



Title	遺伝子操作法による組み換えヒト型増殖因子の創製とその性状および機能
Author(s)	岩根, 理
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42907
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"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉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	岩根 真理 <small>いわね まこと</small>
博士の専攻分野の名称	博士 (理学)
学位記番号	第 15083 号
学位授与年月日	平成12年2月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	遺伝子操作法による組み換えヒト型増殖因子の創製とその性状および機能
論文審査委員	(主査) 教授 柳田 敏雄 (副査) 教授 葛西 道生 教授 村上富士夫

論文内容の要旨

増殖因子は極微量で細胞に増殖、生存維持、分化などを惹起するペプチド性液性因子である。しかし、生体内含量が低いことが研究の妨げになっていた。本研究では、ヒト由来の3種類の増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、神経成長因子(NGF)、ニューロトロフィン-3(NT-3)を取り上げ、遺伝子操作法によって天然型たんぱくと同等の生物活性を持つ組み換え型たんぱくを調製した。そして、その物理化学的性状を明らかにし、モノクローナル抗体を作製して生体内での挙動を観察した。

組み換え型ヒトbFGFはそのcDNAを大腸菌で遺伝子を発現させることにより得られた。これはヘパリンアフィニティカラムで容易に高純度で精製でき、精製標品は細胞増殖活性のみならず強い血管新生誘導活性を持つことを確認した。また、モノクローナル抗体により人為的に脳虚血を誘起したラットでは障害を受けた海馬領域のアストロ細胞にbFGFが誘導されることを認めた。

NGFはヒトでの生体内含量が低いため、ヒト型NGFの性状については知られていなかった。チャイニーズハムスター(CHO)培養細胞により組換え体の高能率産生細胞株を樹立した。この組換え体はPC12細胞に対する神経突起伸長などマウスNGFと同程度の比活性を保持していた。また、中枢神経系由来のコリン作動性の培養神経細胞の生存維持活性を示し、ラット脳障害モデルによる中核野コリン作動性ニューロンの壊死脱落を遅延させた。さらに、モノクローナル抗体を調製することで高感度(検出限界10 pg/ml)のEIA系を設定した。NT-3は遺伝子の相似性により発見されたので、生物活性は不明であった。マチュア型ヒトNT-3の遺伝子とヒトNGFのプレプロ領域をコードするキメラたんぱくとして動物細胞で発現させることにより組み換え型たんぱくを調製することに成功した。これはNGFと同様に感覚神経に対しては神経突起を誘導したが、PC12細胞には形態変化しか起こさなかった。この事実から、NT-3はNGFと作用する細胞種が異なることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

増殖因子は極微量で細胞に作用して増殖、生存維持、分化など生体にとって重要な反応を調節するペプチド性液性因子である。しかし、これら増殖因子の多くは生体含量が低いことが障害になり、その性状や生物活性、あるいは臨床応用の探索が十分に進められなかった。本論文では、中枢神経系の細胞に作用を示す塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、神経成長因子 (NGF)、ニューロトロフィン-3 (NT-3) の3つの因子を取り上げて、遺伝子操作法によって相当量の組み換え型たんぱくの調製に成功している。そして、この十分量の組み換えたんぱくの物理化学的性状ならびに生物活性を検討し、いずれも天然型たんぱくとの同等と見なすうとの結論を得ている。なお、ヒト型の因子を取り上げたのは、将来の臨床応用を想定したからである。

本論文では3種類の増殖因子について各章ごとに取り上げている。まず、bFGFの研究では、遺伝子を大腸菌で発現させ、組み換え型たんぱくをヘパリンアフィニティーカラムを利用することで簡便に高純度の標品を得る方法を確立している。精製された組換え体の生物活性は、線維芽細胞に対する増殖活性だけでなく *in vivo* においても血管新生誘導活性を確認している。また、この組み換え体を抗原とすることでモノクローナル抗体を調製して、ラットの脳虚血モデルで障害を受けた海馬領域において bFGF が誘導されてくることを認めている。

NGF は従来マウス NGF については研究されていたが、ヒト NGF は生体での含量が少ないことから殆ど研究されていない。ヒト NGF 遺伝子の発現を種々の遺伝子発現系を用いて検討し、チャイニーズハムスター (CHO) 培養細胞を用いて高能率に組み換え型たんぱくを産生させることに成功している。組換え体は PC12細胞に神経突起の伸長を誘導するなどマウス NGF で報告されていた末梢神経系の細胞への生物活性を保持していること、ならびに、ラット中隔野由来神経細胞培養株に対して用量依存的にコリンアセチルトランスフェラーゼ活性を上昇させたことから中枢神経系の細胞に対しても生存維持活性を持つことを確認している。また、モノクローナル抗体を調製することで高感度 (検出限界10 pg/ml) の EIA 系を設定している。

NT-3 は NGF と構造上高い相似性を示す神経栄養因子である。この因子は遺伝子の相似性から発見されたので、NGF との生物活性の異同等などは分かっていなかった。マチュア型ヒト NT-3 の遺伝子とヒト NGF のプロモ領域をコードするキメラ型たんぱくとして動物細胞で発現させることにより組み換え型たんぱくの調製に成功している。これは NGF と同様にニワトリ 8 日胚から調製した感覚神経に対しては神経突起を誘導したが、PC12細胞には形態変化を引き起こすが神経突起の伸長活性は持たないことを観察している。また、非神経系への作用として NGF と同程度にヒト末梢血由来の白血球に対してコロニー形成能を持つことも確認している。

この研究により得られた組み換え型たんぱく標品が天然型たんぱくと同等の生物活性を持つことから、将来の基礎研究、応用研究に貢献するものと考えられ、博士 (理学) の学位論文として価値のあるものと認める。