

氏 名（本籍） おお の 野 いさお 勲

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 2074 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 元 年 2 月 22 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 55 年 3 月  
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Induction of tumor necrosis factor from rodent  
basophil/mast cell lines.  
(ゲッ歯類由来好塩基球および肥満細胞株からの  
腫瘍壊死因子の誘導)

(主 査)  
論 文 審 査 委 員 教 授 滝 島 任 教 授 高 坂 知 節  
教 授 橘 武 彦

# 論文内容要旨

## 【目 的】

肥満細胞や好塩基球は、即時型アレルギー反応において中心的役割を担う一方で、抗腫瘍活性を示すことが知られている。しかし、そのmediatorについては、報告が少ない。最近、rat basophilic leukemia cell (RBL) がnatural cytotoxic (NC) cell activityをもつことが証明され、さらにNC活性のmediatorがtumor necrosis factor (TNF) であることが明らかとなってきた。そこで、今回、我々は、好塩基球や肥満細胞を用いて、mediatorの一つとして、TNFの誘導を試みた。

## 【方 法】

マウスマクロファージ細胞株であるJ774A.1, ラット腹腔マクロファージ (rat PM  $\phi$ ), およびRBL, マウス肥満細胞腫細胞株であるP-815を, PMA (5 ng/ml), LPS (10  $\mu$ g/ml) またはcalcium ionophore A23187 (10  $\mu$ M) で, また, 抗ovalbumin (OVA) マウス血清で感作したRBLおよびP-815を, OVAで刺激した。刺激30分後の上清中のヒスタミンを, automated fluorometric techniqueにて測定した。刺激後5時間の細胞より抽出したRNAにて, マウスTNF cDNAをprobeとしたNorthern blot analysisを行った。細胞の培養上清中のcytotoxic activityは, L929 を標的細胞として用いて測定した。即ち, 標的細胞の50% cytotoxicityを惹起する最大希釈倍数をもって, その活性 (U) とした。また, 検体のTNF活性をみるため, 抗マウスTNFウサギ血清による中和試験を試みた。

## 【結 果】

J774 A.1, およびrat PM  $\phi$  は, LPS刺激により, 24時間後に, それぞれ5 U/10<sup>6</sup> cells, 250 U/10<sup>6</sup> のcytotoxic activityを遊離したが, RBLはLPSにもPMAにも反応しなかった。一方, A 23187や感作後の抗原 (OVA) 刺激では, RBLは, 30分後に, それぞれ38.1%, 66.8%のヒスタミン遊離を示すものの, この時点では上清中にcytotoxicityは認められなかった。しかし, 24時間後の上清中には, 前者で9 U/10<sup>6</sup>, 後者で10 U/10<sup>6</sup>の活性が出現していた。P-815では, A23187の刺激でのみ, ヒスタミンが遊離 (54.5%) し, PMA刺激でのみ, わずかに28%程度のcytotoxicityを認めた。蛋白合成阻害剤であるcycloheximideの存在下では, RBLやP-815からのcytotoxic activity遊離は認められなかった。抗マウスTNF血清は, J774 A.1からのcytotoxic activityを消失させるとともに, rat PM  $\phi$ においても活性を中和した。

さらに、RBLからの活性も完全に中和したが、P-815においては、60%の抑制を示すだけであった。Northern blot analysisでは、J774A.1、やrat PMφはもちろん、RBLやP-815においても、cytotoxic factorを誘導させ得る刺激により、5時間後に2-kb TNF mRNAが発現されることが示された。

### 【考 察】

TNFは、主に、単球、マクロファージから、PMAやLPSにより誘導され、抗腫瘍活性の他に、炎症における調節因子として注目されている。今回、我々は、マウスTNF cDNAをprobeとしたNorthern blot analysisと抗マウスTNF血清との反応により、RBLおよびP-815から、非特異的 (calcium ionophore, PMA)、あるいは特異抗原 (OVA) によるIgE receptorを介する刺激を契機に、TNFが産生されることを明らかにした。このTNF産生の意義を、アレルギー性疾患、たとえば気管支喘息の病態から考えてみる。吸入抗原 (アレルゲン) が、IgEを介して、まず肥満細胞のIgE receptorを刺激し、この細胞から遊離されるヒスタミンなどのchemical mediatorが、早期の気道収縮をひきおこすとされている。しかし、抗原吸入の数時間後に再度観察される気道収縮には、好中球や好酸球の関与が重要とされている。これら炎症細胞の活性化に関わる因子の1つとして、TNFが、知られており、従って、最初の抗原刺激により、肥満細胞あるいは好塩基球から産生されるTNFが、好中球や好酸球を介して、遅発性の気道反応に関与することが考えられる。また、TNFはマクロファージやNC cellのcytotoxicityのmediatorとされており、好塩基球や肥満細胞もTNFを産生することにより、抗腫瘍作用をもつことが示唆される。

## 審 査 結 果 の 要 旨

肥満細胞ないし好塩基球が即時型アレルギー反応ばかりでなく、抗腫瘍活性をもつことが種々の系で知られるようになった。例えばrat basophilic leukemia cell (RBL) はnatural cytotoxic (NC) activityを有し、IgE receptor 刺激によりNC specific factorを遊離することが示されており、一方、別の系でNC活性はtumor necrosis factor (TNF) -  $\alpha$ を介して発現していることが分っている。しかしながら、RBLがIgE receptorを介してTNFを産生するという事を明確に示した報告は見当らない。本申請者は抗TNF -  $\alpha$ 抗体による中和試験とマウスTNF -  $\alpha$  cDNAをprobeとするNorthern blot analysisによりこの点を明らかにしようと試みた。

先ず、抗ovalbumin (OVA) マウス血清で感作したRBLを抗原OVAで刺激すると30分後にヒスタミン、24時間後にL 929を標的細胞としたcytotoxic活性が上清中に認められた。このcytotoxic活性は抗マウスTNF -  $\alpha$ 血清で完全に消失した。この条件はIgE receptorを介する反応であることが知られており、上述の結果はIgE receptor刺激によりRBLからTNF -  $\alpha$ が産生されることを示している。更に、IgEを介さずにヒスタミン遊離をひきおこすCalcium ionophore A 2318でもRBLは同様にTNF -  $\alpha$ を産生したが、マウスマクロファージ細胞株J 774 A・1やラット腹腔マクロファージ (rat P M  $\phi$ ) では有効刺激となったlipopolysaccharide (LPS) やphorbol myristate acetate (PMA) ではRBLからヒスタミンもTNFも遊離しなかった。このことはヒスタミン遊離とTNF産生の間に何らかの関連性を示唆している。また、抗原刺激及びA 23187によるRBLからのTNF産生はcycloheximideにより完全にblockされたので、この蛋白は刺激後新たに合成されることが明らかである。

次に抗原刺激によりRBL内にTNF -  $\alpha$ のmRNAが発現されるか否かをマウスTNF -  $\alpha$  cDNAをprobeとしてNorthern blottingを行った。抗体やcDNAとしてマウスを用いているのはラットのものがないためであるが、ラットにも十分反応することはrat PM  $\phi$ を用いた実験で明らかである。その結果、抗原やA 23187刺激によりcytotoxic factorを誘導させうる条件で、5時間後に2 kbのTNF -  $\alpha$  mRNAが発現されることが明らかとなった。

以上、本論文は、特異抗原によるIgE receptorを介した刺激あるいは非特異的にヒスタミンを遊離させうる刺激により、RBLよりTNF -  $\alpha$ が産生されることを特異抗体による中和試験とNorthern blot analysisという極めて特異性の高い方法で示したもので、その実験事実は世界に訴えるに足り、学位授与に値すると考えられる。