

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科 獣医学専攻

平成 10 年度博士課程進学

氏名 Athipoo Nuntaprasert

指導教官 甲斐 知恵子

論文題目 Studies on swine interleukin-4 and swine interleukin-6

ブタインターロイキン-4と6に関する研究

IL-4 と IL-6 は免疫反応の重要な調節因子であり、ブタにおいても重要と考えられる。本研究の目的は、ブタ IL-4/IL-6 の蛋白を発現し、それらの解析法を確立し、実際に生体に用いた際の効果を検索することによってそれらのブタでの免疫調節機能の基礎的研究への道を開くことである。本研究では組換えブタ IL-4/IL-6 の発現系の確立、抗ブタ IL-4/IL-6 抗体の作製とその性状解析、サンドイッチ ELISA ならびに ELISPOT システム確立と試験管内でのブタ由来細胞に対する両組換えサイトカインの生物活性の研究への応用を行った。さらに生体内で、正常状態、あるいは LPS、細菌感染といったブタの免疫システム刺激因子の前処理における組換えブタ IL-4/IL-6 の効果について解析を行った。

第一章：組換えブタ IL-4 の発現ならびに精製とサンドイッチ ELISA、ELISPOT システムの確立

ブタ IL-4 レベル測定のためのサンドイッチ ELISA、ELISPOT システムを確立するためにブタ IL-4 cDNA をクローニングし、大腸菌、バキュロウイルス、ほ乳類細胞発現系を用いてそれぞれの組換え蛋白を発現させた。これは大腸菌、昆虫細胞または COS-7 細胞の 3 種類の発現系により発現させたブタ IL-4(rSwIL-4)の分子量を比較した最初の報告であり、分子量は大腸菌発現で 16kDa、昆虫細胞発現で 15、18kDa、ほ乳類細胞で 15、20kDa であった。ツニカマイシン処理の結果、ブタ IL-4 は 18kDa の分子では少なくとも 1 ヶ所に糖鎖が付加されており、15kDa の分子は糖鎖修飾がされていないことが判明した。従って昆虫細胞とほ乳動物細胞にお

ける分子量の違いは発現細胞による糖鎖付加の相違によるものと考えられた。また、バキュロウイルス発現 rSwIL-4 が試験管内、細胞内の研究において有用性が高いことも示した。さらに、ブタ IL-4 に対する 2 種類のポリクローナル抗体と 4 種類のモノクローナル抗体(mAb)を作製し、ブタ IL-4 の検出と精製に利用した。抗ブタ IL-4 mAb を用いた免疫アフィニティクロマトグラフィにより、組換えバキュロウイルス感染 Tn5 細胞培養上清から、生物活性のある rSwIL-4 を容易に得ることができた。この発現蛋白は、ブタの宿主防御機構や感染症発症におけるブタ IL-4 の役割の研究に有用と考えられる。さらに、ここで作製した抗ブタ IL-4 抗体はサンドイッチ ELISA や ELISPOT システムへ応用でき、ブタの免疫反応や感染症におけるブタ IL-4 機能解析に非常に有用な手段を与えたと考える。著者は実際にこの解析系を用いて、実験的に *M. hyopneumoniae* を感染させたブタの BALF(肺胞還流液)サンプルでブタ IL-4 レベルを測定し、細菌感染群でサイトカインレベルが高い傾向であることを示した。また、この成果がバキュロウイルスが生物活性をもつサイトカインの発現に非常に有用なベクターであり、発現させた rSwIL-4 が感染症の臨床研究に応用可能であることが示された。

第二章：ブタ免疫細胞およびブタでの LPS 誘導による炎症後サイトカイン産生への組換えブタ IL-4 の影響

試験管内における PBMC や単球、マクロファージなど、ブタ免疫細胞への rSwIL-4 の影響と、ブタの生体内での効果について解析を行なった。第一章で示したように rSwIL-4 はヒト由来細胞に対し生物活性を持つ。マイトジェン刺激したブタ PBMC を用いた解析で rSwIL-4 は CD4 陽性 T 細胞を誘導し、さらに、バキュロウイルス発現 rSwIL-4 とブタ GM-CSF を組み合わせて単球から樹状細胞(Mo-DC)を分化させることに成功した。この rSwIL-4 での処理により未熟 Mo-DC からの IL-6 産生が抑制された。以上のように、rSwIL-4 を用いてブタ Mo-DC を分離増殖させることができ、将来的に感染症やワクチンの研究への有用性を示した。また、LPS 刺激後の肺胞マクロファージからの炎症性サイトカイン産生に対する影響を *in vitro* で検討した結果、rSwIL-4 を LPS と同時に添加することにより培養ブタ肺胞マクロファージからの TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-18 の分泌が抑制された。一方、LPS 刺激 1 時間前の rSwIL-4 処理では TNF- α と IL-18 の分泌は増加しなかった。さらに、育成豚に LPS (*E.coli* O55B5; 100 μ g/ml)処理 1 時間前にバキュロウイルス発現 rSwIL-4 (20 μ g/ml)を投与すると、炎症性サイトカイン、とくに TNF- α と IL-18 が増加し、エンドトキシンショック時の呼吸不全感受性が高くなった。以上より、炎症性サイトカイン産生へのブタ IL-4 の影響は投与のタイミングによると考えられた。試験管内、生体内のどの例においても、バキュロウイルス発現 rSwIL-4 は生物活性を示した。

第三章：組換え IL-6 発現と精製によるサンドイッチ ELISA 法の確立

ブタの IL-6 レベルの測定法としてのサンドイッチ ELISA 法確立のために、大腸菌、バキュロウイルス、ほ乳類細胞による組換えブタ IL-6(rSwIL-6)発現を行った。大腸菌発現 rSwIL-6 は分子量 26kDa であり、昆虫細胞培養上清中(バキュロウイルス発現) rSwIL-6 は 25、26、30kDa、COS-7 細胞培養上清中(ほ乳類細胞発現) rSwIL-6 は 26、30kDa であった。昆虫細胞と COS-7 細胞培養上清中の rSwIL-6 は異なった糖鎖修飾を受けたと考えられた。マウス由来 IL-6 感受性細胞に対する大腸菌発現 rSwIL-6 の活性は昆虫細胞培養上清中 rSwIL-6 の 10 分の 1 であり、糖鎖付加がブタ IL-6 の活性に影響すると考えられた。また、his-tag アフィニティカラムを用いた大腸菌発現 rSwIL-6 精製法と、Q セファロースあるいは mAb アフィニティカラムを用いた昆虫細胞培養上清中の rSwIL-6 精製法を確立した。精製 rSwIL-6 を用いてポリクロナール抗体も作製した。さらにこれら抗体を用いて rSwIL-6 を測定するためにサンドイッチ ELISA 法を確立した。この ELISA 法を用いて、マイトジェンや *A. pleuropneumoniae*、*M. hyopneumoniae* を実験的に感染させたブタの血漿あるいは BALF サンプルで刺激した単球の培養上清中の可溶性ブタ IL-6 を測定したところ、細菌感染させたブタのサンプル中には IL-6 が産生されていることが示された。この研究により、バキュロウイルス発現系は生物活性を持ったサイトカインの発現に有用であることが示され、また今回得られた生物活性をもつ rSwIL-6 は感染症の臨床研究に応用できると考えられる。

第四章：ブタにおける急性期蛋白産生と *Streptococcus suis* 抵抗性に対する組換えブタ IL-6 の影響

ブタの肝臓由来急性期蛋白反応に対する組換え rSwIL-6 の役割を解析する目的で、ブタ初代培養肝細胞、および成長期豚への効果を解析した。さらに、*Streptococcus suis* (*S. suis*) serotype 2 攻撃に対するブタの抵抗性に対する影響も検討した。rSwIL-6 は初代培養したブタ肝細胞での急性期蛋白 (C-reactive protein、haptoglobin) の合成を促し、容量依存的にアルブミン分泌を抑制した。さらに、バキュロウイルス発現 rSwIL-6 を成豚に 10 μ g/kg/day で 3 日間皮下投与したところ、試験管内で観察されたような急性期蛋白の産生が血漿中に検出され、皮下投与がこれからの臨床実験で有用であることがわかった。また、成長期豚に *S. suis* serotype 2 (NIAH-11433, 9x10⁹ CFU)攻撃を行なった。3 日間 10 μ g/kg/day バキュロウイルス発現 rSwIL-6 を前投与したところ、血漿中ハプトグロビンと C-reactive protein レベルが上昇し持続した。これらのブタは対照群と比較して高い抗 *S. suis* 抗体(IgM)反応と、低い TNF- α 、IL-18 の産生、球菌に対する抵抗性を示した。この研究により、バキュロウイルス発現 rSwIL-6 は試験管内、生体内両方で活性があり、*S. suis* serotype 2 などのブタの細菌感染に対して、rSwIL-6 を投与するこ

とで免疫機能と抵抗性を増加させる可能性が示された。この rSwIL-6 は副作用のない強力な免疫調整機能を示し、有用と考えられる。

本研究で得られた rSwIL-4/ IL-6 とその生物活性とブタへの応用についての情報は、ブタの免疫学的基礎研究やブタの感染症に対する免疫療法・ワクチンの開発に貢献すると考えられる。また、ブタの疾病発症における IL-4/ IL-6 の果たす役割は未だ詳細な研究がなく、本研究で確立した発現サイトカインや測定技術は、このような研究に解析手段を与えるものと考えられる。