GcMAF及びその前駆体のマクロファージ活性化能に関する研究

【序論】マクロファージは生体防御のフロンティアである自然免疫の主要なプレーヤーであり、免疫の低下や異常によって引き起こされるリューマチ、糖尿病、エイズ、癌といった種々の疾患に対する防御機能を有している。我々は、マクロファージを活性化させる因子の前駆物質である血清糖タンパク質 Gc グロブリンに着目している。Gcグロブリンは B 細胞や T 細胞といった免疫担当細胞により糖鎖切断を受け、N-acetylgalactosamine 末端を有する GcMAF（別名：DBP-maf）に変換されることが知られており、GcMAF はマクロファージ活性化や血管新生阻害作用を介した抗腫瘍効果が報告されている。しかし、GcMAFを用いた癌免疫療法の問題点として、Gcグロブリンの亜型（1f, 1s, 2のホモおよびヘテロ二量体）による糖鎖構造の違いがGcMAFの製造を困難にしている点が挙げられる。そこで今回、Gcグロブリンの亜型に共通する糖構造であるβ－ガラクトースのみを人工的に切断して生成したプレMAF（GcX）を使用すれば、生体内において常在性シアリダーゼによってGcMAFに変換されマクロファージ活性化能を示すのではないかという仮説を立て、その検証を行った。

【材料および方法】ヒト血清から25(OH)D_3アフィニティーカラムを用いて精製したGcグロブリン（1f1f, 1s1s, 22）について、β－ガラクトシダーゼによる酵素処理を行い$Gc_{1f1f}X$, $Gc_{1s1s}X$, $Gc_{22}X$を得た。糖鎖構造は特異的レクチンを用いたウェスタンブロットにより確認した。マクロファージ貪食活性化能の評価は、マウス腹腔から回収したマクロファージに、10 ng GcMAF、 1 μg LPS、未処理もしくはマウス腹腔液で1時間処理した各GcX（10 ng）を添加して37 ℃で3時間培養し、さらにオプソニン化した0.5% SRBCを加えて90分間貪食させ、細胞を固定してギムザ染色した後顕鏡し、貪食したSRBC数をカウントして貪食能を評価した。

【結果および考察】GcMAF、LPS、およびマウス腹腔液で処理した$Gc_{1f1f}X$は、コントロールと比較して有意な貪食能を示し（$p < 0.005$）、その比活性は1.6倍程度とすべて同レベルの値を示した。一方、未処理の$Gc_{1f1f}X$はコントロールに対して0.93倍の比活性であり、有意な貪食能を示さなかった。$Gc_{1s1s}X$はコントロールと比較して有意な貪食能を示し（$p < 0.05$）、その比活性は1.44倍とGcMAFおよびLPSと同等の値を示した。また、$Gc_{22}X$もコントロールと比較して有意な貪食能を示し（$p < 0.05$）、その比活性は1.58倍とGcMAFと同等の値を示した（Anticancer Research,

31(7), 2489-92, 2011)。一方、$Gc_{1s1s}X$ および $Gc_{22}X$ は $Gc_{1f1f}X$ と異なりマウス腹腔液で処理してもその活性値はほとんど変化しなかった。以上の結果より、$Gc_{1f1f}X$ 単独ではマクロファージ活性化能を有さず、マウス腹腔液中に含まれる T 細胞の常在性シアリダーゼによる糖鎖切断を受けて GcMAF に変換されることでマクロファージ活性化能を示すことが示唆された。また、1s1s および 22 型の Gc グロブリンはβ－ガラクトシダーゼ処理のみでマクロファージ活性化作用を有することが明らかとなった。この理由として N-acetylgalactosamine 末端に対してシアル酸修飾が無い、もしくは少ないためによると考えられる。

【結論】$Gc_{1f1f}X$ は生体内において GcMAF と同様にマクロファージ活性化能を有する可能性が示された。また、1s および 2 のホモ二量体 Gc グロブリンは、β－ガラクトシダーゼ処理のみでマクロファージ活性化体に変換されることが明らかとなった。