

学位申請論文

# 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—

[要 旨]

伊 藤 隆 司

1994

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17 kDaの蛋白質であり、等電点の異なるIL-1 $\alpha$  (等電点約5) とIL-1 $\beta$  (等電点約7) の2種類が存在する。IL-1 $\alpha$ とIL-1 $\beta$ 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 $\alpha$ 及び $\beta$ 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。

ウシ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 $\alpha$ 及び $\beta$ の区別が不可能であり、IL-1 $\alpha$ および $\beta$ 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 $\alpha$ によるものであるのか $\beta$ によるものであるのかの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 $\beta$ 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、単球及び肺胞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 $1 \times 10^7$ 個の単核球が得られ、さらに2時間の付着操作により約 $1-1.5 \times 10^6$ 個の単球が得られた。肺胞マクロファージは健康牛の気管支肺胞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 $1-2 \times 10^6$ 個の肺胞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 $\alpha$ 及びIL-1 $\beta$ mRNAの検出

牛末梢血単核球および肺胞マクロファージを20 $\mu$ 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)<sup>+</sup>RNAをテンプレートとしてRT-PCR法によるIL-1 $\alpha$ 及びIL-1 $\beta$ mRNAの検出法を確立した。RT反応条件は42 $^{\circ}$ C、15分で行い、続いて99 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C、1分、3) 伸長反応：72 $^{\circ}$ 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)<sub>16</sub>、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 $\alpha$ :424bp、およびIL-1 $\beta$ :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 $\alpha$ では最少 poly(A)<sup>+</sup>RNA、0.01ng、また、IL-1 $\beta$ 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 $\times$ 10<sup>6</sup>の細胞から抽出した poly(A)<sup>+</sup>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)<sup>+</sup>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、ノーザンブロット法に比べ約10<sup>6</sup>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 $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ 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 $\alpha$ および $\beta$ mRNA濃度の上昇が認められ、また、IL-1 $\alpha$ 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 $\alpha$ mRNA出現の一過性も認められた。さらに、IL-1 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ 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 $\beta$ 測定法を確立した。RT-PCR法による牛IL-1 $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ 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 $\beta$ 測定法も牛IL-1 $\beta$

の簡易測定法として有用である。

近年、牛のIL-1、IL-2、IFN、TNF $\alpha$ 、CSFなどの遺伝子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。