

学 位 論 文 題 名

Characterization of murine macrophage clones immortalized with a helper-free and replication-defective retroviral vector

（ヘルパーフリー・複製欠損レトロウイルスベクターにて
樹立したマウスマクロファージクローンの特性

学位論文内容の要旨

単球及びマクロファージ（M ϕ ）は侵入微生物、異物及び変性自己組織を貪食することによって生体防御において重要な役割を果たしている。M ϕ の形質と機能は生体内の分布部位によって異なっており、M ϕ の増殖のための栄養要求性はM ϕ の起源や分化段階により異なることが示唆されている。M ϕ の増殖性状や機能を*in vitro*で解析する場合、様々な機能を有するM ϕ 細胞株を用いることが有用である。しかし、現在あるマウスM ϕ 株は造腫瘍性か、機能が乏しいかあるいはレトロウイルス産生細胞である。これらは正常マウスM ϕ の増殖性状や機能を必ずしも反映していない。

腫瘍ウイルスSV40やレトロウイルスが細胞株の樹立に利用されている。SV40はマウス細胞に対する感染性及び不死化の効率が低く、また、レトロウイルスによって不死化した細胞は子ウイルスを産生するため、試験を混乱させる。これらの問題を解決する為にヘルパーフリー・複製欠損レトロウイルスベクターが開発された。このレトロウイルスベクターは容易にマウス細胞に感染し、ゲノムに入り、挿入遺伝子を効率良く発現するが子ウイルスを産生しない。そこで、SV40初期抗原を発現するヘルパーフリー・複製欠損レトロウイルスベクター(MV40)を用いて、クローナルなマウスM ϕ 株を樹立した。得られたM ϕ 株は正常M ϕ の形態を呈し、貪食能、細胞毒性、抗体依存性細胞傷害活性及び

各種サイトカイン産生能を保持していた。これらM ϕ 株はMV40プロウイルスを有し、SV40初期抗原を発現していたが、いずれのM ϕ 株でもMV40ウイルス産生は認められなかった。これらの結果は、樹立した全てのマウスM ϕ 株がMV40プロウイルスを有しながらもウイルスを産生せず、上述のM ϕ 機能を保持することを示している。

M ϕ の多様性及びM ϕ クローンを大量に調製することが困難であることから、個々の成熟M ϕ のサイトカイン依存性増殖及び血液細胞コロニー刺激因子(CSF)発現プロファイル、またインターフェロン- γ (IFN- γ)のM ϕ CSF産生に対する調節作用のメカニズムは殆ど不明のままであった。そこで、まず、樹立したマウスM ϕ クローンのサイトカインに対する反応性を調べたところ、サイトカイン反応パターンはM ϕ クローン間で異なっていた。この成績は成熟マウスM ϕ クローンの増殖がサイトカインで特異的に調節されることを示唆している。いっぽう、インターロイキン-4(IL-4)がマウスM ϕ クローン及びチオグリコレート誘導腹腔マウスM ϕ の増殖を誘起することから、IL-4が成熟マウスM ϕ の増殖に関与することが示唆された。次に、これらマウスM ϕ クローンのCSFの発現と調節について解析した。リポポリサッカライド(LPS)刺激により顆粒球CSF(G-CSF)、顆粒球・M ϕ CSF(GM-CSF)及びM ϕ CSF(M-CSF)の発現が誘導もしくは減弱され、そして、それらの発現レベルはM ϕ クローン間で異なっていた。これらのCSF発現パターンを比較したところ、M ϕ クローンはGタイプ(G-CSF⁺⁺⁺GM-CSF⁻M-CSF⁺)とGMタイプ(G-CSF[±]GM-CSF⁺⁺⁺M-CSF⁺)に分類された。しかし、両タイプ間でインターロイキン-1、インターロイキン-6及び腫瘍壊死因子 α mRNAのLPS誘導発現レベルに差は認められなかった。M-CSF mRNAの発現様式はG-CSFやGM-CSF mRNAと異なっており、その発現はIFN- γ により完全に抑制された。また、LPSとIFN- γ の同時刺激によってGとGMタイプ間でCSF mRNAの発現調節は異なるが、IFN- γ はマウスM ϕ クローンのLPS刺激依存性CSF産生を強く抑制した。これらの成績はマウスM ϕ クローンは特異的に調節されたCSF発現様式を持つこと及び抑制機序はGとGMタイプ間で異なるものの、IFN- γ がマウスM ϕ のCSF産生を強

く抑制することを示唆している。

以上の成績は以下のことを示す。1) マウスM ϕ クローンは特異的に調節されたサイトカイン依存性増殖とCSF発現様式を持っている。2) IL-4は成熟マウスM ϕ の増殖を助ける。3) IFN- γ はマウスM ϕ のCSFの産生を抑制する。4) SV40初期抗原を発現するヘルパーフリー・複製欠損レトロウイルスベクターは*in vitro*で機能的なM ϕ 細胞株を樹立するのに有効である。また、5) 得られた機能的マウスM ϕ クローンは、多様性を示すM ϕ 群の増殖及び機能を細胞及び分子レベルで解析するために有用である。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	小 沼	操
副 査	教 授	斉 藤	昌 之
副 査	教 授	喜 田	宏
副 査	教 授	渡 邊	智 正

学 位 論 文 題 名

Characterization of murine macrophage clones immortalized with a helper-free and replication-defective retroviral vector

(ヘルパーフリー・複製欠損レトロウイルスベクターにて
樹立したマウスマクロファージクローンの特性)

マクロファージ (M ϕ) の増殖性状や機能を *in vitro* で解析する場合、様々な機能を有する M ϕ 細胞株を用いることが有用である。しかし、現在あるマウス M ϕ 株は造腫瘍性か、機能が乏しいかあるいはレトロウイルス産生細胞であり、正常マウス M ϕ の増殖性状や機能を必ずしも反映していない。

そこで、SV40初期抗原を発現するヘルパーフリー・複製欠損レトロウイルスベクター(MV40)を用いて、クローナルなマウス M ϕ 株を樹立した。得られた M ϕ 株は正常 M ϕ の形態を呈し、貪食能、細胞毒性、抗体依存性細胞障害活性及び各種サイトカイン産生能を保持していた。いずれの M ϕ 株も MV40プロウイルスを有し、SV40初期抗原を発現していたが、MV40ウイルス産生は認められなかった。これらの結果は、樹立した全てのマウス M ϕ 株がウイルスを産生せず、成熟 M ϕ の機能を保持することを示している。

樹立したマウス M ϕ クローンを用いてそのサイトカインに対する反応性を調べたところ、サイトカイン反応性パターンは M ϕ クローン間で異なっていた。また、インターロイキン-4 が成熟 M ϕ の増殖に関与することが示唆された。これらマウス M ϕ クローンの血液細胞コロニー刺激因子(CSF)の発現と調節について解析した。リポポリサッカライド(LPS)刺激により顆粒球CSF(G-CSF)、顆粒球・M ϕ CSF(GM-CSF)及びM ϕ CSF(M-CSF)の発現が誘導もしくは抑制され、それらの発現レベルは M ϕ クローン間で異なっていた。これらのCSF発現パターンを比較したとこ

ろ、M ϕ クローンはGタイプ(G-CSF⁺⁺⁺GM-CSF⁻M-CSF⁺)とGMタイプ(G-CSF⁺GM-CSF⁺⁺⁺M-CSF⁺)に分類された。またインターフェロン- γ はマウスM ϕ クローンのLPS刺激依存性CSF産生を強く抑制した。

この研究はレトロウイルス非産生で正常M ϕ の機能をもった細胞株を樹立し、これら細胞株を用い、M ϕ のサイトカイン依存性増殖及びCSF発現プロフィール等について明らかにしたものであり、M ϕ の増殖及び機能を分子レベルで解析するために重要な知見を提供するものである。よって審査員一同は小川恭喜氏が博士(獣医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。