

【86】

|             |  |
|-------------|--|
| 氏 名 (本 籍)   | はぎわらとしゆき<br>萩原敏之 (茨 城 県)                           |
| 学 位 の 種 類   | 医 学 博 士  |
| 学 位 記 番 号   | 博 甲 第 670 号  |
| 学位授与年月日     | 平成元年 3 月 25 日                                      |
| 学位授与の要件     | 学位規則第 5 条第 1 項該当                                   |
| 審 査 研 究 科   | 医 学 研 究 科  |
| 学 位 論 文 題 目 | フィブロネクチン産生に及ぼすサイトカインの調節作用について<br>(dissertation 形式) |
| 主 査         | 筑波大学教授 医学博士 田 村 昇                                  |
| 副 査         | 筑波大学教授 医学博士 阿 部 帥                                  |
| 副 査         | 筑波大学教授 医学博士 成 田 光 陽                                |
| 副 査         | 筑波大学助教授 薬学博士 小 野 崎 菊 夫                             |
| 副 査         | 筑波大学助教授 医学博士 馬 場 徹                                 |

## 論 文 の 要 旨

フィブロネクチン (Fn) は、オプソニン作用や線維芽細胞、単球・マクロファージ系細胞の遊走促進作用などの生物活性をもっている。これらの活性は、炎症過程での初期の局所反応、損傷部位での有害物質の除去、創傷治癒などと深く関係しており、炎症が発生した場合、血中の Fn 濃度が増加することが臨床的、基礎的に確認されている。著者らも、ラットの抜歯後に血漿中 Fn 濃度が一過性に上昇することを明らかにしてきた。しかし、血漿中 Fn 濃度の変動の要因については不明の点が多い。

炎症反応時に血中濃度が増加する血漿蛋白は急性相蛋白と称せられ、それらの中で10種類余りの蛋白の産生がサイトカインによって調節されていることが、現在までの報告で明らかにされている。これらのことから、炎症反応時における血中 Fn 濃度の変動も、サイトカインが Fn 産生を調節しているために起きるという可能性が考えられた。本論文では、Fn 産生に及ぼすサイトカインの影響をラットにおいて検討するとともに、Fn の産出に及ぼす、サイトカインとグルココルチコイドとの相互作用や、サイトカイン同士の相互作用についても検討を加えた。

急性相蛋白を誘導するサイトカインの一つとしてインターロイキン 1 (IL-1) が報告されている。まず、IL-1  $\alpha$  と Fn の関係を明らかにするために、IL-1  $\alpha$  をラットの腹腔内に投与し血漿中の Fn 値の変動を一元放射状免疫拡散法 (SRID) にて測定した。抗体としては、ラットの Fn を精製してウサギに免疫し、その血清を IgG 分画に精製したものを用いた。

IL-1 を投与すると、投与後24時間をピークとしたFn 値の増加が見られ、著者らがすでに観察してきた抜歯後の変動と一致した。また、投与後24時間のラットの肝組織を抗Fn 抗体を用いた酵素抗体法にて染色したところ、肝組織中に対照に比べより多くのFn の存在が確認された。以上の実験成績から、IL-1  $\alpha$  がFn の産生を促進していることが示唆された。

つぎに、IL-1  $\alpha$  がラット初代培養肝細胞のFn 産生に及ぼす影響を、24時間 IL-1  $\alpha$  を培養肝細胞に作用させた培養上清中のFn 濃度をエンザイムイムノアッセイ (ELISA) にて測定することによって調べた。単独でFn の産生を促進させることが知られているグルココルチコイドとIL-1  $\alpha$  との相乗作用の有無についても検討した。その結果 *in vivo* の実験とは相違して、Fn の産生はIL-1  $\alpha$  によって促進されなかった。さらにIL-1  $\alpha$  とグルココルチコイドとの間に相乗作用は認められなかった。すなわち、IL-1  $\alpha$  には、Fn の産生を直接促進させる作用やグルココルチコイドによるFn 産生促進を増強する作用がないことが明らかとなった。したがって、IL-1  $\alpha$  の *in vivo* における血漿Fn 値の増加促進は、直接に作用する他の物質を誘導する間接的な作用によるものと推定された。

つぎに、Fn の産生を直接促進させるサイトカインを明らかにするため、IL-1  $\beta$ 、インターロイキン6 (IL-6 /Hepatocyte Stimulating Factor)、腫瘍壊死因子 (TNF) などのサイトカインを、IL-1  $\alpha$  の実験と同様に、ラット培養肝細胞に作用させた。さらに、Fn 産生に対するIL-1 とIL-6 との相互作用も検討した。その結果、ラットの培養肝細胞においてFn の産生に促進効果をもつサイトカインはIL-6 であることが明らかとなり、グルココルチコイドとサイトカインの間、IL-1 とIL-6 の間ではお互いに作用を及ぼしあわないことが明らかとなった。

IL-1 がIL-6 を誘導する可能性を検討するため、ヒト単球を用いて実験を行った。ヒト末梢血から分離された単球の培養系にIL-1 を24時間作用させ、採取した上清中の分子量8,000以上の物質 (PBM-CM) をラット肝細胞培養系に加えて産生されたFn 量を測定した。また、PBM-CM を抗IL-6 抗体で処理した後、同様な実験を行なった。その結果、このPBM-CM はラットの肝細胞におけるFn の産生を促進し、PBM-CM を抗IL-6 抗体で処理するとその活性がなくなることが明らかとなった。さらに、IL-1 で刺激したPM-CM 中のIL-6 濃度をELISA にて測定したところ、刺激しないPBM-CM の約30倍の濃度のIL-6 が検出された。すなわち、IL-1 がヒト単球のIL-6 産生を誘導することが明らかとなった。これによって、IL-1 のFn 産生促進作用における *in vivo* と *vitro* の違いの原因について一部説明できる。

以上の結果をmRNA レベルで検討するため、ノーザンブロッティングを用いてラット肝細胞中のmRNA 量を測定したところ、IL-6 とPBM-CM (IL-1 刺激) とがそれぞれFn のmRNA 量を増加させていることが判明した。

以上のことから、Fn の産生はサイトカインによって調節されていることが明らかとなり、炎症反応時の血漿Fn 値の変動もサイトカインの作用によることが示唆された。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、IL-1  $\alpha$ 、IL-1  $\beta$ 、IL-6、TNF などのサイトカインが、フィブロネクチンの産生にどのような影響を与えるかを、ラットを用いた in vivo と vitro の実験により検討したものである。検討されたサイトカインの中、初代培養肝細胞に直接作用してフィブロネクチンの産生を促進させるものは IL-6 であり、IL-1  $\alpha$  の腹腔投与により血中フィブロネクチン量が増加するのは、IL-1 が単球などに作用し IL-6 を産生放出させるためである、ことなどを明らかにしている。IL-1 の作用により単球より放出させるフィブロネクチン産生促進因子には、IL-6 以外の因子も関与している可能性も残されているが、本研究はサイトカインとフィブロネクチン産生との関係を初めて明らかにした基礎的研究として、十分に評価できる。

よって、著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。