

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 ・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。

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の濃度を測定する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。

第1章では、先ず遺伝子クローニングを行った。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、成熟型M-CSFは、第214番と215番で切断され血中に放出されることが明らかにされているので、シグナルペプチドから第214番までのアミノ酸残基までをコードする発現用cDNAをウシM-CSF β cDNAをテンプレートにしたPCRでクローニングし、バキュロウイルス組換え蛋白質発現系を用いて組換えウシM-CSFを生産した。組換えウシM-CSFのSDS-PAGEによる解析によりホモダイマーで培養上清中に産生されることが明らかになった。また、N末端のアミノ酸の解読により、産生された組換えウシM-CSFのシグナルペプチドは除かれており、ヒトやマウスのM-CSFのN末端のアミノ酸残基は一致した。得られた組換えウシM-CSFの生物活性をマウスの骨髄細胞を用いたコロニーアッセイ法で調べたところ、単球様細胞から成るコロニーの形成が認められた。また、コロニーの一部は、プレート底に細胞質を伸ばしたマクロファージ様の細胞に分化していた。以上の結果から、生物活性のあるウシの組換えM-CSFの産生が確認された。

第2章では、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、個体間の差が大きく、加齢に伴い個体間の差は縮小した。また、初乳中に含まれる M-CSF は、出産直後の初乳中に $15.3 \pm 6.3 \text{ ng/ml}$ ともっとも高濃度に含まれており、搾乳の回数が増すに従い減少し、4 日後では、 $3.5 \pm 1.7 \text{ ng/ml}$ であった。

第 3 章では、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 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (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、M-CSF は、CM 中に含まれる因子と共に組織中に滲出した単球を多核巨細胞に誘導する生物活性を持つが、マクロファージに対しては、多核巨細胞の形成機構には作用しないことが明らかになった。

以上の内容は、ウシの M-CSF について新たな知見を示すものである。したがって、審査委員一同は、本論文は博士 (獣医学) の資格を十分に有するとの合意に達した。