

薬学雑誌  
YAKUGAKU ZASSHI  
116 (9) 719—727 (1996)

マウス腎臓抽出物中に見い出されるマウス造血前駆細胞コロニー  
増幅活性の作用及び性質

番場豊樹, 柏倉幾郎,\* 早瀬幸俊, 高木良成  
北海道薬科大学

**Biological Properties of the Colony-Promoting Activity in  
Extracts Prepared from Murine Kidney**

Toyoki BAMBA, Ikuo KASHIWAKURA,\* Yukitoshi HAYASE,  
and Yoshinari TAKAGI

*Hokkaido College of Pharmacy, 7-1 Katsuraoka-cho,  
Otaru 047-02, Japan*

(Received March 25, 1996)

Aqueous extracts prepared from the murine kidney (MKE) promoted colony formation derived from murine hematopoietic progenitor cells in serum-free cultures stimulated by interleukin-3 (IL-3) and erythropoietin (Epo). MKE itself did not stimulate any colony formation. MKE preferentially enhanced granulocyte-macrophage colony forming units (CFU-GM), but did not promote any erythroid colony formation. The CFU-GM colony promotion by MKE was observed at day 6 after the culture started, and the colony-promoting activity (CPA) was maintained at the same level until day 16. MKE showed no CPA in the cultures using cells obtained from 5-FU-injected mice and from c-kit<sup>+</sup>-enriched treatment. Furthermore, MKE acted synergistically with granulocyte-colony-stimulating factor (CSF), macrophage-CSF, IL-6 and IL-11 on colony formation, but did not act with GM-CSF, stem cell factor and Epo. From the results of various experiments and gel-filtration chromatography, it is estimated that the colony-promoting factor detected in MKE is a heat stable protein with about 20 KDa molecular weight. These results suggest that MKE promotes colony formation by murine myeloid progenitor cells, and that the target cell populations of MKE are relatively mature in the hematopoietic differentiation pathway.

**Key words**—kidney; colony-promoting activity; CFU-GM; erythropoietin; IL-3

緒 言

*In vitro* において造血前駆細胞が増殖・分化し、コロニーを形成するためには colony-stimulating factor (CSF) の存在が不可欠である。<sup>1)</sup> CSF には granulocyte-CSF (G-CSF), macrophage-CSF (M-CSF), GM-CSF, multi-CSF (interleukin-3, IL-3) が知られている。それらはそれぞれ純化・クローニングされ、IL-3 を除く CSF が医薬品として用いられている。<sup>2-5)</sup> 一方、それ自身はコロニー形成を刺激しないが、CSF との共存下でコロニー形成を増幅させる活性 (colony-

promoting activity, CPA) の存在が報告されている。<sup>6-8)</sup> これらは各種細胞培養液, 臓器抽出液, 血清, 赤血球溶血液などにその存在が報告されてきたが, コロニー増幅因子 (colony-promoting factor, CPF) として純化されたものは IL-1 $\alpha$  が知られている程度で, CSF との関連を含め詳細は不明な点が多い。<sup>9)</sup>

著者らはこれまで, マウス造血前駆細胞である granulocyte-macrophage colony-forming units (CFU-GM), erythropoietic burst-forming units (BFU-E), megakaryocyte colony-forming units (CFU-Meg) 及び colony-forming units in spleen (CFU-S) の *in vitro* における増殖を促進する因子 (hematopoietic promoting factor, HPF) をブタ腎臓抽出物中に見出し, HPF の作用及び性質について報告してきた。<sup>10-12)</sup> この論文ではマウス腎臓の水溶性抽出物 (murine kidney extracts, MKE) 中に HPF とは異なる CPA の存在を認め, その作用及び性質について検討したので報告する。

## 実 験 方 法

**MKE の調製** 腎臓は, ddY 系雄性マウス (10—13 週齢, 三協ラボ) を頸椎脱臼後直ちに採取し, 新鮮な状態もしくは凍結保存したものを使用した。氷冷下で精製水を加え, Polytron (6000 rpm, 30 s, 3 times) を用いて 12% (w/v) ホモジネートを作成した。このホモジネートを 4°C で 8 時間攪拌し, 9000g (4°C, 30 min) で遠心分離した。上澄を酢酸で pH 4.0 とし, 不溶物を遠心除去後, 上澄を Visking チューブを用いてダルベッコ改変リン酸緩衝食塩液 (PBS) (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 不含) に対して透析した。透析後, 不溶物を遠心除去し, 上澄をメンブランフィルター (ポアサイズ 0.45  $\mu$ m, TOYO) を用いてろ過滅菌し, MKE とした。MKE は -20°C で保存した。実験にはいくつかのロットの MKE を調製したが, 各項目の実験には同一ロットを用いた。また, ロット毎にタンパク量は異なったが, 2.35—3.40 mg/ml の範囲を示した。

**マウス骨髓細胞の調製** ddY 系雄性マウス (10—13 週齢) 大腿骨及び脛骨から, 0.5% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA, Boehringer Mannheim GmbH, Germany) を含む PBS で骨髓細胞を洗い出した。遠心分離後, 骨髓細胞を Gey 溶液により溶血処理を行った。処理後回収された細胞を 10% ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS, Intergen, NY) を含むイスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM) 12 ml に懸濁し, 組織培養用プラスチックシャーレ (直径 10 cm, Falcon, NJ) に対して 30 分及び 60 分間の 2 回, シャーレを換えて吸着処理を行った。処理後非吸着細胞を回収し, 実験に用いた。

**5-Fluorouracil 投与マウス骨髓細胞の調製** Suda らの方法<sup>13)</sup> を参考に行った。生後 10 週齢の ddY 系雄性マウスに対し, 5-fluorouracil (5-FU, 協和発酵, 東京) を尾静脈投与 (150 mg/kg 体重) した。2 日後, 骨髓細胞を採取し, 溶血・吸着処理を行い実験に用いた。なお生理食塩水を投与したマウスをコントロールとして用いた。

**c-kit 陽性濃縮細胞の調製** 既報<sup>12)</sup> に従って調製した。表面活性化型細胞培養フラスコ (T-25 cell culture flask, Applied Immune Sciences Inc., Santa Clara, CA) に対し, 抗マウス c-kit 受容体抗体 (Rat IgG2b, Pharmingen, San Diego, CA) を結合させた。結合処理後フラスコに, 溶血・吸着除去処理した骨髓細胞を加え, 室温下 60 分間インキュベートした。非吸着細胞を除去し, フラスコ表面を PBS で 3 回洗浄後, 10% FCS を含む IMDM 10 ml を加え, 一夜インキュベートした。インキュベート後フラスコ表面から遊離した細胞を回収し, c-kit 陽性濃縮細胞とした。この処理で得られた細胞は, 単位細胞数当たりのコロニー数が処理前のおよそ 3—5 倍, また 8 日目の CFU-S はおよそ 10 倍に増加する。

**造血因子** 遺伝子組換えヒト G-CSF, 遺伝子組換えヒト IL-6 及び遺伝子組換えマウス stem cell factor (SCF) はキリンビール (東京) から供与された. 遺伝子組換えヒト M-CSF は Austral Biologicals (San Ramon, CA) より購入した. 遺伝子組換えマウス GM-CSF は Intergen Company (Purchase, NY) より購入した. 遺伝子組換えマウス IL-3 及び遺伝子組換えヒト IL-11 は Bio Source (Camarillo, CA) より購入した. 遺伝子組換えヒト erythropoietin (Epo) は三共 (東京) より購入した. 各因子はシャーレ当たり下記の量を添加した. G-CSF, 1.25  $\mu$ g; M-CSF, 500 units; GM-CSF, 10 ng; IL-1 $\alpha$ , 30 units; IL-3, 5 ng; IL-6, 20 ng; IL-11, 10 ng; SCF, 100 ng; Epo, 4 units.

**コロニー増幅活性 (CPA) の測定法** Iscove らの方法<sup>14)</sup>に基づく, IL-3 及び Epo を含む無血清メチルセルロース培養法により行った. 2% BSA, 600  $\mu$ g transferrin (Miles Inc., Kankakee, IL), 0.2% (v/v) low density lipoprotein (Egg York LDL, キューピー, 東京), 10 nM 2-mercaptoethanol (和光純薬, 大阪), 10  $\mu$ g insulin (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), 0.8% メチルセルロース, 骨髓細胞 5000 個, 5 ng IL-3, 4 units Epo 及び試料 100  $\mu$ l を含む IMDM 培地 1.1 ml を 35 mm プラスチックシャーレ (テルモ) に播き, 37°C, 5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub> 環境下にて培養を行った. 培養後ベンチジン染色を行い, 倒立顕微鏡又は実体顕微鏡を用い, 細胞 50 個以上からなるコロニー数を計数した. 染色陽性コロニーを BFU-E 由来コロニー, 染色陰性コロニーを CFU-GM 由来コロニーとしてそれぞれ計数した. また, IL-3(+), Epo(+), MKE(-) の条件下で形成されたコロニー数を X, IL-3(+), Epo(+), MKE(+) の場合のコロニー数を Y とし, Y/X で得られた値を CPA とした.

**ベンチジン染色法** 0.3% Diaminobenzidine を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) を, 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と 6:1 の割合で混合し, その 750  $\mu$ l をメチルセルロース培地上に静かに加えた. 室温で 20 分放置後, 赤色ないしは茶褐色を呈する細胞を赤芽球とした.

**トリプシン処理** MKE 0.4 ml (タンパク濃度 2.4 mg/ml) に対し, 3.2 mg/ml の trypsin (bovine pancreas, Sigma, St. Louis, MO) 溶液 0.1 ml を添加し, 37°C で 2 時間インキュベートした. 反応終了後, 3.2 mg/ml の trypsin inhibitor (soy beans, Sigma) 溶液 0.1 ml を添加し, さらに 30 分間インキュベート後, MKE として 100  $\mu$ l 相当分の試料溶液について CPA の測定を行った. 別に PBS 0.4 ml を同様に処理したもの及び MKE を 37°C で 2.5 時間処理したものをそれぞれコントロールとした.

**化学処理** 以下の処理は Brennan らの方法<sup>15)</sup>に準じて行った.

1) 酸化処理——MKE 0.8 ml に対し, 150 mM sodium metaperiodate (SMPI, 和光純薬) 溶液 0.4 ml を添加し (最終濃度 50 mM SMPI), 4°C で 14 分間反応させた. 終了後, 1/10 容量の 50% ショ糖溶液 (120  $\mu$ l) を添加して反応を止め, PBS に対し透析した. 透析後試料溶液をろ過滅菌し, MKE として 100  $\mu$ l 相当分の試料溶液について CPA の測定を行った.

2) 還元及びアルキル化処理——MKE 0.8 ml に対し 25 mM dithiothreitol (DTT, 和光純薬) 溶液又は 75 mM N-ethylmaleimide (NEM, 和光純薬) 溶液 0.2 ml を添加し (最終濃度 5 mM DTT 及び 15 mM NEM), 室温下 2 時間処理後, 共に PBS に対し透析した. 透析後試料溶液をろ過滅菌し, MKE として 100  $\mu$ l 相当分の試料溶液について CPA の測定を行った.

3) 有機溶媒抽出——MKE に対し 2 倍量の diisopropylether-n-BuOH (3:2) (和光純薬) を加え, 室温下ミキサーで 10 分間混和後遠心分離し, 水層を凍結乾燥した. 終了後, MKE と同量の精製水を用いて溶解, ろ過滅菌後, MKE として 100  $\mu$ l 相当分の試料溶液について CPA を測定した.

**ゲルろ過クロマトグラフィー** Centriprep (分画分子量 10000, Amicon) を用いて, 20 ml の

MKE を 1 ml にまで濃縮した後、あらかじめ 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した TOYOPEARL HW-55 (16×640 mm, TOSOH) カラムに添加し、280 nm の吸光度をモニターしながら、溶出液を 2 ml ずつ分取した。各画分 100  $\mu$ l について CPA を測定した。なお、Centriprep による濃縮処理での CPA の回収率はほぼ 100% であった。また、標準タンパクには catalase (240 kDa), egg-albumin (45 kDa), cytochrome c (12.5 kDa) を用いた。

**タンパク定量法** タンパク濃度の測定は、標準タンパクに BSA を用いた Lowry 法<sup>16)</sup> により行った。

## 結 果

### コロニー形成に対する MKE の影響

IL-3(-), Epo(-) 又は IL-3(+), Epo(+) の条件下に MKE を添加し、培養 10 日目のコロニー数を計数した。Table 1 に示したように、IL-3(-), Epo(-) 条件下では、MKE をタンパク量として 600  $\mu$ g まで添加してもコロニーの形成は認められなかった。一方 IL-3(+), Epo(+) に MKE 300  $\mu$ g の添加で、CFU-GM 由来のコロニー数は非添加時の約 1.6 倍に増加し、MKE 中に CPA の存在することが認められた。しかし、BFU-E を含め赤血球系前駆細胞に対する増幅作用は認められなかった。MKE の CPA を培養開始から 16 日目まで測定すると (Fig. 1), CPA は培養 6 日目から 16 日目まで認められ、この間の増幅率及びコロニー組成に変化は観察されなかった。このことから MKE の作用は、分化増殖に時間を要する造血前駆細胞に作用している可能性の低いことが推察された。また、以後の CPA 測定は 10 日目に行った。

### 5-FU 投与マウス骨髓細胞及び c-kit 陽性濃縮細胞のコロニー形成に対する MKE の作用

マウスにピリミジン代謝阻害剤である 5-FU を投与すると、投与後 2—4 日目には骨髓細胞中の分化の進んだ造血前駆細胞は死滅し、生き残った造血幹細胞のほとんどは静止期 ( $G_0$  期) に在ることが知られている。<sup>17-19)</sup> Table 2 に示したように、MKE は 5-FU 投与マウス骨髓細胞のコロニー形成を 10 日目、20 日目ともに増幅しなかった。一方 SCF は、5-FU 投与及び非投与のいずれの細胞においてもコロニー形成を増加させた。また、c-kit 陽性濃縮細胞を用いて MKE の作用を検討した結果、MKE による有意な CPA は認められなかった (Table 2)。このことから、MKE は  $G_0$  期に在る未熟な幹細胞には作用せず、また c-kit を発現している造血前駆細胞にも作用しないことが示唆された。

### MKE と各種サイトカインの併用によるコロニー形成

MKE と各種サイトカインとのコロニー形成に対する反応性及び異同を検討する目的で、9

Table 1. Effect of MKE on Colony Formation/Enhancement

MKE ( $\mu$ g protein/dish)	Colonies/5000 cells						
	IL-3(-), Epo(-)			IL-3(+), Epo(+)			
	BFU-E	CFU-GM	Total	BFU-E	CFU-GM	Total	CPA
0	0	0	0	7.5 $\pm$ 0.8	41.8 $\pm$ 3.5	49.3 $\pm$ 3.6	—
30	0	0	0	7.2 $\pm$ 1.1	52.3 $\pm$ 4.6*	59.5 $\pm$ 5.2**	1.21**
60	0	0	0	6.3 $\pm$ 2.6	63.3 $\pm$ 7.8*	69.7 $\pm$ 8.2*	1.41*
150	0	0	0	5.8 $\pm$ 2.3	69.2 $\pm$ 3.5*	75.0 $\pm$ 3.3*	1.52*
300	0	0	0	6.5 $\pm$ 2.8	68.8 $\pm$ 1.2*	75.3 $\pm$ 3.1*	1.53*
600	0	0	0	2.3 $\pm$ 0.9*	63.2 $\pm$ 4.8*	65.5 $\pm$ 4.7*	1.33*

Mean  $\pm$  S.D. of 6 dishes from two separate experiments. \* $p$  < 0.005, \*\* $p$  < 0.01.

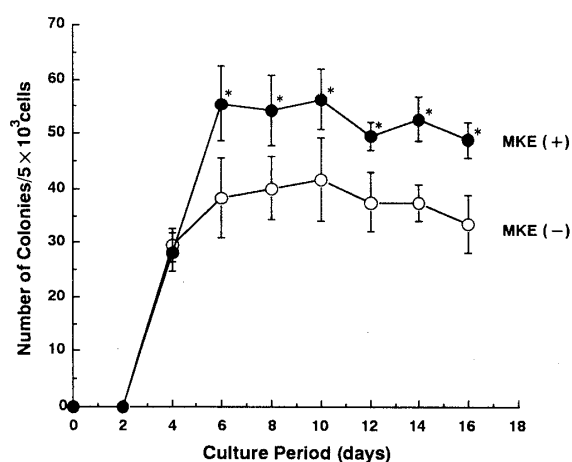


Fig. 1. Relationship between Culture Period and Number of Colonies with or without MKE

Cultures were carried out with IL-3 (5 ng) and Epo (4 unit) as a source of CSF without (○) or with (●) MKE (310 μg of protein). Mean ± S.D. of 6 dishes from two separate experiments. \* $p < 0.005$ .

Table 2. Effect of MKE on Colony Formation by Mouse Bone Marrow Cells Prepared from 5-FU Injected Mice and C-kit<sup>+</sup> Enriched Cells

Treatment	Cytokines	10 d		20 d	
		Total colonies	CPA	Total colonies	CPA
Control (5000 cells)	Epo + IL-3	39.0 ± 3.4	—	36.0 ± 1.7	—
	Epo + IL-3 + SCF	72.0 ± 5.7*	1.85*	67.0 ± 1.7*	1.86*
	Epo + IL-3 + IL-6	41.0 ± 4.8	1.05	34.0 ± 4.1	0.94
	Epo + IL-3 + MKE	52.0 ± 4.6*	1.33*	44.0 ± 0.8*	1.22*
5-FU (10000 cells)	Epo + IL-3	0	—	0	—
	Epo + IL-3 + SCF	1.3 ± 0.5*	—	4.3 ± 2.1*	—
	Epo + IL-3 + IL-6	0.3 ± 0.5	—	0	—
	Epo + IL-3 + MKE	0	—	0	—
C-kit <sup>+</sup> (5000 cells)	MKE	0	—	—	—
	Epo + IL-3	97.1 ± 23.8	—	—	—
	Epo + IL-3 + MKE	97.9 ± 26.4	1.01	—	—

Mean ± S.D. of 6 dishes from two separate experiments. \* $p < 0.005$ .

種類のサイトカインについて、MKEのCPAを検討した。Table 3に示したように、MKEはG-CSF、M-CSF、IL-1 $\alpha$ 、IL-6及びIL-11と相乗的に作用し、2倍以上のCPAを示した。しかし、GM-CSF及びSCFとの併用では、有意なCPAは観察されなかった。また、Epoとの併用では、BFU-E由来コロニー形成に対する増幅作用は認められず、むしろ抑制作用が認められた。このように、MKEの作用はサイトカインに大きく依存し、CPAにも大きな差が認められた。

#### MKEに含まれるCPFの安定性

MKE中のCPFの安定性を検討する目的で、MKEに対する各種処理を行った。Table 4に示したように、MKEをトリプシン処理するとCPAは完全に失活した。しかし、MKEのDTT、NEM及びSMPI処理ではCPAの有意な失活は認められなかった。またMKE中の疎水性成分の影響を検討するために、MKEをdiisopropylether-*n*-BuOHで処理したが、CPAの低下は認

Table 3. Effect of Combinations with MKE and Cytokines on Colony Formation

Cytokines	Colonies						
	MKE(-)			MKE(+)			
	BFU-E	CFU-GM	Total	BFU-E	CFU-GM	Total	CPA
G-CSF	0	10.0±1.0	10.0±1.0	0	27.0±4.6*	27.0±4.6*	2.70*
GM-CSF	0	18.3±1.2	18.3±1.2	0	21.7±5.0	21.7±5.0	1.19
M-CSF	0	10.0±1.7	10.0±1.7	0	20.3±4.7*	20.3±4.7*	2.03*
IL-1	0	0.3±0.5	0.3±0.5	0	5.7±1.2***	5.7±1.2***	19.00***
IL-3	0	39.7±1.5	39.7±1.5	0	48.3±2.1**	48.3±2.1**	1.22**
IL-6	0	4.3±1.2	4.3±1.2	0	12.7±3.1*	12.7±3.1*	2.95*
IL-11	0	3.7±1.5	3.7±1.5	0	15.0±3.6**	15.0±3.6**	4.05**
SCF	0	19.7±2.3	19.7±2.3	0	25.7±6.4	25.7±6.4	1.30
Epo <sup>#</sup>	11.7±3.5	9.7±0.6	21.3±3.5	5.0±3.0	15.7±4.2	20.7±7.1	0.97

Data is a representative experiment of two separate experiments. Mean±S.D. of 3 dishes. <sup>#</sup>50000 cells/dish; others, 5000 cells/dish, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

Table 4. Effect of Various Treatments on CPA of MKE

Treatment	Total colonies/5000 cells	CPA
Control (without MKE)	41.3±2.4	—
37°C, 2.5 h	57.0±4.3	1.38
Trypsinized	42.0±1.4	1.02*
Control (without MKE)	36.0±1.2	—
Untreated	48.7±6.8	1.35
Dithiothreitol	44.8±2.7	1.24
N-Ethylmaleimide	47.7±3.4	1.32
Control (without MKE)	21.7±1.2	—
Untreated	29.3±3.9	1.35
Sodium metaperiodate	33.7±1.7	1.55
Control (without MKE)	49.0±2.3	—
Freeze Dried	77.0±8.5	1.57
Diisopropylether- <i>n</i> -BuOH(3:2) extraction	75.5±8.5	1.54
Control (without MKE)	36.0±1.6	—
Untreated	47.7±3.9	1.33
56°C, 30 min	54.0±6.4	1.50
70°C, 30 min	50.7±3.4	1.41
100°C, 2 min	36.6±6.0	1.02*

Mean±S.D. of 6 dishes from two separate experiments. \* $p < 0.05$ .

められなかった。56°C, 30 分間及び 70°C, 30 分間の加熱処理においても CPA の低下は認められなかったが, 100°C, 2 分間の処理では CPA の失活が認められた。以上のことから, MKE 中の CPF は, その活性発現に糖鎖, SH 基及び疎水性成分の関与がなく, 比較的熱に安定なタンパクであると推定される。

#### ゲルろ過クロマトグラフィーによる CPF の分子量の測定

Centriprep により濃縮した MKE について, HW55 カラムによるゲルろ過クロマトグラフィーを行い, 溶出画分の CPA を測定した。Fig. 2 に示したように, CPA は分画番号 31—34

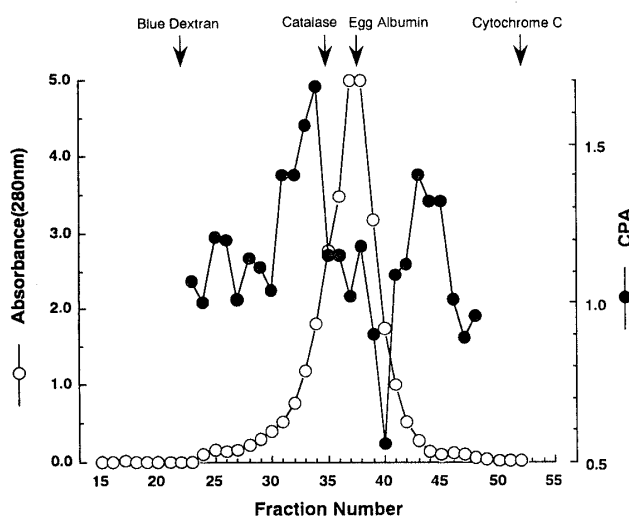


Fig. 2. Elution Profile of CPA on TOYOPEARL HW55-Gel Filtration Column Chromatography

MKE was concentrated 20-fold by ultrafiltration, and was applied to a TOYOPEARL HW55-Gel filtration column previously equilibrated with 20 mM phosphate buffer, pH 7.4. Fractions of 2 ml were collected and their absorbance at 280 nm (○), and CPA (●) were measured.

番及び 44—46 番の 2 カ所に検出された。標準タンパクの溶出結果から、それぞれの溶出位置の分子量は約 400 kDa 及び 20 kDa と推定された。400 kDa 付近の活性画分をプールし、限外ろ過濃縮後同じカラムを用いて再クロマトを行うと、20 kDa に相当する画分に再び CPA が現われた (data not shown)。このことから、MKE 中に含まれる CPF の分子量はおよそ 20 kDa と推定される。

## 考 察

著者らがこれまで報告してきたブタ腎臓由来 HPF は、サイトカイン存在下、ほとんど静止期にある未熟な造血幹細胞に作用し、*in vitro* において CFU-GM, BFU-E, CFU-Meg 由来のコロニー数を増加させ、CFU-S の増殖作用を示す。<sup>12)</sup> 一方、MKE は CFU-GM の中でも分化の進んだ前駆細胞に作用する G-CSF, M-CSF 刺激下のコロニー形成を強く促進し、さらに赤芽球系前駆細胞、5-FU 抵抗性の未熟な造血幹細胞及び c-kit を発現している造血幹細胞には作用しないことが示唆された。したがって、MKE 中の CPF は、CFU-G や CFU-M など比較的成熟した前駆細胞が標的細胞と考えられ、HPF の作用とは大きく異なることが示された。この点は、ほ乳類と齧歯類に由来する種差、あるいは両種の血球産生における腎臓機能の差に起因している可能性が考えられる。

今回用いた 9 種類のサイトカインは、単独でコロニー形成を刺激した点で MKE とは性質が異なる。IL-1 $\alpha$  は単独での CSF 活性が弱く、MKE 中の CPF と類似するサイトカインであるが、両者間に相乗性が認められ、IL-1 $\alpha$  が 5-FU 処理骨髓細胞を含め未熟な前駆細胞に対して CPA を示すことから、<sup>20)</sup> 両者は異なるものと考えられる。この実験では検討していないが、MKE と類似の活性を示すものに IL-4 がある。IL-4 は単独でコロニー形成を支持しないが、Epo 存在下で赤芽球コロニー、混合コロニー形成を促進させることが報告されている。<sup>21,22)</sup> また、IL-4 は IL-3 刺激下のコロニー形成に対しては CPA を示さないことから、<sup>23)</sup> MKE 中の活

性成分が IL-4 である可能性は低い。最近になって、チロシンキナーゼ型レセプターである flk-2/flt-3 が未分化な造血前駆細胞に発現しており、そのリガンドが IL-3 との相乗性を示すことが報告されている。しかし、flk-2/flt-3 ligand が BFU-E を増幅しない点は MKE と共通するが、flk-2/flt-3 ligand が未分化な前駆細胞に対して高い増殖能を示す<sup>24)</sup>点で MKE とは異なる。

Chen らはマウス骨髓細胞長期培養上清中に、G-CSF, GM-CSF, IL-3 と相乗性を示す CPA の存在を報告している。しかし、この CPA は GM-CSF との間に高い相乗性があり、5-FU 投与マウス骨髓細胞においても CPA を示すことから MKE とは性質が異なる。<sup>25)</sup> Ryoet らは、マウス腎臓細胞抽出物中に、主に mature な BFU-E の増殖を促進する因子 (mBPA) の存在を報告している。<sup>26)</sup> しかし、同じマウス腎臓抽出物ではあるが、mBPA と赤芽球系前駆細胞に作用しない MKE とでは明らかに異なる。Dahl らはマウス血清中に、IL-3 と相乗性を示す CPA を見出し、その産生細胞が放射線抵抗性であること、<sup>27)</sup> CL-6B によるゲルろ過クロマトの溶出パターンから、60—70 KDa 及び 20—30 KDa の 2 成分の CPF が存在することを報告している。MKE 中の CPF は 20 KDa と推定され、血清由来 CPF 2 成分のうち低分子因子と分子量の点で類似する。しかし、3Gy の X 線照射を行ったマウスから MKE を調製し、CPA を測定したところ、照射後 7 日目のマウスより調製した MKE 中に CPA は検出されず、14 日目に照射前の CPA に回復するのを観察した (data not shown)。このことより、MKE 中の CPF 産生細胞は放射線感受性と推察され、Dahl らが報告した血清中の CPF とは産生細胞が異なると考えられる。既述の報告を含め、これまでの CPA に関する報告のほとんどは、未処理の骨髓細胞を  $2-5 \times 10^4$  個含む血清培養で評価を行っている。このような培養系では、血清成分や骨髓細胞に含まれる造血前駆細胞以外の様々な細胞の関与を無視できない。骨髓細胞に含まれる赤血球は、CPA を示すヘモグロビンを含んでおり、<sup>8)</sup> またマクロファージや繊維芽細胞などの間質系細胞は各種刺激によりサイトカインを産生する可能性が考えられる。著者らの実験では、CPA の評価を赤血球や吸着細胞を除いた細胞 5000 個を用いた無血清培養により行い、MKE の作用をより直接的に評価出来たものと考えられる。

腎臓は酸素センサーとして作用し、赤血球産生を司る Epo の産生を調節する臓器として機能していることは既によく知られている。<sup>28)</sup> 同時に、各種の腎疾患が腎性貧血を誘引し、血小板あるいはリンパ球の減少による出血、免疫不全を引き起こす一因となっていることも事実である。<sup>29)</sup> MKE 中の CPF が腎臓で産生されているかどうかは現在のところ不明であるが、Epo 以外の造血因子が、腎臓から産生されている可能性は否定出来ない。MKE に見い出された CPF は、血球産生に関与する生理的因子である可能性があり、今後この活性成分の構造を含め腎臓の造血に果たす役割の詳細な検討が必要である。

## 引用文献

- 1) Vallance S. J., Whetton A. D., *Biochem. Soc. Trans.*, **19**, 307 (1991).
- 2) Nagata S., Tsuchiya M., Asano S., Kaziro Y., Yamazaki T., Yamamoto O., Hirata Y., Kubota N., Oheda M., Nomura H., Ono M., *Nature (London)*, **319**, 415 (1986).
- 3) Wong G. G., Temple P. A., Leary A. C., Witek-Giannotti J. S., Yang Y.-C., 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., *Science*, **235**, 1504 (1987).
- 4) Gough N. M., Gough J., Metcalf D., Kelso A., Grail D., Nicola N. A., Burgess A. W., Dunn

- A. R., *Nature* (London), **309**, 763 (1984).
- 5) Lewis I. C., Aebersold R., Ziltener H., Schrader J. W., Hood L. E., Kent S. B. H., *Science*, **231**, 134 (1986).
  - 6) Wagemaker G., Peters M. F., *Cell Tissue Kinet.*, **11**, 45 (1978).
  - 7) Brennan J. K., Abboud C. N., DiPersio J. F., Barlow G. H., Lichtman M. A., *Blood*, **58**, 803 (1981).
  - 8) Tsuneoka K., Takagi Y., Hirashima K., Shikita M., *Exp. Hemat.*, **6**, 445 (1978).
  - 9) Dinarello C. A., *Blood*, **77**, 1627 (1991).
  - 10) 柏倉幾郎, 早瀬幸俊, 高木良成, 薬誌, **108**, 984 (1988).
  - 11) Kashiwakura I., Murakami M., Hayase Y., Takagi Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 3290 (1991).
  - 12) Kashiwakura I., Murakami M., Hayase Y., Takagi Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1476 (1995).
  - 13) Suda T., Suda J., Ogawa M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 6689 (1983).
  - 14) Iscove N. N., Sieber F., Winterhalter K. H., *J. Cell. Physiol.*, **83**, 309 (1974).
  - 15) Brennan J. K., Abboud C. N., DiPersio J. F., Barlow G. H., Lichtman M. A., *Blood*, **58**, 803 (1981).
  - 16) Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 1407 (1951).
  - 17) Nakahata T., Akabane T., *Acta Haematol. Jpn.*, **47**, 1764 (1984).
  - 18) Suda T., Suda J., Ogawa M., *J. Cell. Physiol.*, **117**, 308 (1983).
  - 19) Ogawa M., Porter P. N., Nakahata T., *Blood*, **61**, 823 (1983).
  - 20) Muench. M. O., Schneider J. G., Moore M. A. S., *Exp. Hematol.*, **20**, 239 (1992).
  - 21) Kishi K., Ihle J. N., Urdal D. L., Ogawa M., *J. Cell. Physiol.*, **133**, 463 (1989).
  - 22) Sonoda Y., Okuda T., Yokota S., Maekawa T., Shizumi Y., Nishigaki H., Misawa S., Fujii H., Abe T., *Blood*, **75**, 1615 (1990).
  - 23) Peschel C., Paul W. E., Ohara J., Green I., *Blood*, **70**, 254 (1987).
  - 24) Hudak S., Hunte B., Culpepper J., Menon S., Hannum C., LuAnn T.-S., Rennick D., *Blood*, **85**, 2747 (1995).
  - 25) Chen Y.-R., Hsu M.-L., Ho C.-K., Wang S.-Y., *Exp. Hematol.*, **21**, 1219 (1993).
  - 26) Royet J., Mouchiroud G., Arnaud S., Oddos T., Galland S., Blanchet J.-P., *Blood*, **76**, 1965 (1990).
  - 27) Dahl C. A., Lindqvist C., *Blood*, **73**, 700 (1989).
  - 28) Jelkmann W., *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **104**, 139 (1986).
  - 29) Lusvarghi E., *J. Nephrol.*, **8**, 79 (1994).