

学 位 論 文 要 旨

博士課程 甲・乙	第 号	氏 名	三 苦 修 也
<p>[論文題名]</p> <p>牛インターロイキン-2 持続発現 HEK-293 細胞の樹立及びその免疫学的解析と応用 Characterization of bovine interleukin-2 stably expressed in HEK-293 cells Journal of Veterinary Medical Science, 83(1): 134- 141, 2021. DOI: 10.1292/jvms.20-0423.</p> <p>[要 旨]</p> <p>インターロイキン-2 (IL-2) は T 細胞増殖因子としてよく知られているサイトカインで、近年免疫賦活化及び抑制効果の両面を持つことが明らかになってきた。宿主免疫調整役としての IL-2 は特異的抗原に対する T 細胞反応を決定付ける重要な役割を果たす。また、牛 T 細胞免疫機序の解明、特に牛 MHC クラス II テトラマーを用いた CD4T 細胞エピトープの同定には、本来の活性を持つ牛 IL-2 が必要である。牛の実験系においては、人 IL-2 が使用されることが多いが、牛 IL-2 との相同性 (64%) は高くないため、牛 IL-2 が不可欠である。組換え牛 IL-2 の作製法として、哺乳類細胞発現系方が他の発現系と比べて半減期が長く安定しているが、現在報告されているものは一時発現系であり、活性の安定した IL-2 作製には適さない。今回 piggyBac トランスポゾンシステムを用いて牛 IL-2 を持続発現する HEK-293 細胞を樹立し、その牛末梢血単核球 (PBMC) における活性を調べた。Puromycin 選択培地により持続発現 HEK293 細胞を選択した後、クローン化した細胞からは 7 日間の培養で 100 ng/ml の牛 IL-2 が培養液中に分泌されていた。高濃度牛 IL-2 存在下の牛 PBMC では主に CD8 陽性 T 細胞及び CD3 陰性細胞が増殖するのに対し、低濃度牛 IL-2 存在下の牛 PBMC では CD4 陽性 T 細胞及び γ δ T 細胞の増殖が顕著であった。これは γ δ T 細胞やレギュラトリー CD4T 細胞では、IL-2 受容体 (IL-2R) を構成する三量体のうちのの一つに CD25 (IL-2Rα) が、高発現している可能性が示唆された。また、牛 IL-2 と人 IL-2 に対する牛 PBMC の反応は γ δ T 細胞以外ほぼ同様の結果であったが、それらの活性において人 IL-2 は牛 IL-2 に対して約 90 倍以上の濃度を必要とした。また、牛 IL-2 で人 IL-2 依存性 T 細胞株 (ILT-MAT) を培養・維持できたが、高濃度 (100 ng/ml) を必要とした。これは牛 IL-2 が人 IL-2R に対する親和力が低いことを示唆している。また、マウスにおける研究では IL-2 と抗 IL-2 抗体 (IL-2 との免疫複合体により、選択的にレギュラトリー T 細胞 (JES6-1) とエフェクター T 細胞 (S4B6) を活性化することがわかっている。今回作製した牛 IL-2 と抗牛 IL-2 抗体 (C5) の複合体を試験したところ、牛 PBMC において NK 細胞や CD8T 細胞を選択的に増殖させることが明らかになった。これは IL-2 が抗体により構造が変化、もしくは IL-2Rα の結合部位を阻害し IL-2Rβ 鎖及び IL-2Rγ 鎖が優位に発現している NK 細胞や CD8T 細胞を選択的に刺激したことが示唆している。牛 IL-2/C5 複合体により NK 細胞及び CD8T 細胞を選択刺激することができれば牛白血病等の難治性感染症治療へ繋がるかもしれない。また、作製した組換え牛 IL-2 は、牛 MHC クラス II テトラマーによる CD4T 細胞エピトープマッピング (TGEM 法) に使用する事が可能であることが分かった。以上の事から、樹立した牛 IL-2 持続発現 HEK-293 細胞は、本来の生物活性を持つ牛 IL-2 を産生し、TGEM 法に利用できると共に、牛 IL-2/C5 複合体の免疫活性を応用した難治性感染症の治療にも有用であると考えられる。</p>			

備考 論文要旨は、和文にあつては 2, 000 字程度、英文にあつては 1, 200 語程度