農研機構
NARO 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

ウシ造血系における幹細胞成長因子 SCF とその受容体 c-kit に関する研究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2019-03-22
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 彦野, 弘一
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001893

研究紹介

平成15年度学位取得者の論文要旨

ウシ造血系における幹細胞成長因子SCFとその受容体*c-kit*に関する研究

彦野弘一

Studies on stem cell factor and its receptor, *c-kit*, in bovine hematopoietic system

Hirokazu HIKONO

細菌感染による子牛の下痢や肺炎は，その治療コスト，生産性の低下，家畜の損耗により，畜産業に多大な経済的損失を与えている。また，抗生物質の広範囲で不適切な使用は，抗生物質耐性菌の出現を招き，公衆衛生上問題となっている。よって，新しい細菌感染症の防除法の開発が求められている。

自然免疫は，細菌感染に対する最初の防衛ラインであり，主に好中球やマクロファージ等の骨髄球系の免疫細胞により担われている。好中球は，細菌感染に反応して，骨髄中の骨髄球系造血前駆体細胞から分化・増殖・動員されてくる。しかし，幼若動物は骨髄中の骨髄球系造血前駆体細胞の数が少なく，その増殖能も低いため，しばしば細菌感染に対して充分な好中球を生産しない。この自然免疫上の問題が原因となり，子牛は，分娩直後，離乳，輸送，密飼い，などのストレス状況下において細菌感染症を起こしやすい。よって，好中球の生産を促すような免疫制御因子の使用は，子牛の細菌感染症の新しい防除法の候補と考えられている。

好中球やマクロファージなどの骨髄球の生産は，コロニー刺激因子（Colony-Stimulating Factor；CSF）と呼ばれるサイトカインとその受容体によって制御されている。CSFは，元来*in vitro*において半固形培地中に培養された骨髄細胞から好中球またはマクロファージから成るコロニーの形成を刺激する因子として同定され，現在では，細菌感染時の骨髄球系造血前駆体細胞の分化・増殖において中心的な役割を果たしていることが明らかとなっている。

顆粒球コロニー刺激因子（Granulocyte Colony-Stimulating Factor; G-CSF）は，好中球特異的なCSFであるため，G-CSFを投与することにより，好中球の生産を促し，幼若動物の細菌感染症の防除に利用することが検討されてきた。その過程で，G-CSFは*in vitro*においてよく分化した好中球のコロニーの形成をごく少数だけ誘導することが示された。これは，G-CSFが分化の比較的進んだ顆粒球系造血前駆体細胞の増殖を刺激する因子であるためである。そこで，G-CSFを，分化の比較的進んでいない（未分化な）造血前駆体細胞の増殖を刺激する因子と組み合わせて投与することにより，より多数の成熟好中球を生産することができると予想された。

幹細胞成長因子（Stem Cell Factor; SCF）は，未分化な造血前駆体細胞を標的とするサイトカインであり，G-CSFと組み合わせて投与することにより，多数の成熟好中球を生産し，子牛の細菌感染症の防除に利用できる可能性がある最有力候補である。しかし，ウシにおけるSCFとその受容体*c-kit*については，これまで全く研究されていなかった。

そこで，ウシ造血系におけるSCFと*c-kit*の発現と機能について基礎的知見を得ることを目的として本研究をおこなった。

第1章　ウシ幹細胞成長因子SCFとその受容体*c-kit*のクローニングと，これら分子に対するモノクローナル抗体の作製

RT-PCRをもちいて，ウシSCFをコードするcDNAを得た。予想されるアミノ酸配列は，他の生物種のSCFのアミノ酸配列と高い相同性を示した。このcDNAとバキュロウイルス遺伝子発現系をもちいて，ウシSCFの細胞外領域の組換えタンパク質を生産した。得られた組換えタンパク質をイオン交換クロマトグラフィで精製後，マウスに免疫して8クローンのモノクローナル抗体を得た（bS-1 ～ bS-8）。

ウシ*c-kit*受容体のcDNA断片をプローブとしてウシ小脳のcDNAライブラリーをスクリーニングし，ウシ*c-kit*受容体の全長をコードするcDNAを得た。予想されるアミノ酸配列は，他の生物種の*c-kit*受容体のアミノ酸配列と高い相同性を示したことから，ウシ*c-kit*受容体も，他の生物種と同様に細胞膜貫通型のチロシンキナーゼ受容体であることが示唆された。バキュロウイルス遺伝子発現系をもちいて，ウシ*c-kit*受容体の細胞外領域の組換えタンパク質を生産した。得られた組換えタンパク質をイオン交換クロマトグラフィで精製後，マウスに免疫して6クローンのモノクローナル抗体を得た（bK-1 ～ bK-6）。このうち，bK-2，bK-3，bK-5，bK-6は，SCFに対する中和活性を有した。

第2章　ウシ骨髄におけるSCFと*c-kit*の発現と機能

抗ウシ*c-kit*モノクローナル抗体（bK-1またはbK-2）をもちいたフローサイトメトリー解析の結果，*c-kit*受容体は，子牛の骨髄細胞のおよそ18%に発現することが示された。*c-kit*陽性骨髄細胞は，いわゆる“芽球領域”に分布し，そのほとんどは細胞系列マーカーであるG1（好中球），CD14（単球・マクロファージ），CD3（Tリンパ球），IgM（Bリンパ球）を発現していなかったが，ごく一部でCD3（Tリンパ球）の発現が認められた。ギムザ染色の結果，*c-kit*陽性CD3陰性骨髄細胞は，主に，骨髄芽球，前骨髄球，前赤芽球，塩基性赤芽球などの芽球様細胞からなる幼若な造血細胞の集団であった。一方，*c-kit*陽性CD3陽性骨髄細胞は，リンパ球様の細胞であった。*c-kit*陽性骨髄細胞は，SCFまたはG-CSF単独存在下で，半固形培地にてコロニーを形成するが，*c-kit*陰性骨髄細胞は同条件下でコロニーを形成しなかった。G-CSF存在下の*c-kit*陽性骨髄細胞にSCFを添加したところ，形成されるコロニーの数と大きさは，ともに相乗的に増加した。これらの結果は，子牛においてSCFが骨髄に含まれる*c-kit*受容体陽性造血前駆体細胞に作用し，G-CSFによる好中球の生産に対して強い相乗効果をもつことを示唆した。

第3章　ウシ末梢血におけるSCFと*c-kit*受容体の発現と機能

抗ウシ*c-kit*モノクローナル抗体（bK-1またはbK-2）をもちいたフローサイトメトリー解析の結果，*c-kit*受容体は，末梢血細胞のおよそ1.5%に発現することが示された。*c-kit*陽性末梢血細胞は，いわゆる“リンパ球領域”に分布し，一部は細胞系列マーカーであるCD3（Tリンパ球），IgM（Bリンパ球）またはCD11a（NKまたは骨髄球）を発現していたが，G1（好中球），CD14（単球・マクロファージ）は発現していなかった。ギムザ染色の結果，*c-kit*陽性末梢血細胞は，主に，大リンパ球様の形態を示した。*c-kit*陽性末梢血細胞は，SCF単独存在下では液体培地にて増殖（トリチウムチミジンの取込み）もしなければ，半固形培地にてコロニーも形成しなかった。これらの結果は，ウシにおいて，*c-kit*受容体が末梢血リンパ球の一部に発現しているが，SCFはその増殖には関与しないことを示唆した。

第4章　ウシ胎子血清における天然型SCFの検出と定量

組換えウシSCFの生物活性を，液体培地にて培養した骨髄細胞のトリチウムチミジン取込み，および，半固形培地にて培養した骨髄細胞のコロニー形成にて検討したところ，ng/mlの範囲で生物活性を示した。抗ウシSCFモノクローナル抗体bS-8をもちいてサンドイッチELISAを構築し，組換えウシSCFを標準品とし，ウシ胎子血清における天然型SCFの濃度を測定したところ，その濃度は100pg/ml以下であり，ヒト血清中の平均値（3.3ng/ml）よりも10倍以上低いことが示された。これらの結果は，ウシ胎子血清中の天然型SCFは濃度が低く，単独では生物活性を示さないことを示唆した。

以上の研究において，ウシSCFおよび*c-kit*受容体のcDNA，組換えタンパク質，モノクローナル抗体を作出し，さらに，ウシ造血系における両分子の発現と機能についての基本的な知見を得た。これらの結果は，子牛の免疫機構における両分子の機能を研究する基礎となるばかりではなく，将来SCFをもちいた子牛の細菌感染症の防除法を開発する場合にも有益な情報である。

本学位論文にまとめられた結果の一部は，以下の原著論文にて発表されている。

1) Hikono, H., J.H. Zhou, M. Ohta, S. Inumaru, E. Momotani, and M. Sakurai. 2002. Production of a monoclonal antibody that recognizes bovine stem cell factor (SCF) and its use in the detection and quantitation of native soluble bovine SCF in fetal bovine serum. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 22: 231-235.

2) Hikono, H., M. Ohta, J.H. Zhou, and M. Sakurai. 2001. Expression and distribution of the Kit receptor in bovine bone marrow cells. *American Journal of*

Veterinary Research 62: 974-977.

3) Hikono, H., M. Ohta, M. Sakurai, and E. Momotani. 2001. Expression of Kit, the receptor for stem cell factor, in bovine peripheral blood. *The Journal of Veterinary Medical Science* 63: 321-324.

4) Hikono, H., M. Ohta, T. Kubota, J.H. Zhou, S. Inumaru, and M. Sakurai. 1999. Production and characterization of monoclonal antibodies that recognize bovine Kit receptor. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 68: 101-112.

5) Zhou, J.H., H. Hikono, M. Ohtaki, T. Kubota, and M. Sakurai. 1994. Cloning and characterization of cDNAs encoding two normal isoforms of bovine stem cell factor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1223:148-150.

6) Kubota, T., H. Hikono, E. Sasaki, and M. Sakurai. 1994. Sequence of a bovine *c-kit* proto-oncogene cDNA. *Gene* 141:305-306.