

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 10 年度博士課程 入学

氏 名 角田 茂

指導教官氏名 岩倉 洋一郎

論文題名 遺伝子欠損マウスを用いたサイトカインの抗腫瘍作用の解析

サイトカインはリンパ球やマクロファージ、造血系細胞、繊維芽細胞、ケラチノサイトなどの種々の細胞から産生される、すなわち“多数の異なる細胞から産生され、多数の異なる細胞に働きかけるポリペプチド”として定義され、インターロイキン (interleukin: IL) や腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF)、インターフェロン (interferon: IFN) などが含まれる。これらサイトカインは複雑なネットワークを形成しながら、細胞の生死や増殖、分化の調節など多様な生理作用を持つことが知られている。がん細胞に対しても同様に生死や増殖に作用することが投与実験から示され、さらには免疫系の活性化を調節している因子でもあることから、がんの発生や進行、転移の過程で少なからず影響を与えていると推測されていた。しかし、がんと内因性のサイトカインとの関わりについては、これまでほとんど解析がなされていなかった。

一方、近年の発生工学の進歩により数多くのサイトカイン遺伝子欠損 (KO) マウスが作製され、内因性のサイトカインの役割の解析に非常に有効な手段として研究に用いられている。そこで本研究では、サイトカイン KO マウスを用いることにより内因性のサイトカインの抗腫瘍作用について検討を行った。サイトカインとしては、がん細胞に対する増殖抑制などの作用を持ち、さらには免疫機能の調節にも重要な役割を担っている炎症性サイトカイン IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 に注目した。

第 1 章では、KO マウスを用いた *in vivo* の抗腫瘍作用として 2 つのステップ、すなわち、すでに発生したがん細胞の排除の過程と、化学誘導または遺伝子変異によるがん細胞の発生の過程について、それぞれサイトカインの役割を検討した。

まず可移植性腫瘍細胞株・B16 悪性黒色腫 (melanoma) をマウス尾静脈内接種したときの転移数を指標として、がん細胞の排除におけるサイトカインの役割を評価した。IFN- $\gamma$ 、TNF-

$\alpha$ 、IL-1、IL-6 それぞれの KO マウスにおける B16 細胞の実験的転移は、IFN- $\gamma$  KO マウスのみで転移の亢進が認められ、他のサイトカイン KO マウスでは野生型と有意な差は認められなかった。このことは、これらサイトカインの中では、IFN- $\gamma$  が転移の抑制に特に重要であることを示している。IFN- $\gamma$  は B16 細胞に対して *in vitro* で増殖抑制作用があるだけでなく、免疫担当細胞の活性化にも関与していることから、次に IFN- $\gamma$  受容体 (R) KO マウスを用いることにより (IFN- $\gamma$ R KO マウスでは IFN- $\gamma$  による免疫担当細胞の活性化の可能性を排除できるため)、その作用部位について検討を行った。IFN- $\gamma$ R KO マウスにおける B16 の実験的転移は野生型と差がなかったことから、IFN- $\gamma$  は B16 細胞に対して直接作用することにより転移を抑制していることが明らかになった (図 1A)。一方では、B16 移植後の生存日数および皮下移植による腫瘍形成実験においては、IFN- $\gamma$ R KO マウスは野生型と IFN- $\gamma$  KO マウスの中間的な値を示すことがわかった (図 1B)。このことから、転移初期の抑制は IFN- $\gamma$  の腫瘍細胞に対する直接の作用が特に重要であり、宿主側の抗腫瘍機構の活性化作用は後期の腫瘍形成の時期に必要なことが示唆された。

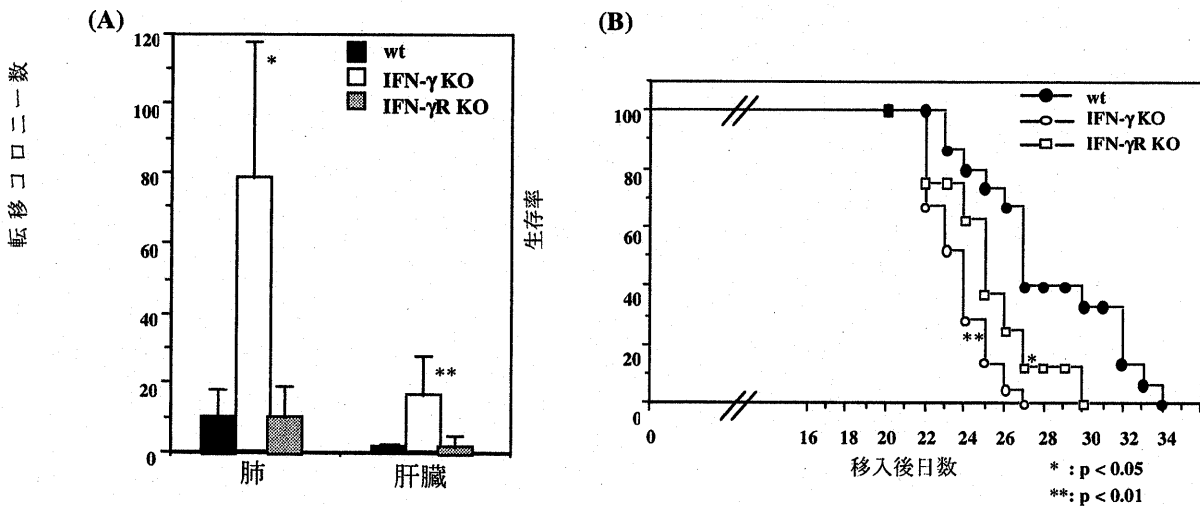


図 1 IFN- $\gamma$  および IFN- $\gamma$ R KO マウスにおける B16 悪性黒色腫の実験的転移

(A)  $1 \times 10^5$  細胞を尾静脈より移入し、14 日後の肺および肝臓での B16 の転移数

(B)  $1 \times 10^5$  細胞を尾静脈より移入したときの生存日数

次に、がん細胞の発生過程からのサイトカインの役割を評価するために、まず化学発癌剤・メチルコラントレン (methylchoranthrene: MCA) 投与による化学誘導発がんを IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  KO マウスで検討した。IFN- $\gamma$  KO マウスでは発症の早期化が認められたが、これに対して TNF- $\alpha$  KO マウスは野生型と同じであった。MCA 誘導発がんは宿主側の免疫監視機構が発症の抑制に重要な役割を果たしていることが知られており、IFN- $\gamma$  の重要性と TNF- $\alpha$  は関与していない

ことが示唆された。

続いて、遺伝子の変異による自然発症としてヒト家族性大腸ポリープ症のモデルマウスである *Apc<sup>Min</sup>* (adenomatous polyposis coli / multiple intestinal neoplasia) マウスとこれらのサイトカイン KO マウスとの交配することによって、腸管ポリープ形成におけるサイトカインの関与を検討した。*Apc<sup>Min</sup>* マウスは加齢に伴って主に小腸に多数のポリープを形成するが、IFN- $\gamma$  KO マウスでは野生型とほぼ同様であり、ポリープ形成においては IFN- $\gamma$  は抑制には関与していないことがわかった。この結果は、ポリープ形成の抑制に免疫監視機構は機能していないとの報告と一致していた。TNF- $\alpha$ 、IL-6 KO マウスについても野生型と同じ発生数であった。一方、IL-1 の内因性抑制因子である IL-1Ra (receptor antagonist) の KO マウスとの交配により小腸においては有意なポリープ形成の早期化が認められ、さらに大腸においてはポリープ発生数が著しく増加していた (図 2 A)。このことから、IL-1Ra がポリープ形成抑制に重要な役割を担っていることが示唆された。しかし、IL-1 KO マウスでは野生型と変わらないポリープ形成が認められたことから、他のサイトカインによって IL-1 の機能が代償されている可能性が示唆された (図 2 B)。IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1Ra は腸管ポリープ形成に伴いポリープ局所で強く発現が誘導され、ポリープ形成に対してプロモーション作用を持つ COX (cyclooxygenase) -2 の mRNA の発現誘導に作用していると考えられたが、予想に反して IL-1 KO、IL-1Ra KO マウス共に発現レベルに野生型と大きな差はなかったことから、ポリープ局所での COX-2 の誘導に IL-1 は関与していないことが示唆された。一方、ポリープ形成促進作用が知られている核内受容体 PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) - $\gamma$  の発現が IL-1Ra KO マウスではポリープ局所で亢進していることから、IL-1 によるポリープ形成促進は PPAR- $\gamma$  の系を介している可能性が示唆された。

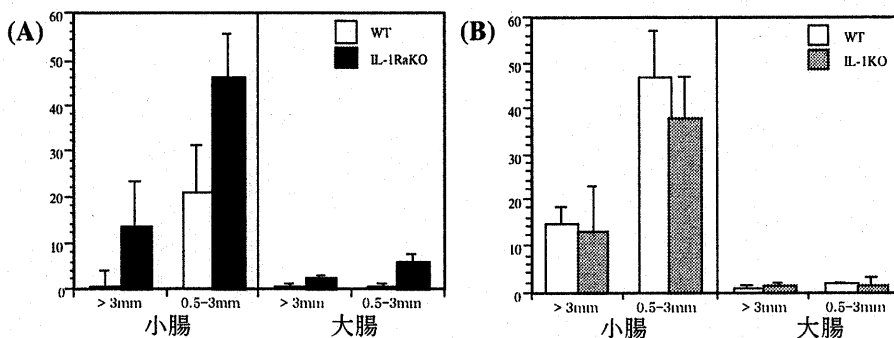


図 2 *Apc<sup>Min</sup>* x KO マウスの腸管ポリープの形成数

(A) 4ヶ月齢における *Apc<sup>Min</sup>* x IL-1Ra KO マウスのポリープ形成数

(B) 6ヶ月齢における *Apc<sup>Min</sup>* x IL-1 KO マウスのポリープ形成数

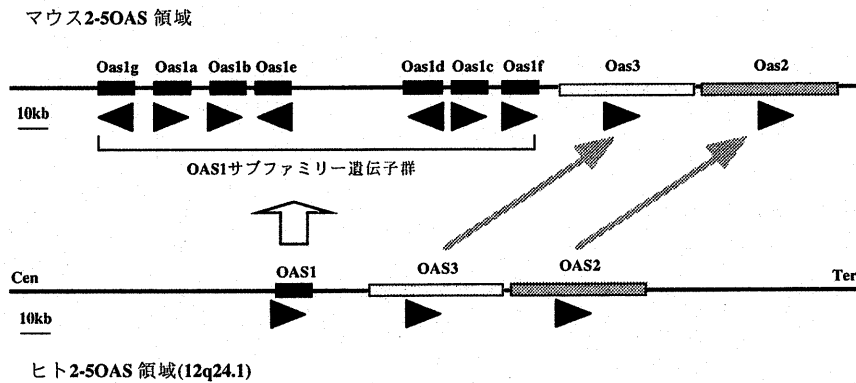


図3 マウスとヒトの2-5OASゲノム領域を比較した模式図

矢頭は遺伝子の転写方向を示す

第2章では、IFNは腫瘍細胞に対して増殖抑制やアポトーシスの誘導など直接作用することが重要であることを第1章で明らかにしたことから、その作用を担う細胞内シグナル伝達経路にも着目した。IFN- $\gamma$ 処理によってB16悪性黒色腫細胞に強く誘導される遺伝子の中で、2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素(2',5'-oligoadenylate synthetase: 2-5OAS)遺伝子はその候補遺伝子の一つと考えられたことから、2-5OASの抗腫瘍機能を検討するために、KOマウスの作製を試みた。まず、KOマウス作製に先立ってマウス2-5OAS遺伝子の構造の解析を行った。マウスゲノムDNAの解析、およびEST(expression sequence tag)データベースの検索から新規のマウス2-5OAS遺伝子を6つクローニングすることに成功した。その結果、ヒトでは独立した4つのクラスの遺伝子からなるファミリーを形成しているが、マウスではその中の2つのクラス(OAS1、OASL)で遺伝子増幅を起こしてサブファミリーを形成しており、少なくとも計11の遺伝子からなることを明らかにした。同時にゲノム構造も解析し、OAS1サブファミリー遺伝子(少なくとも7つ)、Oas3、Oas2が約220kbの領域にクラスターを形成していることがわかった(図3)。2-5OASファミリー遺伝子mRNAの発現は、IFN誘導剤であるpoly I:C刺激により全て誘導されるが、未刺激状態での各臓器ごとの発現分布はそれぞれ異なっていた。この結果から、これらの遺伝子間で機能の相違があることが示唆された。また、大腸菌内で発現させた組み換えタンパク質を用いた実験から、全ての2-5OASファミリー分子は二本鎖RNAとの結合能は有しているが、マウス特有の遺伝子群については酵素活性を欠くことがわかった。このことはATP結合モチーフに変異があるなどのアミノ酸配列上の特徴とも一致しており、これらの分子が古典的2-5Aシステムの制御には関与していないことが予想された。以上の結果を踏まえて、2-5OAS遺伝子ファミリーの中で、その原型であり最も基本的な遺伝子Oas1aのKOマウスの作製を行い、生殖系列への伝達に成功した。今後、2-5OAS遺伝子の個体における生理機能の解析、抗腫瘍作用の解析に非常に有用であると考えられる。