

氏名	河合泰博
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2152号
学位授与の日付	平成11年7月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Hepatocyte inhibitory factor derived from HTLV-I (+) T cell line is identical to IL-6 (HTLV-I感染T細胞株が産生する肝細胞増殖抑制因子の同定およびIL-6との同一性に関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 内山 卓 教授 松岡雅雄 教授 山岡義生

### 論文内容の要旨

#### (背景)

成人T細胞白血病(ATL)の患者に肝障害が多く認められることから、ATLウイルスの肝細胞へ及ぼす影響を調べる過程で我々は、ラット初代培養肝細胞のEGF反応性増殖を抑制する因子を、ATL感染T細胞継代培養株であるATL-2が産生していることを報告してきた。今回の研究では、この因子の同定を目的とし、さらにその臨床的意義について検討した。

#### (対象及び方法)

アッセイ方法として、8週から12週までの雄ラットの肝細胞をコラゲナーゼ灌流法にて採取し培養し、サンプルをEGFとともに培地に混和させ、サイミジンの取り込み率をカウントすることにより、増殖およびその抑制活性とした。また、材料としてはATL-2を3日間無血清培地で培養し、その培養上清15Lをもちいた。精製方法は4ステップのHPLC、SDS-PAGEなどをもちいた。また、ATL患者の血清をELISAにより分析した。

#### (結果)

まず、TGF- $\beta$ でないことを確認するために抗TGF- $\beta$ 中和抗体にてこの因子による肝細胞増殖抑制活性が中和されないことを確認した。そこで限外濾過法にて分子量1万以上の物質に濃縮し、ゲル濾過法にて活性中心が15 kDaから40 kDaまでに存在することを確認した。この活性中心のフラクションを濃縮し、SMARTシステムを使用し、ヘパリンカラムにて、さらに分離をおこなった。NaCl濃度200 mMから300 mM付近に活性中心を認めたため、これを集め、濃縮し、さらに陰イオン交換カラムにて分離をおこなった。NaCl濃度150 mMから200 mM付近に活性中心を認めたため、このフラクションを集め、濃縮し、さらに逆相カラムにて分離をおこなった。アセトニトリル57%に活性中心を認めた。ここまでのHPLCによる分離では活性中心は単ピークであった。この精製の結果、濃縮率は44000倍になり約5  $\mu$ gの蛋白が得られた。さらに活性中心のフラクションをSDS-PAGEにて分離すると、20 kDaと27 kDa付近に2つのバンドを認めた。この2つの蛋白をSDS-PAGEのゲルをスライスして直接抽出することにより活性を確認したところ、両方に活性を認めたため、まず、20 kDaの蛋白から、アミノ酸分析をおこなった。3フラクションから得られた断片から、34アミノ酸がIL-6と一致した。そこで、抗ヒトIL-6抗体にて確認をおこなったところ、まず、抗ヒトIL-6中和抗体にて活性が中和され、ELISAにて濃縮とともにIL-6の濃度が上昇し、ウェスタンブロッティングにて20 kDaと27 kDaの両方が認識された。これらのことより、この因子はIL-6と同一であると結論した。さらにこのIL-6の臨床的意義を確認するため、ATLの患者の血清中のIL-6をELISAにて測定した。患者が大学に入院したときの血清を6人について測定したところ、健常人にくらべて有意に高値を認めた。また、ヒト肝臓より灌流法にて摘出したリンパ球を無血清にて1週間培養したところ、一部IL-6を高濃度分泌していることが確認された。

(考察)

この精製過程を通じて、ATL が産生する肝細胞増殖抑制因子はひとつであり、それが IL-6 であることが示された。リンパ球の分泌する IL-6 が肝臓の再生に関して重要な役割をおこなっている可能性が示唆され、臨床においても、ATL 患者の肝障害や肝臓の再生に対して ATL の細胞が分泌する IL-6 が重要な役割をはたしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本学位授与申請者は、ATL 感染 T 細胞継代培養株である ATL-2 が産生している、ラット初代培養肝細胞の EGF 反応性増殖を抑制する因子を精製同定した。さらにその臨床的意義について検討した。

ATL-2 の培養上清を、限外濾過法、ゲル濾過、ヘパリンカラム、陰イオン交換カラム、逆相カラム、SDS-PAGE にて分離をおこなった。得られた 20 kDa と 27 kDa の両方の蛋白に活性を認めたため、20 kDa の蛋白のアミノ酸分析をおこなった。34 アミノ酸が IL-6 と一致したため、抗 IL-6 抗体にて確認をおこなったところ、中和抗体、ELISA、ウェスタンブロッティングにて認識された。これらのことより、この因子は IL-6 と同一であると結論した。さらに臨床的意義を確認するため、ATL の患者 6 人の血清中の IL-6 を ELISA にて測定したところ、健常人にくらべて有意に高値を認めた。リンパ球の分泌する IL-6 が肝臓の再生に関して重要な役割をおこなっている可能性が示唆され、臨床においても、ATL 患者の肝臓病態に対して ATL の細胞が分泌する IL-6 が重要な役割をはたしている可能性が示唆された。

以上の研究は肝再生における IL-6 の役割の解明に貢献し、肝臓病態の把握に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 11 年 7 月 5 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野の試問を受け、合格と認められたものである。