

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 15 L 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- β でないことを確認するために抗 TGF- β 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 μ 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。