陽性細胞及び aGM₁ 陽性細胞の比率が増加し、IL2 存在下に IL3 を添加するとさらに増加した。IL3 単独でも Thy-1 陽性細胞は増加し、aGM₁ 陽性細胞も増加傾向にあった。一方、成熟 T 及び B リンパ球を示す Lyl-1, sIg 陽性細胞は IL2 及び IL3 添加によっても有意な変化を示さなかった。

VI. 抗 aGM₁ 血清 in vivo 投与後の脾細胞の表面マーカーと細胞障害活性の誘導

まず、脾臓内の成熟 NK 細胞を除去する目的で抗 aGM₁ 血清を in vivo に投与し、表面マーカーの検索

および細胞障害活性を測定した。抗 aGM₁ 血清 in vivo 投与後の脾細胞には aGM₁ 陽性細胞は CB-17, SCID 及び Nude マウスいずれにおいても 1% 以下であり、この時点での細胞障害活性はほとんど認められなかった(表6)。つぎに、この脾細胞を IL2 及び IL3 存在下に5日間培養し、細胞障害活性を測定した(図3)。いずれのマウスにおいても、IL2 により細胞障害活性が誘導され、その活性は IL2+IL3 の添加で増強傾向が認められた。無処理対照群では前述した如く、CB-17, SCID, Nude マウスとも IL3 は IL2 で増強される細胞障害活性に影響を及ぼさなかった。

VII. 5-FU in vivo 投与後の骨髄細胞および脾細胞からの細胞障害活性の誘導

骨髄に存在する成熟細胞を除去し未熟な分化段階にある骨髄細胞から細胞障害活性を誘導する目的で CB-17 および SCID マウスに 5-FU を in vivo 投与した。投与後1日目、2日目、4日目及び5日目に骨髄細胞および脾細胞を取り出し、IL2 及び IL3 存在下に5日間培養し、細胞障害活性を測定した(表7)。5-FU 投与後1日目及び2日目の CB-17 マウス骨髄細胞からは、IL2 濃度 50 U/ml では細胞障害活性は誘導されず、さらに IL3 を添加しても誘導されなかった。そこで、IL2 濃度を 500 U/ml に増加させると IL2 単独では細胞障害活性は誘導されなかったが、IL2+IL3 添加によりはじめて細胞障害活性が誘導された。SCID マ

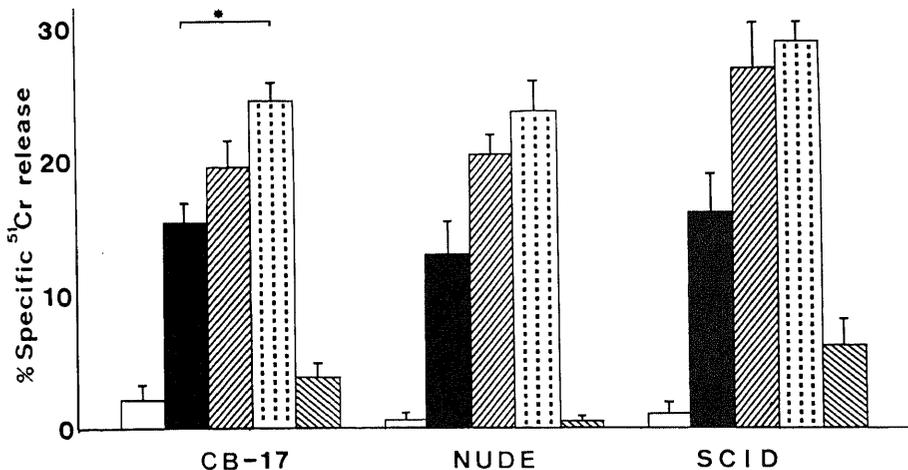


Fig. 2. Cytotoxic activity of cultured bone marrow cells from CB-17, Nude, and SCID mice. Cells were cultured for 5 days in the presence or absence (□, medium alone) of IL2 alone (■, 50 U/ml), IL3 alone (▨, 50 U/ml) or IL2+IL3 (▩, IL2 50 U/ml+IL3 50 U/ml; ▩, IL2 50 U/ml+IL3 100 U/ml). Percent cytotoxicity was measured by a 4-hr ⁵¹Cr-release assay using YAC-1 cells as targets. Effector to target ratio was 100:1. Data represent the mean±standard error of the four different experiments. *, $p < 0.05$; IL2, recombinant human interleukin 2; IL3, highly purified mouse interleukin 3; SCID, severe combined immunodeficiency.

ウスの骨髄細胞でも同様の結果であった。

Ⅷ. IL2 レセプター発現に及ぼす IL3 の影響

IL2 による骨髄細胞からの細胞障害活性誘導に IL3 は増強作用をもつことが示されたため、その作用機序を解明する目的で骨髄細胞を IL2 および IL3 存在下に培養し、ラット抗マウス IL2 レセプター単クローン抗体 (7D4 抗体) を用いて IL2 レセプターの発現を経時的に調べた (図 4)。その際に成熟 T・B リンパ球上に発現される IL2 レセプターの影響を除外するため

に成熟 T・B リンパ球を欠如する SCID マウスの骨髄細胞を用いた。IL2 レセプター陽性コントロールとして用いたマウス IL2 依存性 T 細胞株 (CTLL-2) の 7D4 抗体陽性率は 98.9% であり、培養前の SCID マウス骨髄細胞中の 7D4 抗体陽性細胞は 0.5% であった。IL2 単独添加では培養開始後 24 時間までは 7D4 抗体陽性細胞の発現は僅かであったが、培養 36 時間では明らかに増加した (16.7%)。IL2+IL3 添加では培養 24 時間で、すでに 12.8% と増加し、IL2 単独添加に比して 7D4 抗体陽性細胞は早期に発現した。IL3 単独添加でも培養 24 時間で 15.0% と 7D4 抗体陽性細胞の発現を認めた。このときの、正常ラット血清 (10 倍希釈) を陰性コントロールとした非特異的な 7D4 抗体陽性率は 4.6% であった。IL3 による IL2 レセプターの発現は、IL2+IL3 添加時の IL2 レセプター発現時期と一致していた。培養 48 時間では、IL2 あるいは IL3 単独および同時添加いずれの場合も 7D4 抗体陽性細胞は減少した。

考 察

Kalland¹¹⁾ は IL2 によってマウス骨髄細胞から誘導される細胞障害活性 (NK 活性) は IL3 により抑制されることを報告した。一方, Hattori⁷⁾ は最近, クローン化 NK 細胞株を樹立するうえで IL3 が不可欠であることを報告した。実験系こそ異なるが、一見相反するこれらの結果の矛盾を解決するために、著者は IL2 の濃度を 50 U/ml という低濃度を用いてマウス骨髄細胞から細胞障害活性の誘導を試みた。その結果、IL3 は骨髄細胞から誘導される細胞障害活性 (NK 活性) を有意に増強させることを見出した。骨髄および脾細胞は非常に多種多様な細胞集団から構成されるため、

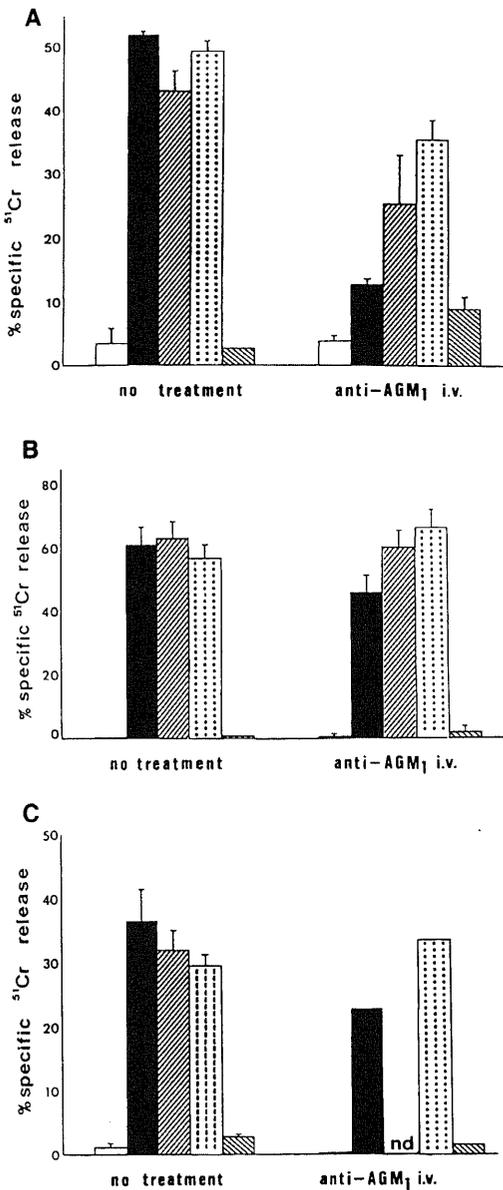


Fig. 3. Cytotoxic activity of cultured spleen cells from CB-17 (A), Nude (B), and SCID (C) mice pretreated with or without anti-asialo-GM₁ antiserum. Anti-asialo-GM₁ antiserum was administered intravenously at a dosage of 30 μl/day for consecutive 3 days. Cells were cultured for 5 days in the presence or absence (□, medium alone) of IL2 alone (■, 50 U/ml), IL3 alone (▨, 50 U/ml) or IL2+IL3 (▧, IL2 50 U/ml+IL3 50 U/ml; ▩, IL2 50 U/ml+IL3 100U/ml). Percent cytotoxicity was measured by a 4-hr ⁵¹Cr-release assay using YAC-1 cells as targets. Effector to target ratio was 100:1. Data represent the mean±standard error of the four different experiments. IL2, recombinant human interleukin 2; IL3, highly purified mouse interleukin 3; SCID, severe combined immunodeficiency; nd, not determined.

(1) 5-FU をマウスに *in vivo* 投与することにより未分化な多能性幹細胞を濃縮し, (2) 抗 aGM₁ 血清を *in vivo* 投与することにより脾細胞中の成熟 NK 細胞を除去し, あるいは(3) 成熟 T リンパ球を欠く Nude マウスおよび T・B 両リンパ球を欠如する SCID マウスをもちいることにより, IL3 の作用する細胞群がより明確にされた。さらに, 抗 IL2 レセプター抗体を用いて検討した結果, IL3 がそれらの細胞に IL2 レセプターを発現させることにより, IL2 の細胞障害活性誘導を増強するという作用機序が明らかとなった。

まず, 免疫不全マウスを用いるにあたり, 骨髄および脾の構成細胞を種々の単クローン抗体を用いて検索した。骨髄では成熟 NK 細胞を示す aGM₁ 陽性細胞¹⁹⁾²⁰⁾の比率を比較すると CB-17, SCID, Nude マウスの間に差は認められなかった。骨髄中の成熟 T リンパ球は極めて僅かであり, SCID および Nude マウスでは欠如していた。成熟 B リンパ球は CB-17 および Nude マウスで 10-20% 認められ, SCID マウスでは欠如していた。一方, 脾細胞では明らかにその構成は異なり, SCID マウスでは成熟 T・B リンパ球を欠如

Table 5. Phenotypical change of bone marrow cells cultured with lymphokines^a

mice	Lymphokines (Unit/ml)	% Positive cells ^b					% Recovery of cells ^c
		Thy-1	aGM ₁	Lyt-1	sIg	Mac-1	
CB-17	(-)	2.7	9.1	ND	ND	ND	ND
	IL2(50)	7.7	19.8	2.6	1.1	ND	ND
	IL2+IL3(50)	16.9	32.5	1.8	ND	ND	ND
	IL2+IL3(100)	28.9	28.0	ND	ND	ND	ND
	IL3(50)	20.7	14.7	0.6	ND	ND	ND
SCID	(-)	7.3	5.2	0.8	0.9	66.9	33.3
	IL2(50)	28.2	12.0	0.5	1.8	62.5	26.7
	IL2+IL3(50)	47.8	28.3	1.1	1.4	62.9	33.3
	IL2+IL3(100)	46.9	27.1	1.5	1.3	56.3	33.3
	IL3(50)	37.8	15.8	1.0	1.2	71.9	26.7
Nude	(-)	1.6	6.0	0.7	13.2	64.5	20.0
	IL2(50)	8.5	8.4	1.4	18.8	55.4	26.7
	IL2+IL3(50)	10.7	13.9	0.1	17.3	54.4	40.0
	IL2+IL3(100)	14.2	14.9	0.1	17.1	54.7	23.3
	IL3(50)	5.9	3.9	1.9	16.8	63.4	20.0

^a Pooled bone marrow cells from two or three mice were cultured for 5 days with IL2, IL3 or both.

^b The percentage of cells expressing surface antigen was analyzed by a flow cytometry.

^c Percent recovery of cells at the end of the culture was calculated with respect to the number of cells plated at the beginning of the culture. IL2, recombinant human interleukin 2; IL3, highly purified mouse interleukin 3; sIg, surface immunoglobulin; aGM₁, asialo-GM₁; SCID, severe combined immunodeficiency; ND, not determined.

Table 6. Phenotypical analysis and cytotoxic activity of spleen cells after *in vivo* administration of anti- aGM₁ antiserum^a

	% Positive cells ^b					% Cytotoxicity ^c (E/T = 100)
	Thy-1	aGM ₁	Lyt-1	Lyt-2	sIg	
CB-17	25.6	0.5	23.7	6.7	62.0	1.1
SCID	1.3	0.8	0.5	1.3	0.8	3.0
Nude	1.2	0.5	1.0	0.5	79.1	3.7

^a Anti-aGM₁ antiserum was intravenously administered at a dosage of 30 μl/day for consecutive 3 days.

^b The percentage of cells expressing surface antigen was examined by a flow cytometry.

^c Percent cytotoxicity was measured by a 4-hr ⁵¹Cr-release assay using YAC-1 cells as targets. aGM₁, asialo-GM₁; sIg, surface immunoglobulin; E/T, Effector : target ratio; SCID, severe combined immunodeficiency.

し, Nude マウスでは T リンパ球を欠き相対的に B リンパ球増加が認められた。aGM1, 陽性細胞の比率は SCID および Nude マウスで相対的に増加していた。Thy-1 陽性細胞は SCID および Nude マウスにも認め

られた。Bosma ら¹⁴⁾は, この細胞が成熟リンパ球の刺激物質である種々のマイトーゲンに反応しなかったことより未熟 T リンパ球と報告した。著者は, スペクトラム III を用いて Thy-1 陽性細胞の蛍光強度を CB-

Table 7. Cytotoxic activity from 5FU-treated bone marrow cells and spleen cells

		% Cytotoxicity (E/T=200)					
		IL2(50)	IL2(50)+IL3(100)	IL2(500)	IL2(500)+IL3(50)	IL2(500)+IL3(100)	IL3(50)
CB-17	5FU-1d-BM	0	0	1.5	23.4	ND	0
	5FU-2d-BM	0	0	1.6	16.0	23.7	0
	5FU-4d-Spleen	ND	ND	1.3	ND	33.4	0.4
SCID	5FU-2d-BM	ND	ND	5.0	11.7	18.7	6.0
	5FU-2d-Spleen	ND	ND	6.3	15.2	12.3	3.5

5FU was intravenously administered at a dosage of 150 mg/kg by a single shot. Percent cytotoxicity was measured by a 4-hr ⁵¹Cr-release assay using YAC-1 cells as targets. IL2, recombinant human interleukin 2; IL3, highly purified mouse interleukin 3; SCID, severe combined immunodeficiency; E/T, effector : target ratio; ND, not determined.

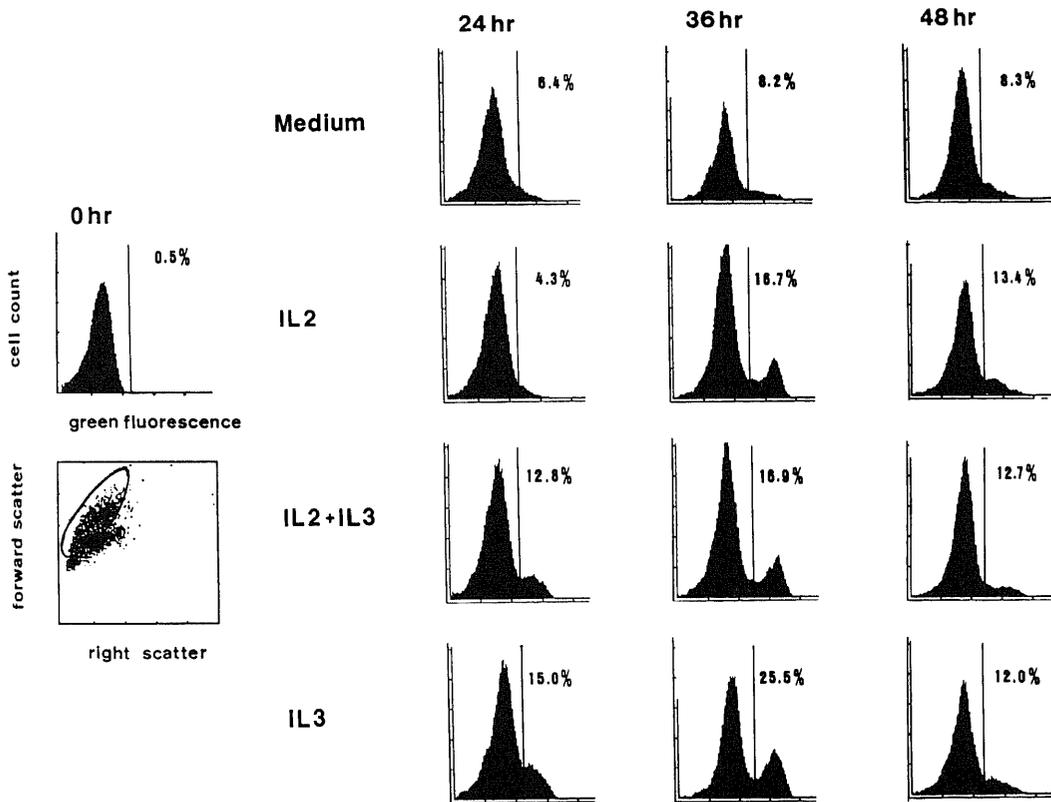


Fig. 4. Kinetics of interleukin 2 (IL2) receptor expressed on cultured bone marrow cells from SCID mice. Cells were cultured with medium alone, IL2 (500 U/ml) alone, interleukin 3 (50 U/ml) alone or IL2+IL3. The expression of IL2 receptor was evaluated by indirect immunofluorescence with rat anti-mouse IL2 receptor monoclonal antibodies (7D4), using a flow cytometry. Green fluorescence intensity was shown by logarithm scale.

17 マウス脾細胞と SCID マウス脾細胞で比較したところ、SCID マウス脾細胞の Thy-1 陽性細胞の蛍光強度は弱く、成熟 T リンパ球とは異なる細胞群と考えられた。

IL2 あるいは IL2+IL3 添加培養後の表面マーカーの検索では、いずれのマウス骨髄細胞においても、Thy-1 陽性細胞および aGM₁ 陽性細胞が増加していた。しかし、T リンパ球マーカーを示す Lyt-1 陽性細胞の増加は認められず、Thy-1 陽性細胞の増加は T リンパ球ではなく NK 細胞の増加と考えられた。これまでの報告²³⁾では、SCID マウスに存在する NK 細胞には Thy-1 抗原は出現していないとされているが、Thy-1 抗原が T リンパ球に特異的ではないこと²⁴⁾²⁵⁾ および NK 細胞の約半数は Thy-1 陰性²⁶⁾であり、刺激にて容易に陽性化する²⁷⁾ことを考えれば矛盾しない。一方、IL3 単独添加でも Thy-1 陽性細胞は増加したが、それに伴う細胞障害活性は認められず、したがって、この場合に増加してくる Thy-1 陽性細胞は NK 細胞とは考えにくい。Schrader ら²⁴⁾および Basch ら²⁵⁾は骨髄細胞中にも Thy-1 陽性細胞が存在し、IL3 の添加培養によりさらに増加し、その細胞群からは顆粒球・マクロファージコロニーが形成されると報告している。

つぎに IL3 の骨髄細胞および脾細胞に対する影響を細胞障害活性の点から検討したところ、IL2 (50 U/ml) 存在下に IL3 を添加すると、骨髄細胞から誘導される細胞障害活性は IL2 単独添加に比し有意に増加した ($p < 0.05$)。これは Kalland の結果¹⁾と矛盾した。IL2 により誘導される細胞障害活性は、著者の測定系では添加する IL2 の濃度 500 U/ml でほぼプラトーに達し、その際の%細胞障害能はエフェクター・標的細胞比 100:1 にて 50-60%であり、この値は上限値と考えられた。Kalland の結果は、IL2 (50 U/ml) でその%細胞障害能は 50%を越えており、彼の用いた測定系ですでに上限値を示していると予想された。著者はこの上限値を避ける実験系を採択した。最大限に増強された活性化状態に新たに加えられた増強因子は毒性に働く可能性がある。事実、著者の検討でも、IL2 (500 U/ml) 存在下に IL3 を添加すると誘導される細胞障害活性は IL3 濃度依存性に抑制された (未発表データ)。以上より IL3 は、低濃度の IL2 による骨髄細胞からの細胞障害活性誘導に対し、増強作用をもつと考えられた。

一方、脾細胞では IL3 の増強作用は認められなかったが、これは IL2 により成熟 NK 細胞が十分に活性化され、その活性に IL3 による増強作用がマスクされたためと考えられた。そこで、抗 aGM₁ 血清を *in vivo* 投

与し成熟 NK 細胞を除去した脾細胞を用いたところ、IL3 の増強作用を明確にすることができた。さらに、SCID および Nude マウスにおいても CB-17 と同様の増強作用が認められたことより、IL3 の増強作用に T・B リンパ球の関与は少ないものと考えられた。Suda ら²⁸⁾²⁹⁾により明らかにされたように、5-FU をマウスに投与すると、より未分化な多能性幹細胞を濃縮できることが知られている。これは、5-FU の DNA 合成期特異的な殺作用によりその多くが DNA 合成期にある赤血球系ならびに顆粒球系前駆細胞を減少させ、より未分化な多能性幹細胞が残存するものと考えられている³⁰⁾。著者も IL2 による骨髄細胞からの細胞障害活性誘導に対する IL3 の作用を明確にさせるためにこの手段を用いて検討した。

5-FU 投与後 1 日目、2 日目の最も未分化幹細胞が多いとされる時期の骨髄および脾細胞に、高濃度の IL2 (500 U/ml) を添加しても IL2 単独では細胞障害活性を誘導することはできなかったが、さらに IL3 を添加することによりはじめて細胞障害活性が誘導された。このことより、IL3 は未分化な細胞を IL2 反応性の細胞へと分化させることが示唆された。IL3 が分化の方向を決定しないことは Suda らにより報告²⁹⁾されており、したがって、IL3 の作用機序として、IL3 が働くのは多能性幹細胞自身に対してではなく、すでに IL2 に反応する方向に決定づけられた細胞を IL2 非反応性から IL2 反応性へと分化させる機序が推測された。

つぎに、この機序をより明確にするために IL2 および IL3 添加による骨髄細胞の IL2 レセプターの発現を SCID マウス骨髄細胞を用いて検討した。その結果、IL3 単独添加で骨髄細胞表面に IL2 レセプターが発現してくるようになった。IL3 単独添加培養 24 時間で IL2 レセプター抗体陽性細胞は 15.0%に認められ、同時期、IL2 単独添加では 4.3%であり、IL3 により早期に IL2 レセプターが発現してくるものが観察された。また、その発現細胞は SCID マウス骨髄細胞を用いたことより T・B リンパ球以外の細胞と考えられた。

興味ある事に Birchenall-Sparks ら³¹⁾は IL3 依存性の非リンパ性細胞株にも IL2 レセプターが存在し、IL3 の刺激にてその発現は増強することを見出し、さらに、発現された IL2 レセプターは、レセプター結合親和性の解析から低親和性レセプターであり、高濃度の IL2 を加えても細胞増殖は誘導されずその生理的、機能的意味は不明であることを報告している。また、最近では Robb ら³²⁾³³⁾、Dukovich ら³⁴⁾、Teshigawara ら³⁵⁾、Siegel ら³⁶⁾により、主としてヒトにおいて、IL2 レセプターには高親和性レセプターおよび低親和性レ

セプターが存在し、高親和性レセプターは、少なくとも 2 種類の異なるタンパク (IL2 レセプター α , IL2 レセプター β) の複合体であり、IL2 レセプター α と IL2 レセプター β はそれぞれ単独では低親和性を示すことが明らかにされてきた。さらに、IL2 レセプター α は単独では機能を持たず IL2 レセプター β との複合体 (高親和性レセプター) を形成してはじめて機能するのに対して、IL2 レセプター β は単独で IL2 と結合し細胞の活性化が可能³³⁾であり、後者は NK 細胞上に多く発現している³⁴⁾³⁶⁾と報告されている。以上の報告、即ち、① IL3 により非リンパ性造血細胞にも IL2 レセプターが発現しうること、②その IL2 レセプターは低親和性レセプターであること、③低親和性レセプター (IL2 レセプター α) は機能しないこと、④ IL2 レセプター β は NK 細胞上に多く発現されていること、と著者の結果即ち、IL3 単独で IL2 レセプターが骨髄細胞に発現することおよび未分化細胞からの細胞障害活性誘導には IL2 と IL3 の存在が必要であったことを考え合わせて、IL2 による骨髄細胞からの細胞障害活性誘導に対する IL3 の増強作用機序は以下のように考えられた。IL3 により、骨髄の NK 前駆細胞を含む IL3 反応性未熟細胞に IL2 レセプターが発現するが、非リンパ性未熟細胞に発現した IL2 レセプターは機能を持たない低親和性レセプターであろう。しかし、一部 NK 細胞への分化がすでに決定づけられたいわゆる NK 前駆細胞には機能的 IL2 レセプターが発現し、IL2 が存在すれば IL2 と結合し NK 細胞へと分化・成熟していくと考えられた。しかし、今回の実験では IL2 レセプターが骨髄細胞のどの細胞に発現されているのか、IL2 への結合親和性はどの程度なのか、また抗 IL2 レセプター抗体 (7D4) が認識する部位は IL2 レセプター上のどこか、さらには IL3 レセプターがリンパ性未熟細胞に発現しうるかという問題は未解決であり、今後の検討が必要である。

結 論

正常マウスおよび免疫不全マウスを用いて、IL2 による骨髄細胞および脾細胞からの細胞障害活性誘導に及ぼす IL3 の影響とその作用機序について検討し以下の結論を得た。

1. IL2 存在下の骨髄細胞および脾細胞を培養すると 3-5 日間で細胞障害活性が誘導され、細胞障害活性を有する細胞は NK 細胞と考えられた。

2. IL2 存在下に IL3 を添加培養すると骨髄細胞から誘導される細胞障害活性は IL2 単独添加に比し有意に ($p < 0.05$) 増強された。IL3 単独添加では細胞障害活性は誘導されなかった。

3. 脾細胞では、IL3 は IL2 により誘導される細胞障害活性に影響を及ぼさなかったが、成熟 NK 細胞を除去すると、IL3 は IL2 により誘導される細胞障害活性を増強した。

4. 5-FU *in vivo* 投与により得られた未熟骨髄細胞からは IL2 単独添加では細胞障害活性は誘導されず、IL2 存在下に IL3 を添加することによりはじめて細胞障害活性が誘導された。

5. IL3 単独添加にて骨髄細胞に IL2 レセプターが発現し、しかも IL2 単独添加時よりも早期に IL2 レセプターが発現がみられた。

6. 以上の結果より、IL3 により骨髄の NK 前駆細胞を含む IL3 反応性未熟細胞に IL2 レセプターが発現し、NK 前駆細胞に発現した IL2 レセプターは IL2 と結合し、NK 細胞への分化・成熟が誘導されると考えられた。

7. 免疫不全マウスをもちいた結果からは、IL2 による細胞障害活性誘導に対する IL3 の増強作用には、T および B リンパ球の関与は少ないと考えられた。

謝 辞

稿を終るに臨み、研究の御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部小児科谷口昂教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、直接御指導頂きました三浦正義助手、小泉晶一講師はじめ、終始研究に御協力頂きました蓮井正樹先生、小児科血液・免疫グループの諸兄、ならびに教室員の皆様に深謝致します。

さらに、貴重な御助言ならびに IL2 レセプター抗体を供与していただきました自治医科大学、湊長博博士に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ihle, J. N., Pepersack, L. & Rebar, L.: Regulation of T cell differentiation: In vitro induction of 20- α -hydroxysteroid dehydrogenase in splenic lymphocytes from athymic mice by a unique lymphokine. *J. Immunol.*, **126**, 2184-2189 (1981).
- 2) Ihle, J. N., Keller, J., Henderson, L., Klein, F. & Palaszynski, E.: Procedures for the purification of interleukin 3 to homogeneity. *J. Immunol.*, **129**, 2431-2436 (1982).
- 3) Ihle, J. N., Rebar, L., Keller, J., Lee, J. C. & Hapel, A. J.: Interleukin 3: Possible roles in the regulation of lymphocyte differentiation and growth. *Immunol. Rev.*, **63**, 5-32 (1982).
- 4) Ihle, J. N., Keller, J., Oroszlan, S., Henderson, L. E., Copeland, T. D., Fitch, F., Prystowsky,

- M. B., Goldwasser, E., Schrader, J. W., Palaszynski, E., Dy, M. & Lebel, B.:** Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, P cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell stimulating factor activity. *J. Immunol.*, **131**, 282-287 (1983).
- 5) **Metcalf, D.:** The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood*, **67**, 257-267 (1986).
- 6) **Miura, Y.:** Advances in hemopoietic stem cell research. *Acta. Haematol. Jpn.*, **50**, 1491-1498 (1987).
- 7) **Hattori, M., Sudo, T., Iizuka, M., Kobayashi, S., Nishio, S., Kano, S. & Minato, N.:** Generation of continuous large granular lymphocyte lines by interleukin 2 from the spleen cells of mice infected with Moloney leukemia virus. Involvement of interleukin 3. *J. Exp. Med.*, **166**, 833-849 (1987).
- 8) **Kalland, T.:** Generation of natural killer cells from bone marrow precursors in vitro. *Immunology*, **57**, 493-498 (1986).
- 9) **Koo, G. C. & Manyak, G. L.:** Generation of cytotoxic cells from murine bone marrow by human recombinant IL2. *J. Immunol.*, **137**, 1751-1756 (1986).
- 10) **Koo, G. C., Dumont, F. J., Tutt, M., Hackett, J. & Kumar, V.:** The NK-1.1(-) Mouse: A model to study differentiation of murine NK cells. *J. Immunol.*, **137**, 3742-3747 (1986).
- 11) **Kalland, T.:** Interleukin 3 is a major negative regulation of the generation of natural killer cells from bone marrow precursors. *J. Immunol.*, **137**, 2268-2271 (1986).
- 12) **荒井澄夫:** ヒトNK細胞の免疫系における位置づけ. *臨床免疫*, **16**, 355-362(1984).
- 13) **Kumagai, K., Suzuki, R., Suzuki, S. & Arai, S.:** Immunoregulatory effects of NK cells. *In* R. B. Herberman & D. M. Callewaert (eds.), *Mechanisms of cytotoxicity by NK cells*. p489-498, Academic Press Inc., Orland, 1985.
- 14) **Bosma, G. C., Custer, R. P. & Bosma, M. J.:** A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, **301**, 527-530 (1983).
- 15) **West, W. H., Cannon, G. B., Kay, H. D., Bonnard, G. D. & Herberman, R. B.:** Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: characterization of effector cells. *J. Immunol.*, **188**, 355-361 (1977).
- 16) **Ledbetter, J. A., Rouse, R. V., Micklem, H. S. & Herzenberg, L. A.:** T cell subsets defined by expression of Lyt-1, 2, 3, and Thy-1 antigens. *J. Exp. Med.*, **152**, 280-295 (1980).
- 17) **Ledbetter, J. A., Evans, R. L., Lipinski, M., Cunningham-Rundles, C., Good, R. A. & Herzenberg, L. A.:** Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor populations in mouse and man. *J. Exp. Med.*, **153**, 310-323 (1981).
- 18) **Dialynas, D. P., Quan, Z. S., Wall, K. A., Pierres, A., Quintans, J., Loken, M. R., Pierres, M. & Fitch, F. W.:** Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule. *J. Immunol.*, **131**, 2445-2451 (1983).
- 19) **Kasai, M., Iwamori, M., Nagai, Y., Okumura, K. & Tada, T.:** A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur. J. Immunol.*, **10**, 175-180 (1980).
- 20) **Springer, T., Galfre, G., Secher, D. S. & Milstein, C.:** Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.*, **9**, 301-306 (1979).
- 21) **Malek, T. R., Robb, R. J. & Shevach, E. M.:** Identification and initial characterization of a rat monoclonal antibody reactive with the murine interleukin 2 receptor-ligand complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5694-5698 (1983).
- 22) **Lanier, L. L., Phillips, J. H., Hackett, J., Tutt, M. & Kumar, V.:** Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J. Immunol.*, **137**, 2735-2739 (1986).
- 23) **Dorshkind, K., Pollack, S. B., Bosma, M. J. & Phillips, R. A.:** Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid). *J. Immunol.*, **134**, 3798-3801 (1985).
- 24) **Schrader, J. W., Battye, F. & Scollay, R.:** Expression of Thy-1 antigen is not limited to T cells in cultures of mouse hemopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4161-4165 (1982).
- 25) **Basch, R. S. & Berman, J. W.:** Thy-1 determinants are present on many murine hemato-

- poietic cells other than T cells. *Eur. J. Immunol.*, **12**, 359-364 (1982).
- 26) Koo, G. C., Jacobson, J. B., Hammerling, G. J. & Hammerling, U.: Antigenic profile of murine natural killer cells. *J. Immunol.*, **125**, 1003-1006 (1980).
- 27) Brooks, C. G., Urdal, V. L. & Henney, C. S.: Lymphokine-driven "differentiation" of cytotoxic T-cell clones into cells with NK-like specificity: correlation with display of membrane macromolecules. *Immunol. Rev.*, **72**, 43-72 (1983).
- 28) Suda, T., Suda, J. & Ogawa, M.: Proliferative kinetics and differentiation of murine blast cell colonies in culture: evidence for variable G₀ periods and constant doubling rates of early pluripotent hemopoietic progenitors. *J. Cell. Physiol.*, **117**, 308-318 (1983).
- 29) Suda, T., Suda, J., Ogawa, M. & Ihle, J. N.: Permissive role of interleukin 3 (IL-3) in proliferation and differentiation of multipotential hemopoietic progenitors in culture. *J. Cell. Physiol.*, **124**, 182-190 (1985).
- 30) Hodgson, G. S. & Bradley, T. R.: Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell? *Nature*, **281**, 381-382 (1979).
- 31) Birchenall-Sparks, M. C., Farrar, W. L., Rennick, D., Kilian, P. L. & Ruscetti, F. W.: Regulation of expression of the interleukin-2 receptor on hemopoietic cells by interleukin-3. *Science*, **233**, 455-458 (1986).
- 32) Robb, R. J., Greene, W. C. & Rusk, C. M.: Low and high affinity cellular receptors for interleukin 2. Implications for the level of Tac antigen. *J. Exp. Med.*, **160**, 1126-1146 (1984).
- 33) Robb, R. J. & Greene, W. C.: Internalization of interleukin 2 is mediated by the β chain of the high-affinity interleukin 2 receptor. *J. Exp. Med.*, **165**, 1201-1206 (1987).
- 34) Dukovich, M., Wano, Y., Thuy, L. B., Katz, P., Cullen, B. R., Kehrl, J. H. & Greene, W. C.: A second human interleukin-2 binding protein that may be a component of high-affinity interleukin-2 receptors. *Nature*, **327**, 518-522 (1987).
- 35) Teshigawara, K., Wang, H., Kato, K. & Smith, K. A.: Interleukin 2 high-affinity receptor expression requires two distinct binding proteins. *J. Exp. Med.*, **165**, 223-238 (1987).
- 36) Siegel, J. P., Sharon, M., Smith, P. L. & Leonard, W. J.: The IL-2 receptor β chain (p70): Role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science*, **238**, 75-78 (1987).

Requirement of Interleukin 3 for the Differentiation and Growth of Murine NK Lineage Cells Yutaka Saikawa, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **97**, 317—330 (1988)

Key words: interleukin 2, interleukin 3, differentiation of natural killer cells, mice with immunodeficiency disease, IL2 receptor

Abstract

The correlation between interleukin 2 (IL2) and interleukin 3 (IL3) during the differentiation process of natural killer (NK) lineage cells was investigated in murine bone marrow (BM) and spleen cells in this study. BM and spleen cells were obtained from normal CB-17 mice and the NK cell activity was measured by a 4-hr ⁵¹Cr-release assay system. In vitro cytolytic activities of both BM and spleen cells against YAC-1 cells as targets were sufficiently induced by recombinant human IL2 after 5 days of incubation. After incubation, the relative proportion of the cells expressing a typical phenotype for NK cells, asialo-GM₁⁺ (aGM₁⁺), Thy-1⁺ and Lyt-1⁻, significantly increased. When IL3 was added to the IL2-induced NK cell activity assay system, a significant augmentation of NK cell activity was noted in an IL3 dose-dependent fashion in BM

cells, but not in spleen cells. However, when mature NK cells were eliminated by injecting anti-aGM₁ antiserum intravenously, IL2-induced NK cell activity of the residual spleen cells did show an IL3 dose-dependent augmentation in the same manner as seen in BM cells. IL3 alone did not induce NK cell activity. After this, mice were treated with 5-fluorouracil (5-FU) in vivo. Although the residual immature BM cells showed little NK activity even at a high concentration of IL2 alone, the addition of IL3 again demonstrated a significant augmentation of NK cell activity. SCID mice (T and B cell deficient) and nude mice (T cell deficient) were also used in this study, and they showed findings similar to those in normal CB-17 mice. These results indicate that IL3 supports the development of the NK lineage cells from IL2-unresponsive primitive or pre-NK cells, which exist mainly in BM, to IL2-responsive mature NK cells. In addition, the effect of IL3 appears not to be mediated by T or B lymphocytes. To further investigate the mechanism of the correlation between IL2 and IL3, the expression of IL2 receptors on BM cells of SCID mice was checked using a monoclonal antibody (7D4) against mouse IL2 receptors. When the cells were incubated with IL3 alone, IL2 receptors were expressed early (within 24 hrs) compared to IL2 alone (36 hrs), indicating that IL3 plays an important role in the development of NK lineage cells by promoting the expression of IL2 receptors on primitive cells.