

マウス骨髄中のCD4陽性細胞の解析

大西 真由美

①

マウス骨髄中の
C D 4 陽性細胞の解析

大西真由美

東京大学医学部第三内科

目次

1、はじめに	3
2、材料・方法	4
3、結果	7
4、考察	10
5、図・表	13
6、まとめ	22
7、参考文献	23

<はじめに>

1988年 Spangrudeらは、マウス骨髄中のThy1を低レベルに発現しB220, Mac-1, Gr-1, CD4, CD8といった系統マーカーを持たず、Sca-1を発現している細胞(Thy1^{lo}Lin⁻Sca-1⁺)が造血幹細胞であると報告した¹⁾。彼らは限界希釈法とCFU-S、放射線照射マウス胸腺への細胞移入後に出現するコロニー数(CFU-T)の検討、及び放射線照射コンジェニックマウスの骨髄再構成がT細胞、B細胞、単球・顆粒球で起こることを示した。しかし最近のJonesらの報告をはじめ、従来のCFU-Sによるアッセイ法によって骨髄造血幹細胞を定義することには問題があるのではないかという指摘も起こっている²⁾⁻⁴⁾。すなわち放射線照射マウスへの細胞移植による再構成をみる系においては、移植した細胞に早期生着と晚期生着があり、CFU-Sの高頻度な分画では早期生着は非常に良く起こったが、長期にわたる造血の維持はできないことが示された。つまり長期にわたる造血維持のためにはCFU-S細胞以外の幹細胞が存在するか、stroma cellに代表される造血微小環境の関与、あるいは他のマーカーを持った細胞との相互作用などの因子が関与している可能性が指摘されている。

一方1989年にFredricksonらは骨髄中のCD4陽性細胞の内に造血前駆細胞が存在することを報告した⁵⁾。CD4は本来helper/inducer T細胞の分化抗原として発見され、現在では細胞質内でsrc関連癌遺伝子産物であるp56lckと結合しクラスII MHC分子と反応してT細胞リセプターの抗原認識を高めるco-receptor機能を担っている分子であるとされている^{6), 7)}。もし造血幹細胞の一部にCD4が実際に発現しているならばリンパ球の前駆細胞でもある造血幹細胞がある特定の分化段階で自己を認識するという仮説も想定され、造血幹細胞の分化増殖の研究に重要な事実と考えられる。またCD4はHIVのリセプターとしても注目されており造血幹細胞がCD4を発現しているか否かは臨床的にHIV感染を考える上でも重要と思われる⁸⁾。そこで我々はモノクローナル抗体と6次元解析のできるフローサイトメトリーを用いてマウス骨髄中のCD4陽性細胞の性状を明らかにすることを試みた。

<材料・方法>

1、マウス 4週齢から12週齢のメスのBALB/cA、BALB/c nu/nu、C57BL/6 Ly5.2、C57BL/6 Ly5.1を用いた。BALB/cAはCharles-River Japan Inc. (神奈川) およびClea Japan Inc. (東京) から購入した。C57BL/6 Ly5.2とBALB/c nu/nuはClea Japan Inc. より購入した。C57BL/6 Ly5.1は愛知ガンセンターの高橋先生よりご供与いただいた。5-fluoro-uracil (5FU)を投与する実験では、100mg/kg (BALB/c) または150mg/kg (C57BL/6)を尾静脈より注射した。

2、抗体 phycoerythrin (PE)を結合させたラット抗CD4抗体 (GK1.5)⁹⁾、fluorescein isothiocyanate (FITC)を結合させたラット抗Thy 1.2抗体^{9), 10)}、streptavidinを結合させたallophycocyanin (SAV-APC)、streptavidinを結合させたTexas Red (SAV-TR)はBecton-Dickinson Immunocytometry systems (San Jose, CA) より購入した。ビオチン化またはFITCを結合させたラット抗Gr-1抗体 (RB6-8C5)¹¹⁾、FITCを結合させたハムスター抗T細胞リセプター $\alpha\beta$ 抗体 (H57-597)¹²⁾、ラット抗B220抗体 (RA3-6B2)^{13), 14)}、ラット抗Mac-1抗体 (M1/70)¹⁵⁾はPharmingen (San Diego, CA) より購入した。ビオチン化したT細胞リセプター可変領域: V β 6、V β 11に対する抗体¹⁶⁾、¹⁷⁾はワシントン大学の金川先生よりご供与いただいた。Wマウスで欠損し造血幹細胞上に発現しているとされているc-kit¹⁸⁾に対する抗体は熊本大学の西川先生より また赤芽球系を認識する抗体TER119は京都大学の喜納先生よりご供与いただいた。

3、造血因子 マウス リコンビナントIL-3 (mrIL-3)はDNAXの新井先生よりご供与いただいた。IL-4 (mrIL-4)、IL-5 (mrIL-5)はそれぞれ小野薬品 (大阪) とSuntory Biomedical Research Institute (大阪) から、IL-7 (mrIL-7)はバイオマテリアル研究所 (横浜) の須藤先生より、またヒト精製エリスロポエチン (rEpo)は雪印乳業 (東京) の上田先生よりご供与いただき実験に用いた。

4、細胞調製及び染色方法 脾細胞、胸腺細胞、大腿骨と腓骨より通常の方法で採取した骨髓細胞は 低浸透圧ショック法により赤血

球を溶血させて除去し、ナイロンメッシュでろ過し、染色用培養液（リン酸緩衝液に胎児牛血清を3%、sodium azideを0.1%加えたもの）で2回洗浄した後、染色に用いた。細胞は625倍に希釈した正常ラット血清の存在下で、適当な濃度に調製された抗体と氷上で25分間反応させたのち、染色用培養液で3回洗浄し、ビオチン化抗体を用いたときはSAV-APCまたはSAV-TRを加え氷上で10分間反応させ¹⁹⁾、再び同様に洗浄し用いた抗体の種類によって7-aminoactinomycin D (7AAMD) (2 μ g/ml) またはpropidium iodide (PI) (5 μ g/ml) を添加した染色用培養液に浮遊させて実験に用いた。

5、フローサイトメトリー (FACS) による細胞表面抗原の解析 488nmアルゴンレーザーと599nmダイレーザーを備え、Micro VAX3300とリンクさせたFACStarPLUS (Beckton Dickinson)を用いて多次元解析を行った。一検体に付き一万個から五万個の細胞の情報をFACS-DESK (ver.1.8)²⁰⁾に取り込んだ。蛍光強度はrelative fluorescence unitsにて測定した。細胞の凝集塊は前方散乱-側方散乱 (FSC-SSC) のプロットで除去し、PIまたは7AAMDで染色される死細胞は情報取り込みの際に除去した。対照としては染色していない細胞を用いた。

6、脾細胞コロニー形成能 (CFU-S) の検討 5FUを投与後7日目のBALB/cマウスの骨髄細胞を採取しPEを結合させた抗CD4抗体とFITCを結合させた抗Gr-1抗体にて染色した。全骨髄細胞またはCD4陽性細胞をAutomatic Cell Deposition Unit (ACDU) (Beckton Dickinson) にて24穴プレートに回収し、エッペンドルフチューブに移してPBSにて2回洗浄し、 $1-2 \times 10^4$ 個/mlの濃度に調製してPBSに浮遊させ、放射線照射後の(750rad)同系マウス尾静脈より注射した。細胞移植後10日目に脾臓を採取しブアン液で染色後、コロニー数を算定した。

7、IL-3, EpoまたはIL-4, -5, -7存在下でのメチルセルロースコロニー形成能の検討 Iscoveらの方法²¹⁾を一部改変してメチルセルロースコロニーを作製した。前記の方法にて回収した全骨髄細胞またはCD4陽性細胞をmethylcellulose 1.2% (Fisher Scientific, Georgia)、2-mercaptoethanol 1×10^{-4} mol、牛血清アルブミン 10%、FCS 20

%含有する alpha medium (Flow Laboratories, North Ryde) に浮遊させ、IL-3 (150u/ml)、Epo (6.7u/ml) または IL-4 (5u/ml)、IL-5 (25u/ml)、IL-7 (100u/ml) の存在下で培養した²²⁾。培養は 35mm ディッシュで 37°C、5% CO₂ 存在下で行い 前者は 7 日目 後者は 10 日目に細胞数 30 個以上のコロニーを算定した。

8、放射線照射マウス骨髄の再構成実験 5FU 処理後 7 日目の C57BL/6 Ly5.2 から FACS を用いて採集した CD4/Gr-1 陽性細胞 3 万個を C57BL/6 Ly5.1 の全骨髄細胞 10 万個とともに 放射線照射後 (950rad) の C57BL/6 Ly5.1 マウス尾静脈より注射した。11 週後に胸腺、脾臓、骨髄細胞を採取し FACS にてドナー由来の Ly5.2 陽性細胞の各臓器における割合と表面抗原を解析した。

< 結果 >

1、マウス骨髄中のCD4陽性細胞

陰性対照のFACSパターンから陰性/陽性の境界線を決定しCD4陽性細胞の割合を算定したところ、BALB/cマウスで3.70% (SD=0.34)、C57BL/6マウスで5.49% (SD=1.75)の骨髄細胞がCD4陽性であった(図1(a)、表1)。CD4は本来T細胞表面抗原であるにもかかわらず、これらのCD4陽性細胞のいくつかはT細胞系以外の表面抗原も発現していた。なかでも本来成熟顆粒球を認識するとされているGr-1陽性の細胞があり、このGr-1の発現の有無によりCD4陽性細胞を二つの亜集団に分けることができた。CD4陽性Gr-1陰性細胞は、骨髄細胞の0.1%を占め、CD4陽性Gr-1陽性細胞(CD4/Gr-1陽性細胞)は0.6%を占めていた(表1、図1(a))。またBALB/cヌードマウス骨髄ではCD4陽性Gr-1陽性細胞のみ約0.5%検出された(図1(b))。

2、CD4陽性細胞の形態および細胞表面抗原

前記の2つの細胞亜集団は互いに形態、細胞表面抗原に違いが認められた。形態を調べるためにFACSを用いて細胞を分離し、分離した細胞をサイトスピンを用いてスライドグラスに付着させて標本作製し、顕微鏡下で観察した。図2に示すように、CD4陽性Gr-1陰性細胞は小型で細胞質に乏しく、比較的大型、円形で濃染する核を持つ細胞集団で、一方CD4/Gr-1陽性細胞は比較的大型で、円形から腎臓型の核を持つ比較的多様性のある細胞集団であった。

細胞表面抗原の解析ではCD4陽性Gr-1陰性細胞は一部T細胞リセプター $\alpha\beta$ 陽性、Thy1.2陽性、B220、Mac-1、Gr-1が陰性であり、CD4/Gr-1陽性細胞ではT細胞リセプター $\alpha\beta$ 陰性、Thy1.2陽性、B220陽性、Mac-1陰性、TER119陰性、c-kit陰性であった(図3(a))。また前者ではT細胞リセプターV β 鎖のdeletionが起こっており(BALB/cマウスにおいて一部がV β 6陽性、V β 11はnegative selectionにより陰性^{16),17)}(図3(b))、胸腺内で選択された成熟T細胞と考えられた。

3、5FUの骨髄CD4陽性細胞に対する影響

マウスに5FUを投与すると骨髄における比較的未熟な細胞の割合を増加させられることが知られている²²⁾。マウス骨髄中のCD4陽性細胞の5FUに対する感受性を評価するため、5FU投与後のCD4陽性細胞の割合および絶対数の変化を調べた(図4)。Gr-1陰性細胞は0.1%から3.5%に、陽性細胞は約1%から4%にと、5FU投与により割合の増加が認められた(図4(a))。一方絶対数ではCD4陽性Gr-1陰性細胞が5FUによる影響を強く受けないのに対し、CD4/Gr-1陽性細胞は約十分の一に減少した(図4(b))。

4、骨髄CD4陽性細胞のin vivoおよびin vitroにおけるコロニー形成能の検討

5FUの投与によりCD4/Gr-1陽性細胞の割合が増加することはこれらが未熟な細胞集団であることを裏づけている。そこでこの細胞の脾コロニー形成能と、in vitroにおけるIL-3、-4、-5、-7、Epoに対する反応性を検討した(表2)。FACSを用いてCD4陽性Gr-1陽性細胞を分離するとアッセイに十分な細胞数が得られないので、CFU-Sアッセイではday8とday13 CFU-Sのかわりにday10 CFU-Sを検討した。またin vitroのコロニーアッセイでは、前記のようにCD4陽性Gr-1陰性の成熟T細胞にはサイトカインに反応する能力は無いと考えられるので、CD4陽性細胞全体を用いた。CD4/Gr-1陽性細胞中にCFU-Sはほとんど検出されず、またIL-4,5,7と反応してコロニーを形成できる細胞も認められず、IL-3に反応し顆粒球-単球系に分化できる能力を有する細胞も全骨髄細胞に比較して少ないことが明らかとなった。

5、放射線照射マウスにおける細胞移植後の再構成の検討

CD4陽性Gr-1陽性細胞のin vivoにおける運命を検討するためC57BL/6 Ly5.2マウスよりこの細胞を3万個単離し、放射線照射後の(950rad)Ly5.1コンジュニックマウスに正常Ly5.1マウス骨髄10万個とともに尾静脈より注射した。移植11週後にこのマウスの胸腺、脾臓、骨髄細胞を採取して細胞表面抗原を解析したところ、ドナー由来のLy5.2陽性細胞は胸腺細胞、脾臓細胞の約10%、骨髄細胞の約1.5%を占めており、多臓器間の分布も正常であった(図5(a))。さら

に骨髄ではドナー由来の細胞中にGr-1陽性細胞、Mac-1陽性細胞に加えて、移植した細胞と同じ形質をもつCD4/Gr-1陽性細胞がレシビエントの全骨髄細胞細胞中約0.2%と少数ながら存在していた(図5(b))。すなわち、11週間前に移植した細胞と同様の表現型を持つ細胞が存在していたことを示しており、CD4/Gr-1陽性細胞が長い寿命を持っているか、あるいは自己増殖を行っている可能性を示すものであった。

<考察>本論文ではマウス骨髄中のCD4陽性細胞がGr-1の表現の有無によりふたつの亜集団に分けられることを示した。CD4陽性Gr-1陰性細胞は成熟T細胞と考えられたが、Gr-1陽性細胞はコンジュニクレスピエントマウス中で顆粒球-単球系、T細胞、B細胞に分化できる能力を持つ造血幹細胞を含んでいる可能性が考えられた。

単クローン抗体GK1.5で検出されるCD4陽性細胞は我々の実験では全骨髄の約3%から6%を占めていた(表1)。Dialynasらの報告⁶⁾によると、骨髄有核細胞の約3分の2を占める大型細胞の約50%、小型細胞の10%、すなわち全骨髄細胞の約40%にGK1.5が反応するといふ。FredricksonとBaschの報告では19%から65%(BDF1マウスで平均 $34.6 \pm 15.3\%$)の骨髄有核細胞がCD4(GK1.5)陽性である⁵⁾。マウス骨髄中のCD4陽性細胞の割合に関してこれらの報告と我々の実験結果には開きがあるが、これには以下のような理由が考えられる。すなわち、我々の実験ではFACSによる分析の際にPIまたは7AAMDの添加により死細胞を厳密に取り除いたこと、非特異性結合を避けるために染色時の細胞浮遊液に正常ラット血清を加えたこと、分析の際にCD4-FSCプロットでなくCD4-Gr-1プロットを用いたことである。

CD4陽性Gr-1陰性細胞の細胞表面抗原は $CD4^+TCR\alpha\beta^+Thy1.2^+$ B220⁻Mac-1⁻Gr-1⁻であったこと、その形態がT細胞に類似していること、およびV β 11陽性細胞が欠如していることから、この亜集団は胸腺における選択を経た成熟T細胞であることが示唆された。5FUによる骨髄中の絶対数への影響が少ないこともこの細胞集団が成熟した性質を持っていることを支持するものと考えられる。従ってマウス骨髄中のCD4陽性Gr-1陰性細胞は前駆細胞ではなく、それ以上に分化する能力の無い成熟T細胞で、胸腺で教育を受けた後、骨髄組織中あるいは血管内に存在しているものと考えられる。

一方CD4/Gr-1陽性細胞の存在は興味深いものであった。なぜならGr-1はその詳細な組織分布は未だ明かではないが、本来成熟顆粒球に表現されるマーカーとされており¹⁰⁾、またこの亜集団の細胞はT細胞以外の細胞にも表現されているThy1.2が弱陽性に表現されて

ただけでなく^{2,4)}、本来B細胞のマーカーであるB220も陽性であったからである。従ってこの細胞は顆粒球系、T細胞系、B細胞系の少なくとも3系統のマーカーを持っている細胞であることになりその系統を表面抗原から決定することは不可能であった。

この細胞亜集団は比較的多様性に富む形態を示し、5FUに対する反応性は、一部は未熟で休止状態にあるが一部は細胞周期に入っていることを示していた。またこの亜集団のCFU-Sは検出限界以下でありIL-3,4,5,7に反応できる細胞も全骨髓細胞に比べ少数であり、ここまでの情報ではこの細胞亜集団の造血組織における役割は不明であった。

しかし最近の報告によるとday8 CFU-Sやday12 CFU-Sが、多能性造血幹細胞を代表しているのではなく^{3),4)}、放射線照射マウスに移植したときに晩期に生着し長期にわたる造血を維持できるような細胞が多能性造血幹細胞なのではないかという議論がされている²⁾。沈澱速度により細胞を分離したJonesらの報告によると、速く沈澱してくる分画には99.8%のday12 CFU-Sが含まれており、放射線照射後のマウスの生命を維持し短期の骨髓再構成を支持しする能力を示したが、遅く沈澱してくる分画はday12 CFU-Sを0.25%しか含まず放射線照射からマウスを救うこともできなかったが60日以上長期にわたる骨髓再構成を支持することができたという。このことはCFU-Sのほとんどは骨髓の長期にわたる造血を維持している細胞とは異なるものである可能性を示唆したものである。Spangrudeらによって示されたThy1^{lo}Lin⁻Sca-1⁺の細胞は、CFU-SとCFU-Tをもつばら造血幹細胞のアッセイとして用いていること、骨髓再構成は文献上では6週間とJonesらの報告と比較して短期間でみていることから短期の造血を支持する幹細胞である可能性がある²⁾。

我々の注目したCD4/Gr-1陽性細胞はSpangrudeらの報告による幹細胞とは異なり多彩な表面マーカーを持っていること、in vivoやin vitroでコロニーを形成する能力が殆ど無いことなどから、短期に骨髓再構成を支持できる細胞とは考えられなかったため、長期骨髓再

構成を支持する細胞を含んでいる可能性を考え、Lyコンジュニックマウスを用いてこのアッセイを行った。その結果、驚いたことにT細胞、B細胞、顆粒球-単球系の細胞が移植した細胞から再構成されていた。さらに移植した細胞と同様の表面マーカーを持つ細胞が比較的長期にわたり骨髄中に存在していたことは、移植した細胞の少なくとも一部は11週間にわたり休止状態でいたか、あるいは自己増殖していたことを示すものであった。

この結果は直ちにCD4/Gr-1陽性細胞中にT細胞、B細胞、顆粒球-単球に分化できる、多能性幹細胞が存在することを示すものでは無いが、この形態上比較的多様性のある細胞集団がそれぞれの系統へ分化する非常に初期の細胞を含んでいるということは言えよう。最近の報告に、いわゆるdouble negative (CD4⁻CD8⁻)の段階以前の胸腺の非常に未分化な細胞はCD4を低レベルに発現しているというものがある²⁵⁾。胸腺細胞は骨髄由来の細胞が迷入してきて胸腺の特殊な微小環境の影響により分化・成熟したものであると一般に考えられているが、この仮説が正しければ、彼らのみている細胞は骨髄では我々の単離した細胞集団から由来するものである可能性もあると考えている。

骨髄幹細胞は本来“ナイーブ”なものとされてきたが、我々の単離した細胞集団のように逆に多彩な系統マーカーを持ったものもある可能性を示した。特にCD4は接着因子として未熟な細胞を骨髄ストローマ細胞に接着させておく働きをしているか またはMHC分子と結合して成熟T細胞で認められるような信号伝達系に関与している²⁶⁾、²⁷⁾と考える。

以上 造血幹細胞にはCD4、Thy1.2、B220、Gr-1という様々な系統マーカーを持つものが存在する可能性を示唆したが、これら相互の関係、表現されるCD4分子の機能、ヒトにおける同様の細胞の検索については今後検討すべき課題と考える。

表 1

	CD4 positive	CD4 single positive	CD4/Gr-1 positive
BALB/c	3.70 (0.34)	0.097 (0.02)	0.56 (0.09)
C57BL/6	5.49 (1.75)	ND	ND
BALB/c nu/nu	3.75	<0.1	0.41

average percentage
(); SD

マウス骨髄におけるCD4陽性細胞の割合

CD4陽性細胞の割合はFACS-DESK(ver1.8)により計算した。CD4陰性／陽性の境界は陰性対照のFL2/FL4ドットプロットにより決定した。またCD4陽性細胞中のGr-1陰性、陽性細胞の割合はhardware gateをかけて情報を取り込んだ後、CD4/Gr-1ドットプロットにより境界を決定し、算定した。(図1参照)それぞれの割合は3回以上の、ただしヌードマウスでは2回の実験結果の平均を示している。

表 2

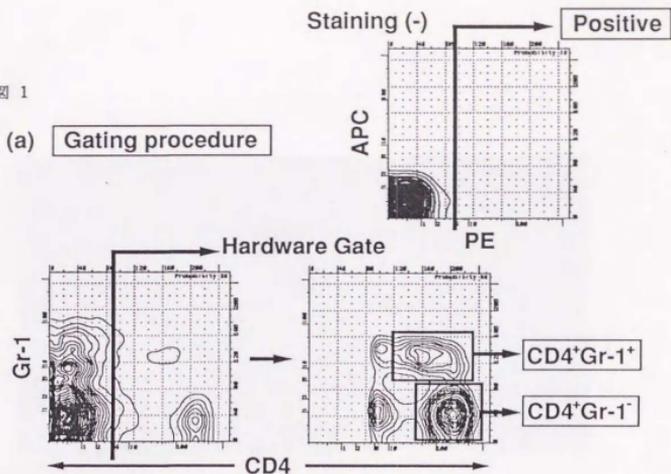
	Whole	CD4 positive
CFU-S *	13.08 ± 2.90 n=6	0.25 ± 0.18 n=4
CFU-IL-3/Epo n=2	33.75	7.23
CFU-IL-4,5,7 n=1	6	0

Colonies/10,000 cells

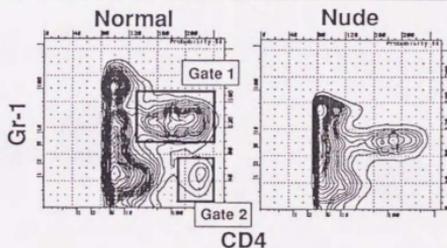
CD4陽性細胞によるコロニー形成能の検討 (*CFU-Sアッセイのみは CD4/Gr-1陽性細胞を用いた。)

CD4/Gr-1陽性細胞から形成される day10 CFU-Sと CD4陽性細胞から IL-3/Epoまたは IL-4,5,7に反応して形成されるコロニー数を示した。in vitroにおけるコロニーは細胞数30個以上のものを算定した。

図 1



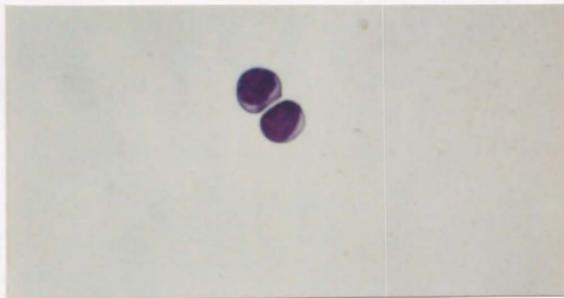
(b) Absence of Gate 2 population in nude mice



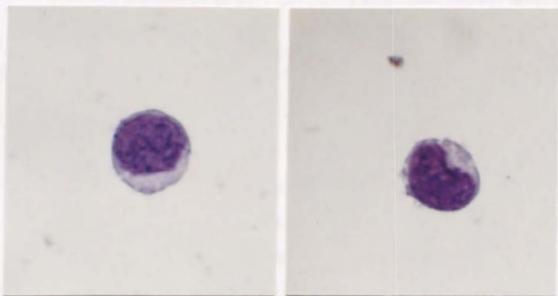
- (a) CD4陽性細胞、そのうちのGr-1陰性、陽性細胞の割合の算定方法
 CD4陰性／陽性の境界線は陰性対照のFL2(PE)/FL4(APC)プロットを表示させ、1%の境界よりも外側に境界線を定めた。さらにこの境界線でhardware gateをかけてCD4陽性細胞のみの情報を取り込み それぞれの細胞集団の割合を算定した。
- (b) ノードマウスにおけるCD4/Gr-1の染色性
 抗CD4抗体(PE)/抗Gr-1抗体(APC)で染色した正常およびノードマウス骨髄を(a)で述べた方法でコンピュータに取り込み、表示させた。

図 2

(a)



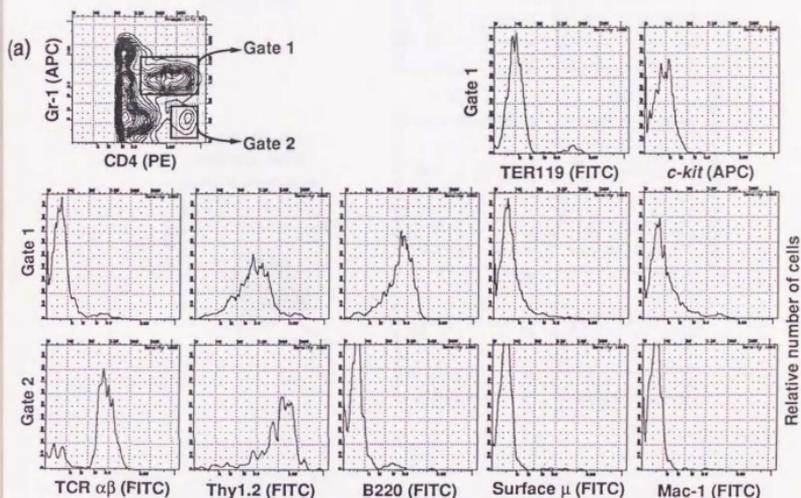
(b)



CD4陽性Gr-1陰性細胞(a)とCD4/Gr-1陽性細胞(b)の形態

5FU静注後7日目のBALB/cマウスから骨髓細胞を採取し、染色し、それぞれの細胞をFACSをもちいて5000個ずつ96穴プレートに選別し、サイトスピン(Shandon Southern Products Ltd.)により標本を作製し、Wright-Giemsa染色を行った。いずれの写真も同じ倍率(x600)で撮影した。

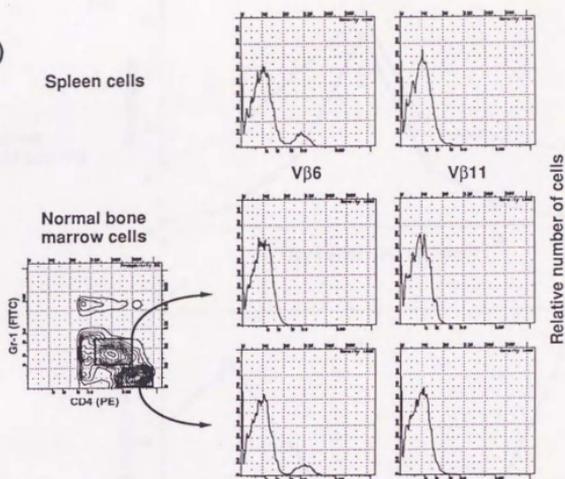
図 3



(a) CD4陽性細胞の細胞表面抗原

正常BALB/cマウス骨髄細胞を抗CD4抗体(PE)、抗Gr-1抗体(ビオチン化, FITC) およびFITCを結合させた抗TCR $\alpha\beta$ 、Thy1.2、B220、s surface μ 、Mac-1、TER119抗体またはビオチン化した抗c-kit抗体とSAV-APCを用いて染色した。7AAMDに染まる死細胞は分析時に除去した。それぞれの染色条件について最上団段にPE-APCプロットで示したようにhardware gateをかけてCD4陽性細胞のみの情報を取り込んだ。Gate 1はCD4陽性Gr-1陰性細胞を Gate 2はCD4/Gr-1陽性細胞を示す。

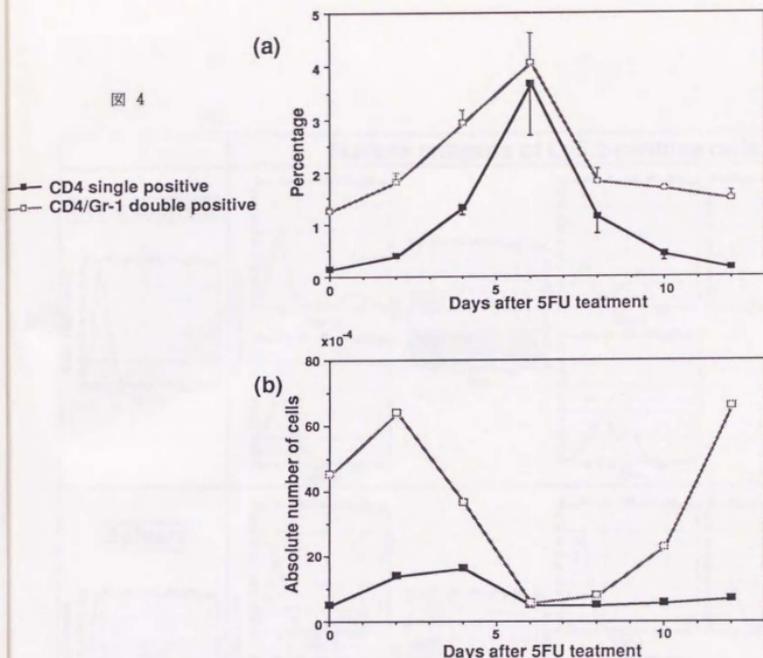
(b)



(b) CD4陽性細胞のV β 染色性

正常BALB/c骨髓細胞を抗CD4抗体(PE)、抗Gr-1抗体(FITC)、およびビオチン化した抗V β 6、 β 11抗体とSAV-APCを用いて染色した。死細胞は(a)と同様の方法で除去し、情報の処理も(a)と同様CD4陽性細胞についてのみ行った。陽性対照には正常脾細胞を用いた。

図 4

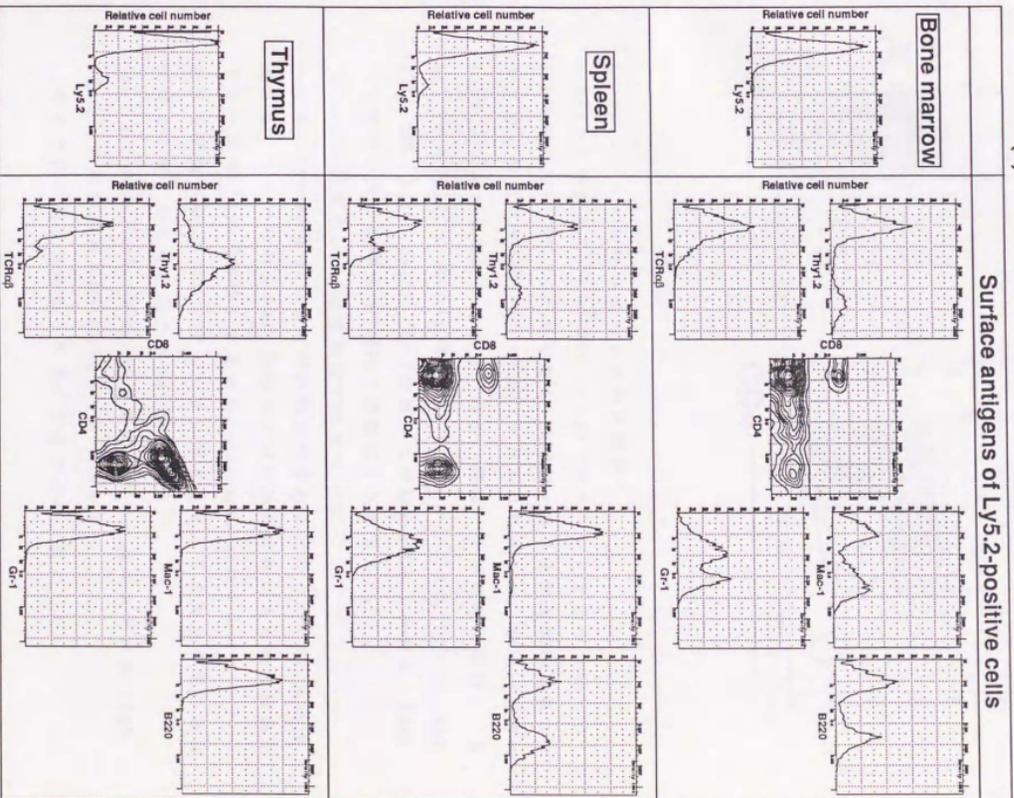


CD4陽性細胞に対する5FUの影響

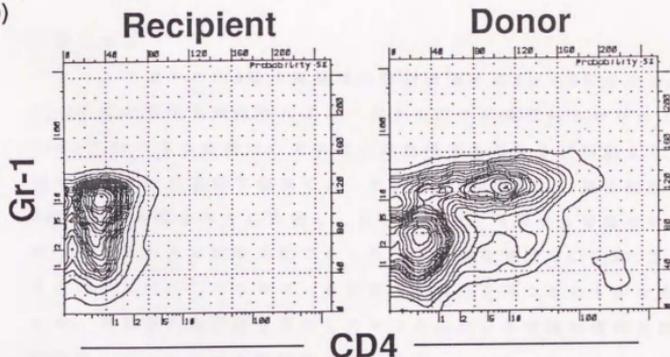
5FU静注後の1日おきのCD4陽性Gr-1陰性細胞とCD4/Gr-1陽性細胞の割合 (a)およびマウス一匹あたりの絶対数を示した。個体差を小さくするために それぞれの条件につき3匹のマウスの骨髄を混合して分析した。■: CD4陽性Gr-1陰性細胞 □: CD4/Gr-1陽性細胞

(a)

Surface antigens of Ly5.2-positive cells



(b)



Ly-5コンジュニックマウスの骨髄再構成

5FUを上静注後7日目のC57BL/6 Ly5.2マウスから骨髄中のCD4/Gr-1陽性細胞をFACSにて3万個単離し Ly5.1マウス骨髄細胞10万個とともに放射線照射後(950rad)のLy5.1マウスに移植した。移植11週後にLy5コンジュニックマウスから 胸腺、脾臓、骨髄細胞を採取し 抗Ly5.2抗体(FITC)、抗CD4抗体(PE)、ビオチン化した抗TCR $\alpha\beta$ 、Thy 1.2、CD8、B220、Mac-1、Gr-1抗体およびSAV-APCにて染色し、FACSにて解析した。死細胞は7AADの添加により除去した。

(a)ドナー由来のLy5.2陽性細胞の表面マーカー

左列はhardware gate無しで情報を取り込んだ際のLy5.2の染色性である。骨髄では約1.5%、胸腺および脾臓では約10%前後の細胞がドナー由来(Ly5.2陽性)であった。hardware gateをかけてドナー由来の細胞のみ1万個コンピュータに取り込み、その細胞の他の表面抗原を分析したのが右列である。

(b)ドナー由来(Ly5.2陽性)の骨髄細胞とレシピエント由来(Ly5.2陰性)の骨髄細胞のCD4/Gr-1ドットプロット

それぞれの細胞は前記と同様の方法で採取、分析した。

<まとめ>

マウス骨髄中のCD4陽性細胞は全骨髄細胞の約3から6%を占め、抗Gr-1抗体に対する染色性により、大きく二つの集団にわけられる。CD4陽性Gr-1陰性細胞は、その他の細胞表面抗原および形態より、胸腺で選択された成熟T細胞であった。一方CD4陽性Gr-1陽性細胞はB220、Thy1も低レベルに発現し、比較的大型で円形から腎臓型の核を持つ多様性のある細胞集団であった。この細胞集団はCFU-Sに乏しく、またIL-3に反応してコロニーを形成する能力を持つものも少なかったが、致死量の放射線を照射したマウスにおける骨髄再構成実験では長期にわたり造血を維持する能力を持っていた。またドナー由来のCD4陽性Gr-1陽性細胞は、移植後少なくとも11週間以上レシビエントマウス骨髄中に存在していた。これらの結果よりマウス造血幹細胞にはCD4、Gr-1、Thy1、B220といった系統マーカーを持つものが存在する可能性が示唆された。

< 参考文献 >

1. Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241:58
2. Jones, R.J., J.E. Wagner, P. Celano, M.S. Zicha, and S.J. Sharkis 1990. Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony forming cells. *Nature* 347:188
3. Jones, R.J., P. Celano, S.J. Sharkis, and L.L. Sensenbrenner 1989. Two phases of engraftment established by serial bone marrow transplantation in mice. *Blood* 73:397
4. Ploemacher, R.E., and R.H. P.C. Brons 1989. Separation of CFU-S from primitive cells responsible for reconstitution of the bone marrow hemopoietic stem cell compartment following irradiation : evidence for a pre-CFU-S cells. *Exp. Hematol.* 17:263
5. Fredrickson, G.G. and E.S. Basch 1989. L3T4 antigen expression by hemopoietic precursor cells. *J. Exp. Med.* 169 (4):1473
6. Dialynas, D.P., D.B. Wilde, P. Marrack, A. Pierres, K.A. Wall, W. Harran, G. Otten, M.R. Loken, M. Pierres, J. Kappler, and F.W. Fitch 1983. Characterization of the murine antigenic determinant, designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK1.5: Expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity. *Immunol. Rev.* 74:29
7. Veillette, A., M.A. Bookman, E.M. Horak, L.E. Samelson, and J.B. Bolen 1989. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase *p56^{lck}*. *Nature* 338:257

8. Maddon, P.J., A.G. Dalgleish, J.S. Mcdougal, P.R. Clapham, R.A. Weiss, and R.Axel 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47:333
9. Ledbetter, J.A. and L.A. Herzenberg 1979. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol. Rev.* 47:63
10. Ledbetter, J.A., R.V. Rouse, H.S. Micklem, and L.A. Herzenberg 1980. T cell subsets defined by expression of Lyt-1.2.3. and Thy-1 antigens. *J. Exp. Med.* 152:280
11. Holms, K.L., W.Y. Langdon, T.N. Fredrickson, R.L. Coffman, P.M. Hoffman, J.W. Hartley, and H.C. Morse III 1986. Analysis of neoplasms induced by Cas-Br-M MuLV tumor extracts. *J. Immunol.* 137 no.2:679
12. Kubo, R.T., W. Born, J.W. Kappler, P. Marrack and M. Pigeon 1989. Characterization of a monoclonal antibody which detects all Murine $\alpha\beta$ T cell receptors. *J. Immunol.* 142:2736
13. Dessner, D.S. and M.R. Loken 1981. DNL1.9 : a monoclonal antibody which specially detects all murine B lineage cells. *Eur. J. Immunol.* 11:282
14. Coffman, R.L., I.L. Weissman 1981. B220, a B cell specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature* 289:681
15. Springer, T., G. Galfre, D.S. Secher, and C. Milstein 1979. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 9:301
16. Mountz, J.D., T.M. Smith, and K.S. Toth 1990. Altered expression of self-reactive T cell receptor V β regions in autoimmune mice. *J. Immunol.* 144. 6:2159

17. MacDonald, H.R., R. Schneider, R.K. Lees, R.C. Howe, H. Acha-Orbea, H. Festenstein, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner 1988. T cell receptor V β use predicts reactivity and tolerance to Mls^a-encoded antigens. *Nature* 332:40
18. Russell, E.S. 1979. Hereditary anemias of the mouse, a review for geneticists. *Adv. Genetics* 20:357
19. Bayer, E., E. Skutelsky, and M. Wilcheck 1979. The avidin-biotin complex in affinity cytochemistry. *Methods Enzymol.* 62:308
20. Moore, W. and R. Kantz 1986. Data analysis in flow cytometry. In *The Handbook of Experimental Immunology*, 4th ed. D.M. Weir, L.A. Herzenberg, C. Blackwell, L.A. Herzenberg, editors. Edinburgh, Scotland, Blackwell, 301
21. Iscove N.N., Sieber F., Winterhalter K.H. 1974. Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow. Analysis chromatography on agarose-concanavalin A. *J. Cell. Physiol.* 83:309
22. Suda, T., S. Okada, J. Suda, M. Yasusada, M. Ito, T. Sudo, S. Hayashi, S. Nishikawa, and H. Nakauchi 1989. A stimulatory effect of recombinant murine interleukin-7 (IL-7) on B-cell colony formation and an inhibitory effect of IL-1 α . *Blood* 74(6):1936
23. Zant G.V. 1984. Studies of hematopoietic stem cells spared by 5-fluorouracil. *J. Exp. Med.* 159:679
24. Basch, R. S. and J. W. Berman 1982. Thy-1 determinants are present on many murine hematopoietic cells other than T cells. *Eur. J. Immunol.* 12:359
25. Wu, L., S. Scollay, M. Egerton, M. Pearce, G.J. Spangrude, and K. Shortman 1991. CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature* 349:71

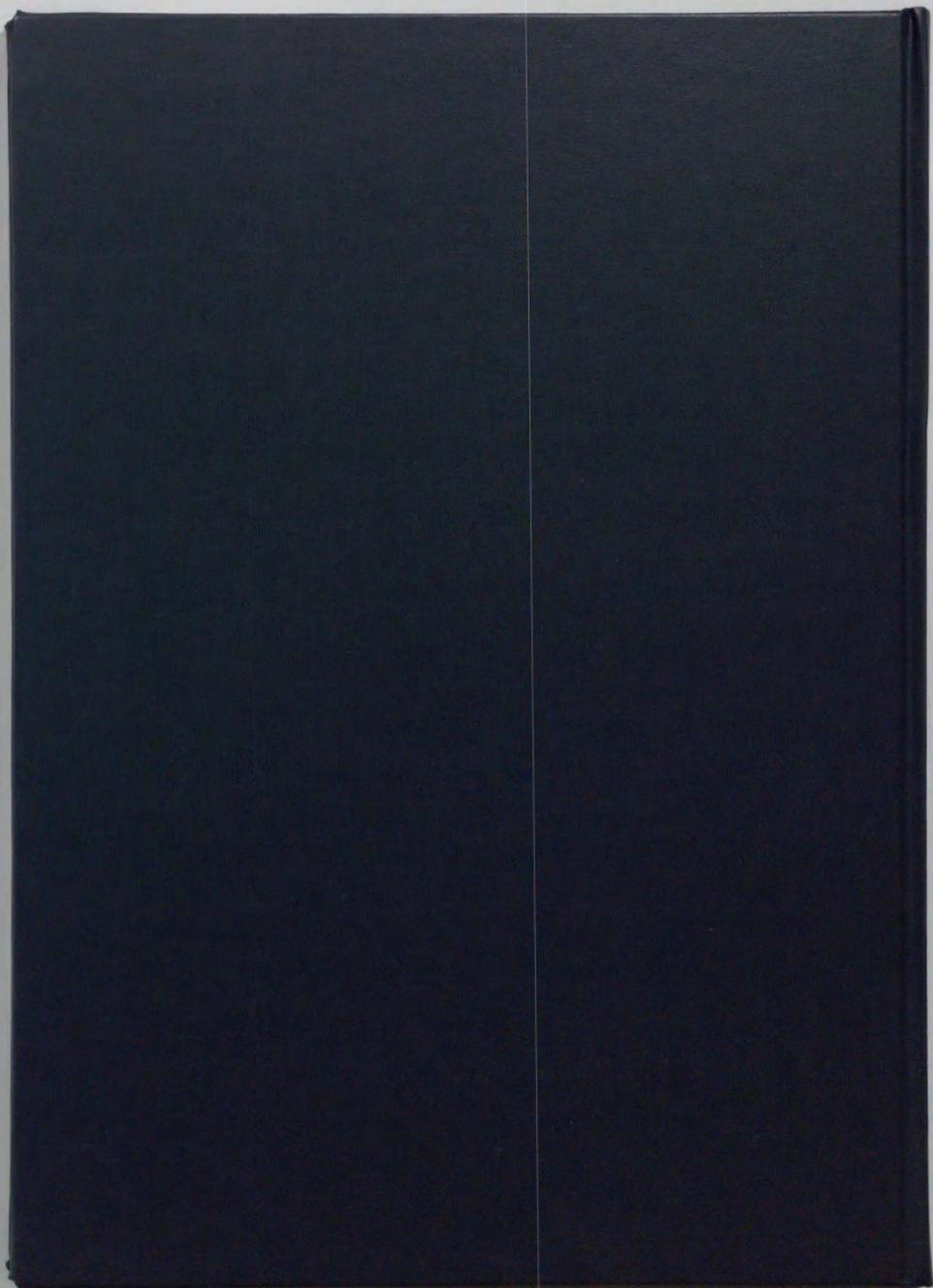
26. Dyle, C. and J.L. Strominger 1987. Interaction between CD4 and Class II. MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature (Lond.)*.

30:256

27. Wilde, D.B., P. Marrack, J. Kappler, D.P. Dialynas, and F. Fitch 1983. Evidence implicating L3T4 in class II MHC antigen reactivity: monoclonal antibody GK1.5 (anti L3T4) blocks class II MHC antigen-specific proliferation, release of lymphokines, and binding by cloned murine helper T lymphocyte lines. *J. Immunol.*

131:621

この研究を行う機会を与えて下さった高久史麿先生、中内啓光先生、北村聖先生に深く感謝いたします。また様々な助言を下さった稲盛健先生、岡田誠治先生、FACS解析をサポートして下さいました永吉和成先生、実験助手の難波雅子さん、そして家族に感謝いたします。





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

C Y M

© Kodak, 2007 TM Kodak