



Title	ヒトインターロイキン-1 α の蛋白工学的手法による生物活性の分離に関する研究
Author(s)	山吉, 迪子
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37376
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・（本籍）	やま	よし	みち	こ
	山	吉	迪	子
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	9 4 2 9		号
学位授与の日付	平成	2 年	12 月	4 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
学位論文題目	ヒトインターロイキン-1 α の蛋白工学的的手法による 生物活性の分離に関する研究			
論文審査委員	(主査)			
	教授 近藤 雅臣			
	(副査)			
	教授 真弓 忠範	教授 岩田平太郎	教授 西原	力

論文内容の要旨

インターロイキン-1 (IL-1) は、種々の細胞から産生され、多様な生物学的、免疫学的反応を惹き起こし、生体防御に重要な役割を果たしているサイトカインである。IL-1 の多様な作用が、ただ一つの活性部位もしくは活性発現様式によりもたらされるのか、あるいはいくつかの活性部位もしくは発現様式が存在するののかということは、極めて興味深い問題である。IL-1 α の作用のなかにインドメタシンにより抑制される作用と抑制されない作用とがあること、および IL-1 のレセプターが 2 種類存在するとされていることから、作用のいくつかを分離し得る可能性が示唆された。また IL-1 には異なる二つの分子、IL-1 α と IL-1 β が存在し、そのアミノ酸配列は 26% の相同性しか示さないにも関わらず、IL-1 α と IL-1 β は同じレセプターに結合し同じ作用を惹き起こすことが知られている。従って、IL-1 分子中の活性発現は、限局された領域で制御されているのではないかと推察され、IL-1 の構造をごく限定して変化させたときに IL-1 の有する作用の一部を変化させ得る可能性が有るのではないかと予測した。

そこで遺伝子操作技術を用いて、ヒト IL-1 α の 1 つのアミノ酸を変換した誘導体を、分子全体に変異部位を分布させ、数多く作製した。活性の変化をスクリーニングする方法としては、IL-1 α の作用を代表する作用である LAF 活性と A-375 細胞障害活性に加えて、インドメタシンの作用効果の不一致という側面から、PGE₂ の産生誘導に対する作用を選んだ。LAF 活性および A-375 細胞障害活性は、既に確立された方法に従って測定した。PGE₂ 産生誘導活性に関しては、若干の基礎的な検討を加えた上で、ヒト骨肉腫 MG-63 細胞を標的細胞として測定する方法を確立して使用した。

アミノ酸の変換は、部位特異的変異誘発法を用いて実施し、159 アミノ酸残基からなる IL-1 α の 32 箇所について、合計 51 個の 1 アミノ酸変換誘導体を作製した。これらの誘導体は、1 誘導体 (152V)

を除き、大腸菌内で可溶性の蛋白質として充分量が生産された。この結果は、ヒト癌壊死因子 (TNF) の場合とは大いに異なるものであり、TNF が 1 アミノ酸の変換により活性が著しく低下したり不溶性蛋白質に変化したりするのに比し、IL-1 α では大部分の変異誘導体が安定に可溶性蛋白質として生産され、IL-1 α 分子が TNF 分子よりかなり安定な性質を示すことが明らかとなった。生物活性に明らかな変化の認められた誘導体は 26V と 151V で、これらは PGE₂ の産生誘導活性が明らかに低下していた。精製品を用いての再検定の結果、26V は PGE₂ 産生誘導活性および LAF 活性が共に IL-1 α の約 1/10 に低下しており、151V は LAF 活性は IL-1 α の 1/5 弱の低下しか示さなかったが、PGE₂ 産生誘導活性はほぼ完全に喪失していた。

そこで、151V を IL-1 α の多様な活性が分離された誘導体として選択して、TN-55 と命名し、この誘導体の示す性質について詳細に検討した。TN-55 は MG-63 細胞以外の人由来細胞においても PGE₂ 産生誘導活性が低下しており、また、TNF と IL-1 α の共存時に認められる PGE₂ 産生誘導に対する相乗作用も、TNF と TN-55 の組み合わせでは認められなかった。TN-55 は線維芽細胞の増殖促進作用も有意に低下していた。一方、TN-55 の A-375 細胞障害活性は IL-1 α の約 1/50 で、T 細胞 HSB-2 サブクローンにおける IL-2 の産生誘導も IL-1 α の約 1/100 の活性を示し、若干の低下は認められるものの、極めて低い濃度で活性を示した。従って、TN-55 は人由来細胞における IL-1 α の生物活性の中で、一部の作用についてはある程度活性を保ち、一部の作用については活性をほとんど失っていることが明らかとなった。

MG-63 細胞における TN-55 の PGE₂ 産生誘導活性の欠如は、TN-55 が MG-63 細胞のレセプターに結合できないことに起因するのではなく、その結合能は IL-1 α と同程度であること、および、TN-55 は IL-1 による PGE₂ 産生誘導や線維芽細胞増殖促進作用を競合的に阻害することを明らかとした。しかし、完全に活性を阻害するためには、レセプター結合試験で得られた結果よりかなり多量の TN-55 を必要とした。これは、IL-1 に対する細胞応答は細胞上のごく一部のレセプターに IL-1 分子が結合するだけで惹き起こされるためであろうと考えられる。TN-55 が IL-1 レセプターに結合した後、どの段階の細胞応答を惹き起こさないのかに関しては、今後明らかにしなければならない課題である。

TN-55 は、ラットにおいて、ほとんど ACTH の分泌亢進作用を示さなかった。しかし、ウサギを用いた発熱性試験で、TN-55 は IL-1 の 1/10 程度の比較的強い発熱惹起作用を示した。一方、ラットおよびウサギ由来の細胞におけるヒト IL-1 α 、IL-1 β および TN-55 の PGE₂ 産生誘導活性は、ラット LC-540 細胞では、IL-1 β > IL-1 α > TN-55 の順に作用が強く、作用の最も強い IL-1 β と最も弱い TN-55 の作用の開きは千倍であった。また、ウサギ RAB-9 細胞では、IL-1 α > IL-1 β > TN-55 の順で、IL-1 α と TN-55 の作用の開きは十倍であった。この作用の順は、in vivo のそれぞれの動物における作用の強さの順に一致していた。IL-1 は作用に種差のないサイトカインであると考えられているが、作用の強さについては種差が存在することが明らかとなり、ヒトにおける作用の強さを正確に反映していない可能性が示唆された。以上の結果を併せて考えると、TN-55 はウサギでは発熱惹起作用を示したが、ヒトにおいては極めて発熱惹起作用が弱いのではないかと期待される。

TN-55 は、以下の目的での使用が期待される。

- 1) IL-1の作用の中で、発熱惹起作用などのPGE₂の産生を介する好ましくない作用を失ったアゴニストとしての臨床応用
- 2) IL-1の特定の作用を阻害するアンタゴニスト
- 3) IL-1の作用機構の解明の手段

論文審査の結果の要旨

蛋白工学的手法を用いてヒトインターロイキン-1 α の1アミノ酸変換誘導体を種々作製し、その中からLAF活性やA-375細胞傷害活性を保持しているが、PGE₂産生誘導能を失った誘導体TN-55を見出した。この物質について種々の生理活性を検討した結果、本物質はPGE₂のような炎症にかかわる物質の産生を誘導することなく、ヒトインターロイキン-1の他の作用であるT細胞活性化作用や抗腫瘍作用を保持したヒトインターロイキン-1誘導体であることを確認した。この結果は、ヒトインターロイキン-1の作用の中で、発熱惹起作用などのPGE₂の産生を介する好ましくない作用を失ったアゴニストとしての臨床応用、また、インターロイキン-1の特定の作用を阻害するアンタゴニストの作製などへの道を拓くものとして学位授与に値するものと判定した。