

論文内容の要旨

申請者氏名 白鳥 行大

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 応答が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る。従って、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のだが、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。

報告者はサイトカインが生体内で稼働する免疫応答をモニターするアウトプットとして最適である点、またその微量で最大の効果を発揮する薬理動態に着目したサイトカイン療法が癌を含む種々の疾患に対する新たな治療法として有力視されている点、かつ同時にマウスを主とする前臨床動物試験の限界が浮き彫りにされている点に着目し、未報告であった Th1 型インターロイキン、IL-12、IL-18 及び IL-23 のモルモット遺伝子を同定した。本発表ではヒト、マウスを対照とする比較解析(*in vitro*)で得られ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を総じて報告する。さらに実際に *in vivo* への応用として、サイトカイン療法の可能性をモルモット坦癌モデルを用いて評価したので報告する。最後にモルモットの分子進化が他の齧歯類のそれに比べ非常に特異であるという最近の学説に関して、今回同定したサイトカイン遺伝子を対象とする系統発生的分析を行い再考したので併せて報告する。以下①～⑤に得られた知見を要約する。

① IL-12 は互いに相同性を持たない p35, p40 分子からなるヘテロダイマー(p70)で 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及びラットなどの齧歯類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、モルモット各サブユニット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 を評価する前臨床動物モデルとしてモルモットが有用であることを明らかにした。一方、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におけるリプダクシシステムの構築に参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。

- 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)が優位に発現誘導されることを明らかにした。また、IL-12 とは異なり、IL-23 が作用する標的細胞の population あるいは IL-23 の活性強度がヒト及びモルモットでは異なることを明らかにした。
- ③ IL-18 は IL-1 β 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。今回報告者はヒトリコンビナント Caspase-1 と反応させた活性型が、IL-12 存在下、モルモット脾細胞の Th1 型サイトカイン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、計算上の分子量差に反し、モルモット前駆体のみ明確なサイズ差が確認された。そこで質量分析を行った結果、1)PAGE 上で生じるサイズ差は実際の質量(マス)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一連の 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。
- ④ 前述の坦癌モデルに対するサイトカイン療法は精製リコンビナント体の投与を採用した。使用したモルモット 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、高頻度のリンパ節転移を伴う悪性度が極めて高い腫瘍細胞である。今回検討した投与スケジュールでは IL-12 投与群に腫瘍形成の遅延、リンパ節転移の抑制などの明確な抗腫瘍効果が認められた。一方、IL-18 投与群に関しては腫瘍形成が若干遅延されるもの優位な抗腫瘍効果は認められなかった。
- ⑤ モルモットは形態学上齧歯類に属し、また分子進化が極めて早く特異であるという古くからの説はモルモットが齧歯類であると仮定に基づく。しかしアミノ酸配列データを用いた最近の系統発生的解析では、モルモットを齧歯類に分類するのは適当でないとするが論旨が目立つ。報告者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った。結果、モルモットサイトカイン遺伝子の分子進化は 3 つのタイプに分類されることを見いだした。即ち、1)モルモットが齧歯類を含む他の真獣類に対してアウトグループ(IL-1 β)、2)齧歯類及びモルモットが他の真獣類に対してアウトグループ(TNF α /TGF β /IL-10)、3)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(IL-2/IL-12 p35/IL-12 p40/ IL-18/IFN γ)である。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 白鳥行大

モルモットは結核菌、リステリア菌あるいはジフテリア菌などの細菌感染症モデルとして古くから使われてきている。しかしながら、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。申請者は、サイトカインが生体内で稼働する免疫応答をモニターするアウトプットとして最適である点、またその微量で最大の効果を発揮する薬理動態に着目したサイトカイン療法が癌を含む種々の疾患に対する新たな治療法として有力視されている点、かつ同時にマウスを主とする前臨床動物試験の限界が浮き彫りにされている点に着目し、未報告であったTh1型インターロイキン、IL-12、IL-18及びIL-23のモルモット遺伝子を同定・単離するとともに、それらの一次構造解析さらには機能解析を行った。

まず、IL-12については、ヒト、モルモット各サブユニット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を評価する前臨床動物モデルとしてモルモットが有用であることを明らかにした。次に、IL-23について、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)が優位に発現誘導されることを明らかにした。また、IL-12とは異なり、IL-23が作用する標的細胞のpopulationあるいはIL-23の活性強度がヒト及びモルモットでは異なることを明らかにした。IL-18については、遺伝子産物について質量分析を行った結果、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一連の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。さらに、モルモット肝癌モデルを用いて、サイトカイン療法の可能性を検討した結果、IL-12投与群に腫瘍形成の遅延、リンパ節転移の抑制などの明確な抗腫瘍効果を見いだした。

最後に、申請者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に関して系統発生的分析を行った結果、モルモットサイトカイン遺伝子の分子進化は3つのタイプに分類されることを見いだした。

以上のように、本論文はモルモットのサイトカイン遺伝子を単離し、その一次構造に基づく系統発生的な考察を加えた上で、細胞・個体レベルでの機能解析を行ったもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。