

論文の内容の要旨

論文題目 Studies on Stem Cell Factor and its Receptor, *c-kit*, in the Bovine Hematopoietic System
(ウシ造血系における幹細胞成長因子 SCF とその受容体 *c-kit* に関する研究)

氏名 彦野 弘一

細菌感染症は、幼若ウシにおいて下痢や肺炎などを引き起こし、その治療コスト、生産性の減少、高い罹患率と死亡率などにより、畜産業に多大の経済的損失をもたらしている。さらに、細菌感染症を防ぐために用いられる抗生物質は、その不適当な使用が耐性菌を発生させることから、公衆衛生上大きな問題となっている。そのため、細菌感染症に対処するための新たな免疫制御物質が望まれている。

病原細菌の感染に対して、顆粒球は骨髄中の造血前駆体細胞から誘導される。しかし、幼若動物にしばしば見られる顆粒球造血不全は、幼若ウシの細菌感染の高い罹患率に関与していると予想される。よって、顆粒球造血を促進するような免疫制御物質は、幼若ウシにおける細菌感染の予防と治療に利用できる新しい生理活性物質候補であると考えられている。

これまでに、顆粒球特異的な造血因子である顆粒球コロニー形成因子 (G-CSF) を用いて幼若動物の顆粒球造血を促進し、細菌感染症の発生を抑える試みが検討されてきた。しかし、マウスの結果から、G-CSF は比較的后期の分化段階にある顆粒球系細胞の造血因子であり、*in vivo* における顆粒球造血を誘導する能力は限られたものであることが示唆された。よって、比較的早期の分化段階の顆粒球系細胞の造血因子を、G-CSF とともに使用することにより、より多くの成熟顆粒球生産を誘導することが期待された。

Stem Cell Factor (SCF) は多機能のサイトカインで、標的細胞に存在する細胞膜貫通型チロシンキナーゼ受容体 *c-kit* に結合し活性化することで生物活性を発揮する。マウスの結果から、SCF は、比較的早期の分化段階の顆粒球系造血前駆体細胞に働き、G-CSF と協働的に働いて、得ら

れる成熟顆粒球の数を大幅に増大させることが示された。そのため、ウシにおいても、SCF を G-CSF とともに用いることで、ウシにおける顆粒球造血を誘導し、細菌感染症の発生を抑制できる可能性が考えられる。しかし、ウシにおける SCF の機能は、これまで十分に検討されていない。

一方、SCF とその他の CSF は実験的あるいは臨床的目的で造血前駆体細胞の培養に用いられている。同時に、造血前駆体細胞の培養系では、細胞の増殖を支持するためにウシ胎児血清 (FCS) が広く使用されている。マウスの結果から、SCF が FCS 中に存在し、内在性因子として造血前駆体細胞の増殖を誘導するため、FCS を添加した培養系において用いられる様々な造血サイトカインの生物活性の解釈に影響を与えることが示唆されている。しかし、FCS 中の天然型 SCF の存在と濃度は、これまで検討されていなかった。

本研究においては、ウシの造血系における SCF と *c-kit* の発現と機能および FCS 中の天然型ウシ SCF についての基本的知見を得る目的で実験を行い、以下の結果を得た。

1. ウシ SCF およびその受容体である *c-kit* の cDNA のクローニングと両分子に対するモノクローナル抗体の作製

RT-PCR を用いて、ウシ SCF の2種類のアイソフォームをコードする cDNA を得た。予想されるアミノ酸配列は、長いアイソフォームと短いアイソフォームがそれぞれ274個と246個のアミノ酸残基からなり、他の動物種の SCF の cDNA と高い相同性を示した。バキュロウイルスベクターを用いて、組換えウシ SCF タンパク質を生産し、これをマウスに免疫し、モノクローナル抗体 bS-8 を得た。ウェスタンブロット解析を用いて、bS-8 の反応性を確認した。

ウシ大脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、ウシ *c-kit* をコードする cDNA を得た。予想されるアミノ酸配列は、他の動物種の *c-kit* の cDNA と高い相同性を示した。バキュロウイルスベクターを用いて、ウシ *c-kit* タンパク質の細胞外領域を生産し、これをマウスに免疫することにより、6クローンのモノクローナル抗体を得た。免疫沈降とフローサイトメトリー解析を用いて、ウシ *c-kit* タンパク質に対するモノクローナル抗体の反応性を検討した。6クローンのモノクローナル抗体のうち、4クローンがウシ SCF に対して中和活性を示した。

得られたウシ SCF および *c-kit* に対するモノクローナル抗体は、以下の研究において、ウシ造血系におけるこれら分子の発現と機能を検討するため使用された。さらに、FCS 中のウシ SCF の検出と定量に応用された。

2. ウシ骨髄における SCF と *c-kit* 受容体の機能と発現

フローサイトメトリー解析により幼若ウシ骨髄における *c-kit* の発現と分布を調べ、SCF の標的細胞を同定した。さらに、コロニー形成試験を用いて、*c-kit* 陽性骨髄細胞における SCF と G-CSF の機能を検討した。フローサイトメトリー解析の結果、*c-kit* 受容体が全骨髄細胞のおよそ18%に発現していることが示された。ほとんどの *c-kit* 陽性骨髄細胞は細胞系列分化マーカーを発現していなかったが、一部は CD3 を共発現していた。ギムザ染色の結果、*c-kit* 陽性 CD3 陰性骨髄細胞は不均一な細胞集団で芽球様細胞からなり、骨髄芽球、前骨髄球、前赤芽球、塩基性赤芽球からなる

ことが明らかにされた。対照的に、*c-kit* 陽性 CD3 陽性骨髄細胞は均一な細胞集団で、リンパ球様の細胞からなることが示された。*c-kit* 陽性骨髄細胞は、SCF または G-CSF 存在下でコロニーを形成したが、一方、*c-kit* 陰性骨髄細胞は、同条件下ではコロニーを形成しなかった。G-CSF とともに SCF を培養系に添加することにより、コロニーの数とサイズは相乗的に増加した。これらの結果は、*c-kit* が主としてウシ骨髄中の未成熟な造血細胞に発現し、*c-kit* 陽性骨髄細胞は SCF または G-CSF に反応する造血前駆体細胞を含むことを示している。さらに、*c-kit* 陽性骨髄細胞の増殖において、SCF は G-CSF と協働的に働くことを示している。以上の結果は、今後、SCF を用いて幼若ウシにおける不完全または不適當な顆粒球造血を改善する研究をすすめるのに有用と考えられた。

3. ウシ末梢血における SCF と *c-kit* 受容体の機能と発現

フローサイトメトリー解析によりウシ末梢血における *c-kit* の発現と分布を調べ、SCF の標的細胞を同定した。さらに、コロニー形成試験等を用いて、*c-kit* 陽性末梢血細胞における SCF との機能を検討した。フローサイトメトリー解析の結果、この受容体が全末梢血白血球のおよそ 1.5% に発現していることが示された。ギムザ染色の結果、*c-kit* 陽性末梢血細胞は大リンパ球様の形態を持つことが示された。*c-kit* 陽性末梢血細胞の一部は、CD3、sIgM、CD11b を共発現していたが、CD14、G1 は発現していなかった。*c-kit* 陽性末梢血細胞は、SCF 存在下で [³H]チミジンを取り込まず、コロニーも形成しなかった。以上の結果は、ウシの末梢血において *c-kit* 受容体はリンパ球の一部に発現するが、リガンドである SCF は直接的にはその増殖に関与しないことを示している。

4. FCS に含まれる天然型 SCF の検出と定量

免疫クロマトグラフィにより、FCS から天然型可溶性ウシ SCF を精製した。ウェスタンブロット解析の結果、精製された天然型 SCF は 33kDa の分子量を持つことが示された。ELISA の結果、市販の FCS に含まれる天然型可溶性 SCF のレベルは、100pg/ml 以下であることが示された。一方、ウシ骨髄細胞を用いた [³H]チミジン取り込み試験とコロニー形成試験により組換えウシ SCF タンパク質の有効濃度を検討したところ、ng/ml 以上の濃度で生物活性を発揮することが示された。以上の結果から、市販の FCS に含まれる天然型可溶性 SCF のレベルは、FCS 添加の培養系において造血前駆体細胞の増殖に生物効果を示す濃度には達していないと考えられた。今後さらに他のサイトカインとの協働試験が必要である。

以上、本研究において、ウシの造血系における SCF と *c-kit* の発現と機能について基本的な知見を得た。これらの知見は、ウシの健康あるいは疾病における両分子の生物学的役割を理解し、今後の組換えウシ SCF の臨床応用にむけた研究において有用であると考えられる。さらに、本研究において、FCS 中の天然型ウシ SCF についての知見を得た。この知見は、FCS を添加した培養系で検討された造血サイトカインの生物活性の正確な評価のため有用であると考えられる。