

氏 名 (本籍) 菅 野 祐 幸

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 1 0 4 1 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 2 年 3 月 28 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
(博 士 課 程) 病 理 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 A Macrophage Differentiating Factor Derived
from Human T Cell Line HUT102 Acting a
Mouse Myeloid Cell Line M1
(マウス骨髓性白血病細胞株M1に作用するヒト
T細胞株HUT102由来マクロファージ分化因子)

(主 査)
論 文 審 査 委 員 教 授 京 極 方 久 教 授 菅 村 和 夫
教 授 橘 武 彦

論文内容要旨

マクロファージの分化は、種々のサイトカインによって誘導されることが知られている。また、既知のサイトカインの多くには種特異性が認められ、種を越えて作用することは少ないとされている。本研究では、ヒトT細胞株HUT102が、マウス骨髄性白血病細胞株M1に対して免疫複合体取り込みの亢進を誘導するマクロファージ分化因子(MDF)を産生することを見出し、さらにこの系を用いて、ヒトT細胞産生物質中より種特異性を越えて作用する新しいMDFの精製・同定を試みた。

HUT102細胞培養上清中には、その培養時間に依存してMDF活性が上昇する。また、このMDF活性の上昇は、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドの添加により著明に抑制された。なお、MDF活性は、M1に対してペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ免疫複合体(以下PAPと略す)の取り込みを誘導する活性とし、ELISA法に準じて測定した。これらの事実より、HUT102培養上清中のMDF活性は、HUT102が産生する蛋白分子によって担われている可能性が示唆され、次に、この活性物質の精製・同定を試みた。

1%ウシ胎児血清添加HUT102培養上清約40 μ lを分画分子量10kDの限外濾過膜で濃縮した後、種々のカラムクロマトグラフィーを用いてMDFの精製を試みた。まず、濃縮培養上清を陽イオン交換カラムS-Sepharoseに添加したところ、0.25M NaCl溶出分画にMDF活性を認めた。この分画をレンチル・レクチンアフィニティーカラムに添加したところ、0.15M α -メチル-Dマンノシド溶出分画にMDF活性を認めた。この結果より、MDFはアスパラギン結合型糖鎖を有する糖蛋白質であることが示唆される。この分画をさらに疎水性カラムphenyl-Sepharoseに添加したところ、その通過画分に強いMDF活性を認めた。さらに、この分画をヒドロキシアパタイトカラムに添加したところ、0.06Mリン酸バッファーで溶出される第一ピークに強いMDF活性を認めた。このMDFは用量依存的にM1の増殖を抑制し、またM1に対して非特異的貪食能及びFcレセプター発現の亢進を誘導した。またヒト前骨髄性白血病株であるHL-60細胞に対しても、PAPの取り込み誘導活性を有した。

ヒドロキシアパタイトカラムによる最終精製分画をSDS-PAGEにて分離後、ゲルからのMDF活性回収を試みたところ、分子量約45kDのバンドに相当する位置に活性を認めた。また同じ最終精製分画をアイソエレクトリックフォーカシングカラム、Mono Pに添加したところ、MDF活性分画の等電点はpH7.8~8.3の間であった。この最終精製分画について、C18逆相高速液体クロマトグラフィーにてさらに精製を行い、その45kD分子のN末アミノ酸配列の分析を試みたところ、N末端アミノ酸はブロックされており、N末アミノ酸配列の同定は出来なかった。

一方、HUT102細胞が産生している可能性のある既知のサイトカインであるインターロイキン-1 (IL-1), インターフェロン- γ (IFN- γ), リンホトキシン (LT), 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) のMDF活性を, これらのリコンビナント標品を用いて測定したところ, いずれも単一因子としてはMDF活性を有さず, IL-1とLTの組み合わせのみが弱いながらMDF活性を示した。またヒトインターロイキン-6 (IL-6) 及びヒト顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は, 単独でM1分化誘導活性を有することが知られているが, これら2種のサイトカインに対する中和抗体の添加によって, ハイドロキシアパタイトカラム最終精製分画中のMDF活性を抑制することは出来なかった。また最近, ヒト単球細胞株THP-1の培養上清中から, 分子量51kD, 等電点pH8.8-9.0のM1分化誘導因子が精製されたが, この因子のN末端アミノ酸はブロックされておらず, またその性状は今回のMDFとは異なるものである。

以上の知見より, 今回HUT102細胞培養上清中より分離・同定した45kD糖蛋白は, 新しいマクロファージ分化因子であることが示唆された。

審査結果の要旨

マクロファージの分化は、種々のサイトカインによって誘導されることが知られている。また、既知のサイトカインの多くには種特異性が認められ、1種を超えて作用することは少ないとされている。本研究では、ヒトT細胞株HUT102が、マウス骨髄性白血病細胞株M1に対して免疫複合体取り込みの亢進を誘導するマクロファージ分化因子（MDF）を産生していることの発見に始まる。このMDF活性の上昇は、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドの添加により著明に抑制された。この事実より、このMDF活性は、蛋白分子によって担われている可能性が示唆されたので、この活性物質の精製・同定を試みた。陽イオン交換カラムS-Sepharoseに添加したところ、0.25M NaCl溶出分画にMDF活性を認めた。この分画をレンチル・レクチンアフィニティークラムに添加したところ、0.15M α -メチル-D-マンノシド溶出分画にMDF活性を認めた。この結果より、MDFはアスパラギン結合型糖鎖を有する糖蛋白質であることが示唆された。この分画をさらに疎水性カラムphenyl-sepharoseに添加したところ、その通過画分に強いMDF活性を認めた。さらに、この分画をハイドロキシアパタイトカラムに添加したところ、0.06Mリン酸バッファーで溶出される第一ピークに強いMDF活性を認めた。ハイドロキシアパタイトカラムによる最終精製分画をSDS-PAGEにて分離後、ゲルからのMDF活性回収を試みたところ、分子量約45kDのバンドに相当する位置に活性を認めた。また同じ最終精製分画をアイソエレクトリックフォーカシングカラム、Mono Pに添加したところ、MDF活性分画の等電点はpH7.8~8.3の間であった。この最終精製分画について、C18逆相高速液体クロマトグラフィーにてさらに精製を行い、その45kD分子のN末アミノ酸配列の分析を試みたところ、N末端はブロックされており、N末アミノ酸配列の同定は出来なかった。一方、既知のサイトカインであるIL-1、IFN- γ 、LT、GM-CSF活性を、これらのリコンビナント標品を用いて測定したところ、いずれも単一因子としてはMDF活性を有さず、また、IL-6及びヒトG-CSFは、これら2種のサイトカインに対する中和抗体の添加によっても、ハイドロキシアパタイトカラム最終精製分画中のMDF活性を抑制することは出来なかった。

以上の知見より、今回HUT102細胞培養上清中より分離・同定した45kD糖蛋白質は、新しいマクロファージ分化因子であることが示唆された。これらの研究成果はヒトT細胞白血病細胞が、新しいマクロファージ活性化因子を産生していることを示唆する発見であり、ある種のT細胞リンパ腫、とくにATL関連疾患の病態解明に大きな示唆を与えるものとして医学博士にふさわしい研究と認める。