

氏 名	やまもと あきら 山元 哲
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 乙 第 1 7 8 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	伴侶動物用顆粒球コロニー刺激因子の生産と薬理効果
審 査 委 員	(主査)教授 竹谷 茂 教授 山口政光 教授 森 肇

論文内容の要旨

動物の骨髓細胞に作用して好中球分化を促す顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は癌化学療法時の白血球減少からの回復を促進する補助剤として人の医療では実用化されている。伴侶動物臨床界では癌化学療法、敗血症あるいは感染症などで起こる好中球減少症の治療に際し、副作用の無い治療薬を開発することが望まれている。現在、伴侶動物臨床ではヒト G-CSF が用いられることがあるが、長期投与するとヒト G-CSF に対して中和抗体が産生され、投与効果がなくなる上に、その抗体は伴侶動物の G-CSF の作用も中和して重篤な好中球減少症が引き起こされることが知られている。

本研究では、イヌおよびネコ G-CSF の組換えタンパク質を発現・精製して、生物活性を調べて臨床応用の可能性について検討した。ネコ腎由来上皮細胞 CRFK のゲノム DNA を鋳型とし、PCR 法によりネコ G-CSF ゲノム遺伝子を増幅して、G-CSF タンパク質をコードする遺伝子の全領域を明らかにした。また Lipopolysaccharide 処理して炎症時の刺激をすると CRFK 細胞では G-CSF mRNA の発現は誘導されるが、同細胞の RNA を鋳型とし cDNA の全長を RT-PCR によりクローニングしてアミノ酸配列を決定した。195 アミノ酸残基からなるネコ G-CSF はヒトやマウスを始めとする種々の哺乳動物と推定アミノ酸配列を比較すると 66.8~90.8%の高い相同性を示した。そこで得られた G-CSF の生物活性の有無を確かめるために、ネコ G-CSF cDNA の全長を組み込んだ組換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞(Sf21)に感染させて組換えタンパク質を発現させた。感染細胞の培養上清を骨髓細胞に添加すると白血球数の増加が認められて G-CSF 活性を示した。生物活性を確認したネコ G-CSF 成熟タンパク質の N 末端にヒスチジンヘキサマー (His6) を付加した組換えタンパク質を大腸菌で発現させた。この産物を Ni-NTA カラムを用いて精製したところ、得られた G-CSF はヒト G-CSF の活性の 3 分の 1 を示した。1.25 μ g の精製組換えネコ G-CSF を 1 日 1 回、2 日間連続でネコに投与したところ、好中球数が投与前の約 4 倍に増加した。50 μ g の精製組換えネコ G-CSF の 11 日間連日投与において、最終的に白血球数は投与前の約 10 倍に達した。組換えネコ G-CSF 投与による臨床的な異常は認められず、投与を止めると白血球数は速やかに投与前のレベルへと戻った。

一方、組換えイヌ G-CSF についてもブレヴィバチルスによる発現・精製と生体での効果を調べた。まず、成熟イヌ G-CSF もしくはジスルフィド結合に関与しないとされている 17 番目のシステイン残基をセリンに置換したイヌ G-CSF (C17S) の cDNA を合成し、*Brevibacillus chosinensis*

HPD31 株で発現させた。上清中の生物活性は、置換前のイヌ G-CSF で 3.2×10^3 LU/mL と低値であったが、イヌ G-CSF(C17S)では 6.7×10^4 LU/mL と活性の上昇がみられた。組換えイヌ G-CSF(C17S)を含む培養上清を硫酸沈殿により濃縮し、疎水性カラムやイオン交換カラム精製を行って、精製品（比活性： 8.0×10^6 LU//mg タンパク質）を得た。この精製品をイヌに 125、25、5、 $1 \mu\text{g}$ /頭の用量で 2 日間連日、皮下注射で投与した。血中の総白血球数は投与 1 日後から 125、25、 $5 \mu\text{g}/\text{head}$ 投与の群で上昇した。投与中止後、好中球数は速やかに元の値へと回復し、臨床障害症状は観察されなかった。

さらに、サイクロフォスファミドで誘導した好中球減少症について、組換えイヌ顆粒球刺激因子による改善の有無を調べた。イヌに $400\text{mg}/\text{m}^2$ のサイクロフォスファミドを静脈内に単回投与して、顆粒球減少症誘導した。顆粒球減少症は顆粒球数 $1000/\text{mm}^3$ 以下もしくは $2000/\text{mm}^3$ 以下で 39.5°C 以上の体温が認められるときと規定した。まず、減少症となったときに治療的に組換えイヌ G-CSF を投与する方法を試みた。 $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与することにより約 1.5 日の顆粒球減少期間の短縮が見られた。次に、顆粒球数に関係なくサイクロフォスファミドの投与後 2～4 または 3～6 日の 3 日連続で組換えイヌ G-CSF を $2.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与する予防的方法を試みたところ、顆粒球数の最低値からの回復に要した日数および顆粒球数が $2000/\text{mm}^3$ 以下の期間が有意に短縮した。従って本研究において発現・精製した イヌとネコの組換え G-CSF は有効で安全な伴侶動物用の好中球数回復剤となり得る可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

本論文は伴侶動物臨床における癌化学療法、敗血症あるいは感染症などで起こる好中球減少症の治療に際し、副作用の無い治療薬を開発することを目的としてイヌおよびネコの顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)遺伝子や蛋白質の単離および臨床応用への有効性を調べた結果をまとめたものである。

- ① G-CSF は骨髓細胞に作用して好中球分化を促進し、また、好中球を末梢血へ動員するとともに活性化することが知られている。本研究ではネコ G-CSF 遺伝子全容を明らかにして、cDNA の全長を RT-PCR 法によりクローニングし、塩基配列を決定した。ネコ G-CSF は 21 アミノ酸残基のシグナルペプチドを含む 195 アミノ酸残基からなることを示した。cDNA の全長を組み込んだ組換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞(Sf21)に感染させて組換えタンパク質を発現させて、感染細胞の培養上清を用いた結果、白血球を増加させる有効な生物活性を得た。次いで組換えタンパク質を大量に得るために大腸菌で発現させたところ封入体を形成したのでこれの再生を試みて、アフィニティカラムを用いて精製した。精製標品はヒト G-CSF の 3 分の 1 の生物比活性を示した。これを 2 日間連続でネコに投与したところ、好中球数が約 4 倍に増加した。11 日間連日投与においては、約 10 倍に達した。組換えネコ G-CSF 投与による臨床的な異常は認められず、投与を止めると白血球数は速やかに投与前のレベルへと戻り、標品の有効性を初めて証明した。
- ② 組換えイヌ G-CSF についても枯草菌ブレベバチルスを用いた発現・精製と生体での効果を調べた。イヌ G-CSF の 17 番目のシステイン残基をセリンに置換したイヌ G-CSF (C17S) の cDNA を合成し、*B. chosinensis* HPD31 株で発現させた。C17S 型の上清は、野生型イヌ G-CSF のそれよりも高い生物活性を示した。組換えイヌ G-CSF(C17S)の精製を試みて、高

度精製品を得た。これをイヌに連日投与したところ、総白血球数は上昇した。また、投与中止後の好中球数の回復や臨床障害などでは異常は観察されないことから、臨床応用への期待がもたれる。

- ③ サイクロフォスファミドで誘導した好中球減少症に対する組換えイヌ顆粒球刺激因子による改善についても調べるために、顆粒球減少症を誘導したあと治療的に組換えイヌ G-CSF を投与した。投与することによって顆粒球減少期間の短縮が認められた。また、予防的効果についても、顆粒球数の回復の短縮の好成績を得ている。

これらの結果は、本研究で発現・精製した イヌとネコの組換え G-CSF は有効で安全な伴侶動物用の好中球数回復剤となり得る可能性を示しており、臨床応用に利用できることを明確にした。

これらの研究の成果は、下記の国際科学雑誌 6 編に掲載されている。

「公表論文」

- (1) A. Yamamoto, A. Iwata , T. Saito , F. Watanabe , S. Ueda, Expression and purification of canine granulocyte colony-stimulating factor (cG-CSF). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 130 巻 221 頁～225 頁(2009 年)
- (2) A. Iwata, A. Yamamoto, M. Fujino, I. Sato, T. Hosokawa-Kanai, K. Tuchiya, A. Ishihama, Y. Sokawa, High level activity of 2', 5'-oligoadenylate synthetase in dog serum. *Journal of Veterinary Medical Science* 66 巻 721 頁～724 頁(2004 年)
- (3) A. Yamamoto, A. Iwata, T. Saitoh, K. Tuchiya, T. Kanai, H. Tsujimoto, A. Hasegawa, A. Ishihama S. Ueda Expression in Escherichia coli and purification of the functional feline granulocyte colony-stimulating factor. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 90 巻 169 頁～177 頁(2002 年)
- (4) A. Yamamoto, A. Iwata, K. Tuchiya, A. Katsumata, K. Oishi, T. Saito, H. Tsujimoto, A. Hasegawa, S. Ueda, Molecular cloning and expression of the cDNA encoding feline granulocyte colony-stimulating factor, *Gene* 274 巻 263 頁～269 頁(2001 年)
- (5) A. Yamamoto, A. Iwata, Y. Koh, S. Kawai, S. Murayama, K. Hamada, S. Maekawa, S. Ueda, Y. Sokawa, Two types of chicken 2',5'-oligoadenylate synthetase mRNA derived from alleles at a single locus, *Biochem. Biophys. Acta* 1395 巻 181 頁～91 頁(1998 年)
- (6) X. Xuan, K. Tuchiya, I. Sato, Y. Nishikawa, Y. Onoderaz, Y. Takashima, A. Yamamoto, A. Katsumata, A. Iwata, S. Ueda, T. Mikami, H. Otuka, Biological and immunogenic properties of rabies virus glycoprotein expressed by canine herpesvirus vector, *Vaccine* 16 巻 969 頁～76 頁(1998 年)

【特許】

- (1) ヘモフィルス・パラガリナルム由来新規ポリペプチドとその遺伝子及び製法：山元哲、永野哲司、長井伸也、林志鋒、中村俊博 平成 16 年 2 月 26 日 特許開 2004-057078
- (2) イヌ化抗体の作成方法および使用：岩田晃、山元哲、藤野美由紀、勝俣淳、金井朋子、佐藤一郎、土屋耕太郎、平成 21 年 2 月 20 日 登録番号 2009-4263951