

論文の内容の要旨

論文題目

ウシの **macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)** に関する研究
— 遺伝子のクローニングと組換え **M-CSF** の生産、**ELISA** に
よる血清中 **M-CSF** 濃度測定及び多核巨細胞形成への関与—

氏 名

吉原一浩

Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)は、単球・マクロファージ系の細胞の増殖、分化及び活性化に必須なサイトカインであり、マクロファージの抗真菌、抗細菌活性、サイトカイン産生、抗腫瘍活性等の作用を促進させる。さらに、**M-CSF** は、破骨細胞や絨毛細胞の増殖と分化、脂質代謝刺激活性等多様な生理活性を持つ。マクロファージは、炎症刺激によって動員される単球由来マクロファージ（滲出マクロファージ）と正常組織に定住する組織在住マクロファージに大別されるが、**M-CSF** は、どちらのマクロファージに対しても、その分化、成熟及び活性化に重要な働きを担っている。このように **M-CSF** は、単球・マクロファージ系の細胞に必須のサイトカインである。

本研究では、始めにウシの **M-CSF** 遺伝子のクローニングを実施し、バキュロウイルス組換え蛋白質発現系を用いてウシの組換え **M-CSF** を生産した。次に、**M-CSF** を測定する **ELISA** を開発し、ウシの血清及び初乳中の **M-CSF** 濃度を測定した。さらに、多核巨細胞の形成における **M-CSF** の関与について調べた。

ヒトとマウスの **M-CSF** 遺伝子のクローニングの研究から、**M-CSF** は、一つの遺伝子から選択的スプライシングによって分子量の異なる3種類の成熟型 **M-CSF** が生産されることが明らかになっている。ウシの **M-CSF** の遺伝子クローニングの結果 α と β タイプの **cDNA** がクローニングされた。ウシ **M-CSF** の **cDNA** 塩基配列から推定されるアミノ酸配列のヒトとマウスとの相同性は、 α タイプでヒトと 83.3%、マウスとは 75.9%、 β タイプでは、

ヒトと 75.3%、マウスでは 65.9%であった。また、バキュロウイルス組換え蛋白質発現系により、生物活性のある分子量 34kD の組換え M-CSF がホモダイマーで産生された。

次に、ウシ M-CSF を測定する ELISA を開発し、ウシ及びウシ胎仔の血清と初乳中に含まれる M-CSF の濃度を測定した。その結果、胎仔 6 頭の平均は、 $8.8 \pm 1.4 \text{ ng/ml}$ であった。また、生後 100 日齢以下のウシでは $2.7 \pm 1.5 \text{ ng/ml}$ 、101 日齢以上では $1.8 \pm 0.8 \text{ ng/ml}$ であり、加齢に伴い血清中の M-CSF 濃度は減少した。また、同一の個体から経時的に採血し M-CSF 濃度を測定したところ、生後 1 日では、 $2.7 \pm 2.2 \text{ ng/ml}$ で、3 ヶ月後の平均は、 $1.4 \pm 0.39 \text{ ng/ml}$ であり、加齢に伴い低下した。さらに、生後 1 日では、個体差が大きく、加齢に伴い個体差は縮小した。初乳中の M-CSF 濃度は、出産後の最初の初乳で最も高く、搾乳の回数が増えるに従い減少した。

さらに、ウシの単球及び単球より誘導したマクロファージから、ウシの末梢単核細胞を ConA で刺激後回収した培養上清液 (CM) と M-CSF あるいは GM-CSF を用いて多核巨細胞の形成を試みた。単球からの多核巨細胞の形成は、GM-CSF と CM の共培養で $22.2 \pm 3.3\%$ と最も高く、M-CSF と CM では $13.3 \pm 4.9\%$ であった。また、GM-CSF 単独では $4.5 \pm 2.5\%$ の形成率を認めたが、M-CSF 単独では 0.1% 以下であった。マクロファージからの多核巨細胞の形成は、GM-CSF と CM の共培養で 10% 程度の形成率を認めたが、M-CSF を用いた場合、CM との共培養においても多核巨細胞は形成されなかった。以上の結果から、組織中に出現する多核巨細胞は、組織中に滲出してきた単球が、GM-CSF あるいは M-CSF と CM に含まれる因子との共同作業で形成が促進されるものと考えられた。