

博士論文

モルモットサイトカイン遺伝子の単離及び機能解析

白鳥 行大

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 大阪府立成人病センター

所属 (主指導教官)	大阪府立成人病センター (瀬谷 司)		
氏名	白鳥 行大	提出	平成 15年 1月 7日
題目	モルモットサイトカイン遺伝子の単離及び機能解析		
要旨	<p>末梢の機能型ヘルパーT 細胞が司る高次免疫システムは細胞性免疫(Th1)及び体液性免疫(Th2)に分類される。この2つの異なる細胞集団が織り成す免疫応答は個々が産生するサイトカインによって厳密に制御され、かつその絶妙なバランスが生体内における免疫システムの恒常性を規定する。多くの細菌感染症や自己免疫疾患はこの免疫バランスの破綻が起因となって発症するが、その中でも Th1 応答の惹起が必須な種々の細菌感染症において、モルモットはヒトに近い病態を示す。事実、古くから有名である結核菌、リステリア菌あるいはジフテリア菌感染症モデルの有効性は近年分子レベルで証明されつつあり、ワクチン開発を中心とする創薬の現場で得られる知見は重要な位置を占める。</p> <p>しかしモルモットに関しては依然として遺伝子配列などの分子生物学的な情報が絶対的に不足しており、分子レベルでの有効性評価は他の実験動物に大きな遅れをとっている。特に今後の課題でもある上述の細菌感染症や多様な進行癌に対する治療法の開発を考えた場合、宿主側の Th1 応答を惹起する免疫療法は極めて有効な手段であり、その中心を担うサイトカインの遺伝子情報は必須となる。</p> <p>報告者は以上の理由から、主に抗原提示細胞が産生する Th1 型サイトカインのうち、未報告であった IL-12、IL-23 及び IL-18 モルモット遺伝子の単離同定を試みた。さらにヒト、マウスを対照とする比較解析から、各分子の発現制御及び生理活性などの基礎的な分子性状を明らかにするとともに、in vivo への応用をモルモット坦癌モデルで試みた。以下①～④に得られた知見を要約する。</p> <p>① IL-12 は互いに相同性を持たない p35 及び p40 サブユニットからなるヘテロダイマー(p70)であり、Th1 レスポンスの中心を担う。ヒト IL-12 は p35 分子によって規定される種特異性のためマウス細胞群に活性を示さない。従って、ヒト IL-12 を評価する前臨床動物モデルはその使用範囲が限られてきた。今回報告者はヒト、モルモット IL-12 の各サブユニットを置換したキメラ型 p70 を作成し、両種間における比活性を検討した結果、ヒト、モルモット間に生理活性を規定する種特異性は認められず、ヒト IL-12 を評価する実験小動物としてモルモットが有効であることを明らかにした。一方、モルモットでは p40 及び</p>		

p40 を含むであろう高分子複合体が精巢におけるリプロダクトシステムの構築に關与する可能性が高いことを組織別の発現プロファイルで明らかにした。

② IL-23 は最近になって同定された IL-12 ファミリーであり、新規 p19 分子及び IL-12 p40 分子がジスルフィド結合を介してヘテロダイマーを形成する。基本的には IL-12 様の生理活性を持つサイトカインと考えられているが、今回報告者は種々の菌体成分で刺激を行ったモルモットマクロファージにおける IL-12 及び IL-23 の発現プロファイルを比較検討し、*E. coli* 由来の LPS 刺激では IL-12 (p35/p40) が、一方 *S. aureus* 由来の peptide glycan 刺激では IL-23 (p19/p40) が有意に発現誘導されることを明らかにした。即ち、抗原提示細胞が発現する一連の菌体成分認識レセプター TLR に依存して IL-12 及び IL-23 の発現プロファイルは異なり、TLR シグナルの多様性が示唆された。また、モルモット脾細胞では IL-23 に濃度依存的な細胞増殖活性が認められるのに対し、ヒト PBMC では IL-23 に細胞増殖活性は認められず、ヒト、モルモット間に興味深い種差が存在することを明らかにした。

③ IL-18 は IL-1 $\beta$  と構造的な類似性をもつ細胞質型サイトカインで、前駆体はプロテアーゼ Caspase-1 によるプロセッシング後、活性型として分泌される。今回報告者はモルモット及びヒト IL-18 前駆体がヒト Caspase-1 により 18 kDa の活性型にプロセッシングされ、この活性型 IL-18 のみが IL-12 存在下、ヒト PBMC 及びモルモット脾細胞の IFN $\gamma$  産生を増強することを明らかにした。一方、モルモット、ヒト、マウス前駆体の発現を SDS-PAGE で比較した結果、理論上の分子量差に反したモルモット前駆体に特異的なサイズ差を確認した。そこで質量分析を行った結果、1) PAGE 上で認められるサイズ差は実測質量値の差を反映しない、2) 他の多くの細胞質タンパク同様、IL-18 前駆体は開始メチオニンのプロセッシングからアラニン残基のアセチル化へと続く N 末端に特異的な保護修飾をうけることを明らかにした。また *P. acnes* 投与による内因性 IL-18 の発現誘導及び活性化をタンパクレベルで確認した結果、非投与群に比べ腹腔浸潤細胞、脾臓及び PBMC において IL-18 の発現が著名に増強されていること、ただしその発現はいずれも前駆体であり、菌体成分による再感作を行っても活性型へのプロセッシングは認められないことを明らかにした。

④ モルモット担癌モデルに対する IL-12 及び IL-18 の抗腫瘍活性はリコンビナント体で評価した。解析に使用した Line10 ヘパトーマは抗原性が低く、原発巣における腫瘍の増大に引き続き、所属リンパ節への転移を伴う悪性度が極めて高い腫瘍細胞である。今回検討を行った投与スケジュールでは IL-12 投与群に明確な抗腫瘍活性(腫瘍形成及びリンパ節転移の抑制)が認められた。一方、IL-18 単独投与群及び IL-12/IL-18 併用群に関しては腫瘍形成が若干抑制されるものの、IL-12 投与群のような明確な抗腫瘍活性は認められないことを明らかにした。

# 目次

	頁
略語表	i
序章	1
第1章 モルモット IL-12 遺伝子の同定及び機能解析	
1-1 実験方法	4
1-2 実験結果	9
1-3 考察	16
第2章 モルモット IL-23 遺伝子の同定及び機能解析	
2-1 実験方法	18
2-2 実験結果	22
2-3 考察	28
第3章 モルモット IL-18 遺伝子の同定及び機能解析	
3-1 実験方法	31
3-2 実験結果	36
3-3 考察	45
第4章 モルモットサイトカイン遺伝子の分子進化	
4-1 実験方法	47
4-2 実験結果及び考察	49
第5章 Line10 坦癌モルモットで評価する IL-12 及び IL-18 の抗腫瘍効果	
5-1 実験方法	54
5-2 実験結果及び考察	59
終章	66
謝辞	67
参考文献及び付録(supplement)	I

## 略語表

APC	: antigen presenting cell
bp	: base pair
BSA	: bovine serum albumin
CD	: cluster of differentiation
cDNA	: complementary DNA
CNTF	: ciliary neurotrophic factor
cpm	: counts per minute
D-PBS	: Dulbecco's phosphate buffered saline
D-MEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	: ethylenediaminetetraacetate
ELISA	: enzyme linked immunosorbent assay
FCA	: Freund's complete adjuvant
FCS	: fetal calf serum
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GSP	: gene specific primer
HBSS	: Hank's balanced salt solution
IAA	: iodoacetamide
IFN	: interferon
IL	: interleukin
IPTG	: isopropyl-β-D-thiogalactoside
IgG	: immunoglobulin G
LMC	: lymphomyeloid complex
LPS	: lipopolysaccharide
MALP-2	: macrophage-activating lipopeptide-2
MHC	: major histocompatibility complex
mRNA	: messenger RNA
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NK	: natural killer
NO	: nitric oxide
NP-40	: Nonidet P-40
ORF	: open reading frame
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PBL	: peripheral blood lymphocyte
PBMC	: peripheral blood mononuclear cells
PCR	: polymerase chain reaction

PGN	: peptidoglycan
PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	: polyvinylidene difluoride
RACE	: rapid amplification of cDNA ends
RT	: reverse transcriptase
SDS	: sodium dodecyl sulfate
TBS	: Tris buffered saline
TCA	: trichloroacetic acid
TGC	: thioglycollate medium
Th	: helper T
TLR	: Toll like receptor
Tris	: tris (hydroxymethyl) aminomethane

## 序章

新薬開発早期の臨床試験で実験台にされる被験者を俗に隠語で「モルモット」と呼ぶことがある。これはかつてモルモットが実験動物の代表だったことに由来する比喩的な表現なのだが、もし単純に使用頻度だけで命名されたのであれば、今は「マウス」と呼ぶべきである。しかしそのような風潮はなく、恐らくそれ以上にこの比喩には「モルモットはヒトに似ている」という意味合いが強く含まれているのではないだろうか？。

実際、モルモットは古くからウイルス、細菌などの感染症モデルとして使用されてきた。これは多くの比較解析から、マウス、ラットに比べモルモットをヒト疾患モデルとして用いる利点、即ち発症(感染の成立)から治療法の開発に至る過程の多くでヒトとの重要な類似点が認められることに起因する(1)。以下にその根拠となる知見の幾つかを列挙するが、もちろんモルモットに特異的な性質も存在する。例えばインシュリンの同化作用および成長促進作用、また 6 量体を形成する性質は他の哺乳類では認められない(2)。

- (A)モルモット新生児のリンパ骨髄系器官(LMC)はヒト同様、高度に成熟している。
- (B)ヒト同様、ビタミン C の体内合成 (腸管内における L-グルン酸から L-アスコルビン酸への生合成)ができないため摂取による補給を必要とする。また欠乏は重度の栄養障害を引き起こす。
- (C)ヒト同様、コルチコステロイド耐性である。
- (D)抗生物質に対する感受性が高く、投与した場合、副作用として重度の腸炎を発症させる。
- (E)気道感染における肺の病理像はヒトに極めて類似する。
- (F)遅延型過敏反応において皮膚の炎症反応が認められる。

さらに重要な点として、近年の分子生物学的手法の進歩により、種々の細菌感染症モデルとしての有効性が分子レベルで証明されつつある。例えば齧歯類にはないと考えられてきた脂質抗原を提示する一連の分子群(CD1)が最近モルモットで同定され、結核菌を代表とする多くのマイコバクテリア由来の脂質抗原(ミコール酸、リポアラビノマンナン、グルコースモノマイコレート)を実際に提示することが明らかにされた(3-5)。近年、多型性の MHC によって提示されるペプチド抗原に加え、非多型性である CD1 によって提示される脂質抗原が感染時における宿主側の免疫応答に極めて重要であるという知見がヒトで蓄積されつつあり(6)、今後モルモットは有効なモデル動物として解析に繁用されると予想される。一方、リステリア菌の感染モデルとしての有効性も最近分子レベルで証明された。ヒトはリステリア菌の経口感染により重度の食中毒を発症する。従来よりモルモットではリステリア菌の経口感染

が認められていたが(マウス、ラットなどの齧歯類ではリステリア菌の経口感染は認められない)、Lecuit らはリステリア菌が宿主腸上皮細胞へ侵入する際にレセプターとして用いる E-cadherin のモルモット配列を同定し、リステリア菌の経口感染の有無(種特異性)がたった1アミノ酸の置換によって規定されることを明らかにした(7)。またジフテリア菌が感染時に産生する毒素(Diphtheria Toxin, DT)に関しても、ヒトは高感受性であるのに対し、マウス、ラットは抵抗性を示すことが知られている。この種特異性は構成サブユニットである DT-B と宿主側のレセプターである HB-EGF との結合親和性によって規定されるが、Kolibo らはモルモット細胞の DT-B に対する結合親和性がヒト同様極めて高いことを明らかにしている(8)。

以上より、今後もワクチン開発を中心とする創薬の現場においてモルモット感染モデルは重要な位置を占めることが予想される。しかしモルモットに関しては依然として遺伝子配列などの分子生物学的な情報が絶対的に不足しており、分子レベルでの有効性評価は他の実験動物に大きな遅れをとっているのが現状である。特に今後の課題でもある上述の細菌感染や多様な進行癌に対する治療法の開発を考えた場合、宿主側の Th1 応答\*を惹起する免疫療法は極めて有効な手段であり、その中心を担うサイトカインの遺伝子情報は必須となる。しかしヒト、マウスでは既に 50 以上の遺伝子配列が同定されているサイトカインも、モルモットの遺伝子情報に関しては下図に示した IFN $\gamma$ から IL-10 までの 10 種類のみと極めて少ない。

筆者は上述の理由から、細胞性免疫を惹起する Th1 型サイトカインのうち、未報告であった IL-12、IL-23 及び IL-18 モルモット遺伝子の単離同定を試みた。さらに、各分子の発現制御、生理活性などの基礎的な分子性状を明らかにするとともに、モルモット坦癌モデルを用いた in vivo への応用を試みた。以下に得られた知見を報告する。

\*末梢の機能型ヘルパーT細胞が司る高次免疫システムは細胞性免疫(Th1)及び液性免疫(Th2)に分類される。この2つの異なる細胞集団が織り成す免疫応答は個々が産生するサイトカイン(Th1細胞 $\rightarrow$ IFN $\gamma$ 、Th2細胞 $\rightarrow$ IL-4,-6,-10,-13)によって厳密に制御され、かつその絶妙なバランスが生体内の免疫システムの恒常性を規定する。多くの細菌感染症や自己免疫疾患はこの免疫バランスの破綻が起因となって発症するが、モルモットがヒトに近い病態を示すと考えられている上述の細菌感染症、あるいは悪性度の高い進行癌の多くでは Th1 応答の惹起が有効な治療手段となる。



## Guinea pig cytokines

Cytokine	cDNA
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Partial</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Full</b>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Full</b>
<b>GM-CSF</b>	<b>Full</b>
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	<b>Partial</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>Full</b>
<b>IL-2</b>	<b>Full</b>

Cytokine	cDNA
<b>IL-5</b>	<b>Full</b>
<b>IL-8</b>	<b>Full</b>
<b>IL-10</b>	<b>Full</b>
<b>IL-12</b> p35	<b>Full</b>
p40	<b>Full</b>
<b>IL-18</b>	<b>Full</b>
<b>IL-23</b> p19	<b>Full</b>

現在までに遺伝子情報が公開されているモルモットサイトカイン  
 斜体で示したサイトカインは、本研究において筆者が単離同定を試みたものである。

## 第1章 モルモット IL-12 遺伝子の同定及び機能解析

IL-12 は互いに相同性を持たない p35 及び p40 サブユニットがジスルフィド結合で会合したヘテロダイマー(p70)であり、主に樹状細胞やマクロファージといった抗原提示細胞(APC)より産生される(9, 10)。IL-12 は T、NK 細胞に作用し、細胞性免疫を賦活化する IFN $\gamma$ を強力に誘導することから Th1 応答の中心を担う(9, 10)。IL-12 が示す多くの治療効果において、中心的な役割を果たしている生物活性はこの IFN $\gamma$ 誘導であり、種々の腫瘍や感染症のマウスモデルにおける IL-12 の治療効果は、抗 IFN $\gamma$  中和抗体の同時投与により大幅に減弱、あるいは消失する(9, 10)。IFN $\gamma$ はウイルスを含む細胞内寄生型の細菌感染において Th1 細胞の分化 (T-bet、Th1 型サイトカインレセプターの誘導)及び抗原提示細胞 (NO, O<sub>2</sub>の産生)の活性化を誘導し、腫瘍モデルでは血管新生の抑制(IP-10)や原発腫瘍へのリンパ球浸潤に必須なケモカインを誘導するなどの Th1 活性を示す(11, 12)。しかし興味深いことに、これらの多くのモデルにおいて IFN $\gamma$ 療法は IL-12 療法に匹敵する効果を示さない(9-12)。従って、IL-12 によって惹起される免疫応答の中には、明らかに IFN $\gamma$ に依存しない重要な機構が存在する。事実、IL-12 や後述する IL-18 は IFN $\gamma$ 非依存的かつ非特異的に NK 細胞の細胞障害活性(Fas, perforin)や CTL 反応を増強する(9-12)。現在、以上の理由から種々の細菌感染症や腫瘍に対してより有効であろう IL-12 療法、さらに遡って IL-12 を誘導するアジュバント療法など、新たに提唱されている基本免疫療法を解析する前臨床動物モデルの構築が急務課題となっている(13)。序章でも述べたように筆者はこれら前臨床動物モデルをモルモットで構築すべく、本章では先にモルモット IL-12 遺伝子の同定及び機能解析を行った。なお、最近次々と同定されている IL-12 ファミリーとの構造的、機能的な関連性に関しては次章で考察する。また実際に坦癌モデルで検討した IL-12 療法の可能性に関しては最終章であらためて論じる。

### 1-1 実験方法

#### 1-1-1 実験動物

実験に用いた Hatley 系モルモット (8 週令、451~500g、雄) は日本エスエルシー株式会社より購入した。飼育及び実験に際する取り扱いに関しては大阪府立成人病センターが定めた規約に従った。

#### 1-1-2 モルモット腹腔浸潤細胞の調整

モルモットサイトカイン遺伝子の単離はチオグリコレート(TGC, Difco)培地で誘導

した腹腔浸潤細胞の mRNA をソースに行った。腹腔浸潤細胞の調製は定法に従い、3%TGC 培地 20ml を腹腔内に投与し、4 日後に放血致死させ回収した。回収した細胞は Tris-NH<sub>4</sub>Cl 溶液を用いた赤血球の溶血処理後、10%FCS-RPMI 培地(Gibco)に懸濁し、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で 2 時間培養を行い浮遊細胞を除去した。

#### 1-1-3 腹腔浸潤細胞 mRNA の調製及び cDNA ライブラリーの作成

腹腔浸潤細胞の mRNA は Fast Track mRNA Isolation kit (Invitrogen)を用いて回収した。また、PCR の鑄型に用いる cDNA ライブラリーは最終的に RACE 法で単離することを考え、Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech)を用いて作成した。両者ともプロトコールは付属のマニュアルに従った。

#### 1-1-4 PCR 法によるモルモット IL-12 遺伝子の単離

モルモット IL-12 遺伝子(p35/p40)の単離を行うにあたり、先にヒト、マウス IL-12 遺伝子の ORF 配列内で比較的保存されている部位に縮重プライマーを設定し、(1-1-3)で調製した cDNA を鑄型に PCR を行うことで部分配列を決定した。次いでこれらの部分配列をもとに遺伝子特異的(GSP)なプライマーを作成し、キット付属のアダプタープライマー(AP1/AP2)を併用した nested PCR (RACE)を行うことで全長配列を決定した。最後に全長から推測される ORF 配列に関しては fidelity の高い *pfu* DNA polymerase (Stratagene)を用いた PCR を再度行い、最低 5 クローンの塩基配列を両ストランドから確認した。なお、本実験で使用したプライマーセットは巻末サプリメントに全て表記した。

#### 1-1-5 Northern blot 解析

IL-12 mRNA の組織別発現分布は Northern blot で確認した。モルモット各臓器の total RNA は TRIZOL Reagent (Gibco) を用いて調製し、10 µg の total RNA をアガロースゲルで分離した。泳動ゲルの変性、中和からニトロセルロース膜 (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia)への転写までは定法に従い、<sup>32</sup>P で標識したプローブ(ORF 全長)のハイブリダイゼーションには ExpressHyb Solution (Clontech)を用いた。なお、補正用のβ-actin プローブは Rottoman らの報告 (14)に従い作成した。またリプローブは転写膜を沸騰した 0.1% SDS で数回洗浄することにより行った。

#### 1-1-6 ウサギ抗モルモット p40 抗体の作成

ウサギ抗モルモット p40 抗体を作成するにあたり、先に免疫原となるリコンビナント p40 を大腸菌で作成した。シグナル配列を除いたモルモット p40 配列を PCR で増幅し、C 末端に His タグ(His<sup>6</sup>)が付加されるようフレームをあわせ pET28b (Novagen)

に組み込んだ。形質転換体は BL21(DE3) 株(Novagen)で作成し、IPTG (1mM)で 4 時間誘導後、ニッケルカラム(QIAexpressionint, Qiagen)を用いて精製を行った。なお、精製は付属のマニュアルに記載された変性条件で行い、段階的な透析を行うことでリコンビナント体の再生操作を行った。ウサギへの免疫はフロイントの完全アジュバント(FCA)を用いた定法に従った。即ち、抗原 50~100 $\mu$ g (500 $\mu$ l)に対して等量の FCA (Difco)を加えたエマルジョンを免疫原とし、5 週にわたり週 1 回の免疫をウサギ(雌)の鼠径部リンパ節近傍に行った。その後、採取したウサギ抗血清に対して終濃度 33% となるよう硫酸アンモニウムを加え、沈殿した画分を精製 IgG 抗体として使用した。

#### 1-1-7 キメラ型 IL-12 の作成

モルモット及びヒト IL-12 の各サブユニット(p35/p40) を組み合わせたキメラ型リコンビナント(p70)を作成するにあたり、各遺伝子の ORF 配列を pME18S に組み込んだ発現ベクターを構築した。次に発現ベクターの各組み合わせ(p35/p40)を Lipofect AMINE PLUS (Gibco)を用いて COS7 細胞にトランスフェクションし、1%FCS-DMEM (Gibco)の条件で 24 時間培養後、キメラ型リコンビナントを含む培養上清を回収した。回収した培養上清は speed vac で 10 倍に濃縮後、IAA(1mg/ml)、PMSF(1mM)を加え、DPBS に対して 4°C、一晩の条件で透析を行った。透析後 0.22 $\mu$ m のフィルターを通すことにより濾過滅菌を行い濃縮培養上清とした。

#### 1-1-8 キメラ型 IL-12 の発現確認

COS7 細胞で作成したキメラ型 IL-12 の発現を Western blot により確認した。(1-1-7)で調製した濃縮培養上清 100 $\mu$ l に等量の 10% trichloroacetic acid (TCA)を加え、遠心した後のペレット画分を培養上清サンプルとして用いた。Western blot は福井らの報告に従った(15)。すなわち、7% の 2-mercaptoethanol (2ME)を含む還元型サンプル (5 分間煮沸)、及び非還元型サンプルを SDS-PAGE (10% acrylamide)で分離後、PVDF 膜に転写し、5%スキムミルク、0.1% Tween 20、0.5M NaCl を含む 20mM Tris buffer (TB, pH7.4) (blocking buffer)で 6 時間ブロッキングを行った。その後 blocking buffer で 1  $\mu$ g/ml に希釈したウサギ抗モルモット p40 ポリクローナル抗体もしくは 0.1 $\mu$ g/ml に希釈したヤギ抗ヒト IL-12 p70 ポリクローナル抗体(Genzyme Techne)と室温で 2 時間反応させた。次いで washing buffer で 10 分間の洗浄を 3 回を行い、blocking buffer で 1 万倍希釈した HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG もしくは HRP 標識ブタ抗ヤギ IgG (ともに Biosource)と室温で 1 時間反応させた後、ECL (Amersham Pharmacia) による発色、検出を行った。またプローブは転写膜を沸騰した熱湯で 1 分間洗浄することにより行った。(1-1-7)で作成した濃縮培養上清中のキメラ型 IL-12 の定量は Sandwich ELISA 法により行った。Sandwich ELISA 法には human IL-12 p70 Immunoassay 及び p40

Immunoassay (Genzyme Techne)を使用し、マニュアルは付属のプロトコールに従った。

#### 1-1-9 内因性 IL-12 タンパクの発現確認

腹腔浸潤細胞及び精巣における内因性 IL-12 の発現を Western blot により確認した。(1-1-2)で調製した腹腔浸潤細胞を 1%FCS-RPIMI 培地に懸濁し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 2 時間培養を行い浮遊細胞を除去した。その後、10µg/ml の LPS (*E.coli* 0127: B8, Difco)存在下及び非存在下で更に 24 時間培養を行い上清を回収した。なお、培養上清の濃縮は(1-1-7)に記載した方法に従う。精巣に関しては回収した組織に 100 mg/ml となるように 1 mM PMSF, 10 mM EDTA, 1 mg/ml IAA を含む Tris buffer saline (TBS, pH7.4)を加え、ポジトロンを用いて破碎した。4°C で 1 時間攪拌した後、4°C、15,000 rpm で 30 分間遠心を行い、上清をタンパク試料とした。精巣試料のタンパク濃度は protein assay kit (Bio Rad) を用いて測定し、BSA 当量で求めた。なお、Western blot の条件は使用した抗体を含め(1-1-8)に従う。

#### 1-1-10 ヒト末梢血単核球細胞(PBMC)に対するキメラ型 IL-12 の活性評価

##### 1) ヒト末梢血単核球 (PBMC)及びヒト末梢血リンパ球(PBL)の調製。

ヒト PBMC は健常ドナーから採血した血液より調製した。あらかじめ 200µl のヘパリンを加えた 50ml のコーニングチューブに採血した血液を 20ml 加え、転倒混和した後、室温、2000rpm で 10 分間遠心を行いプラズマ画分を除去した。次に生理食塩水を加え 45ml までメスアップし、2%メチルセルロースを 5ml 加え転倒混和した後、室温に 45 分間静地した。上層を室温、2000rpm で 10 分間遠心し、得られた沈殿画分を 4ml の RPMI 培地に懸濁した後、あらかじめ 4ml の Ficol Paque Plus (Pharmacia)が入った 15ml のコーニングチューブに静かに重層した。重層後のチューブを室温、2000rpm で 30 分間遠心し、得られた中間層を回収後、再度 10 分間の遠心を行った。沈殿した細胞画分は RPMI 培地で 2 回洗浄した後 10%FCS-RPMI 培地に懸濁し、以後の実験に用いた。PBMC に含まれるリンパ球の精製には MACS 磁気ビーズシステム(MiltenYi Biotec, Bergisch Gladbach)を使用し、CD14 ネガティブである細胞画分を PBL とした。なお、プロトコールは付属のマニュアルに従った。

##### 2) 細胞増殖試験

1)で調製した PBMC を 5µg/ml の concanavalin A (ConA, Honen)を含む 10% FCS-RPMI に  $2.0 \times 10^6$  cells/ml となるように懸濁し、3 日間培養を行った。形成されたブラストコロニーをパスツールピペットを用いて丁寧にほぐしつつコーニングチューブ(50ml)に回収し、4°C、1500rpm で 10 分間遠心を行い培養上清を除いた。沈殿した細胞画分

を RPMI 培地で 3 回洗浄した後、(1-1-7)で調製した濃縮培養上清 (4 段階に希釈) 10 $\mu$ l を含む 10% FCS-RPMI に 1.0x10<sup>6</sup> cells/ml (200 $\mu$ l)となるように懸濁し、96 穴プレートで 24 時間培養した。その後、各 well に 1 $\mu$ Ci/well となるように [<sup>3</sup>H]-thymidine (NEN Life Science)を加え、更に 24 時間培養を行った後、セルハーベスターを用いて細胞をガラスフィルター上にトラップした。ガラスフィルターは完全に乾燥させ、トルエン系シンチレーターを用いて細胞が取り込んだ [<sup>3</sup>H]-thymidine 量を測定した。なお、全ての解析はトリプリケートで行った。

### 3) IFN $\gamma$ の定量

1)で調製した PBL を 10ng/ml のヒトリコンビナント IL-2 (R&D systems)及び(1-1-7)で調製した濃縮培養上清 (4 段階に希釈) 10 $\mu$ l を含む 10% FCS-RPMI に 1.0x10<sup>7</sup> cells/ml (200 $\mu$ l)となるように懸濁し、96 穴プレートで 24 時間培養した。培養上清中の IFN $\gamma$  濃度はヒト IFN $\gamma$  ELISA システム(Amersham Pharmacia)を用いて測定した。また IL-2 を含まない濃縮培養上清単独での効果も同様に測定した。なお、全ての解析はトリプリケートで行った。

## 1-1-11 モルモット脾細胞に対するキメラ型 IL-12 の活性評価

### 1) モルモット脾細胞の調製

放血致死させたモルモットから脾臓を摘出し、RPMI 培地で洗浄を行うことで付着している脂肪を除去した。次に 21 ゲージのシリンジ及びステンレスフィルターを用いて脾臓をもみほぐし、細胞をコーニングチューブ(50ml)に回収した。その後、4 $^{\circ}$ C、2000rpm の条件で 5 分間遠心を行い、沈殿した細胞画分に対して溶血処理を行った後、RPMI 培地で 2 回洗浄、10% FCS-RPMI に 2-3x10<sup>6</sup>cells/ml となるように懸濁した。

### 2) 細胞増殖試験

1)で調製したモルモット脾細胞を用い、実験方法は全て(1-1-10)に従う。

### 3) IFN $\gamma$ の定量

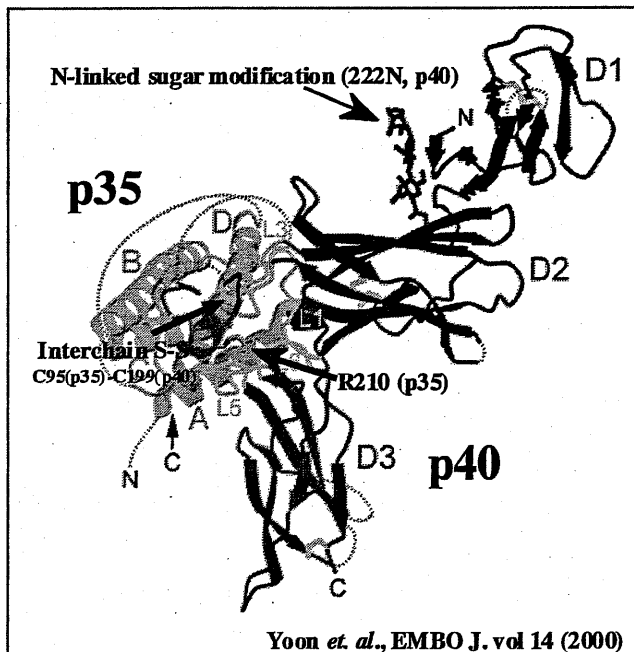
1)で調製した脾細胞を 10ng/ml のヒト IL-2 及び(1-1-7)で調製した濃縮培養上清 30 $\mu$ l を含む 10% FCS-RPMI に 4 x10<sup>6</sup> cells/ml (3ml) となるように懸濁し、6 穴プレートで 24 時間培養した。脾細胞の total RNA は TRIZOL Reagent を用いて回収し、10  $\mu$ g の total RNA をアガロースゲルで分離した。以後の実験方法は(1-1-5)に従い、プローブはモルモット IFN $\gamma$  の ORF 配列を用いた。また、Northern blot で得られたシグナル強度の半定量的解析は NIH Image (version1.6)プログラムを用いて行った。

## 1-2 実験結果

### 1-2-1 モルモット IL-12 遺伝子の同定

モルモット腹腔浸潤細胞 mRNA より調製した cDNA を鋳型とする RT-PCR スクリーニングより モルモット IL-12 p35 及び p40 サブユニットの部分配列を決定した。またこの既知配列をもとに行った 5' RACE、3' RACE-PCR によりモルモット IL-12 p35 及び p40 サブユニットの全長を単離し、その塩基配列を決定した。Figure.1-1 に各サブユニット ORF の塩基配列および推測されるアミノ酸配列を示す。p35 サブユニットは 221 アミノ酸からなり、7 個のシステイン残基、4 箇所の N 型糖鎖修飾モチーフを持つ。一方、p40 サブユニットは 332 アミノ酸からなり、9 個のシステイン残基、1 箇所の N 型糖鎖修飾モチーフを持つ。

2000 年 Yoon らは結晶解析によりヒト IL-12 の詳細な分子構造を明らかにした(16)。彼らは、①N 型糖鎖(GlcNAc-GlcNAc-mannose)は p40 分子 222 位のアスパラギン残基のみに修飾されること(アミノ酸の番号はシグナル配列を含む)、②210 位のアルギニン残基(p35)と 312 位のアスパラギン酸残基(p40) のイオン結合がヘテロダイマー(p70)の形成に必須であること、③また同様に 204 位のアルギニン残基及び 207 位のスレオニン残基(p35)と 203 位のグルタミン酸残基(p40) のイオン結合も重要であること、④非常に興味深い点として、95 位のシステイン残基(p35)と 199 位のシステイン残基



(p40) で形成される分子間ジスルフィド結合は、ヘテロダイマーの安定化には寄与しているものの必須ではないことを報告している(横図)。この情報を指針に各動物種で同定されている IL-12 配列のアライメントを行った(Figure.1-2)。結果、p35 及び p40 分子ともに上述の①~④に示したアミノ酸残基及び分子内ジスルフィド結合に関与しているシステイン残基は全種で保存されていた。興味深いことに、モルモット p35、p40 配列に対する相同性は両分子ともに

ヒト配列が最も高く、対照的にマウス、ラットなどの齧歯類配列は低い値を示した(GENETYX)。また、データには示さないが、モルモット IL-12 配列をプローブに BLAST サーチを行った場合、両分子ともにヒトホモログが最も高い相同値でヒットする。

**IL-12 p35 (221aa)**

```

1  ATGAGTCTTTGGCGCAAGTGCCTCTCTGACGAGCCTTGTCTCTGGTGAGCTGCAGTTTGGCCAGGAACCTCCCTAGGGCCTCACCA 90
   M S P L R K C L L L T S L V L L V S C S L A R N L P R A S P
91  GCACCAGTCACAGAACCGGTCCAGTGCCTTTAACCACTCCCAAACCTCTGCTGAGGGCGGTGAACAGTGAACCTCACAAGGCCATACAAATG 180
   A P V T E P V Q C F N E S Q T L L R A V N S E L H K A I Q M
181 CTAGCAGTTTACTCCTGTACTCCTGAAGAGATCGATCATGAAGATATCACAAAAGACAAAACCGCACCCTGAAAGCCTGTGTACCCTG 270
   L A V Y S C T P E E I D H E D I T K D K T S T V K A C V P L
271 GAATTAGTCAAGAAATGAGAGCTGCCTGGCTTCTGGACATATTTCTTTCACAACCAATGGGAGTTGCCTGGCTTCCGAAAGACCTCTTTT 360
   E L V K N E S C L A S G H I S P T T N G S C L A S G K T S F
361 ATGATGGCCCTGTGCCTTAACAGTATCTATGAGGACTTGAAGCTGTACCAGCTGGAGTTCAGAACATGAATGCACAACCTTTTAATGGAT 450
   M M A L C L N S I Y E D L K L Y Q L E F K N M N A Q L L M D
451 CCTCAGAGGCAGATCTTTTTAGATCAAAACATGCTTTTCAGCTATTGATGAATTGATTGAGCCCTGAATGGCAGCGATGTACTGTGCCA 540
   P Q R Q I F L D Q N M L S A I D E L I Q A L N G S D V T V P
541 CAAAAGCTTTCCCTTGAAGAACCGGATTTTATAAAATTAATAAAGCTCTGCATACTTCTACACGCTTTCAGAATTCGTGCGGTGACT 630
   Q K L S L E E P D F Y K I K M K L C I L L H A F R I R A V T
631 ATCGACAGAGTGATGAGCTACCTGACTTCTTCCTGA 666
   I D R V M S Y L T S S *

```

**IL-12 p40 (332aa)**

```

1  ATGTGTACCCGGCAGTTGATCTCCTCTGGCTCTCCCTGGTGTGCTGGCATCTCCCTCCTGGCCATGTGGGAAC TGAAAAAGACGTG 90
   M C H R Q L I S S W L S L V L L A S P L L A M W E L K K D V
91  TACCTGGTAGAGTTGGATTGGCACACAGATGCTCCTGGAGAGACGGTGGTTCTTACCTGCAACACTGCTGAGGAAGATGGCATCACATGG 180
   Y V V E L D W H T D A P G E T V V L T C N T A E E D G I T W
181 ACCTCAGACCCGAAAAGTGATATCTTAGCTCTGGTAAAACCTCACCATCCAGGTCAAAGAGTTTGAAGATGCTGGAGGATACACCTGT 270
   T S D R K S D I L G S G K T L T I Q V K E F E D A G G Y T C
271 CACAAAGGAGGCGAGGTTCTGAGCCGGTCACAACCTGCTACTTCAAAAAGGAAGATGAAATTTGGTCCACTGATATTTAAAGGAACAG 360
   H K G G E V L S R S Q L L L H K K E D E I W S T D I L K E Q
361 AAAGGATCCAATGGCAAGACCTTTCTGAAATGTGAAGCAAGGAGTATTCTGGACGTTTCACCTGCTGGTGGCTGACGGCATTGGTACT 450
   K G S N G K T F L K C E A R S Y S G R F T C W W L T A F G T
451 GATGTGAAGTTCAAGTGTCAAGGGCAGCAGAGGCTCCTCAGACCCCTCAGGAGTACTTGTGGAGAAGCAGAGAGTGTCTGGGGACAAC 540
   D V K F S V K G S R G S S D P S G V T C G E A E R V S G D N
541 CAGGAGTATAAGTACTCCGTTGGAGTGTGAGGAGACAGCCCTGCCCCACGGCCGAAGAGAGCCTCCCCATTGAGTGGTGGTGGATGCT 630
   Q E Y K Y S V E C Q E D S A C P T A E E S L P I E V V V D A
631 ATTCACAAGTTCAAGTATGAAAACCTACACCAGCAGCTTCTACATCAGAGACATCATCAAACCCAGACCCACCGAAGAACCTGCAGCTGAAG 720
   I H K F K Y E N Y S S P Y I R D I I K P D P P K N L Q L K
721 CCATCAGTGAATTCTCAGCAGGTGGAGGTGAGTGGGAGTATCTGACACCTGGAGCACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATCTTA 810
   P S V N S Q Q V E V S W E Y P D T W S T P H S Y F S L T F L
811 GTGCAGACCCATGGCAAGAACAAGAACAGGAGAGAAAAGAAATCAAGAACTTTCACAGACAAGACCTCAGCCACAGTTTCATGCCACAAG 900
   V Q T H G K N K N R R E K K Y E L F T D K T S A T V S C H K
901 ATTTCAAAGTGGAGGTGCGGGCCCGGGACCGCTACTACAGCTCATCGTGGAGCGAATGGGCCTCTGTGCTCCTGCAGTGAAGTTTCAGTC 990
   I S K V E V R A R D R Y Y S S S W S E W A S V S C S E V S V
991 TCAAGATGA 999
   S R *

```

Figure.1-1 モルモット IL-12 分子の ORF 塩基配列及び推測されるアミノ酸配列  
 灰色下線で示したシグナル配列は P-SORT プログラム (<http://psort.nibb.ac.jp:8800>)で推定した。システ  
 イン残基は灰色で、N 型糖鎖修飾モチーフは灰色ボックスで示した。なお、p40 に関しては Scaroza  
 らがすでに部分配列(図中 270-777bp)を公開している(AF097507)(17)。





## 1-2-2 モルモット各組織における内因性 IL-12 の発現プロファイル

IL-12 p35 及び p40 分子の ORF 全長をプローブに用いた Northern blot 解析を行い、各組織における IL-12 mRNA の発現量を比較した。Figure.1-3 (a)に結果を示す。興味深いことに p35 (2.0kb)、p40 (2.5kb)分子ともに精巣において推定分子サイズの強い発現が認められた。p40 に関しては若干サイズが異なる(2.0~2.2kb)弱い発現が腎臓でも認められたが、2分子とも脾臓、胸腺などのリンパ組織での発現は認められなかった。Scarozza らは Con A プライミングを行った脾細胞では p40 mRNA の発現が著明に増強されることを RT-PCR で明らかにしている(未刺激の脾細胞では p40 の発現は認められない) (17)。しかし、今回我々が行った実験条件では、Con A 刺激如何にかかわらず、脾細胞における p40 の発現は認められなかった。一方、クローニングに用いた腹腔浸潤細胞では p35、p40 分子ともに mRNA の発現が認められたが、LPS 刺激(24 時間)による増強は認められなかった。なお、精巣で発現する IL-12 mRNA に関しては、RACE 法による遺伝子の単離を試み、部分配列(p35; 168-666 bp, p40; 49-999 bp, Figure.1-1)を確認している。

次にモルモット p40 分子に対するポリクローナル抗体をウサギで作成し、タンパクレベルでの発現を mRNA の発現が認められた精巣及び腹腔浸潤細胞で確認した。SDS-PAGE による分離を還元、非還元条件で行い、Western blot 解析を行った結果を Figure.1-3 (b)に示す。興味深いことに、精巣では p40 及び p40 を構成サブユニットとして含むと思われる高分子タンパク(~200 kDa)の発現が非還元条件で確認された。p35 及び p40 リコンビナント体を共発現させた COS7 細胞の培養上清との比較から、精巣ではヘテロダイマー(p70)の発現は認められないこと、また、還元条件では p40 単量体のみが確認されることから、非還元条件で認められる高分子タンパクはジスルフィド結合を介して p40 と会合している可能性が示唆された。またデータには示していないが、より濃度が低いアクリルアミドゲル(8%)で分離を行った場合、ゲル中央部に該当する強いシグナルが確認されることから、ゲルスタックなどによる人為的な産物ではないことを確認している。現在この高分子タンパクの同定を試みているが結果を得るには至っていない。一方、腹腔浸潤細胞の培養上清にも p40 単量体の発現が確認された。更に LPS 刺激(24 時間)を行うことで培養上清の p40 タンパク量は若干増加した。そこで、相違が認められる Figure.1-3 (a)の Northern blot 解析に関しては、より詳細な経時変化を RT-PCR で確認した(実験結果は次章で述べる)。今回、精巣及び腹腔浸潤細胞ともにヘテロダイマー(p70)の発現は確認できなかった。生体内におけるヘテロダイマー(p70)の発現は極めて微量であり(pg オーダー)、興味深いことに p70 の発現には最大で 500 倍もの p40 単量体及び p40 ホモダイマーの発現が伴う(9)。その生理的な意義は未だ曖昧であるが、内因性 p70 を確認するためには今後 ELISA 法など高感度な検出法の構築が必要である。

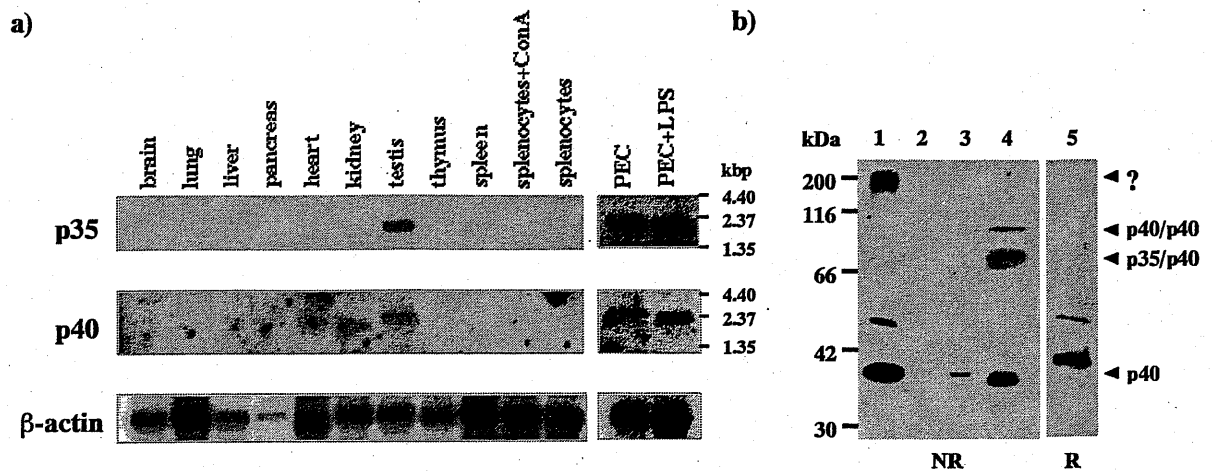


Figure.1-3 モルモット各組織における内因性 IL-12 の発現プロファイル

(a)p35、p40 分子の ORF 全長をプローブに用いた Northern blot 解析。全て同一のメンブレンを使用し、リプローブは p35→p40→βactin の順で行った。また、フィルムの露出時間(-80°C)は各プローブで異なり、p35 (5days)、p40 (7days)、β-actin (1day)である。(b)抗モルモット p40 抗体を用いた Western blot 解析。SDS-PAGE には 10%アクリルアミドゲルを用いた。NR は非還元、R は還元条件を示す。なお、Lane1 及び Lane5 は精巢タンパク、Lane2 は腹腔浸潤細胞の培養上清、Lane3 は LPS 刺激を行った腹腔浸潤細胞の培養上清、Lane4 は p35、p40 を共発現させた COS7 細胞の培養上清である。Lane1 及び Lane5 で 50kDa 付近に確認されるバンドは非特異的でありコントロール IgG でも検出される。

### 1-2-3 キメラ型 IL-12 の作成及び発現確認

ヒト IL-12 は p35 分子によって規定される種特異性のためマウス及びラット細胞群に活性を示さない(18)。従って、ヒト型 IL-12 のリコンビナント体や遺伝子(ベクター)などを試験する前臨床動物モデルはその使用範囲に限られる。今回我々が同定したモルモット IL-12 はヒトホモログに対して極めて高い相同性を示す(Figure.1-2)。そこでヒト、モルモット間で各サブユニットを置換したキメラ型リコンビナントを作成し、両種間における IL-12 活性の種特異性を検討した。COS7 細胞で一過性に強制発現させたキメラ型リコンビナントを Western blot 及び ELISA で確認した結果を Figure.1-4 に示す。本実験ではリコンビナントの精製は行っておらず、また、ヒト ELISA システムによるモルモット分子の検出が不可能であったため(Figure.1-4 c)、キメラ分子の定量までは行えなかった。しかし、抗モルモット p40 抗体(a)及び抗ヒト p70 抗体(b)を用いた Western blot 解析から COS7 細胞の培養上清に各キメラ型 IL-12 が発現していることを確認した。

### 1-2-4 キメラ型 IL-12 の活性評価

次にキメラ型 IL-12 の細胞増殖活性及び IFN $\gamma$ 誘導活性をヒト、モルモット細胞群

で比較した(Figure.1-4)。興味深いことに、作成した全てのキメラ型 IL-12 が両細胞群に活性を示し(a-b, d-e)、かつヒト型 IL-12 がモルモット細胞群に示す増殖活性は抗ヒト IL-12 中和抗体で完全に阻害された(c)。本実験ではキメラ型 IL-12 の比活性にコンセンサスは得られていない。しかし、細胞増殖活性に関してはモルモット p70 及びヒト p70 が両細胞群に対して示す活性強度、至適濃度に差がないことを改変した実験法で確認している(次章)。またこれも次章で示すが、モルモット IL-12 はマウス細胞群に対して活性を示さない。以上、ヒト、モルモット間にリコンビナント体の生理活性を規定する種特異性は認められないことを明らかにした。更なる解析が必要であるが、少なくとも以上の結果からヒト IL-12 を評価する実験小動物としてモルモットが有用である可能性が示唆された。

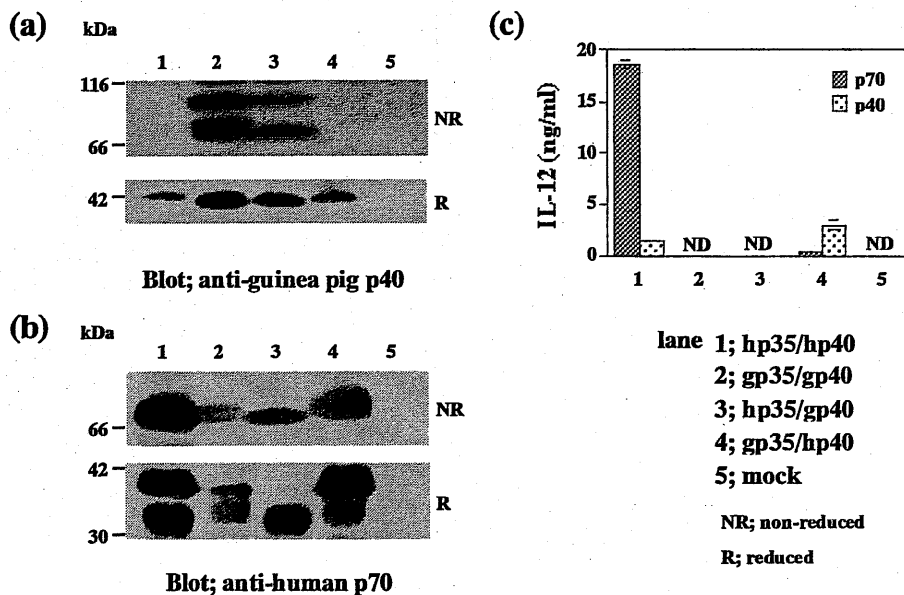


Figure.1-4 キメラ型 IL-12 の作成と発現確認

ヒト及びモルモット p35、p40 の発現ベクターを各種組み合わせ COS7 細胞にトランスフェクションし、培養上清中のキメラ型 IL-12 の発現を確認した。(a)抗モルモット p40 抗体を用いた Western blot 解析。非還元条件ではモルモット p40 を構成サブユニットに含むヘテロダイマー(p70)及び p40 ホモダイマーが確認される。一方、還元条件ではモルモット p40 に加え、ヒト p40 に該当する交叉シグナルも若干ながら認められる。(b)抗ヒト p70 抗体を用いた Western blot 解析。本実験で使用した抗ヒト p70 抗体は p35、p40 ともに検出可能なポリクローナル抗体であり中和活性を持つ。非還元条件では交叉性に依存した (hp35/hp40→hp35/gp40, gp35/hp40→gp35/gp40)ヘテロダイマーの発現が認められ、還元条件においても交叉性に依存した p35 及び p40 単量体の発現が認められる。なお、SDS-PAGE による分離は全て 10%アクリルアミドゲルで行った。(c)ヒト ELISA システムを用いてキメラ型 IL-12 の定量を試みたが、モルモットサブユニットを含むキメラ型ヘテロダイマー(p70)の検出は不可能であった。

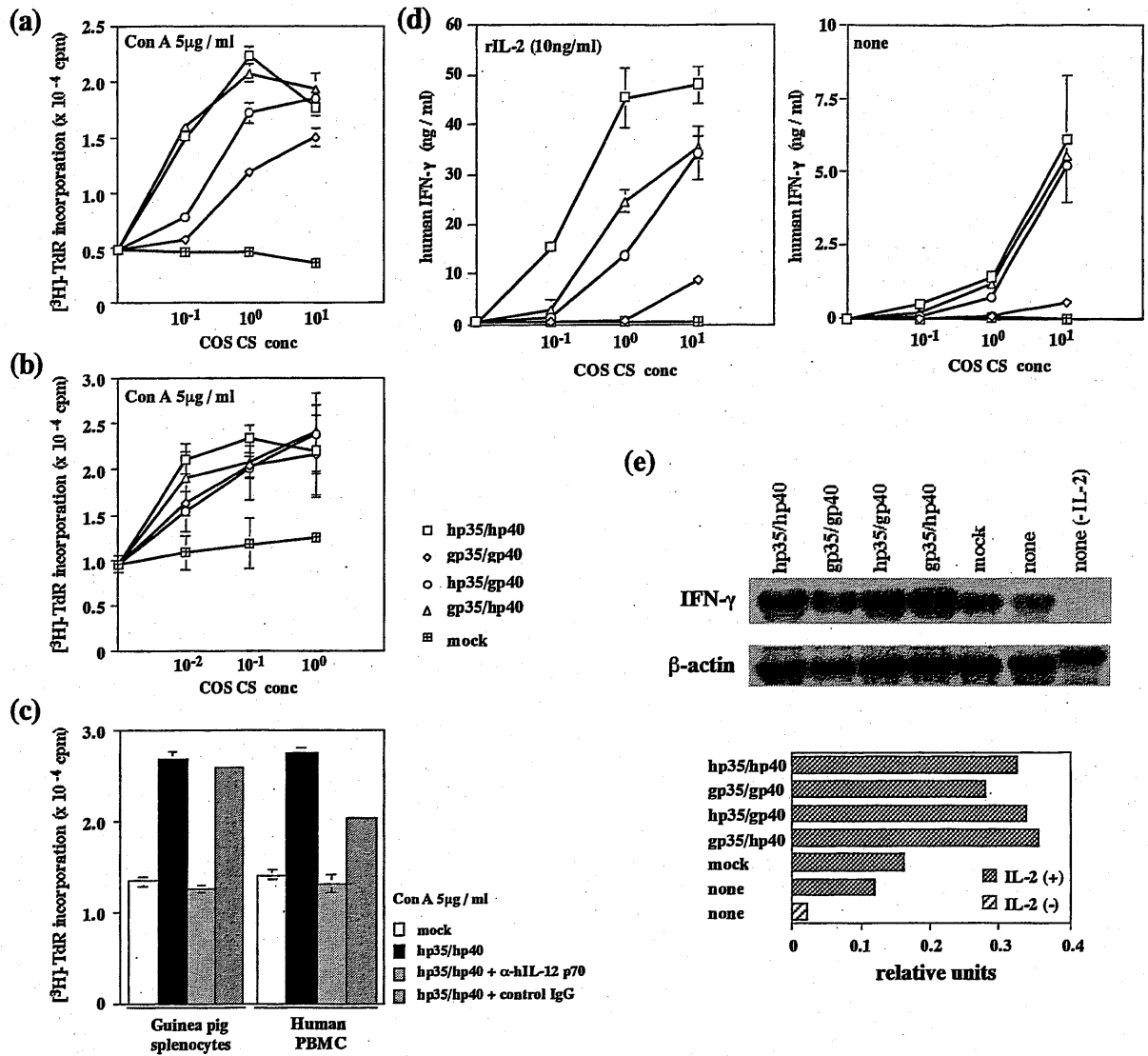


Figure.1-5 キメラ型 IL-12 の生理活性評価

Con A でプライミングしたヒト PBMC(a)及びモルモット脾細胞(b)に対するキメラ型 IL-12 の細胞増殖活性。COS CS は (1-2-3)で調製した COS7 細胞の濃縮培養上清(10<sup>1</sup> は 10 倍濃縮)を意味する。(c)ではヒト型 IL-12 (hp35/hp40)を発現する COS CS をあらかじめ抗ヒト p70 抗体もしくはコントロール IgG と 4°C で 1 時間反応させ、その後、最終濃度が COS CS (10<sup>0</sup>)及び抗体(20mg/ml)となるよう、ヒト PBMC 及びモルモット脾細胞(ともに Con A プライミング)に加え培養を行った。(d)ではヒトリコンビナント IL-2 存在下及び非存在下でのキメラ型 IL-12 の IFN $\gamma$ 誘導活性をヒト PBL で検討した。キメラ型 IL-12 単独でも弱いながら IFN $\gamma$ 誘導活性を示し、IL-2 存在下では著明な相乗効果が認められる。(e)ではモルモット脾細胞に対するキメラ型 IL-12 の IFN $\gamma$ 誘導活性を Northern blot で確認した。ヒト IL-2 がモルモット脾細胞に対して交叉活性を示すことは既に報告されている(19)。(Figure.1-3)でも示したようにインタクトな脾細胞では IFN $\gamma$ の発現は認められない。興味深いことに IL-2 単独でも明確な IFN $\gamma$ 誘導が認められ、更にキメラ型 IL-12 にも相乗効果が認められた。なお、半定量的な解析を行った結果(e 下段)、キメラ型 IL-12 のコントロール(mock)に対する比活性は 1.7~2.2 倍であった。

### 1-3 考察

本章ではモルモット IL-12 遺伝子を単離同定し、更に臓器別の発現プロファイル、及び生理活性の種間比較において幾つか興味深い知見を得た。(1-2-3)で述べたように、ヒト IL-12 は p35 分子によって規定される種特異性のため、マウス及びラット細胞群に活性を示さない(18)。これに関してはその後、ヒト、マウスの部分配列を置換したキメラ型 p35 を用いた詳細な解析が行われ、ヒト p35 配列内の 3 箇所のアミノ酸残基がマウス IL-12 レセプターとの親和性を規定していることが判明している (Figure.1-6)(20)。今回これらの既報を指針にヒト、モルモット間で各サブユニットを置換したキメラ型リコンビナントを作成し、両種間における IL-12 活性の種特異性を比較検討した。結果、全てのキメラ型リコンビナントが両細胞群に活性を示し、かつヒト型 IL-12 がモルモット細胞群に対して示す活性は抗ヒト IL-12 中和抗体で完全に阻害された。即ち、ヒト、モルモット間に IL-12 の生理活性を規定する種特異性は認められなかったが、興味深いことにヒト p35 分子の上述 3 アミノ酸残基のうち、モルモット配列においても保存されているアミノ酸残基は 1 カ所のみであり、他の 2 カ所は 3 者 3 様であった。従って、上述の変異体解析の結果を踏襲するコンセンサスを得ることはできなかったが、これは偏にレセプターの親和性がモルモット、マウスで異なるためであり、今後モルモット IL-12 レセプターを同定し、結合実験を行うことでその点を更に検証する必要がある。いずれにしろ、ヒト IL-12 の薬物動態を評価する実験小動物はその使用範囲が限られてきた。モルモットがその有力候補であることを明らかにした本章の解析は、今後様々な検討が期待される遺伝治療などの前臨床試験を考えた上でも非常に重要であると考えられる。

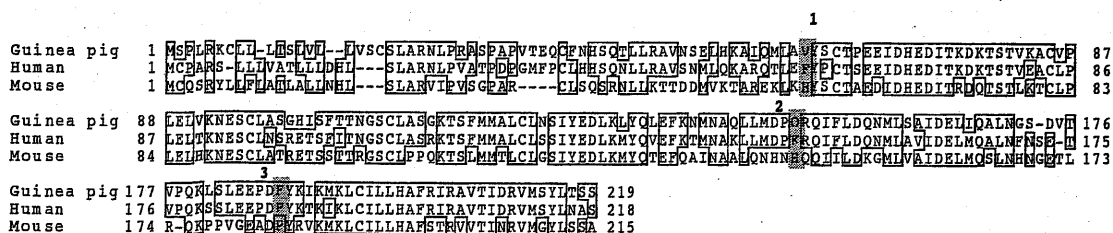


Figure.1-6 p35 分子の生理活性を規定するアミノ酸の種間比較

灰色ボックスで囲んだアミノ酸(1~3)はマウス細胞群に対するヒト IL-12 の生理活性を規定する。従って図中 3 カ所のアミノ酸配列全てをマウス型に置換した変異体はマウス細胞群に活性を示す。

加えて本章では IL-12 p40 分子及び p40 を構成分子として含むと思われる高分子タンパク(~200kDa)がモルモット精巣において恒常的に発現していることを明らかにした。次章で詳しく述べるが IL-12 を構成する p35 及び p40 は IL-6/ IL-6R $\alpha$ 複合体と構

造的な相同関係にあり、両者ともβ型レセプターを介して細胞内にシグナルを伝達する(21)。従って「レセプター(p40)/リガンド(p35)」という関係性から互いのパートナーが唯一ではない可能性は充分考え得る。興味深いことに、幾つかのサイトカインは、paracrine mediator としてリプロダクトシステムの構築に関与している(Figure.1-7)。例えばラットセルトリ細胞は IL-1αを恒常的に発現する(22)。その発現量は精子形成サイクルのステージングに依存し(減数分裂の第1分裂が開始されるステージ VII 及び生殖細胞を除去した精細管では発現が消失する)、主に精細胞の DNA 複製に関与していると考えられている(22, 23)。また IL-12 に関してもプレリミナリーではあるが興味深い知見が報告されている。ラットライディッヒ細胞では黄体形成ホルモン(LH)刺激に対し、濃度依存的な IL-12 p40 の産生が認められ、その発現誘導パターンがテストステロンと同様であることが報告されている(24)。黄体形成ホルモンで誘導されるテストステロンはステージ VII のセルトリ細胞に作用し、セルトリ細胞は paracrine 的に生殖細胞を制御することから IL-12 にも IL-1αと同様な何らかの制御活性があるのではないかと考えられている。今回残念ながら高分子複合体を同定するには至らなかったが、上述の知見を含め、レセプターの発現分布などを詳細に解析することで、生殖機構における IL-12 の役割、重要性が明らかにされるものとする。

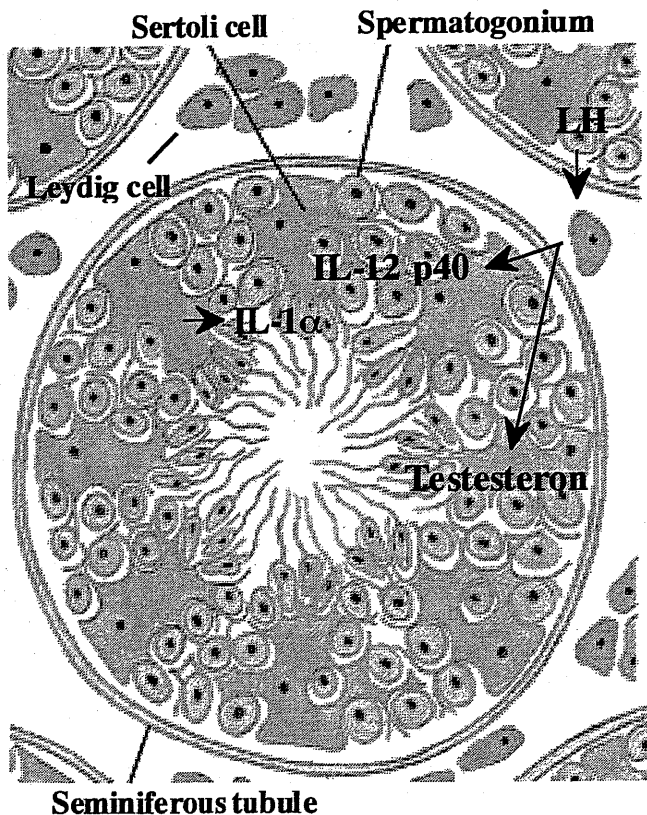
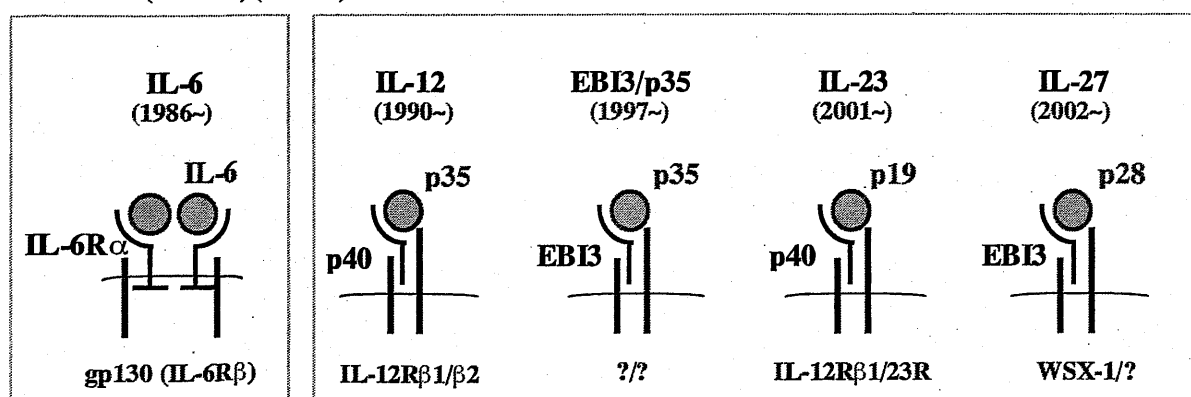


Figure.1-7 精子形成とサイトカイン  
精細管(Seminiferous tubule)内のセルトリ細胞(Sertoli cell)では精子形成サイクルに依存した IL-1αの発現が認められる。恐らく生殖細胞の DNA 複製に関与すると考えられているが、IL-1αノックアウトマウスは正常に生まれ、受精能力にも特筆すべき異常は見られない(25)。間質に存在するライディッヒ細胞(Leydig cell)は黄体形成ホルモン(LH)シグナルに応じてテストステロンを分泌し、精子形成を調節する。最近、黄体形成ホルモンを *in vitro* で作用させたライディッヒ細胞が、テストステロンと平行して IL-12 p40 を産生することがラットで明らかにされた(24)。なお、図は「細胞の分子生物学」Figure.20-22 を一部改変して掲載した。

## 第2章 モルモット IL-23 遺伝子の同定及び機能解析

IL-12 は I 型サイトカインに属し、 $\beta$ 型レセプター gp130 を共有する IL-6 や CNTF などの Hematopoietin ファミリーに分類される(9, 10)。興味深い点として、p40 は  $\alpha$  型 IL-6 受容体の細胞外ドメインに配列で 20% 強の相同性を示し、かつ配列内のシステイン残基や重要なモチーフは高度に保存されている。また p35 も IL-6 に若干ながら相同性(10%強)を持つ。従って、p35/p40 で形成されるヘテロダイマーは IL-6/IL-6R $\alpha$  複合体と構造的な相同関係にあり、両者とも  $\beta$  型レセプターを介して細胞内にシグナルを伝達する(下図 1)。この「レセプター(p40)/リガンド(p35)」で形成される piggy back コンプレックスは新しいサイトカインの概念であり、その関係性から互いのパートナーが唯一でない可能性が示唆されてきた。また、同じ可能性はノックアウトマウスを用いた解析からも指摘された。第 1 章で述べたように IL-12 は細胞性免疫の中心を担うサイトカインである。従って、Th1 反応の惹起を必要とする種々の細菌感染モデルにおいてノックアウトマウスは致命的であるし、Th1 反応の抑制を必要とする同種移植片モデルでは優位に拒絶を抑える。しかし、興味深い点は p40 ノックアウトが p70 ノックアウトと同程度の phenotype を示すのに対し、p35 ノックアウトは期待されるほどの効果を示さない(26, 27)。以上述べてきたような背景から新規パートナーの検索が試みられ、2000 年 *Oppmann* らによって p19/p40 で形成される新規ヘテロダイマー IL-23 が同定された(28)。更に機能が不明なためインターロイキンの称号を得ていない EBI3/p35 を含め、現在までに 3 種類の新規ヘテロダイマーが同定されている(下図 1)(29, 30)。

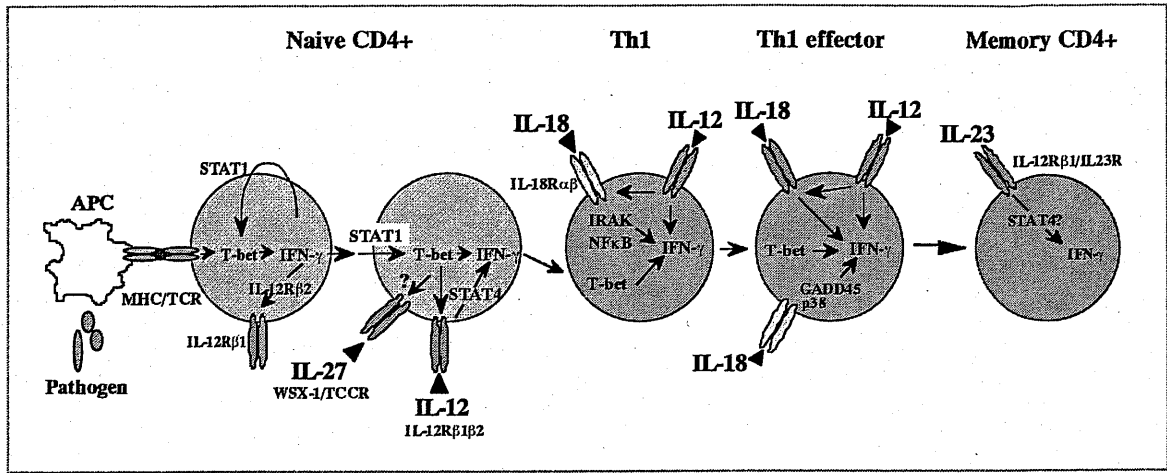


(図 1) 現在までに同定されている IL-12 ファミリー

これらは全て p35、p40 と相同性を持つサブユニットがジスルフィド結合で会合した分子構造をとり、また、生理活性に関しても次章に述べる IL-18 を含め、樹状細胞、マクロファージなどの抗原提示細胞より産生され、Th1 反応を稼働する IL-12 様な機



能を持つと考えられている。しかし現在のところ IFN $\gamma$ を誘導する点及び標的細胞のサブセットが異なる可能性が示唆されているだけで、これら新規サイトカインが存在する意義、重要性はまだ明らかにされていない(下図 2)(10, 31)。



(図 2) IFN $\gamma$ を誘導するパスウェイの多様化で定義する Th1 分化

抗原提示細胞(APC)上の MHC class II 分子に提示された外来ペプチドは naiveCD4 細胞が発現する TCR によって認識される。naiveCD4 細胞は IL-12R $\alpha$ のみを恒常的に発現しており、TCR からのシグナルは transcription factor である T-bet を誘導する。T-bet はクロマチンリモデリング作用で直接 IFN $\gamma$ 遺伝子を transactivate する。誘導された IFN $\gamma$ は転写因子である STAT1 を介して IL-12R $\beta$ 2 を誘導するとともにオートクライン作用で T-bet の発現を更に増強する。また、明らかにされていないが IL-27R も恐らくこの段階で誘導される。IL-12 に応答可能な naiveCD4 細胞に対し、IL-12 は STAT4 を介した経路で IFN $\gamma$  を誘導し Th1 細胞の分化を更新させる。IL-12 は更に IL-18R の発現を誘導し、転写因子 NF $\kappa$ B を介した IFN $\gamma$ 誘導経路を導く。GADD45 を高発現する武装化 Th1 細胞では p38MAPK を介した IL-18 シグナルが更に追加され、IFN $\gamma$ 誘導に抗原感作を必要としない。マウスにおいて IL-23 は memory 細胞にのみ作用し、IL-12 と同様、STAT4 を介した経路で IFN $\gamma$ を誘導する。なお図は文献(31)の内容を一部変更し記載した。

本章ではモルモット IL-23 遺伝子(p19 サブユニット)の同定と機能解析を行った。IL-23 に関しては興味深い種差が幾つか報告されている。例えば IL-12、IL-23 が作用する標的細胞のサブセットはヒト、マウスで異なる。マウスでは IL-23 は memory 細胞にのみ作用するのに対し、ヒトでは程度の差はあれ naive 細胞にも働く(28)。またマウス APC では IL-12、IL-23 のオートクライン作用による IFN $\gamma$ 産生が認められるが、ヒト及びモルモット抗原提示細胞に同様な機構は認められない(32)。そこで本章ではモルモットにおける IL-12、IL-23 の分子比較を産生細胞、標的細胞プラスそれに起因する新規な生理活性の可能性に着目し検討した。

## 2-1 実験方法

### 2-1-1 モルモット IL-23 遺伝子の同定

モルモット IL-23 p19 遺伝子の単離は第 1 章と同様、先にヒト、マウス p19 分子の ORF 配列内で高度に保存されている C 末端部位に縮重プライマーを設定し、直接 5' RACE-PCR を行うことで部分配列を決定した。次に得られた部分配列をもとに GSP を設定し、3' RACE-PCR を行うことで全長配列を決定した。なお、遺伝子を単離同定するにあたって使用した動物、細胞、実験法は全て第 1 章に従う。また、使用したプライマーセットは全て巻末サプリメントに記載した。

### 2-2-2 PAMP 刺激を行ったマクロファージの IL-12 及び IL-23 の発現プロファイル

菌体成分 PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) で刺激を行ったマクロファージにおける IL-12 及び IL-23 の継時的な発現プロファイルを RT-PCR で確認した。TGC で誘導した腹腔浸潤細胞を溶血操作後、 $2.0 \times 10^6$  cell/ml となるよう 10% FCS-RPMI 培地に懸濁し、6 穴プレート(3ml)で 2 時間培養を行った。その後、浮遊細胞を RPMI 培地で洗浄することで取り除き、接着細胞画分をマクロファージとした。調製したマクロファージは  $1 \mu\text{g/ml}$  濃度の LPS (*E. coli* 0127:B8, Difco) もしくは  $10 \mu\text{g/ml}$  濃度の peptide glycan (*S. aureus* PGN, Furuka) を含む 10% FCS-RPMI 培地で更に培養し、継時的に細胞を回収した。Total RNA の回収は RNeasy mini kit (Qiagen) 付属の lysis buffer を接着細胞に直接加えて行い、以後の調製法は付属のプロトコールに従った。逆転写酵素による 1 本鎖 cDNA の合成は定法に従い、GSP プライマーを用いた RT-PCR は全て同条件( $94^\circ\text{C}$  30sec $\rightarrow$  $55^\circ\text{C}$  30sec $\rightarrow$  $72^\circ\text{C}$  30sec) $\times$ 30 cycles で行った。なお、増幅断片の半定量的な解析は NIH Image (version 1.6) を用いて行った。

### 2-1-3 抗原特異的な抗モルモット p40 抗体の作成

抗原特異的な抗モルモット p40 抗体の精製は *Tsuji* らの方法に従った(33)。即ち、(1-1-6)で調製したリコンビナント p40 抗原を Affi-Gel 10 (Bio Rad) に吸着させることで抗原カラムを作成し、第 1 章で使用した抗モルモット p40 抗体(total IgG)より抗原特異的な抗体を精製した。なお、Affi-Gel 10 の使用は付属のプロトコールに従った。

### 2-1-4 リコンビナント IL-23 の作成

モルモット及びヒト IL-23 リコンビナント体の作成は基本的に第 1 章(1-1-7)「キメラ型 IL-12 の作成」の項に従う。ただし、各サブユニット(p19 及び p40)を組み込んだ発現ベクターはウサギ腎由来 RK13 細胞にトランスフェクションし、培養上清(10% FCS-DMEM)の濃縮は行っていない。また、IL-12 に関しても同様な方法で再調

製した。リコンビナント IL-23 の発現確認は Western blot で行い、方法は第 1 章(1-1-8)「キメラ型 IL-12 の発現確認」に従った。ただし、確認用の培地組成は上述と異なり 1%FCS-DMEM である。また培養上清は speed vac で 1/3 に濃縮後、250 $\mu$ l を等量の 10%TCA で処理し、泳動サンプルとした。また抗原精製を行った抗モルモット p40 抗体は 0.1 $\mu$ g/ml の濃度で使用した。

#### 2-1-5 ヒト PBMC 及びモルモット脾細胞に対する IL-23 の活性評価

ヒト末梢血単核球 (PBMC) の調製は第 1 章(1-1-10)に従う。細胞増殖試験は Cell Titer96<sup>(R)</sup> Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega)を用いた比色定量法で評価した。5 $\mu$ g/ml 濃度の Con A 存在下で 3 日間培養した PBMC を回収、洗浄後、(2-1-4)で調製した RK13 細胞の培養上清 (4段階に希釈) 10 $\mu$ l を含む 10% FCS-RPMI に  $1.0 \times 10^6$  cells/ml (100 $\mu$ l)となるよう懸濁し、96 穴プレートで 48 時間培養した。その後、各ウェルに 15 $\mu$ l の MTT を含む色素溶液を加え 4 時間培養し、最後に 100 $\mu$ l の反応停止液を加え吸光度(570nm)を測定した。TCR 刺激はマウス抗 CD3 モノクローナル抗体 (Beckton)を 96 穴プレートに固層化することで行った。D-PBS で 5 $\mu$ g/ml の濃度に調整した CD3 抗体を 100 $\mu$ l の割合で 96 穴プレートに加え 4°C で一晩放置した。その後、細胞を加える直前に各ウェルを D-PBS で 3 回洗浄し、以後の培養に用いた。一方、CD28 刺激に関しては、(2-1-4)で調製した RK13 細胞の培養上清と同時にマウス抗 CD28 抗体(Nichiryo)を 5 $\mu$ g/ml の濃度で培養上清中に加えた。なお、これらの抗体を加える以外の培養条件は全て上述に従い、また測定は全てトリプリケートで行った。IFN $\gamma$ の定量はヒト IFN $\gamma$  ELISA システム(Amersham Pharmacia)を用いて行った。上述と同じく 5 $\mu$ g/ml 濃度の Con A 存在下で 3 日間培養した PBMC を回収、洗浄後、(2-1-4)で調製した RK13 細胞の培養上清 20 $\mu$ l を含む 10% FCS-RPMI に  $1.0 \times 10^7$  cells/ml (200 $\mu$ l)となるよう懸濁し、96 穴プレートで 48 時間培養した。その際、100ng/ml 濃度のヒトリコンビナント IL-18 (MBL)を加えた培養群を同時に用意し、併せて比較解析を行った。なお、測定は全てトリプリケートで行った。

## 2-2 実験結果

### 2-2-1 モルモットIL-23 遺伝子の同定

モルモット腹腔浸潤細胞 mRNA より調製した cDNA を鋳型とする 5' RACE-PCR スクリーニングより モルモット IL-23 p19 サブユニットの部分配列を決定した。また、この既知配列をもとに行った 3' RACE-PCR により p19 サブユニットの全長を単離し、その塩基配列を決定した。Figure. 2-1(a)に ORF の塩基配列および推測されるアミノ酸配列を示す。p19 サブユニットは 4 箇所のシステイン残基を含む 189 アミノ酸からなる。次に各動物種で同定されている p19 配列のアライメントを Figure. 2-1(b)に示す。まず、各動物種 p19 配列のモルモット p19 配列に対する相同性 (アミノ酸レベル) は p35 及び p40 配列のそれに比べ比較的高い。また、全ての配列に共通して N 型糖鎖修飾モチーフは見あたらない。モルモット p19 はブタホモログに最も高い相同性を示すが、4 箇所のシステイン残基に関してはヒトホモログとの間でのみ全て保存されている。興味深いことに、p35 及び p40 のアライメントを含めモルモット配列のマウス、ラット配列に対する相同性は他の比較配列のそれに比べ低いものであった。この点に関しては第 4 章で改めて考察する。

### 2-2-2 PAMP 刺激を行ったマクロファージの IL-12 及び IL-23 の発現プロファイル

近年、菌体成分 PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) を認識する一連のレセプター群 (Toll like receptors, TLRs) が同定され、軟骨魚類以上の生物種が普遍的に持ち合わせている基本免疫の重要性が分子レベルで明らかにされつつある (34, 35)。Fabio らは各種 PAMP 刺激を行ったヒト樹状細胞におけるサイトカインの発現差異を比較し、*E. coli* 由来の LPS (TLR4) 刺激では IL-12 (p35/p40) が、一方 *S. aureus* 由来の peptide glycan (TLR2) 刺激では IL-23 (p19/p40) が有意に発現増強することを報告している (36)。そこで同様な PAMP 刺激を行ったモルモットマクロファージにおけるサイトカインの発現差異を RT-PCR で比較した。その結果を Figure. 2-2 に示す。興味深いことに p35 に関しては peptide glycan (PGN) 刺激 3 時間後に一過性の発現が認められるのに対し、LPS 刺激では 3~12 時間に渡り発現誘導が維持された。一方、反対に p19 に関しては LPS 刺激 3 時間後に一過性の発現が認められるのに対し、PGN 刺激では 3~12 時間に渡り発現誘導が維持された。p40 に関しては LPS 刺激が p19 と同様な発現誘導パターンを示すのに対し、PGN 刺激では 24 時間後においても時間に依存した著明な発現誘導が認められた。ちなみに次章で詳しく述べる Th1 型サイトカイン IL-18 は intact な状態でも若干の発現が認められ、LPS、PGN 刺激ともに IL-12 及び IL-23 より早くから (1 時間) 時間に依存した発現誘導パターンを示す。以上、刺激後 24 時間までのプロファイルの結果、PGN 刺激では IL-23 の組み合わせが IL-12 に比べ有意

に発現増強され、LPS 刺激では IL-12、IL-23 の組み合わせとともに同程度の一過性の発現が認められた後、p35 単独の発現増強が認められた。

(a)

IL-23 p19 (189aa)

```

1 ATGCTGGGAAGCACAGCTGTGATGCTGCTACTGCTGCTCCCTGACTGCACAGACCCTGGCAGTCTCTGGGAGCAGCAACCCATCCTGG 90
  M L G S T A V M L L L L P W T A Q T R A V S G S S N P S W
91 ACCCAGTGCCAGCTGTACAGAACTCTGCACCCCTGGCTTGGAGTGCACATCCATCAGTAGGACATGTGGAGCCACCAAGAGAAGAG 180
  T Q C Q Q L S Q K L C T L A W S A H P S V G H V E P P R E E
181 GCAGATGAAGAGACTACAGATTATGTCCTCCATATCCTATGTGGGATGGCTGTGATCCACAAGGACTCAAGGACCAACAGTCACTTCTGT 270
  A D E E T T D Y V P H I L C G D G C D P Q G L K D N S Q F C
271 TFGCAGAGGATCTACAGGGTCTGGTTTCTACCAGAACCTGCTGGGCTCAGACATTTTCACAGGGGAGCCTCCACTATTCCCTGATGGG 360
  L Q R I Y Q G L V F Y Q N L L G S D I F T G E P P L F P D G
361 CCTGTAGCCAGCTTACAGCCCTCCCTGCTGGGGCTCAGCCAACTGCTCAGCCTGAGGTTACCAGTGGGAGCCTCAGATCCAGCCCTC 450
  P V S Q L H A S L L G L S Q L L Q P E V H Q W E P Q I P S L
451 AGTCCCAACCGCCATGGCAGCGCCTTCTTGTGAGAATCAAGATCCTCGCAGCTTCCAGGCCTTGTGGTGTAGTCCCGAGTCTTT 540
  S P N Q P W Q R L L L R I K I L R S F Q A F V A V A A R V F
541 GGCCATGGAGCAGCAACCCCTGACCCCTTAA 570
  G H G A A T L T P *
  
```

(b)

Human	1	MLGSRVAVMLLLL	--PWT	QGRAV	GCSS	HW	TCCQQLS	QK	CTLAWSA	H	LVGH	MDL	RE	EGDEET	ND	VPHIQ	CGD	GCD	PQGL	LDN	85
Guinea pig	1	MLGSRVAVMLLLL	--PWT	QGRAV	GCSS	HW	TCCQQLS	QK	CTLAWSA	H	LVGH	MDL	RE	EGDEET	ND	VPHIQ	CGD	GCD	PQGL	LDN	86
Pig	1	MLGSRVAVMLLLL	--PWT	QGRAV	GCSS	HW	TCCQQLS	QK	CTLAWSA	H	LVGH	MDL	RE	EGDEET	ND	VPHIQ	CGD	GCD	PQGL	LDN	89
Mouse	1	MLGSRVAVMLLLL	--PWT	QGRAV	GCSS	HW	TCCQQLS	QK	CTLAWSA	H	LVGH	MDL	RE	EGDEET	ND	VPHIQ	CGD	GCD	PQGL	LDN	86
Rat	1	MLGSRVAVMLLLL	--PWT	QGRAV	GCSS	HW	TCCQQLS	QK	CTLAWSA	H	LVGH	MDL	RE	EGDEET	ND	VPHIQ	CGD	GCD	PQGL	LDN	86

Human	86	SQFCLQRI	QGLV	FK	KL	LGSD	IFTG	EP	SL	LP	DS	V	QL	HASL	LGL	SQ	LQ	PE	GH	HW	ET	Q	IF	SL	SP	SP	QW	RLL	HL	FK	IL	RS	LQ	AF	VAV	175
Guinea pig	87	SQFCLQRI	QGLV	FK	KL	LGSD	IFTG	EP	SL	LP	DS	V	QL	HASL	LGL	SQ	LQ	PE	GH	HW	ET	Q	IF	SL	SP	SP	QW	RLL	HL	FK	IL	RS	LQ	AF	VAV	175
Pig	90	SQFCLQRI	QGLV	FK	KL	LGSD	IFTG	EP	SL	LP	DS	V	QL	HASL	LGL	SQ	LQ	PE	GH	HW	ET	Q	IF	SL	SP	SP	QW	RLL	HL	FK	IL	RS	LQ	AF	VAV	179
Mouse	87	SQFCLQRI	QGLV	FK	KL	LGSD	IFTG	EP	SL	LP	DS	V	QL	HASL	LGL	SQ	LQ	PE	GH	HW	ET	Q	IF	SL	SP	SP	QW	RLL	HL	FK	IL	RS	LQ	AF	VAV	176
Rat	87	SQFCLQRI	QGLV	FK	KL	LGSD	IFTG	EP	SL	LP	DS	V	QL	HASL	LGL	SQ	LQ	PE	GH	HW	ET	Q	IF	SL	SP	SP	QW	RLL	HL	FK	IL	RS	LQ	AF	VAV	176

Human	176	AARVFAHGAATI	-----	SP	189	( % )
Guinea pig	176	AARVFAHGAATI	-----	SP	189	(82.6)
Pig	180	AARVFAHGAATI	-----	SQ	193	(84.9)
Mouse	177	AARVFAHGAATI	TEPLV	PA	196	(74.4)
Rat	177	AARVFAHGAATI	TEPLV	PA	196	(79.4)

Figure. 2-1 モルモット IL-23 p19 分子のアライメント

(a)モルモット IL-23 p19 分子の ORF 塩基配列及び推測されるアミノ酸配列。灰色下線で示したシグナル配列は P-SORT (<http://psort.nibb.ac.jp:8800>)プログラムを用いて推定した。なおシステイン残基は灰色太字で表記した。(b)各動物種で同定されている IL-23 配列のアライメント。配列のアクセシオンナンバーは巻末に全て記載。モルモット配列に対する相同性は GENETYX プログラム(ver 11.2)で解析し、各配列最後尾に%で表記した。なおシステイン残基は灰色太字で表記した。

2-2-3 リコンビナント IL-23 の発現確認

モルモット p19、p35 及び p40 分子を組み込んだ発現ベクター(pME18S)をウサギ腎由来 RK13 細胞に co-transfection し、培養上清中の IL-12 及び IL-23 の発現を抗モルモット p40 抗体を用いた Western blot で確認した。Figure. 2-3 に示したように、細胞内で形成された IL-12 (p35/p40)及び IL-23 (p19/p40)の各ヘテロダイマーは培養上清中

に同程度量分泌されていることを確認した。また、p19、p35 が同時に存在する条件においても、各ヘテロダイマーの形成、分泌効率に有意な差は認められなかった。なお、データには示していないが、ヒト IL-12 及び IL-23 についても抗ヒト p70 抗体を用いた Western blot により同様の発現を確認している。

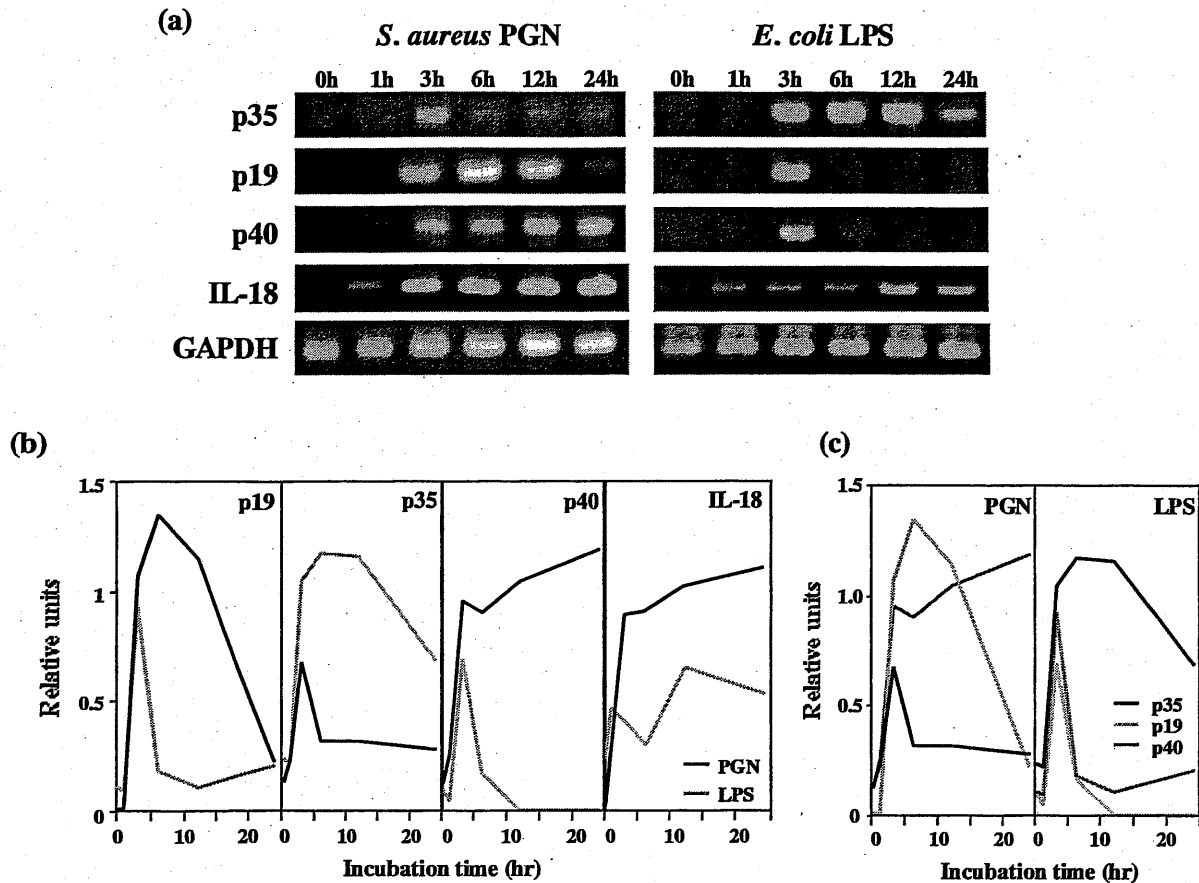


Figure. 2-2 PAMP 刺激を行ったマクロファージにおける IL-12/IL-23 の発現比較

*E. coli* 由来の LPS 及び *S. aureus* 由来のペプチドグリカン(PGN)で刺激を行ったモルモットマクロファージが発現する IL-12 及び IL-23 mRNA の継時変化(0~24hr)を RT-PCR (a)で比較し、得られた各 PCR 断片のシグナル強度を半定量的に数値化した(b, c)。なお、解析は NIH Image (verion 1.6)で行い、相対値(relative units)の算出には以下の計算式を用いた。相対値(relative units)=(サイトカインのシグナル強度-背景の非特異的なシグナル強度)/(GAPDH のシグナル強度-背景の非特異的なシグナル強度)

#### 2-2-4 ヒト PBMC 及びモルモット脾細胞に対する IL-12、IL-23 の細胞増殖活性

次に ConA でプライミングしたヒト PBMC、モルモット脾細胞に対する IL-12 及び IL-23 の細胞増殖活性を比較した。その結果を Figure. 2-4 に示す。既報では mitogen でプライミングしたヒト PBMC に対して IL-23 は増殖活性を持つ。しかし、その活性強度は IL-12 に比べ非常に弱い(28)。今回我々が行った実験条件では、IL-12 が濃

度依存的な増殖活性を示すのに対し、IL-23 はいずれの濃度においても活性を示さなかった(a)。IL-12 及び IL-23 のリコンビナント体は、ともに強制発現させた RK13 細胞の培養上清(RKCS)を用いているが、同定度量の発現はウェスタンブロットにて確認している(2-2-3)。また、(2-2-6)で後述するようにモルモット脾細胞に対して、ヒト IL-23 はモルモット IL-23 と同程度の細胞増殖活性を示す。更に TCR 及び CD28 を介したシグナルの必要性についても検討を行ったが、これらの条件が IL-12 の活性をさらに増強するのにに対し、IL-23 の増殖活性には効果を示さなかった(b)。一方、モルモット脾細胞に対して IL-23 は濃度依存的な増殖活性を示し、IL-12 に比べ活性強度は弱いながら明確な種差が認められた (c)。

#### 2-2-5 ヒト PBMC に対する IL-12、IL-23 の IFN $\gamma$ 誘導活性

IL-23 にヒト PBMC に対する細胞増殖活性が認められなかったことから、次に IFN $\gamma$  の誘導活性を比較した(Figure. 2-5)。結果、IL-23 は IL-12 と比べ非常に弱いながら誘導活性を示した。また、IL-12 との相乗効果は何ら認められないが IL-18 との相乗効果は明確に認められた(a)。ただし、IL-23 は IL-12 の 10 倍濃度で使用しており(RKCS 10% vs RKCS 1.0%)、データには示していないが IL-23 を RKCS 1.0%濃度で作用させた場合の IFN $\gamma$ 誘導活性は極めて低い。また、GM-CSF の産生に関しても IL-12 が既報と同じく明確な誘導活性を示すのに対し、IL-23 に同様な効果は殆ど認められなかった(b)。一方、新規な生理活性を探索する目的で Th2 型サイトカインやケモカインを含む他の液性因子の誘導活性についても同様に検討を行ったが、有意な結果は得られなかった。また、(2-2-4)で細胞増殖活性が認められたモルモット脾細胞に対するサイトカインの誘導活性に関しても RT-PCR による比較解析を試みたが、検出感度の限界により有意な結果は得られなかった。

#### 2-2-6 IL-12 及び IL-23 リコンビナント体の種間交叉反応性

最後に IL-12 及び IL-23 リコンビナント体の種間交叉反応性をヒト PBMC 及びモルモット脾細胞を対象に検討した。その結果を Fig. 2-6 及び Table 2-1 に示す。モルモット脾細胞に対しては、ヒト、モルモット IL-12 及び IL-23 の全てが細胞増殖活性を示した。2種間(ヒト vs モルモット)及び2分子間(IL-12 vs IL-23)の比活性はともに同程度であり、また、ヒト PBMC に対する IFN $\gamma$ 誘導活性に関しても同様の傾向を示した。なお、Tyk2 及び Jak2 (IL-12 レセプターの下流)ノックアウトマウスを用いた Shimoda らとの共同研究から、モルモット IL-12、IL-23 はともにマウス細胞群に活性を示さないことを明らかにしている。以上の種間交叉反応性を Table 2-2 まとめた。

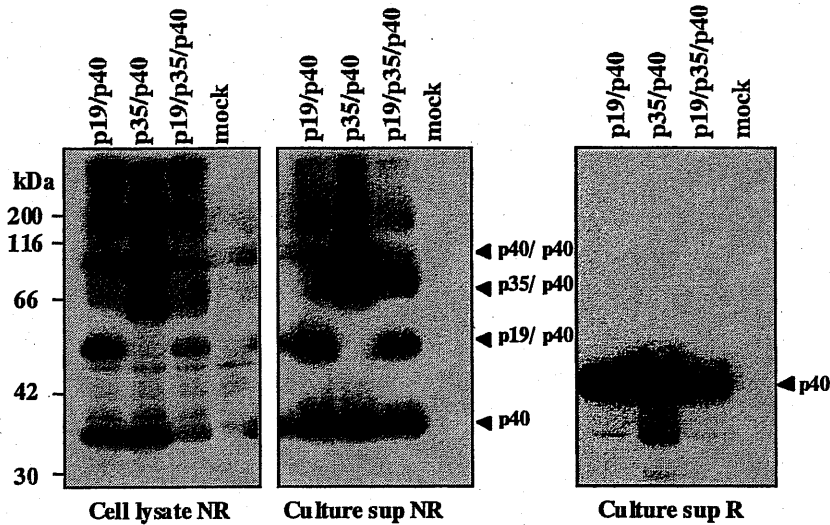


Figure. 2-3 モルモット IL-12 及び IL-23 リコンビナント体の作成と発現確認

ウサギ腎由来 RK13 細胞にモルモット p19、p35 及び p40 分子の発現ベクターを co-transfection し(組み合わせはパネル上部に表記)、24 時間培養後に細胞ライセート(Cell lysate)及び培養上清(Culture sup)サンプルを調製した。SDS-PAGE による分離は 10%アクリルアミドゲルで行い、各サンプル中に含まれるリコンビナント体の発現を抗モルモット p40 抗体で検出した。各リコンビナント体の発現位置は横矢印で示し、NR は非還元、R は還元条件を示す。

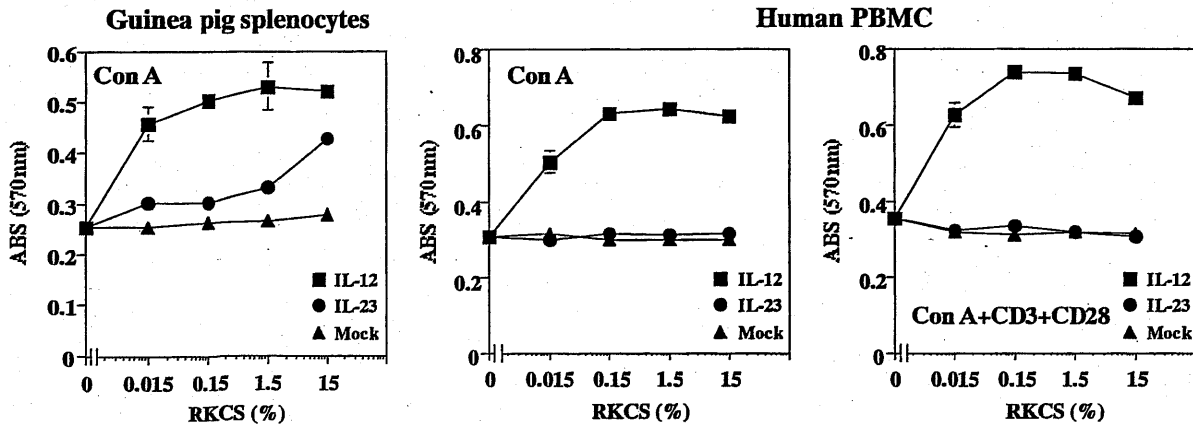


Figure. 2-4 IL-12 及び IL-23 が免疫系細胞に示す細胞増殖活性の比較

IL-12、IL-23 の細胞増殖活性をモルモット脾細胞及びヒト PBMC を対象に比較した。個々の細胞群に作用させたリコンビナント体は同じ種に由来するものを用いている。RKCS (%)はリンパ球培養に加えた RK13 細胞の培養上清濃度を示し、グラフ縦軸の吸光度(570nm)は細胞の増殖度を示す。TCR 刺激に用いた CD3 及び CD28 の作用法に関しては実験方法の項を参照。



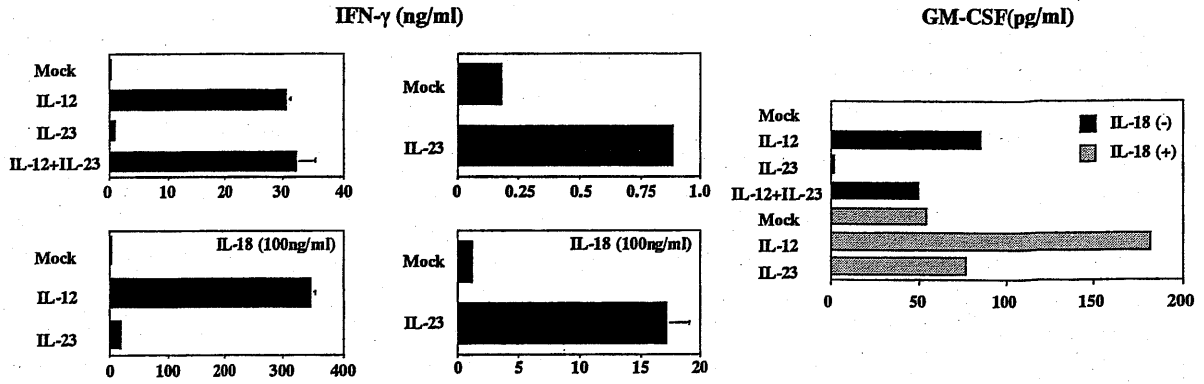


Figure. 2-5 IL-12 及び IL-23 が免疫系細胞に示す IFN $\gamma$ 誘導活性の比較

IL-12 及び IL-23 の IFN $\gamma$ 、GM-CSF 誘導活性をヒト PBMC で比較した。次章で詳しく述べるが IL-12 存在下で IL-18 を作用させた場合、相乗的な IFN $\gamma$  (GM-CSF)の産生誘導が認められる。リコンビナント体は全てヒト型であり、IL-23 は IL-12 の 10 倍濃度で使用している(RKCS 10% vs 1.0%)。培養上清中の IFN $\gamma$  (GM-CSF)濃度は市販の ELISA キットを用いて測定し、解析は全てトリPLICATEで行った。

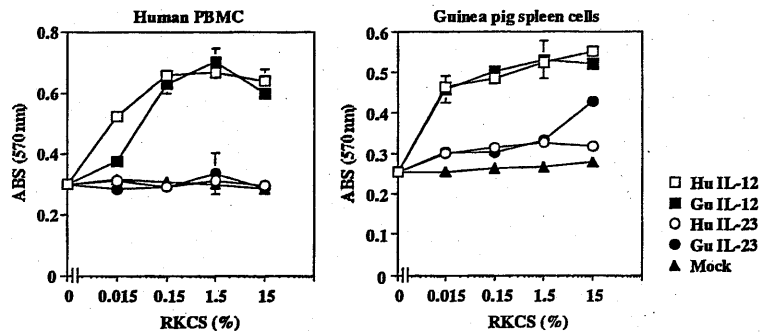


Figure.2-6

Table 2-1

IFN $\gamma$ (pg/ml)	Human	Guinea pig
Mock	178.1 $\pm$ 7.50	
IL-12	30527.3 $\pm$ 863.4	41160.6 $\pm$ 2894.0
IL-23	886.8 $\pm$ 3.82	370.0 $\pm$ 82.7

Table 2-2

ILs \ cells	guinea pig	human	mouse
guinea pig IL-12	+	+	-
guinea pig IL-23	+	+	-
human IL-12	+	+	-
human IL-23	+	+	+
mouse IL-12	ND	+	+
mouse IL-23	ND	ND	+

Figure. 2-6 細胞増殖活性で評価する IL-12 及び IL-23 の種間交叉反応性

実験条件は(Fig. 2-4)に全て従う。Hu はヒト型、Gu はモルモット型のリコンビナント体を示す。細胞増殖活性の測定が困難であるヒト PBMC に対する IL-23 の種間交叉反応性は IFN $\gamma$ の誘導活性で評価した(Table 2-1)。なお、Table 2-1 では PBMC の培養に IL-18 を加えていない。Table 2-3 に Shimoda らとの共同研究で得られた知見を含め、ヒト、モルモット、マウス各細胞群に対する IL-12 及び IL-23 の種間交叉反応性をまとめた。マウス IL-23 のクローニングは現在進行中であり、ND は未解析を示す。

## 2-3 考察

本章ではモルモット IL-23 遺伝子を単離同定し、更に菌体成分刺激を行った抗原提示細胞における発現プロファイル、及び生理活性の種間比較において幾つか興味深い知見を得た。本章冒頭でも述べたように IL-23 は発見からまだ間もないが、現在のところ Th1 応答を稼働する IL-12 様の生理活性をもつと考えられている(28)。しかし、構成サブユニットを共有するという分子性状は過剰な応答を抑制するネガティブフィードバック機構を想定した場合も合理的である(下図 1)。

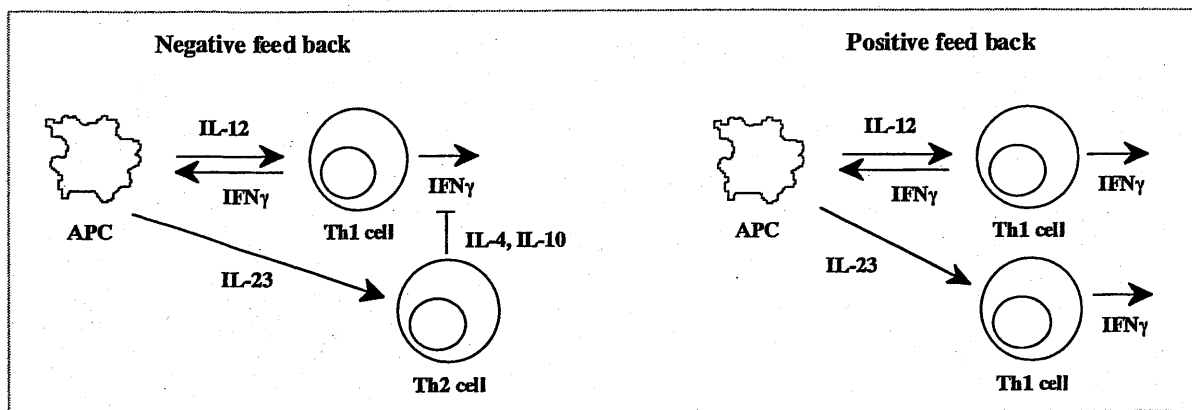


図 1 IL-23 の可能性

抗原提示細胞(APC)から産生された IL-12(p35/p40)は Th1 細胞の IFN $\gamma$ 産生を誘導する。過剰な Th1 シグナル(図では IFN $\gamma$ )は APC の IL-23(p19/p40)産生を誘導し、Th2 細胞に作用した IL-23 は IL-4、IL-10 といった IFN $\gamma$ 抑制因子の産生を惹起する(ネガティブフィードバック)。一方、Th1 シグナルによって誘導された IL-23 が IL-12 と共役し、Th1 応答に対して相乗効果を示すポジティブフィードバックモデルも考えられる。

事実、既報及び本章(2-2-4)でも明らかなように IL-23 の Th1 活性は IL-12 のそれに比べ極めて低く、また IL-12 と共役して Th1 レスポンスを増強する相乗効果は認められていない(2-2-5)。一方、興味深いことに最近 IL-23 レセプターが同定され、Th2 細胞にも Th1 細胞と同程度量発現していることが明らかにされている(37)。しかし上述のネガティブフィードバック機構を指示する知見に関しては、我々の検討を含め現在までのところ得られていない。データには示していないが、我々は先に、産生細胞レベルでも「レドックス制御」に着目した比較解析を行い、ネガティブフィードバック機構の可能性を検討した。マクロファージをはじめとする抗原提示細胞は細胞内のグルタチオンレドックスを調節することで Th1 応答を惹起する還元型(GCH)及び Th2 応答を惹起する酸化型(GSSG)に分化誘導することが可能である(下図 2)(38)。

しかし、両細胞群における IL-12/IL-23 の発現プロファイルに有意差はなく、Th1 応答を抑制する(=Th2 応答を惹起する)効果を期待した IL-23 の発現誘導を認めることはできなかった。

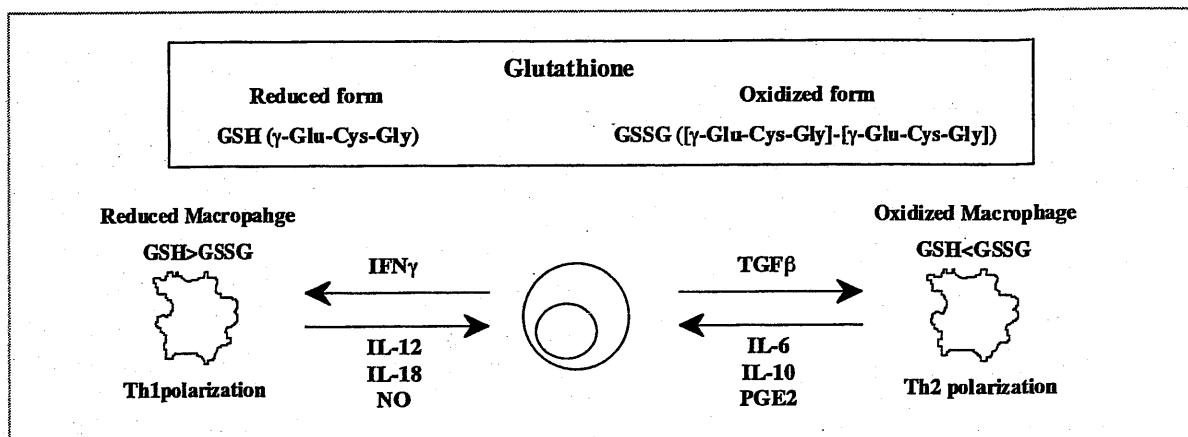


図2 レドックス制御による抗原提示細胞の Th1/Th2 分極

還元型マクロファージは IL-12、IL-18、NO といった Th1 因子を産生し、Th1 細胞の IFN $\gamma$ 産生を誘導する。一方酸化型マクロファージは IL-6、IL-10、PGE2 などの Th2 因子を産生し、Th2 細胞の TGF $\beta$ 産生を誘導する。なお、IFN $\gamma$ 及び TGF $\beta$ は抗原提示細胞の Th1/Th2 分極を paracrine 的に増強する。

一方、Fabio らは抗原提示細胞を活性化する菌体成分(PAMP)の違いにより IL-12/IL-23 の発現誘導が異なることをヒト樹状細胞で明らかにした(36)。当研究室の Nasim らも Fabio らと異なる PAMP を用いて同様な比較解析をヒト樹状細胞で行っており、ともに TLR4 を介する LPS 刺激では IL-12 が、TLR2 を介する PGN 刺激では IL-23 の組み合わせが有意に発現誘導されることを明らかにしている。一方、筆者らがモルモットマクロファージを対象に行った比較解析でも、上述のヒト樹状細胞の傾向とおおよそ一致する発現プロファイルを得た。ただし、LPS 刺激では p40 の発現が p19 同様一過性であった。興味深いことに、p40 とは異なり p35(及び p19)単独での細胞外分泌は認められない(9, 10)。従って、モルモットマクロファージを LPS で刺激した場合、p35 は p40 ではない他のパートナー(例えば EB13 など)と会合して有意に発現している可能性が考えられる。ただし、重要な点は TLR を介したシグナルの多様性が、その後続く高次免疫応答にどの程度影響を与えるかは不明な点が多く、この発現差異の重要性、意義を明らかにするためにも「TLR シグナルが惹起する高次免疫システム」の更なる解析が待たれる。

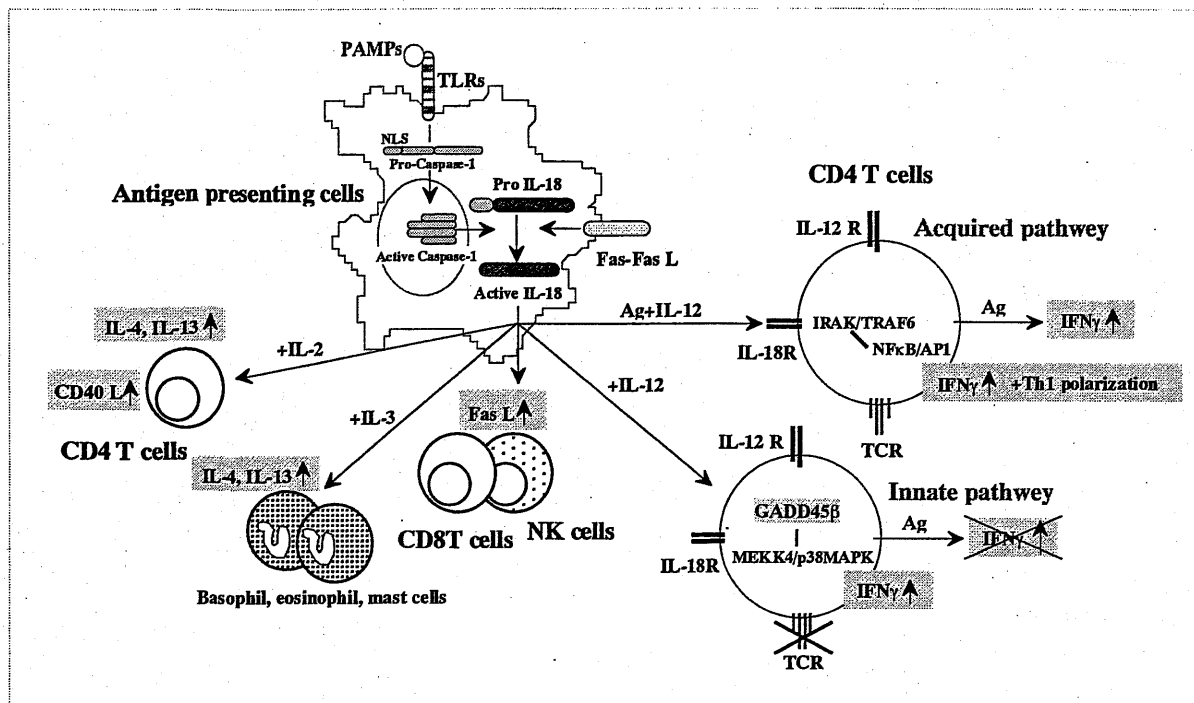
本章では IL-23 の作用機序がヒトとモルモットで異なることも明らかにした。これに関しては「IL-12/IL-23 の比活性(レセプターの発現量を含むシグナル伝達の多様性)が異なる」及び「標的細胞(ポピュレーション)が異なる」のいずれも可能性として考

えられる。しかし、残念ながら IL-23 に関しては両者共に未だ不明な点が多く、現時点でいずれが上述の差異を反映しているかは分からない。いずれにしろ、今回のような種々の細胞集団を含んだ実験系には限界があり、今後、より詳細な種間比較解析を行うためには細胞をサブセットごとに分離する技術をモルモットで構築することが大前提となる。最後に本章冒頭で述べた IL-27 を含め、なぜこういったサブユニットを共有する分子形態(ヘテロダイマー)が複数必要なのか?という根本的な疑問に関しては、今のところ似通った生理活性が報告されているのみである。考察冒頭で述べたネガティブフィードバック機構の可能性を含め、更なる解析が待たれる。

### 第3章 モルモット IL-18 遺伝子の同定及び機能解析

IL-18はIFN $\gamma$ を強力に誘導する因子(Interferon Gamma Inducing Factor, IGIF)として95年、兵庫医大の Okamura らによって同定された(39)。多くのサイトカインファミリーとは異なり、IL-18はN末端に疎水性シグナルペプチドを持たない細胞質タンパクとして合成される(40)。従って、分泌機構もデフォルト経路(ER-Golgi)である多くの糖鎖修飾型サイトカインと異なり複雑である。IL-18には同じく細胞質サイトカインであるIL-1 $\beta$ との構造的な類似性が認められ、ともにシステインプロテアーゼであるCaspase-1(ICE)によってプロセシングされ、活性型として分泌される。ちなみに、その他の細胞質型サイトカインとして、IL-1 $\alpha$ 及びIL-16はCalpain及びCaspase-3によってプロセシングを受ける(41, 42)。IL-18 mRNAの発現は比較的広範囲の細胞、臓器で認められるため、分子制御の多くはこのプロセシング機構が規定すると考えられているがセルバイオロジーは不明な点が多い。例えば、TLRシグナルを介したCaspase-1依存的なIL-18の活性化に加え、Caspase-1非依存的な活性化機構がFas-Fas ligandを介したシグナルで確認されている(43)。またCaspase-1そのものに関しても、最近になって自身のプロドメインが有する核移行シグナル(NLS)に依存した核内活性化機構が報告された(44)。興味深いことにIL-16及びIL-1 $\alpha$ 前駆体のプロドメインにはNLSが存在し、プロテアーゼ(Calpain及びCaspase-3)によるプロセシングに必須であることが明らかとなっている。しかし、IL-18及びIL-1 $\beta$ に同様なNLSは認められず、また活性化機構に関しても、細胞質だけでなく、細胞膜、細胞外で進行する可能性も報告されている(40, 45)。

一方、サイトカイン活性に関しても興味深い知見が数多く報告されている(下図)。IL-18は発見当初から抗原やIL-12存在下でのIFN $\gamma$ 誘導活性に代表される細胞性免疫(Th1)応答のco-activatorとして注目、研究されてきた。しかし、現在では単独あるいはパートナーを変えることで液性免疫(Th2)に対しても増強活性を示すことが明らかになっている(40)。例えばIL-12非存在下、IL-18はT細胞、NK細胞、好塩基球、マスト細胞などに作用してIL-4、IL-13などのTh2サイトカインを誘導する。また、IL-18単独投与は生体内における多クローン性のIgE産生を誘導し、重症アトピー性皮膚炎を惹起する。このように発見から6年が経過した現在でも新知見が続々と報告されているサイトカインであるが、本章ではヒト及びマウスホモログとの比較解析を通じて得られたモルモットIL-18の基礎的な分子性状を中心に報告を行う。



(図)IL-18 による免疫応答の調節

Toll like receptors (TLRs)を介した一連の PAMPs シグナルは Caspase-1 前駆体の活性化を誘導する。活性化された Caspase-1 は IL-18 前駆体に作用し、プロドメインをプロセッシングすることで IL-18 を活性化する。最近、Caspase-1 が核で活性化される可能性が報告されたが確証はない(44)。また、現在までに Caspase-1 非依存的な IL-18 の活性化機構が Fas-Fas L を介したシグナルで惹起されることが明らかとなっている(43)。IL-18 は抗原及び IL-12 存在下で IFN $\gamma$ を誘導し Th1 細胞の分化を惹起する。ちなみに、これらの分化した細胞は抗原による再感作のみで大量の IFN $\gamma$ を産生することが可能となる。一方、IL-18 は抗原非存在下でも IL-12 と共役して IFN $\gamma$ を誘導する。最近、この抗原非依存的な IFN $\gamma$ の誘導機構に必須な分子として GADD45 $\beta$ が同定された(46)。GADD45 $\beta$ の発現は IL-12R 及び IL-18R を介したシグナルで相乗的に誘導され、MEKK4、p38MAPK パスウェイを活性化する。直接作用する標的分子は未だ不明であるが、p38MAPK パスウェイは直接的あるいは間接的に IFN $\gamma$ 遺伝子誘導関連因子を活性化する。驚くことに IL-18 は IL-12 非存在下、IL-3 と共役して好酸球、好塩基球及びマスト細胞の Th2 サイトカイン(IL-4、IL-13)及びヒスタミンの産生を誘導する。また同様に、IL-12 非存在下、IL-2 と共役してナイーブ CD4 細胞の Th2 サイトカイン(IL-4、IL-13)の発現を誘導する。このように IL-18 は IL-12 が共存するか否かで全く異なる作用を発揮する。

### 3-1 実験方法

#### 3-1-1 モルモット IL-18 遺伝子の同定

モルモット IL-18 遺伝子の単離は第 1 章と同様、先にヒト、マウスホモログの ORF 配列内で高度に保存されている C 末端部位に縮重プライマーを設定し、直接 5' RACE-

PCR を行うことで部分配列を決定した。次に得られた部分配列をもとに GSP を設定し、3' RACE-PCR を行うことで全長配列を決定した。なお、遺伝子を単離同定するにあたって使用した動物、細胞、実験法は全て第 1 章に従う。また、使用したプライマーセットは全て巻末サプリメントに表記した。

### 3-1-2 IL-18 mRNA の組織別発現プロファイル

IL-18 mRNA の組織別発現分布は ORF 全長をプローブとする Northern blot で解析した。なお、方法は第 1 章(1-1-5)に従い、使用したメンブレンも(1-1-5)に既述したものと同一である。なおメンブレンの露出は $-80^{\circ}\text{C}$ で 3 日行った。

### 3-1-3 IL-18 前駆体トランスフェクタントの作成及び発現確認

C 末端に His タグを融合したモルモット、ヒト及びマウス IL-18 前駆体の発現ベクター(pME18S)を COS7 細胞及び RK13 細胞に Lipofect AMINE2000 (Gibco)を用いてトランスフェクションし、ともに 10%FCS-DMEM 培地で 24 時間培養後、細胞を回収した。回収した細胞ペレットを 1% Triton-X を含む可溶化バッファー(0.15 M NaCl, 10 mM EDTA, 1 mg/ml IAA, 1 mM PMSF, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4)に懸濁し、on ice で 30 分間放置後、15000rpm で 20 分間遠心を行い、各トランスフェクタントの細胞ライセート(上清)を調製した。その後、各サンプルを還元条件下、12.5%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離し、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のマウス抗 His<sup>6</sup>抗体を用いた Western blot により、各リコンビナント IL-18 前駆体の発現を確認した。

### 3-1-4 ウサギ抗モルモット IL-18 ポリクローナル抗体の作成

ウサギ抗モルモット IL-18 抗体を作成するにあたり、先に免疫原となるリコンビナント IL-18 を大腸菌で作成した。前駆体のプロドメインを除いたモルモット IL-18 配列を PCR で増幅し、N 末端に His タグ(His<sup>6</sup>)が付加されるようフレームをあわせ pQE30 ベクター(Qiagen)に組み込んだ。形質転換体は M15[pREP4]株 (Qiagen)で作成し、1mM 濃度の IPTG で 4 時間誘導後、ニッケルカラム(QIAexpressionist, Qiagen)を用いて精製を行った。尚、精製は付属のマニュアルに記載された変性条件で行い、段階的な透析を行うことでリコンビナント体の再生操作を行った。ウサギへの免疫は(1-1-6)に従う。また抗原特異抗体の精製は(2-1-3)に従い、抗原である上述リコンビナント体を Affi-Gel 10 に吸着させた affinity カラムを用い total IgG より精製した。

### 3-1-5 IL-18 前駆体を恒常的に発現する細胞株の調製及びリコンビナント体の精製

モルモット及びヒト IL-18 前駆体を恒常的に発現する RK13 細胞株の調製は Inoue らの報告に従った(47)。すなわち、上述のモルモット及びヒト IL-18 前駆体の発現ベ

クター(pME18S) 5 $\mu$ g 及び G418 選択用ベクター-pPHL0.5 $\mu$ g を Lipofect AMINE2000 を用いて RK13 細胞に co-transfection し、10%FCS-DMEM 培地(24 穴プレート)で 48 時間培養後、細胞を回収した。回収した細胞は 500 $\mu$ g/ml 濃度の geneticine (G418)を含む同培地に懸濁し、10cm ディッシュ 3 枚に蒔き直した。その後、培地交換を 3 日おきに 2 週間行い、形成された耐性コロニーをペニシリンカップを用いて回収した。各クローンにおける IL-18 前駆体の発現量を前述(3-1-3) Western blot で確認後、最も発現量が高いクローンに関して培養を 10cm ディッシュ 15 枚までスケールアップした。その後、1% Triton-X を含む可溶化バッファーで調製した細胞ライセートを同条件のバッファーで平衡化したニッケルカラムに吸着させ、Imidazole (200mM)を用いた native な条件でリコンビナント体の溶出、精製を行った。

### 3-1-6 質量分析

(3-1-4)及び(3-1-5)で調製したリコンビナント体の質量分析はアプライドバイオシステム(3-1-4)並びに奈良先端科学技術大学院大学(3-1-5)に依頼した。測定は MALDI 法で行い、マトリックスはシナピン酸を選択した。サンプルは全て 20mM リン酸バッファーに 1mg/ml となるよう懸濁し、その内 1 $\mu$ l を 1 回の測定に用いた。

### 3-1-7 IL-18 前駆体の *in vitro* プロセッシング反応

モルモット及びヒト IL-18 前駆体を *in vitro* で Caspase-1 と反応させることによりプロセッシングされた活性型 IL-18 を調製した。方法は Shida らの報告に従い、(3-1-5)に既述した精製 IL-18 前駆体 1 $\mu$ g を 25Uの大腸菌由来ヒトリコンビナント Caspase-1 (Calbiochem)及び 8% glycerol を含む HEPES バッファー(100 $\mu$ l)に懸濁し、25°C で 3 時間反応させた(48)。その際、Caspase-1 特異的な阻害剤である Ac-YVAD-cmk (1mM, Calbiochem)及びシステインプロテアーゼ阻害剤である IAA (10mM, Wako)を含む反応液も同時に調製し、併せて解析を行った。反応の成否は上述反応サンプルを SDS-PAGE で分離後、抗 His<sup>6</sup>抗体を用いた Western blot により確認した。

### 3-1-8 活性型 IL-18 の生理活性評価

(3-1-7)で調製した活性型 IL-18 の IFN $\gamma$ 誘導活性をヒト PBMC 及びモルモット脾細胞を用いて評価した。なお、ヒト PBMC 及びモルモット脾細胞の調製は(1-1-10)に従い、ヒト PBMC に関しては(3-1-7)に既述した各反応液 2 $\mu$ l 及び 10ng/ml のヒトリコンビナント IL-12 (R&D system)を含む 10% FCS-RPMI に  $1.0 \times 10^7$  cells/ml (200 $\mu$ l)となるよう懸濁し、96 穴プレートで 24 時間培養した。培養上清中の IFN $\gamma$ 濃度はヒト IFN $\gamma$  ELISA システム(Amersham Pharmacia)を用いて測定し、解析は全てトリプリケートで行った。モルモット脾細胞に関しては、(3-1-7)の各反応液 30 $\mu$ l 及び(2-1-4)で調製し



た RK13 細胞の培養上清 (モルモット IL-12) 100 $\mu$ l を含む 10% FCS-RPMI に  $4.0 \times 10^6$  cells/ml となるよう懸濁し、6 穴プレート (3ml) で 12 時間培養した。IFN $\gamma$  (及び GM-CSF) mRNA の発現は RT-PCR で確認した。なお、total RNA は RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて回収し、調製は付属のマニュアルに従った。その後の逆転写酵素を用いた一本鎖 cDNA の合成は定法に従い、遺伝子特異的(GSP)なプライマーを用いた RT-PCR は全て同条件(94°C 30sec→55°C 30sec→72°C 30sec)x30 cycles で行った。

### 3-1-9 内因性 IL-18 タンパクの発現プロファイル

*P. acnes* 投与群、及び未投与モルモット群における内因性 IL-18 タンパクの発現プロファイルを Western blot により解析した。兵庫医大岡村春樹博士より御供与頂いた *P. acnes* 加熱死菌 25mg (in HBSS) をモルモット腹腔内に投与し、4 日後に放血致死させ、腹腔浸潤細胞、脾臓、及び PBMC を回収した。未投与群に関しても脾臓、PBMC 及び腹腔レジデント細胞を同様に調製した。なお、PBMC の調製に関して、採血は右足大動脈から行い、凝固防止のため 1%トリプシン、0.25mM EDTA を含む生理食塩水をあらかじめ 100 $\mu$ l/ 10ml blood となるように加えたコーニングチューブに血液を回収した。また、PBMC はマウス用比重分離液(比重=1.09, Wako)を用いて調製し、プロトコールは付属のマニュアルに従った。腹腔浸潤細胞に関しては、1 $\mu$ g/ml 濃度の LPS (*E.coli* 0127:B8, Difco) 及び *P. acnes* 加熱死菌(10 $\mu$ g/ml) を含む 10%FCS-RPMI 培地に  $2.0 \times 10^6$  cells/ml となるよう懸濁し、6 穴プレートで 4 時間培養を行った。その他の菌体成分として *S. aureus* PGN (10 $\mu$ g/ml, Furuka) 及び Malp2 (10ng/ml, peptide synthesis) を 2 次刺激に用い、培養条件は全て上述に従った(49)。なお、泳動サンプルの調製は(1-1-9)及び(3-1-3)に従い、BCA 法によるタンパク濃度測定後、100 $\mu$ g (BSA 当量) を SDS-PAGE (非還元条件下) で分離し、0.1 $\mu$ g/ml 濃度の抗モルモット IL-18 抗体を用いた Western blot により内因性 IL-18 タンパクの検出を行った。

### 3-1-10 免疫染色

IL-18 前駆体の細胞内局在を免疫染色により確認した。モルモット及びヒト IL-18 前駆体を恒常的に発現する RK13 細胞(3-1-5)をチャンバースライド(Nunc)で 24 時間培養し、1% paraformaldehyde で細胞を固定後、0.2% Triton 溶液で細胞の permeabilization を行った。その後の反応は Moriwaki らの報告に従い(50)、IL-18 前駆体の染色には 10 $\mu$ g/ml の抗 His 抗体、核染色には 50 $\mu$ g/ml の propidium iodide (PI, Sigma) を用い、検鏡は共焦点レーザー顕微鏡(FLUOVIEW, Olympus)で行った。

### 3-2 実験結果

(a)

```

1 ATGGCTGTTTCCGACTCAGAAAACGATTGCATCAACTTTGTGAAAATGAAATTTATTGACAGTATACTTTACTTTTATACCTGAGAATGAT 90
  M A V S D S E N D C I N F V K M K F I D S I L Y F I P E N D

91 GACAACCTGGAATCAGATTACTTTGGCAGGATTGAACATCATTGTGCAATCATACGAAATTTGAAAAACCGGTCTCTTTATTGACCGT 180
  D N L E S D Y F G R I E H H L S I I R N L K N Q V L F I D R
  ▲

181 AAGAAGCAGCCTGTGTTGAGGATATGCCGACTCCGACTGTGCAGACAATGAACCTTATACTACGTTTAACATACATGTATATAAGAT 270
  K K Q P V F E D M P D S D C A D N E P Y T T F N I H V Y K D

271 AGCAACGCGAGGAGGTGACCTGTAGCATCTCTGTGACGTGTAACGGGAACCATACCCCTCTCTTGTGAGGACAAAACCTATTTCCTTTAAG 360
  S N A R G V P V A I S V T C N G ██████████ L S C E D K T I S F K

361 GAAATCAATCCCTCGATAATATCAATGACACAAAAAGTGACATAATATTTCCAGAGAAGTGTCCAGGACATGATGATAAGATGCAA 450
  E I N P P D N I ██████████ K S D I I F F Q R S V P G H D D K M Q

451 TTTGAGTCTTCATTGTATAAAGGCTACTTTCTAGCTGTGCAAAAAGAGAGAAAACATTTACAACTTATTCTGAAAAACAAGGATGAATAT 540
  F E S S L Y K G Y F L A C Q K E R N I Y K L I L K N K D E Y

541 GGGGATAAGTCTGTAATGTTCACTGTCCAAAAACGACTAG 582
  G D K S V M F T V Q N N D *
  
```

(b)

Guinea pig	1	M A V S D S E N D C I N F V K M	--K F I D S I--	LYFI P E N D	DN L E S D Y F G R I E H H L S I I R N L K N Q V L F I D R	K K Q P V F E D M P D S D C A D N E P Y T T F N I H V Y K D	F E D M P D S D C A D N E P Y T T F N I H V Y K D	86
Human	1	M A E P V E D N C I N F V A M	--K F I D N T--	LYFI R E D D E N	L E S D Y F G K L E S K L S I I R N L N D Q V L F I D G M R P L		F E D M T P S D C R D N A P R T F I I S	86
Sheep	1	M A A E P V E D N C I S V E M	--K F I R E S--	LYFV A E N G E D	L E S D E F G K L E P K L S I I R N L N D Q V L F I S Q G N Q P V		F E D M P D S D C S D N A P Q T F I I Y	86
Bovine	1	M A A E Q V E D N C I S V E M	--K F I R E S--	LYFV A E N D E D	L E S D E F G K L E P K L S I I R N L N D Q V L F I N D G N Q P V		F E D M P D S D C S D N A P Q T F I I Y	86
Horse	1	M A A G P V E D N C I S L V E M	--K F I D N T--	LYFV A E N D E N	L E S D Y F G K L E P K L S I I R N L N D Q V L F I N D G N Q P V		F E D M P D S D C T D N A P Q T F I I Y	86
Pig	1	M A A E P E D N C I S V E M	--K F I R E S--	LYFV A E N D E D	L E S D Y F G K L E P K L S I I R N L N D Q V L F I N D G N Q P V		F E D M P D S D C S D N A P Q T F I I Y	85
Cat	1	M A A I P V D D C I N F V G M	--K F I D N T--	LYFV A D S E N L E T	D Y F G K L E H K L S I I R N L N D Q V L F I N D G D P V		F E D M P D S D C T D N A P R T F I I Y	85
Dog	1	M A A N L I E D N C I N L V E M	--K F I R E S--	LYF K A E S D E G	L E S D Y F G K L E P K L S I I R N L N D Q V L F V N E G N Q P V		F E D M P D S D C T D N A P H T F I I Y	86
Mouse	1	M A A S E D S C V N F K E M	--M F I D N T--	LYFI P E N G D	L E S D E F G R L H C T T A V I R N I N D Q V L F V D K R Q P V		F E D M P I D T A S E E Q T R L I I Y	84
Rat	1	M A A S E G S C V N F K E M	--M F I D N T--	LYFI P E N G D	L E S D E F G R L H C T T A V I R S I N D O V L F V D K R P E V		F E D M P I D R T A S E E Q T R L I I Y	86
Chicken	1	-----M S E E I A V C A V R L R E M L L Y E D D-----			L E S D A E F K D K T T K R F F R N V S D L L V R P D L N V A A E E D V T D Q E V K S G S G M Y F D L R C			80

Guinea pig	87	V K D S N A R G V P	-V T I S V K C E M L S T L S C E N K I	-----	I S F K E I N P P D N I R K S D I I F F Q R S V P G H D D K I O	F E S S L Y K G Y F L A C K K E R N I	169
Human	87	M Y K D S Q P R C M A	-V T I S V K C E M L S T L S C E N K I	-----	I S F K E V N P P D N I R K S D I I F F Q R S V P G H D D K I O	F E S S S M E G Y F L T F E K E R D L	169
Sheep	87	M Y K D S L T R G L A	-V T I S V Q C K K M S T L S C E N K I	-----	I S F K E M N P P D N I D M E G S D I I F F Q R S V P G H D D K I O	F E S S L Y K G Y F L A C K K E N D L	169
Bovine	87	M Y K D S L T R G L A	-V T I S V Q K K M S T L S C E N K I	-----	I S F K E M N P P D N I D M E E D I I F F Q R S V P G H D D K I O	F E S S L Y K G Y F L A C K K E N D L	169
Horse	87	M Y K D S L T R G L A	-V T I S V K C E M L S T L S C E N K I	-----	I S F K E M S P P E N I N D E G N D I I F F Q R S V P G H D D K I O	F E S S L Y K G Y F L A C K E N D L	169
Pig	86	M Y K D S L T R G L A	-V T I S V Q C K K M S T L S C E N K I	-----	I S F K E M S P P D I D D E G N D I I F F Q R S V P G H D D K I O	F E S S L Y K G Y F L A C K K E N D L	168
Cat	86	M Y K D S L T R G L A	-V T I S V N Y K T M S T L S C E N K I	-----	I S F K E M S P P E S H N D E G N D I I F F Q R S V P G H D D K I O	F E S S L Y K G Y F L A C K E K D L	168
Dog	87	M Y K D S L T R G L A	-V T I S V K Y K T M S T L S C E N K I	-----	I S F K O K M S P P D E I N D E G N D I I F F Q R S V P G H D D K I O	F E S S L Y K G H F L A C K K E N D L	169
Mouse	85	M Y K D S E V R G L A	-V T L S V K D S K M S T L S C E N K I	-----	I S F E E M D P P E N I D D I Q S D L I F F Q K R V P G H N K -M E	F E S S L Y E C H F L A C K E K D D A	166
Rat	87	M Y K D S E V R G L A	-V T L S V K D G R M S T L S C E N K I	-----	I S F E E M N P P E N I D D I R E D L I F F Q K R V P G H N K -M E	F E S S L Y E C H F L A C K E K D D A	168
Chicken	81	V T T A P S A G M P A F S V Q V E D R S I Y M L S E K E H G K M V V R E R S E V E P K D I P G E S N I I F F K K T F T S C S S S A F K F E V S L E Q S M E L A F E E E D S					167

Guinea pig	170	F-KLILKN--KDEYGDKSVHFTVQ---MND-	193 ( ? )
Human	170	F-KLILKK--EDELGDESIHFTVQ---MED-	193 (69.4)
Sheep	170	F-KLILKR--QDNRDKSIHFTVQ---NKN-	193 (66.3)
Bovine	170	F-KLILKK--QDNRDKSVHFTVQ---NQN-	193 (66.8)
Horse	170	F-KLILKE--KDENGDKSVHFTVQ---NQN-	193 (69.4)
Pig	169	F-KLILKE--KDECDKSIHFTVQ---NKN-	192 (67.4)
Cat	169	F-KLILKK--KDENGDKSIHFTVQ---NKN-	192 (66.8)
Dog	170	F-KLILKD--KDENGDKSIHFTVQ---EKE-	193 (65.6)
Mouse	167	F-KLILKK--KDENGDKSVHFTLTLNHQS--	192 (59.1)
Rat	169	F-KLVVLR--KDENGDKSVHFTLTLNHQS--	194 (57.7)
Chicken	168	LRLKLLKRLKPREDEVDTREKIVTSHNERHN	198 (30.3)

Figure. 3-1 モルモット IL-18 遺伝子の同定

(a)モルモット IL-18 前駆体の ORF 塩基配列及び推測されるアミノ酸配列。灰色三角はヒト配列で同定されている Caspase-1 の作用部位を示す。この部位以前の配列がプロドメインであり、以後の配列が活性型 IL-18 に相当する。なお、システイン残基は灰色太字で、N 型糖鎖修飾モチーフは灰色ボックスで表記した。(b)各動物種で同定されている IL-18 配列のアライメント。配列のアクセシオンナンバーは巻末に全て記載。モルモット配列に対する相同性は GENETYX プログラム(ver 11.2)で解析し、各配列最後尾に%で表記した。なお、システイン残基は(a)同様、灰色太字で表記した。

### 3-2-1 モルモット IL-18 遺伝子の同定

モルモット腹腔浸潤細胞 mRNA より調製した cDNA を鋳型とする 5' RACE-PCR スクリーニングよりモルモット IL-18 の部分配列を決定した。またこの既知配列をもとに 3' RACE-PCR を行い全長配列を決定した。Figure.3-1(a)に ORF の塩基配列および推測されるアミノ酸配列を示す。モルモット IL-18 は 5 つのシステイン残基を含む 193 アミノ酸残基からなり、ヒト、マウス配列同様、疎水性アミノ酸残基に富むシグナル配列は認められない。また、活性型 Caspase-1 の標的である N 末プロドメインの cleavage site は前後 7 アミノ酸残基にわたりヒト、モルモット間で非常によく保存されており、モルモット IL-18 前駆体も同部位でプロセシングされる可能性が高いと考える。一方、本章冒頭でも述べたように Caspase-1 前駆体プロドメインが有する核移行シグナル(NLS)や他の着目すべきモチーフに関しては、ヒト、マウス配列を通じて IL-18 には認められない。また、その産生機構から生理的意義はないと考えられるが、モルモット IL-18 は配列内に 2 箇所 of N 型糖鎖修飾モチーフを有する。次に各動物種で同定されている IL-18 配列のアライメント結果を Figure.3-1(b)に示す。モルモット IL-18 はヒト及びウマ配列に最も高い相同性を示し(69.4%)、モルモット、霊長目(ヒト)及び有蹄目(ヒツジ、ウシ、ウマ、ブタ)の間で配列内 5 箇所のシステイン残基は全て保存されていた。

### 3-2-2 モルモット各組織における IL-18 mRNA の発現プロファイル

IL-18 の ORF 全長をプローブとして用いた Northern blot 解析を行い、各組織における IL-18 mRNA の発現プロファイルを検討した。Figure.3-3 にその結果を示す。興味深いことに、発現が精巣に局限される IL-12 p35、p40 分子とは異なり、IL-18 mRNA の発現は比較的広範囲の臓器で認められ、特にリンパ組織での発現が顕著であった。また、IL-12 とは異なり LPS 刺激(24 時間)を行った腹腔浸潤細胞では IL-18 mRNA の発現量が著明に増強された。

### 3-2-3 リコンビナント IL-18 前駆体の作成及び発現確認

次に C 末端に His タグを融合した IL-18 前駆体の発現ベクター(pME18S)をモルモット、ヒト、マウス配列で作成し、RK13 細胞及び COS7 細胞に強制発現させた各リコンビナント体の比較を行った。その結果を Fig.3-4 に示す。興味深いことに SDS-PAGE で分離を試みた各リコンビナント体のうち、モルモット型にのみ明確なサイズ差が認められた。またこのサイズ差は RK13、COS7 細胞の両トランスフェクタントで確認された。ちなみに各リコンビナント体の理論質量数(Average MW)はモルモット(23386.78)、ヒト(23336.98)、マウス(23145.83)であり、求められる質量差( $\Delta$ MW)はヒト-モルモット(49.8)、ヒト-マウス(191.2)、モルモット-マウス(241.0)である。従っ

て、SDS-PAGE で生じるサイズ差は理論値から予測される可能性と明らかに矛盾した。加えて Table 3-1 に示すように、泳動時の分離度に影響を及ぼす可能性がある塩基性アミノ酸残基の含有量も 3 者間で顕著な差は認められない。そこでモルモット配列に特異的な翻訳後修飾の可能性を考え、先に抗体作成のため免疫原として調製した活性型 IL-18 の質量分析を試みた。

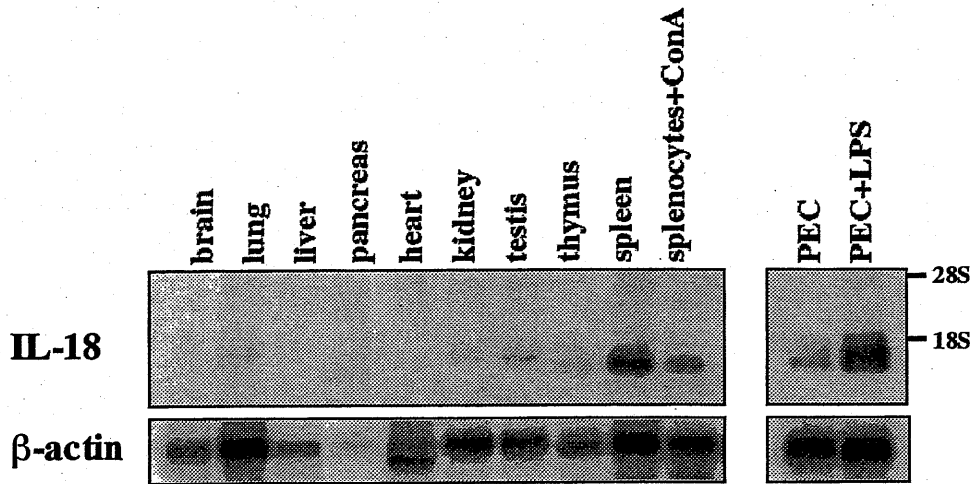


Figure. 3-2 モルモット各組織における内因性 IL-18 の発現プロファイル

(a) IL-18 ORF 全長をプローブに用いた Northern blot 解析。メンブレンは Figure.1-3 で使用したものと同一であり、フィルムの露出時間(-80°C)は IL-18 (3days)、 $\beta$ -actin (1day)である。

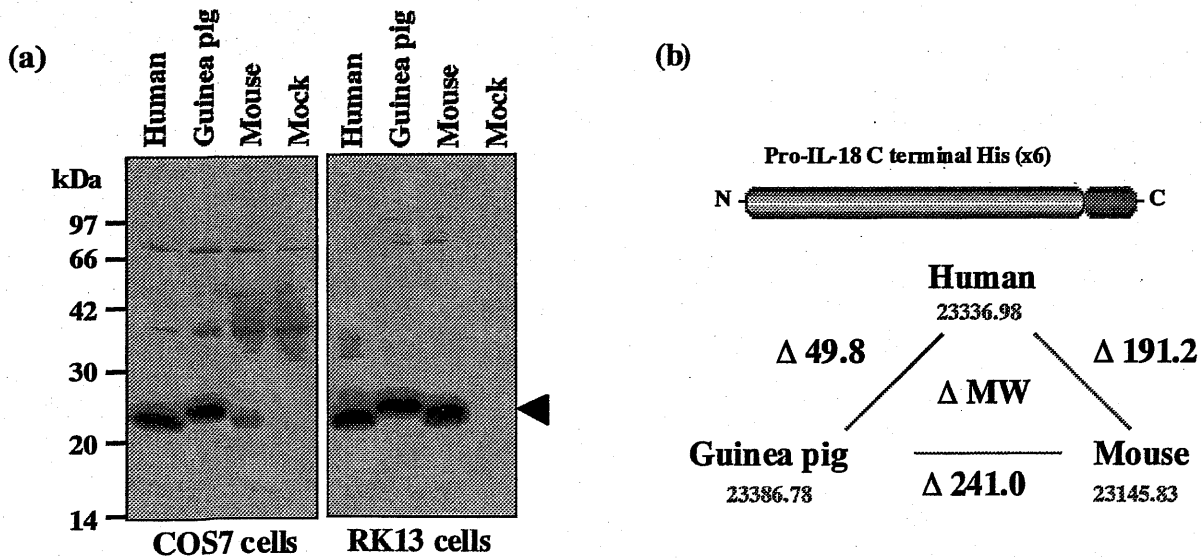


Figure. 3-3 リコンビナント IL-18 前駆体の作成及び発現確認

(a) COS7 及び RK13 細胞に IL-18 前駆体(モルモット、ヒト、マウス)を一過性に強制発現させ、SDS-PAGE (12.5%アクリルアミドゲル、還元条件)で細胞ライセートを分離後、抗 His タグ抗体で検出した。(b) 各リコンビナント体の理論質量数(Average MW)及び質量差( $\Delta$ MW)は GENETYX プログラムで解析した。

Table 3-1 IL-18 前駆体配列に認められる塩基性アミノ酸残基の含有量

Species/AA	Lys	His	Arg	Total
Guinea pig	16/193 (8.29%)	5/193 (2.59%)	6/193 (3.11%)	27/193 (13.99%)
Human	15/193 (7.77%)	1/193 (0.52%)	8/193 (4.15%)	24/193 (12.44%)
Mouse	15/192 (7.81%)	4/192 (2.08%)	6/192 (3.12%)	25/192 (13.02%)

### 3-2-4 活性型 IL-18 の作成及び質量分析

免疫原用に調製した精製リコンビナント体はプロドメインを除いた活性型(N 末端に His タグを付加)を大腸菌で作成したものであり、理論質量数(Average MW)は 19619.69 である。精製したリコンビナント体は SDS-PAGE で分離後、CBB 染色にて単一であることを確認した(Figure.3-5)。この活性型リコンビナント体の質量分析(MALDI 法)での実測質量は 19612.1874 であり、理論質量数と概ね一致した(誤差は 0.0382%)。さらに、実測質量 19687.7346 及び 19820.4150 の位置に明確なピークが確認された。この 2 つのピークが示す実測値と先の実測値の質量差( $\Delta MW$ ) は 75.55 及び 208.23 であり、大腸菌で作成した活性型リコンビナント体の一部がリン酸化(79.96)及びミリスチル化(210.19)などの翻訳後修飾をうけている可能性が示唆された。しかし、上述のサイズ差とは解釈が別であり、実際の証明は行っていない。また、この 2 つのピークが測定時の分解不足などによる非特異的産物ある可能性も完全には否定できない。以上、大腸菌由来の活性型 IL-18 に SDS-PAGE で生じるサイズ差を説明可能な生物的修飾は認められなかった。そこで次にプロドメインを含むモルモット及びヒト IL-18 前駆体のリコンビナントを動物細胞で調製し、同様な質量分析による比較検討を行った。

### 3-2-5 モルモット及びヒト型 IL-18 前駆体の作成と質量分析による比較検討

(3-2-3)に既述したモルモット及びヒト型 IL-18 前駆体を発現するトランスフェクタントを RK13 細胞で調製し、G418 で選別した stable clone を大量培養後、1% Triton-X で可溶化した細胞ライセートよりニッケルカラムを用いて前駆体の精製を行った。精製したリコンビナント体を SDS-PAGE で分離後、CBB 染色にて確認した結果を Figure.3-6(a)に示す。還元、非還元条件に関わらず、精製後も依然として両リコンビナント体に明確なサイズ差が認められる。しかし、各リコンビナント体の実測質量は 23292.95 (モルモット) 及び 23243.97(ヒト)であり、両分子の質量差( $\Delta MW$ ) 48.98 は理論値 49.8 とほぼ完全に一致した。従って SDS-PAGE で認められるサイズ差は実際の質量差を反映していないことが判明した。ただし、各リコンビナント体の実測質量値はともに理論質量数より 100 マスほど小さい。これに関しては各分子とも開

始メチオニンの次に位置するアラニン残基のアセチル化で計算が一致する。ちなみにこのアラニン残基は Figure.3-1(b)に示した全ての哺乳類配列で保存されており、IL-18 前駆体が開始メチオニンのプロセッシングからアラニン残基のアセチル化と続く一連の N 末端に特異的な保護修飾をうける可能性は極めて高いと考える。

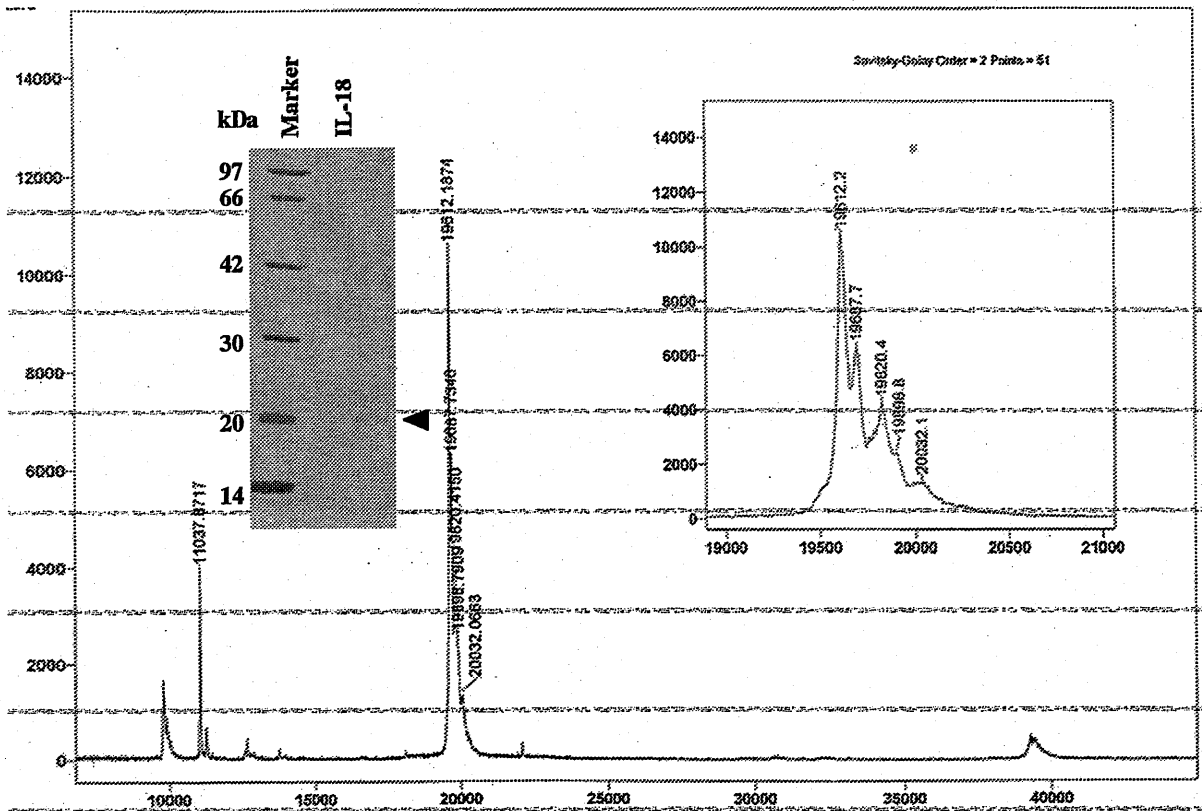


Figure.3-4 活性型 IL-18 (*E.coli* 由来)リコンビナント体の精製及び質量分析

N 末端に His タグを付加したモルモット活性型 IL-18 リコンビナント体を大腸菌で作成し、変性条件下、ニッケルカラムを用いて精製した。透析再生を行った精製リコンビナント(1.5 $\mu$ g/lane)を SDS-PAGE (12.5%アクリルアミドゲル)で分離後、CBB 染色による確認を行った。この精製リコンビナント(1.0  $\mu$ g)の質量分析を行った結果、理論質量数 19619.69 に対し、19612.19 の実測値を示した (誤差は 0.0382%)。縦軸は検出強度、横軸は質量(マス)値(m/s)を示す。

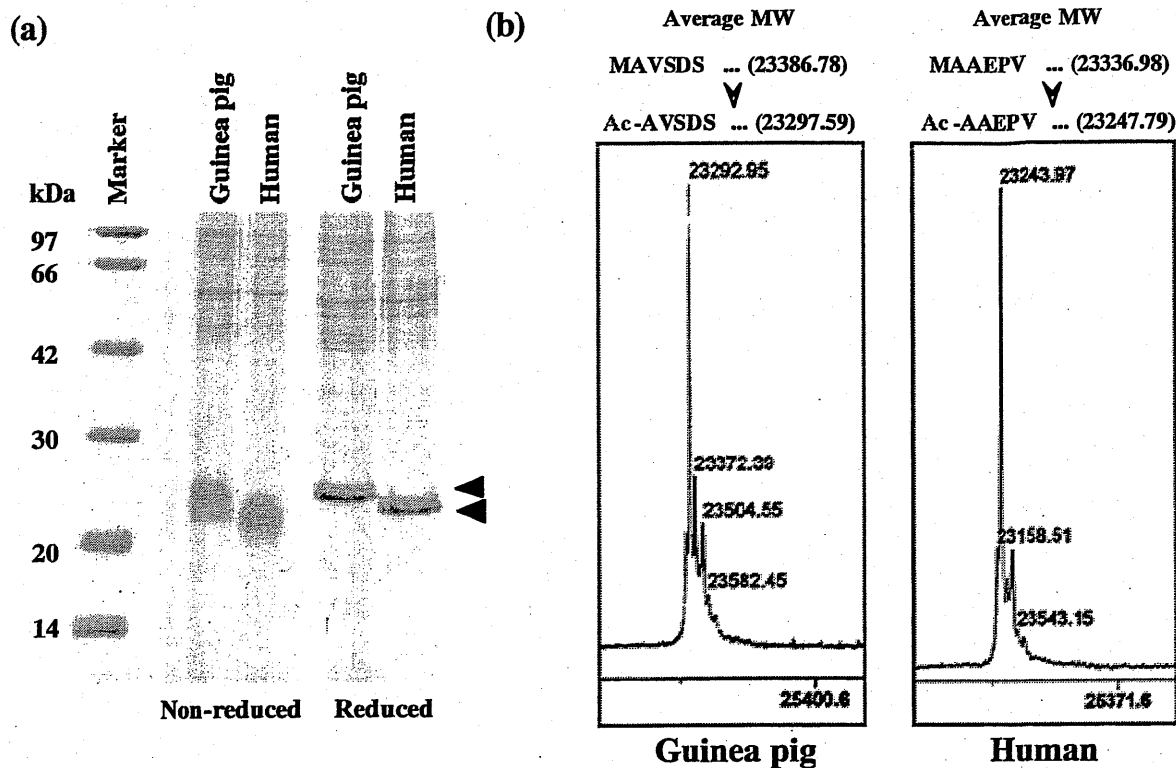


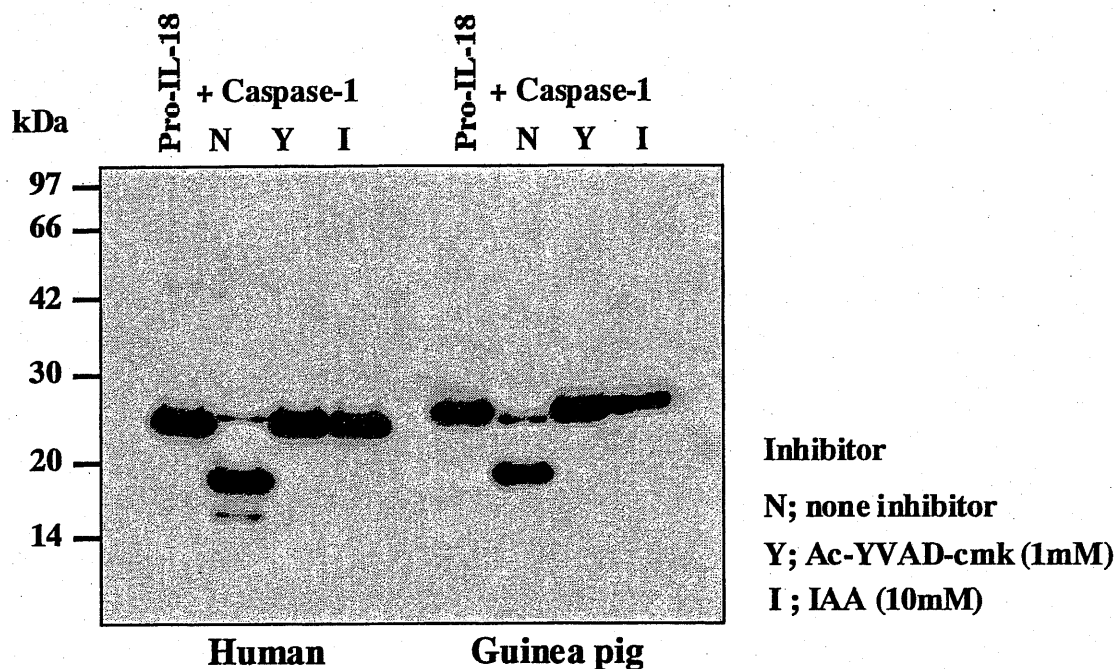
Figure.3-5 モルモット、ヒト IL-18 前駆体の精製及び質量分析

C 末端に His タグを付加したモルモット及びヒト IL-18 前駆体を恒常的に発現するクローンを RK13 細胞で作成し、native 条件下、ニッケルカラムを用いてリコンビナント体の精製を行った。(a)精製リコンビナント(2.0 $\mu$ g/lane)を SDS-PAGE (12.5%アクリルアミドゲル)で分離後、CBB 染色による確認を行った。各精製リコンビナント(1.0  $\mu$ g)の質量分析を行った結果、理論質量数 23386.78(モルモット)、23336.98 (ヒト) に対し、実測値は 23292.95(モルモット)及び 23243.97(ヒト)を示した。縦軸は検出強度、横軸は質量(マス)値(m/z)を示す。なお、Ac-A はアセチル化修飾をうけたアラニン残基を示し、修飾後の理論質量数は以下の計算式より求めた。修飾後の理論質量数=未修飾の理論質量数-開始メチオニンの分子量(149.22)+アセチル化修飾(42.01)。

### 3-2-6 IL-18 前駆体の *in vitro* プロセッシング反応

モルモット IL-18 の生理活性を評価するにあたり、(3-2-5)に既述した精製 IL-18 前駆体に対して、ヒト型リコンビナント Caspase-1 を作用させる *in vitro* プロセッシング反応により活性型の調製を行った。なお、(3-2-4)で調製した大腸菌由来の活性型リコンビナント体に生理活性は認められなかった。これに関しては N 末端にタグを融合していること、また精製後の再生操作が不適切であったことなどが可能性として挙げられる。また、既報の多くでは IL-18 前駆体及び Caspase-1 前駆体を動物細胞に一過的に共発現させることで活性型 IL-18 の調製に成功しているが、我々の検討では再現不可能であった(Caspase-1 前駆体はオートプロセッシングされるらしい)。反応混

合物を SDS-PAGE で分離し、抗タグ抗体で検出した結果を Figure.3-6 に示す。モルモット及びヒト IL-18 前駆体はともにヒト型リコンビナント Caspase-1 を作用させることで 18kDa の活性型にプロセッシングされ、またこれらのプロセッシング反応はシステインプロテアーゼ阻害剤である IAA 及び Caspase-1 に特異的な阻害剤である Ac-



YVAD-cmk 存在下では完全に抑制された。興味深いことに 18kDa の活性型に関しては、モルモット及びヒト型リコンビナント体の間に前駆体ほどのサイズ差は認められない。

Figure.3-6 IL-18 前駆体の *in vitro* プロセッシング反応

精製 IL-18 前駆体(モルモット、ヒト型)及びリコンビナント Caspase-1 の反応混合物を SDS-PAGE(12.5% アクリルアミドゲル、還元条件)で分離後、0.1 $\mu$ g/ml 濃度の抗 His(x6)タグ抗体を用いた Western blot により各反応物(0.5 $\mu$ g of recombinant IL-18 /lane)の検出を行った。反応条件の詳細は「実験方法」の項を参照。Pro-IL-18 は前駆体を示す。

### 3-2-7 活性型 IL-18 の生理活性評価

ヒト PBMC 及びモルモット脾細胞の培養上清に、(3-2-6)で調製した反応混合物を直接加える方法で活性型 IL-18 の生理活性を評価した。その結果を Figure.3-7 に示す。なお、ヒト PBMC の培養上清には 10ng/ml 濃度の IL-12 を加え、上清中の IFN $\gamma$ 濃度は ELISA で測定した。一方、モルモット脾細胞の培養上清には 4% (v/v)濃度の RKCS (IL-12)を加え、回収した脾細胞の mRNA を鋳型とする RT-PCR で評価を行った。結果、ヒト PBMC 及びモルモット脾細胞ともに活性型 IL-18 のみに応答し、IFN $\gamma$ の産生が認められた。さらに補足として、ヒト PBMC に対してモルモット活性型は交叉



反応性を示さず、生理活性を規定する種特異性が認められた(モルモット脾細胞に対する同様な検討は行っていない)。

### 3-2-8 内因性 IL-18 タンパクの発現プロファイル

マウスでの既報に従い(39)、*P. acnes* 加熱死菌を腹腔投与したモルモット腹腔浸潤細胞における内因性 IL-18 タンパクの発現を抗モルモット IL-18 抗体を用いた Western blot 解析で確認した。なお、PBMC 及び(3-2-2)に既述した Northern blot 解析の結果から IL-18 mRNA の著明な発現が確認された脾細胞に関しても同様な解析を行った。その結果を Figure.3-9 に示す。コントロール(未投与群)に比べ、*P. acnes* 投与群から回収した腹腔浸潤細胞、脾臓及び PBMC では内因性 IL-18 タンパクの発現が著明に増強されていた。しかしその発現はいずれも前駆体であり、LPS 及び *P. acnes* などの菌体成分による 2 次刺激(in vitro)を行っても、活性型へのプロセッシングは認められなかった(a)。さらに、モルモット腹腔浸潤細胞に作用して IL-23 の発現を著明に誘導することが明らかな *S. aureus* PGN (2-2-2)及び当研究室で TLR を介したシグナルを誘導することが確認されている種々の PAMPs を用いて 2 次刺激の再検討を試みたが、いずれも活性型へのプロセッシングは認められなかった(b)(49)。

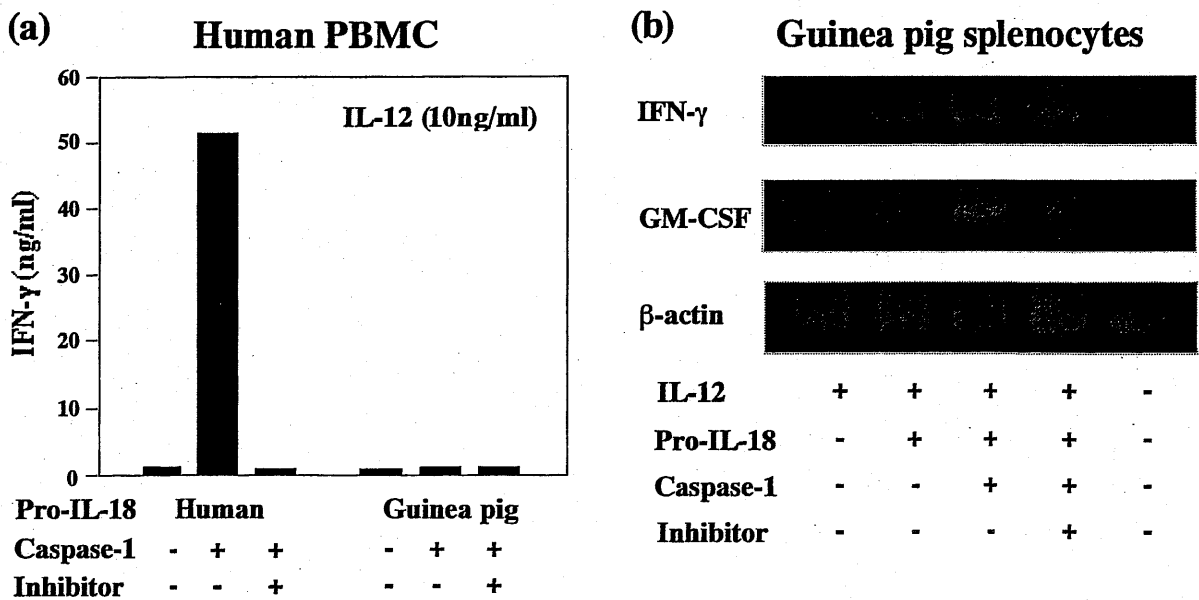


Figure.3-7 活性型 IL-18 の活性評価

Figure.3-6 の反応混合物を直接、ヒト PBMC (a)及びモルモット脾細胞(b)の培養上清に加える方法で IL-18 の生理活性を評価した。ヒト PBMC は 24 時間、モルモット脾細胞は 12 時間培養後、それぞれ培養上清及び細胞の回収を行った。なお、(a, b)に表記した inhibitor は Ac-YVAD-cmk(10mM)である。

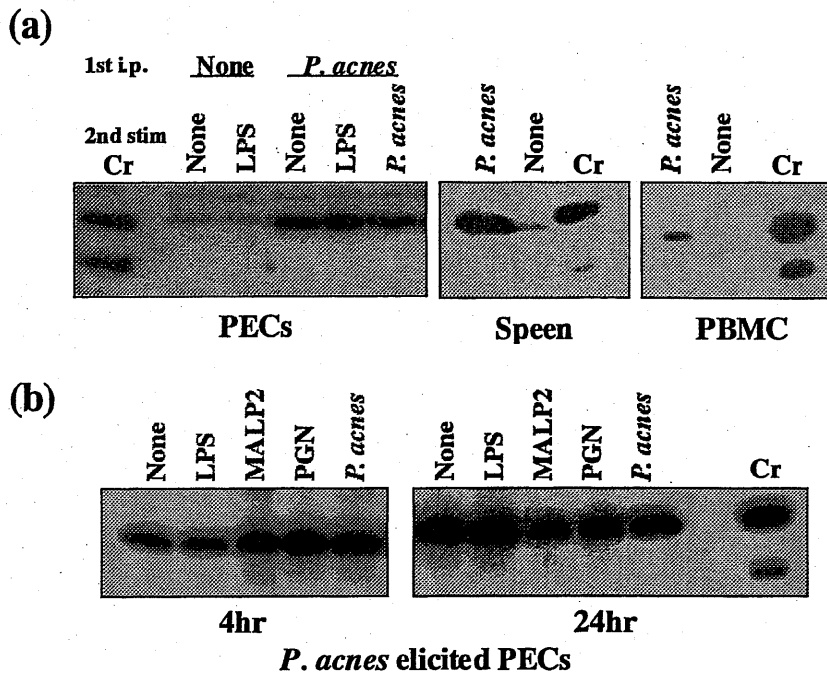


Figure.3-8 内因性 IL-18 タンパクの発現プロファイル

(a) *P. acnes* 投与群は HBSS に懸濁した 25mg の *P. acnes* 加熱死菌を腹腔内(i.p.)に投与し、4 日後に腹腔浸潤細胞(PECs)、脾臓(Spleen)及び末梢血単核球細胞(PBMC)を回収した。なお、1st i.p.は前述の in vivo 刺激を意味し、None は未刺激で回収した腹腔内定住細胞を意味する。また、腹腔より回収した PECs はシャーレ上で LPS (1 $\mu$ g/ml)もしくは *P. acnes* 加熱死菌(10 $\mu$ g/ml)存在下、4 時間培養を行った(2nd stim)。各サンプルは 100 $\mu$ g/lane となるよう調製し、SDS-PAGE (12.5%アクリルアミドゲル、非還元条件)で分離後、0.1 $\mu$ g/ml 濃度の抗モルモット IL-18 抗体を用いた Western blot により内因性 IL-18 タンパクの発現を確認した。なお、Cr はポジコンマーカであり、Caspase-1 と反応させた 18kDa の活性型(3-2-6) を当量の前駆体(24kDa)と混合することで調製し、Western blot には 50ng of each fragment/lane で使用した。

(b) *P. acnes* 加熱死菌(i.p.)で誘導した PECs に対して、2 次的な PAMP 刺激(in vitro)を行った。使用した菌体成分のロット及び濃度は「実験方法」の項を参照。また、解析は全て(a)に従う。

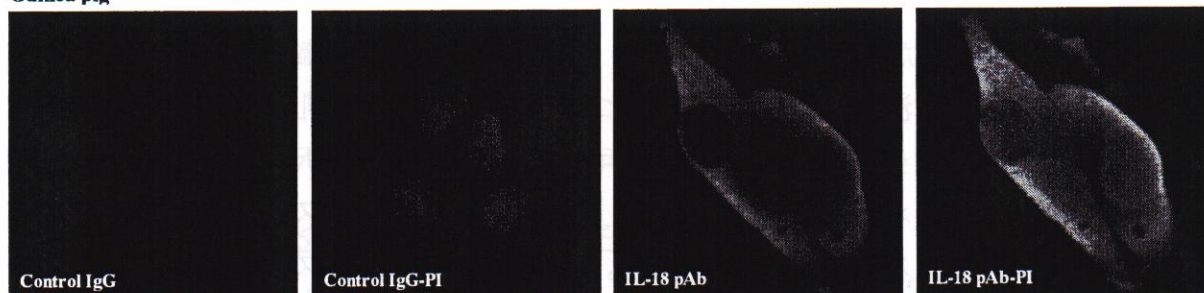
### 1-3 考察

本章ではモルモット IL-18 遺伝子を単離同定し、更にモルモット、ヒト、マウスリコンビナント体の発現比較において幾つか興味深い知見を得た。はじめに今回同定したモルモット IL-18 を含むヒト、マウス前駆体のリコンビナント体を動物細胞 (RK13、COS7) に強制発現させ、SDS-PAGE で分離した各リコンビナント体の分子サイズを比較した結果、理論上の分子量差に反し、モルモット前駆体のみに明確なサイズ差が認められた。なお、内因性 IL-18 に関しても同様な比較を試みたが、今回作成したポリクローナル抗体を含め、交叉反応を示す適当な抗体が準備できなかったため、確認できていない。興味深いことに IL-18 と構造的に類似する IL-1 $\beta$  では配列内リジン残基のミリスチル化が確認されており、この翻訳後修飾が膜への transport に重要である可能性が報告されている(45, 51)。そこで同様なモルモット IL-18 に特異的な翻訳後修飾の可能性を考え質量分析を試みたが、実測値から求められる質量差は理論値と一致し、泳動で認められたサイズ差は実際の質量差を反映していなかった。その他の可能性として立体構造的な影響が考えられるが、少なくとも構成アミノ酸に関しては、泳動に影響を与えると考えられる極性分子の含有量に顕著な差は見られず、またデータには示していないが、高次構造を予測するプログラムを用いた解析でも特に原因となり得るような差異は認められなかった。従って更なる解明には結晶解析や NMR などの専門的な解析が必要であり今後の検討課題である。一方、今回の質量分析では同時に IL-18 前駆体が N 末端に特異的な保護修飾(開始メチオニンのプロセッシングに続くアラニン残基のアセチル化)を受けている可能性が示唆された。IL-18 の翻訳後修飾に関してはヒト、マウスを含め報告はなく、また実際に標識脂肪酸の取り込み実験を行う必要があるが、N 末端 2 番目のアラニン残基は現在までに同定されている配列のうち、ニワトリ配列を除く全てで保存されていることから、哺乳類では種を問わない普遍的な修飾であると考えられる。興味深いことに、細胞質に局在するタンパク質の約半数が同様なアセチル化による N 末端修飾を受けており、さらにアラニン残基はアセチル化されるアミノ酸残基の 40% をしめることが統計学的に証明されている。未だその生理的な意義は明らかにされていないが、IL-18 に関しても前駆体は細胞質内に均一に局在することを免疫染色で確認しており、質量分析から推測される翻訳後修飾の可能性は極めて高いと考える(下図)。

なお、本章では Okamura らの既報に従い、*P. acnes* 投与群及び非投与群における内因性 IL-18 タンパクの発現差異を Western blot で比較した(39, 40)。本実験では残念ながら内因性の活性化機構を確認することはできなかったが、Kikkawa らも報告しているように当研究室では、ヒト、マウスいずれの細胞群においても既報の反応機構に

対する再現性が得られていない(52)。従って、信頼性という点でも活性化機構に関しては今一度、再考察する必要があると考える。一方、興味深いことに今回の解析では腹腔浸潤細胞(マクロファージ)に加え、脾臓、PBMCにおいても *P. acnes* 投与による明確な発現増強が確認された。これまでタンパクレベルでの発現が確認されている IL-18 産生細胞はマクロファージ、樹状細胞、単球などの抗原提示細胞に限局されてきたが、脾臓、PBMC における該当サブセットの割合は PBMC で~9%、脾臓にいたっては数%と極めて少ない。従って上述の脾臓、PBMC における IL-18 の発現誘導に関しては、APC 以外のサブセットが産生細胞として関与している可能性が考えられるが、現在のところ、唯一ラット脾細胞で同様の結果が報告されている (53)。本章冒頭でも述べたとおり、IL-18 の標的細胞は T 細胞に限らず非常に多様であることが最近明らかにされつつあり、新規な生理活性の可能性を含めこれらのサブセットが IL-18 を発現する意味、重要性を明らかにすることは非常に興味深い検討課題であると考えられる。

#### Guinea pig



#### Human

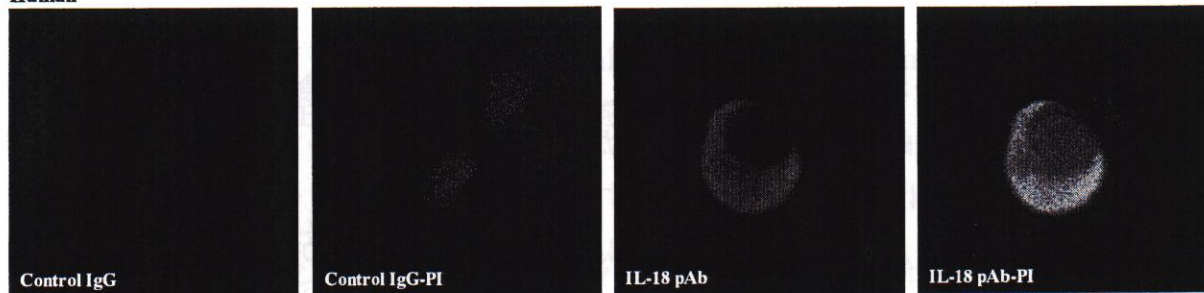


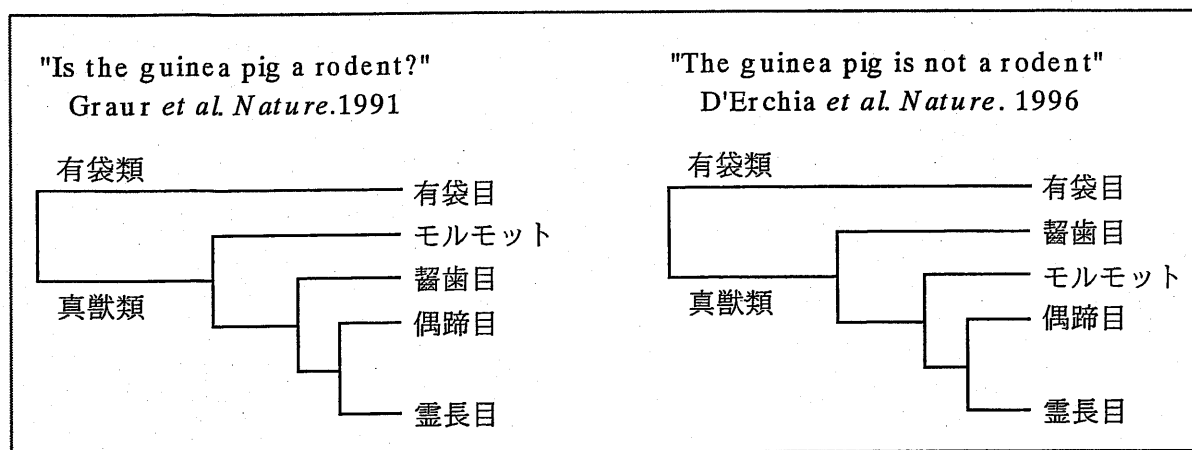
Figure.1-7 モルモット及びヒト IL-18 前駆体の細胞内局在

モルモット及びヒト IL-18 前駆体を恒常的に発現する RK13 細胞を対象に、抗 His タグ抗体を用いた免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いた検鏡により細胞内局在を確認した。PI は propidium iodide を示し、個々の細胞の核染色に用いた。

#### 第4章 モルモットサイトカイン遺伝子の分子進化

モルモット(*Cavia porcellus*)は形態学上、齧歯目の新世界ヤマアラシ亜目(テンジクネズミ亜目)に分類される。齧歯目は哺乳類(有袋類+真獣類)の中でも最も多くの種を含む目であるが、形態学上3つの亜目に分類される。すなわち、リス亜目、ネズミ亜目及びヤマアラシ亜目である。最初の2つの亜目は単一系と考えられているが、ヤマアラシ亜目の動物は、齧歯目の中でも独立したグループと考えられている。事実、ヤマアラシ亜目は他の2つの齧歯類亜目と比較して非常に特異な形態学および分子生物学的特徴をしばしば示す。従って、モルモットの分子進化に関する従来の文献も、「収斂進化」、「きわめて速い置換速度」および「ユニークな進化のメカニズム」を論じたものが多くを占めるが、このような「モルモットの遺伝子は特異である」という主張は、たいていモルモットが齧歯類であるという仮定に基づいている。しかし、91年、*Graur*らは15種類の分子のアミノ酸配列データをもとに行った系統発生的分析から「モルモットを齧歯類に分類するのは適当ではない」とする新しい説を提唱した(54)。彼らはモルモット、ネズミ亜目、霊長目及び偶蹄目の全てでアミノ酸配列が決定されており、かつ有袋類もしくは哺乳類以下の生物種のアミノ酸配列がアウトグループとして利用可能である分子を選択、解析を行った結果、霊長目と偶蹄目がネズミ亜目の齧歯類(ラットおよびマウス)から分れる以前にモルモットは分岐することが示唆された。そこで彼らは、ネズミ亜目とヤマアラシ亜目は1つのクレード(共通の祖先から進化した生物群)に属するのではなく、ヤマアラシ亜目は分類学上の地位を上げて、齧歯類とは別の独立した哺乳類の目に分類すべきであることを提唱し、その結果、もしネズミ亜目が食肉目、重歯目、偶蹄目および霊長目が分岐する以前に分岐したのであれば、新しいヤマアラシ目は、真獣類の系統発生における初期の分岐を示すものになるという驚くべき結論が導かれた。その後、同様なモルモットの分子進化に関する解析が幾つか行われたが、知見が蓄積されるにつれ、モルモットの進化上の分岐位置が「解析する分子集団の選択」及び「計算法」によって異なり、必ずしも統一した見解が得られないことが明らかとなった(55)。従って、問題の解決には更なる遺伝子配列の網羅的解読、及びそれらの個別分析データを基にした統計学的な分析が必要となり、96年 *D'Erchia*らは①母性遺伝であること、②組換えがないこと、③多くの生物種において相同遺伝子が同定されているという利点からモルモットミトコンドリアゲノムの完全長を解読し、同様な系統発生的分析から、「ネズミ亜目の齧歯類がモルモットを含む他の真獣類に対してアウトグループになる」という見解を報告した(下図)(56)。従って、進化上の分岐位置は異なるが、上述の *Graur*らの報告と同様、やはりモルモットは齧歯類に

分類すべきではないという結論が導かれた。本章では現在までに同定されているモルモットサイトカイン遺伝子のうち、哺乳類以下の生物種でホモログ遺伝子が単離されているもの、あるいは全ドラフトシーケンスが公開されているフグゲノムからホモログ遺伝子の推測が可能な分子に関して系統発生的分析を行い、モルモットの進化上の分岐位置(分子進化)に関してサイトカイン遺伝子を基に考察した。



(図) モルモットは齧歯類なのか？

## 4-1 実験方法

### 4-1-1 フグ IL-12 p35、p40 及び IL-10 分子の同定

モルモット IL-12 p35、p40 及び IL-10 分子のアミノ酸配列をプローブに、フグゲノム上に存在する相同遺伝子の検索を行った。検索は NCBI Blast search サイトの Fugu genomic blast プログラム(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/fugu.htm>)で行い、その他の解析には GENETYX プログラムを使用した。

### 4-1-2 サイトカイン遺伝子の系統樹作成

各サイトカイン遺伝子群のアライメントは Clustal W プログラム([http://hypemig.nig.ac.jp/homology/clustalw\\_help.html](http://hypemig.nig.ac.jp/homology/clustalw_help.html))で行った。系統樹推定は近隣結合法 (neighbor-joining, NJ 法) で行い、その際、bootstrap の連続実行(1000 回)を解析オプションとして指定した。系統樹は TreeView PPC プログラム(version 1.6)で作成し、全て radial type で表記した。なお、各サイトカイン配列のアクセッションナンバーは巻末サプリメントに全て表記した。

## 4-2 実験結果及び考察

### 4-2-1 コンピュータ解析によるフグサイトカイン分子の検索

一般的に真獣類の分岐の順序はまだよく判っていないため、有袋類もしくは哺乳類以下の生物種をアウトグループとして加えることで系統発生的分析は俄然有意義なものとなる。現在までにモルモットホモログが同定されているサイトカインのうち、IL-12 p35、IL-12 p40、IL-10、GM-CSF、IL-5 に関しては有袋類及び哺乳類以下の生物種でホモログ遺伝子が単離されていない。そこで、最近全ドラフトシーケンスが公開されたフグゲノム上にこれらサイトカインの相同配列が存在するか否か Blast 検索を行った。はじめに同定されている哺乳類の全 ORF 塩基配列をプローブに順次 BLAST 検索を行ったが、該当する相同遺伝子は認められなかった。そこで、次にモルモットホモログのアミノ酸配列をプローブに Gene scan プログラムを実行したところ、IL-12 p40 及び IL-10 の相同配列がフグゲノム上に認められた(Figure.4-1)。ちなみに、これらのフグ配列をプローブに BLAST 検索を行った場合、各サイトカインの哺乳類配列が全長に渡り最も高い相同性を示す。IL-12 p35 についても相同配列が認められたが、予測分子(N末端から SCHIP1→IL-12 p35→ZPC4 が連結した全長1000アミノ酸残基からなるポリペプチド)の部分配列であった。従って厳密にホモログとは言えないが、以後の系統樹解析では相同性を示す部分配列をフグ IL-12 p35 として用いている。一方、GM-CSF 及び IL-5 に関しては、他の哺乳類全てのアミノ酸配列をプローブに用いても該当する相同配列が認められなかったため、以後の系統樹解析には採用していない。最後に本論文への記載は間に合わなかったが、現在予測されたフグサイトカイン分子が実際に存在するか否か RT-PCR で解析中である。

#### Fugu IL-12 p40 (Fugu Gene Scan\_9258)

28.4% identity (292aa)

Guinea pig	1	MCHRQLISSWLSVLLASPLLAMWELKKDQVYVV-ELDWHDDAP-GETVVVITFNH--AFEDGITWTSD-----RSDI-LGSGKTLT-I-Q	78
Fugu	1	-----MGNHNK-EDSSSQ-LLLSLHSTPEBEHVGGSPEDVDIFWKNNGVMETQRGNLYVVD	56
Guinea pig	79	VKRFEDAGVYTCRKGGEV-LSRSQLLHKKEDLWSTDI-LKEQKESNGKTFKCEERSYSRRTQW--ALTAFGTDVKEPSVKG--SRGS-	162
Fugu	57	LEESLGGGNYTCHSQTGSLNRYTVVLI-EDNDTRKXILKNDQE---Q-YLSGSENNFNDEERCSWSHATLVGKVAEITQRAADGSL	141
Guinea pig	163	--S--PFSQVT--GGEAEKRVSGDNQ-EYKYSVEQEDSACPTAEESLPLEVVVDALHK-FKYENYTSSEFYIRDITKPDPPKLNQLKPSVN	244
Fugu	142	PACSVDAACRHWSGSSGQKVTCSVDGDDGGMWCKDEQHCYAEESQPIHIDVHVSSEHETLMQTVSSREIFLSDIIVKPD--KVIIRKVV--M	227
Guinea pig	245	SQQMEVSNVEYFDTMSPPHSYSLTFLVQTHGKKNRREKKYELFTDK-PSATVVSCHKIKSVE-----V---RARDRYSSSSWSEW--AS	322
Fugu	228	ATHMA--MSVPSKMTPEFSYFPLTFQIRQLRKS CRTCDHPCTQTRVTKIL-EVSSPELYQHVKRRIMVVCVRAKDALCISQWGEWSFLX	314
Guinea pig	323	VSCSEVSVSR	332
Fugu	314	-----	314

### Fugu IL-10 (Fugu Gene Scan\_2883)

27.6% identity (181aa)

Guinea pig	1	M-PGSALILCCALLAGVKASQGTN-TQSEDSCAHFPAPLPHMIRELRAAFGRVKTFFQTQDLDLWVLLNKSLLEDFFKGYLGGQALSEMIQ	88
Fugu	1	MTFGS-LISVLLLLCCACTVWCAALCN-NRCCS-EVVEFPARLKMLENYSQIRDYIEANLDLDIYLLDQSLIVDTFATPFALHMDGILR	87
Guinea pig	89	FYLVEVMPQPEKHGP-FI---KEELNSLGEKLTTRMLRRRHRFLPCEKSKAVEQVKSDFNKLODQVVKAMNFFDIFINCEAVMMI	174
Fugu	88	FYLDSELEERLATVTAETRNLEKPEVESIQQIFDQIKIEVTNCKHYFACKNRFDI-NVLNSETYTKMEDKELVKAMGELDLLFVYLENPLAS	176
Guinea pig	175	KMKS---	178
Fugu	177	KRRRNVA	183

### Fugu IL-12 p35 (Fugu Gene Scan\_12554)

23.5% identity (145aa)

Guinea pig	1	MSPLRKLLLSLVLLVSCSLARNLPRASPAPVTEPVQCFNHSDFLLRAVNSELHKAIQMLAVYSFPEEIDHE-DIKDKTSTVKACVFF	89
Fugu	1	-----DQVSAQADALLHNITGTLEKKE-LFSGMDLSEKQSLELHEE-EDT---AWACVFF	47
Guinea pig	90	LELVKNESPLASCHFFSPTTNGSCLASGKTFMMALFLNSLYEDLKLQDLEFKMNAQLLMDLQRQIFDQNMISAIDEIIFALNGSDVFF	179
Fugu	48	---KFTCS--ETL-----KSEFNKERELFNLEDLQHE-LRF--LSAQ-----DPEGW-HATLIPSTROLELQ-----LAV	106
Guinea pig	180	PQKLELEPDPFKIKMKLCLLHAFRIIRAVTIDVMSLTTSS	221
Fugu	107	NHPSL-----FAERLKLCKVLRGEPDVERSIINRAVKMNA-	141

Figure.4-1 フグ IL-12 p35、p40 及び IL-10 分子の予測アミノ酸配列

フグゲノム上に認められる IL-12 及び IL-10 サイトカインの予測配列(Fugu Gene Scan)を表記した。なお、相同性(% identity)はモルモット配列に対する数値である。

#### 4-2-2 系統樹モデルの設定

系統樹分析を行うに当たり、はじめに Figure. 4-2 に示した I 型～IV 型のモデルを設定した。I 型は *Graur* らが提唱した系統樹モデルで、モルモットは齧歯目を含む他の真獣類に対してアウトグループである(54)。II 型は従来の形態学的分類と一致するものであり、モルモット及び齧歯目は 1 つのクレードを形成する(55)。III 型は *D'Erchia* らが提唱した系統樹モデルで、齧歯目がモルモットを含む他の真獣類に対してアウトグループとなる(56)。IV 型は III 型で、かつ、霊長目と偶蹄目が分かれた後にモルモット及び霊長目が分岐し、両者は 1 つのクレードを形成する。

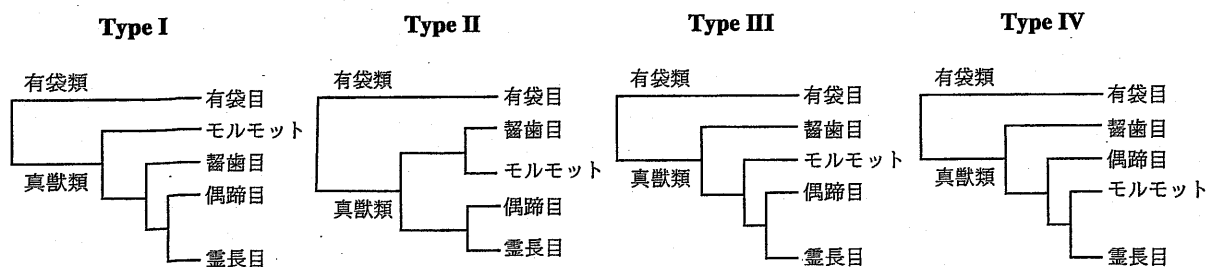


Figure. 4-2 系統樹モデルの設定

系統樹内に表記した齧歯目はネズミ亜目(マウス、ラット)を指し、モデルの順列は右に移行するに従ってモルモットと霊長目との系統発生学的距離が近くなるよう設定した。



#### 4-2-2 IL-12 p35、p40 及び IL-18 分子の系統樹解析

はじめに、今回筆者がモルモットホモログの単離に成功した IL-12 p35、p40 及び IL-18 分子に関して、現在までに同定されている全動物種のアミノ酸配列データを基に系統樹を作成した(Figure. 4-2)。興味深いことに、IL-12 p35 及び p40 分子の系統樹はともに前述の III 型モデル(*D'Erchia* 提唱モデル)を指示するのに対し、IL-18 の系統樹は、モルモットと霊長目が分岐する局所的ブートストラップ値が 486 と低いものの、今回新たに設定した IV 型モデル(モルモットと霊長目の系統発生学的距離が最も近い)を指示した。

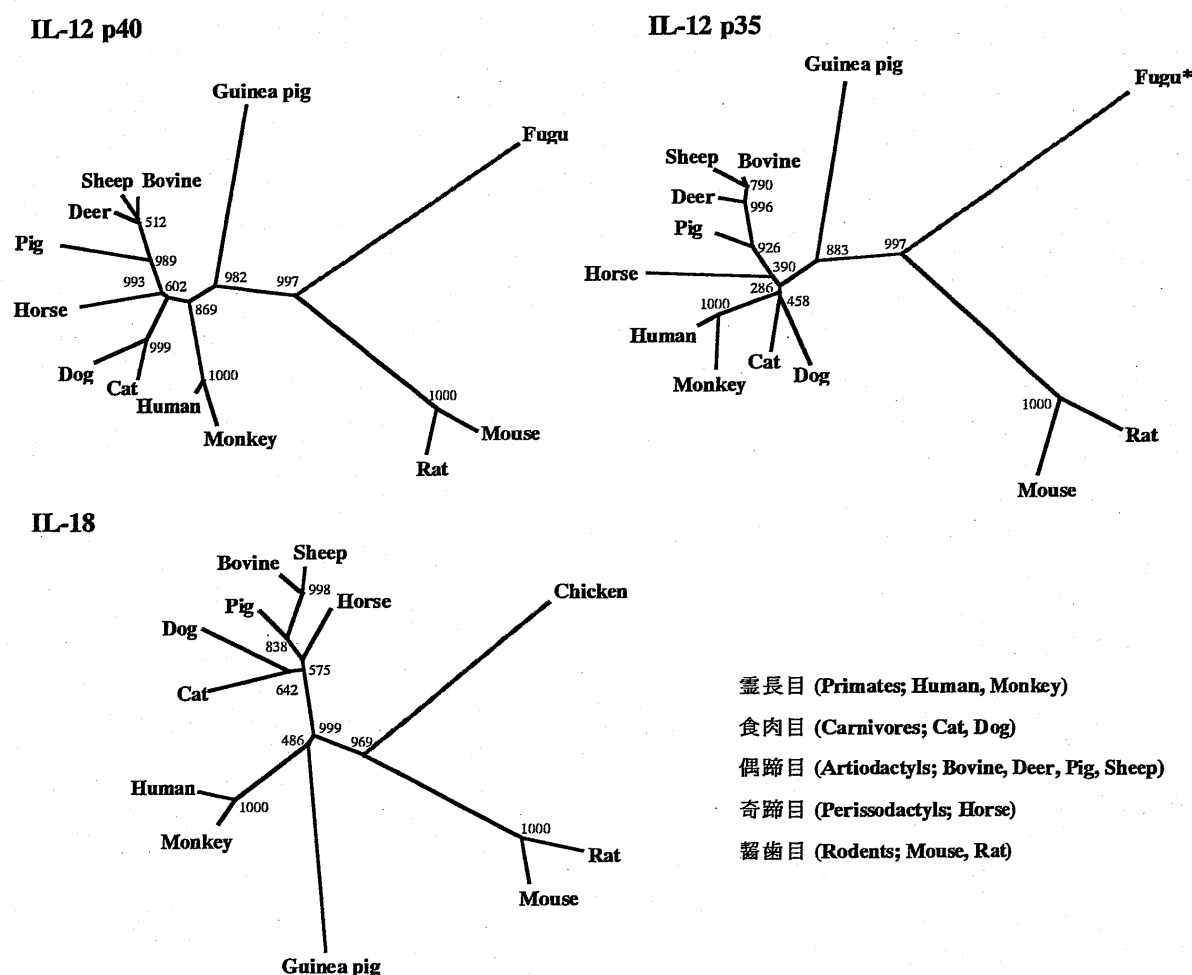
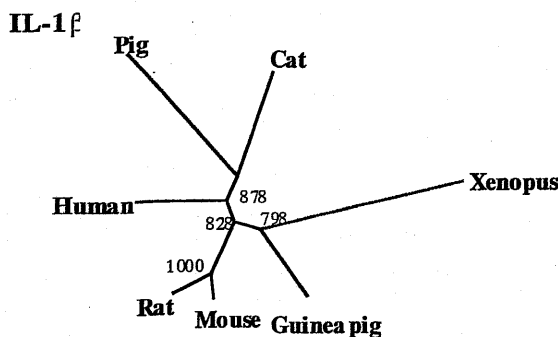


Figure.4-3 IL-12 p35、p40 及び IL-18 のアミノ酸配列データを基に作成した系統樹  
 各サイトカイン分子の系統樹は近隣結合法で推定し、図中に示した数値はその際解析オプションとして指定した局所的ブートストラップ値(800 以上が信頼性の基準となる)を示す。なお、図中灰色線で示したアウトグループに関しては実際に得られた枝寸尺(進化的な距離)を短縮している。

#### 4-2-3 サイトカイン分子の系統樹解析

次に前述のサイトカイン(IL-12 p35, IL-12 p40, IL-18)に加え、現在までにモルモットホモログが同定されているサイトカインのうち、有袋類もしくは哺乳類以下の生物種でホモログ遺伝子が同定されている分子のアミノ酸配列データを基に系統樹を作成した(Figure. 4-4)。なお、系統樹を単純化するため、アウトグループの他には、5種類の真獣目(霊長目、偶蹄目、食肉目、齧歯目、モルモット)のみを加え、かつ、齧歯目(マウス、ラット)を除き各分類目1動物種で分析を行った。結果、サイトカイン遺伝子にはI型(IL-1 $\beta$ )、II型(TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-10)、III型(IL-12 p35, IL-12 p40, IL-2)、IV型(IL-18, IFN $\gamma$ )全ての分子進化パターンが認められ、約1/3は「モルモットは齧歯類に属する」という従来の形態学的分類を指示した。一方残りの2/3は「モルモットを齧歯類に分類すべきではない」という *Graur*、*D'Erchia* らの見解を指示し、少なくともIII型及びIV型に含まれる5/9の系統樹に関して言えば、モルモットと霊長目との系統発生的距離は、モルモットとネズミ目、あるいは霊長目とネズミ目の距離よりずっと近い。さらにIL-18及びIFN $\gamma$ に関しては霊長類とモルモットが同じクレードを形成するという極めて興味深い分子進化モデルが示唆された。ただし、本解析で採用した近隣結合法は、配列の数が多い時に計算時間が少なくすむ反面、誤った系統推定となる確率が相対的に大きく、必ずしも信頼性が高い方法とは言えない。事実、今回作成した系統樹では、モルモット以外の分類目に関しても、齧歯目及びアウトグループ(有袋類、鳥類、魚類)を除き統一した樹形は得られず、局所的ブストラップ確立が低い節点(<800)も多い。今後、アライメントに関しては全長を用いず不確定部分を除いた配列で再実行し、系統推定に関しても、より信頼度の高い最尤法(Maximum-likelihood 法)を併用するなどして再検討を行う必要がある。しかし、少なくともサイトカイン配列を対象にした今回の系統発生的解析から、モルモットの分子進化は、他のネズミ亜目の齧歯類のそれに比べ興味深い挙動を示すことが示唆された。

#### Type I



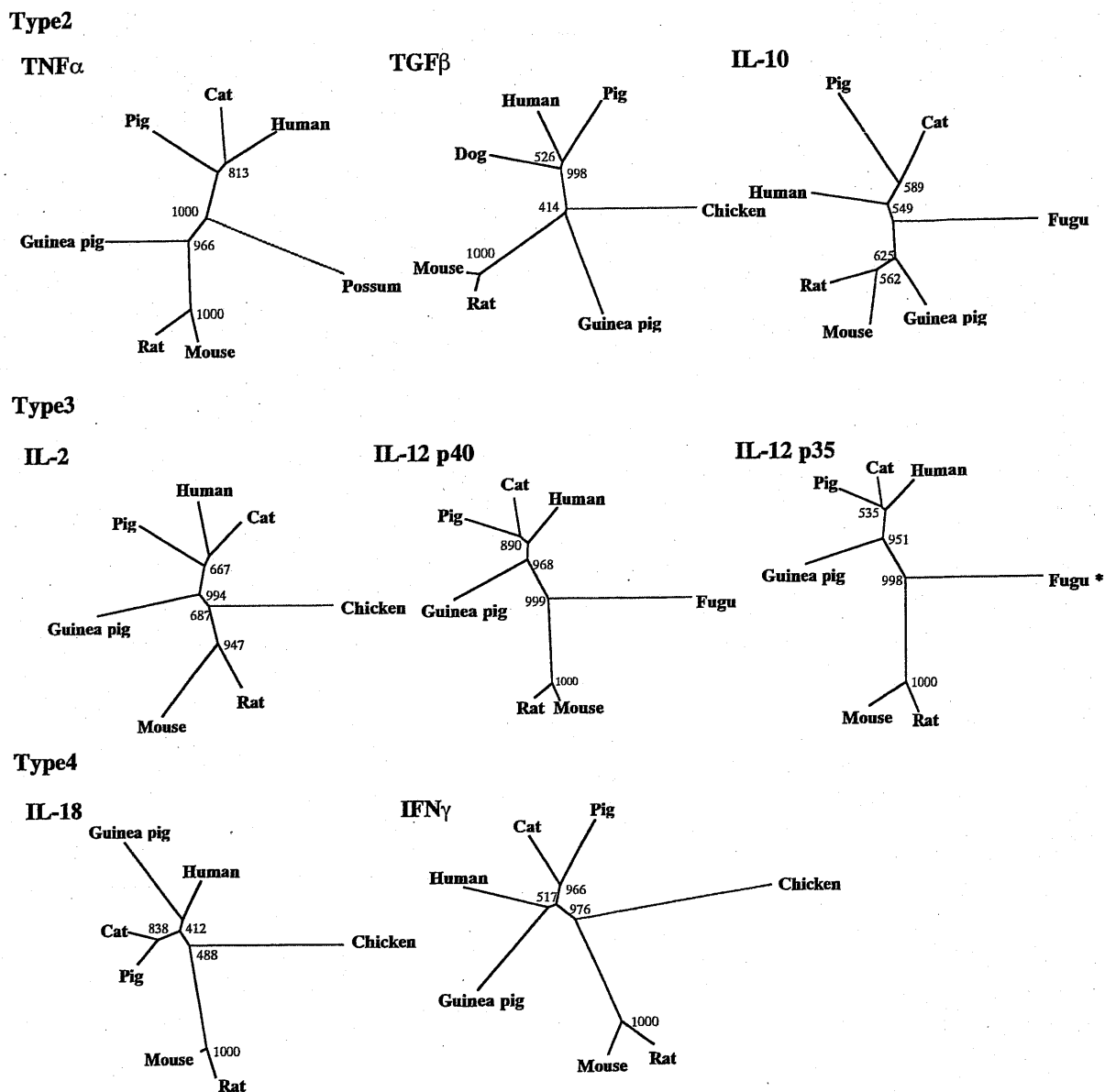


Figure. 4-4 サイトカイン分子の系統樹解析

Figure. 4-3 同様、各サイトカイン分子の系統推定は近隣結合法で行い、図中に示した数値は局所的ブーストラップ値を示す。なお、図中灰色線で示したアウトグループに関しては、実際に得られた枝寸尺(進化的な距離)を短縮している。

## 第 5 章 Line10 坦癌モルモットで評価する IL-12 及び IL-18 の抗腫瘍効果

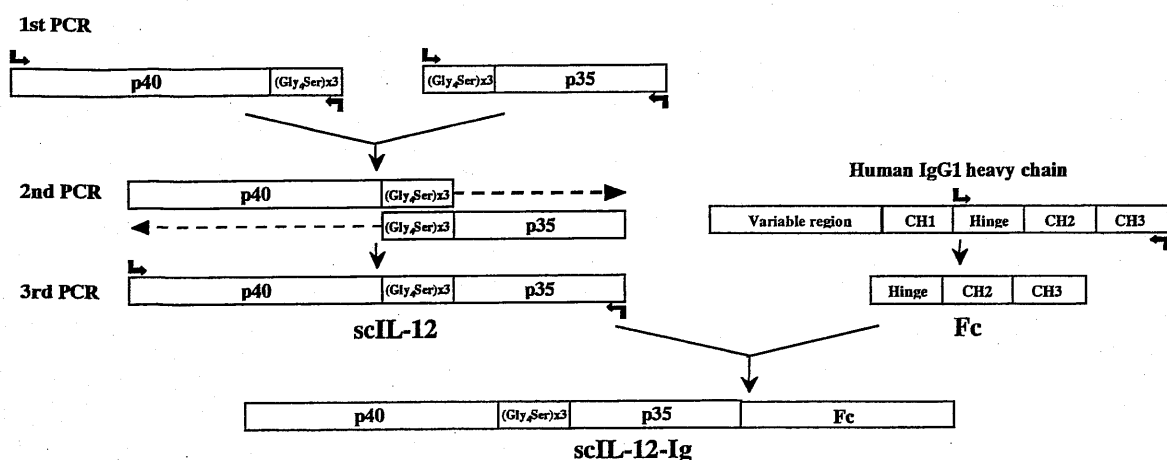
本章では、第 1 章から第 4 章に渡って論じてきたモルモットサイトカインに関して、実際に *in vivo* への応用をモルモット腫瘍モデルで検討した。序章、及び第 1 章でも述べたように、Th1 応答の惹起が必須な種々の細菌感染症や癌に対し、「サイトカイン療法」は、生体内での微量な至適濃度を考えた上でも非常に有効な手段となる(57)。一方、過剰な免疫応答が起因となって発症する種々の炎症性自己免疫疾患に対しては、免疫シグナルの司令塔を担うサイトカインを遮断する「抗サイトカイン療法」が有効な手段となる(58)。後者では現在、特異抗体の投与が治療手段として注目されているが、実は慢性関節リウマチを初めとする炎症性自己免疫疾患に対する治療法としては従来の消炎鎮痛剤や免疫抑制剤の使用に比べ比較的新しく、特に抗 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  抗体の投与は非常に有効な臨床成績を上げている(59, 60)。一方、前者は一口に「サイトカイン療法」と言っても、従来のリコンビナント体投与に加え、遺伝子治療あるいは樹状細胞などの抗原提示細胞を併用する細胞療法など実に様々な治療手段が多面的に検討されている。IL-12 は Th1 応答を極めて強力に誘導することから、発見当初よりサイトカイン療法への応用が期待視されてきた(10, 61)。特に、IL-12 は IFN $\gamma$  を介して間接的に IP-10 を誘導し、血管新生を抑制する効果を持つことが最近までに明らかにされた(62)。従って、従来より明らかである CTL や NK 細胞などの傷害活性を非特異的に増強する抗腫瘍効果に加え、自身の増殖に血管新生を必要とする進行性の固形癌に対しては、現在この新たな効用に着目した分子設計(ミサイル療法)が検討されている(63)。IL-18 に関しては、IL-12 との併用による IFN $\gamma$  依存的な抗腫瘍効果の他に、単独投与においても NK 細胞などの傷害活性を増強する効果が認められる(64)。興味深いことに *Osaki* らは IL-12 によって惹起される NK 細胞の傷害活性はパーフォリン・グランザイム依存性であるのに対し、IL-18 単独で増強される NK 細胞の傷害活性は、Fas を介した IL-12、IFN $\gamma$  非依存的な機構であることを明らかにしている(65)。このような興味深い知見がマウスをはじめとする前臨床動物試験で数多く蓄積されている一方、臨床試験では前臨床動物試験のあり方を見直さなければならない幾つかの問題点が浮き彫りにされている(IL-18 の臨床成績はいずれのサイトカイン療法に関しても現在のところ報告はない)。IL-12 の臨床試験はリコンビナント体投与に関して、腎癌(20 症例)及び悪性黒色腫(12 症例)を対象に第 II 相まで施行されたが、副作用による死亡例が続出したため 95 年に中断されている(66)。これはその後の詳細な原因究明から、前臨床動物試験より算出された投与量、投与スケジュールが問題であったことが判明している(67)。また現在、IL-12 遺伝子を導入した同系繊維芽細胞を投与する細胞療法の臨床試験が第 I 相まで施行

されているが、DLT (dose limiting toxicity)や MTD (maximum tolerated dose)に関してはマウスをはじめとする前臨床動物モデルとの間に大きな開きがある(68)。冒頭でも述べたように、本章では前述の抗腫瘍効果を期待した IL-12/IL-18 療法を Line10 坦癌モデルで検討した。実験に使用した Line10 ヘパトーマは抗原性が低く、原発巣における腫瘍の増大に続き、所属リンパ節への転移を伴う悪性度が極めて高い腫瘍細胞である。従って、従来のマウス腫瘍モデルと比べても非常に有効な評価系であるのだが、サイトカイン療法に関しては IL-2 (ヒト型リコンビナント体)の検討が報告されているのみである(19)。また本章に記載した以外にも、モルモットの有用性が明らかかな結核感染及びウイルス性出血熱モデルに対する IL-12/IL-18 療法(リコンビナント体及び DNA ワクチン)の可能性を *Ahulananda* らとの共同研究で検討している(27, 69)。

## 5-1 実験方法

### 5-1-1 IL-12 発現ベクター(scIL-12-Ig)の構築及び発現確認

*Lieschke* らの報告に従い、モルモット IL-12 p35 及び p40 をリンカー鎖 (GGGSGGGSGGGS)で連結したシングルペプチドを作成した(70)。はじめに、リンカー鎖の塩基配列を含むプライマーを用いた PCR により p35 及び p40 断片を増幅させ (1st)、ゲル抽出により各 PCR 断片を精製した。次に、精製 PCR 断片を混合し、プライマーを含まない条件で3サイクル(2nd)、プライマーを加えた条件で25サイクル(3rd)の PCR を行い、p40-linler-p35 (scIL-12)からなる一本鎖の PCR 断片を増幅させた。次に抗体定常領域(Fc)を scIL-12 の C 末端に融合させるため、大阪府立公衆衛生研究所鈴木博士より供与されたヒト IgG1 発現ベクターを鋳型に、適当なプライマーを用いた PCR を行い、重鎖 Fc 部位の増幅断片を得た。各 PCR 断片はシーケンスにより配列を確認後、pME18S ベクターに組み込んだ(scIL-12-Ig)。なお、以上のサブクローニングの行程を下図に簡単に示した。また scIL-12-Ig の塩基、アミノ酸配列は巻末サプリメントに表記した。scIL-12-Ig の発現は通常の免疫沈降法により確認した。即ち、構築した発現ベクターを RK13 細胞に Lipofect AMINE2000 を用いてトランスフェクションし、scIL-12-Ig を一過的に強制発現させた。次いで FCS を含まない培養上清 (DMEM)を 24 時間後に回収し、非特異的な結合を防ぐため、あらかじめ 1%BSA で処理した Protein G sepharose ビーズ(Amersham Pharmacia)と室温で 2 時間反応させた。その後、D-PBS で数回洗浄を行ったビーズを SDS 及び 2ME を含むサンプルバッファーに直接懸濁し、煮沸することで沈降物の溶出を行った。溶出サンプルは 10%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離後、CBB 染色による発現確認を行った。なお、抗モルモット p40 抗体を用いた Western blot も同様に行い、scIL-12-Ig の発現を確認した。



(図) scIL-12-Ig のクローニングストラテジー

プライマー配列は以下の通りである。なお下線は配列最後尾に表記した制限酵素サイトを示す。

- ① TCTCGAGATGTGTCACCGCAGTTG(XhoI), ② AGATCCGCCGCCACCCGACCCACCACCGCCCGAGCCACCGCCACCTCTTGAGACTGAAACCTCAC, ③ AGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTAGGAACCTCCCTAGGGCC, ④ GGCGGCCGCTCTAGACTAGGAACTAGTCAGGTAGC(XbaI/NotI)

### 5-1-2 scIL-12-Ig を恒常的に発現する細胞株の調製及びリコンビナント体の精製

scIL-12-Ig を恒常的に発現する RK13 細胞株の調製は(3-1-5)に従った。選別した各 G418 耐性クローンの scIL-12-Ig 発現量を前述の免疫沈降法で確認し、最も発現量が高いクローンに関して、培養を 10cm ディッシュ 25 枚までスケールアップした。次いで、細胞がコンフルエントな状態であることを確認した後、培地を AIMV(Gibco) 及び RPMI を 1:1 に混合した無血清タイプに交換し、更に 48 時間培養を行った。その後、回収した培養上清に硫酸アンモニウムの粉末を最終濃度 80%となるように加え、O/N、4°C の条件で上清タンパクの塩析操作を行った。塩析させた上清タンパクは 8000rpm、4°C、30min の遠心条件で沈降させ、リン酸バッファー(phosphate buffer, PB)に懸濁後、同バッファーに対して透析を行い、サンプルを平衡化させた。その後、アフィニティー (Protein G; step elution, 0.1M Glycine pH2.7 in PB) → イオン交換 (mono Q; gradient elution, 0~1M NaCl pH8.0 in D-PBS)と続く 2 段階の精製操作を、指定のカラム (HiTrap, Amersham Pharmacia) を接続した AKTA Prime (Amersham Pharmacia)を用いて行った。最終精製物は D-PBS に対して透析を行い、エンドキシン濃度を市販のキット(エンドスペシー、生化学工業)を用いて測定後、-20°C に保存した。なお、精製したリコンビナント体の生理活性評価は(2-1-5)に従った。即ち、5µg/ml 濃度の Con A 存在下で 3 日間培養したヒト PBMC を回収、洗浄後、

$10^0$ ~ $10^5$  pg/ml 濃度の scIL-12-Ig を含む 10% FCS-RPMI に  $1.0 \times 10^7$  cells/ml (200 $\mu$ l) となるよう懸濁し、96 穴プレートで 48 時間培養した。培養上清中の IFN $\gamma$  濃度はヒト IFN $\gamma$  ELISA システム (Amersham Pharmacia) を用いて測定し、解析は全てトリプレケートで行った。

### 5-1-3 リコンビナント IL-18 の作成及び精製

投与する IL-18 リコンビナント体は大腸菌で作成した。前駆体のプロドメインを除いたモルモット IL-18 配列を PCR で増幅し、C 末端に His タグ (His $^{x6}$ ) が付加されるようフレームをあわせ pET23b ベクター (Novagen) に組み込んだ。形質転換体は BL21(DE3) 株 (Novagen) で作成し、1mM 濃度の IPTG で 4 時間誘導後、集菌したペレットをリン酸バッファーに懸濁し超音波破碎を行った。遠心後の上清サンプルに対し、アフィニティー (Ni $^{2+}$ キレート; gradient elution; 20~200mM imidazole pH7.4 in Tris B)  $\rightarrow$  イオン交換 (mono Q; gradient elution; 0~1M NaCl pH8.0 in PBS) と続く 2 段階の精製操作を AKTA Prime を用いて行った。最終精製物は D-PBS に対して透析を行い、エンドトキシン濃度を測定後、-20 $^{\circ}$ C に保存した。なお、精製したリコンビナント体の生理活性評価は(3-1-8)に従った。即ち、100ng/ml 濃度の scIL-12-Ig 及び 100ng/ml 濃度の精製 IL-18 を含む 10% FCS-RPMI に  $4.0 \times 10^6$  cells/ml となるようモルモット脾細胞を懸濁し、6 穴プレート (3ml) で 12 時間培養した。なお、IFN $\gamma$  mRNA の発現は(3-1-8)と同条件の RT-PCR で確認した。

### 5-1-4 Line10 ヘパトーマ細胞の移植

Line10 ヘパトーマを用いた抗腫瘍活性評価試験は全て住友製薬株式会社が作成したプロトコールに準拠し、Line10 ヘパトーマ細胞の調製は腹水継代で行った。即ち、起眠させた Line10 ヘパトーマ細胞を HBSS にて洗浄後、 $2 \times 10^8$  個を Strain2 モルモットの腹腔内に移植し、10 日後モルモットをエーテル高濃度吸引により安楽死させ腹水を採取した。採取した腹水を 1,200 rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し細胞を回収、HBSS での洗浄を 3 回行った後、同緩衝液を用いて最終的に  $1 \times 10^7$  個/ml の細胞浮遊液を調製した。次に移植直前に無麻酔下で、正常モルモットの右腹側部をバリカンを用いて剃毛し、上述の細胞浮遊液 ( $1 \times 10^6$  個/100 $\mu$ l) を 26G 注射針と 1 ml シリンジを用いてモルモット腹側皮内に移植した。なお移植の順は、群番号 1、2、3 $\rightarrow$ の順に行い、各群 1 匹ずつ全群の移植が終了したら、上記とは逆の順序で移植を行った。また移植部位は原則として右腹側部とし、該当部の毛色が有色の場合は左腹側部、両側とも有色の場合はより毛色の薄い方を剃毛した。

#### 5-1-4 リコンビナント体の投与

被験物質であるリコンビナント体の投与は 4 群で行った。即ち、コントロールである HBSS 投与群、IL-12 単独投与群、IL-18 単独投与群、IL-12/IL-18 併用群である。投与法は全て腹腔内注射(i.p.)で行い、投与スケジュールは *Osaki* らの報告を一部改変し、施行した(64)。即ち、腫瘍を移植した翌日からの連続 7 日間投与に加え、その後 1 週間毎に同量のブースト投与を行った。なお、投与量、投与スケジュールの詳細は本章(5-2-3)に記載した。

#### 5-1-5 活性評価方法

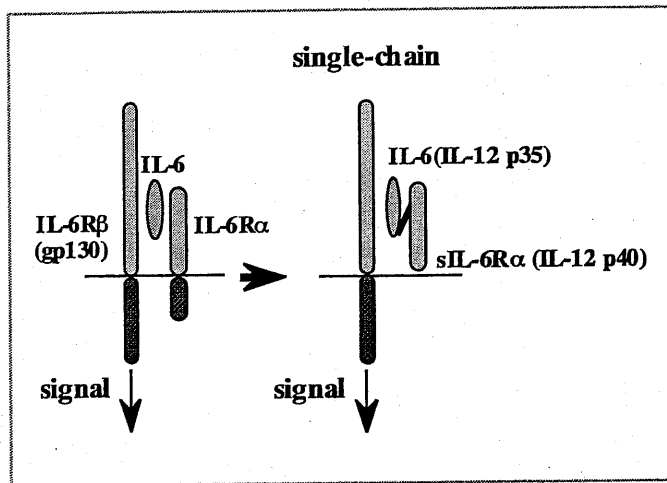
体重の測定は腫瘍を移植した翌日から 3~4 日おきに 26 日目まで行った。原発腫瘍径は電子ノギスを用いて測定し、(長半径)x(短半径)の計算式で求めた。また測定は腫瘍移植後 7 日目から 3~4 日おきに 22 日目まで行った。リンパ節転移の評価は腫瘍移植後 26 日目にモルモットを安楽死させ、腫瘍を移植した面と同側の前肢—腋窩リンパ節を摘出し、電子天秤で重量を測定することで行った。



## 5-2 実験結果及び考察

### 5-2-1 リコンビナント IL-12 (scIL-12-Ig)の作成及び生理活性評価

97年、Fischerらはβ型レセプター(gp130)の発現は認められるがα型レセプター(IL-6Rα)の発現を欠く細胞群にIL-6を作用させる方法として、IL-6及びIL-6Rαの細胞外領域をリンカー配列で連結させたpiggy backコンプレックスを設計し、生理活性を有するリコンビナント体の作成に成功した(71)。



また、同じファミリーに属するIL-12に関してp35及びp40分子をリンカー配列で連結した単一ポリペプチド鎖(single-chain, sc)が設計され、そのリコンビナント体は従来のヘテロダイマーと同等以上の生理活性を有し、かつ、より安定であることが報告されている(横図)(70)。さらに、精製過程の簡便化、細胞障害活性の付与、及び血中半減期を延ばす目的で抗体

定常領域(Fc)を融合させたサイトカインが作成、報告されている(72, 73)。今回これらの既報を参考に、Line10 肝癌モデルに投与するIL-12はモルモットIL-12 p35及びp40分子をリンカー配列で連結し、さらにそのC末端にヒトIgG1重鎖の定常領域(Fc)を融合させたリコンビナント体(scIL-12-Ig)で検討を行った。scIL-12-Igの模式図をFigure.5-1(a)に示す。「実験方法」の項で既述したように、scIL-12-Igを発現するstable cloneをRK13細胞で作成後、培養上清からProtein Gカラム及びイオン交換カラム(Q sepharose)を用いてリコンビナント体の精製を行った。精製したリコンビナント体のエンドトキシン濃度は0.031 Eu per mg proteinであり、SDS-PAGEで分離後、CBB染色で単一であることを確認した(Fig.5-2 b)。また、精製scIL-12-IgはヒトPBMCに対して濃度依存的なIFN $\gamma$ 誘導活性を示す(Fig.5-2 c)。ところで、Fc融合はCH2 domainを介した抗体依存性の細胞障害活性(ADCC、会合分子はFcレセプター)や補体依存性の細胞障害活性(CDC、会合分子はC1q)を誘起する可能性を持つ。既報の多くでは、これらの殺傷機構を防ぐためCH2 domain内のFcレセプター及びC1q会合部位に変異を導入している(72, 73)。しかし上述のscIL-12-Igに同様な点変異は導入しておらず、また、Figure.5-1(c)ではコントロールである市販のヒトリコンビナントIL-12との非活性に若干の差が認められる。そこでこれらの点を考慮し、Osakiらがマウス肝癌モデルで実施している投与量(0.1 $\mu$ g)のモルモット体重換算量(2.5 $\mu$ g)をスタートに、最大10倍量(25 $\mu$ g)を正常モルモットに7日間連続で投与する予備実験(毒性テスト)

を行った(64, 65)。その結果、データは示さないが体重推移及びリンパ節(頸部、後肢—鼠径部、腸間膜)、リンパ組織(胸腺、脾臓)を含む全臓器の解剖所見に特筆すべき異常が認められなかったことから、本実験の scIL-12-Ig 単独投与は 25 $\mu$ g で行った。

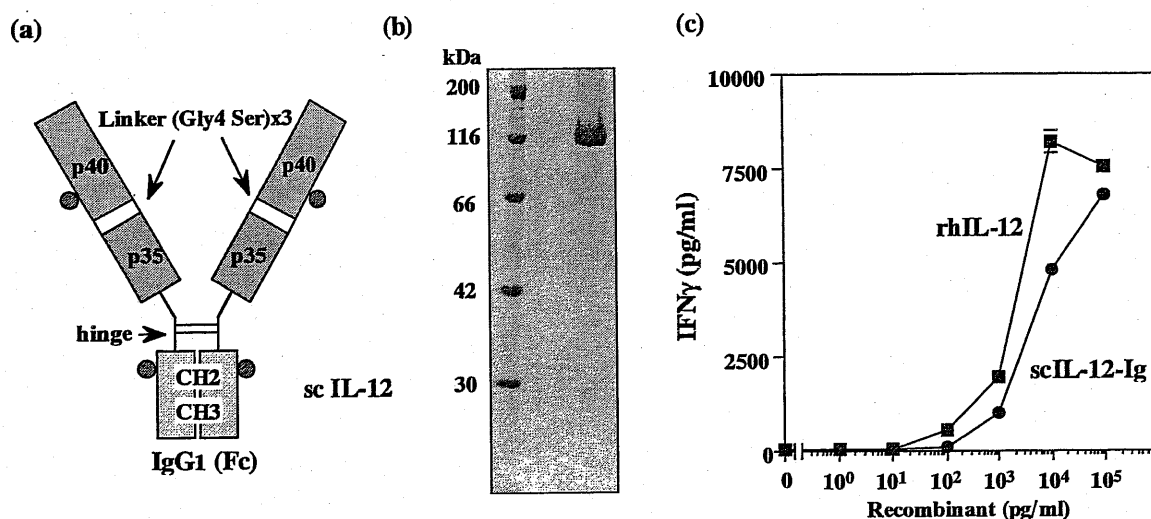


Figure.5-1 scIL-12-Ig リコンビナント体の作成及び生理活性評価

(a)ヒト IgG1 重鎖はヒンジ領域の 2 箇所ジスルフィド結合(=)を形成するため、リコンビナント体(scIL-12-Ig)は非還元条件において最低 2 量体を形成するものと考えられる。図中の●は IL-12 p40 及び Fc 領域の CH2 ドメイン内に認められる N 型糖鎖修飾を示す。(b)精製リコンビナント体 10 $\mu$ g を SDS-PAGE(10%ポリアクリルアミドゲル、還元条件)で分離し、CBB 染色により確認した。(c) scIL-12-Ig は Con A でプライミングしたヒト PBMC に対し、濃度依存的な IFN $\gamma$ 誘導活性を示す。なお、実験方法は(2-1-5)に従い、培養上清中の IFN $\gamma$  濃度は市販の ELISA キットを用いて測定した。また、解析は全てトリプレケートで行った。

### 5-2-2 リコンビナント IL-18 の作成及び生理活性評価

第 3 章において、C 末端に His タグを融合した IL-18 前駆体(RK13 細胞由来)は native な条件で精製が可能であり、かつ、Caspase-1 と反応させ作成した活性型 IL-18 が IFN $\gamma$  誘導活性を保持することを示した。そこで Line10 肝癌モデルに投与するリコンビナント IL-18 は C 末端に His タグを融合した大腸菌由来の活性型で検討した。なお、リコンビナント体の精製にはニッケルカラム及びイオン交換カラム(Q sepharose)を用い、精製後のエンドトキシン濃度が 0.019 Eu per mg protein であること、また Figure.5-2(a)で示したように、精製後のリコンビナントが単一であることを CBB 染色により確認した。精製したリコンビナント IL-18 は IL-12 存在下、モルモット脾細胞の IFN $\gamma$ 産生を増強する(Fig.5-2 b)。ただし、RT-PCR による評価は定量性の面で限

界があり、IL-18 の相乗効果がどの程度であるのか in vitro で厳密に比較することは難しい(IL-12 とは異なり、モルモット IL-18 はヒト細胞群に交叉反応性を示さないため(3-2-7)、IFN $\gamma$ を定量する適当な評価系がない)。

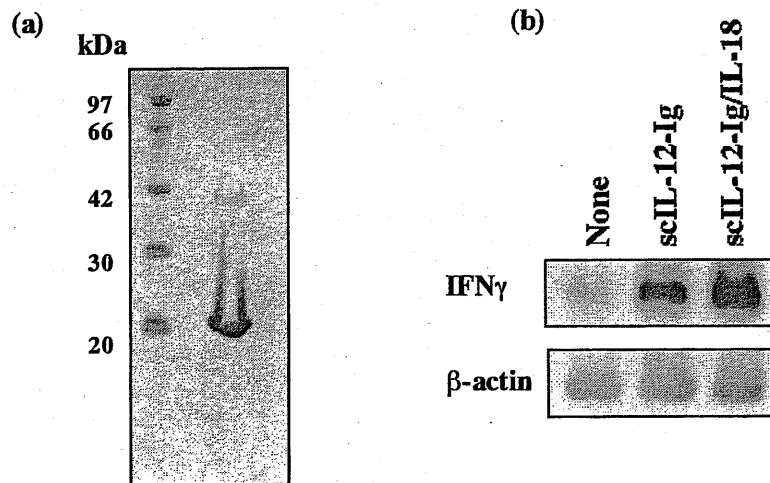


Figure. 5-2 活性型 IL-18 リコンビナント体の作成及び生理活性評価

(a)精製リコンビナント体 10 $\mu$ g を SDS-PAGE(10%ポリアクリルアミドゲル、還元条件)で分離し、CBB 染色により確認した。(b) モルモット脾細胞を scIL-12-Ig (100ng)及び IL-18 (100ng)存在下で 12 時間培養し、IFN $\gamma$ の発現は回収した細胞の mRNA を鋳型とする RT-PCR で評価した。

### 5-2-3 Line10 肝癌モルモット(Strain 2)で評価する IL-12 及び IL-18 の抗腫瘍効果

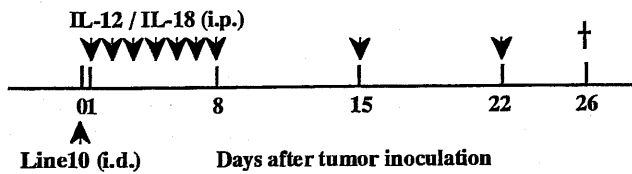
その 1 ; リコンビナント体の投与スケジュール及び測定期間中の体重推移

(5-2-1)及び(5-2-2)で調製したリコンビナント体の投与は Figure.5-3 (a)に表記した 4 群(n=4)で行った。即ち、コントロールである HBSS 投与群(Group1)、IL-12 単独投与群(Group2)、IL-18 単独投与群(Group3)、IL-12/IL-18 併用群(Group4)である。なお、Line10 へパトーマの皮内移植及び予後経過の観察は、住友製薬株式会社が作成したプロトコールに準拠した。また毎回の投与量及び投与法は基本的に *Osaki* らの報告に従い、IL-18 に関してはモルモットの体重に換算した 2 倍量(50 $\mu$ g)、IL-12/IL-18 併用群に関しては、それぞれ単独投与の 1/10 量、1/2 量を全て腹腔内に投与した(64)。また、IL-12 に関しては既述した予備実験の結果をふまえ、モルモットの体重に換算した 10 倍量を投与した。投与スケジュールに関しては、*Osaki* らの報告を一部改変し、腫瘍を移植した翌日からの連続 7 日間投与に加え、その後 1 週間毎に同量のブースト投与を行った。腫瘍系の測定は腫瘍移植後 7 日目から 3~4 日おきに 22 日目まで行い、体重測定は腫瘍を移植した翌日から 3~4 日おきに 26 日目まで行った。Figure.5-3 (b) に測定期間中の体重推移を示す。有意差は厳しいものの、IL-12 及び IL-18 単独投与群と比較して、HBSS 投与群および IL-12/IL-18 併用群では測定期間の後半で体重の

増加が抑制される傾向が認められた。以後に示す結果と照らし合わせると、これらの傾向は病状の進行と相関する。ただし、腫瘍移植後 26 日目の生存率は各群ともに 100%であり、衰弱などの所見は各群ともに観察されなかった。

(a)

Group 1 : HBSS  
 Group 2 : IL-12 (25 $\mu$ g/daily)  
 Group 3 : IL-18 (50 $\mu$ g/daily)  
 Group 4 : IL-12 (2.5 $\mu$ g/daily) & IL-18 (25 $\mu$ g/daily)



(b)

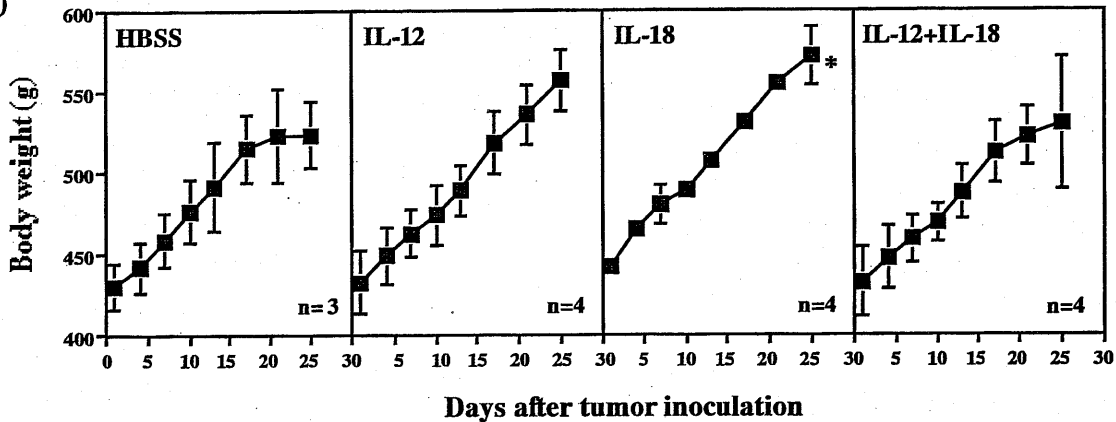


Figure.5-3 リコンビナント体の投与スケジュール及び測定期間中の体重推移

(a) (i.p.)は腹腔内投与、(i.d.)は皮内移植を示す。(b) グラフは各群の平均値で誤差は標準偏差で表した(\*は  $p < 0.01$ )。本文において腫瘍移植後 26 日目の生存率は各群ともに 100%であると表記したが、厳密に言うと腫瘍移植後 9 日目にコントロール群で 1 匹死亡が認められた。ただし、今回は未処置においても 1 ヶ月は 100%の生存率が維持されるプロトコールを採用しており、投与実験とは直接関係しない突然死と判断し、以後の解析ではコントロール群のみ  $n=3$  で行っている。

### 5-2-3 Line10 担癌モルモット(Strain 2)で評価する IL-12 及び IL-18 の抗腫瘍効果

#### その 2 ; 原発巣における腫瘍形成及び所属リンパ節への転移

次に、原発巣における腫瘍形成及び所属リンパ節への転移を指標に、IL-12 及び IL-18 の抗腫瘍効果を評価した。Figure.5-4(a)及び(b)に Line10 移植後 7 日目から測定した原発腫瘍系の推移を示す。(a)は各群の腫瘍系をそれぞれ個別にプロットしたグラフであり、(b)は値が近接する 3n の平均値(誤差は標準偏差)をグラフにしたもので

ある。コントロールである HBSS 投与群に比べ、IL-12 単独投与群では明確な腫瘍形成の抑制が認められた。また、HBSS 投与群では測定を中止した 22 日目の段階で原発巣の腫瘍に膿瘍が認められたのに対し、IL-12 単独投与群に同様な外傷は認められなかった。一方、IL-18 単独投与群及び IL-12/IL-18 併用群に関しても移植後 18 日目まで若干ながら腫瘍形成の抑制が認められた。ただし、両群とも IL-12 単独投与群ほどの効果は認められず、特に期待された IL-12 及び IL-18 の相乗効果は今回検討を行った投与量では観察されなかった。ちなみに 22 日目の段階において両群の腫瘍にはコントロールと同様な膿瘍が認められた。次に所属リンパ節への転移を比較した結果を Figure.5-4(c)及び(d)に示す。(c)に示したグラフは移植後 26 日目に摘出した前肢—腋窩リンパ節の重量を各群それぞれ個別にプロットしたものであり、(d)は摘出した前肢—腋窩リンパ節の写真図である。コントロール群と比較して、IL-12 単独投与群ではリンパ節転移が有意に抑制されており、既述した腫瘍形成の結果と相関した。また、IL-18 単独投与群に関しては、リンパ節への転移が若干抑制されているものの、IL-12/IL-18 併用群では抑制効果が認められなかった。ちなみに、今回検討を行った Line10 坦癌(皮内移植)モデルでは、腫瘍を移植した面と同側の前肢—腋窩リンパ節にのみ転移が認められる。実際、移植後 26 日目の解剖では上述のリンパ節以外への転移は認められず、リンパ節(頸部、後肢—鼠径部、腸間膜)、リンパ組織(胸腺、脾臓)を含む全臓器の解剖所見に特筆すべき異常は認められなかった(e)。なお、本論文への記載は間に合わなかったが、現在解剖時に回収した血清中の抗体力価を測定することで投与したリコンビナント体の抗原性を確認している。また、ごく最近モルモットインターフェロンの間接測定法を確立した Yamamoto らとの共同研究で、血中の IFN $\gamma$ 濃度と上述の抗腫瘍効果の相関性を併せて解析中である(74)。筆者らは、今回はじめてリンパ節転移を伴うモルモット坦癌モデルを用いて IL-12/IL-18 の抗腫瘍効果を検討し、IL-12 に腫瘍形成及びリンパ節転移を抑制する抗腫瘍効果が認められることを明らかにした。一方、IL-18 に関しては腫瘍形成を若干抑制するものの Osaki らがマウス腫瘍モデルで示したような著明な抗腫瘍効果は認められなかった。ただし、IL-12/IL-18 併用群でも、今回検討を行った投与量(IL-12 は単独投与の 1/10 量、IL-18 は単独投与の 1/2 量)では同程度の効果しか認められなかったことから、投与量の再検討は必須と考える。また、投与方法及び投与スケジュールに関しても更なる条件検討を行い、併せて考察する必要があると考える。特に IL-18 に関しては今回、大腸菌で作成したリコンビナント体 1 種類のみでの解析となったが、(5-2-2)でも既述したように、生理活性をより厳密に定量できる in vitro の評価系を構築し、最適なりコンビナント体の設計、選別を簡便にすることが急務課題である。その点で、Yamamoto らが構築した抗ウイルス活性を指標とするインターフェロン間接測定法は非常に有効な評価系であり、共同研究からある程度これらの問題を克服することは可能だと

考える(74)。また投与方法に関しても、より即効性の高い静脈投与、腫瘍に浸潤するリンパ球に直接作用させる腫瘍内投与など、様々な方法が可能性として考えられ、生体内における薬物動態を比較するという点でも、これらの投与方法を検討することは、

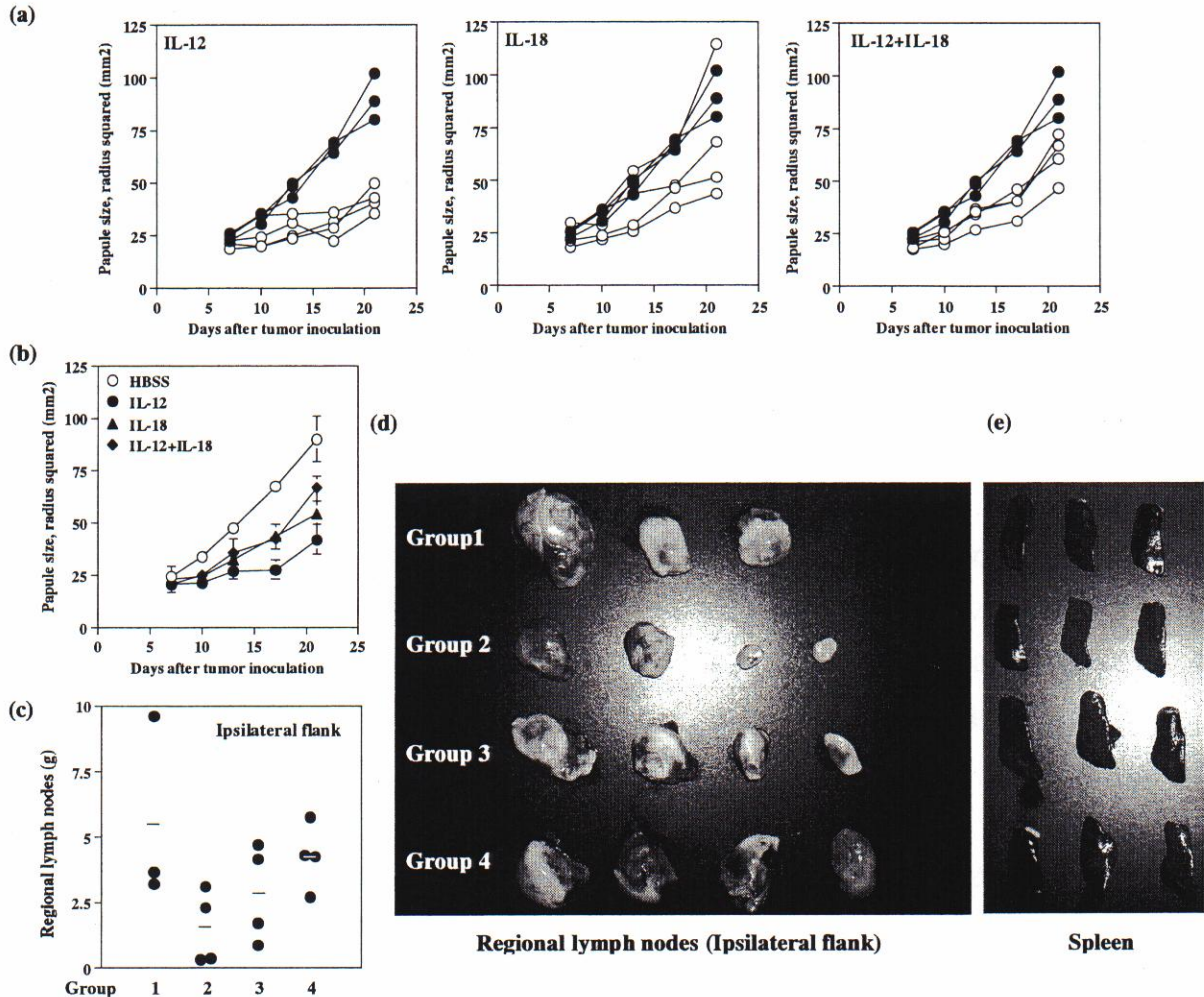


Figure.5-4 原発巣における腫瘍形成及び所属リンパ節への転移

(a) 原発腫瘍系の推移。移植後 21 日目あたりからコントロール群及び III、IV 群で腫瘍の膿瘍がひどくなり、正確な腫瘍系の算出が不可能になったため以後の測定は行っていない。●はコントロールである HBSS 投与群、○はグラフ内に表記した各サイトカインの投与群を示す。なお、本文でも述べたように(a)は各群の腫瘍系をそれぞれ個別にプロットし、(b)では値が近接する 3n の平均値(誤差は標準偏差)をグラフにした。(c) 移植後 26 日目に摘出した前肢—腋窩リンパ節の正重量。横棒は平均値を示す。(d)、(e) 移植後 26 日目に摘出した前肢—腋窩リンパ節及び脾臓の写真図。

非常に有意義であると考えられる。現在、従来のリコンビナント体投与に加え、遺伝子治療、さらに樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞を目的遺伝子のキャリアーとして併用する細胞療法など、様々なサイトカイン療法が前臨床動物試験、臨床試験で

検討されている。繁用には程遠いが興味深いことに、モルモットをこれらのサイトカイン療法の前臨床動物モデルとして使用することが徐々にではあるが可能となってきた。例えば最近、*Hiromatsu* らはモルモットでの解析が待ち望まれていた樹状細胞の誘導(骨髄、脾臓由来)に成功した(4)。実際、当研究室でもこの報告に基づいた樹状細胞の誘導に成功しており、現在我々は、IL-12、IL-23 及び IL-18 遺伝子を導入した初代培養を坦癌モルモットに投与する細胞療法を、*Osaki*、*Tahara* らが報告しているマウスモデルを参考に検討予定である(75, 76)。また、本論文には記載しないが、当研究室では IL-12 及び IL-18 に関して、リボソーム法(静注)を用いた遺伝子治療を、Line10 モデルで検討中である(77, 78)。一般の研究室でモルモット坦癌モデルに利用可能な腫瘍は未だ Line10 ヘパトーマのみであるが、今後これらのサイトカイン療法の本モルモットモデルが構築され、マウス、ラットをはじめとする繁用実験小動物を用いた評価系の1つに加えることは、前臨床試験の限界、問題点を克服する上でも非常に有意義であると考えられる。

## 終章

報告者はモルモットの実験動物としての有効性を分子レベルで評価すべく、未報告であった Th1 型 サイトカイン遺伝子の単離同定を試みた。また、各分子の発現制御、及び生理活性などの基礎的な分子性状の解明、さらにがんモデルを用いた *in vivo* への応用を試みた。以下、本研究で明らかにしたことを示す。

### 第1章 IL-12 に関して

ヒト、モルモット間で構成サブユニット(p35/p40)を置換したキメラ型 p70 に、生理活性を規定するような種特異性は認められず、ヒト IL-12 を評価する実験小動物としてモルモットが有用であることを明らかにした。また、モルモットでは p40 及び p40 を含むであろう高分子複合体が、精巣でのリブダクシステムに関与している可能性が高いことを組織別の発現プロファイルで明らかにした。

### 第2章 IL-23 に関して

抗原提示細胞を活性化する菌体成分の違いにより、IL-12/IL-23の発現誘導が異なることを明らかにした。即ち、抗原提示細胞上のTLRに依存してIL-12及び IL-23の発現プロファイルは異なり、そのシグナルの多様性が示唆された。また、IL-23はモルモット脾細胞に対して濃度依存的な細胞増殖活性を示す一方、ヒトPBMCに対しては増殖活性を示さず、ヒト、モルモット間に明確な種差が認められた。

### 第3章 IL-18 に関して

他の多くの細胞質タンパク同様、IL-18 前駆体は開始メチオニンのプロセッシングからアラニン残基のアセチル化へと続く、N 末端に特異的な保護修飾をうける可能性が高いことを質量分析で明らかにした。また、*P. acnes* 感作では従来より明らかな腹腔浸潤細胞に加え、脾臓、PBMC においても IL-18 の発現が著明に増強された。ただしその発現はいずれも前駆体であり、菌体成分による再感作を行っても発現誘導、及び活性型へのプロセッシングは認められなかった

### 第4章 モルモットサイトカイン遺伝子の分子進化に関して

モルモットサイトカイン遺伝子の分子進化は、従来の形態学的分類(齧歯類)に合致するものを含め非常に多様であり、他のネズミ亜目の齧歯類のそれに比べ興味深い挙動を示すことを明らかにした。

### 第5章 モルモットがんモデルで評価する IL-12/IL-18 の抗腫瘍効果に関して

本論文の検討では IL-12 投与群に明確な抗腫瘍効果(腫瘍形成及びリンパ節転移の抑制)が認められた。一方、IL-18 及び IL-12/IL-18 併用群に関しては腫瘍形成が若干抑制されたものの、IL-12 投与群のような明確な抗腫瘍効果は認められなかった。



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、始終適切なお助言、ご討議をしていただきました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科、瀬谷司教授に深く感謝致します。

本論文を審査して下さいました、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科動物遺伝子機能学講座、川市 正史教授、石田 靖雅助教授ならびに細胞増殖学講座、竹家達夫教授に深く感謝致します。

始終適切なお指導をいただきました大阪府立成人病センター免疫学部門、松本美佐子博士、ならびに住友製薬株式会社ウイルス・癌研究グループ柏崎安男博士に深く感謝致します。

5年間、唯一の学生期生として、ともに苦しみなながらも終始有意義な討論を頂いた森脇康博君に心から感謝します。

研究および様々な面で大変お世話になりました、大阪府立成人病センター免疫学部門の皆様心から感謝します。

9年間にも及ぶ大学生活を精神的、経済的に支えてくれた両親、妹に心から感謝致します。

最後に本研究を遂行するにあたり多大な貢献をしてくれたモルモット、ウサギ、マウス達に感謝するとともに冥福を祈ります。

2003年 3月

## 参考文献

1. McMurray, D. N. (1994) Guinea pig model of tuberculosis. In Bloom, B. R. (ed.), *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*, p. 135. American society for microbiology, Washington, DC
2. Watt, V. M. (1985) Sequence and evolution of guinea pig preproinsulin DNA. *J Biol Chem* **260**,10926-10929
3. Dascher, C. C., Hiromatsu, K., Porcelli, S.A., Brenner, M.B. and LeClair, K. P. (1999) Conservation of a CD1 multigene family in the guinea pig. *J Immunol* **163**, 5478-5488
4. Hiromatsu, K., Dascher, C. C., Sugita, M., Gingrich-Baker, C., Behar, S. M., LeClair, K. P., Brenner, M. B. and Porcelli, S. A. (2002) Characterization of guinea-pig group 1 CD1 proteins. *Immunology* **106**, 159-172
5. Hiromatsu, K., Dascher, C. C., LeClair, K.P., Sugita, M., Brenner, M.B. and Porcelli, S.A. (2002) Induction of CD1-restricted immune responses in guinea pigs by immunization with mycobacterial lipid antigens. *J Immunol* **169**, 330-339
6. Porcelli, S. A., Segelke, B. W., Sugita, M., Wilson, I. A. and Brenner, M. B. (1998) The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules. *Immunol Today* **19**, 362-368
7. Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaiken, M., Gumbiner, B. and Cossart P. A. (1999) Single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J* **18**, 3956-3963
8. Kolibo, D. V., Romaniuk, S. I., Radavskii, I. L and Komissarenko, S. V. (2002) Effect of diphtheria toxin on the viability of phagocytes and B-lymphocytes in animals sensitive and insensitive to it. *Ukr Biokhim Zh* **74**, 30-36
9. Gately, M. K., Renzetti, L. M., Stem, A. S., Gubler, U. and Presky, D. H. (1998) The interleukin-12/interleukin-12 receptor system: role in normal and pathological immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**, 495-521
10. Trinchieri, G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **3**, 133-146
11. Fujiwara, H. and Hamaoka, T. (2001) Coordination of chemokine and adhesion systems in intratumoral T cell migration responsible for the induction of tumor regression. *Int Immunopharmacol* **1**, 613-623
12. Colombo, M. and Trinchieri, G. (2002) Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**, 155-168
13. Smyth, M. J., Godfrey, D. I. and Trapani, J. A. (2001) A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* **2**, 293-299

14. Rottman, J.B., Freeman, E.B., Tonkonogy, S. and Tompkins, M. B. (1995) A reverse transcription-polymerase chain reaction technique to detect feline cytokine genes. *Vet Immunol Immunopathol* **45**, 1-18
15. Fukui, A., Inoue, N., Matsumoto, M., Toyoshima, K. and Seya, T. (2001) Molecular cloning and functional characterization of chicken toll-like receptors. A single chicken toll covers multiple molecular patterns. *J Biol Chem* **276**, 47143-47149
16. Yoon, C., Johnston, S. C., Tang, J., Stahl, M., Tobin, J. F and Somers, W. S. (2000) Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12. *EMBO J* **19**, 3530-3541
17. Scarozza, A. M., Wicher, V. and Wicher, K. (1998) Spontaneous cytokine gene expression in normal guinea pig blood and tissues. *Cytokine* **10**, 851-859
18. Schoenhaut, D. S., Chua, A. O., Dwyer, C. M., Gately, M. K. and Gubler, U. (1992) Cloning and expression of murine IL-12. *J Immunol* **148**, 3433-3440
19. Balemans, L. T., Steerenberg, P. A., Koppenhagen, F. J., Scheper, R. J. and Den Otter W. (1994) PEG-IL-2 therapy of advanced cancer in the guinea pig. Impact of the primary tumor and beneficial effect of cyclophosphamide. *Int J Cancer* **58**, 871-876
20. Zou, J. J., Schoenhaut, D. S., Carvajal, D. M., Warriar, R. R., Presky, D. H., Gately, M. K. and Gubler, U. (1995) Structure-function analysis of the p35 subunit of mouse interleukin 12. *J Biol Chem* **270**, 5864-5871
21. Gearing, D. P. and Cosman, D. (1991) Homology of the p40 subunit of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) with the extracellular domain of the interleukin 6 receptor. *Cell* **66**, 9-10
22. Jonsson, C. K., Zetterstrom, R. H., Holst, M., Parvinen, M. and Soder, O. (1999) Constitutive expression of interleukin-1alpha messenger ribonucleic acid in rat Sertoli cells is dependent upon interaction with germ cells. *Endocrinology* **140**, 3755-3761
23. Parvinen, M., Soder, O., Mali, P., Froysa, B. and Ritzen, E. M. (1991) In vitro stimulation of stage-specific deoxyribonucleic acid synthesis in rat seminiferous tubule segments by interleukin-1 alpha. *Endocrinology* **129**, 1614-1620
24. Valenti, S., Villaggio, B., Cutolo, M., Giusti, M. and Giordano, G. (1999) Preliminary data suggesting production of interleukin-12 by rat Leydig cells cultured in vitro. *Ann N Y Acad Sci* **876**, 259-261
25. Horai, R., Asano, M., Sudo, K., Kanuka, H., Suzuki, M., Takahashi, M. and Iwakura, Y. (1998) Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med* **187**, 1463-1475

26. Piccotti, J. R., Li, K., Chan, S. Y., Magram, J., Eichwald, E. J. and Bishop, D. K. (1998) Alloantigen-reactive Th1 development in IL-12-deficient mice. *J Immunol* **160**, 1132-1138
27. Cooper, A. M., Kipnis, A., Turner, J., Magram, J., Ferrante, J and Orme, I. M. (2002) Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *J Immunol* **168**, 1322-1327
28. Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Bazan, J. F. and Kastelein, R. A. (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13**, 715-725
29. Pflanz, S., Timans, J. C., Cheung, J., Rennick, D. and Kastelein, R. A. (2002) IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* **16**, 779-16790
30. Devergne, O., Birkenbach, M. and Kieff, E. (1997) Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12041-12046
31. Robinson, D. S. and O'Garra, A. (2002) Further checkpoints in Th1 development. *Immunity* **16**, 755-758
32. Belladonna, M. L., Renauld, J. C., Bianchi, R., Vacca, C., Fallarino, F., Orabona, C., Fioretti, M. C., Grohmann, U. and Puccetti, P. (2002) IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells. *J Immunol* **168**, 5448-5454
33. Tsuji, S., Uehori, J., Matsumoto, M., Suzuki, Y., Matsuhisa, A. and Seya, T. (2001) Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall. *J Biol Chem* **276**, 23456-23463
34. Medzhitov, R. and Janeway, C. A. Jr. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298
35. Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**, 135-145.
36. Fabio, R. and Strominger, J. L. (2001) Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* **276**, 37692-37699
37. Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E. and Moore, K.W. (2002) A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* **168**, 5699-5708
38. Forman, H. J. and Torres, M. (2001) Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med* **22**, 189-216
39. Okamura, H., Tsutsi, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y. and Hattori, K. (1995) Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* **378**, 88-91

40. Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H. and Okamura, H. (2001) Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* **19**, 423-474
41. Tevenson, F. T., Turck, J., Locksley, R. M. and Lovett, D. H. (1997) The N-terminal propeptide of interleukin 1 alpha is a transforming nuclear oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 508-513
42. Zhang, Y., Kornfeld, H., Cruikshank, W. W., Reardon, C. C. and Center, D. M. Nuclear translocation of the N-terminal prodomain of interleukin-16. *J Biol Chem* **276**, 1299-1303
43. Tsutsui, H., Kayagaki, N., Kuida, K., Nakano, H., Okamura, H. and Nakanishi, K. (1999) Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity* **11**, 359-367
44. Mao, P. L., Jiang, Y., Wee, B. Y. and Porter, A. G. (1998) Activation of caspase-1 in the nucleus requires nuclear translocation of pro-caspase-1 mediated by its prodomain. *J Biol Chem* **273**, 23621-2364
45. Singer, I. I., Scott, S., Chin, J., Bayne, E. K., Limjuco, G., Chapman, K. and Kostura, M. J. (1995) The interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE) is localized on the external cell surface membranes and in the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immuno-electron microscopy. *J Exp Med* **182**, 1447-1459
46. Yang, J., Zhu, H., Murphy, T. L., Ouyang, W. and Murphy, K. M. (2001) IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production. *Nat Immunol* **2**, 157-164
47. Inoue, N., Fukui, A., Nomura, M., Matsumoto, M., Nishizawa, Y., Toyoshima K. and Seya, T. (2001) A novel chicken membrane-associated complement regulatory protein: molecular cloning and functional characterization. *J Immunol* **166**, 424-431
48. Shida, K., Shiratori, I., Matsumoto, M., Fukumori, Y., Matsuhisa, A., Kikkawa, S., Okamura, H., Toyoshima, K., Seya T. (2001) An alternative form of IL-18 in human blood plasma: complex formation with IgM defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* **166**, 6671-6679
49. Nishiguchi, M., Matsumoto, M., Tsuji, S., Akira, S., Toyoshima, K. and Seya, T. (2001) Mycoplasma fermentans lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2: role of N-terminal hydrophobic portion initiates multiple functions. *J Immunol* **166**, 2610-2616
50. Moriwaki, Y., Begum, N. A., Kobayashi, M., Matsumoto, M., Toyoshima, K. and Seya, T. (2001) Mycobacterium bovis bacillus calmette-guerin and its cell wall complex induce a novel lysosomal membrane protein SIMPLE, that bridges the missing link between lipopolysaccharide and p53-inducible gene, LITAF(PIG7), and estrogen-inducible gene, EET-1. *J Biol Chem* **276**, 23065-23076

51. Bursten, S. L., Locksley, R. M., Ryan, J. L. and Lovett, D. H. (1988) Acylation of monocyte and glomerular mesangial cell proteins. Myristyl acylation of the interleukin 1 precursors. *Clin Invest* **82**, 1479-1488
52. Kikkawa, S., Matsumoto, M., Shida, K., Toyoshima, K. and Seya, T. (2001) Human macrophages produce dimeric forms of IL-18 which can be detected with monoclonal antibodies specific for inactive IL-18. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 461-467
53. Sugama, S., Kim, Y., Baker, H., Tinti, C., Kim, H., Joh, T. H. and Conti, B. (2000) Tissue-specific expression of rat IL-18 gene and response to adrenocorticotrophic hormone treatment. *J Immunol* **165**, 6287-6292
54. Graur, D., Hide, W. A. and Li, W. H. (1991) Is the guinea-pig a rodent? *Nature* **351**, 649-652
55. Cao, Y., Adachi, J., Yano, T. and Hasegawa, M. (1994) Phylogenetic place of guinea pigs: no support of the rodent-polyphyly hypothesis from maximum-likelihood analyses of multiple protein sequences. *Mol Biol Evol* **11**, 593-604
56. D'Erchia, A. M., Gissi, C., Pesole, G., Saccone, C. and Arnason, U. (1996) The guinea-pig is not a rodent. *Nature* **381**, 597-600
57. Belardelli, F. and Ferrantini, M. (2002) Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends Immunol* **23**, 201-208
58. Maini, R. N. and Taylor, P. C. (2000) Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. *Annu Rev Med* **51**:207-229
59. Papadaki, H. A., Kritikos, H. D., Valatas, V., Boumpas, D. T., Eliopoulos, G. D. (2002) Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy. *Blood* **100**, 474-482
60. Nishimoto, N., Sasai, M., Shima, Y., Nakagawa, M., Matsumoto, T., Shirai, T., Kishimoto, T. and Yoshizaki, K. (2000) Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy. *Blood* **95**, 56-61
61. Lotze, M. T., Zitvogel, L., Campbell, R., Robbins, P. D., Elder, E., Haluszczak, C., Martin, D., Whiteside, T. L., Storkus, W. J. and Tahara, H. (1998) Cytokine gene therapy of cancer using interleukin-12: murine and clinical trials. *Ann NY Acad Sci* **795**, 440-454
62. Duda, D. G., Sunamura, M., Lozonschi, L., Kodama, T., Egawa, S., Matsumoto, G., Shimamura, H., Shibuya, K., Takeda, K. and Matsuno, S. (2000) Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res* **60**, 1111-1116
63. Halin, C., Rondini, S., Nilsson, F., Berndt, A., Kosmehl, H., Zardi, L. and Neri, D. (2002) Enhancement of the antitumor activity of interleukin-12 by targeted delivery to

neovasculature. *Nat Biotechnol* **20**, 264-269

64. Osaki, T., Peron, J. M., Cai, Q., Okamura, H., Robbins, P. D., Kurimoto, M., Lotze, M. T. and Tahara, H. (1998) IFN-gamma-inducing factor/IL-18 administration mediates IFN-gamma- and IL-12-independent antitumor effects. *J Immunol* **160** 1742-1749
65. Hashimoto, W., Osaki, T., Okamura, H., Robbins, P. D., Kurimoto, M., Nagata, S., Lotze, M. T. and Tahara, H. (1999) Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively. *J Immunol* **163**, 583-539
66. Cohen, J. (1995) IL-12 deaths: explanation and a puzzle. *Science* **270**, 908
67. Leonard, J. P., Sherman, M. L., Fisher, G. L., Buchanan, L. J., Larsen, G., Atkins, M. B., Sosman, J. A., Dutcher, J. P., Vogelzang, N. J. and Ryan, J. L. (1997) Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood* **90**, 2541-2548
68. Kang, W. K., Park, C., Yoon, H. L., Tahara, H., Lotze, M. T. and Park, C. H. (2001) Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study. *Hum Gene Ther* **12**, 671-684
69. Xu, L., Sanchez, A., Yang, Z., Zaki, S. R., Nabel, E. G. and Nichol, S. T. (1998) Nabel, G. J. Immunization for Ebola virus infection. *Nat Med* **4**, 37-42
70. Lieschke, G. J., Rao, P. K., Gately, M. K. and Mulligan RC. (1997) Bioactive murine and human interleukin-12 fusion proteins which retain antitumor activity in vivo. *Nat Biotechnol* **15**, 35-40
71. Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P., Kallen, K. J., Wollmer, A., Grotzinger, J. and Rose-John, S. A. (1997) bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol* **15**, 142-145
72. Zheng, X. X., Steele, A. W., Hancock, W. W., Kawamoto, K., Li, X. C., P. Nickerson, W., Li, Y., Tian, Y. and Strom. T. B. (1999) IL-2 Receptor-Targeted Cytolytic IL-2/Fc Fusion Protein Treatment Blocks Diabetogenic Autoimmunity in Nonobese Diabetic Mice. *J Immunol* **163**, 4041-4048
73. Zheng, X. X., Steele, A. W., Hancock, W. W., Steven, A. C., Tian, y., and Strom, T. B. (1997) A Non-cytolytic IL-10/Fc fusion protein prevents diabetes, blocks autoimmunity, and promotes suppressor phenomena in NOD mice. *J Immunol* **158**, 4507-4513
74. Yamamoto, T., Jeevan, A., Ohishi, K., Nojima, Y., Umemori, K., Yamamoto, S. and McMurray, D. N. (2002) A new assay system for guinea pig interferon biological activity. *J Interferon Cytokine Res* **22**, 793-797
75. Osaki, T., Hashimoto, W., Gambotto, A., Okamura, H., Robbins, P. D., Kurimoto, M., Lotze,

- M. T. and Tahara H. (1999) Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor, interleukin-18 (IL-18). *Gene Ther.* **6**, 808-815
76. Nishioka, Y., Hirao, M., Robbins, P. D., Lotze, M. T and Tahara, H (1999) Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12. *Cancer Res* **59**, 4035-4041
77. Liu, Y., Mounkes, L. C., Liggitt, H. D., Brown, C. S., Solodin, I., Heath, T. D. and Debs, R. J. (1997) Factors influencing the efficiency of cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *Nat Biotechnol* **15**, 167-173
78. Blezinger, P., Freimark, B. D., Matar, M., Wilson, E., Singhal, A., Min, W., Nordstrom, J. L. and Pericle, F. (1999) Intratracheal administration of interleukin 12 plasmid-cationic lipid complexes inhibits murine lung metastases. *Hum Gene Ther* **10**, 723-731.



## Supplemental data 1

本論文中で使用した配列の Accession No

IL-18		IL-12 p35		TGF beta	
species	No	species	No	species	No
bovine	Q9TU73	bovine	P54349	chicken	P09531
cat	BAB21060	cat	AAB93836	dog	P54831
chicken	CAB96214	deer	Q28233	guinea pig	Q9Z1Y6
dog	Q9XSR0	dog	Q28267	horse	O019011
guinea pig	AB025722	fugu	*12554	human	P01137
horse	Q9XSQ7	guinea pig	AB025723	mouse	NP_035707
human	NP_001553	horse	Q9XSQ6	pig	P07200
monkey	AAK13416	human	M65271	rat	NP_067589
mouse	NP_032386	mouse	M86672		
pig	O019073	pig	AAA73897	IL-2	
rat	NP_062038	rat	AAD51364	species	No
sheep	CAC09326	sheep	AAD51976	cat	AAA51431
TNF alpha		IL-12 p40		chicken	AAC96064
species	No	species	No	guinea pig	BAA31346
cat	P19101	bovine	P46282	horse	P37997
dolphin	9QBEA1	cat	AAB93835	human	NP_000577
guinea pig	P51434	deer	Q28234	mouse	AAB39206
horse	P29553	dog	Q28268	pig	P26891
human	AAA61198	fugu	*9258	rabbit	O77620
mouse	NP_038721	guinea pig	AB025724	rat	NP_446288
pig	P23563	horse	Q9XSQ5	IL-10	
possum	P79374	human	M65272	species	No
rabbit	A25451	mouse	M86671	cat	P55029
rat	CAA47146	pig	AAA75356	fugu	*2883
IL-1 beta		rat	NP_072133	guinea pig	Q9Z1Y5
species	No	sheep	AAB61368	horse	Q28374
cat	P41687	IFN gamma		human	NP_000563
chicken	CAC04510	species	No	pig	Q29055
guinea pig	Q9WVG1	cat	P46402	possum	O97798
horse	Q28386	chicken	P49708	rabbit	AAC23839
human	ICHU1B	dolphin	Q9TV67	rat	JN0475
mouse	I55969	guinea pig	AAN75515	IL-23	
pig	S10532	horse	P42160	species	No
possum	Q9XS77	human	IVHUG	guinea pig	AB058509
rabbit	A30584	mouse	P10580	human	NP_057668
rat	Q63264	pig	S10513	mouse	NP_112542
whele	AAL56945	rabbit	P30123	pig	BAA93688
xenopus	CAB53499	rat	NP_620235	rat	NP_569094

\* FuguGeneScan (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/fugu.html>)

## Supplemental data 2

モルモットサイトカイン遺伝子の単離に用いた PCR プライマー

AP1 及び AP2 はキットに付属されたアダプタープライマーである。

### Degenerate primers for cloning partial cDNA

primer	sequence
AP1	5'-CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC-3'
AP2	5'-ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC-3'
IL-18 5'end	AP1/AP2
IL-18 3'end 1st	5'-GTG AAC ATT AXA GAT XTA TCC CC-3'
IL-18 3'end 2nd	5'-GAA GAT TCA AAX TXC ATC TTR TT-3'
IL-12p40 5'end	5'-GAT GCT GGC CAG TAC ACC TG-3'
IL-12p40 3'end 1st	5'-GAG AAG TAG GAA TGX GGA GTR CTC CA-3'
IL-12p40 3'end 2nd	5'-GGG TAC TCC CAG CTG ACC TC-3'
IL-12p35 5'end	5'-GAA GAX ATH GAT CAT GAA GAX ATC AC-3'
IL-12p35 3'end 1st	5'-GGT ACA TCT TCA AGT CYT CAT A-3'
IL-12p35 3'end 2nd	5'-AGG CAC AGG GYC ATC AT-3'
IL-23p19 5'end	AP1/AP2
IL-23p19 3'end 1st	5'-TGC TGC TCC XTG GGC AAA GAC CCG GGC-3'
IL-23p19 3'end 2nd	5'-AAA GGC CTG GAG GCT XCG AAG GAT-3'

H; not G, R; A or G, Y; C or T, X; A or T or G or C

### Primers for cloning full length cDNA (5'-3' RACE PCR)

primer	sequence
IL-18 GSP2	5'-GAG GAT ATG CCC GAC TCC GAC TGT GC-3'
IL-18 NGSP2	5'-GCA ACG CGA GAG GTG TAC CTG TAG CC-3'
p40 GSP1	5'-CCC AGC TGA CCT CCA CCT GCT GAG AAT TC-3'
p40 NGSP1	5'-GGC TTC AGC TGC AGG TTC TTC GGT GG-3'
p40 GSP2	5'-CAC CTG CTG GTG GCT GAC GGC ATT CGG-3'
p40 NGSP2	5'-GTG GAG AAG CAG AGA GAG TGT CTG GGG AC-3'
p35 GSP1	5'-CCT CAT AGA TAC TGT TAA GGC ACA GGG CCA TC-3'
p35 NGSP1	5'-GAG GTC TTT CCG GAA GCC AGG CAA CTC-3'
p35 GSP2	5'-CCA GCA CCG TGA AGC CTG TGT ACC ACT GG-3'
p35 NGSP2	5'-GAA TGA GAG CTG CCT GGC TTC TGG AC-3'
p19 GSP2	5'-CTA CCA GAA CCT GCT GGG CTC AGA C-3'
p19 NGSP2	5'-GCC TCC ACT ATT CCC TGA TGG GCC-3'

