

氏名(本籍)	伊藤 隆 司 (愛知県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第 332 号
学位授与の番号	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文の要件	牛インターロイキン 1 に関する研究—初期サイトカインとしての発現動態の解明—
論文審査委員	(主査) 教授 田 淵 清 (副査) 教授 小 西 信一郎 教授 藤 谷 英 男

論 文 内 容 の 要 旨

サイトカインとは細胞、主として免疫系細胞が産生、分泌する高分子ペプチドの総称であり、各種細胞間情報伝達物質として、生体において重要な機能を担っている。すなわち、生体への異物の侵入に際し、感染防御、免疫応答あるいは炎症反応等の場において非特異的防御因子として、または、液性免疫、細胞性免疫に働きかけるイニシエーターとして重要な役割を果たしている。その内のひとつ、インターロイキン 1 (IL-1) はヒト、マウス、ウサギ、ネコ、ブタ、ウシ等の動物種で報告されている。特にヒト IL-1 に関しては詳細な研究がなされている。それによると、IL-1 は主として単球・マクロファージ系の細胞から分泌される、約 17kDa の蛋白質であり、等電点の異なる IL-1 α (等電点約 5) と IL-1 β (等電点約 7) の 2 種類が存在する。IL-1 α と IL-1 β は共に同一の IL-1 レセプターに結合し、同一の作用を発揮するとされている。ヒトやマウスにおいては既に単クローン抗体を用いた ELISA による IL-1 α 及び β の測定キットが開発され、利用されている。さらに、IL-1 遺伝子発現及び発現調節機構についても調節遺伝子や核内転写因子等の詳細な研究が進んでいる。IL-1 は他のサイトカインと同様、多様な生物活性を持っている。最も重要な機能はヘルパー T 細胞からの IL-2 の産生を誘導し、この IL-2 を介して T 細胞の分化・増殖を促進する点にある。また、B 細胞の分化・増殖にも影響している。IL-1 は免疫系細胞に対して作用を示すばかりでなく、脳に対しては内因性発熱因子として作用したり、肝細胞に対しては炎症作用を発揮する急性期蛋白質の産生を促進し、更に、滑膜細胞に対してはコラゲナーゼやプロスタグランジン産生を誘導するなど、炎症反応にも関与している。

IL-1 に関しては 1988 年、Maliszewski らにより cDNA がクローニングされ、その塩基配列が決定された。また、大腸菌による蛋白の発現も報告されている。しかし、彼らの報告は IL-1 の物質としての分子生物学的研究にとどまり、生体防御反応に関わるサイトカインとしての動態、すなわち、産生細胞内での遺伝子発現から分泌およびそのカイネティクス等についてはふれられていない。また、IL-1 の生物活性はヒト、マウスにおいてもマウス胸腺細胞のマイトジェン存在下での増殖増強作用を指標として測定されているが、この方法では IL-1 α 及び β の区別が不可能であり、IL-1 α および β の総合的な活性を測定していることになる。したがって生物学的測定法では IL-1 活性が α によるものであるのか β によるものであるのか区別が不可能である。

本研究はこのような背景に基づいて、IL-1 の免疫学的イニシエーターとしての作用、特に、疾病におけ

る IL-1 産生の意義、さらに IL-1 産生の個体差と疾病に対する免疫応答誘導との関連性等を解明するための新技法の確立を目的として行われたものである。そのために RT-PCR 法を用いたウシ IL-1 遺伝子発現の微量検出法を確立し、また、その遺伝子産物、特に産生量の多いといわれている IL-1 β の測定法として単クローン抗体を用いた ELISA を確立し、これらの手法を用いて IL-1 遺伝子発現および産生性について検討を加えた。

以下に得られた主要成果を要約する。

1. 牛末梢血単核球、単球及び肺泡マクロファージの分離

健康牛の頸静脈からヘパリン加血液を採取し、フィコール・コンレイ比重遠心法（比重=1.081）により単核球を分離した。その結果、ヘパリン加血液10ml から約 1×10^7 個の単核球が得られ、さらに2時間の付着操作により約 $1-1.5 \times 10^4$ 個の単球が得られた。肺泡マクロファージは健康牛の気管支肺泡洗浄液より細胞を回収し、付着法により分離した。その結果、成牛1頭当たり約 $1-2 \times 10^4$ 個の肺泡マクロファージが分離された。これらの付着細胞はグルタルアルデヒド固定羊赤血球の貪食能陽性、非特異的エステラーゼ染色陽性、酸フォスファターゼ染色陽性によりマクロファージであることが確認された。

2. RT-PCR 法による牛 IL-1 α 及び IL-1 β mRNA の検出

牛末梢血単核球および肺泡マクロファージを $20 \mu\text{g/ml}$ の LPS により一定時間刺激し、両細胞から分離、精製した poly(A)⁺RNA をテンプレートとして RT-PCR 法による IL-1 α 及び IL-1 β mRNA の検出法を確立した。RT 反応条件は 42°C 、15分で行い、続いて 99°C 、5分で逆転写酵素を失活させた。そして PCR 反応条件は、1) 熱変性: 95°C 、1分（1回目の熱変性のみは3分）、2) プライマーアニーリング: 55°C 、1分、3) 伸長反応: 72°C 、1分で行い、原則として35サイクルで実施した。RT 反応時のプライマーとしては一般に1) ランダムヘキサマー、2) オリゴ d(T)_n、3) 特異的下流プライマーの3種類が使用可能であるが本実験においてもこの3種類のプライマーの何れを用いてもよい結果が得られた。すなわち、4%アガロースゲル電気泳動の結果、予想したサイズのバンドを検出した (IL-1 α : 424bp, および IL-1 β : 394bp)。これらの RT-PCR 生成物は制限酵素切断パターンにより同定した。

RT-PCR 法の検出感度を検討したところ、LPS で24時間刺激した末梢血単核球において、IL-1 α では最小 poly(A)⁺RNA、0.01ng、また、IL-1 β では最少0.1pg の濃度で検出可能であった。また、サンプル細胞数による検出感度としては、最少 1×10^6 の細胞から抽出した poly(A)⁺RNA で検出可能であった。さらに、PCR サイクル数による検出感度としては、50ng の poly(A)⁺RNA をテンプレートとした場合、サイクル数25以上で検出可能であった。また、ノーザンプロット法に比べ約 10^4 倍、RT-PCR 法の方が高感度であった。

RT-PCR 産物の応用について検討した結果、ノーザンプロット法、ドットプロット法および in situ hybridization 法におけるプローブとして極めて有用であった。

RT-PCR 法を用いて in vitro における IL-1 遺伝子発現動態を検討した結果、末梢血単核球では LPS 等の刺激のない、いわゆる resting の状態であってもきわめて低レベルではあるが、構成的（持続的）に IL-1 α および IL-1 β mRNA の存在が認められることが明らかとなった。さらに、LPS 刺激により短時

間（3時間以内）でIL-1 α および β mRNA 濃度の上昇が認められ、また、IL-1 α mRNA の発現が一過性を示すことが明らかとなった。また、LPS投与牛におけるIL-1mRNA 発現動態について検討した結果、in vivoにおいてもLPS投与後、極めて短時間でmRNA の出現を認め、いわゆる early phase のサイトカインとして炎症に深く関与することが示された。また、in vitro においても認められたIL-1 α mRNA 出現の一過性も認められた。さらに、IL-1 β mRNA 生成の個体差を検討した結果、その量は個体により差を認めた。

3. 牛IL-1 活性測定とIL-1 β に対する単クローン抗体

肺胞マクロファージの培養上清から液体等電電気泳動法により精製したIL-1 β を免疫原としてin vitro stimulation 法により単クローン抗体を作成した。この単クローン抗体を用いたELISAによりIL-1 β の測定を試み、マウス胸腺細胞を用いたバイオアッセイの結果と比較した。その結果、バイオアッセイと同程度の感度で培養上清中のIL-1 の測定が可能であった。マウス胸腺細胞を用いたバイオアッセイおよびELISAを用いて末梢血単核球の産生するIL-1 を測定した結果、刺激後3時間以降で活性が認められ、24、48時間後には高活性が認められた。

本研究は牛IL-1 の免疫学的イニシエーターとしての作用、特に、疾病におけるIL-1 産生の意義、さらにIL-1 産生の個体差と疾病に対する免疫応答誘導との関連性等を解明することを目的として行われたものである。そのために、RT-PCR法を用いた牛IL-1 α およびIL-1 β 遺伝子発現の高感度検出法及び、単クローン抗体を用いたELISAによるIL-1 β 測定法を確立した。RT-PCR法による牛IL-1 α およびIL-1 β mRNA 検出に関する報告はIL-2 およびIL-6につづくものであり、今後、さらに数多くのサイトカインに応用され、サイトカインネットワークの詳細の解明に役立つであろう。また、単クローン抗体を用いたELISAによるIL-1 β 測定法も牛IL-1 β の簡易測定法として有用である。

近年、牛のIL-1、IL-2、IFN、TNF α 、CSFなどの遺伝子やcDNAが単離され組換え体サイトカインを用いた免疫機構の解明に関する研究が可能となってきた。牛におけるサイトカインの臨床応用は、感染症の予防、治療効果を目的としたものである。特に感染症による廃用率が高い子牛に対し、未熟な生体防御機能の増強を目的としたサイトカインの利用が考えられる。また、周産期やストレス負荷時などに低下した免疫機能を回復させるための利用も考えられる。さらに、組換え体ワクチンの免疫効果の増強を目的としたサイトカインのアジュバント効果が提示されている。しかし、感染症の予防、治療薬としての有効利用をはかるためには個々のサイトカインの詳細な作用に加えて、サイトカインネットワークの詳細の解明が必要であろう。多くの組換え体サイトカインの作出、サイトカイン遺伝子発現の検出法あるいはサイトカイン活性測定法の確立により家畜の免疫機構解明はめざましく発展するであろう。

論文審査の結果の要旨

インターロイキン1 (IL-1) は抗原提示細胞・マクロファージ系の細胞から分泌される約17kDaの蛋白質であって体液性・細胞性免疫におけるイニシエーターとして重要な役割を果たしている。IL-1には等電点の異なる2種類 (IL-1 α \approx 約5 とIL-1 β \approx 約7) が区別されるが、ともにT細胞のIL-1レセプターに結合して同一の機能を発揮するとされ、他のサイトカインと同様に多様な生物活性を保有する。最も重要な作

用はヘルパーT細胞に作用してIL-2産生を誘導し細胞障害性T細胞の増殖・分化を促進させたり、IL-4,5,6を介してB細胞の活性化・増殖・分化を促進させることにある。この他、脳に対しては内因性発熱因子として作用し、肝細胞には急性期蛋白質の産生、滑膜細胞にはコラゲナーゼ・プロスタグランジン産生を誘導する。

牛IL-1については、すでにMaliszewskiら(1988)によりcDNAのクローニング・塩基配列の決定がなされているが、IL-1産生細胞内での遺伝子発現から分泌及びその動態に関しては不明である。

本研究は初期イニシエーターとしてのIL-1の遺伝子発現とその動態を解明するための新技法の確立を目的として行われた。すなわち、牛IL-1 α およびIL-1 β mRNA検出法としてのRT-PCR法(逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)並びにIL-1 β 測定法としての単クローン抗体を用いたELISA(酵素結合抗体免疫吸着アッセイ)を確立し、これらの新技法を用いてIL-1遺伝子発現及びその産生性について検討した。

本研究の概要は次のとおりである。

1. 牛末梢血単核球、単球及び肺泡マクロファージの分離

健康牛の単核球はフィコール・コンレイ比重遠心法(比重=1.081)によりヘパリン加血液10mlから約 1×10^7 個を分離し、さらに2時間の付着操作により約 $1 \sim 1.5 \times 10^6$ 個の単球を得た。肺泡マクロファージは健康成牛の肺泡洗浄液から付着法により牛1匹当たり約 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個を得た。これらの付着細胞はグルタルアルデヒド固定羊赤血球貪食能・非特異的エステラーゼ染色・酸フォスファターゼ染色陽性であることからマクロファージであると確認した。

2. RT-PCR法による牛IL-1 α 及びIL-1 β mRNAの検出

牛単核球および肺泡マクロファージをlipopolysaccharide(LPS: $20 \mu\text{g/ml}$)で一定時間刺激して分離・精製したpoly(A)⁺RNAをテンプレートとするRT-PCR法の確立を検討した。RT反応条件は $42^\circ\text{C} \cdot 15$ 分とし、 $99^\circ\text{C} \cdot 5$ 分で逆転写酵素を失活させた。PCR反応条件は熱変性($95^\circ\text{C} \cdot 1$ 分)、プライマーアニーリング($55^\circ\text{C} \cdot 1$ 分)・伸長反応($72^\circ\text{C} \cdot 1$ 分)とし、原則として35サイクルで実施した。RT反応時のプライマーとしては3種(ランダムヘキサマー・オリゴd(T)₁₈・アンチセンスプライマー)ともに使用可能であった。RT-PCR産物は制限酵素切断パターンにより同定した結果、IL-1 α が424bp、IL-1 β が394bpに相当するものであった。

RT-PCR法の検出感度はLPSで24時間刺激した末梢血単核球において、IL-1 α の最少poly(A)⁺RNAで10pg、IL-1 β では最少0.1pgであった。サンプル細胞数では最少 1×10^6 個の細胞から抽出したpoly(A)⁺RNAが検出可能であった。PCRサイクル数では50ngのpoly(A)⁺RNAをテンプレートとした場合、25サイクル以上で検出可能であった。また、本法はノーザンブロット法に比較して約 10^6 倍高感度であった。

RT-PCR産物の応用について検討した結果、ノーザンブロット法、ドットブロット法、および*in situ* hybridization法におけるプローブとして極めて有用であった。

RT-PCR法を用いた*in vitro* IL-1遺伝子発現動態を検討した結果、末梢血単核球ではLPS等の刺激のないresting phaseにおいても極低レベルながら持続的なIL-1 α およびIL-1 β mRNAの存在を確認した。

また、LPS 刺激により短時間（3 時間以内）で IL-1 α および IL-1 β mRNA 濃度の上昇を認め、IL-1 α mRNA の出現が一過性であることが明らかとなった。

LPS (20 μ g/kg) 投与牛における IL-1 mRNA 生成動態について検討した結果、*in vivo* においても LPS 投与後極めて短時間で IL-1 mRNA の出現を認め、*in vitro* で検出した IL-1 α mRNA 出現の一過性が確認された。

IL-1 β mRNA 量の個体差を検討した結果、その生成量は個体により区々であった。

3. 牛 IL-1 活性測定と IL-1 β に対する単クローン抗体

肺胞マクロファージの培養上清から液体等電点電気泳動法により精製した IL-1 β を免疫原として *in vitro* stimulation 法にて単クローン抗体を作成し、この単クローン抗体を用いた ELISA により IL-1 β の測定を試み、マウス胸腺細胞を用いたバイオアッセイの成績と比較した。この ELISA はバイオアッセイと同程度の感度で培養上清中の IL-1 を測定可能であった。

両法にて牛単核球の産生する IL-1 を測定した結果、その活性は LPS 刺激後 3 時間以降で認められ、24~48 時間後に高い活性を示した。

著者は本研究によって、RT-PCR 法を用いた牛 IL-1 α および IL-1 β 遺伝子発現の高感度検出法並びに単クローン抗体を用いた ELISA による IL-1 β 測定法を確立し、この新技法を用いて牛 IL-1 遺伝子発現およびその産生性の実態を初めて明らかにした。本研究は獣医免疫学並びに分子生物学上に寄与するところ大であり、博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしい業績として評価する。