

The Effect of IL-6 on Human Bone Marrow CFU-GM Colony Formation : Inhibition of IL-6 to the rhG- CSF-induced CFU-GM

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/2297/8097

ヒト骨髄細胞由来の顆粒球-単球/マクロファージ系前駆細胞 (CFU-GM) に対するインターロイキン 6(IL-6) の役割： 顆粒球コロニー形成刺激因子 (G-CSF) との拮抗作用

金沢大学医学部小児科学講座 (主任：谷口 昂教授)

片 山 啓 太

(平成1年2月3日受付)

正常ヒト骨髄顆粒球-単球/マクロファージ系前駆細胞 (colony forming units in granulocyte-monocyte/macrophage, CFU-GM) の増殖, 分化に対する組み換え型ヒトインターロイキン 6 (recombinant human interleukin 6, rhIL-6) の作用について検討した. 無血清培養下で rhIL-6 単独では CFU-GM コロニーは全く形成されなかった. つぎに組み換え型ヒト顆粒球コロニー形成刺激因子 (recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rhG-CSF) および組み換え型ヒト顆粒球-単球/マクロファージコロニー形成刺激因子 (recombinant human granulocyte-monocyte/macrophage colony stimulating factor, rhGM-CSF) と rhIL-6 との共同作用について検索したところ, 血清存在下および無血清培養下の両方で, rhIL-6 は濃度依存性に rhG-CSF による CFU-GM コロニー形成を抑制し, rhGM-CSF による CFU-GM コロニー形成に対しては影響を及ぼさなかった. さらに造血幹細胞を特異的に認識するといわれる抗 My10 マウスモノクローナル抗体を用いて panning 法により骨髄単核非付着細胞より分離した My10 陽性細胞分画について検索したところ, 同様の結果が得られた. また骨髄単核非付着細胞をあらかじめ rhIL-6 と前処理し, その後洗浄して無血清培養下で rhG-CSF あるいは rhGM-CSF を加えたところ, rhG-CSF による CFU-GM コロニー形成は, 培養液のみで前処理したものと比較して抑制された. しかし, rhGM-CSF による CFU-GM コロニー形成は rhIL-6 前処理によって影響がみられなかった. その rhIL-6 と前処理した時にみられた rhG-CSF による CFU-GM コロニー形成の抑制は, 高濃度の rhG-CSF と同時に前処理することによりみられなくなった. 以上の結果より, 正常ヒト骨髄細胞由来の CFU-GM コロニー形成において rhIL-6 は rhG-CSF の作用を抑制し, その機序として, rhIL-6 により rhG-CSF 受容体の発現が抑制された可能性が示唆された.

Key words CFU-GM, IL-6, G-CSF, GM-CSF, serum-free culture

1961年, Till と McCulloch によるマウス脾コロニー法の報告¹⁾以来, 造血幹細胞の研究は飛躍的に発展し, 骨髄細胞を軟寒天やメチルセルロースなどの半流動培地中で培養し, コロニーを形成させることにより, *in vitro* での造血幹細胞を定量的に測定する方法が確立されている²⁾. その際, コロニー形成刺激因子 (colony stimulating factor, CSF) と呼ばれる糖蛋白が

必要であり, すでに3種の遺伝子組み換え型の因子がヒト, マウスそれぞれについて精製されている. すなわち, ヒトの場合は組み換え型ヒト顆粒球コロニー形成刺激因子 (recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rhG-CSF)³⁾, 組み換え型ヒト顆粒球-単球/マクロファージコロニー形成刺激因子 (recombinant human granulocyte-monocyte/

Abbreviations: AML, acute myelogenous leukemia; BSA, bovine serum albumin; BSF-2, B cell stimulatory factor 2; CFU-GM, colony forming units in granulocyte-monocyte/macrophage; CSF, colony stimulating factor; FCS, fetal calf serum; IMDM, Iscove's

macrophage colony stimulating factor, rhGM-CSF)⁹⁻¹⁰, そして組み換え型ヒト単球/マクロファージコロニー形成刺激因子 (recombinant human monocyte/macrophage colony stimulating factor, rhM-CSF)^{9,10}である。また最近, 各種インターロイキンの造血幹細胞に対する効果も報告されている^{11,12}。

B細胞刺激因子 (B cell stimulatory factor 2, BSF-2) はもともとレクチンまたは抗原で刺激された単核球の培養上清中に存在し, B細胞の増殖, 分化の最終段階に作用して抗体産生細胞への分化を誘導するT細胞由来のリンフォカインとして同定された¹³。最近, BSF-2のcDNAがクローン化され¹⁴, 他のサイトカインとして報告された26kDa蛋白¹⁵, インターフェロン β_2 (interferon β_2)¹⁶との同一性, およびハイブリドマ・プラズマサイトマ増殖因子¹⁷との部分アミノ酸配列の同一性が確認された。それに加えてBSF-2はT細胞, 肝細胞, 神経細胞, 造血幹細胞にも作用することが明らかとなり, BSF-2は単にB細胞による免疫グロブリン産生のみでなく, ささまざまな細胞の生育と分化に関与しており, 現在ではインターロイキン6 (interleukin 6, IL-6) と統一呼称されている¹⁸。

IL-6の造血幹細胞に対する作用はIkebuchiらによって最初に報告された¹⁹。それによるとヒトIL-6はマウスの顆粒球-単球/マクロファージ系前駆細胞 (colony forming units in granulocyte-monocyte/macrophage, CFU-GM) の増殖を支持し, 正常マウス脾細胞の培養で多能性幹細胞および芽球コロニーの形成を支持した。特にインターロイキン3 (interleukin 3, IL-3) のマウス多能性幹細胞の増殖作用を相乗的に刺激した。ところがKoikeら²⁰が無血清培養下で検索した結果によると, IL-6単独ではマウスCFU-GMおよび多能性幹細胞の増殖を支持しなかった。一方, Wongら²¹はIL-6がマウスCFU-GMを直接刺激し, 芽球を含むいくつかのコロニー形成を間接的に支持したことを報告した。しかし, Hoangら²²はIL-6は単独ではヒト造血幹細胞に対する効果はないと報告し, マウスとヒトでIL-6の作用の異なることが示唆された。

本研究では組み換え型ヒトインターロイキン6 (recombinant human interleukin 6, rhIL-6) のヒト骨髓CFU-GMの増殖に対する効果について, 特にrhG-CSFおよびrhGM-CSFとの相互作用について検

討した。

材料および方法

I. 材料

健康成人有志, および急性血小板減少性紫斑病, 急性白血病寛解期 (化学療法終了後のもの, 継続中のものを含む), 骨髓移植後, 先天性赤芽球癆など, 顆粒球系の造血がほぼ正常と考えられる患者の骨髓血を用いた。

II. 骨髓細胞の分離

骨髓血を胸骨または腸骨よりヘパリン加採取し, リン酸緩衝液生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) (PH 7.2) で10倍希釈した後, Ficoll-Hypaque (lymphoprep, Nyegaard & Co., Oslo, Norway) に重層し, 4°C400gで30分間遠心した。中間層の単核細胞を採取し, PBSで3回洗浄後, 10%非働化牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (三菱化成, 東京) を含むRPMI1640培養液 (Gibco, Grand Island, NY, USA) に浮遊した。つぎに骨髓細胞浮遊液を 3×10^6 個/mlの濃度でプラスチックフラスコ (25cm² tissue culture flask) (Costar, Cambridge, MASS, USA) に入れ, 37°C, 5% CO₂存在下で60分間培養した。非付着細胞のみを取りだし, Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) で2回洗浄後, IMDMに浮遊させた。

III. 造血因子

rhG-CSFは中外製薬より, rhGM-CSFは住友製薬より, 組み換え型ヒトインターロイキン3 (recombinant human interleukin 3, rhIL-3) はUCLAのDr. C. H. Uittenbogaartより, rhIL-6は大阪大学細胞工学センターの平野俊夫博士よりそれぞれ供与された。rhIL-6はBSF-2に対するcDNAを大腸菌に発現させ, それを純化して得たもので, その特異的活性は 5.2×10^6 units/mg proteinであった。組み換え型ヒトインターロイキン1 α (recombinant human interleukin 1 α , rhIL-1 α) (Genzyme, Boston, MASS, USA) は, その特異的活性は 10^8 units/mg proteinであった。

IV. CFU-GMコロニー培養法

方法はIscoveらの方法²³を一部改変し, 1×10^5 個の骨髓単核非付着細胞を0.8%メチルセルロース

modified Dulbecco's medium; PBS, phosphate buffered saline; rhG-CSF, recombinant human granulocyte colony stimulating factor; rhGM-CSF, recombinant human granulocyte-monocyte/macrophage colony stimulating factor; rhIL-1 α , recombinant

(methylcellulose) (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ, USA), 20% FCS, 1% 脱イオン化牛胎児アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Sigma), 各種の造血因子を含む IMDM 1 ml に加え, プラスチックペトリ皿 (24wells, tissue culture plate) (Becton Dickinson & Company, Lincoln Park, NJ, USA) に1穴あたり 0.25 ml ずつ分注した. 培養は triplicate で行い, 37°C, 5% CO₂ 湿潤下で培養し, 培養7日目と14日目にそれぞれ倒立顕微鏡にて, 20個以上の細胞よりなる集団をコロニーとしてその数を数えた. 実験ごとのコロニー数のばらつきが大きいため, 結果は%コントロールで表示した. 無血清培養法を用いた CFU-GM コロニー培養法は Iscove らの方法²⁰に準じ, FCS の代わりに塩化第II鉄飽和ヒトトランスフェリン (transferrin, Iron saturated)

(Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany) 600 μg/ml, ソイビーン・レシチン (L-x-phosphatidylcholine) (Sigma) 160 μg/ml, コレステロール (和光純薬工業, 大阪) 96 μg/ml を用い, BSA, IMDM, メチルセルロースとともに培養した. 形成されたコロニーが顆粒球系コロニーであるのか, 単球/マクロファージ系コロニーであるのかの判定は Agar 法によった²⁰. すなわち, 0.3% Bacto-Agar (Difco Laboratories, Detroit, MICH, USA), 20% FCS, 1% BSA, 骨髓単核非付着細胞 1 × 10⁵ 個/ml, IMDM, rhG-CSF または rhGM-CSF を加えて培養されたコロニーを寒天ごとスライドガラス上に移し, 濾紙で脱水させ乾燥後, エステラーゼ二重染色を施した. α-ナフチールプトレートエステラーゼ陽性のコロニーを単球/マクロファージ系コロニー (M-colony), ナフトール AS-D

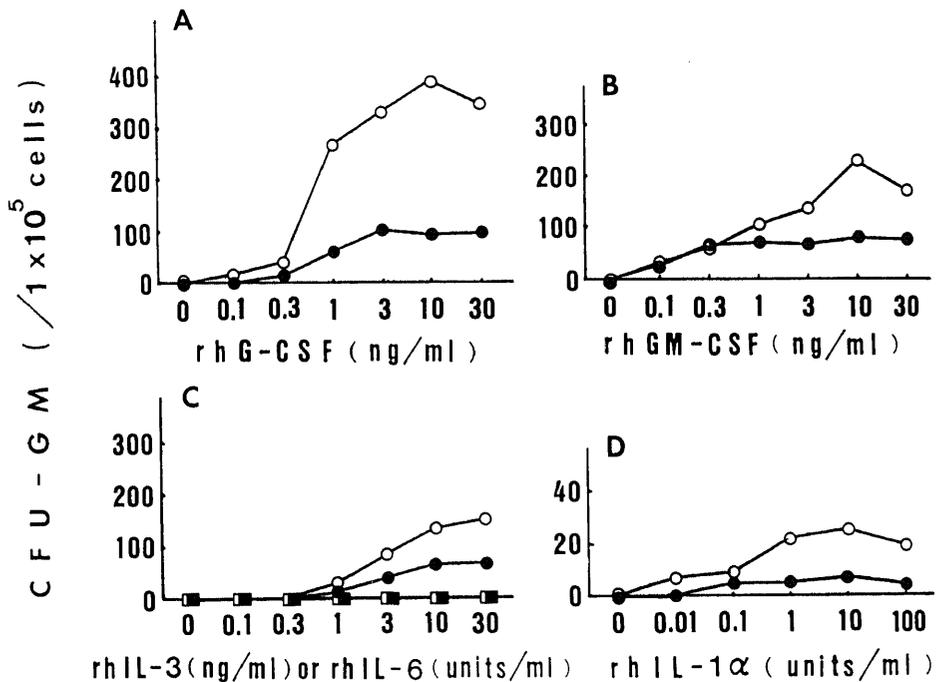


Fig. 1. Dose response curves of various growth factors on human bone marrow CFU-GM colony formation. Colony numbers were counted on day 7 (○-○, □-□) and day 14 (●-●, ■-■). Each point shows mean of the CFU-GM colony number generated from 1 × 10⁵ bone marrow cells using serum-free medium in triplicate cultures. Bone marrow cells were cultured with various doses of rhG-CSF (A), rhGM-CSF (B), rhIL-3 (C; ○-○, ●-●), rhIL-6 (C; □-□, ■-■), and rhIL-1α (D).

human interleukin 1α; rhIL-3, recombinant human interleukin 3; rhIL-6, recombinant human interleukin 6; rhM-CSF, recombinant human monocyte/macrophage colony stimulating factor

クロロアセテートエステラーゼ陽性のコロニーを顆粒球系コロニー (G-colony), 両者の混合したコロニーを顆粒球-単球/マクロファージ系コロニー (GM-colony) とした。

V. My 10 陽性細胞の分離

Wysocki ら²⁰⁾の panning 法によった。まず、ヤギ抗マウス免疫グロブリン (IgG+IgA+IgM) 抗体 (affinity purified antibody to mouse IgG+IgA+IgM (H+L) (Goat)) (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, USA) を 0.05M トリス緩衝液 (PH 9.5) で 100 倍希釈したものを 100×20mm の組織培養皿 (tissue culture dish) (Costar) に散布し、室温で 3 時間静置後、PBS で静かに 3 回洗浄した。一方、 $2 \sim 4 \times 10^7$ 個の骨髄単核非付着細胞に抗 My 10 マウスモノクローナル抗体 (anti-HPCA-1 [human progenitor cell antigen]) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA, USA) を 1×10^6 個あたり $5 \mu\text{l}$ 加え、 4°C で 30 分間反応させ、10% FCS 加 RPMI1640 培養液で 3 回洗浄

後、あらかじめヤギ抗マウス免疫グロブリンで前処理させておいた組織培養皿に静かに加え、 4°C で 2 時間反応させた。反応後の付着細胞をはがし、2 回洗浄後、IMDM に浮遊させ、My 10 陽性細胞分画とした。その際、細胞の一部を取り、fluorescein conjugated IgG fraction goat anti-mouse IgG (heavy & light chains specific) (Cooper Biomedical Inc., Malvern, PA, USA) を二次抗体として 1/40 加え、30 分間反応後洗浄し、My 10 陽性細胞の比率を蛍光顕微鏡にて確認した。

VI. 統計学的検定法

得られた成績は、平均値±標準偏差または標準誤差で示した。平均値の差の検定には、2 群間の場合は Student's t-test を、多群間では 1 元配置分散分析後、Dunnnett の多重比較法を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

I. 各造血因子の濃度依存曲線

正常ヒト骨髄単核非付着細胞による CFU-GM コロ

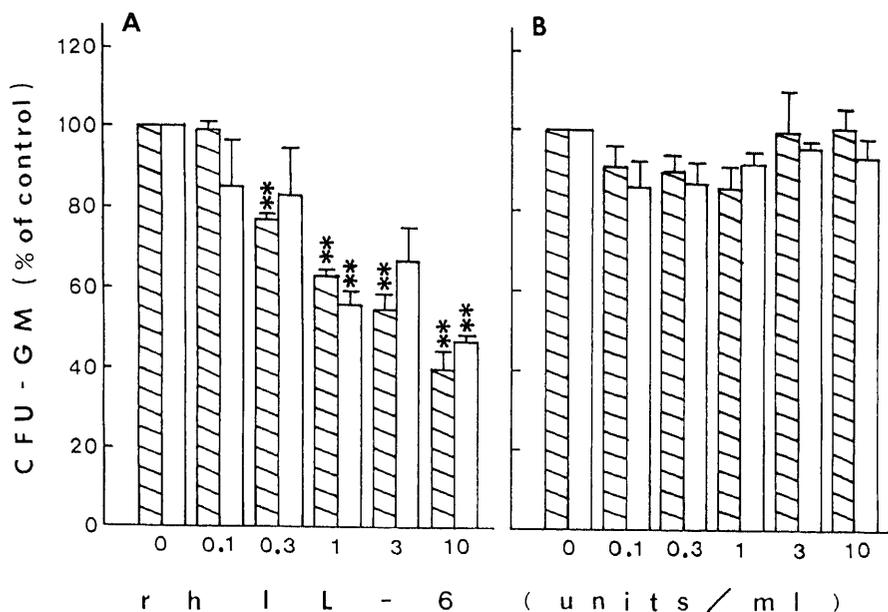


Fig. 2. Effect of rhIL-6 on human bone marrow CFU-GM colony formation in serum-containing culture. Recombinant hIL-6 was added in various concentrations (0.1-10 units/ml) to the bone marrow CFU-GM colony assay system with 5 ng/ml of rhG-CSF (A) or rhGM-CSF (B). Colony numbers were counted on day 7 (▨) and day 14 (□). Each value represents the mean ± standard error of percent of control from three separate experiments. In control cultures, which were incubated with rhG-CSF or rhGM-CSF alone, the absolute colony numbers were approximately 300 on day 7 and 180 on day 14 in both G-CSF- or GM-CSF-induced CFU-GM colony assay. ** $p < 0.01$ vs. controls by one-way ANOVA followed by Dunnnett's multiple comparison.

ニー形成における各造血因子の濃度依存曲線は無血清培養により得た(図1). 図1-A, Bに示されるように, rhG-CSF および rhGM-CSF は濃度依存性に CFU-GM コロニー形成を増強し, 10 ng/ml で最大数のコロニー形成を得たため, 以下の実験では最大数の約80%のコロニー形成を得る濃度と考えられる 5 ng/ml の rhG-CSF, rhGM-CSF を使用した. 図1-C, Dに示されるように, rhIL-3 および rhIL-1 α についても濃度依存性にコロニーを形成したが, その数は rhG-CSF や rhGM-CSF に比べて少なく, また個々のコロニーを形成する細胞も少なかった. rhIL-6 については 30 units/ml まで濃度を増加させても全くコロニーは形成しなかった.

II. rhIL-6 の rhG-CSF および rhGM-CSF に対する作用

血清存在下の培養において一定濃度 (5 ng/ml) の

rhG-CSF または rhGM-CSF 存在下で, rhIL-6 を濃度を変えて加え, その共同作用について検索した. 図2-Aに示されるように, rhG-CSF の存在下に rhIL-6 を付加すると濃度依存性に CFU-GM コロニーの形成を抑制し, 1 unit/ml 以上の rhIL-6 で有意であった. 一方, 図2-Bに示されるように, rhGM-CSF については付加する rhIL-6 の濃度を変えても刺激効果も抑制効果もみられなかった. また, 7日目のコロニーと14日目のコロニーとの間に有意な差はなかった. つぎに同様の実験を無血清培養で行った. 図3-A, Bに示されるように, 血清存在下での結果と同様に, rhIL-6 は濃度依存性に rhG-CSF に対して抑制的に作用し, rhGM-CSF に対しては特に効果はみられなかった. さらに panning 法により My10 陽性細胞を分画し, 同様の実験を行った. 形成されたコロニー数を比較すると, panning 法により CFU-GM は約 5 倍に濃縮さ

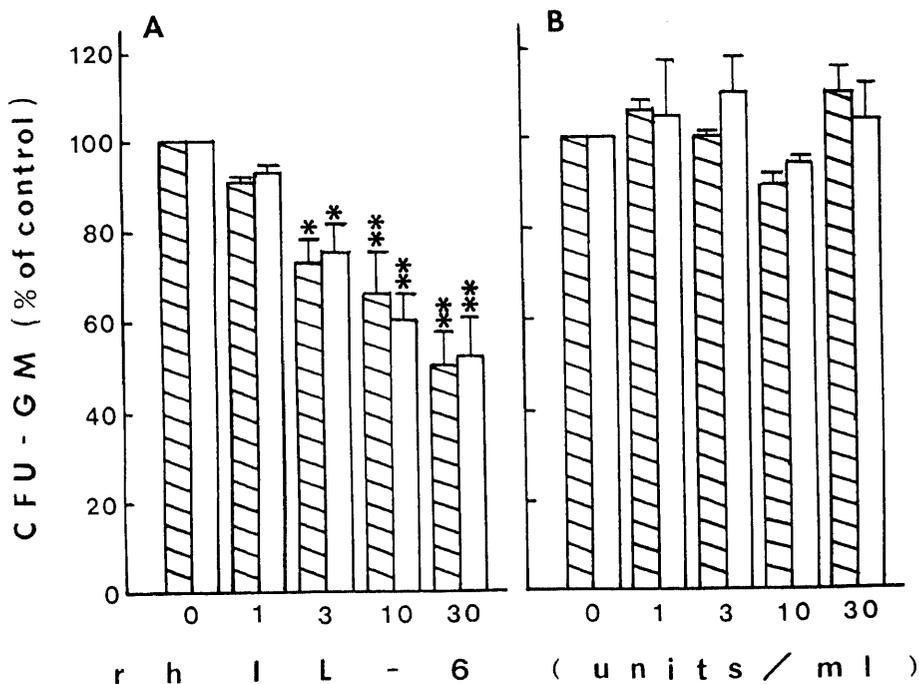


Fig. 3. Effect of rhIL-6 on human bone marrow CFU-GM colony formation in serum-free culture. Recombinant hIL-6 was added in various concentrations (1-30 units/ml) to the bone marrow CFU-GM colony assay system with 5 ng/ml of rhG-CSF (A) or rhGM-CSF (B). Colony numbers were counted on day 7 (▨) and day 14 (□). Each value represents the mean \pm standard error of percent of control from three separate experiments. In control cultures, which were incubated with rhG-CSF or rhGM-CSF alone, the absolute colony numbers were 209 ± 32 (A, day 7), 164 ± 6 (A, day 14), 203 ± 3 (B, day 7), and 162 ± 39 (B, day 14), respectively. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. controls by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison.

れたと考えられた。図4-A, B に示されるように、My10 陽性細胞分画についても、rhIL-6 は濃度依存性に rhG-CSF の作用を抑制し、rhGM-CSF の作用に対する効果はみられなかった。つぎに rhIL-6 を rhG-CSF あるいは rhGM-CSF に濃度を変えて付加したときの CFU-GM コロニー数の経時の変化を調べた(図5)。CFU-GM コロニー数はいずれも4日目には少数であり7日目に最大となり、以後は徐々に減少した。従って rhG-CSF あるいは rhGM-CSF に rhIL-6 を加えたからといって CFU-GM コロニーが形成される期間が短縮する傾向は認められなかった。一方、従来 CFU-GM の増殖、分化に関与していると報告されている rhIL-3 および rhIL-1 α を rhG-CSF あるいは rhGM-CSF に加えて、CFU-GM コロニー形成

に対する効果を調べた結果が図6および図7である。図6-A, B に示されるように、rhIL-3 は濃度依存性に rhG-CSF と rhGM-CSF の両者の作用を増強した。また図7-A, B に示されるように、rhIL-1 α は 0.1 units/ml の低濃度で rhG-CSF および rhGM-CSF の両者の作用を増強し、10 units/ml の濃度では特に刺激効果も抑制効果もみられなかった。

III. rhIL-6 による前処理の rhG-CSF および rhGM-CSF に対する効果

つぎに rhIL-6 の rhG-CSF に対する抑制作用の機構を検討するために、骨髄単核非付着細胞を一定時間、5 units/ml の rhIL-6 と反応させ、IMDM で3回洗浄後、rhG-CSF または rhGM-CSF を加えたものと、rhIL-6 を付加せず IMDM のみと前処理したもの

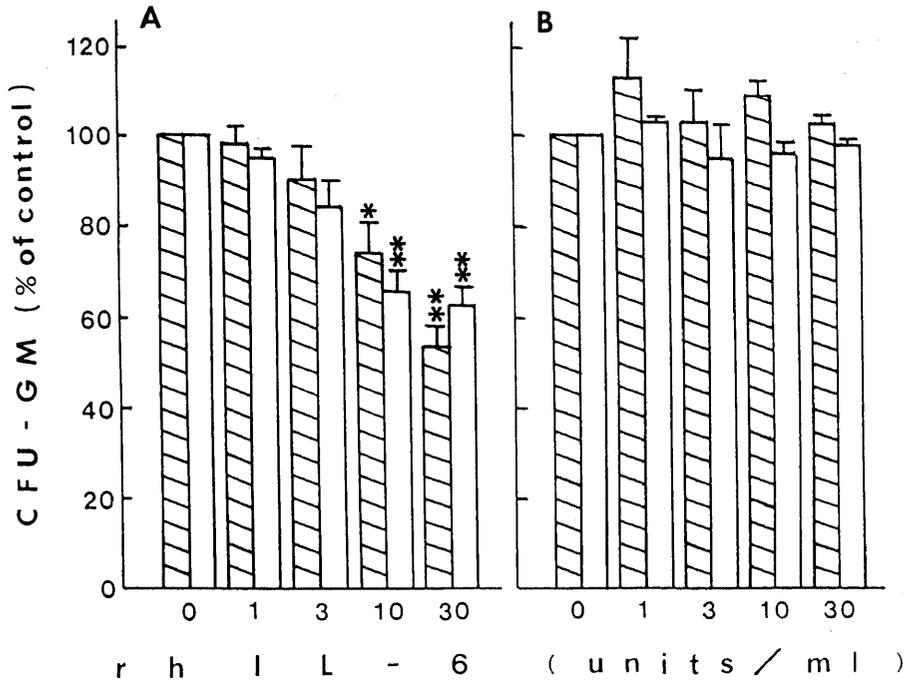


Fig. 4. Effect of rhIL-6 on CFU-GM colony formation with My10 positive cell enriched population obtained from human bone marrow. To investigate the direct effect of rhIL-6 on GM-colony forming progenitor cells, My10 positive cells were enriched by a panning method as described in Materials and Methods. Recombinant hIL-6 was added in various concentrations (1-30 units/ml) to the bone marrow CFU-GM colony assay system with 5 ng/ml of rhG-CSF (A) or rhGM-CSF (B). Colony numbers were counted on day 7 (■) and day 14 (□). Each value represent the mean \pm standard error of percent of control from three separate experiments. In control cultures, which were incubated with rhG-CSF or rhGM-CSF alone, the absolute colony numbers were 90 ± 5 (A, day 7), 104 ± 60 (A, day 14), 57 ± 36 (B, day 7), and 75 ± 49 (B, day 14), respectively. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. controls by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison.

とで無血清培養下に形成された CFU-GM コロニー数を比較した。表 1 に示されるように、rhIL-6 と前処理すると、rhG-CSF により形成された CFU-GM コロニー数は有意に抑制されたが、rhGM-CSF により形成された CFU-GM コロニーについては特に変化はみられなかった。rhG-CSF 添加でみられた rhIL-6 の前処理による抑制は、30 分間という比較的短時間の前処理においても認められた。つぎに骨髓単核非付着細胞に 5 units/ml の rhIL-6 と種々の濃度の rhG-CSF とを同時に加えて 30 分間前処理し、3 回洗浄後、rhG-CSF による CFU-GM コロニー形成を無血清培養条件下でみた。表 2 に示されるように、rhIL-6 単独による前処理では CFU-GM コロニー形成が抑制されたが、その抑制は rhG-CSF とともに前処理することにより解除された。すなわち、低濃度 (0.1 ng/ml) の rhG-CSF を前処理の際に加えた時は CFU-GM コロニー形成は軽度回復しただけであったが、高濃度 (10 ng/ml) の rhG-CSF を加えた時は対照とした培養液のみと前処理した時のコロニー形成に近い数が得られた。

IV. 形成されたコロニーのエステラーゼ染色による検討

軟寒天中に形成したコロニーを寒天ごとスライドグラス上に移し、エステラーゼ二重染色を施した結果を表 3 に示す。rhG-CSF 単独ではほとんど顆粒球系コロニーが形成されたのに対し、rhGM-CSF 単独では単球/マクロファージ系コロニーが 5%~8% をしめた。また、rhIL-6 を加えても顆粒球系コロニーと単球/マクロファージ系コロニーの比率は有意に変化したとはいえなかった。

考 察

ヒトの造血幹細胞に対する IL-6 の効果に関する報告は少ない。Leary ら²⁰はヒト IL-6 が IL-3 と相乗的に作用してヒト芽球コロニーの増殖を支持することを報告した。また Hoang ら²¹は rhIL-6 の急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) の患者の末梢血の芽球前駆細胞に対する効果について調べたところ、単独ではほとんど効果はなく、GM-CSF または IL-3 との相乗作用で AML 芽球コロニーの形成を刺

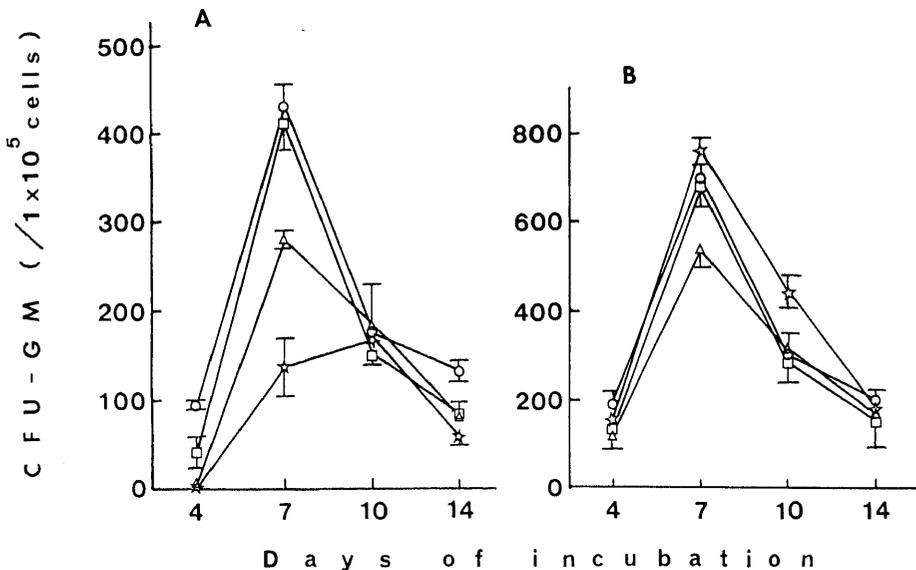


Fig. 5. Time course analysis of CFU-GM colony formation in different concentration of rhIL-6. Human bone marrow nonadherent mononuclear cells (1×10^5 cells/ml) were cultured with 5 ng/ml of rhG-CSF (A) or rhGM-CSF (B) in the presence of various doses (0.1-10 units/ml) of rhIL-6 in serum-containing medium. The cultures were done in the absence of rhIL-6 (○-○) or in the presence of rhIL-6 at the concentrations of 0.1 unit/ml (□-□), 1 unit/ml (△-△), and 10 units/ml (☆-☆). Each point represents the mean \pm standard deviation in triplicate cultures.

激し、正常骨髄細胞における CFU-GM についても同様の相乗効果が見られたと報告した。著者はまず rhIL-6 の正常ヒト骨髄 CFU-GM コロニー形成に対する効果について調べたが、図 1 に示すとおり濃度を増加させても rhIL-6 は全く CFU-GM コロニーを形成しなかった。従って IL-6 単独による CFU-GM の刺激効果はないと考えられた。つぎに単独で正常ヒト骨髄 CFU-GM コロニー形成を支持する rhG-CSF および rhGM-CSF に、rhIL-6 を濃度を変えて付加しその効果をみたところ、血清存在下では図 2 に示すように、rhIL-6 は濃度依存性に rhG-CSF の作用を抑制し、一方 rhGM-CSF に対しては効果を示さなかった。つぎに血清中に含まれる微量の CSF との反応の可能性を取り除くために無血清培養で行ってみたが、図 3 に示すように同様の結果が得られた。以上より rhIL-6 にはヒト骨髄 CFU-GM コロニー形成において、rhG-CSF と拮抗する機序が存在することが示唆された。その可能性を確かめるために、まず rhIL-6 との前

処理の実験を行った。細胞を一定時間十分量の rhIL-6 と反応させ、その後 3 回洗浄し、培養液中の rhIL-6 を取り除いた状態で rhG-CSF または rhGM-CSF と反応させ CFU-GM コロニー形成をみた。その結果、表 1 に示されるように rhIL-6 と前処理して rhG-CSF を加えると、rhIL-6 を加えなかったものに比べて CFU-GM コロニー形成は有意に抑制され、rhGM-CSF に関しては変化はなかった。つぎに、一定濃度の rhIL-6 に種々の濃度の rhG-CSF を混合して前処理を行い、その後 rhG-CSF による CFU-GM コロニー形成をみたところ、表 2 に示されるように高濃度の rhG-CSF を加えて前処理したものでは、rhIL-6 の前処理による抑制は消失した。以上の結果より、rhIL-6 が CFU-GM またはさらに未分化な造血幹細胞の、rhG-CSF 反応性を低下させた可能性が示唆された。

Hirano ら¹⁰ は IL-6 (BSF-2) のアミノ酸レベルの構造を決定した。それによるとヒト IL-6 は 184 個のアミ

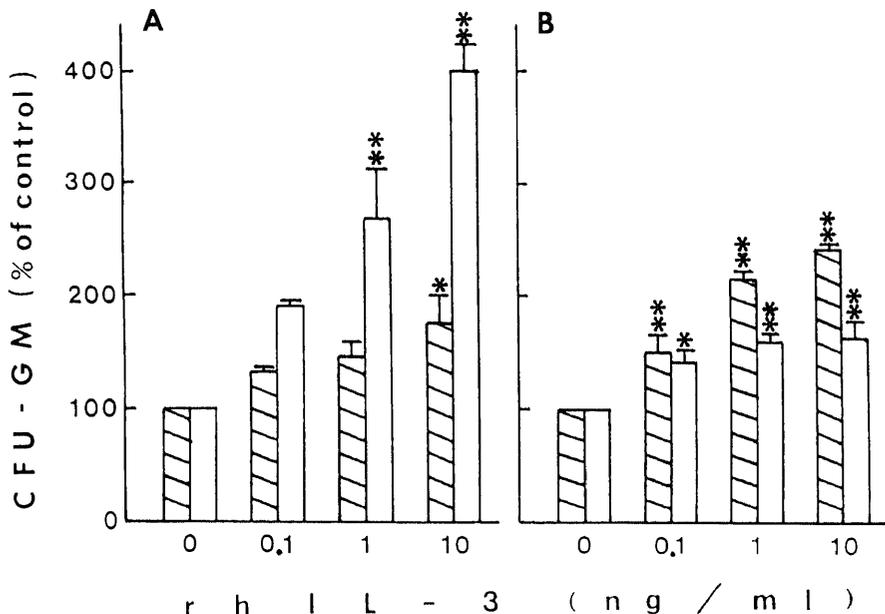


Fig. 6. Effect of rhIL-3 on human bone marrow CFU-GM colony formation in serum-free culture. Recombinant hIL-3 was added in various concentrations (0.1-10 ng/ml) to the bone marrow CFU-GM colony assay system with 5 ng/ml of rhG-CSF (A) or rhGM-CSF (B). Colony numbers were counted on day 7 (▨) and day 14 (□). Each value represents the mean \pm standard error of percent of control from three separate experiments. In control cultures, which were incubated with rhG-CSF or rhGM-CSF alone, the absolute colony numbers were 134 ± 49 (A, day 7), 27 ± 5 (A, day 14), 63 ± 12 (B, day 7), and 70 ± 2 (B, day 14), respectively. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. controls by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison.

ノ酸よりなる分子量21000の蛋白で、さまざまな造血因子と構造を比較したところ、G-CSF との有意な一次構造の類似性がみられた⁴⁾ (図8-A)。つまり IL-6 と G-CSF がアミノ酸レベルで25.7%の一致を認め、特にシステインが完全に一致していた。また、Yasukawa ら²⁰⁾は IL-6 の染色体遺伝子を単離し、その構造を決定した。それによると IL-6 の染色体遺伝子は5つのエクソンと4つのイントロンで構成されている。G-CSF も同様のエクソン/イントロン構成を示し、またエクソンの長さがよく一致していた²⁰⁾ (図8-B)。本研究における rhIL-6 と rhG-CSF との拮抗作用の機序として、以上のような IL-6 と G-CSF との構造の類似性より、造血幹細胞におけるそれらの受容体を介しての相互作用の可能性も考えられた。IL-6 の受容体については Taga ら³⁰⁾が、¹²⁵I-標識 rIL-6 を用いて解析を行い、IL-6 受容体は種々の細胞株で発現しており、IL-6 受容体が IL-6 とのみ結合し、G-CSF とは結合しないことを示した。しかし逆に、G-CSF の受

容体に G-CSF のみならず IL-6 も結合するかどうかは報告がなく不明である。一般に造血因子は、標的細胞表面に存在する特異的な受容体への結合を介して作用すると考えられている。各分化段階の造血幹細胞にはふつう、いくつかの造血因子に対する受容体が同時に存在し、ある造血因子と受容体との結合が他の受容体の発現を抑制 (down-modulation) することが報告されている³¹⁾。それによると、造血幹細胞の分化のより初期に作用する造血因子が、より後期に作用する造血因子の受容体の発現を制御しているが、本研究の場合、IL-6 とその受容体との結合が G-CSF 受容体の発現を抑制したために rhG-CSF による CFU-GM コロニー形成を抑制した可能性が示唆された。今後 CFU-GM の IL-6 および G-CSF 受容体の詳細な研究が必要とされるが、現在のところ高度に純化された CFU-GM 分画の採取が困難なことが障壁となっている。本研究で試みられた抗マウス My10 モノクローナル抗体を使用した panning 法による未分化な幹細胞

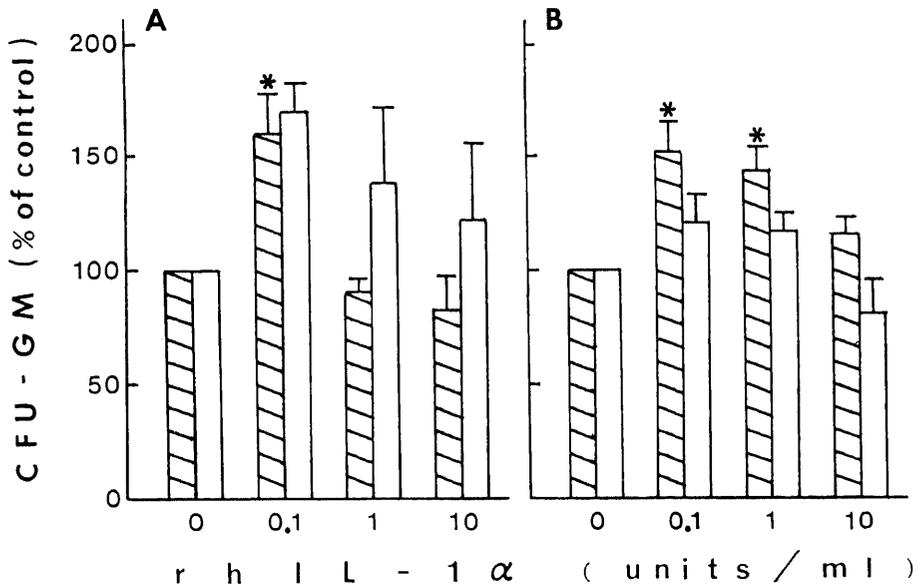


Fig. 7. Effect of rhIL-1 α on human bone marrow CFU-GM colony formation in serum-free culture. Recombinant hIL-1 α was added in various concentrations (0.1-10 units/ml) to the bone marrow CFU-GM colony assay system with 5 ng/ml of rhG-CSF (A) or rhGM-CSF (B). Colony numbers were counted on day 7 (▨) and day 14 (□). Each value represents the mean \pm standard error of percent of control from three separate experiments. In control cultures, which were incubated with rhG-CSF or rhGM-CSF alone, the absolute colony numbers were 82 ± 38 (A, day 7), 51 ± 33 (A, day 14), 65 ± 31 (B, day 7), and 63 ± 38 (B, day 14), respectively. * $p < 0.05$ vs. controls by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison.

Table 1. The effect of preincubation with rhIL-6 on human bone marrow rhG-CSF- or rhGM-CSF-induced CFU-GM colony formation.

Time	Preincubation*		rhG-CSF-induced CFU-GM		rhGM-CSF-induced CFU-GM	
	rhIL-6		Day 7	Day 14	Day 7	Day 14
	(units/ml)		(per 10 ⁵ cells)		(per 10 ⁵ cells)	
30 min	0		316±52 ^b	60±4	234±14	226±26
	5		164±20†† ^c	28±4††	244±40	196±40
1 hr	0		462±74	174±6	162±22	140±14
	5		302±58†	76±16††	156±8	170±15
24 hr	0		158±10	130±6	272±16	168±8
	5		78±14††	58±6††	260±4	207±24

^a After preincubation with rhIL-6 (5 units/ml), cells were washed three times with PBS, and then incubated with rhG-CSF or rhGM-CSF (5 ng/ml) in serum-free culture.

^b The value represents the mean ± standard deviation in triplicate cultures.

^c Statistic significance was evaluated for control cultures, in which cells were preincubated with medium alone, by Student's t test. †† p<0.01, † p<0.05.

Table 2. The effect of preincubation with rhIL-6 and rhG-CSF on human bone marrow rhG-CSF-induced CFU-GM colony formation.

Exp.	Preincubation*		rhG-CSF-induced CFU-GM	
	rhIL-6	rhG-CSF	Day 7	Day 14
	(units/ml)	(ng/ml)	(per 10 ⁵ cells)	(per 10 ⁵ cells)
1	0	0	209±5 ^b	93±5
	5	0	125±13†† ^c	58±2††
	5	0.1	171±3	78±2
	5	1	199±21	91±7
	5	10	163±30	94±14
	0	10	170±24	94±6
	2	0	0	31±3
5		0	15±1††	10±2†
5		0.1	16±4††	10±1†
5		1	16±4††	13±1
5		10	35±2	21±3
0		10	27±4	16±6

^a After preincubation with rhIL-6 (5 units/ml) and various concentration (0.1-10 ng/ml) of rhG-CSF for 30 min, cells were washed three times with PBS and then incubated with rhG-CSF (5 ng/ml) alone in serum-free culture.

^b The value represents the mean ± standard deviation in triplicate cultures.

^c Statistic significance was evaluated for control cultures, in which cells were preincubated with medium alone, by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison. †† p<0.01, † p<0.05.

の濃縮，純化も充分ではなかった。

造血幹細胞の研究をする際，いくつか解決すべき問題がある．一般に培養には血清を15-30%添加する．ところが血清には未知の物質や造血因子が含まれているために，純化された造血因子を使用したとしてもその相互作用の影響が考えられ，正確に造血因子の作用をあらわしているとはいえない．そのため，血清の代

わりに比較的組成のはっきりした血清成分や物質で代替しようとする無血清培養法が，1976年の Guilbertらの報告²⁾に端を発して行われるようになり本研究においてもいくつかの実験を無血清培養を用いて行った．その結果，図2および図3に示されるように，血清を含む培養でも無血清培養でも同じ傾向が得られたため，本研究で用いられた血清の影響は無視できるも

Table 3. Characterization of CFU-GM colonies.

Growth factor		Day 7	Day 14
rhG-CSF	G -colony ^a	90.3% ^b	98.4%
	GM-colony	9.6%	0
	M -colony	0.1%	1.6%
rhG-CSF + rhIL-6 ^c	G -colony	97.3%	84.6%
	GM-colony	2.7%	10.1%
	M -colony	0	5.3%
rhGM-CSF	G -colony	90.6%	90.9%
	GM-colony	3.9%	1.3%
	M -colony	5.5%	7.8%
rhGM-CSF + rhIL-6	G -colony	96.0%	71.8%
	GM-colony	0.7%	19.4%
	M -colony	3.3%	8.8%

^a G-colony, granulocyte colony; GM-colony, granulocyte-monocyte/macrophage colony; M-colony, monocyte/macrophage colony.

^b Percent of each type of colony identified with double esterase staining method. More than 5 agar cultures were counted on 7 and 14 days after the beginning of incubation.

^c Recombinant hIL-6 was added to rhG-CSF (5 ng/ml) or rhGM-CSF (5 ng/ml) at the final concentration of 10 units/ml during the culture.

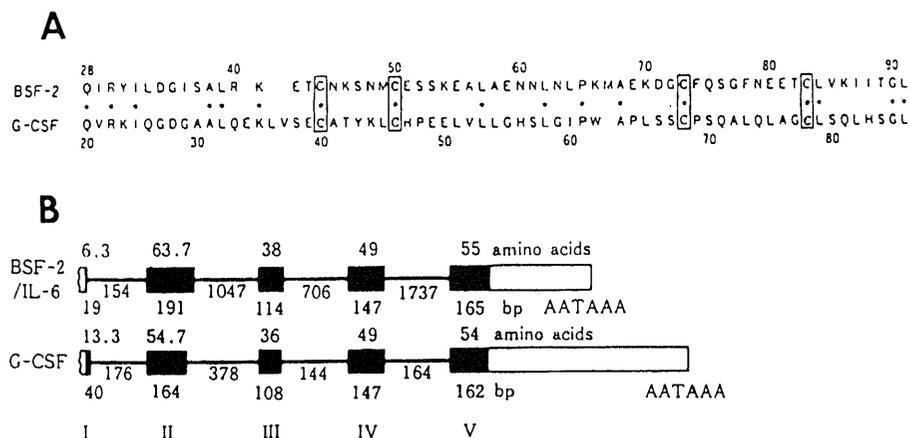


Fig. 8. Comparison of the amino acid sequence (A) and the gene organization (B) between BSF-2/IL-6 and G-CSF. This figure is quoted from references No. 14) and 27).

のであると考えられた。つぎに補助細胞 (accessory cells) の問題について考えてみると、正常の骨髄細胞に含まれている造血幹細胞はわずかであり、その生育、分化には残りのさまざまな種類の細胞が影響する。たとえば単球から IL-1, GM-CSF, M-CSF が産生されたり³⁰⁾、T細胞が幹細胞に作用したり³⁴⁾、IL-1 が線維芽細胞や血管内皮細胞に働き CSF を放出させる³⁵⁾³⁶⁾などの報告がしばしばみられている。本研究のすべての実験で骨髄単核細胞よりプラスチックフラスコによる付着細胞の除去を行い、非付着細胞の α -ナフチルブチレートエスラーゼ陽性細胞は2%以下であったが、わずかに残存する単球の影響は常に考えておく必要がある。またT細胞の除去は行わなかった。補助細胞の影響を取り除くために、抗 My10 マウスモノクローナル抗体を用いて造血幹細胞の純化、濃縮 (enrichment) を行った。この抗体は未熟なヒト骨髄細胞株 KG-1a の細胞をマウスに免疫して得られたもので、ヒト造血幹細胞を認識するといわれている³⁷⁾。そのため My10 陽性細胞分画では造血幹細胞が濃縮され、コロニー形成が増強するとされている³⁸⁾³⁹⁾。今回の実験では panning 法により My10 陽性細胞分画を採取し、rhG-CSF または rhGM-CSF に対する rhIL-6 の効果について調べたところ、図4に示されるように My10 陽性細胞でも rhG-CSF と rhIL-6 は CFU-GM コロニー形成に対して拮抗的に作用した。My10 陽性細胞の比率を蛍光顕微鏡で調べると、骨髄単核非付着細胞中の My10 陽性細胞は平均2%であるのに対し、panning 法により20-25%に濃縮された。しかし、それ以上の濃縮は難しく、補助細胞の影響を完全に取り除いたとは言えなかった。

造血幹細胞の多くは Go 期と呼ばれる細胞周期中の静止期にある。これらの造血幹細胞において、いったん活発な増殖が開始され Go 期を離れると、さまざまな段階 (lineage) の造血因子の影響を受け、次々に増殖、分化をおこしてくることになる。小川⁴⁰⁾は造血因子をつぎの3つに分類した。一つは分化段階後期の造血幹細胞に作用し、各血球選択的に働く因子 (late-acting, lineage-specific factors) であり、第二は分化段階初期の造血幹細胞に作用し、血球非選択的に働く因子 (early-acting, lineage-non-specific factors) であり、第三は静止期の幹細胞に働く因子である。G-CSF は無血清培養下では純粋な顆粒球コロニーのみを形成することから⁴¹⁾、lineage-specific factor と考えられており、そのほか M-CSF やエリスロポエチンもこれに属する。GM-CSF は造血幹細胞の発達中間段階を支持すると考えられ、ヒト骨髄細胞で顆粒球、

単球/マクロファージの混合するコロニーを形成する。最近 rhGM-CSF はさまざまなタイプの単一および多能性 (multilineage) のコロニーの形成やエリスロポエチンの存在下で赤芽球系コロニーの形成も支持するという報告⁴²⁾⁴³⁾がみられる。このことより GM-CSF の標的細胞には多能性幹細胞をも含むことが示唆される。Sonoda ら⁴⁴⁾は GM-CSF 単独、あるいは GM-CSF と IL-3 との共同作用では十分なコロニー形成をみなかったが、lineage-specific factor である G-CSF やエリスロポエチンを加えると著明にコロニー形成が増強されることを無血清培養下で観察した。このことより GM-CSF は成熟の最終段階よりもむしろ造血幹細胞の発達の初期段階に主として働き、前駆細胞の増殖を支持することが示唆された。IL-3 はもともと Ihle らによりヌードマウス脾細胞で20 α ステロイド脱水素酵素の合成を誘導する因子として定義され⁴⁵⁾、その後未分化な造血幹細胞に働く多能性コロニー形成刺激因子 (multi-CSF) としての作用を有することが明らかとなった⁴⁶⁾。Suda ら⁴⁷⁾はマウス多能性幹細胞の培養で IL-3 を遅らせて添加したところ芽球コロニー数は減少したが、その増殖、分化の性質は全く変化しなかったことから、IL-3 はすでに細胞周期に入った多能性幹細胞の持続的な増殖は支持するが、細胞周期に入れるための引き金にはならないと考えた。また Paquette ら⁴⁸⁾は IL-3 が hG-CSF, hGM-CSF と相乗的に働いて CFU-GM コロニー形成を刺激したことを報告したが、これは IL-3 による CFU-GM の支持に lineage-specific factor が必要であることを示唆し、このことより IL-3 は造血幹細胞の発達後期の成熟過程は支持しないと考えられた。Stanley ら⁴⁹⁾⁵⁰⁾はヒト膀胱癌細胞株5637の培養上清中に存在し、マウス造血幹細胞の増殖を IL-3 と相乗的に支持する作用のある hemopoietin-1 を報告し、Mochizuki ら⁵¹⁾は hemopoietin-1 が IL-1 α と同一の物質であろうと報告した。Zsebo ら⁵²⁾は hemopoietin-1 は単独ではコロニー形成を刺激せず、IL-3 の未分化な造血幹細胞に対する作用を増強することから、hemopoietin-1 は IL-3 に反応する細胞よりもっと未分化な多能性幹細胞に作用し、細胞の CSF 反応性獲得に寄与するのではないかと考えた。以上のことを考慮し、本研究では rhIL-6 とともに rhIL-3, rhIL-1 α の作用も検討したが、rhG-CSF と rhIL-6 とでみられた拮抗作用は rhIL-3 や rhIL-1 α では認められなかった。Ikebuchi ら¹⁹⁾はマウスの未分化な芽球コロニーの出現は IL-6 が存在すると、IL-3 単独の時よりもかなり早期にみられ、個々のコロニーの増殖速度には変化はみられなかったことから、IL-6 が

マウス造血幹細胞の Go 期を短縮していると考えた。のちに G-CSF も IL-3 と相乗的に作用して造血幹細胞の Go 期を短縮し、多能性 (multilineage) コロニーの出現を早期にしたとの報告がみられた⁵⁰⁾。従来の報告と本研究の結果を加味して、図 9 に示すような顆粒球-単球/マクロファージ系の造血幹細胞の分化と種々の造血因子の標的細胞をあらわすモデルが考えられた。

In vivo の造血系についてははるかに複雑であると考えられる。骨髄造血微細環境として骨髄中にはさまざまな補助細胞が存在し、それが直接に、あるいは間接的に造血に影響を及ぼし、また造血因子についても、多くの因子の相互作用の結果として造血幹細胞の分化、増殖が表現されているはずである。生体でのサイトカインの複雑なネットワークの解明と造血因子の臨床応用に向けて、in vitro における研究の重要性が再認識された。

結 論

rhIL-6 の正常ヒト骨髄 CFU-GM に対する効果を、単独の場合と rhG-CSF あるいは rhGM-CSF との共同作用とで検索し、以下の結論を得た。

1. 無血清培養下で、rhIL-6 は単独では全く正常ヒト骨髄 CFU-GM コロニー形成を刺激しなかった。

2. rhIL-6 を濃度を変えて rhG-CSF または rhGM-CSF に加え、CFU-GM コロニー形成に対する効果をみたところ、rhG-CSF に対しては 0-30 units/ml の範囲で濃度依存性に CFU-GM コロニー形成を抑制し、rhGM-CSF に対しては影響を及ぼさなかった。血清存在下、無血清培養条件下、My 10 陽性細胞

分画を用いた時のいずれにおいても同じ傾向がみられた。

3. rhIL-6 を rhG-CSF または rhGM-CSF に加えても CFU-GM コロニーが形成される期間は短縮しなかった。

4. rhG-CSF はほとんど顆粒球系コロニーの形成を支持し、rhGM-CSF は一部単球/マクロファージ系コロニーの形成も支持したが、rhIL-6 との共同作用によって形成されるコロニーの形態に特に変化はみられなかった。

5. rhIL-6 と短時間 (30分間) 前処理した骨髄細胞で、rhG-CSF または rhGM-CSF による CFU-GM コロニー形成を無血清培養下でみたところ、rhG-CSF による CFU-GM コロニー形成は培養液のみで前処理したものと比較して有意に抑制され、rhGM-CSF による CFU-GM コロニー形成には影響を及ぼさなかった。またその抑制は高濃度の rhG-CSF を加えて前処理することにより消失した。

以上より、正常ヒト骨髄 CFU-GM コロニー形成に対する rhG-CSF と rhIL-6 の拮抗作用は、rhIL-6 の CFU-GM におけるその受容体との結合が、G-CSF 受容体の発現を抑制したことによる機序が可能性として考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、研究の御指導と御校閲を賜りました恩師谷口昂教授に深甚なる感謝の意を表します。また、終始直接御指導、御教示を頂きました小泉晶一講師、宮脇利男講師、ならびに小児科血液グループの諸先生、教室員の皆様に深謝致します。

文 献

- 1) Till, J. E. & McCulloch, E. A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research*, 14, 213-222 (1961).
- 2) Pike, B. L. & Robinson, W. A.: Human bone marrow colony growth in agar-gel. *J. Cell. Physiol.*, 76, 77-84 (1970).
- 3) Worton, R. G., McCulloch, E. A. & Till, J. E.: Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture. *J. Cell. Physiol.*, 74, 171-182 (1969).
- 4) Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y., Yamazaki, T., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., Nomura, H.

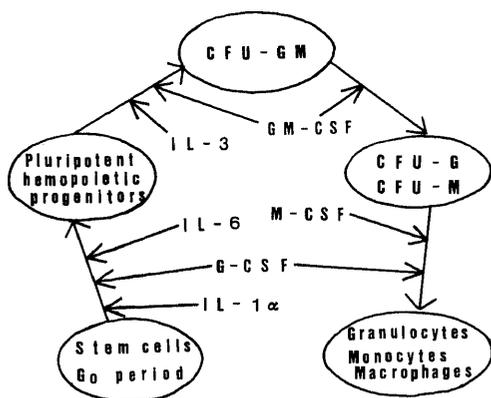


Fig. 9. A schematic model of differentiation of myeloid hemopoietic stem cells.

- & Ono, M.: Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature*, **319**, 415-418 (1986).
- 5) Souza, L. M., Boone, T. C., Gabrilove, J., Lai, P. H., Zsebo, K. M., Murdock, D. C., Chazin, V. R., Bruszewski, J., Lu, H., Chen, K. K., Barendt, J., Platzer, E., Moore, M. A. S., Mertelsmann, R. & Welte, K.: Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*, **232**, 61-65 (1986).
- 6) Wong, G. G., Witek, J. S., Temple, P. A., Wilkens, K. M., Leary, A. C., Luxenberg, D. P., Jones, S. S., Brown, E. L., Kay, R. M., Orr, E. C., Shoemaker, C., Golde, D. W., Kaufman, R. J., Hewick, R. M., Wang, E. A. & Clark, S. C.: Human GM-CSF: Molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science*, **228**, 810-815 (1985).
- 7) Lee, F., Yokota, T., Otsuka, T., Gemmell, L., Larson, N., Luh, J., Arai, K. & Rennick, D.: Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4360-4364 (1985).
- 8) Cantrell, M. A., Anderson, D., Cerretti, D. P., Price, V., McKereghan, K., Tushinski, R. J., Mochizuki, D. Y., Larsen, A., Grabstein, K., Gillis, S. & Cosman, D.: Cloning, sequence, and expression of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6250-6254 (1985).
- 9) Kawasaki, E. S., Ladner, M. B., Wang, A. M., Arsdell, J. V., Warren, M. K., Coyne, M. Y., Schweickart, V. L., Lee, M. T., Wilson, K. J., Boosman, A., Stanley, E. R., Ralph, P. & Mark, D. F.: Molecular cloning of a complementary DNA encoding human macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1). *Science*, **230**, 291-296 (1985).
- 10) Wong, G. G., Temple, P. A., Leary, A. C., Witek-Giannotti, J. S., Yang, Y., Ciarletta, A. B., Chung, M., Murtha, P., Kriz, R., Kaufman, R. J., Ferenz, C. R., Sibley, B. S., Turner, K. J., Hewick, R. M., Clark, S. C., Yanai, N., Yokota, H., Yamada, M., Saito, M., Motoyoshi, K. & Takaku, F.: Human CSF-1: Molecular cloning and expression of 4-kb cDNA encoding the human urinary protein. *Science*, **235**, 1504-1508 (1987).
- 11) Cosman, D.: Colony-stimulating factors in vivo and in vitro. *Immunol. Today*, **9**, 4, 97-98 (1988).
- 12) Naldini, A., Fleischmann Jr., W. R., Ballas, Z. K., Klimpel, K. D. & Klimpel, G. R.: Interleukin 2 inhibits in vitro granulocyte-macrophage colony formation. *J. Immunol.*, **139**, 1880-1884 (1987).
- 13) Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K. H. & Kishimoto, T.: Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5490-5494 (1985).
- 14) Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T. & Kishimoto, T.: Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, **324**, 73-76 (1986).
- 15) Haegeman, G., Content, J., Volckaert, G., Derynck, R., Tavernier, J. & Fiers, W.: Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. *Eur. J. Biochem.*, **159**, 625-632 (1986).
- 16) Zilberstein, A., Ruggieri, R., Korn, J. H. & Revel, M.: Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J.*, **5**, 10, 2529-2537 (1986).
- 17) Van Damme, J., Opdenakker, G., Simpson, R. J., Rubira, M. R., Cayphas, S., Vink, A., Billiau, A. & Snick, J. V.: Identification of the human 26-kD protein, interferon β_2 (IFN- β_2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, **165**, 914-919 (1987).
- 18) Poupart, P., Vandenabeele, P., Cayphas, S.,

- Snick, J. V., Haegeman, G., Kruys, V., Fiers, W. & Content, J.:** B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein (BSF-2, HuIFN- β 2, HPGF). *EMBO J.*, **6**, 5, 1219-1224 (1987).
- 19) **Ikebuchi, K., Wong, G. G., Clark, S. C., Ihle, J. N., Hirai, Y. & Ogawa, M.:** Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 9035-9039 (1987).
- 20) **Koike, K., Nakahata, T., Takagi, M., Kobayashi, T., Ishiguro, A., Tsuji, K., Naganuma, K., Okano, A., Akiyama, Y. & Akabane, T.:** Synergism of BSF-2/interleukin 6 and interleukin 3 on development of multipotential hemopoietic progenitors in serum-free culture. *J. Exp. Med.*, **168**, 879-890 (1988).
- 21) **Wong, G. G., Witek-Giannotti, J. S., Temple, P. A., Kriz, R., Ferenz, C., Hewick, R. M., Clark, S. C., Ikebuchi, K. & Ogawa, M.:** Stimulation of murine hemopoietic colony formation by human IL-6. *J. Immunol.*, **140**, 3040-3044 (1988).
- 22) **Hoang, T., Haman, A., Goncalves, O., Wong, G. G. & Clark, S. C.:** Interleukin-6 enhances growth factor-dependent proliferation of the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Blood*, **72**, 2, 823-826 (1988).
- 23) **Iscove, N. N., Senn, J. S., Till, J. E. & McCulloch, E. A.:** Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture: Effect of conditioned medium from human leukocytes. *Blood*, **37**, 1-5 (1971).
- 24) **Iscove, N. N., Guilbert, L. J. & Weyman, C.:** Complete replacement of serum in primary cultures of erythropoietin-dependent red cell precursors (CFU-E) by albumin, transferrin, iron, unsaturated fatty acid, lecithin and cholesterol. *Exp. Cell Res.*, **126**, 121-126 (1980).
- 25) **Koizumi, S., Yamagami, M., Miura, M., Horita, S., Sano, M., Ikuta, N. & Taniguchi, N.:** Expression of Ia-like antigens defined by monoclonal OKIa1 antibody on hemopoietic progenitor cells in cord blood: A comparison with human bone marrow. *Blood*, **60**, 4, 1046-1049 (1982).
- 26) **Wysocki, L. J. & Sato, V. L.:** "Panning" for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 6, 2844-2848 (1978).
- 27) **Leary, A. G., Ikebuchi, K., Hirai, Y., Wong, G. G., Yang, Y. C., Clark, S. C. & Ogawa, M.:** Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: Comparison with interleukin-1 α . *Blood*, **71**, 6, 1759-1763 (1988).
- 28) **Yasukawa, K., Hirano, T., Watanabe, Y., Muratani, K., Matsuda, T., Nakai, S. & Kishimoto, T.:** Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J.*, **6**, 10, 2939-2945 (1987).
- 29) **Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., Nomura, H. & Yamazaki, T.:** The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor. *EMBO J.*, **5**, 3, 575-581 (1986).
- 30) **Taga, T., Kawanishi, Y., Hardy, R. R., Hirano, T. & Kishimoto, T.:** Receptors for B cell stimulatory factor 2. Quantitation, specificity, distribution, and regulation of their expression. *J. Exp. Med.*, **166**, 967-981 (1987).
- 31) **Walker, F., Nicola, N. A., Metcalf, D. & Burgess, A. W.:** Hierarchical down-modulation of hemopoietic growth factor receptors. *Cell*, **43**, 269-276 (1985).
- 32) **Guilbert, L. J. & Iscove, N. N.:** Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. *Nature*, **263**, 594-595 (1976).
- 33) **Torok-Storb, B.:** Cellular interactions. *Blood*, **72**, 2, 373-385 (1988).
- 34) **Estrov, Z., Roifman, C., Mills, G., Grunberger, T., Gelfand, E. W. & Freedman, M. H.:** The regulatory role of interleukin 2-responsive T lymphocytes on human marrow granulopoiesis. *Blood*, **69**, 4, 1161-1166 (1987).
- 35) **Bagby Jr., G. C., Dinarello, C. A., Wallace, P., Wagner, C., Hefeneider, S. & McCall, E.:** Interleukin 1 stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating activity release by vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, **78**, 1316-1323

(1986).

- 36) Yang, Y., Tsai, S., Wong, G. G. & Clark, S. C.: Interleukin-1 regulation of hematopoietic growth factor production by human stromal fibroblasts. *J. Cell. Physiol.*, **134**, 292-296 (1988).
- 37) Civin, C. I., Strauss, L. C., Brovall, C., Fackler, M. J., Schwartz, J. F. & Shaper, J. H.: Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.*, **133**, 1, 157-165 (1984).
- 38) Lu, L., Walker, D., Broxmeyer, H. E., Hoffman, R., Hu, W. & Walker, E.: Characterization of adult human marrow hematopoietic progenitors highly enriched by two-color cell sorting with My10 and major histocompatibility class II monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, **139**, 6, 1823-1829 (1987).
- 39) Strauss, L. C., Rowley, S. D., La Russa, V. F., Sharkis, S. J., Stuart, R. K. & Civin, C. I.: Antigenic analysis of hematopoiesis. V. Characterization of My-10 antigen expression by normal lymphohematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.*, **14**, 878-886 (1986).
- 40) 小川真紀雄: 造血幹細胞. 代謝, **25**, 6, 489-497 (1988).
- 41) Eliason, J. F.: Granulocyte-Macrophage colony formation in serum-free culture: Effects of purified colony-stimulating factors and modulation by hydrocortisone. *J. Cell. Physiol.*, **128**, 231-238 (1986).
- 42) Emerson, S. G., Sieff, C. A., Wang, E. A., Wong, G. G., Clark, S. C. & Nathan, D. G.: Purification of fetal hematopoietic progenitors and demonstration of recombinant multipotential colony-stimulating activity. *J. Clin. Invest.*, **76**, 1286-1290 (1985).
- 43) Sieff, C. A., Emerson, S. G., Donahue, R. E., Nathan, D. G., Wang, E. A., Wong, G. G. & Clark, S. C.: Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: A multilineage hematopoietin. *Science*, **230**, 1171-1173 (1985).
- 44) Sonoda, Y., Yang, Y., Wong, G. G., Clark, S. C. & Ogawa, M.: Analysis in serum-free culture of the targets of recombinant human hemopoietic growth factors: Interleukin 3 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor are specific for early developmental stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4360-4364 (1988).
- 45) 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**, 6, 2184-2189 (1981).
- 46) 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**, 1, 282-287 (1983).
- 47) 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).
- 48) Paquette, R. L., Zhou, J. Y., Yang, Y. C., Clark, S. C. & Koeffler, H. P.: Recombinant gibbon interleukin-3 acts synergistically with recombinant human G-CSF and GM-CSF in vitro. *Blood*, **71**, 6, 1596-1600 (1988).
- 49) Jubinsky, P. T. & Stanley, E. R.: Purification of hemopoietin 1: A multilineage hemopoietic growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2764-2768 (1985).
- 50) Stanley, E. R., Bartocci, A., Patinkin, D., Rosendaal, M. & Bradley, T. R.: Regulation of very primitive, multipotent, hemopoietic cells by hemopoietin-1. *Cell*, **45**, 667-674 (1986).
- 51) Mochizuki, D. Y., Eisenman, J. R., Conlon, P. J., Larsen, A. D. & Tushinski, R. J.: Interleukin 1 regulates hematopoietic activity, a role previously ascribed to hemopoietin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5267-5271 (1987).
- 52) Zsebo, K. M., Wypych, J., Yuschenkoff, V. N., Lu, H., Hunt, P., Dukes, P. P. &

Langley, K. E.: Effects of hematopoietin-1 and interleukin 1 activities on early hematopoietic cells of the bone marrow. *Blood*, 71, 4, 962-968 (1988).

53) Ikebuchi, K., Clark, S. C., Ihle, J. N.,

Souza, L. M. & Ogawa, M.: Granulocyte colony-stimulating factor enhances interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3445-3449 (1988).

The Effect of IL-6 on Human Bone Marrow CFU-GM Colony Formation: Inhibition of IL-6 to the rhG-CSF-induced CFU-GM Keita Katayama, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. *Juzen Med. Soc.*, 98, 220-236 (1989)

Key words CFU-GM, IL-6, G-CSF, GM-CSF, serum-free culture

Abstract

The effect of recombinant human interleukin 6 (rhIL-6) on the formation of granulocyte-monocyte/macrophage colony forming units (CFU-GM) in normal human bone marrows was investigated. Recombinant hIL-6 alone did not stimulate CFU-GM colony formation at all in serum-free culture. When rhIL-6 at various concentrations was added to the bone marrow CFU-GM colony assay system using a recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) or a recombinant human granulocyte-monocyte/macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF) as a source of CSF, rhIL-6 showed a significant suppressive effect on rhG-CSF-induced CFU-GM colony formation in a dose dependent manner. In contrast, rhGM-CSF-induced CFU-GM colony formation was not affected by addition of rhIL-6. GM-colony forming progenitor cells were enriched by a panning technique using an anti-My10 mouse monoclonal antibody which reacts specifically with human hemopoietic progenitor cells. A similar effect of rhIL-6 on rhG-CSF- and rhGM-CSF-induced CFU-GM colony formation was observed when the enriched My10⁺ cell population was used. To investigate the mechanism of the suppressive effect of rhIL-6 on the activity of rhG-CSF, bone marrow nonadherent mononuclear cells were preincubated with rhIL-6 for a short time (30 min) and then cultured for CFU-GM colony assay using rhG-CSF or rhGM-CSF. Colony numbers induced by rhG-CSF were significantly reduced after preincubation with rhIL-6, while the rhGM-CSF-induced colony numbers were not. Furthermore, such a suppressive effect of IL-6 on rhG-CSF was abolished when the cells were preincubated in the presence of high doses of rhG-CSF with combination of rhIL-6 for 30 min. These results suggested the possibility that rhIL-6 induced the down-modulation on the expression of G-CSF receptors.