

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 -

吉原一浩

Study on bovine macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)
- Cloning of bovine M-CSF gene and expression of recombinant bovine
M-CSF, quantitation of bovine M-CSF in serum by ELISA and the
relation of the formation of multinucleated giant cells -

Kazuhiro YOSHIHARA

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 ウシのM-CSFの遺伝子のクローニングと組換えM-CSFの生産

ヒトとマウスのM-CSF遺伝子の遺伝子解析から、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た。本研究がスタートした時点では、ウシのM-CSFの塩基配列は明らかになっていなかったため、最初にヒトとマウスのM-CSFのアミノ酸配列の相同部位からPCR用の混合プライマーを作製し、ウシの単核細胞をphorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) で9時間刺激した後、mRNAを抽出してRT-PCRを実施し、ウシのM-CSF遺伝子の一部を増幅し、部分的なウシのM-CSFcDNAをクローニングした。次に、同様な条件で抽出したmRNAを用いてcDNAライブラリーを作製し、部分的なウシM-CSFcDNAをプローブにしてウシのM-CSF遺伝子のクローニングを試みた。その結果、cDNAの5'端側の約300塩基を欠く不完全長な α タイプのM-CSFcDNAがクローニングされた。欠落している5'端の塩基配列は、rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法により明らかにされた。次に、RACE法で得られた5'端の塩基配列の情報からセンスプライマー、cDNAライブラリーからのクローニングで得られたクローンの3'端の塩基配列の情報からアンチセンスプライマーを設計し、RT-PCRを実施した。その結果、ウシM-CSFの α と β の2つのタイプの完全長の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、M-CSFは、まず細胞膜上に発現し、次に第214番と215番アミノ酸残基の間で切断され血中に成熟型M-CSFとして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 β を生産した。組換えウシM-CSF β 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 β 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。ヒトのM-CSFは、マウスの細胞にも活性を示すことから、得られた組換えウシM-CSF β 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 β の産生が確認された。

第2章 ウシM-CSFのELISAの開発と血清中M-CSF濃度の測定

組換えウシM-CSFを抗原にして、モノクローナル抗体及びウサギを用いてポリクローナル抗体を作製し、これらを用いた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頭の血清中のM-CSF濃度の平均は、 8.8 ± 1.4 ng/mlであった。また、生後100日齢以下のウシでは 2.7 ± 1.5 ng/ml、101日齢以上では 1.8 ± 0.8 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 ± 2.2 ng/mlで、3ヵ月後の平均は、 1.4 ± 0.39 ng/mlであり、加齢に伴い低下した。また、初乳中に含まれるM-CSFは、出産直後の初乳中に 15.3 ± 6.3 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、乳中のM-CSF濃度は、 3.5 ± 1.7 ng/mlであった。

ウシのM-CSF血清濃度は、加齢に伴い徐々に低下していくことが明らかになったが、幼若なウシでは、個体間で大きな濃度差が認められた。遺伝子の一部欠損からM-CSFを作ることのできないマウスでは、さまざまな組織

中でマクロファージの数の減少や未成熟であることが知られている。このことから、M-CSFの血清濃度が低い幼若なウシにおいて、マクロファージの発達の程度、さらには疾病等の関連性について明らかにする必要があると考えられる。

第3章 ウシの単球及びマクロファージからの多核巨細胞の形成

多核巨細胞は、内在性、外来性の種々の刺激に対する生体の組織反応である肉芽腫病変に類上皮細胞やマクロファージ、リンパ球と共に認められる。この多核巨細胞は、単球・マクロファージ系の細胞の融合によって作られ、さらにこの融合には、granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) やM-CSF, IFN- γ , IL-4等の様々なサイトカインやインテグリン等の細胞接着因子の関与が報告されている。しかしながら、多核巨細胞の形成メカニズムや生体防御機構における役割についての詳細は未だにわかっていない。獣医学領域においては、ウシのヨーネ病や結核において肉芽腫病変に出現する多核巨細胞の報告がなされているが、それらは組織学的な検索である。その一方で、ヨーネ菌は、取り込まれた多核巨細胞内で増殖するという報告もされており、多核巨細胞の生体防御機構における役割について注目される。

そこで、本研究では、ウシにおける多核巨細胞の形成メカニズムの解明の一環として、M-CSF及びGM-CSFの多核巨細胞形成への関与について調べた。

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 ± 3.3 %と最も高く、M-CSFとCMでは 13.3 ± 4.9 %であった。また、GM-CSF単独では 4.5 ± 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。