

# 顆粒球系前駆細胞（CFC-G）と単球・マクロファージ系前駆細胞（CFC-M）におけるIa様抗原発現能の相違

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: 沼田, 三枝子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8029">http://hdl.handle.net/2297/8029</a>

## 顆粒球系前駆細胞 (CFC-G) と単球・マクロファージ系前駆細胞 (CFC-M) における Ia 様抗原発現能の相違

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

沼田 三枝子

(昭和63年2月25日受付)

顆粒球-単球/マクロファージ系前駆細胞 (CFU-GM) から顆粒球系前駆細胞 (CFC-G) および単球/マクロファージ系前駆細胞 (CFC-M) への分化の過程と Ia 様抗原の発現能との関係について検討した。方法として, Ia 様抗原に対する単クローン抗体 OKIa1 と補体で処理してヒト臍帯血および骨髓単核細胞から Ia 様抗原陽性 (Ia<sup>+</sup>) 細胞を除去する方法 (negative selection), ならびにブドウ球菌より精製したプロテイン A 結合ウシ赤血球と単クローン抗体 OKIa1 とを用いたロゼット法およびセル・ソーティング法によりヒト臍帯血や骨髓単核細胞から Ia<sup>+</sup> 細胞と Ia 様抗原陰性 (Ia<sup>-</sup>) 細胞を分離分取する方法 (positive selection) を用いて検討した。まず, OKIa1 と補体で Ia<sup>+</sup> 細胞を除去後, CFU-GM コロニー培養法を行なうと, 骨髓では補体のみで処理した対照に比べ CFU-GM が著しく減少し, エステラーゼ二重染色法によると, そのほとんどが CFC-G の減少によるものであった。一方, 臍帯血では CFU-GM の減少は軽度で, 残った Ia<sup>-</sup> 細胞は CFC-G よりも CFC-M を強く発育させた。また, Ia<sup>+</sup> 細胞と Ia<sup>-</sup> 細胞をロゼット法で分離分取すると, 臍帯血 CFC-G はおもに Ia<sup>+</sup> 細胞群において形成され, 骨髓 CFC-G もまた同様の結果となった。これに対し, 臍帯血 CFC-M の大部分は Ia<sup>-</sup> 細胞群において形成された。骨髓における CFC-M の絶対数は臍帯血に比べて非常に少ないため, 骨髓 CFC-M の形成は Ia<sup>-</sup> 細胞群においても少なく, 有意の結論は得られなかった。蛍光活性化セルソーターを利用したセル・ソーティング法を用いてより純粋に Ia<sup>+</sup> 細胞と Ia<sup>-</sup> 細胞を分離分取したが, Ia<sup>+</sup> 細胞群における CFC-G コロニー形成の優位性ならびに Ia<sup>-</sup> 細胞群における CFC-M コロニー形成の優位性が確認された。また, 臍帯血単核細胞からの T リンパ球除去, あるいは Ia<sup>+</sup> 細胞および Ia<sup>-</sup> 細胞による培養細胞の再構築, あるいは分画した Ia<sup>+</sup> 細胞ならびに Ia<sup>-</sup> 細胞培養上清の CFU-GM アッセイ系への添加により, CFC-G, CFC-M における Ia 様抗原発現能には偏った増減は起こらず, 補助細胞の関与や培養中に Ia<sup>+</sup>, Ia<sup>-</sup> 細胞から放出される液性因子の関与は少ないものと思われた。以上の結果より, CFU-GM からの顆粒球系あるいは単球系どちらかへの方向づけと Ia 様抗原発現能との間には密接な関係があり, CFC-G ではその発現能が強く, CFC-M ではその発現能が弱いことが明らかとなった。また, 臍帯血では Ia 様抗原発現能の弱い CFC-M が多数存在し, 何らかの生理的意義が示唆された。

**Key words** stem cells, Ia antigens, granulopoiesis, bone marrow, cord blood

Ia 抗原は, マウスの 17 番目の染色体上にある主要組織適合遺伝子群 (major histocompatibility complex, MHC) の I 領域遺伝子 (とくに I-A と I-E 亜領域) によって支配されて産生される糖蛋白質抗原で,

I region-associated antigens であるところから, Ia 抗原と総称された<sup>1)</sup>。ヒトでは, この MHC が第 6 染色体短腕上にあり HLA 複合座と呼ばれ, その中に存在する HLA-DR 領域は免疫学的に重要な機能を担ってい

Abbreviations: BFU-E, burst-forming units in erythroid; BRBC, bovine red blood cells; CFC-G, colony-forming cells in granulocyte; CFC-M, colony-forming cells in monocyte/macrophage; CFU-E, colony-forming units in erythroid; CFU-GEMM, colony-forming units in granulocyte, erythroid, monocyte, megakaryocyte; CFU-GM, colony-forming units in

る DR 抗原を支配する遺伝子領域である。この DR 抗原は組織分布、生物学的性状、分子構造においてマウスの I-E 抗原と似ているため Ia 様抗原と呼ばれている<sup>2)</sup>。この Ia 様抗原は B 細胞、抗原提示細胞、活性化 T 細胞に発現され、免疫担当細胞間相互作用において重要な働きを担っている<sup>3)</sup>。一方、造血細胞にも Ia 様抗原が発現することが明らかとなってきた。顆粒球系では、骨髄芽球、前骨髄球には Ia 様抗原が発現するが、より成熟した顆粒球は Ia 様抗原陰性であり、骨髄芽球より未熟な顆粒球-単球/マクロファージ系前駆細胞 (colony-forming units in granulocyte-monocyte/macrophage, CFU-GM) では Ia 様抗原が発現しているとの報告が数多くなされている<sup>4)-10)</sup>。また、赤芽球系細胞に関しては、未熟な赤芽球系前駆細胞 (burst-forming units in erythroid, BFU-E) では Ia 様抗原が発現しているが<sup>8)-11)-14)</sup>、より成熟した赤芽球系前駆細胞 (colony-forming units in erythroid, CFU-E) については議論の残っているところであるが、Ia 様抗原は発現していないとされている<sup>8)-11)-13)</sup>。近年、CFU-GM, BFU-E より未熟で多分化能を有する造血幹細胞である colony-forming units in granulocyte, erythroid, monocyte, megakaryocyte (CFU-GEMM) に対するコロニー形成法が発達し<sup>15)-17)</sup>、CFU-GEMM においてもまた Ia 様抗原が発現していると報告されている<sup>18)-20)</sup>。以上のように、Ia 様抗原はヒト造血幹細胞に発現し、その分化の過程に関与していることが示唆されている。一方、CFU-GM は顆粒球系前駆細胞 (colony-forming cells in granulocyte, CFC-G) と単球/マクロファージ系前駆細胞 (colony-forming cells in monocyte/macrophage, CFC-M) にさらに分化すると考えられているが、その各々における Ia 様抗原の発現性についてはほとんど検討されていない。本研究では、Ia 様抗原に対する単クローン抗体 OKIa1 と補体を用いてヒト骨髄細胞と臍帯血より Ia 様抗原陽性 (Ia<sup>+</sup>) 細胞を除去する方法 (negative selection)、ならびにセル・ソーティング法およびプロテイン A を利用したロゼット法によりヒト臍帯血や骨髄単核細胞から Ia<sup>+</sup> 細胞と Ia 様抗原陰性 (Ia<sup>-</sup>) 細胞を分離分取する方法 (positive selection) により、CFU-GM から CFC-G および CFC-M への分化の過程と Ia 様抗原発現能との関連について検討した。

granulocyte-monocyte/macrophage; CFU-S, colony-forming units in spleen; FACS, fluorescence activated cell sorter; FBS, fetal bovine serum; HPCM, human placental conditioned medium; PBS, phosphate-buffered saline; PHA, phytohemagglutinin; PWM, poke weed mitogen; SPA, staphylococcal protein A.

## 材料および方法

### I. 材 料

正常新生児分娩直後で、胎盤を剥離する前に切断された臍帯の胎盤側より採取した臍帯血を使用した。さらに特発性血小板減少性紫斑病、鉄欠乏性貧血、急性白血病寛解期、あるいは末梢血および骨髄の検索を行い骨髄球系造血が正常と診断された患者から採取した骨髄を使用した。

### II. 方 法

#### 1. 単核球の分離

ヘパリン加臍帯血に 2.5% デキストラン-リン酸緩衝液生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS, pH=7.4) を等量加え 37°C, 30 分間静置後上清を採取し、Ficoll-Hypaque (lymphoprep, Nyegaard & Co., Oslo, Norway) 比重遠沈法にて 400×g, 30 分間遠心し中間層の単核細胞を分離した。骨髄もヘパリン存在下に穿刺吸引し、PBS で 5 倍希釈したのち F/H 法にて 400×g, 30 分間遠心した。中間層に分画された単核細胞を PBS で 3 回洗浄し、McCoy 5A 培養液 (Flow, Mclean, VA) に浮遊した<sup>21)22)</sup>。

#### 2. 付着細胞の除去

15% 牛胎児血清 (FBS, Flow, Stanmore, NSW, Australia) を含む McCoy 5A 培養液にて単核細胞を 5×10<sup>6</sup> 個/ml の濃度に調節し、プラスチックペトリ皿 (60×15 mm, Falcon #3030) にて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 60 分間培養後、付着細胞を除去し非付着細胞 (NA 細胞) のみを回収した。なお、NA 細胞の α-ナフチルエステラーゼ染色陽性率は 2% 以下であった。

#### 3. 単クローン抗体 OKIa1 と補体による補体依存性細胞溶解法

臍帯血や骨髄から得られた NA 細胞を 5×10<sup>6</sup>/ml の濃度になるように McCoy 5A 培養液に再浮遊させ、Ia 抗原に対する単クローン抗体 OKIa1 (Ortho Pharmaceutical Corp., Raritan, NJ) を 1/100 の割合で加え、30 分間室温にてインキュベートし、OKIa1 抗体を NA 細胞に結合させた。新鮮な、あるいは -80°C にて保存されていたウサギ血清を補体として、この OKIa1 結合 NA 細胞に 1/10 の割合で加え、37°C, 45 分間恒温槽にてインキュベートした後、300×g, 10 分間遠心し、McCoy 5A 培養液にて洗浄後、抗体処理前の NA 細胞浮遊液と同量になるように McCoy 5A 培養

液に再浮遊させた。なお、補体依存性細胞溶解操作後のNA細胞のOKIal陽性率は4%以下であった。また、対照として、NA細胞にOKIal抗体ならびに補体の両者を加える代わりにMcCoy 5A培養液のみ、または、OKIal抗体のみ、または、補体のみを加えた。

#### 4. プロテインAを利用したロゼット法によるIa<sup>+</sup>細胞とIa<sup>-</sup>細胞の分離

ブドウ球菌より精製されたプロテインA (staphylococcal protein A, SPA; Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) は、単クローン抗体OKIalがマウスのIgG<sub>2</sub>サブクラスに属するためこれと結合可能である。そこでSPAを利用したロゼット法が用いられた。ウシ赤血球 (bovine red blood cells, BRBC) を0.9% NaCl溶液で3回洗浄後、packed BRBCとした。SPAは0.9% NaCl溶液を用いて1 mg/mlに調整し、CrCl<sub>3</sub>・6H<sub>2</sub>Oも0.9% NaCl溶液にて1 mg/mlとした。Gronowiczら<sup>23)</sup>によるCrCl<sub>3</sub>法の変法により、packed BRBC, SPA, CrCl<sub>3</sub>溶液を0.1 mlずつ1:1:1の割合で混合、迅速に攪拌し、室温に5分間静置した後、ただちに0.9% NaCl溶液で4回洗浄後、最終濃度2%のSPA結合BRBCを作製した。NA細胞浮遊液 (5×10<sup>6</sup>/ml) にOKIal抗体を1/40の割合に加え、4°C、30分間インキュベート後、McCoy 5Aで2回洗浄した。OKIal結合NA細胞にSPA結合BRBCを等量加え、200×g、5分間遠心後、室温に30分間静置しOKIal<sup>+</sup>細胞のロゼット形成を行った。沈層を再浮遊後Ficoll-Hypaque (1.077 g/ml) 比重遠沈法にて400×g、30分間遠心した。中間層に分画されたロゼット非形成細胞をPBSで2回洗浄し、再びSPA結合BRBCを等量加え、上記と同様の方法で再度、中間層に分画されたロゼット非形成細胞をIa<sup>-</sup>細胞群として用いた。沈層に分画されたロゼット形成細胞を再浮遊後、Ficoll-Hypaque 比重遠沈法にて400×g、30分間遠心した。再度、沈層に分画されたロゼット形成細胞に0.01 M トリス-0.84 NH<sub>4</sub>Cl 緩衝液 (pH=7.65) を加えSPA結合BRBCを溶血させ、PBSで2回洗浄後Ia<sup>+</sup>細胞群として用いた。ロゼット非形成細胞にもトリス NH<sub>4</sub>Cl 緩衝液にて同様の処置をした。臍帯血NA細胞では、SPA結合BRBCロゼット形成 (Ia<sup>+</sup>) 細胞は28±3% (平均値±SD, n=9)であった。骨髄NA細胞でも臍帯血とほぼ同様の結果を得た; 31±3% (平均値±SD, n=7)。また、得られた細胞をOKIal抗体を用いた間接免疫ペルオキシダーゼ法にて解析したところ、ロゼット形成細胞のIa様抗原陽性率は75~80%であるのに対し、ロゼット非形成細胞のIa様抗原陽性率は2%以下であった。各々の細胞群の生存率はtrypan blue 色素排

泄法で確認し、90%以上であった。

#### 5. 蛍光活性化セル・ソーター (fluorescence activated cell sorter, FACS) による解析とセル・ソーティング

より純粋にIa<sup>+</sup>細胞とIa<sup>-</sup>細胞を分離、解析するために、FACSを使用した。臍帯血単核細胞浮遊液 (1×10<sup>7</sup>/ml) に、蛍光標識抗ヒトHLA-DR単クローン抗体 (Becton Dickinson Inc., Mountain View, CA) を1/50の割合に加え、4°C、30分間インキュベートしたのち、0.1%アジドナトリウムを含んだPBSで2回洗浄した。一部の検体では、ノイラミニダーゼで処理したヒツジ赤血球とTリンパ球にてEロゼット形成後、Ficoll-Hypaque 比重遠沈法によりTリンパ球を除去したのち<sup>24)</sup>、単クローン抗体を加えた。Coulter EPICS C (Coulter Electronics Inc., Hialeah, FL) セル・ソーターを用いて、抗ヒトHLA-DR抗体陽性細胞と陰性細胞とを分離した。sort windowを蛍光を強く発する細胞 (Ia<sup>+</sup>) の領域 (全細胞数の10~30%) と蛍光をほとんど発しない細胞 (Ia<sup>-</sup>) の領域 (全細胞数の60~80%) とに設定した。これら2つのwindow間にある約10%の細胞は蛍光の強度が中等度であるので、各々の細胞群へのコンタミネーションを防ぐために切り捨てた。対照として、抗ヒトHLA-DR抗体の代わりに腹水の非特異的IgG免疫グロブリン (Bethesda Research Lab., Gaithersburg, MD) を用いた。蛍光陽性細胞群を再びFACSにて解析したところ、Ia<sup>+</sup>細胞は93%以上であったのに対し、蛍光陰性細胞群では5%以下であった。

#### 6. Ia<sup>+</sup>細胞およびIa<sup>-</sup>細胞の培養上清の作製

FBSを10%の割合で含むRPMI1640培養液にて、FACSにて分離したIa<sup>+</sup>細胞およびIa<sup>-</sup>細胞を1×10<sup>6</sup>/mlに調整し、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で72時間培養後遠心した。一部の細胞はFACSにて分離後phytohemagglutinin (PHA, 0.1%, DIFCO, Detroit, MI) を添加したのち同様に培養、遠心した。得られた上清を採取し、-20°Cで保存した。

#### 7. CFU-GM コロニー形成法

臍帯血、骨髄各々のIa<sup>+</sup>、Ia<sup>-</sup>細胞のCFU-GM測定には、Pikeら<sup>25)</sup>の二重軟寒天培養法を変法して<sup>21)22)</sup>用いた。McCoy 5A培地を基剤とし、最終濃度0.5%の寒天 (Bacto-agar, Difco, Detroit, MI)、15% FBSを加えた培養液中に、常に同一正常人から採血した末梢血白血球を5×10<sup>6</sup>/mlとなるように加えて1 mlずつプラスチックペトリ皿 (35×10 mm, Falcon # 3001) に分注したものを下層とした。上層には最終濃度0.3%の寒天、15% FBSを含んだMcCoy 5A培養液中に、Ia<sup>+</sup>細胞ないしIa<sup>-</sup>細胞を各々1×10<sup>6</sup>/ml、2×

10<sup>5</sup>/ml となるように加えて 1 ml ずつ重層した。一部のものでは、二層法の代りに、コロニー刺激因子として Burgessら<sup>26)</sup>のヒト胎盤培養上清 (human placental conditioned medium, HPCM) を 15%, あるいは甲状腺癌細胞培養上清から精製されたコロニー刺激因子 (CSF-Chugai, Chugai Pharmaceutical Co., LTD., Tokyo, Japan)<sup>27)</sup>を 10% 添加した軟寒天単層法を用いた。培養は triplicate で行い、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 空気中で 7~14 日間培養後、40 個以上の細胞が集落をなすものをコロニー、8~39 個のものをクラスターとして算定した。

#### 8. CFC-G および CFC-M の細胞化学的分析

生じたコロニー内の CFC-G および CFC-M の細胞化学的分析は Kubotaら<sup>28)</sup>のエステラーゼ二重染色法によった。すなわち、培養後、軟寒天をスライドガラス上に移し、濾紙にて脱水したのち  $\alpha$ -ナフチルアセテートエステラーゼ染色とナフトール ASD クロロアセテートエステラーゼ染色の二重染色を行った。 $\alpha$ -ナフチルアセテートエステラーゼ染色陽性のコロニー及びクラスターを CFC-M, ナフトール ASD クロロアセテートエステラーゼ染色陽性のコロニー及びクラスターを CFC-G とした。

#### 9. 統計学的検定法

得られた成績はすべて平均値  $\pm$  SD で示した。2 群間の比の平均値の差の検定には Student's t-test を用い、 $p < 0.05$  を有意とした。

### 成 績

#### I. OKIa1 抗体と補体を用いた Ia<sup>+</sup> 細胞溶解法による CFU-GM コロニー形成能の変化

骨髓細胞と臍帯血における Ia<sup>+</sup> 細胞の占める割合は、補体依存性細胞溶解操作により調べたところ、それぞれ 12.9  $\pm$  4.2%, 10.1  $\pm$  3.5% であった。CFU-GM

コロニー形成法を行なう前に、前処置として単クローン抗体 OKIa1 と補体を用いてヒト骨髓細胞と臍帯血各々より Ia<sup>+</sup> 細胞を除去し、対照として、培養液のみ、あるいは OKIa1 抗体のみ、あるいは補体のみで前処置を行ない、それぞれのコロニー数を比較検討した (表 1)。骨髓細胞を OKIa1 抗体のみ、または補体のみで前処置した場合においては、培養液のみで前処置をした後の CFU-GM コロニー数と著変なかったが、OKIa1 抗体と補体で前処置を行なうと、CFU-GM コロニー数

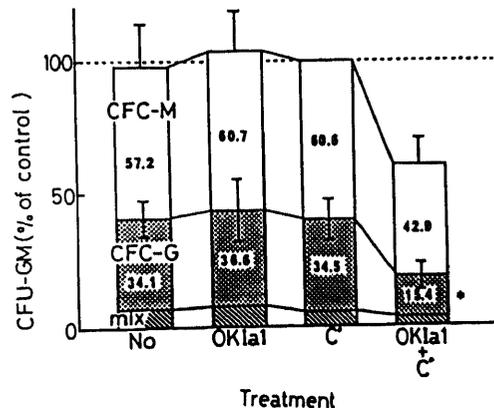


Fig. 1. CFC-M and CFC-G colonies in cord blood characterized by the double staining for esterase activity using both alpha-naphthyl acetate and naphthol AS-D chloroacetate as substrates. Data represent the mean percentage ( $\pm$ SD) of controls treated with complement (C) alone (100%).

\* $p < 0.05$  vs. relative inhibition of controls in CFC-M by Student's t-test. CFC-G, colony-forming cells in granulocyte; CFC-M, colony-forming cells in monocyte/macrophage; mix, mixed colony consisting of both granulocytes and macrophages; C, complement.

Table 1. CFU-GM from bone marrow and cord blood after treatment with monoclonal OKIa1 antibody plus complement<sup>a</sup>

		No treatment	OKIa1 antibody	Complement	OKIa1 antibody + Complement
BM (N=6)	Colony counts (/10 <sup>5</sup> cells)	193.5 $\pm$ 76.9	186.5 $\pm$ 70.9	206.3 $\pm$ 78.2	38.2 $\pm$ 20.3
	Percent	95.6 $\pm$ 15.6	91.5 $\pm$ 10.3	100	18.0 $\pm$ 5.6
CD (N=12)	Colony counts (/10 <sup>5</sup> cells)	101.0 $\pm$ 48.2	111.5 $\pm$ 60.5	113.2 $\pm$ 70.0	63.3 $\pm$ 35.2
	Percent	103.8 $\pm$ 18.0	102.9 $\pm$ 14.0	100	58.8 $\pm$ 13.0

<sup>a</sup> Bone marrow and cord blood mononuclear cells were treated with monoclonal OKIa1 antibody alone, complement alone, and OKIa1 antibody plus complement prior to CFU-GM cultures. Each value represents the mean  $\pm$  SD in triplicate cultures. BM, bone marrow mononuclear cells; CD, cord blood mononuclear cells.

は補体のみ前処置による CFU-GM コロニー数の  $18.0 \pm 5.6\%$  と著しい減少を認めた。骨髓 CFU-GM コロニーにエステラーゼ二重染色を行なったところ CFC-G (顆粒球系) コロニー数が CFU-GM コロニー数の  $88.3 \pm 9.4\%$  と大部分を占めたが、OKIa1 抗体と補体にて前処置を行なった後においても CFC-G コロニー数と CFC-M (単球・マクロファージ系) コロニー数の相対的比率には著変を認めなかった。一方、臍帯血においては、OKIa1 抗体と補体により、Ia<sup>+</sup> 細胞を除去すると、CFU-GM コロニー数は補体のみ前処置による CFU-GM コロニー数の  $58.8 \pm 13.0\%$  と減少したが、骨髓と比較すると減少の程度は軽度であった。臍帯血では骨髓と異なり、CFC-M コロニー数が CFU-GM コロニー数の  $60.6 \pm 7.7\%$  を占めた。図 1 に示すように、OKIa1 抗体と補体にて前処置を行なうと、CFC-M コロニー数、CFC-G コロニー数ともに補体のみ処理群より減少したが、相対的に CFC-G コロニー数の減少度 ( $55.4 \pm 13.0\%$ ) の方が CFC-M コロニー数の減少度 ( $29.2 \pm 10.4\%$ ) よりも有意に著しかった ( $p < 0.05$ )。

## II. 臍帯血 Ia<sup>+</sup> 細胞と Ia<sup>-</sup> 細胞における CFU-GM コロニー形成能の比較

臍帯血 NA 細胞において、1) 非分画細胞群、2) ロゼット法により分画された Ia<sup>+</sup> 細胞群、3) ロゼット法により分画された Ia<sup>-</sup> 細胞群、4) Ia<sup>+</sup> 細胞と Ia<sup>-</sup> 細胞とを 3 : 7 の割合で混ぜあわせて再構築した群の

4 つの細胞群について二重軟寒天培養法を用いて、CFC-G および CFC-M の測定を行なった結果を表 2 に示した。その結果、臍帯血の非分画群における CFC-G と CFC-M の比率は 44% と 56% であった。Ia<sup>+</sup> 細胞群、Ia<sup>-</sup> 細胞群のどちらにおいても CFC-G、CFC-M とともに形成されたが、特に Ia<sup>+</sup> 細胞群においてはおもに CFC-G が形成され (CFC-G 62%, CFC-M 38%), Ia<sup>-</sup> 細胞群では CFC-M の形成が主体をなした (CFC-G 34%, CFC-M 66%)。つまり、非分画細胞  $2 \times 10^5$  個あたり Ia<sup>+</sup> CFC-G コロニー数は  $33 \pm 17$  個、Ia<sup>-</sup> CFC-G コロニー数は  $20 \pm 15$  個で Ia<sup>+</sup> CFC-G と Ia<sup>-</sup> CFC-G の比は  $1.62 \pm 0.34$  であるのに対し、Ia<sup>+</sup> CFC-M と Ia<sup>-</sup> CFC-M の比は  $0.50 \pm 0.09$  であった ( $p < 0.01$ )。

## III. 骨髓 Ia<sup>+</sup> 細胞と Ia<sup>-</sup> 細胞における CFU-GM コロニー形成能の比較

表 3 に示すように、骨髓 NA 細胞においても臍帯血と同様に 4 つの細胞群について二重軟寒天培養法を用いて CFC-G、CFC-M の測定を行なった。その結果、骨髓の非分画群における CFC-G と CFC-M の比率は 69% と 31% であり、臍帯血に比べて CFC-M の絶対数は非常に少なかった。Ia<sup>+</sup> 細胞群においては臍帯血と同様に CFC-G の形成が主体を成した (CFC-G 77%, CFC-M 23%)。非分画細胞  $10^5$  個あたりに換算した Ia<sup>+</sup> CFC-G と Ia<sup>-</sup> CFC-G の比も  $1.80 \pm 0.37$  と CFC-G については Ia 陽性のコロニーが優位であった。骨髓における CFC-M の絶対数が少ないため、Ia<sup>-</sup> 細胞群

Table 2. Characterization of myeloid progenitor cells in separated Ia<sup>+</sup> and Ia<sup>-</sup> cord blood cells<sup>a</sup>

Cell populations	(a) Proportion of total cells in fraction	(b) No. colonies/ $2 \times 10^5$ cells	No. colonies/ $2 \times 10^5$ cells in unfractionated population	
			(a × b)	Ia <sup>+</sup> /Ia <sup>-</sup>
CFC-G unfractionated	100%	$79 \pm 41$ (44%) <sup>b</sup>	$79 \pm 41$	} $1.62 \pm 0.34$
Ia <sup>+</sup>	$28 \pm 3\%$	$116 \pm 58$ (62%)	$33 \pm 17$	
Ia <sup>-</sup>	$72 \pm 3\%$	$29 \pm 22$ (34%)	$20 \pm 15$	
Ia <sup>+</sup> (30%) + Ia <sup>-</sup> (70%)	100%	$60 \pm 36$ (47%)	$60 \pm 36$	
CFC-M unfractionated	100%	$100 \pm 46$ (56%)	$100 \pm 46$	} $0.50 \pm 0.09^{**}$
Ia <sup>+</sup>	$28 \pm 3\%$	$70 \pm 26$ (38%)	$19 \pm 7$	
Ia <sup>-</sup>	$72 \pm 3\%$	$56 \pm 35$ (66%)	$40 \pm 25$	
Ia <sup>+</sup> (30%) + Ia <sup>-</sup> (70%)	100%	$68 \pm 40$ (53%)	$68 \pm 40$	

<sup>a</sup> Ia<sup>+</sup> and Ia<sup>-</sup> cell populations were separated by a rosette technique. Ia<sup>+</sup>+Ia<sup>-</sup> cell population was reconstituted at the Ia<sup>+</sup>/Ia<sup>-</sup> ratio of 3 : 7. Each value represents the mean  $\pm$  SD of nine separate experiments. <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$  vs. CFC-G by Student's t-test.

<sup>b</sup> Numbers in parentheses are the rate of CFC-G and CFC-M in the unfractionated, Ia<sup>+</sup>, Ia<sup>-</sup>, or Ia<sup>+</sup>+Ia<sup>-</sup> cell populations.

においても臍帯血とは異なり CFC-M の形成は少なかった。非分画細胞  $1 \times 10^5$  個あたりに換算した  $Ia^+$  CFC-M コロニー数は  $10 \pm 4$  個,  $Ia^-$  CFC-M コロニー数は  $11 \pm 8$  個で ( $Ia^+$  CFC-M/ $Ia^-$  CFC-M =  $0.90 \pm 0.27$ ), CFC-M については  $Ia^+$  細胞群と  $Ia^-$  細胞群には有意の差は認められなかった。このため, CFC-G と CFC-M における Ia 様抗原の発現能の差異についてさらに調べるために以下の実験は臍帯血を材料として

行なった。

#### IV. コロニー刺激因子の影響

FACS を用いることにより  $Ia^+$  細胞と  $Ia^-$  細胞をより純粋に分離した後, 末梢白血球, ヒト胎盤培養上清 (HPCM), 甲状腺癌細胞株培養上清から精製されたコロニー刺激因子 (CSF-Chugai) の 3 種類のコロニー刺激因子を用いて CFU-GM コロニー形成能を比較した。表 4 に示すように, どのコロニー刺激因子を

Table 3. Characterization of myeloid progenitor cells in separated  $Ia^+$  and  $Ia^-$  bone marrow cells<sup>a</sup>

Cell populations		(a) Proportion of total cells in fraction	(b) No. colonies/ $10^5$ cells	No. colonies/ $10^5$ cells in unfractionated population	
				(a × b)	$Ia^+/Ia^-$
CFC-G	unfractionated	100%	$72 \pm 35$ (69%) <sup>b</sup>	$72 \pm 35$	} $1.80 \pm 0.37$
	$Ia^+$	$31 \pm 3\%$	$114 \pm 66$ (77%)	$35 \pm 20$	
	$Ia^-$	$69 \pm 3\%$	$27 \pm 27$ (63%)	$19 \pm 18$	
	$Ia^+(30\%) + Ia^-(70\%)$	100%	$51 \pm 25$ (68%)	$51 \pm 25$	
CFC-M	unfractionated	100%	$33 \pm 17$ (31%)	$33 \pm 17$	} $0.90 \pm 0.27$
	$Ia^+$	$31 \pm 3\%$	$34 \pm 15$ (23%)	$10 \pm 4$	
	$Ia^-$	$69 \pm 3\%$	$16 \pm 13$ (37%)	$11 \pm 8$	
	$Ia^+(30\%) + Ia^-(70\%)$	100%	$24 \pm 9$ (32%)	$24 \pm 9$	

<sup>a</sup>  $Ia^+$  and  $Ia^-$  cell populations were separated by a rosette technique.  $Ia^+ + Ia^-$  cell population was reconstituted at the  $Ia^+/Ia^-$  ratio of 3:7. Each value represents the mean  $\pm$  SD of seven separate experiments.

<sup>b</sup> Numbers in parentheses are the rate of CFC-G and CFC-M in the unfractionated,  $Ia^+$ ,  $Ia^-$ , or  $Ia^+ + Ia^-$  cell populations.

Table 4. CFC-G and CFC-M growth in the separated  $Ia^+$  and  $Ia^-$  populations in cord blood by using three different colony-stimulating factors<sup>a</sup>

Cell populations	Colonies + clusters ( $/10^5$ cells)						
	Peripheral blood leukocytes		CSF-Chugai		HPCM		
	7 days	14 days	7 days	14 days	7 days	14 days	
$Ia^+$	CFC-G	$94 \pm 12$	$140 \pm 9$	$137 \pm 10$	$160 \pm 17$	$237 \pm 26$	$206 \pm 6$
	CFC-M	$60 \pm 8$	$71 \pm 4$	$76 \pm 6$	$116 \pm 12$	$140 \pm 16$	$106 \pm 3$
	CFC-Mix	0	0	$3 \pm 1$	$2 \pm 1$	0	0
	CFC-G/CFC-M	$1.57 \pm 0.20$	$1.97 \pm 0.12$	$1.80 \pm 0.14$	$1.38 \pm 0.53$	$1.69 \pm 0.21$	$1.95 \pm 0.05$
$Ia^-$	CFC-G	$4 \pm 1$	$14 \pm 2$	$8 \pm 3$	$13 \pm 2$	$10 \pm 3$	$17 \pm 2$
	CFC-M	$7 \pm 1$	$25 \pm 3$	$13 \pm 4$	$37 \pm 4$	$15 \pm 4$	$31 \pm 3$
	CFC-Mix	0	0	$1 \pm 1$	0	$1 \pm 1$	0
	CFC-G/CFC-M	$0.57 \pm 0.04$	$0.56 \pm 0.07$	$0.62 \pm 0.21$	$0.35 \pm 0.04$	$0.67 \pm 0.22$	$0.55 \pm 0.06$

<sup>a</sup>  $Ia^+$  and  $Ia^-$  cell populations were separated by a FACS and then incubated for CFU-GM assays using three different kinds of colony-stimulating factors; peripheral blood leukocytes by a double layer method, CSF-Chugai (10%) that is prepared from the conditioned medium of a thyroid cancer cell line, and human placental conditioned medium (HPCM, 15%). Each value represents the mean  $\pm$  SD numbers of colonies plus clusters in triplicate cultures for 7 and 14 days.

Table 5. CFC-G and CFC-M growth in the separated Ia<sup>+</sup> and Ia<sup>-</sup> populations in cord blood after T-lymphocyte depletion<sup>a</sup>

Cell populations	Colonies + clusters (/10 <sup>5</sup> cells)	
	Exp. 1.	Exp. 2.
Ia <sup>+</sup>	CFC-G	219 ± 25
	CFC-M	113 ± 15
	CFC-Mix	0
	CFC-G/CFC-M	1.64 ± 0.18
Ia <sup>-</sup>	CFC-G	33 ± 2
	CFC-M	51 ± 3
	CFC-Mix	0
	CFC-G/CFC-M	0.65 ± 0.32

<sup>a</sup> T-lymphocytes were depleted by a rosette technique using neuraminidase-treated sheep red blood cells before cell sorting. Separated cord blood Ia<sup>+</sup> and Ia<sup>-</sup> cells by a FACS were cultured for CFU-GM assays using CSF-Chugai as a colony-stimulating factor. Each value represents the mean ± SD in triplicate cultures for 14 days.

Table 6. CFC-G and CFC-M growth after reconstitution with the separated Ia<sup>+</sup> and Ia<sup>-</sup> cells in cord blood<sup>a</sup>

Ia <sup>+</sup> cells (/ml)	Ia <sup>-</sup> cells (/ml)	Colonies	Colonies + clusters	CFC-G	CFC-M	CFC-Mix
1 × 10 <sup>5</sup>	0	140 ± 20	190 ± 28	115 ± 13	75 ± 9	0
0	2 × 10 <sup>5</sup>	26 ± 4	30 ± 4	12 ± 4	18 ± 3	0
1 × 10 <sup>5</sup>	2 × 10 <sup>5</sup>	196 ± 23	240 ± 29	127 ± 15	113 ± 20	0
1 × 10 <sup>5</sup>	4 × 10 <sup>5</sup>	204 ± 22	256 ± 26	129 ± 19	127 ± 17	0

<sup>a</sup> Cells from separated Ia<sup>+</sup> and Ia<sup>-</sup> cell fractions were mixed in the ratios indicated prior to plating in CFC-G and CFC-M assays. CSF-Chugai was used as a colony-stimulating factor. The numbers of colonies and clusters were expressed as the mean ± SD in triplicate cultures for 14 days. The data from one of two similar experiments are presented.

Table 7. Effects of the culture supernatants of the separated Ia<sup>+</sup> and Ia<sup>-</sup> cell populations on CFC-G and CFC-M growth<sup>a</sup>

Cell populations	Colony-stimulating factors	Colonies + clusters				CFC-G/CFC-G
		(/10 <sup>5</sup> cells)	CFC-G (/10 <sup>5</sup> cells)	CFC-M (/10 <sup>5</sup> cells)	CFC-Mix (/10 <sup>5</sup> cells)	
T-cell-depleted Ia <sup>+</sup> population	None	4 ± 3	2 ± 2	2 ± 1	0	
	CSFCHU	276 ± 14	156 ± 8	116 ± 6	4 ± 1	1.34 ± 0.07
	CSFCHU + PHA	310 ± 50	173 ± 28	134 ± 22	3 ± 1	1.29 ± 0.21
	CSFCHU + PHA-Ia <sup>+</sup> -sup	396 ± 52	217 ± 28	179 ± 24	0	1.21 ± 0.16
T-cell-depleted Ia <sup>-</sup> population	CSFCHU + PHA-Ia <sup>-</sup> -sup	342 ± 30	186 ± 16	156 ± 18	0	1.19 ± 0.12
	None	1 ± 1	0	1 ± 1	0	
	CSFCHU	24 ± 3	7 ± 1	17 ± 2	0	0.41 ± 0.06
	CSFCHU + PHA	24 ± 5	8 ± 1	16 ± 4	0	0.50 ± 0.10
	CSFCHU + PHA-Ia <sup>+</sup> -sup	69 ± 17	17 ± 4	52 ± 13	0	0.33 ± 0.08
	CSFCHU + PHA-Ia <sup>-</sup> -sup	84 ± 11	19 ± 3	65 ± 8	0	0.29 ± 0.04

<sup>a</sup> The separated cord blood Ia<sup>+</sup> and Ia<sup>-</sup> cell culture supernatants stimulated by phytohemagglutinin (PHA) were prepared. T-cell-depleted Ia<sup>+</sup> and Ia<sup>-</sup> cell populations were incubated for CFU-GM assays using the Ia<sup>+</sup> or Ia<sup>-</sup> cell culture supernatants (PHA-Ia<sup>+</sup>- or PHA-Ia<sup>-</sup>-sup) at the final concentration of 10% combined with a smaller amount of CSF-Chugai (CSF<sub>CHU</sub>, 5%) than usual. The numbers of colonies plus clusters are expressed as the mean ± SD in triplicate cultures for 14 days. The data from one of two similar experiments are presented.

用いた場合においても Ia<sup>+</sup> 細胞群においては CFC-G コロニーの形成が優位であった。これに対し Ia<sup>-</sup> 細胞群においては CFC-M コロニーの形成の方が優位であり、ロゼット形成法を用いて細胞分離を行なった場合と同様の結果となった。培養期間に関しては、Ia<sup>-</sup> 細胞群ではコロニー刺激因子の種類に関係なく 7 日間培養に比べて 14 日間培養を行なった方が CFC-M コロニー数の増加が著しかった。Ia<sup>+</sup> 細胞群においては一定した傾向は認められなかった。

#### V. 非造血系補助細胞 (accessory cells) の Ia<sup>+</sup> 及び Ia<sup>-</sup> CFU-GM コロニー形成能に及ぼす影響

##### 1. T リンパ球除去による影響

T リンパ球は造血細胞の分化・増殖に影響を与える補助細胞 (accessory cells) として知られている。FACS を用いた細胞分離過程において、Ia<sup>+</sup> T リンパ球の Ia<sup>+</sup> CFU-GM 分画への偏入、および Ia<sup>-</sup> T リンパ球の Ia<sup>-</sup> CFU-GM 分画への偏入が CFC-G, CFC-M における Ia 様抗原の発現能の差異に何らかの影響を及ぼしていないかを調べるために T リンパ球除去を実施した。T リンパ球の除去にはノイラミニダーゼ処理ヒツジ赤血球を用いたロゼット形成法を利用し、そのうち FACS により Ia<sup>+</sup> 細胞と Ia<sup>-</sup> 細胞のソーティングを行ない、コロニー刺激因子として CSF-Chugai を用いて CFU-GM コロニー形成法を行なった。表 5 に示すように、T リンパ球除去後においても CFC-G, CFC-M における Ia 様抗原の発現能には表 4 と比較して著しい変化は認められなかった。

##### 2. 培養細胞の再構築による変化

Ia<sup>+</sup> 細胞と Ia<sup>-</sup> 細胞とをいろいろな割合で混ぜ合わせて培養細胞の再構築を行ない CFU-GM アッセイを行なった。表 6 に示すように、再構築を行なうことによる CFC-G コロニー数、CFC-M コロニー数の実測値は、理論的に計算された期待値に比較し、有意の著増、著減は認められなかった。また、表 2, 3 に示したように、非分画細胞に占める Ia<sup>+</sup> 細胞、Ia<sup>-</sup> 細胞の割合とほぼ同率となるように 3:7 の割合で再構築を行なったが、非分画細胞に比べ CFC-G コロニー数、CFC-M コロニー数が著しく増減することはなかった。

#### VI. 培養上清の影響

分離した Ia<sup>+</sup> 細胞および Ia<sup>-</sup> 細胞の培養上清中に CFC-G や CFC-M への増強因子ないし抑制因子が存在するかどうかを調べるために、Ia<sup>+</sup> 細胞または Ia<sup>-</sup> 細胞浮遊液へ PHA を添加したのち、あるいは非添加のまま 72 時間培養後、その培養上清を採取し CFU-GM コロニー培養系へ加えた。表 7 に示すように、PHA で刺激された Ia<sup>+</sup>, Ia<sup>-</sup> 細胞の培養上清を加えるとコロニーとクラスターの総数は増加したが、CFC-G,

CFC-M への偏った増加、減少はおこらず CFC-G と CFC-M の比には変化を認めなかった。

## 考 察

Ia 様抗原はヒト造血幹細胞において、その一連の分化の過程で発現してくることが報告されている。Moore ら<sup>29)</sup>はヒト骨髓細胞長期培養法を用いてヒトの最も未熟な造血幹細胞である多能性幹細胞を培養し、これが Ia 様抗原を欠いていることを示した。Keeting ら<sup>30)</sup>もまた、ヒト骨髓細胞の長期液体培養にて同定される造血前駆細胞は Ia 様抗原を欠き、軟寒天コロニー培養法で検出される前駆細胞よりさらに未分化な細胞であることを示した。しかし、CFU-GEMM<sup>19)-20)</sup>, CFU-GM<sup>4)-10)</sup>, BFU-E<sup>8)-11)-14)</sup>などの方向づけられた前駆細胞には Ia 様抗原が発現しており、BFU-E においては CFU-E へ分化する間に抗原性が消失するとされている<sup>8)-11)-13)</sup>。このように各系統への方向づけを獲得した幹細胞における急速な Ia 様抗原の発現と、それらの成熟とともに生ずる選択的な抗原性の消失は、これら分化の過程に Ia 様抗原が関与していることを示唆している。

本研究では、まずヒト骨髓単核細胞を単クローン抗体 OKIa1 と補体で処理して Ia 様抗原陽性細胞を溶解する方法 (negative selection) を用いて CFC-G 並びに CFC-M 各々における Ia 様抗原の発現能について検討した。その結果、骨髓では臍帯血に比べ Ia<sup>+</sup> CFU-GM の減少が著しいが CFC-G と CFC-M の相対的比率には著変を認めなかったのに対し、臍帯血においては Ia<sup>+</sup> CFU-GM の減少が軽度で、残った Ia<sup>-</sup> 細胞が CFC-G よりもむしろ CFC-M をより強く発育させた。しかし、補体を介した細胞溶解法においては弱陽性細胞を溶解しなかったり、細胞群間において補体に対する感受性の差異が存在したり、細胞が体内を循環している間に細胞膜に変化がおこったりする可能性があるため、さらに、ヒト臍帯血ならびにヒト骨髓から Ia<sup>+</sup> および Ia<sup>-</sup> 細胞を分離分取 (positive selection) し、CFC-G および CFC-M における Ia 様抗原の発現能の差異についてより詳細に検討した。その結果、CFC-G と CFC-M はお互いから完全に分離されたわけではないが、臍帯血においては Ia 様抗原陽性の骨髓系前駆細胞からは CFC-M に比べて CFC-G をより強く発育させた。これに対し、Ia 様抗原陰性の前駆細胞からは CFC-M の発育の方が優位であった。これは臍帯血 CFU-GM が顆粒球系あるいは単球系のどちらへ方向づけられるかで Ia 様抗原の発現能が異なり CFC-M では発現能が弱いことを示し、Ia<sup>-</sup> である多能性幹細胞の少数のものは Ia<sup>-</sup> のまま選択的に CFC-M へ方向

づけられると推測される (図2)。

最近, Griffin ら<sup>31)</sup>はヒト骨髄を用いて HLA-DR 抗原量の強度により HLA-DR 抗原強陽性, 弱陽性に分けて未熟な (day 14) CFU-GM とより成熟した (day 7) CFU-GM について検討を行ない, 未熟な (day 14) CFU-GM においては CFC-G と CFC-M 間で HLA-DR の抗原量に有意差を認めず, HLA-DR 抗原量ではその subset を同定できないが, より成熟した (day 7) CFU-GM では CFC-G は弱陽性群, CFC-M は強陽性群に多く, HLA-DR 抗原の強弱により CFC-M は CFC-G と分離されうると報告した。今回の我々の研究でも骨髄においては臍帯血と異なり CFC-M コロニー数は  $Ia^+$  細胞  $1 \times 10^6$  個あたり  $34 \pm 15$ ,  $Ia^-$  細胞  $1 \times 10^5$  あたり  $16 \pm 13$  と  $Ia$  陽性細胞群に多く認められたが, 絶対数では有意差を認めなかった。臍帯血 CFC-M と骨髄 CFC-M の同一性あるいは差異については詳しく検討していないが骨髄の CFC-M は CFC-G に比べて少数であり  $Ia^+$  細胞群に相対的に多く存在するのに対し, 臍帯血においては CFC-G に比べて CFC-M が多数を占め, その CFC-M が  $Ia^-$  細胞群に多く存在することは興味深いことと思われた。

最近, 造血幹細胞の分化増殖の調節機構に T リンパ球などの補助細胞が関与していることが明らかにされつつある。骨髄および臍帯血単核細胞の分離過程でこの補助細胞が混入し,  $Ia^+$  および  $Ia^-$  前駆細胞の顆粒球系あるいは単球・マクロファージ系への発育を修飾している可能性があるためいくつかの検討を加えてみた。しかし  $Ia^+$  細胞および  $Ia^-$  細胞の分離前にあらかじめ T 細胞を除去しておいても, あるいは  $Ia^+$  細胞と  $Ia^-$  細胞を様々な割合で混合し再構築を行なっても CFC-G 並びに CFC-M コロニー形成には著変を認めず, 補助細胞が  $Ia^+$  および  $Ia^-$  CFC-G または CFC-M 由来のコロニー発育を修飾している可能性は少なかった。また,  $Ia^+$  細胞および  $Ia^-$  細胞に PHA を添加して培養し, その培養上清を CFU-GM コロニー培養系へ加えてみたが, CFU-GM コロニー数の著しい増加は認

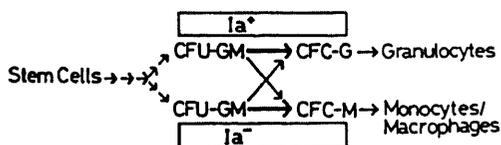


Fig. 2. Proposed differentiation sequence of myeloid progenitor cells in cord blood. CFU-GM, colony-forming units in granulocyte-macrophage; CFC-G, colony-forming cells in granulocyte; CFC-M, colony-forming cells in monocyte/macrophage.

めたものの CFC-G コロニー数および CFC-M コロニー数の比には著変を認めなかった。in vitro で同種抗原や PHA, poke weed mitogen (PWM) などの mitogen で刺激された T 細胞の産生する液性因子には強い CSF 活性が存在している。Hamano ら<sup>32)</sup>は, マウスの主要組織適合抗原である H-2 の異なる同種抗原を投与して T 細胞を刺激すると, 脾および骨髄の CFU-S が増加することより, 何らかの強い刺激を与えた場合に T 細胞より産生される液性因子の存在により, CFU-S の分化, 増殖が進ずる可能性を示した。また, CFU-GEMM の形成には PWM で刺激したマウス脾細胞の培養上清や, PHA で刺激した末梢血単核球の培養上清が必要であり<sup>15)</sup>, mitogen で刺激を受けた T 細胞からの液性因子が CFU-GEMM に対して刺激因子として作用するものと考えられる。また, PHA で刺激された T 細胞と骨髄単核細胞との混合培養により CFU-GM, CFU-E が抑制されること<sup>33)</sup>も報告されている。さらに, 再生不良性貧血患者の骨髄および末梢血中に CFU-GM, CFU-E, BFU-E に対して抑制的に働く T 細胞や単球が存在することについては多数の報告<sup>34)~37)</sup>があり, たとえば患者末梢血の単核細胞や骨髄細胞を正常骨髄細胞に添加し混合培養すると, 正常骨髄幹細胞の分化, 増殖が抑制されたり<sup>34)~36)</sup>, 正常ヒト CFU-GM に対して抑制的に働く患者末梢血から単球を除去すると抑制作用がなくなること<sup>37)</sup>などが報告されている。このように骨髄系前駆細胞の発育には T 細胞その他の補助細胞が複雑に関与していると予想される。しかし, 今回の検討では CFU-GM から CFC-G および CFC-M への分化の調節に補助細胞はそれほど重要な役割を果たしているとは考えられなかった。

ところで, ヒト臍帯血並びに新生児末梢血には多数の造血幹細胞が存在し, 骨髄と異なり CFC-G に比べ CFC-M が多数を占めている<sup>22)</sup>。さらに, 今回の研究ではヒト臍帯血の CFC-M は  $Ia^-$  の前駆細胞群に多く存在した。また, マクロファージには HLA-DR 抗原陽性のもの並びに陰性のものの 2 種類が報告されている。Stiehm ら<sup>38)</sup>は成人末梢血の単球の DR 抗原発現性と比べるとヒト臍帯血における単球の HLA-DR 抗原発現性が減少していることを示した。Lu ら<sup>39)</sup>もまた, マウスの新生児のマクロファージでは  $Ia$  抗原の発現性が低いと報告した。本研究からこのような末梢血の単球における  $Ia$  様抗原発現性の heterogeneity は, その前駆細胞における  $Ia$  様抗原発現性の heterogeneity と密接な関係があることが強く示唆された。特にヒトの新生児期の  $Ia^-$  単球・マクロファージの増加は, 今回明らかとなった臍帯血での  $Ia^-$  CFC-M 前駆細胞の増

加と強い関連性が予想され、興味深い点である。胎生期、新生児期の CFC-M の増加、特に Ia<sup>-</sup> CFC-M の増加の機能的意味は現在のところ全く不明であるが、単クローン抗体を用いてヒト血液前駆細胞における Ia 様抗原の発現性についてさらに詳しく検討することは造血機構における前駆細胞の成熟過程をさらに明瞭化するのに大いに役立つものと期待される。

## 結 論

造血幹細胞の分化の過程に Ia 様抗原が関与しているとされるが、本研究では、CFU-GM から CFC-G ならびに CFC-M への分化過程における Ia 様抗原の発現能を検討した。方法として、補体依存性細胞溶解法を用いた Ia<sup>+</sup> 細胞除去操作により、あるいはセル・ソーティング法および免疫ロゼット法を用いた Ia<sup>+</sup> 細胞と Ia<sup>-</sup> 細胞の分離分取操作により検討し、以下の結果を得た。

1. 補体依存性細胞溶解法を用いて Ia<sup>+</sup> 細胞を除去すると、骨髓では Ia<sup>+</sup> CFU-GM の減少が著しく、そのほとんどが CFC-G と考えられた。

2. 1 と同様な処理後、臍帯血では Ia<sup>+</sup> CFU-GM の減少は軽度で、残った Ia<sup>-</sup> 細胞は CFC-G よりも CFC-M をより強く発育させた。

3. Ia<sup>+</sup> 細胞と Ia<sup>-</sup> 細胞をセル・ソーターで分離分取すると、ヒト臍帯血非付着細胞に関しては、Ia<sup>+</sup> 細胞群、Ia<sup>-</sup> 細胞群のどちらにおいても CFC-G、CFC-M とともに形成されたが特に Ia<sup>+</sup> 細胞群においては主に CFC-G が形成され、Ia<sup>-</sup> 細胞群では CFC-M の形成が主体をなした。

4. ヒト骨髓非付着細胞に関しては、Ia<sup>+</sup> 細胞群においては臍帯血と同様に CFC-G の形成が主体を成した。骨髓における CFC-M の絶対数が臍帯血に比べて非常に少ないため、Ia<sup>-</sup> 細胞群においても CFC-M の形成は少なく、有意の結論は得られなかった。

5. 末梢白血球、HPCM、および CSF-Chugai の 3 種類のコロニー刺激因子による臍帯血 CFU-GM 測定では、いずれの CSF を用いた場合においても Ia<sup>+</sup> 細胞群での CFC-G 優位および Ia<sup>-</sup> 細胞群での CFC-M 優位には変化を認めないことより、コロニー刺激因子による Ia 様抗原の発現能への影響は少ないものと考えられた。

6. 臍帯血非付着単核細胞から T リンパ球を除去した後の CFU-GM コロニー形成法においても、また Ia<sup>+</sup> 細胞および Ia<sup>-</sup> 細胞による再構築後の CFU-GM コロニー形成法においても CFC-G、CFC-M には著しい増減を認めず、補助細胞の Ia 様抗原発現能への関与は少ないものと思われた。

7. 分画した Ia<sup>+</sup> 細胞ならびに Ia<sup>-</sup> 細胞に PHA 添加あるいは無添加のまま培養した上清を CFU-GM コロニー培養系に添加しても、CFU-GM 総数は増加したものの、CFC-G、CFC-M における Ia 様抗原の発現能には偏った増減はおこらず、Ia<sup>+</sup> 細胞ならびに Ia<sup>-</sup> 細胞の培養中に CFC-G や CFC-M への増強因子や抑制因子は放出されないものと考えられた。

以上より、CFU-GM から顆粒球系あるいは単球系のどちらかへの方向づけと Ia 様抗原の発現能との間には密接な関係があり、CFC-G ではその発現能が強く、CFC-M ではその発現能が弱いことが明らかとなった。また、臍帯血では Ia 様抗原発現能の弱い CFC-M が多数存在し、何らかの生理的意義が示唆された。

## 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に深く感謝致します。さらに、種々の御協力を頂きました小児科血液グループの諸先生方、ならびに教室員の皆様に深謝致します。

## 文 献

- 1) Hood, L., Steinmetz, M. & Malissen, B.: Genes of the major histocompatibility complex of the mouse. *Ann. Rev. Immunol.*, **1**, 529-568 (1983).
- 2) Ferrone, S., Allison, J. P. & Pellegrino, M. A.: Human DR (Ia-like) antigens: Biological and molecular profile. *Contemp. Top. Molec. Immunol.*, **7**, 239-281 (1978).
- 3) Benacerraf, B.: Role of MHC gene products in immune regulation. *Science*, **212**, 1229-1238 (1981).
- 4) Winchester, R. J., Ross, G. D., Jarowski, C. I., Wang, C. Y., Halper, J. & Broxmeyer, H. E.: Expression of Ia-like antigen molecules on human granulocytes during early phases of differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4012-4016 (1977).
- 5) Fitchen, J. H., Ferrone, S., Quaranta, V., Molinaro, G. A. & Cline, M. J.: Monoclonal antibodies to HLA-A, B, and Ia-like antigens inhibit colony formation by human myeloid progenitor cells. *J. Immunol.*, **125**, 2004-2008 (1980).
- 6) Kaplan, J., Inoue, S. & Ottenbreit, M. J.: Myeloid colony-forming cells express human B lymphocyte antigens. *Nature*, **271**, 458-459 (1978).
- 7) Cline, B. J. & Billings, R.: Antigens expressed by human B lymphocytes and myeloid stem cells. *J. Exp. Med.*, **146**, 1143-1145 (1977).

- 8) Goldman, J. M., Hibbin, J., Kearney, L., Orchard, K. & Th' ng, K. H. : HLA-DR monoclonal antibodies inhibit the proliferation of normal and chronic granulocytic leukemia myeloid progenitor cells. *Br. J. Haematol.*, **52**, 411-420 (1982).
- 9) Levine, M. N., Fay, J. W., Jones, N. H., Metzgar, R. S. & Haynes, B. F. : Phenotypic characterization of human bone marrow granulocyte-macrophage forming progenitor cells. *Blood*, **58**, 1047-1049 (1981).
- 10) Greenberg, P., Grossman, M., Charron, D. & Levy, R. : Characterization of antigenic determinants on human myeloid colony forming cells with monoclonal antibodies. *Exp. Hematol.*, **9**, 781-787 (1981).
- 11) Robinson, J., Sieff, C., Delia, D., Edwards, P. A. W. & Greaves, M. : Expression of cell-surface HLA-DR, HLA-ABC and glycophorin during erythroid differentiation. *Nature*, **289**, 68-71 (1981).
- 12) Torok-Storb, B. & Hansen, J. A. : Modulation of in vitro BFU-E growth by normal Ia-positive T cells is restricted by HLA-DR. *Nature*, **298**, 473-474 (1982).
- 13) Belzer, M. B., Fitchen, J. H., Ferrone, S., Foon, K. A., Billing, R. J. & Golde, D. W. : Expression of Ia-like antigens on human erythroid progenitor cells as determined by monoclonal antibodies and heteroantiserum to Ia-like antigens. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **20**, 111-115 (1981).
- 14) Winchester, R. J., Meyers, P. A., Broxmeyer, H. E., Wang, C. Y., Moore, M. A. S. & Kunkel, H. G. : Inhibition of human erythropoietic colony formation in culture by treatment with Ia antisera. *J. Exp. Med.*, **148**, 613-618 (1978).
- 15) Fauser, A. A. & Messner, H. A. : Granulocyte-erythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood and cord blood. *Blood*, **52**, 1243-1248 (1978).
- 16) Fauser, A. A. & Messner, H. A. : Identification of megakaryocytes, macrophages, and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblasts. *Blood*, **53**, 1023-1027 (1979).
- 17) Messner, H. A. & Fauser, A. A. : Culture studies of human pluripotent hemopoietic progenitors. *Blut*, **41**, 327-333 (1980).
- 18) Fitchen, J. H., Le Fevre, C., Ferrone, S. & Cline, M. J. : Expression of Ia-like and HLA-A, B antigens on human multipotential hematopoietic progenitor cells. *Blood*, **59**, 188-190 (1982).
- 19) Lu, L., Broxmeyer, H. E., Meyers, P. A., Moore, M. A. S. & Thaler, H. T. : Association of cell cycle expression of Ia-like antigenic determinants on normal human multipotential (CFU-GEMM) and erythroid (BFU-E) progenitor cells with regulation in vitro by acidic Isoferritins. *Blood*, **61**, 250-256 (1983).
- 20) Lu, L., Pelus, L. M. & Broxmeyer, H. E. : Modulation of the expression of HLA-DR (Ia) antigens and the proliferation of human erythroid (BFU-E) and multipotential (CFU-GEMM) progenitor cells by prostaglandin E. *Exp. Hematol.*, **12**, 741-748 (1984).
- 21) 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**, 1046-1049 (1982).
- 22) Ueno, Y., Koizumi, S., Yamagami, M., Miura, M. & Taniguchi, N. : Characterization of hematopoietic stem cells (CFUc) in cord blood. *Exp. Hematol.*, **9**, 716-722 (1981).
- 23) Gronowicz, E., Coutinho, A. & Melchers, F. : A plaque assay for all cells secreting Ig of a given type or class. *Eur. J. Immunol.*, **6**, 588-590 (1976).
- 24) Miyawaki, T., Seki, H., Kubo, M. & Taniguchi, N. : Suppressor activity of T lymphocytes from infants assessed by co-culture with unfractionated adult lymphocytes in the pokeweed mitogen system. *J. Immunol.*, **123**, 1092-1096 (1979).
- 25) Pike, B. L. & Robinson, W. A. : Human bone marrow growth in agar-gel. *J. Cell. Physiol.*, **76**, 77-84 (1970).
- 26) Burgess, A. W., Wilson, E. M. A. & Metcalf, D. : Stimulation by human placental conditioned medium of hemopoietic colony formation by human marrow cells. *Blood*, **49**, 573-583 (1977).
- 27) Bessho, M., Hirashima, K., Nomura, H., Ono, M., Okabe, T., Ohsawa, N., Nara, N. & Momoi, H. : Effects on human bone marrow cells of colony-stimulating factors produced in large quantities from the conditioned medium of thyroid

- cancer cells. *Acta. Haematol. Jpn.*, **47**, 1265-1272 (1984).
- 28) Kubota, K., Mizoguchi, H., Miura, Y., Suda, T. & Takaku, F.: A new technique for the cytochemical examination of human hemopoietic cells grown in agar gel. *Exp. Hematol.*, **8**, 339-344 (1980).
- 29) Moore, M. A. S., Broxmeyer, H. E., Sheridan, A. P. C., Meyers, P. A., Jacobsen, N. & Winchester, R. J.: Continuous human bone marrow culture: Ia antigen characterization of probable pluripotential stem cells. *Blood*, **55**, 682-690 (1980).
- 30) Keating, A., Powell, J., Takahashi, M. & Singer, J. W.: The generation of human long-term marrow cultures from marrow depleted of Ia (HLA-DR) positive cells. *Blood*, **64**, 1159-1162 (1984).
- 31) Griffin, J. D., Sabbath, K. D., Herrmann, F., Larcom, P., Nichols, K., Kornacki, M., Levine, H. & Cannistra, S. A.: Differential expression of HLA-DR antigens in subsets of human CFU-GM. *Blood*, **66**, 788-795 (1985).
- 32) Hamano, T. & Nagai, K.: Effects of allogenic stimulations of the proliferation and differentiation of the hemopoietic stem cell. *Transplantation*, **25**, 23-26 (1978).
- 33) Podesta, M., Frassoni, F., van Lint, M. T., Piaggio, G., Marmont, A. & Bacigalupo, A.: Generation of CFUc suppressor T cells in vitro. II. Effect of PHA, PWM, and Con-A on bone marrow and peripheral blood lymphocytes from healthy donors. *Exp. Hematol.*, **10**, 256-262 (1982).
- 34) Ascensao, J., Pahwa, R., Kagan, W., Hansen, J., Moore, M. & Good, R.: Aplastic anemia: Evidence for an immunological mechanism. *Lancet*, **27**, 669-671 (1976).
- 35) Hoffman, R., Zanjani, E. D., Lutton, J. D., Zalusky, R. & Wasserman, L. R.: Suppression of erythroid-colony formation by lymphocytes from patients with aplastic anemia. *N. Engl. J. Med.*, **296**, 10-13 (1977).
- 36) Takaku, F., Suda, T., Mizoguchi, H., Miura, Y., Uchino, H., Nagai, K., Kariyone, S., Shibata, A., Akabane, T., Nomura, T. & Maekawa, T.: Effect of peripheral blood mononuclear cells from aplastic anemia patients on the granulocyte-macrophage and erythroid colony formation in samples from normal bone marrow in vitro—A cooperative work. *Blood*, **55**, 937-943 (1980).
- 37) Suda, T., Mizoguchi, H., Miura, Y., Kubota, K. & Takaku, F.: Enhancement of granulocytic colony formation by depletion of phagocytic cells in the bone marrow of patients with idiopathic aplastic anemia. *Exp. Hematol.*, **8**, 659-665 (1980).
- 38) Stiehm, E. R., Szein, M. B., Steeg, P. S., Mann, D., Newland, C., Blaese, M. & Oppenheim, J. J.: Deficient DR antigen expression on human cord blood monocytes: reversal with lymphokines. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **30**, 430-436 (1984).
- 39) Lu, C. Y., Calamai, E. G. & Unanue, E. R.: A defect in the antigen-presenting function of macrophages from neonatal mice. *Nature*, **282**, 327-329 (1979).

**Different Ia-like Antigen Expression between Granulocyte Progenitor Cells (CFC-G) and Monocyte-Macrophage Progenitor Cells (CFC-M)** Mieko Numata, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. J. J. Med. Soc.*, **97**, 400—412 (1988)

**Key words :** stem cells, Ia antigens, granulopoiesis, bone marrow, cord blood

#### Abstract

The present study was performed to examine the different expression of Ia-like antigens on myeloid progenitor cells in the maturation process from colony-forming units in granulocyte-monocyte/macrophage (CFU-GM) to colony-forming cells in granulocyte (CFC-G) or to colony-forming cells in monocyte/macrophage (CFC-M). First, Ia-like antigen-positive (Ia<sup>+</sup>) cells were

eliminated from human cord blood and bone marrow mononuclear cells by a complement mediated cytotoxicity technique (negative selection). Next, Ia<sup>+</sup> and Ia-like antigen-negative (Ia<sup>-</sup>) cells were separated by a rosette technique or by a cell-sorting technique (positive selection). CFU-GM were assayed in semisolid agar culture after negative and positive selection, and CFC-G were differentiated from CFC-M by a double staining for esterase activity. CFU-GM in bone marrow was markedly inhibited after a negative selection. This was mainly due to the inhibition of CFC-G. In contrast, the inhibition of CFU-GM in cord blood was mild, and CFC-M was generated in a greater extent in the residual Ia<sup>-</sup> cell fraction. After positive selection by a rosette technique, the majority of CFC-G in cord blood and bone marrow was generated in the Ia<sup>+</sup> cell fraction. In contrast, the majority of CFC-M in cord blood was generated in the Ia<sup>-</sup> cell fraction. The predominance of CFC-G in the Ia<sup>+</sup> fraction in contrast to the predominance of CFC-M in the Ia<sup>-</sup> fraction was confirmed by using a cell-sorting technique. The possibility that accessory cells might influence the CFC-G and CFC-M colony formation was also tested in this study. T-lymphocyte depletion, reconstitution of Ia<sup>+</sup> and Ia<sup>-</sup> cells at various ratios, and addition of the culture supernatants of Ia<sup>+</sup> and Ia<sup>-</sup> cells, however, did not affect the differentiation of CFC-G and CFC-M. These results suggest that Ia-dependent regulatory mechanisms participate in the differentiation of CFU-GM to CFC-G and CFC-M. Furthermore, some differences in the characteristics of Ia-antigen-bearing CFU-GM were demonstrated between cord blood and bone marrow cells. The precise physiological roles of a large number of CFC-M in cord blood, which are negative for Ia-like antigen, remain to be elucidated.