



Expression of granulocyte colony-stimulating factor receptor increases with differentiation in myeloid cells by a newly-devised quantitative flow-cytometric assay

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 新庄, 香 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1066

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 213号	学位授与年月日	平成 8年 3月26日
氏 名	新 庄 香		
論文題目	<p>Expression of granulocyte colony-stimulating factor receptor increases with differentiation in myeloid cells by a newly-devised quantitative flow-cytometric assay (改良フローサイトメトリーによる顆粒球コロニー刺激因子レセプターの定量的検出法で顆粒球コロニー刺激因子レセプターの発現は骨髄球系細胞の分化に伴い増強する)</p>		

博士(医学) 新 庄 香

論文題目

Expression of granulocyte colony-stimulating factor receptor increases with differentiation in myeloid cells by a newly-devised quantitative flow-cytometric assay

(改良フローサイトメトリーによる顆粒球コロニー刺激因子レセプターの定量的検出法で顆粒球コロニー刺激因子レセプターの発現は骨髄球系細胞の分化に伴い増強する)

論文の内容の要旨

【目的】

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、好中球系細胞の増殖・分化を司る重要なサイトカインで、その作用は細胞の G-CSF レセプターに結合することにより開始される。細胞上の G-CSF レセプター発現の解析に関する研究は、これまで主としてラジオアイソトープ (RI) を使用した結合実験により行われてきた。しかし、この方法ではレセプターの定量的解析が可能である反面、被爆の問題や解析に大量の細胞数 (1×10^6 個) が必要である事や手法の煩雑性等の問題があった。さらに表現型別の細胞上 G-CSF レセプター発現を測定するのは不可能であった。そこで、我々はフローサイトメトリー法に改良を加え、G-CSF レセプターを少量の細胞数 (2×10^5 個) で、特異的、高感度かつ定量的に測定する方法の開発を試みた。さらに 3 重蛍光フローサイトメトリー法を用い、従来解析しえなかった造血器細胞の系統、分化段階における G-CSF レセプターの発現量の変化についても検討した。

【方法】

1) 遺伝子組換え型ヒト G-CSF を用いた RI 法とフローサイトメトリー法による結合実験の相関性の検討。

①RI 法: ^{125}I で標識した G-CSF を細胞上のレセプターに結合させ放射能を計測し、Scatchard 解析によりレセプター数を求めた。

②フローサイトメトリー法: ビオチン化した G-CSF を細胞上のレセプターに結合させ、RED670 標識ストレプトアビジン (SA-RED670) にてビオチン-アビジン結合を利用し蛍光染色した。フローサイトメーターで細胞の蛍光強度を測定し、対照細胞の蛍光強度との差に基づき、Kolmogorov-Smirnov (K-S) 検定上の D 値を利用してレセプターの発現量を解析した。

なお両方法ともに被検細胞を含む検体に標識 G-CSF と共に大過剰の非標識 G-CSF を加えて反応させたものを対照として使用した。

2) 細胞の表現型別 G-CSF レセプターの発現の検討。

健常人および急性骨髄性白血病患者の末梢血および骨髄細胞をビオチン化 G-CSF と反応させた後 SA-RED670 にて染色し、さらに FITC 標識抗 CD34 抗体および PE 標識抗 CD33 抗体と反応させた。

3 重蛍光フローサイトメトリー法により各細胞上の吸収波長の異なる 3 種類の蛍光色素の蛍光強度を同時に測定した。各細胞は CD34 と CD33 の発現により分類し、 $\text{CD34}^+\text{CD33}^-$ 、 $\text{CD34}^+\text{CD33}^+$ 、 $\text{CD34}^-\text{CD33}^+$ の 3 種の表現型について、それぞれの G-CSF レセプター発現量を D 値を用いて算出、解析した。

【結果】

1) RI を使用した結合実験より求められた G-CSF レセプター数とフローサイトメトリーにより求められた D 値は良く一致しており、G-CSF レセプター数と D 値の関係から標準曲線を作成し、細

胞上の G-CSF レセプターの発現をフローサイトメトリー法により定量的に測定しえた。

- 2) 正常の表現型別細胞解析では、骨髓 $CD34^+CD33^-$ 細胞 $<CD34^+CD33^+$ 細胞 $<CD34^-CD33^+$ 細胞 $<$ 末梢血 $CD34^-CD33^+$ 顆粒球の順に G-CSF レセプター発現量が増加していた。
- 3) 急性骨髄性白血病細胞においても G-CSF レセプター発現を認めたが、前述のような正常の表現型別特性は必ずしも保持されていなかった。

【結論】

- 1) ビオチン化 G-CSF と SA-RED670を用いてフローサイトメトリーを施行し、K-S 検定の D 値を利用して G-CSF レセプターの発現を解析した。これにより少量の細胞数で簡便、特異的かつ高感度に造血器細胞上の G-CSF レセプターの定量的測定が可能となった。
- 2) 未分化造血幹細胞のマーカーである CD34と骨髓球系分化抗原である CD33と G-CSF レセプターとの同時解析の結果、正常骨髓球系細胞では分化とともに G-CSF レセプター発現量が増加することが認めれた。
- 3) 急性骨髄性白血病細胞では全例に G-CSF レセプターの発現が認められたが、その発現量に多様性が認められ、正常細胞上で認められた表現型別発現特性は必ずしも保持されておらず、急性骨髄性白血病における G-CSF レセプターの発現調節機構の異常が示唆された。

論文審査の結果の要旨

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は主として好中球系細胞の増殖・分化を司るサイトカインである。また、この因子は好中球、顆粒球系の骨髓芽球のみでなく、造血幹細胞、単球、血管内皮細胞、胎盤のトロホプラストにも刺激作用がある。これらの細胞には G-CSF の受容体が存在するが、その検出は主としてラジオアイソトープを用いた結合実験によりなされてきた。この方法は、受容体の定量解析、各施設のデータの比較が可能である一方、被爆の問題や細胞数を大量に必要とするという欠点があった。申請者らは従来のフローサイトメトリー法を発展させ、少数の細胞で G-CSF の受容体の特異的、さらに高感度の定量的検出法の確立を試みた。これらを利用することにより造血細胞の系統、分化段階における G-CSF の受容体の発現の変化についても検討した。

申請者らの検出方法では、ビオチン化した G-CSF を細胞の受容体に結合させ、これを RED670標識ストレプトアビジン (SA-RED670) によりストレプトアビジン-ビオチン結合を利用して蛍光染色した。この検出方法は今までの方法より蛍光強度が強い上に、励起波長と蛍光波長の差が大きく、励起波長の干渉が少なく、測定上非特異的蛍光の関与が少ないことに特徴がある。さらに本法ではフローサイトメトリーによりビオチン標識 G-CSF の結合時の蛍光強度から非特異的蛍光のコントロールの蛍光強度を引いた差 (D 値) を計算することにより、あらかじめ作成した検量線を用い受容体の実数を計算出来た。

結果として末梢血の好中球に G-CSF の受容体は、平均は1508 sites/cell で発現していること、またリンパ球では発現していないことがわかった。さらに骨髓球の分化抗原である CD34と CD33を用い分化と G-CSF 受容体発現の関係を調べたところ骨髓 $CD34^+CD33^-$ 細胞 $<CD34^+CD33^+$ 細胞 $<CD34^-CD33^+$ 細胞 $<$ 末梢 $CD34^-CD33^+$ 顆粒球の順に G-CSF 受容体発現量は増加していた。これらより分化に応じて G-CSF 受容体の発現が増加することがわかった。一方、急性骨髄性白血病細胞においても G-CSF 受容体の発現を認めたが正常の表現型別の特性は必ずしも継承されていなかった。

この結果は申請者らの考案した受容体の微量定量法の特異性と臨床応用への可能性を示唆する優れた

研究と考えられた。

この発表に関連して以下のような質問が出された。

- 1) 今迄の SA-PE では何故感度が低いのか
- 2) 同じ細胞を用いた場合 D 値は同じになるか
- 3) 少ない細胞が多数の受容体を発現している場合と多数の細胞が少数の受容体を発現している場合で D 値は同じか
- 4) 白血病細胞の受容体数の違いは白血病の種類によるか
- 5) 白血病細胞の分化段階により受容体の発現に差はあるか
- 6) 二次元の表示で細胞の内部構造が複雑とはどういうことか
- 7) 発症時と再発時で G-CSF の受容体の発現が異なることはないか

以上の質問に対する申請者の解答は概ね適切であり、申請者の論文は博士（医学）の学位の授与に値すると審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 高 田 明 和

副査 教授 筒 井 祥 博 副査 教授 吉 見 輝 也

副査 助教授 本 郷 輝 明 副査 助教授 三 浦 克 敏