

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 彦野 弘一

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。Stem Cell Factor (SCF) は、マウスの結果から、SCF は、顆粒球コロニー形成因子 (G-CSF) と協働的に作用し、顆粒球造血を誘導することが知られている。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、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かった。

一方、造血前駆体細胞の培養系では、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、FCS を添加した培養系において用いられる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 の存在とその濃度は、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 とその受容体 *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

ウシ SCF および *c-kit* cDNA をクローニングし、cDNA を含む組換えバキュロウイルスを用いて組換え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を得た。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の検討、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芽球様細胞からなり、対照的に、*c-kit* 陽性 CD3 陰性骨髄細胞は均一なリンパ球様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。

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の結果、*c-kit* 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、sIbM、CD11b を共発現していたが、CD14、

G1は発現していなかった。SCF存在下における*c-kit*陽性末梢血細胞の増殖は認められなかった。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、検出した。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、組換えウシSCFタンパク質は、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、FCS中の天然型ウシSCFについての知見は、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。よって、審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の内容を有するという意見で一致した。