

氏 名	まつもと ひさこ 松 本 久 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2105 号
学位授与の日付	平 成 11 年 3 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 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Interleukin-12 gene expression in human monocyte-derived macrophages stimulated with <i>Mycobacterium bovis</i> BCG: Cytokine regulation and effect of NK cells (BCG 刺激によるヒト単球由来マクロファージにおける IL-12 発現について: サイトカインによる制御, NK 細胞の影響) (主査)
論文調査委員	教 授 湊 長 博 教 授 光 山 正 雄 教 授 泉 孝 英

論 文 内 容 の 要 旨

目的 抗原提示細胞からのIL-12の産生は、細胞性免疫の誘導、Tリンパ球のTh-1細胞への分化の初期シグナルとして必要であることが明らかにされている。IL-12は、抗酸菌に対する感染防御においても重要な役割を演じると考えられるが、抗酸菌感染の初期防御においてIL-12の発現がどのように誘導、制御されているか、ヒトにおける詳細は未だ明らかでない。

本研究はBCG刺激を用い、ヒトmonocyte derived macrophage (MDM) のIL-12mRNA発現、及び発現を制御する各種因子についてin vitroで検討した。

研究方法・結果 健康人末梢血から比重遠心法にて分離した単核球を5%ヒトAB型血清を添加したRPMI1640に浮遊させ、37°C 5%CO₂インキュベーターで3時間培養後洗浄して付着細胞のみとし、単球として3×10⁶/dishに調節した。さらに5日間培養してMDMとし、一部に前処置としてIFN-γ、GM-CSF、TNF-α、IL-4、IL-10を加えた後、BCG(東京172株)10⁷ CFU/dishで刺激した。BCGで刺激された細胞を回収後、Trizolを用いてRNAを抽出し、RT-PCRを行いIL-12のp40鎖mRNAの発現を検討し、さらにcompetitive PCRにより半定量的検討を行った。

IL-12のp40鎖mRNAはBCG刺激後、約6-12時間で最も強く発現がみられ、その後減衰がみられた。BCG単独刺激でのIL-12のp40鎖mRNA発現は弱かったが、前処置としてIFN-γ、GM-CSF、TNF-αを加えたところ、GM-CSF、TNF-αで前処置されたものは約10倍に増強され、IFN-γで8-12時間前処置されたものは約100倍に増強された。IL-4、IL-10による前処置では逆に発現の低下が認められた。

一部検体では、細胞回収時に培養上清を採取し、IL-12のheterodimerであるp70の蛋白産生についてsandwichELISA法で測定した。p70の蛋白量は、IFN-γでの前処置時に最も多く、BCG単独刺激、もしくは他のサイトカインでの前処置時には、蛋白量は測定感度以下であった。

IFN-γの受容体欠損マウスでは、BCG刺激によるIL-12の発現が認められなかったことが報告されており(Flesch, 1995)、IFN-γはIL-12の発現を増強するのみでなく、IFN-γ受容体からの刺激がIL-12の発現に必須である可能性が推測された。そこで次に抗IFN-γ中和抗体を投与し、その影響を検討した。抗IFN-γ抗体、抗IFN-γ受容体抗体による前処置後BCG刺激を行っても、IL-12の発現は抑制されなかった。

本研究の実験系では、付着細胞におけるMDMのpurityは90%以上であったが、数%のNK細胞の混入が認められた。このNK細胞がMDMによるIL-12の発現を修飾している可能性について検討するために、培養前に磁気ビーズ法を用いてNK細胞を除去し、同様にBCG刺激をおこなった。NK細胞を除去した系ではMDMによるIL-12のp40鎖mRNAの発現が抑制されたのに対し、コントロールとしてIgG抗体のみを加え、磁気ビーズ法を施行した系では、無処理の系と同様に発現が認め

られた。以上の結果より、MDMのBCG刺激によるIL-12のp40鎖mRNAの発現にNK細胞の存在が必要であると考えられた。
考察 BCG刺激によりヒトMDMにおいてIL-12の発現がみられ、IFN- γ による前処置によりmRNAの発現の増強、蛋白産生の増加がみられた。抗IFN- γ 中和抗体による処理はIL-12の発現を抑制しなかったが、NK細胞の存在がMDMによるIL-12の発現に必要であり、NK細胞は抗酸菌感染の初期防御に重要である可能性が示唆された。NK細胞がいかなる機序でMDMに働きかけているかについての検討は、今後の課題である。

論文審査の結果の要旨

本研究は、抗酸菌感染の初期防御において重要な役割を果たすInterleukin (IL)-12についてヒト単球由来マクロファージ (MDM) を用いて検討したものである。

Mycobacterium bovis BCG (BCG) でMDMを刺激すると、6-12時間をピークとする有意なIL-12mRNAの発現が認められた。さらにInterferon (IFN)- γ 前処理を加えると、mRNA発現と蛋白分泌の有意な亢進が観察された。発現の亢進はGranulo-cyte Macrophage Colony Stimulating Factorや、Tumor Necrosis factor- α 前処理でも観察されたが、INF- γ 前処理で最も顕著であった。一方IL-4やIL-10前処理では発現の低下がみられた。

上記mRNA発現にIFN- γ の存在が必須である可能性を考え、抗IFN- γ 中和抗体による処理を行ったが、発現に変化はなかった。一方実験系に数%の混入の認められたNK細胞を除去したところ発現の抑制が認められ、NK細胞の存在が上記IL-12mRNA発現に必須である可能性が示唆された。

以上の研究はBCG刺激によるMDMのIL-12mRNA発現を制御する各種因子を検討したもので、抗酸菌感染の初期防御機構の解明に貢献し、難治抗酸菌感染症の免疫療法の開発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2月10日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。