

学 位 論 文 題 名

ヒト型リコンビナント マクロファージ コロニー刺激
因子 (rhM-CSF) の生体防御系に及ぼす作用に関する研究

学位論文内容の要旨

M-CSF は単球・マクロファージ系の細胞に作用してその分化増殖や機能亢進に関与していることが知られている。一方、マクロファージは抗原非特異的な生体防御反応のみならず、抗原特異的免疫反応においても重要な役割を果たす細胞であることが知られている。本研究では M-CSF によるマクロファージの増殖と機能亢進そして、生体防御反応への影響について検討しその結果についてまとめたものである。骨子は以下の 6 章からなる。

第 1 章：rhM-CSF 投与によって誘導される腹腔内マクロファージの検討：マウスの腹腔内に rhM-CSF を投与すると、腹腔内のマクロファージが増加する。この作用は直接の増殖作用の他に M-CSF の走化性因子としての作用も関連している。また、M-CSF 投与によって誘導されたマクロファージは *in vitro* において二次刺激 (LPS 添加) に対する反応性 (サイトカイン産生能、一酸化炭素産生能、殺腫瘍活性) が亢進しており、いわゆるプライミング状態にあることが考えられた。

第 2 章：rhM-CSF 投与による血中 TNF 誘導の増強 (*in vivo* におけるプライミング効果について)：BCG や IFN- γ を投与したマウスに LPS を投与すると、血中の TNF の濃度が一過性に上昇する事が知られている。同様の実験モデルで、rhM-CSF を前投与したマウスにおいても、LPS 投与による血中 TNF 濃度の一過性の上昇が見られた。また、rhM-CSF の複数回の投与や IFN- γ との併用によってこのプライミング効果はさらに増強された。

第 3 章：rhM-CSF による混合リンパ球増殖反応 (MLR) の抑制：rhM-CSF を MLR に添加すると濃度依存的に MLR が抑制された。しかし、マクロファージの存在しない培養系 (樹状細胞と T 細胞による MLR) では rhM-CSF の添加培養による抑制作用は見られなかった。さらに、rhM-CSF 投与で誘導された腹腔マクロファージの培養上清中には樹状細胞と T 細胞による MLR を抑制する活性が見られた。このことから rhM-CSF による MLR の抑制はマクロファージによる抑制因子の産生を介した反応である可能性が考えられた。この抑制因子について IL-10, TGF- β である可能性を仮定して検討したが、否

定的な結果であった。また、この抑制因子は LBRM 33 TG6 細胞の増殖を抑制した。
(IL-10, TGF- β にはみられない活性。)

第4章：マウスの免疫反応における rhM-CSF 投与の効果：正常マウスに rhM-CSF を5連投すると脾臓細胞の増加が観察された。さらにその時、IL-4, IL-10 といった血中サイトカインの濃度の上昇もみられた。このことから、正常マウスの平常時の免疫反応が rhM-CSF の投与によってなんらかの修飾を受けている可能性が考えられた。そこで、実際に抗原特異的な免疫反応モデル実験における rhM-CSF 投与の影響について検討した。その結果、塩化ピクリルに対する接触過敏反応（DTH 反応）は（Th1 型の免疫反応であると考えられている）rhM-CSF の投与によって抑制された。一方、DNP に対する抗体産生は IgE の産生（Th2 型の免疫反応において優勢であると考えられている）が rhM-CSF 投与によって増強される事がわかった。これらの結果から rhM-CSF の投与によってマウスの免疫反応が Th2 型の免疫反応が優勢になる傾向に修飾されている可能性が示唆された。

第5章：rhM-CSF 投与による NK 細胞の活性化：rhM-CSF を投与すると、血中や脾臓における NK 1.1⁺ 細胞の数が増加した。一方、Yac-1 細胞の肺におけるクリアランスは rhM-CSF の投与によって亢進した。そこで脾臓中の NK 1.1⁺ 細胞を精製し、その機能を in vitro で調べると、rhM-CSF を投与したマウスから集めた NK 1.1⁺ 細胞は Yac-1 細胞傷害活性、IL-2 に対する増殖反応性、IFN- γ 産生能のすべてについて機能亢進がみられた。この事は、rhM-CSF 投与によって誘導された Yac-1 細胞のクリアランスの亢進が単に NK 1.1⁺ 細胞の増加によって誘導されたのではなく、NK 1.1⁺ 細胞自体の活性化も関与している事を示唆していると考えられた。

第6章：rhM-CSF 投与による B16 メラノーマ細胞の転移抑制効果：尾静脈からの移植によって肺と肝臓に転移結節を形成する B16 細胞を用い、rhM-CSF 投与による転移抑制効果について検討した。その結果、B16 細胞を移植する前に rhM-CSF を投与した場合には肺及び肝臓の転移は抑制されたが、B16 細胞を移植した翌日から rhM-CSF を投与した場合には肝臓の転移のみが抑制された。抗 NK 1.1 抗体を投与して NK 1.1⁺ 細胞を一時的に消去する実験を行なった結果、肺における rhM-CSF による転移抑制効果は「5章」で示した NK 1.1⁺ 細胞の活性化が関与している可能性が示唆されたが、肝臓においてはそれ以外のメカニズムの存在が示唆された。

以上の事から rhM-CSF の投与は生体内のマクロファージの増殖や機能修飾に影響を与えるだけではなく、マクロファージを介した間接的な作用などにより、抗原特異的な免疫反応のバランスを変化させ、さらには NK 細胞の活性化も誘導するなど、成体防御反応に対して幅広い影響を与える事が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 東 市 郎
副 査 教 授 菊 池 九 三
副 査 教 授 谷 口 和 彌
副 査 講 師 劉 永 春

学 位 論 文 題 名

ヒト型リコンビナント マクロファージ コロニー刺激 因子 (rhM-CSF) の生体防御系に及ぼす作用に関する研究

M-CSF に関する研究はこれまで造血作用とマクロファージの機能亢進に関連した研究が主であり、生体防御系（特に免疫系）に及ぼす作用について、詳細な検討を行なった例がこれまでなかった。

本論文は高純度のヒト型リコンビナントM-CSF (rhM-CSF) を用いて、これまで検討されなかったマウスの生体防御系に及ぼす作用について様々な角度から検討を行なった結果をまとめたもので第1章～第6章で構成されている。

第1章：rhM-CSF 投与によって誘導される腹腔内マクロファージの検討：マウスの腹腔内に rhM-CSF を投与すると、腹腔内のマクロファージが増加し、誘導された腹腔マクロファージは *in vitro* において二次刺激（LPS 添加）に対する反応性（IL-6, TNF 産生、一酸化炭素産生能、殺腫瘍活性）が亢進していること（プライミング状態）が示された。

第2章：rhM-CSF 投与による血中 TNF 誘導の増強（*in vivo* におけるプライミング効果について）：BCG や IFN- γ を前投与したマウスに LPS を投与すると、血中の TNF の濃度が一過性に上昇することが知られている。同様の実験モデルで、rhM-CSF を前投与したマウスにおいても、LPS 投与による血中 TNF 濃度の一過性の上昇が見られた。また、rhM-CSF の複数回の投与や IFN- γ との併用によってこのプライミング効果はさらに増強された。

第3章：rhM-CSF による混合リンパ球増殖反応（MLR）の抑制：rhM-CSF を MLR 系に添加すると濃度依存的に MLR が抑制された。しかし、マクロファージの存在しない培養系（樹状細胞とT細胞による MLR）では rhM-CSF の添加による抑制作用は見られなかった。さらに、rhM-CSF の投与で誘導された腹腔マクロファージの培養上清中には樹状細胞とT細胞による MLR を抑制する活性が見られた。以上のことから rhM-CSF による MLR の抑制はマクロファージによる抑制因

子の産生を介した作用である可能性が示唆された。

第4章：マウスの免疫反応における rhM-CSF 投与の効果：正常マウスに rhM-CSF を投与すると脾臓細胞数の増加と、IL-4, IL-10 の血中濃度の上昇がみられた。これは、マウスの平常時の免疫反応が rhM-CSF の投与によってなんらかの修飾を受けている可能性を示すものである。そこで、実際に抗原特異的な免疫反応モデル実験における rhM-CSF 投与の影響について検討した。その結果、塩化ピクリルに対する接触過敏反応（DTH 反応）は rhM-CSF の投与によって抑制された。一方、DNP に対する抗体産生は IgE の産生が rhM-CSF の投与によって増強されることがわかった。これらの結果から rhM-CSF の投与によってマウスの免疫反応性が修飾されることを示唆している。

第5章：rhM-CSF 投与による NK 細胞の活性化：rhM-CSF を投与すると、血中や脾臓における NK 1.1⁺ 細胞の数が増加し、Yac-1 細胞の肺におけるクリアランスが亢進した。そこで脾臓中の NK 1.1⁺ 細胞を精製し、その機能を *in vitro* で調べると、rhM-CSF を投与したマウスから精製した NK 1.1⁺ 細胞は Yac-1 細胞傷害活性、IL-2 に対する増殖反応性、IFN- γ 産生能のすべてについて機能亢進がみられた。このことは、rhM-CSF の投与によって NK 1.1⁺ 細胞の増加と活性化を誘導することを示唆している。

第6章：rhM-CSF 投与による B16 メラノーマ細胞の転移抑制効果：尾静脈からの移植によって肺と肝臓に転移結節を形成する B16 細胞を用い、rhM-CSF 投与による転移抑制効果について検討した。その結果、B16 細胞を移植する前に rhM-CSF を投与した場合には肺及び肝臓の転移は抑制されたが、B16 細胞を移植した翌日から rhM-CSF を投与した場合には肝臓の転移のみが抑制された。抗 NK 1.1 抗体を投与して NK 1.1⁺ 細胞を一時的に消去する実験を行なった結果、肺における rhM-CSF による転移抑制効果は「5章」で示した NK 1.1⁺ 細胞の活性化が関与している可能性が示唆されたが、肝臓においてはそれ以外のメカニズムの存在が示唆された。

以上のことから rhM-CSF の投与は生体内のマクロファージの増殖や機能修飾に影響を与えるだけでなく、抗原特異的な免疫反応のバランスを変化させ、さらには NK 細胞の活性化も誘導するなど、生体防御反応に対して幅広い影響を与えることが示唆された。これらのデータは実際の臨床現場で患者に投与されている M-CSF 製剤の使用経験を考察したり、M-CSF の生体における意義を考える上で重要な知見を含んでいるものと考えられる。

よって申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認めた。