

氏 名（本籍）	たけもとひろし 武 本 浩
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 第 2822 号
学位授与年月日	平成 7 年 9 月 13 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当
最終学 歴	昭和 60 年 3 月 25 日 大阪大学大学院理学研究科前期課程修了
学位論文題目	内皮細胞にアルカリフォスファターゼを誘導する グリア細胞由来因子の研究

(主 査)

論文審査委員 教授 伊 藤 恒 敏 教授 糸 山 泰 人

教授 近 藤 尚 武

# 論 文 内 容 要 旨

## 目 的

血液脳関門 (BBB) を司る脳毛細血管内皮細胞を脳から単離後, *in vitro* で培養するとその BBB 性質が急速に失われてしまう。これは, 脳毛細血管周辺に存在するアストログリアなどの細胞の影響を失ったために内皮細胞が脱分化したためと考えられる。そこで, グリア細胞から BBB 性質を誘導・保持するのに必要な因子が分泌しているのではないかと仮説を立て, この因子の分離同定を目的とした。

## 方 法

これまでの BBB 誘導の実験系は, グリア細胞と脳血管内皮細胞を初代培養し, BBB 性質の誘導を組織化学的検出やダブルチャンバーでの透過性を調べるなど, 生化学的解析に向けた系ではなかった。そこで, まず脳毛細血管内皮細胞の BBB 性質の指標の一つであり, 透過性の抑制と連動していることが知られている, アルカリフォスファターゼ (ALP) の発現に注目し, ALP の発現誘導を迅速かつ多検体のアッセイができる系をウシ肺動脈内皮細胞ライン (CPAE) などを用いて構築した。96 穴マイクロタイタープレートに内皮細胞をあらかじめ培養し, それにグリア細胞上清やクロマトグラフィ画分などのアッセイ検体を加えて培養を続け, 培養プレートに直接 ALP の基質を加えることにより細胞上に誘導された ALP 活性を測定した。

ヒトグリオーマライン Hs683 細胞をホロファイバーカートリッジで無血清培養し, 50 日間にわたる連続培養で, 濃縮培養上清 150ml を得た。これを陰イオン交換フィルタ (DEAE-Memsep) に通過させ, 素通り分画を陽イオン交換クロマトグラフィ (TSK-Gel SP-5PW), 逆相クロマトグラフィ (Cosmosil C4), 分子ふるいクロマトグラフィ (TSK-Gel G3000SW) を行い, ALP 誘導因子を精製した。精製した ALP 誘導因子は, SDS-PAGE, N 末端アミノ酸配列分析, アミノ酸組成分析などの方法でタンパクの解析を行った。

## 結 果

培養ウシ肺動脈内皮細胞 (CPAE) に ALP 活性を誘導する因子がヒトグリア細胞ラインの培養上清中に含まれていた。中でも, ヒトグリオーマ細胞ラインである, Hs683 細胞の培養上清に, 高い ALP 誘導活性が認められた。

種々のヒト細胞ラインを調べたところ, Hs683 細胞以外のグリア細胞ライン (U373MG, T98 G, A172, H4) ではこの誘導活性は, 弱いながらも認められたが, 神経芽細胞 (IMR-32), 線

維芽細胞 (KD), 骨肉腫 (KHOS-240S), 平滑筋細胞 (PASMC), 内皮細胞 (HUVEC-C) の培養上清には ALP 誘導活性は認められなかった。

内皮細胞に ALP を分化誘導する Hs683 細胞由来因子は, 56°C, 30 分の熱処理には安定であったが, 70°C, 30 分では失活した。また Hs683 細胞を無血清培地で培養した培養上清を濃縮後, ゲル濾過すると, ALP 誘導活性は分子量 20–30kD にあった。

精製された ALP 誘導因子は, SDS-PAGE で分子量 24kD の単一バンドを示した。この蛋白の N 末端アミノ酸配列を調べたところ, ヒト IL-6 の N 末端配列と一致した。またアミノ酸分析のプロファイルもヒト IL-6 とよく一致した。さらに, この精製分子はヒト IL-6 に対するモノクローナル抗体ともよく反応した。以上の結果より, ヒトグリオーマ細胞株 Hs683 由来 ALP 誘導因子は, IL-6 であることが明らかとなった。遺伝子組み替えヒト IL-6 によっても ALP が上記内皮細胞に誘導されることも確かめられた。

## 考 察

物質の透過性が制限されている BBB において, それを構築している脳毛細血管内皮細胞には, 血管内腔から脳実質に必要な栄養分を取り込むための, あるいは不必要な分子を排除するための, 多種類のトランスポーターや酵素系が発現している。こういったさまざまな BBB 性質の形成は, 段階的に行われ, ALP の発現は齶歯類において BBB が完成期に入る, 出生後 20 日目に最高値を示すことが報告されている。また, IL-6 の発現も同時期に最高値を示すことが報告されている。IL-6 は, B 細胞において抗体産生細胞への最終分化因子として機能していることが知られているが, これらの報告と, 本研究で得られた知見より, 脳毛細血管内皮細胞をとりまくアストロサイトから分泌される IL-6 が, 内皮細胞の ALP を誘導し, BBB の最終分化に働いているのではないかと考えられる。さらに, IL-6 は正常状態だけでなく, 炎症病態時においても血管内皮細胞に働きかけてその ALP レベルを調節していることが推察される。

## 審査結果の要旨

脳の恒常性を維持するために、脳毛細血管の内皮細胞には血液脳関門（BBB）が構成されている。BBB を司る脳毛細血管内皮細胞を脳から単離後、*in vitro* で培養すると、その BBB としての性質が急速に失われてしまうことが知られている。これは、脳毛細血管周辺に存在する細胞（アストログリア、周細胞、神経細胞）の影響を失ったために、内皮細胞が脱分化したためと考えられ、この BBB の誘導・維持のメカニズム解明に向けて、アストログリアと脳毛細血管内皮細胞の初代培養の共培養系による BBB 再構築実験など、これまでに多くの研究がなされてきた。しかしながら、これらが生化学的解析に向けた系ではなかったこともあって、いまだ実際に分子レベルでそれらが解明された例はない。

本論文では、BBB 性質を誘導・保持するのに必要な因子が、グリア細胞から分泌しているのではないかと仮説を立て、この因子の分離同定を行った。その際、BBB 性質の発現誘導を簡便にアッセイできる系を構築した。ここで用いた BBB 性質は、アルカリフォスファターゼ（ALP）で、広く BBB のマーカー酵素として受け入れられており、BBB の発生における血管透過性抑制の獲得や、脳での創傷の修復過程における新生血管の透過性抑制の獲得と連動して発現誘導されることが報告されている。本論文に記載されているアッセイ系は、96 穴マイクロタイタープレートに培養した内皮細胞にサンプルを添加して培養を続け、これに直接 ALP の基質を加えることにより細胞上に誘導された ALP 活性を測定するもので、ALP 発現誘導を迅速かつ多検体のアッセイができる。極めてユニークなものである。これを用いて、内皮細胞に ALP を誘導する因子を、ヒトグリオーマ Hs 683 細胞培養上清から 4 段階のクロマトグラフィを行って、単離・精製した。精製した ALP 誘導因子は、種々の生化学的解析の結果、IL-6 であることを明らかにした。

本論文で、IL-6 が内皮細胞の ALP 発現を誘導することを発見し、IL-6 が、正常な BBB 形成時あるいは、炎症病態時において内皮細胞の ALP 活性の誘導、調節に役割を果たしている可能性を示唆した。特に脳毛細血管内皮細胞をとりまくアストロサイトから分泌される IL-6 が、内皮細胞の ALP を誘導し、さらに B 細胞での IL-6 の役割同様、BBB の最終分化に働いているとする仮説は興味深い。

本研究は、BBB 誘導因子の一つの候補を同定することに成功したが、これは BBB 性質の誘導と維持の分子メカニズム解明に向けて重要な意義を持ち、学位論文として値するものと考えられた。