

氏 名 (本籍) ち ば けん じ  
千 葉 健 治

学 位 の 種 類 薬 学 博 士

学 位 記 番 号 薬 博 第 154 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 60 年 3 月 26 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 門 課 程 東 北 大 学 大 学 院 薬 学 研 究 科  
( 博 士 課 程 ) 薬 学 専 攻

学 位 論 文 題 目 Stimulated rat T cell-derived inhibitory  
factor for cellular DNA synthesis  
( 活 性 化 ラ ッ ト T 細 胞 か ら 放 出 さ れ る 非  
特 異 的 DNA 合 成 抑 制 因 子 に 関 す る 研 究 )

( 主 査 )

論 文 審 査 委 員 教 授 橋 本 嘉 幸 教 授 鶴 藤 丞

教 授 鈴 木 康 男

# 論 文 内 容 要 旨

## <序 論>

免疫応答は、さまざまな分化過程を経た多種細胞集団の相互作用のうに成立しているが、特にT細胞はそれらの種々の応答において重要な役割を果たしており、免疫応答を増強するhelper T細胞、抑制する suppressor T細胞及び細胞障害性T細胞が知られている。T細胞による免疫応答の制御は、多くの場合それらの産生する可溶性因子 (lymphokine) によるもので、現在までに各種免疫応答を増強あるいは抑制する種々の lymphokine が報告されている。Lymphokine は抗原や mitogen で刺激を受けたT細胞から産生され、免疫現象のさまざまな局面での細胞相互作用を担っている。分子性状及びその作用機序が解明されている lymphokine としては interleukin 2 (IL 2) 及び interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) がある。IL 2 は in vitro において選択的にT細胞の分裂増殖を促進する。したがってこれまで容易ではなかった活性化T細胞の長期培養が可能になった。またIL 2 は細胞障害性T細胞、NK細胞の増殖及び活性化にも関与している。IFN- $\gamma$  は IFN- $\alpha$  (白血球由来)、IFN- $\beta$  (線維芽細胞由来) とは抗原性が異なりT細胞由来でpH 2 処理で失活する。IFN- $\gamma$  は抗ウイルス活性の他に細胞障害性T細胞、NK細胞の活性化にも関与しており、IL 2 とともに免疫系の増強に重要な役割を果たしている。一方免疫系を抑制する抑制性 lymphokine に関しては、その分子性状及び作用機序の解明は十分ではない。ところで concanavalin A (ConA) あるいは同種抗原で刺激されたラットT細胞培養上清に、IL 2、IFN- $\gamma$  とは異なる非特異的DNA合成抑制因子 (STIF) が存在することを見出した。そこでSTIFの産生機構、生化学的及び物理化学的性状を解明するとともに、その免疫系における作用を検討した。またSTIFの検出並びに精製を目的としてSTIFに対する monoclonal 抗体を作製した。

## <方 法>

ConA刺激脾細胞培養上清 (ConA Sup) ; SDラット脾細胞を  $5 \times 10^6$  cells/ml の濃度で  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol及び牛胎児血清 (FCS) 添加RPMI1640培地に懸濁しConA ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) で刺激し $37^\circ\text{C}$ で48時間培養後、その培養上清を遠心、ろ過滅菌し使用。STIF活性の測定 ; SDラット骨髓細胞浮遊液 $2.5 \times 10^5$  cells/wellに試料を2倍系列希釈して加え12時間後の $^3\text{H}$ -thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR) のとりこみ抑制率を算出し、正規確率紙を用いたprobit analysisにより50%抑制を与える希釈濃度を標準STIF (ConASup ;  $10 \text{ U/ml}$ ) と比較しU/mlで標示。IL 2 活性の測定 ; Gillisらの方法に準じ、IL 2 依存性マウスT細胞 clone, T572細胞 $10^4$  cells/well の32時間培養後の $^3\text{H}$ -TdRとりこみ量を測定し、標準IL 2 と比較しU/mlで標示。

IFN活性の測定；マウスL929細胞を牛水泡性ウイルスで感染し，48時間培養後の死細胞ブランク50%減少法により測定し，標準IFNと比較しU/mlで標示。

Lymphokine の精製；1) ConA Sup を $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 塩析し，50-90%飽和画分をSephacryl S-200でゲルろ過し，m.w.45,000-50,000の画分にSTIFを得た。2) 限外ろ過により濃縮後，ConA-Sepharose affinity chromatography を行ない，非吸着性画分にSTIFを得た。

3) 濃縮後NaCl，0-1 Mの直線的濃度勾配によるFPLC-MonoQ陰イオン交換 chromatography を行なった。4) 活性画分を Sephadex IEFを用いた等電点電気泳動 (IEF, pH 3-10) を行ない等電点 (pI) を決定した。

T細胞表面マーカーの同定；ラットT細胞の表面マーカーは，抗ラット胸腺細胞抗血清 (ATS)，R1-3 B 3 monoclonal 抗体 (ラット panT) 及びR1-10 B 5 monoclonal 抗体 (suppressor/killer) を使用し，補体依存性細胞障害試験により同定。

ConA反応；SDラット脾細胞  $2.5 \times 10^5$  cells/well を ConA  $5 \mu\text{g/ml}$  で刺激し72時間培養後の $^3\text{H}$ -TdRとりこみ量を測定。リンパ球混合反応 (MLR)；反応細胞として nylon 非付着性SDラット脾細胞，刺激細胞として mitomycin C  $40 \mu\text{g/ml}$ 処理ACI/Nラット脾細胞を用い，等比で混合培養し4日後の $^3\text{H}$ -TdRのとりこみ量を測定。抗STIF monoclonal 抗体の作製；FPLC-Mono Q精製STIFを免疫したBALB/cマウスの脾細胞とP3 X63 Ag 8-653 myeloma 細胞をPEG1540を用いて細胞融合，HAT培地で選択後468 well の hybridoma 上清をMonoQ精製STIFを抗原とした酵素抗体法 (ELISA) 及びSTIF活性の中和試験により screening し反応陽性の hybridoma を cloning した。

## <結果及び考察>

1) ConA刺激によるSTIFの産生及びその産生細胞；ConAで刺激されたラットT細胞はIL2及びIFN- $\gamma$ を産生することが知られているが，細胞のDNA合成を16時間で90%以上抑制するSTIFも産生されることを新たに見出した。STIFの産生に関与する細胞は nylon 非付着性のT細胞で，その表面マーカーはR1-3 B 3 (ラット panT) 及びR1-10 B 5 (suppressor/killer) 陽性である。一方IL2産生に関与する細胞は nylon 非付着性のT細胞であるが その産生には macrophage の存在が必須であり，R1-3 B 3 陽性，R1-10 B 5 陰性の helperT細胞である。したがってSTIF及びIL2の産生には異なるT細胞亜群が関与し，しかも macrophage の要求性も異なることが明らかとなった。さらにSTIFが非特異的抑制性 lymphokine であることから，suppressorT細胞がSTIFを産生している可能性がある。そこで in vivo 投与で suppressorT細胞に傷害性を示す cyclophosphamide(Cy)を腹腔内投与 (25, 50 100 mg/kg) し，脾細胞のSTIF，IL2及びIFN- $\gamma$ 産生能に与える影響を検討した。その結果STIF産生はCy (>25 mg/kg) 投与により認められなくなり，一方IL2及びIFN- $\gamma$ 産生はCy50 mg/kg

投与で影響がなく、Cy100 mg/kg投与でIL2産生は減少したがIFN- $\gamma$ 産生は有意に増強した。したがってSTIF産生細胞はCy感受性の suppressor T細胞であり、Cy感受性の点からSTIF,IL2及びIFN- $\gamma$ 産生細胞は異なることを明らかにした。

2) STIFの精製及びその生化学的、物理化学的性状；次にSTIFの生化学的及び物理化学的性状を解明するために精製を行なった。ConA Supを $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 塩析し50-90%飽和画分をSephacryl S-200によるゲルろ過を行なった結果STIF及びIFN- $\gamma$ は m.w.45,000-50,000, IL2は m.w.20,000-25,000であった。次にSTIFとIFN- $\gamma$ を分離するためにConA-Sephrose affinity chromatography を行なった。その結果STIFはConA-Sephrose 非吸着性画分に得られ、IFN- $\gamma$ はConA-Sephrose 吸着性で $\alpha$ -methyl-D-mannosideで溶出され、両因子は分離可能である。さらに、FPLC-MonoQ陰イオン交換chromatographyによりSTIFは380-520 mM及び600-700 mM,NaClで溶出される。また等電点電気泳動(IEF)によってそれぞれのSTIFはともにpI 5.1~5.6の単一活性peakとして得られる。以上の方法で精製されたSTIFは trypsin 感受性、DNase, RNase非感受性のタンパク質で、 $\text{NaIO}_4$ 処理で失活しないことから活性部位に糖鎖は存在しないことが示唆された。またSTIFは56°C 30分間の熱処理及び pH 2 処理に安定であり、IFN- $\gamma$ とはConA-Sephrose への吸着性及び pH 2 耐性の点で異なる。さらにSTIFはIFN- $\gamma$ とは異なりN-linked glycosilation の阻害剤である tunicamycin の処理によってもその産生が抑制されないことから、STIFは糖鎖を有しないタンパク質であることが示唆された。STIFの活性は種々の糖( $\alpha$ -methyl-D-mannoside, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, L-fucose, L-rhamnose)の添加によっても阻害されないことも認められた。以上の結果から、STIFはこれまで報告されていた種々の抑制性 lymphokine とはその性状において明らかに異なった抑制性 lymphokine であることが確認された。

3) STIFの細胞増殖及びその免疫系への抑制作用；次に精製したSTIFの免疫系への作用について検討した。ラットT細胞のConA反応及び同種MLRをIL2は有意に増強するのに対し、STIFは濃度依存的に抑制した。さらにSTIFはT細胞 clone T572細胞のIL2依存性増殖及びConA刺激によるラットT細胞からのIL2産生を抑制することが確認された。したがってSTIFは、DNA合成及びIL2産生を抑制することにより活性化T細胞の分裂増殖を抑制し、免疫応答における負のフィードバック機構の一端を担っている免疫調節因子として位置づけることができる。STIFは細胞のDNA合成のみを選択的に抑制し、RNA及びタンパク質合成には関与せず、その作用は可逆的である。またSTIFはラット、マウス及びヒト由来の正常及び腫瘍細胞の増殖を in vitro で抑制する種拘束性のない非特異的DNA合成抑制作用を有している。

4) 同種抗原刺激によるSTIFの産生；STIFはConAなどの mitogen 刺激ばかりでなく同

種抗原の刺激によっても産生されることが確認された。ラット同種MLRにおいてSTIF産生に関与する細胞はConA刺激の場合と同様R1-10 B 5 陽性Cy感受性の suppressor T細胞で、産生されるSTIFの性状はConA Sup由来のSTIFと一致した。

5) STIF に対する monoclonal 抗体 FPLC - Mono Q精製STIFでBALB/c マウスを免疫し、その脾細胞とマウス myeloma 細胞を融合し monoclonal 抗体の作製を行なった。その結果Mono Q精製STIFを抗原とする酵素抗体法 (ELISA) で著しく強い反応性を示すARS-1, ARS-2 抗体 (ともにIgG<sub>2b</sub>) 及びELISAでの反応性は弱いものの、STIFによる骨髄細胞のDNA合成抑制活性を中和するARS-3, ARS-4 抗体 (ともにIgG<sub>1</sub>) を得た。これらの抗体はすべて、IEF精製 STIF (pI 5.1~5.6) とELISAで陽性を示した。一方ConA非存在下でのラット脾細胞培養上清をConA Supと同様にMono Qカラムで精製したもの、及びFCSとはこれらの抗体は全く反応性を示さなかった。以上の結果からSTIFと特異的に反応する monoclonal 抗体を得ることができた。現在これらの抗体を用いて、affinity chromatography によるSTIFの精製を検討中であり、STIFの大量精製及びその分子構造、活性発現の機構の解明への応用が期待される。

活性化T細胞由来の新しい抑制性 lymphokine, STIFの産生、性状及び免疫系への作用の解明によって、in vitro の免疫応答における負の免疫調節因子としてSTIFの意義が明らかとなったが、lymphokine の研究の原点はあくまでも生体内における免疫現象の解明であり、in vitro の作用と対応させながら in vivo での作用についても検討する予定である。

## 審査結果の要旨

免疫反応は宿主細胞から放出される種々の生理活性因子によって調節される。刺激されたT細胞から出される因子のなかには免疫反応を正の方向に調節する $\gamma$ -インターフェロン (IFN) やインターロイキン2 (IL2) のほかに負の調節因子として種々の免疫抑制性因子が存在することが報告されている。IFN及びIL2に関しては既にその化学構造や支配遺伝子が解明され遺伝子組換え法によりそれらの生産も行われている。しかし抑制因子に関しては未だその化学構造も明確ではない。

著者はT細胞マイトゲンであるコンカナバリンA (ConA) でラット脾細胞を刺激するとその培養上清中に細胞DNAの合成を非特異的に阻害するある種の抑制性因子 (STIF) が放出されることを発見し、その分離精製、産生細胞の同定及び生物活性などにつき精査した。

その結果、STIFは糖鎖を持たない分子量4万5千-5万のポリペプチドで同じ分子量をもつIFNと分離可能なことが明らかにされた。

シクロフォスファミド (CY) 投与ラット脾細胞を用いた実験でSTIFはCY感受性のT細胞亜群から産生されること、またその産生にはIL2の場合と異り、マクロファージの存在は不必要であることなどが示された。

さらに *in vitro* の実験系でSTIFはIL2の産生や作用を抑制すること、ラットのみならずマウスやヒト由来の種々の正常及び悪性細胞のDNA合成を阻害することも明らかにされた。

STIFはConA刺激リンパ球以外にも産生されるか否かを知る目的で同種リンパ球混合培養上清についての検索が行われ、この場合にも先に同定されたSTIFと同一分子のSTIFが産生されることが確認された。

さらにSTIFの分離同定を行うためにSTIFに対するモノクローナル抗体が作成され、またこの抗体はヒト末梢血リンパ球由来のヒト型STIFとも交叉反応することが示された。

本研究はこれまで物質的な同定が不充分であった抑制性因子の化学構造や生理活性、並びに支配遺伝子の研究への新しい道を開いたものとして注目され、博士論文に値するものと考えられる。