

EFFECTS OF LEPTIN ON BOVINE IMMUNE CELL FUNCTIONS

(ウシ免疫機能調節におよぼす脂肪細胞由来サイトカイン、レプチンの作用)

学位論文内容の要旨

レプチンは肥満マウスの形質発現に関わる遺伝子として同定され、脂肪細胞から血中に分泌される 16Kda のタンパク質である。レプチンは全身の栄養状態を反映するシグナル分子として脳視床下部の受容体に作用し、摂食を抑制するとともにエネルギー消費を亢進させる。さらにレプチンは神経内分泌機能や性腺機能、血球形成や免疫機能に対しても様々な修飾効果を持つことが明らかになりつつある。ウシにおいてレプチンの血中レベルが栄養状態や、出産、泌乳によって変動することが知られ、特に周産期に減少する。また周産期のウシは免疫機能の低下により感染への感受性が高まることが知られるが、レプチンとの関連は明らかではない。そこで本学位論文ではレプチンのウシ末梢 T リンパ球、好中球、および単球マクロファージに対する作用を *in vitro* で解析した。

まずウシ末梢血リンパ球を分離、精製し、その増殖応答に対する作用を調べたところ、レプチンは単独ではリンパ球の増殖に影響を与えなかった。一方、コンカナバリン A (ConA) あるいは抗 CD3 抗体によってリンパ球の増殖は増大したが、レプチンを同時に加えると増殖刺激による T リンパ球の増殖は抑制された。増殖刺激は Janus-activated protein kinase 2 (JAK2) などの細胞内シグナルを活性化し、シグナル調節分子である suppressor of cytokine signaling (SOCS) 3 や インターフェロン γ (IFN- γ)あるいはインターロイキン(IL)-2、IL-4 遺伝子の発現を亢進させた。しかし、レプチン単独で刺激するとわずかに SOCS3 の発現を誘導したが、他のシグナル経路や遺伝子の発現に影響は見られなかった。増殖刺激とともにレプチンで刺激すると、IFN- γ の発現が亢進し、IL-2 遺伝子の発現は抑制された。このように、レプチンは遺伝子の発現を調節することでウシ T リンパ球の機能を修飾すること、つまりレプチンは抗原提示によるウシ T リンパ球の増殖能を抑制し、Th1 サイトカインである IFN- γ の産生を増強することを示した。

次にウシ末梢血好中球の抗菌酵素の放出能(脱顆粒応答)および活性酸素産生能に対するレプチン作用を調べた。レプチン、TNF- α 、活性型ホルボールエステル (PMA) とオプソニン化したザイモザン (OZP)は脱顆粒を惹起しなかった。一方、アナフィラト

キシンを含むザイモザン活性化血清は (ZAS) は脱顆粒を誘導した。しかし、レプチンや TNF- α は ZAS による脱顆粒反応にも影響しなかった。レプチンを除く、TNF- α 、PMA, OZP と ZAS は活性酸素の産生を異なる強度で誘導した。さらに TNF- α は OZP と ZAS による活性酸素産生能を増強し、この活性増大作用の一部分は NADPH オキシダーゼの細胞質コンポーネントである p47^{phox} の膜移行の増加で説明された。レプチンはいずれの刺激に対しても影響を示さなかった。これらの結果よりレプチンはウシ好中球の脱顆粒応答および活性酸素産生能に対して直接的な作用を示さないことが明らかとなった。

次いでウシ単球マクロファージのサイトカイン産生に対するレプチン作用を調べた。ウシ末梢血より単球マクロファージを分離したところ、無刺激状態であっても TNF- α 、IL-1 β 、IL-12(p35 および p40)、IL-18 遺伝子の恒常的な発現が確認された。レプチンを作作用させると TNF- α と IL-12p40mRNA の発現が増大したが、他の遺伝子の発現は変化しなかった。TNF- α の分泌量を調べると、実際に培養液中の濃度が増加した。しかし、培養液中の IL-1 β 濃度も増大した。そこで伏在性の IL-1 β や IL-18 を活性型に変換するタンパク分解酵素 caspase-1 の発現について調べたところ、レプチンによってその遺伝子の発現が増大した。これらの結果より、レプチンは単球マクロファージに作用し転写を介して TNF- α 分泌や IL-12p35/p40 の複合体形成による分泌を促進するほか、caspase-1 により活性型 IL-1 β /IL-18 を分泌させると考えられた。

これらのサイトカインのうち IL-12 と IL-18 は T リンパ球の増殖やサイトカイン産生を修飾することが知られる。レプチンは直接 T リンパ球の増殖応答を抑制するが、末梢血の Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) 画分のように T リンパ球の他、単球マクロファージが含まれる場合、レプチンの応答がどのように変化するか調べた。PBMC は ConA に応答して、細胞増殖が促進する。PBMC をレプチン単独で刺激してもわずかながら増殖が誘導され、さらにレプチンと ConA で刺激すると ConA 単独に比べ 10-40% の増殖の亢進が見られた。これらの結果は T リンパ球単独の場合のレプチン応答とは明らかに異なっており、レプチンが単球やマクロファージから IL-12 などの T リンパ球の増殖を促進するサイトカインを分泌させ、直接的な抑制よりもむしろ増殖を刺激するものと考えられた。

本研究によりレプチンはウシの免疫細胞機能を調節する重要な因子であることが明らかとなった。すなわち、レプチンは直接あるいは単球やマクロファージから分泌される IL-12 や IL-18 などのサイトカインを介して Th1 リンパ球の増殖と IFN- γ の分泌を促進する。また単球やマクロファージから分泌される TNF- α を介しておそらくは好中球機能を修飾すると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 和 弘

副 査 助教授 稲 波 修

副 査 助教授 大 橋 和 彦

副 査 教 授 斉 藤 昌 之 (天使大学)

学 位 論 文 題 名

EFFECTS OF LEPTIN ON BOVINE IMMUNE CELL FUNCTIONS

(ウシ免疫機能調節におよぼす脂肪細胞由来サイトカイン、レプチンの作用)

レプチンは肥満マウスの形質発現に関わる遺伝子であり、脂肪細胞から血中に分泌される。ヒトや齧歯類においてレプチンはエネルギー代謝や神経内分泌機能を調節するほか、免疫細胞に対しても様々な作用を示す。一方、ウシでは免疫機能の低下により感染への感受性が高まる周産期において血中レプチン濃度が低下することが知られる。しかしながら、レプチンとウシ免疫細胞活性との関連は明らかではない。本学位論文は、ウシ末梢 T リンパ球、好中球、および単球マクロファージに対するレプチンの直接作用を検討したものである。

第一章では、レプチンによる末梢 T リンパ球機能の修飾を示した。レプチン単独では精製した T リンパ球の増殖に影響を与えないが、増殖刺激コンカナバリン A (ConA) あるいは抗 CD3 抗体による T リンパ球の増殖を抑制した。またレプチン単独ではインターフェロン γ (IFN- γ) あるいはインターロイキン (IL)-2 遺伝子の発現を誘導させなかったが、レプチンは増殖刺激による IFN- γ の発現を亢進させ、IL-2 遺伝子の発現を抑制した。すなわち、レプチンは抗原提示によるウシ T リンパ球の増殖能を抑制し、Th1 サイトカインである IFN- γ の産生を増強することを示した。

第二章ではウシ末梢血好中球の抗菌酵素の放出能 (脱顆粒応答) および活性酸素産生能に対するレプチン作用を明らかにした。レプチンは脱顆粒を惹起せず、また活性酸素の産生にも影響を与えなかった。一方、対照とした腫瘍壊死因子 (TNF- α) は脱顆粒応答を誘導しないものの、活性酸素の産生を弱いながらも増大させた。

第三章ではウシ単球マクロファージのサイトカイン産生に対するレプチン作用を調べた。ウシ単球マクロファージは無刺激状態であっても TNF- α 、IL-1 β 、IL-12 (p35 および p40)、IL-18 遺伝子を恒常的に発現した。レプチンは TNF- α と IL-12p40mRNA の発現が増大させたが、他の遺伝子の発現には影響しなかった。また培養液中の TNF- α を増加させた。

一方、培養液中の IL-1 β 濃度も増大させ、同時に伏在性の IL-1 β や IL-18 を活性型に変換するタンパク分解酵素 caspase-1 遺伝子の発現を増大させた。これらの結果より、レプチンは単球マクロファージに作用し転写を介して TNF- α 分泌や IL-12p35/p40 の複合体形成による分泌を促進するほか、caspase-1 により活性型 IL-1 β /IL-18 を分泌させると考えられた。

血中では T リンパ球、好中球、単球やマクロファージが混在する。第一章で示したようにレプチンは直接 T リンパ球の増殖応答を抑制するが、末梢血の peripheral blood mononuclear cells (PBMC) 画分のように T リンパ球の他、単球マクロファージが含まれる場合、レプチンの応答がどのように変化するか調べた。PBMC は ConA に応答して、細胞増殖が促進した。PBMC をレプチン単独で刺激してもわずかながらも増殖が誘導され、さらにレプチンと ConA で刺激すると ConA 単独に比べ 10-40% の増殖の亢進が見られた。これらの結果は T リンパ球単独の場合のレプチン応答とは明らかに異なっており、レプチンが単球やマクロファージから IL-12 などの T リンパ球の増殖を促進するサイトカインを分泌させ、直接的な抑制よりもむしろ増殖を刺激するものと考えられた。

以上の結果から、レプチンは直接あるいは単球やマクロファージから分泌される IL-12 や IL-18 などのサイトカインを介して Th1 リンパ球の増殖と IFN- γ の分泌を促進し、単球やマクロファージから分泌される TNF- α を介しておそらくは好中球機能を修飾すると考えられた。本研究はレプチンが反芻動物であるウシの免疫細胞機能を調節する重要な因子であることを明らかにしたものであり、獣医学の発展に大きく寄与するものである。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者 Mohamed Mohamed Ahmed Mohamed 氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。