

猫伝染性腹膜炎の予防・治療法開発に重要なツールとなる ネコ骨髓細胞由来マクロファージ作製法の確立

Establishment of macrophage differentiation-inducing method from bone-marrow cells that is useful tool for developing the prevention and treatment methods of feline infectious peritonitis.

東京農工大学大学院 農学研究院 獣医微生物学研究室 谷口 隆秀
Takahide Taniguchi, Tokyo University of Agriculture and Technology

キーワード：猫伝染性腹膜炎ウイルス・マクロファージ・分化・GM-CSF・M-CSF

keywords：Feline Infectious Peritonitis・virus・Macrophage・differentiation・GM-CSF・M-CSF

1. 緒論

猫伝染性腹膜炎(FIP)はコロナウイルス科に属する猫伝染性腹膜炎ウイルス(FIPV)によって引き起こされる、猫科動物の致死的な慢性・進行性の免疫介在疾患である¹⁾。FIPは有効なワクチンが開発されておらず、治療法も確立されていないことから、発症すると100%死に至る予防・治療法の無い猫科動物の最も重要な感染症の1つである。ワクチン開発が困難な原因は、宿主が産生した抗体がFIPVと結合すると、マクロファージ系細胞がFcレセプターを介して抗体に結合したFIPVを効率よく取り込み、ウイルスの増殖を助けるとともに炎症性サイトカインを大量に産生する「抗体依存性感染増強(ADE)」が起り、より病態が悪化するためである^{2,3)}。FIPの主要な病態である全身の高度な炎症はFIPV感染マクロファージによって産生される炎症性サイトカインによるものであり、「FIPVのマクロファージへの感染をいかに制御するか」がFIPの予防・治療法の確立に重要であるが、現在は研究に用いる猫マクロファージを安楽死させた猫の肺から回収した少量の肺マクロファージとして得ており、研究を進めるための十分なマクロファージを準備することが困難で、予防・治療法の開発が遅々として進まない。猫の犠牲をできるだけ少なく、研究開発に十分な量のマクロファージを得られる技術の開発が非常に重要となっている。

そこで本研究では、ネコ骨髓細胞を *in vitro*

でマクロファージへ効率的に分化誘導し大量のマクロファージを調製するための技術開発を試みた。

2. 材料と方法

2-1. マクロファージ分化誘導のための サイトカインの作製

既報の遺伝子情報を基に猫顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(fGM-CSF)、豚コロニー刺激因子-1(PoCSF-1)cDNA増幅のためのプライマーおよび両遺伝子を合成した。

得られたfGM-CSF cDNAおよびPoCSF-1 cDNAを哺乳類細胞発現ベクターpcDNA3および大腸菌発現ベクターpET32に挿入し、組換えfGM-CSF、PoCSF-1産生用プラスミドを作製した。

作製した大腸菌発現ベクターを蛋白発現用大腸菌BL21(DE3)に導入し、IPTG(最終濃度100 μ M)を添加して組換えfGM-CSFおよびPoCSF-1産生を誘導後、ヒスチジン-タグを用いて各組換えタンパク質を精製した。

哺乳類細胞発現プラスミドをCos7細胞(アフリカミドリザル腎臓由来)に導入し、一過性に組換えfGM-CSFおよびPoCSF-1細胞培養上清中に大量発現させた。培養上清は1mlずつ分注し、使用するまでの間、-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

2-2. ネコ末梢血単核細胞の培養とマクロ ファージへの分化誘導

雑種猫5匹から合計約5mlの血液を、抗凝固

剤としてクエン酸ナトリウムを用いて採取した。Ficoll (比重 1.077) を用いて猫白血球(単核細胞)を分離・回収し、PBS(-)を用いて3回洗浄後に 37°C 5%CO₂ 下で培養した。培養液には RPMI1640 培地 (FCS: 牛胎児血清 10%添加) を用い、組換え fGM-CSF, PoCSF-1 の添加の有無により 4つの培養条件を設定した(条件 1: fGM-CSF, PoSCSF-1 培養上清をそれぞれ 25%添加、条件 2: fGM-CSF 培養上清を 25%添加、条件 3: PoSCSF-1 培養上清を 25%添加、条件 4: fGM-CSF, PoSCSF-1 培養上清とも無添加)。

それぞれの条件下で 10 日間培養・観察し、細胞の写真撮影を行った。

3. 結果

3-1. 組換え fGM-CSF および PoCSF-1 の作製

発現用プラスミド, pET32 および pcDNA3, に組み込んだ fGM-CSF および PoCSF-1 の塩基配列を決定し、目的とする遺伝子が適切に発現されるように挿入されていることが確認された。

大腸菌発現系を用いた組換え fGM-CSF および PoCSF-1 の作製を行った結果、ヒスチジン-タグを用いて精製された組換え fGM-CSF と PoCSF-1 が大量に回収された (図-1)。

一方、哺乳動物細胞 (Cos7 細胞) を用いた組換え fGM-CSF および PoCSF-1 の一過性発現における培養上清をサンプルとして SDS-PAGE, Coomassie Brilliant Blue 染色を実施したところ、目視による発現は確認できなかった (Data not shown)。

3-2. 組換え fGM-CSF, PoCSF-1 を用いた単球のマクロファージへの分化誘導

組換え fGM-CSF あるいは PoCSF-1 添加群では培養 48 時間後には球形であった単球様細胞が培養フラスコ底面に付着して広がる様子が観察された。組換え PoCSF-1 添加群では、培養 96 時間後には多くの単球様細胞でフラスコへの付着と形態の変化が確認された (図-2 A)。

組換え fGM-CSF + PoCSF-1 添加群では単球様細胞の付着・形態変化が認められたものの、PoCSF-1 添加群と比べその変化は比較的弱く、一方で単核球と思われる小型球形の細胞の増殖が認められた (図-2 B)。

4. 考察

本研究の結果から、組換え fGM-CSF および PoCSF-1 を添加した培養系を用いることによ

て末梢血単球様細胞を付着性のマクロファージ様細胞に分化誘導させることが可能であることが示された。

組換え fGM-CSF を添加した培養系により猫骨髓細胞を樹状細胞へと分化誘導できることが報告されている⁴⁾。一方最近、組換え fCSF-1 レセプター発現細胞を用いた *in vitro* の研究では、PoCSF-1 及びヒト CSF-1 が fCSF-1 レセプター発現細胞の生存および増殖に効果的であることが明らかとなった⁵⁾。そこで、組換え fGM-CSF および PoCSF-1 の哺乳類培養細胞での一過性大量発現を実施し、回収した発現細胞培養上清を用いて末梢血単球の培養・分化実験を行った。

fGM-CSF 単独、PoCSF-1 単独および fGM-CSF + PoCSF1 併用での添加培地を用いて 10 日間の猫末梢血単核球培養を行った。その結果、fGM-CSF 単独添加群および fGM-CSF + PoCSF1 併用群では、単球のフラスコ底面への付着と軽度の形態変化が認められ、また小型単核球の増殖が確認された。一方、PoCSF-1 単独添加群では単球のフラスコ底面への接着し平坦に大きく広がったマクロファージ様細胞に分化した。組換え fGM-CSF と PoCSF-1 の併用群において、末梢血単球のマクロファージへの分化誘導能が PoCSF-1 単独添加群と比べ弱かった原因についてはさらに詳細な検討が必要であるが、組換え PoCSF-1 単独添加により猫末梢血単球が効率よくマクロファージ様細胞に分化誘導できることが明らかとなった。

マクロファージへの分化に用いる、哺乳動物細胞を用いて作製した組換え fGM-CSF および PoCSF-1 サンプルを SDS-PAGE, Coomassie Brilliant Blue 染色により検出・濃度推定を試みたが目視による発現は確認できなかった。そこで、抗 fGM-CSF 抗体、抗 PoCSF-1 抗体を作製し、ウエスタンブロット、ELISA による検出系の確立を検討することとした。抗体作製のための抗原として、大腸菌発現系での組換え fGM-CSF, PoCSF-1 作製を試みたところ、それらの組換えタンパク質を大量に精製することができた。

本研究で作製した組換え PoCSF-1 は採血により得た猫単核球を効率よくマクロファージへ分化誘導できることが明らかとなった。今後、PoCSF-1, fGM-CSF の検出・定量系を確立し、詳細な分化誘導条件を明確にするとともに、本実験で得られたデータを基に、猫骨髓細胞のマクロファージへの効率的な分化誘導法の確立を進

めていきたい。本研究の成果で分化させたマクロファージは、低い侵襲性でかつ猫を犠牲にすることなく得ることができ、猫伝染性腹膜炎の予防・治療法開発のためのツールとして有効であると思われる。今後、今回確立されたマクロファージ分化誘導系を活用し、FIPV の病原性に関わる分子、シグナル伝達系を明らかにしていきたい。

5. 参考文献

- 1) Pedersen NC. 2009. J. Feline Med. Surgery. 11:225-258.
- 2) Olsen CR. et al. 1992. J. Virol. 66:956-965.
- 3) Corapi WV. et al. 1992. J. Virol. 66:6695-6705.
- 4) Dunham SP., Bruce J. 2004. GENE 332:97-106.
- 5) Gow. JD. et al. 2013. Cytokine 61; 630-638.

M 1 2

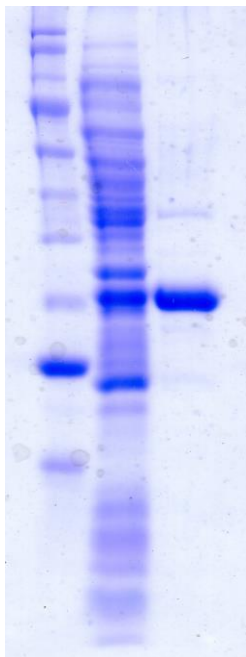
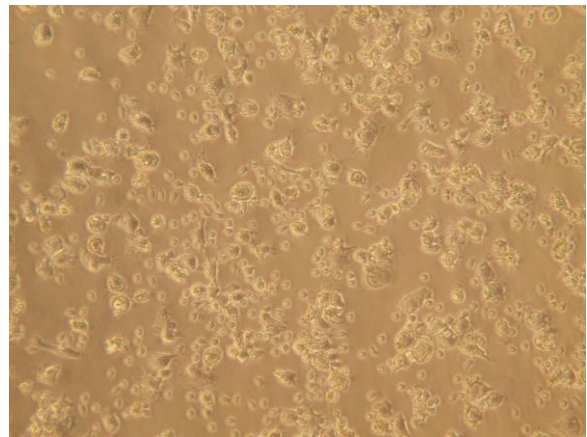


図1 大腸菌発現系による組換え fGM-CSF の発現

- M : 分子量マーカー
- 1 : fGM-CSF 発現大腸菌サンプル
- 2 : 精製 fGM-CSF

2-A



2-B

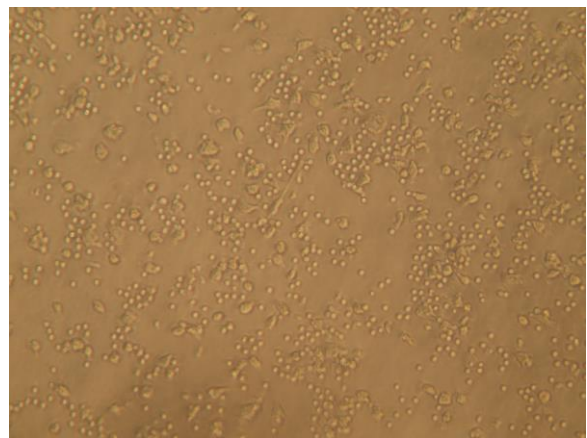


図2 分化誘導後の猫末梢単核球

- A : PoCSF-1 添加群
- B : fGM-CSF + PoCSF-1 添加群