

博士論文

遺伝子欠損マウスを用いたサイトカインの抗腫瘍作用の解析

平成10年度入学

東京大学大学院農学生命科学研究科

獣医学専攻博士課程 87159

角田 茂

指導教官

東京大学医科学研究所

ヒト疾患モデル研究センター 細胞機能研究分野

教授 岩倉 洋一郎

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科獣医学専攻

平成 10 年度博士課程 入学

氏 名 角田 茂

指導教官氏名 岩倉 洋一郎

論文題名 遺伝子欠損マウスを用いたサイトカインの抗腫瘍作用の解析

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

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

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

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

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

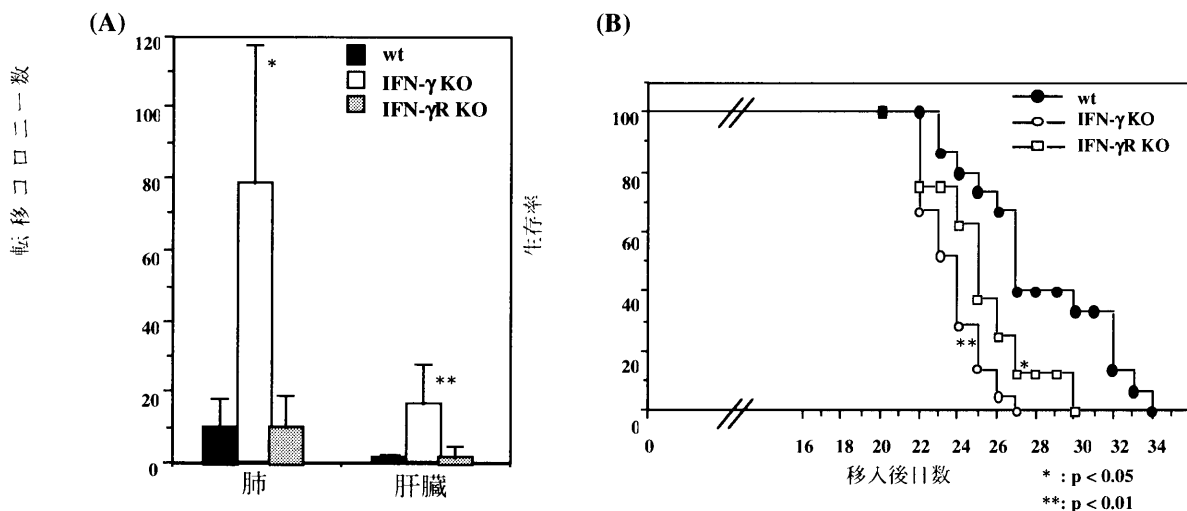


図 1 IFN- γ および IFN- γ R KO マウスにおける B16 悪性黒色腫の実験的転移

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

(B) 1×10^5 細胞を尾静脈より移入したときの生存日数

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

ことが示唆された。

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

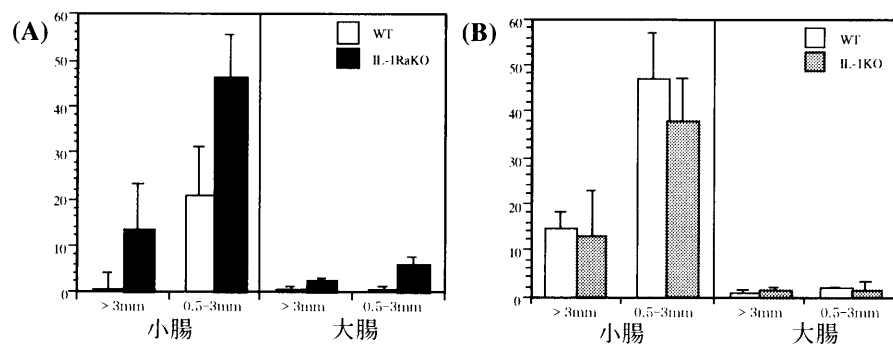


図 2 *Apc^{Min}* x KO マウスの腸管ポリープの形成数

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

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

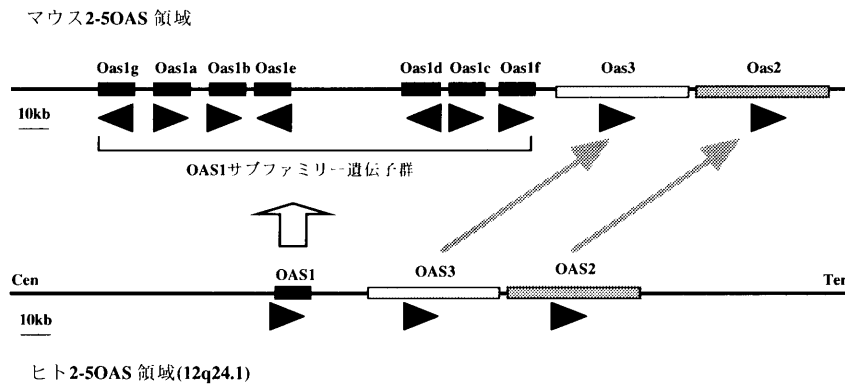


図3 マウスとヒトの2-5OASゲノム領域を比較した模式図

矢頭は遺伝子の転写方向を示す

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

目次

1 緒言	1
2 内因性サイトカインによる抗腫瘍作用についての検討	
2.1 要旨	9
2.2 序論	11
2.3 材料と方法	18
2.4 結果	22
2.5 考察	41
3 マウス 2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素遺伝子の解析と KO マウスの作製	
3.1 要旨	49
3.2 序論	50
3.3 材料と方法	55
3.4 結果	64
3.5 考察	92
4 参考文献	97
5 略語一覧	109
6 謝辞	111

1 緒言

生命は初期の単純な単細胞生物から高等な多細胞生物に進化する過程で、個々の細胞の役割・機能を分担するようになり、それぞれの細胞の生死や増殖、分化は、細胞の集合体である“個体”を維持するために厳密に制御されるようになった。この制御がなんらかの理由によって破綻し、無秩序に細胞が増殖する状態が“がん”である。現在、がんは日本人の死因の第1位であり、全体の約30%を占める疾患であることから、その発生機序の解明、予防および治療法の開発は、社会から強く要請されている医学・生物学の重要課題の一つである。

これら“がん”の発生や進行、転移に影響を与える事象として、細胞間情報伝達物質による細胞の生死や増殖、分化の制御と、異常細胞を認識して除去する免疫学的監視機構を用いた抑制などが考えられる。数多くの細胞間情報伝達物質のなかで、サイトカインはリンパ球やマクロファージ、造血系細胞、繊維芽細胞、ケラチノサイトなどの種々の細胞から産生される、すなわち“多数の異なる細胞から産生され、多数の異なる細胞に働きかけるポリペプチド”として定義され、極微量で細胞表面の特異的受容体を介して生理活性を示す。インターロイキン (interleukin: IL) や腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF)、インターフェロン (interferon: IFN) などが含まれている。これらサイトカインは多様な生理作用を持つばかりでなく、複雑なネットワークを形成していることが知られている。特に IL、TNF、IFN はがん細胞に対して直接的に作用するばかりでなく、免疫系の活性化を調節している因子でもあることから、がんの発生や進行、転移に少なからず影響を与えていると推測されていた。

“がん”との生理状態における内因性のサイトカインとの関わりについては、これまでほとんど解析がなされていない。この要因として、(1) がんの発生や進行、転移といった現象は *in vitro* では再現が難しく、*in vivo* の解析が中心になること、(2) 実験系が一般的に長期間に及ぶことから中和抗体や組み換えタンパク質の投与による解析はコストがかかること、(3) 外部からの過剰量の組み換えタンパク質投与は治療のためのモデルとはなるが、生理状態での内因性のサイトカインの機能を必ずしも反映していないことなどが挙げられる。

この問題を解決する有効な手段として、近年の発生工学の進歩により作製が可能になったサイトカイン遺伝子欠損 (KO) マウスを利用する方法がある。KO

マウスは、標的遺伝子を“相同組み換え”の原理を利用して破壊したマウスである。この相同組み換えは非相同組み換えに対して 1/10,000~1/1,000 の頻度でしか起こらないため、受精卵に遺伝子をマイクロインジェクションする通常のトランスジェニックマウスを作る方法では得ることができない。そこでマウス胚性幹 (ES) 細胞で相同組み換え体を単離した後にマウス個体を形成させることにより作製される。これまでに世界中の研究者によって数多くの KO マウスが作製され、遺伝子の個体レベルでの機能解析が行われている。

本研究では、サイトカインの抗腫瘍作用を検討するにあたり、多機能性・炎症性サイトカインとして知られている IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-6 に注目した。

IFN は当初、抗ウイルス活性を持つ物質として発見されたサイトカインであり(53)、その後の詳細な研究により、細胞増殖抑制(54)、主要組織適合抗原 (MHC: major histocompatibility complex) の発現増強やマクロファージおよび NK 細胞の活性化などの作用を持つ(36)ことが報告されている。IFN には α 、 β 、 γ 、 ω 、 τ 、 δ の6種類が存在しており、 α 、 β 、 ω 、 τ 、 δ はI型に、 γ はII型に大別されている。I型IFNであるIFN- α は塩基配列で約85%以上の高い相同性をもつ15以上の多遺伝子群からなるが、IFN- β はヒトおよびマウスでは単一遺伝子からなり、両者間にはアミノ酸レベルで30~50%の相同性がみらる。これらの遺伝子はヒトでは第9染色体上に、マウスでは第4染色体上にクラスターを形成して存在しており、1つの祖先遺伝子から派生したものと考えられている(129)。IFN- τ は反芻獣に特異的なI型IFN遺伝子であり、胎盤組織に発現が認められている(51)。また、IFN- δ はブタでのみ確認されているI型IFNである(74)。これに対して、II型IFNであるIFN- γ はアミノ酸配列および塩基配列ともI型IFNとの相同性は全くみられず、遺伝子もヒトでは第12染色体上に、マウスでは第10染色体上に位置している。また、I型IFNは共通の受容体 (type I IFN receptor) に(93)、IFN- γ は異なる受容体 (type II IFN receptor) に結合する。しかしながら受容体からのシグナル伝達経路は一部を共有しているため、2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素 (2',5'-oligoadenylate synthetase: 2-5OAS) や IRF (interferon regulatory factor) -1、PKR (double-stranded RNA-dependent protein kinase) といった共通の遺伝子の発現誘導もみられる(24)。I型IFNは主としてウイルス感染によりリンパ球や線維芽細胞をはじめとする様々な種類の細胞より産生が誘導

される。一方、II型IFNは産生細胞がT細胞やNK細胞などのリンパ系細胞に限られ、感作リンパ球に抗原が結合したとき、あるいは非感作リンパ球をマイトジェンで刺激したときに産生が誘導される(39)。したがってIFN- γ は「免疫IFN」とも呼ばれるなど、I型IFNとは全く異なった性質を持っている。

IFN- γ は、CD4陽性ヘルパーT(Th)細胞としては遅延型過敏反応などに関与するTh1タイプが産生する代表的なサイトカインである(84)。IFN- γ は、抗体産生系を介した液性免疫に関与すると考えられているTh2のIL-4産生を抑えることによってさらに、Th1優位な免疫を増強させることが知られている。また、IFN- γ はマクロファージ活性化因子(macrophage activating factor: MAF)の主体をなしている。TNF- α 、IL-1、GM-CSF(granulocyte macrophage-colony stimulating factor)などのサイトカインにもMAF活性をみることができ、これらのMAF活性は単独ではIFN- γ より弱く、IFN- γ を併用すると活性の増強がみられるなど、免疫系の調節因子として重要な役割を担っている。

さらに、IFN- γ は強い増殖抑制作用を持ち、またFas(CD95/Apo-1)やTNF- α などのアポトーシス誘導刺激に対する感受性にも影響を与えている(90, 119, 133)。細胞増殖抑制機構を担う分子としてはPKRやIDO(indoleamine 2,3-dioxygenase)、そして2-5OASが知られている。PKRは、タンパク翻訳開始因子eIF-2の α サブユニットをリン酸化することにより不活化させ、タンパク合成を阻害し(94)、IDOは必須アミノ酸であるトリプトファンを代謝することにより栄養枯渇状態を作り出すことが報告されている(91)。2-5OASは後述する“2-5Aシステム”の調節因子であり、最終的にはRNAを分解することにより転写を阻害し、結果として細胞増殖を抑制する。

このようにIFN- γ は様々な作用を持ち、抗腫瘍サイトカインとして働いていることは示唆されていたが、生理的状态での評価はほとんどなされていなかったため、IFN- γ に着目して解析を行った。

TNF- α は当初、マウスに移植した腫瘍に出血性壊死を起こさせる因子として発見されたサイトカインであるが、その後活性化リンパ球が産生する細胞傷害因子として見出されたリンホトキシン(LT/LT- α /TNF- β)、細胞膜上でLTと結合する糖タンパク質として見出されたLT- β とアミノ酸配列上の高い相同性(約30%)を有し、遺伝子ファミリー(TNFファミリー)を形成している。これらTNF- α 、LT、LT- β 遺伝子はクラスターを形成して存在しており、ヒトでは

第6染色体、マウスでは第17染色体上のMHC遺伝子領域内に存在している。TNF- α 、LT、LT- β は生物活性を多く共有し、また受容体も一部共有していることが知られている(127)。TNF- α に対する受容体は2種類知られており、分子量55 kDaの受容体はTNF-RI (TNF receptor type I)、分子量75 kDaの受容体はTNF-RII (TNF receptor type II) と呼ばれている。TNF-RIには“death domain”と呼ばれるFas/CD95と共通の構造を持ち、TNFやFasリガンドによるアポトーシスの誘導に関与していると考えられている(16)。TNF-RIとTNF-RIIの発現分布は異なっており、TNF-RIは上皮系の細胞をはじめとして広い組織分布を示すのに対して、TNF-RIIは造血組織、特に活性化T細胞やB細胞に強く発現している(102)。機能的には、TNF-RIは細胞障害性や繊維芽細胞の増殖などのTNFの作用の多くの部分と関係しており、TNF-RIIは胸腺細胞の増殖やサイトカイン産生誘導に関与していると考えられているが、両受容体は完全に独立したのではなく、クロストークも知られており、同様の作用を有する場合も報告されている。

TNF- α はマクロファージ、好中球、リンパ球をはじめ、繊維芽細胞、ケラチノサイトなど様々な細胞から産生され、非常に多彩な生理活性を示す。免疫系に対する作用としては、接着分子の発現誘導やIFN- γ 、IL-1、IL-6の産生誘導、T細胞の増殖、B細胞の分化促進などが知られている。また、炎症の誘起にも重要な作用を持っており、生体は外界から刺激を受けると様々なサイトカインを産生、放出するが、通常TNFがもっとも速やかに産生される。そして、発熱、急性期タンパクの誘導、内皮細胞傷害、好中球やマクロファージの遊走および活性化、骨吸収促進、コラゲナーゼやゼラチナーゼの産生増強、血管造成などの作用があることが知られている。TNF- α はその発見の経緯から示唆されるように、抗腫瘍作用を持つ。腫瘍細胞に対して増殖抑制、傷害、分化誘導、組織抗原誘導などの直接的作用の他に、腫瘍組織における血管の傷害や免疫担当細胞の活性化などが挙げられる。しかしその一方で、ある種の腫瘍に対しては増殖刺激となり、また血管新生を刺激するなど腫瘍促進作用もあることが知られている。また、悪疫質を誘導することも知られている。このようにTNF- α は当初癌の治療薬として期待されたが、TNF- α 投与は悪疫質などの副作用に加え、奏効率はあまり高くなく、限界があることが知られている。このようにTNF- α の作用は非常に複雑であり、またその抗腫瘍作用についての理解も整理されていなかったことから、KOマウスを用いての解析のターゲットの一つとした。

IL-1 は、古くからその存在について知られていたサイトカインであり、クローニングされるまで内因性発熱物質、リンパ球活性化因子などの種々の名称で呼ばれていた。IL-1 には同一の受容体に結合する IL-1 α 、IL-1 β の2種類存在し、両者はアミノ酸配列レベルでの相同性はわずかに 27%であるが、類似の高次構造を有しており、ほぼ同じ活性を示すことが知られている。IL-1 α 、IL-1 β ともにシグナルペプチド配列を持たない前駆体タンパク質として産生され、IL-1 α は Ca²⁺依存性プロテアーゼ・カルパインに、IL-1 β はカスパーゼ1 (caspase-1, ICE: IL-1 β converting enzyme) によってそれぞれ成熟型分子にプロセスされることによって活性型となる。しかし、ICE KO マウスでは、IL-1 β のみならず IL-1 α の産生も低下していることから、カスパーゼ1は IL-1 α の産生にも寄与していると考えられている(67)。これら IL-1 には内因性抑制因子である IL-1Ra (receptor antagonist) が存在している(42)。IL-1Ra は受容体に結合するがシグナルは伝えず、IL-1 の受容体への結合を特異的に阻害することにより、IL-1 の作用を負に調節している。IL-1Ra はアミノ酸レベルで IL-1 α とは 19%、IL-1 β とは 26%の相同性を有している。一方、IL-1 の受容体は IL-1RI (IL-1 receptor type I) と IL-1RAcP (IL-1 receptor accessory protein) のヘテロ2量体からなるが、負の調節は受容体側でも行われており(111)、シグナル伝達に必要な細胞内領域を持たずデコイ受容体として機能する IL-1RII (IL-1 receptor type II) が存在している。このように IL-1 のシグナル伝達はリガンドと受容体の双方で複雑に調節されている。

IL-1 は単球・マクロファージをはじめとする種々の細胞から産生され、その作用は炎症反応だけでなく、免疫系、神経系、内分泌系など広範囲にわたって多様な生物活性を有するサイトカインとして知られている。微生物感染や組織損傷を伴う急性炎症時には、発熱や急性期タンパク質の誘導、骨髄からの好中球を動員して血管内皮細胞への接着促進などの炎症反応の惹起に作用している。免疫反応の調節としては、抗原提示細胞 (APC: antigen presenting cell) から T 細胞への抗原提示の過程で APC が産生し、T 細胞の活性化に関与している。特に当研究室の中江らにより KO マウスを用いて詳細に解析されているが、IL-1 α は遅延型過敏症の系においては T 細胞の活性化に、IL-1 β は主として B 細胞の抗体産生の促進に作用していることが報告されている。また、IL-1 は IL-4、IL-6 など種々のサイトカインの産生を誘導し、免疫反応の増強に働いている。神経系としては、IL-1 は視床下部において神経伝達物質である cAMP の上昇や

PGE₂ 産生を引き起こし、発熱や睡眠、食欲減退を促進することなどが知られている。内分泌系としては、IL-1 は脳の視床下部からコルチコトロピン放出因子 (CRF: corticotropin-releasing factor) の放出を促し、CRF は脳下垂体前葉から副腎皮質刺激ホルモン (ACTH: adrenocorticotropic hormone) を遊離させ、その結果、副腎皮質からグルココルチコイドを放出することにより、ストレスに対応している。このとき、グルココルチコイドは IL-1、TNF などの産生を抑制し、フィードバック因子として働いていることも知られている。

IL-1 はさらに種々の細胞に対して増殖促進または増殖抑制作用も有している。これまでに、マウス骨髄性白血病細胞株 (M1) やヒト悪性黒色腫細胞株 (A375) といった腫瘍細胞に対しても増殖を抑制することが報告されている(86)。しかしながら、内因性の IL-1 の抗腫瘍作用に対する解析は *in vivo* ではほとんどなされていないため、今回着目した。

IL-6 は当初、B 細胞に対して抗体産生細胞への最終分化を誘導する因子の一つ、B 細胞分化因子 (BCDF、BSF-2) として単離同定された。同じ頃に別の研究グループから、IFN- β 2、26kD protein、hybridoma/plasmacytoma growth factor、hepatocyte stimulating factor といった分子が同定され、後にこれらが BSF-2 と同一のものであることが明らかになり、IL-6 として統一された。IL-6 は 20~30kD の糖タンパク質であり、受容体としては、IL-6 特異的なリガンド結合鎖 IL-6R とシグナル伝達鎖 gp130 の 2 本鎖から機能的な IL-6 受容体が構成されている。シグナル伝達鎖 gp130 分子は IL-6 以外にも、IL-11、LIF (leukemia inhibitory factor)、OM (oncostatin M)、CNTF (ciliary neurotrophic factor) などの受容体として用いられていることが知られており、サイトカインの特徴の一つである機能的重複性の問題を解決する重要なモデルとなった。

IL-6 は非常に多様な作用を持った多機能性サイトカインである。B 細胞に対しては分化段階の主に後期に作用し、IgM、IgG、IgA の産生を細胞の増殖なしに引き起こす。T 細胞の分化や活性化にも関与しており、CTL への分化とその増殖を引き起こすことが報告されている。骨髄においては、IL-6 は造血幹細胞に働き、G0 期から G1 期へと細胞周期を進める。放射線照射を施して造血幹細胞を抑制させたマウスに IL-3 とともに IL-6 を投与すると造血機能の回復が認められる(64)。皮膚組織においては、IL-6 はケラチノサイトの増殖を増強する。ケラチノサイト自身からも IL-6 が産生されることから、オートクライン機構も

考えられている(134)。肝細胞に対しては、炎症時の急性期タンパク誘導作用が知られている。また、IL-6 KO マウスでは肝切除時に細胞周期が進行せず、肝再生が阻害されることから、肝再生において IL-6 は重要な役割を担っていることが報告されている(20)。

IL-6 遺伝子導入マウスでは形質細胞腫 (plasmacytoma) が発生することから、腫瘍性疾患においても IL-6 が関与していることが示唆されている(117)。実際、多発性骨髄腫や悪性リンパ腫、腎癌、前立腺癌をはじめとする様々な腫瘍で IL-6 の産生が認められ、さらに IL-6 がこれらの腫瘍の増殖を促すことが報告されている。このように IL-6 は腫瘍の発生・進行への関与が示唆されていたが、KO マウスを用いての解析はこれまでほとんどなされていなかった。

以上の理由から特に IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-6 に注目し、これらのサイトカインおよびその関連 KO マウスを用いて、内因性のサイトカインの抗腫瘍作用について検討した (第 1 章)。まず可移植性腫瘍細胞株・B16 悪性黒色腫 (melanoma) を用い、腫瘍細胞の排除におけるサイトカインの役割を評価した。この中で、とりわけ IFN- γ が転移の抑制に重要であることを明らかにした。また、この転移の初期の抑制は IFN- γ の腫瘍細胞に対する直接の作用だけで説明ができ、後期の腫瘍形成の時期には宿主側の抗腫瘍機構の活性化作用も必要となることを明らかにした。続いて、がんの発生過程からのサイトカインの関与を検討するために、化学誘導発がん と 遺伝性発がん についての実験を行った。化学発癌剤・メチルコラントレン (methylchoranthrene: MCA) の皮下投与による化学誘導発がんにおいて、IFN- γ が発がん抑制に重要性であることを確認した。その一方で、家族性大腸ポリープ症 (familial adenomatous polyposis: FAP) のモデルマウスである *Apc^{Min}* (adenomatous polyposis coli / multiple intestinal neoplasia) マウスとこれらのサイトカイン KO マウスとの交配によって、ポリープ形成におけるサイトカインの影響を検討し、IL-1Ra がポリープ形成抑制に重要な役割を担っていることを明らかにした。

さらに、IFN は腫瘍細胞に対して増殖抑制やアポトーシスの誘導など直接作用することが重要であることが第 1 章で明らかになったことから、その作用を担う細胞内シグナル伝達経路にも着目し、その候補遺伝子の一つである 2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素 (2',5'-oligoadenylate synthetase: 2-5OAS) 遺伝子 KO マウスの作製を試みた (第 2 章)。まず、KO マウス作製に先立ってマウス 2-5OAS

遺伝子の構造の解析を行った。その結果、ヒトでは独立した4つのクラスの遺伝子からなるファミリーを形成しているが、マウスではその中の2つのクラスで遺伝子増幅を起こしてサブファミリーを形成しており、少なくとも計11の遺伝子からなることを明らかにした。次に、2-5OAS 遺伝子ファミリーの中で、その原型であり最も基本的な遺伝子 *Oas1a* の KO マウスの作製を行った。

2 内因性サイトカインによる抗腫瘍作用についての検討

2.1 要旨

サイトカイン、特に IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-6 に注目し、これらの関連 KO マウスを用いることにより、内因性サイトカインの *in vivo* における抗腫瘍作用について検討を行った。まず、可移植性腫瘍細胞株を用いて腫瘍排除におけるサイトカインの役割を評価した。B16 メラノーマをマウス尾静脈より移入する「実験的転移」阻止では、TNF- α 、IL-1、IL-6 などのサイトカイン KO マウスでは野生型と有意な差は認められなかったが、IFN- γ KO マウスでのみ転移の亢進が認められ、IFN- γ が転移阻止に重要な役割を果たしていることが明らかになった。しかし、IFN- γ R KO マウスでは、B16 の転移率は野生型と同じであることがわかった。従って、IFN- γ は B16 細胞の転移に対し、宿主の抗腫瘍免疫機能を活性化するのではなく、腫瘍増殖を直接阻害することにより転移を抑制していることがわかった。一方、転移後の腫瘍形成の時期には、宿主側の抗腫瘍機構の活性化に IFN- γ が関与していることが示唆された。

次に化学誘導発癌におけるサイトカインの役割を評価するために、化学発癌剤 MCA を IFN- γ 、TNF- α KO マウスの皮下に投与することにより繊維肉腫を発生させ検討した。IFN- γ KO マウスのみで発症の早期化が認められ、TNF- α KO マウスは野生型と同じであった。この結果、MCA 誘導発癌抑制においても IFN- γ が重要であることを明らかとした。

自然発症腫瘍系として、*Apc^{Min}* マウスにおける腸管ポリープ形成に対するサイトカインの役割を KO マウスと交配することにより解析した。*Apc^{Min}* x IFN- γ KO マウスでは、*Apc^{Min}* マウスと同様にポリープが形成され、IFN- γ はポリープ抑制には関与していないことがわかった。*Apc^{Min}* x TNF- α 、IL-6、IL-1 KO マウスでも同様であった。一方、*Apc^{Min}* x IL-1Ra KO マウスでは有意なポリープ形成の早期化が認められ、IL-1 の過剰シグナルはポリープの形成を促進することがわかった。このとき、ポリープ形成に促進的に作用することが知られている COX-2 および核内受容体 PPAR γ の発現を検討したところ、PPAR γ の発現が IL-1Ra KO マウスで特異的に亢進していることがわかった。このことから、IL-1Ra によるポリープ形成抑制は PPAR γ を介している可能性が示唆された。

以上のことから、内因性のサイトカインとしては、B16 悪性黒色腫細胞の転移および MCA 誘導発癌の抑制には IFN- γ が、腸管ポリープの形成抑制には

IL-1Ra が、それぞれ重要な役割を担っていることが明らかになった。

2.2 序論

悪性腫瘍は心臓病、脳卒中をはじめとする脳疾患と並び、現代人の主な死因の一つとなっている。悪性腫瘍はその由来によって百種類以上存在し、その種類によって性質が全く異なることから、それぞれ治療法も異なり、未だ有効な治療法が確立していないものも数多く残されている。現在、外科的切除の他に、DNA や RNA の核酸合成阻害剤等を用いた化学療法や放射線治療などが行われているが、一部、IFN や TNF、IL-2 などのサイトカインを用いた治療も行われている。特に IFN は抗ウイルス作用以外にも抗腫瘍作用が認められ、実際に IFN- α が腎癌や皮膚癌、多発性骨髄腫などに(10)、IFN- γ は腎癌や直腸癌、頭頸部癌などの治療に用いられ、一定の効果をあげている(3, 12, 99)。外部から投与された IFN は宿主の免疫系の活性化や腫瘍細胞への直接の作用など、多面的に効果を発揮していることが知られている。しかしながら、内因性のサイトカインの役割については明確になっていなかったことから、本研究では KO マウスを用いてその関与を検討した。

まず、腫瘍細胞の排除におけるサイトカインの役割を評価するために、可移植性腫瘍細胞株に対する感受性を検討した。B16 悪性黒色腫細胞株は C57BL/6 マウスの自然発症腫瘍より得られ、マウスにおけるヒトの悪性黒色腫のモデルとして広く用いられている。悪性黒色腫は特に白色人種に多く、アメリカ合衆国においては年間の癌による死亡患者のうち 1~2%を占める重篤な疾患であり(57)、その性質の早急な解明と治療法の開発が待たれている。B16 細胞を静脈内接種すると“実験的転移 (experimental metastasis)”のモデルとなる。がんの“転移”は、「腫瘍の悪性化→浸潤能の獲得→基底膜からの脱出→血管またはリンパ管内への侵入→移動→転移部位への定着→転移部位での腫瘍形成」といった多段階のステップを経て成立するが、“実験的転移”は最終段階の転移部位への定着以降のステップの実験モデルであり、主として宿主側の免疫学的監視機構 (immune surveillance system) を評価することができる。

これまで B16 細胞移植をモデルとして、IFN- γ をはじめとする様々なサイトカインの投与による抗腫瘍効果が検討されてきた。B16 細胞担癌マウスに IFN- γ を投与すると腫瘍塊の増殖遅延や生存日数の延長が認められる(75)。また、IFN- γ の強力な誘導物質である IL-12 を投与することにより、B16 細胞の肺への転移

率が減少し、B16 を腹腔内へ接種した場合には生存日数の延長、皮下への移植では腫瘍塊の増殖遅延がみられたとの報告もある(13)。これらの報告から、IFN- γ は B16 細胞に対する強力な抗腫瘍サイトカインであると考えられている。宿主側の抗腫瘍免疫として、CTL と NK 細胞の役割が重要視されているが、B16 細胞の静脈内接種による実験的肺転移においては、抗アシアロ GM1 抗体投与や NK 細胞を持たない変異マウス (beige マウス) を用いた実験から、NK 細胞が B16 細胞の肺転移を抑制するエフェクター細胞として重要であるという報告がある(121)。しかしながら、これらは IFN- γ を外部から投与した場合の効果であり、生理的条件下の IFN- γ が抗腫瘍効果に関与しているかどうかについては報告がなかった。また、B16 細胞は *in vitro* では IFN- γ により増殖抑制がみられるなど IFN- γ 感受性であるが、このような IFN- γ の直接的な抗腫瘍作用が生理的条件下で機能するのか、さらに IFN- γ による抗腫瘍効果は免疫担当細胞の活性化を介したもののなのかを区別した報告はなく、明らかにされていなかった。本研究では、IFN- γ の作用点を明らかにするため、IFN- γ 受容体ノックアウト (IFN- γ R KO) マウスを用いた。IFN- γ R KO マウスは、IFN- γ を産生し腫瘍細胞側には作用するが、宿主側の免疫系は IFN- γ に対して反応することができない。そのため、野生型および IFN- γ KO、IFN- γ R KO マウスの三者を比較することにより、IFN- γ の作用点が免疫系の活性化にあるのか、それとも腫瘍細胞に対する直接作用なのかを評価することができる。この方法を用いて、IFN- γ は初期には直接作用することによって、後期には直接作用のみならず宿主側の抗腫瘍機能を活性化することによって B16 細胞の転移を抑制することを明らかにした。

次に、化学発癌剤・メチルコラントレン (methylchoranthrene: MCA) 投与による化学誘導発癌によって、がん細胞の発生過程からのサイトカインの役割を評価した。MCA は DNA 塩基中では N^2 -グアニン付加体を形成することにより、変異を誘導する化学発癌剤である(56)。代表的なものとしては、乳頭腫形成において Ha-*ras* 癌遺伝子のコドン 13 の G \rightarrow T 変異 (活性化変異) を高頻度に誘発することが報告されている(11)。MCA を皮下に投与すると高率に繊維肉腫を誘導することができるが、この MCA 誘導発癌は腫瘍特異抗原が存在することが証明された最初の腫瘍実験系であることから、腫瘍免疫の研究の上では歴史的に重要な方法である。すなわち、MCA で誘発した肉腫を同系マウスに移植し、ある程度発育したときにこの腫瘍を結紮除去すると、このマウスは同一腫

瘍を再移植されてもこれを拒絶することができる。一方で、別のマウスで発生した肉腫は拒絶できない。このような方法で、MCA の皮下投与によって誘発された肉腫はそれぞれ腫瘍特異抗原を持っていることが証明された。実際、これまでに NK 細胞やキラー T 細胞の細胞傷害の代表的なエフェクター分子であるパーフォリンの KO マウス(126)、および T/B 細胞を欠損する RAG2 (recombination-activating gene-2) KO マウスで MCA 誘導発癌に対する感受性の亢進が認められており(108)、免疫監視機構が MCA 投与による発癌抑制に機能していることが証明されている。

最近、Schreiber らの研究グループは IFN- γ R KO マウスおよび I 型 IFN および IFN- γ のシグナル伝達が欠損している STAT1 KO マウスを用いて MCA 誘導発癌を行い、IFN- γ が発癌抑制に重要な役割を担っていることを報告した(59)。本研究では IFN- γ KO マウスを用いて、リガンド側からの追試を行った。

一方、TNF- α はすでに化学発癌剤 DMBA (7,12-dimethylbenzanthrene) + TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 投与による乳頭腫誘導実験において、プロモーション作用を有していることが KO マウスを用いて明らかにされていた(82, 118)。しかし、DMBA+TPA 投与による発癌はパーフォリンの KO マウスで差がないなど、免疫系の関与が低い発癌実験系であり、その発癌抑制に関与するメカニズムは全く異なっていることが示唆されている。そこで、TNF- α KO マウスについて MCA 誘導発癌試験を行い TNF- α の関与を検討した。

続いて、遺伝子の変異による自然発症としてヒト家族性大腸ポリープ (腺腫) 症 (FAP: familial adenomatous polyposis) のモデルである *Apc*^{Min} (adenomatous polyposis coli / multiple intestinal neoplasia) マウスにおける腸管ポリープ形成に着目した(83, 116)。FAP は大腸に数百～数千のポリープが生じる常染色体優性遺伝疾患であり、その頻度は約 5,000～10,000 人に 1 人である。患者は 10 代から大腸全域にポリープができはじめ、放置しておくとポリープの数は数千におよび、外科的に大腸を切除しないとほぼ 100% の確率で腺腫のいくつかは大腸癌に進展する重篤な疾患である。*APC* 遺伝子は FAP の原因遺伝子として中村ら 2 つのグループによって単離同定された遺伝子であるが(61, 85)、同時に非遺伝性・散発性の大腸癌や腺腫においても高頻度に体細胞レベルでの変異が認められることから、大腸腺腫の抑制遺伝子であることが証明されている(81, 95)。

APC 遺伝子は、消化管をはじめ広範な組織に発現しており、特に中枢神経系

に多く存在していることが報告されている。APC タンパク質はホモ二量体を形成し、細胞接着分子カドヘリンの細胞質内ドメインの結合タンパク・ β カテニンと結合してその機能を負に制御している。 β カテニンは Wnt シグナル伝達経路の重要な構成因子であり、核内で転写因子 Tcf/Lef (T-cell factor/lymphoid enhancer binding protein) と複合体を形成して Tcf/Lef を活性化し、標的遺伝子の発現を促進することが知られている (図 2.1.1)。Wnt は分子量約 4 万の分泌性糖タンパク質で、線虫やショウジョウバエから哺乳類に至るまで広く保存されており、初期発生や形態形成において重要な役割を果たしている。Wnt の名はマウス乳癌発生に関わる癌遺伝子 *int-1* とショウジョウバエの *wingless* が類似していたことに由来しており、哺乳類において Wnt は 20 種類近く知られており、サブファミリーを形成している(22)。Wnt は細胞膜上の 7 回膜貫通型受容体である Frizzled に結合するが、Frizzled も多数存在し、Wnt との間に特異的な組み合わせがあると考えられている。Wnt ファミリーはその生物学的活性から大きく 2 つに分類され、 β カテニンを安定化するシグナル伝達経路は Wnt/ β カテニン経路と呼ばれ、それ以外は Wnt/ Ca^{2+} 経路と呼ばれている。Wnt/ β カテニン経路においては、Wnt のシグナルは受容体 Frizzled から、Dvl (Dishevelled) やプロテインキナーゼ GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β)、Axin、そして APC を介して、転写因子 Tcf/Lef へと伝達される(106)。この経路の中で APC は Axin と複合体を形成して GSK3 β を介して β カテニンのリン酸化を促すことにより、 β カテニンのユビキチン化・分解を促進している。そのため、APC の機能喪失により Tcf/Lef が恒常的に活性化することが腸管上皮細胞の腺腫化を引き起こす原因と考えられている(62)。

Apc^{Min} マウスは ENU 投与によって誘導された遺伝子変異マウスから発見され(83)、加齢に伴って主に小腸に多数のポリープを形成する常染色体優性遺伝性のマウスとして系統化された。後の解析により *Apc* 遺伝子の 850 番目のコドンが終止コドンに変異していることが明らかになり、ヒト FAP のモデルとして注目された(116)。また、*Apc* 遺伝子の KO マウスも複数の研究者によって作製されており、ホモ欠損マウスは胎生致死などの基本的な表現型は一致するものの、遺伝子変異の部位によりポリープ形成数には差があることが報告されている(33, 88)。しかし一方で、ヒト FAP は大腸にのみ多数のポリープを形成するのに対して、*Apc^{Min}* マウスは小腸に優先的に多数のポリープを形成し、大腸ではほとんどポリープ形成が見られないといった大きな違いがあり、モデルとしての有

用性には疑問が持たれていた(109)。さらには、マウスは体が小さい（腸管が細い）ために腺腫が悪性化して腺癌となる前に、物理的な腸管の機能障害や高度の貧血のために死亡してしまうことから、腺癌の研究には用いることができないなどの問題点も存在する。しかしながら、ポリープ形成のステージの研究には有効であり、これまでにさまざまな研究に用いられている。腸管上皮細胞が過形成し、ポリープを形成するときの染色体の研究から、*Apc* 遺伝子の正常側遺伝子が欠損することにより細胞全体として *Apc* の機能が喪失する、ヘテロ接合性の消失 (LOH: loss of heterozygosity) が証明されている(87)。また、無菌飼育環境でのポリープ形成には差がなかったことからポリープの形成と腸内細菌との関連は否定されている(28)。一方、脂肪分の高い食生活をしている人は大腸癌の発生率が高いという疫学調査の結果は、*Apc* KO マウスを用いて証明された(45, 89)。この動物性脂肪が大腸癌のリスクファクターの一つであることのメカニズムについてはよくわかっていなかったが、近年、そのメカニズムの1つとして、PPARs が関与している可能性が示唆されている。PPARs は脂肪に対するセンサーの役割をしている転写因子群で、核内ホルモン受容体スーパーファミリーの一員であり、恒常性の維持に重要な役割を担っている(76)。ほ乳類の PPAR としては α 、 β/δ 、 γ の3種類が知られており、これらは脂肪酸の代謝と貯蓄の主要な調節因子と考えられている(125)。PPARs にはいろいろな不飽和脂肪酸がリガンドとなって結合することができ、その転写活性化を行っている。PPARs の活性はアラキドン酸誘導体であるプロスタグランジンやエイコサノイドによっても修飾を受けることが知られている。この中で最初は脂肪細胞の分化と脂肪酸代謝の調節因子として同定された PPAR γ が、その特異的合成アゴニストであるトログリタゾンやチアゾリジン誘導体を *Apc^{Min}* マウスに投与した実験から、ポリープ形成に促進的に機能していることが報告されている(73, 103)。他方、*Apc^{Min}* マウスはマウスの遺伝的背景によりポリープ形成に違いがある（AKR マウスよりも C57BL/6J マウスの方がポリープ形成が早期から多数認められる）ことから、その修飾遺伝子の検索が精力的に行われており、現在までに sPLA₂ (secreted phospholipase A₂) a₂ 遺伝子の遺伝的多型が発生率に影響を与えることが報告されている。非ステロイド系抗炎症剤であるアスピリン (COX-2 阻害剤) 常用者は大腸癌になりにくいとの疫学的な結果は、*Apc^{Min}* もしくは *Apc* ヘテロ KO マウスに COX-2 阻害剤を投与、あるいは *Cox-2* KO マウスとの交配することによりポリープ形成が抑制されることから証明された(89)。COX-2 は

ポリープのストローマ細胞で強く発現が誘導され、血管新生を促進されることによってポリープの形成促進に作用すると考えられているが、その誘導因子に関しては未知であった。IL-1、TNF- α を始めとする炎症性サイトカインはCOX-2の強力な誘導作用を持つことが知られていたことから、本研究では *Apc^{Min}* マウスとこれらのサイトカイン KO マウスとの交配することによって、腸管ポリープ形成におけるサイトカインの関与を検討した。

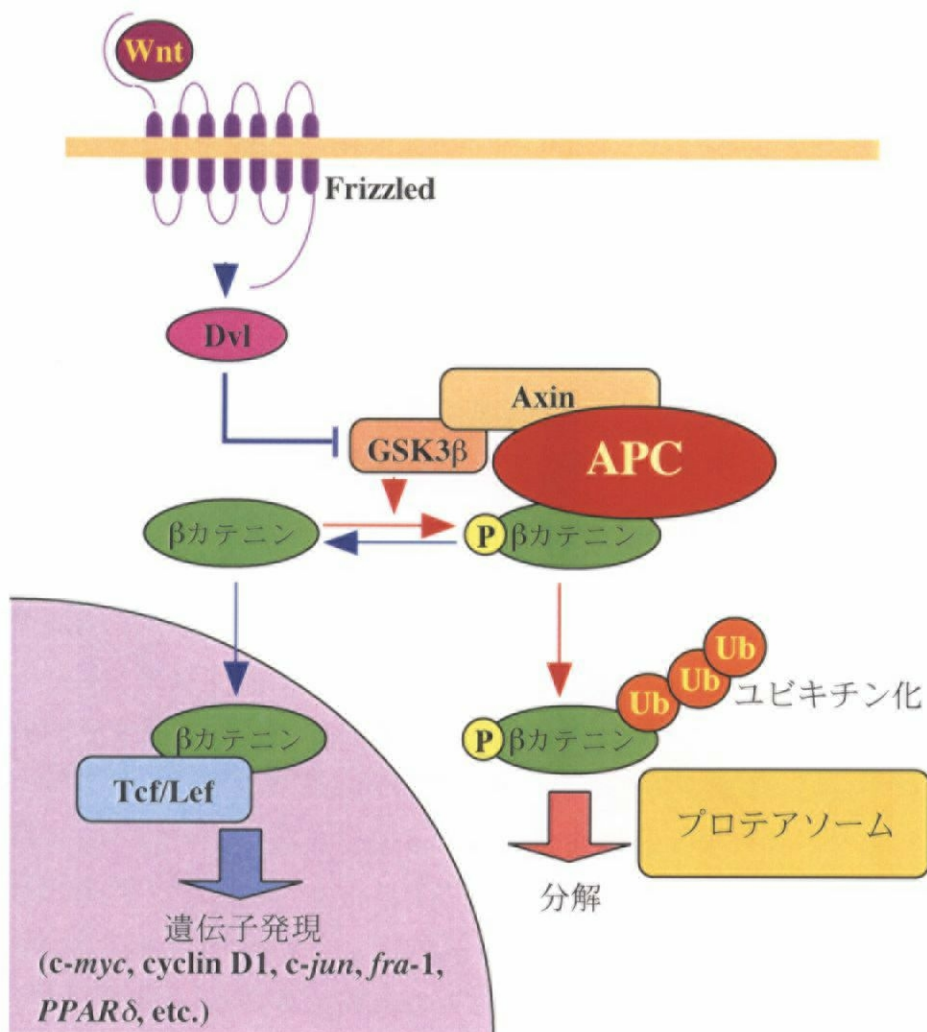


図2.2.1 Wnt/ β カテニン経路

Wntが作用していない場合、 β カテニンがGSK3 β によってリン酸化され、さらにユビキチン化されてプロテアソームで分解されているため、細胞質中での β カテニンのタンパク質量は低く保たれている(→)。Wntが細胞に作用すると、Frizzledから下流のDvlにシグナルが伝達され、GSK3 β の作用が抑制される。その結果、低リン酸化状態となった β カテニンは分解されずに細胞質に蓄積し核内に移行する。 β カテニンは核内で転写因子であるTcf/Lefと複合体を形成してTcf/Lefを活性化し、その結果、哺乳動物では*c-myc*、*c-jun*、*fra-1*、サイクリンD1、*PPAR δ* などの標的遺伝子の発現を促進している(→)。これらの遺伝子発現により腸管上皮細胞の増殖および移動が制御されていると考えられている。この経路の中でAPCはAxinと複合体を形成してGSK3 β を介して β カテニンのリン酸化を促すことにより、 β カテニンのユビキチン化・分解を促進している。APCの機能が喪失するとTcf/Lefが恒常的に活性化する。そのため、腸管上皮細胞の腺腫化を引き起こす原因となると考えられている。

2.3 材料と方法

マウス

C57BL/6J は日本クレア（株）より、*Apc^{Min}*-C57BL/6J はジャクソン研究所より購入した。IFN- γ KO および IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1 α/β 、IL-1Ra KO マウスは当研究室で作製され(46, 119)、C57BL/6J に 8 回戻し交配した N8 世代を用いた。IFN- γ R KO マウスは、Huang らによって作製され(49)、C57BL/6J に 8 回戻し交配した N8 世代を東大医科研の高津聖志博士より分与された。TNF- α KO マウスは Taniguchi らによって作製され(122)、C57BL/6J に 10 回戻し交配した N10 世代を分与された。IL-6 KO マウスは Kopf らによって作製され(65)、C57BL/6J に 6 回戻し交配した N6 世代をジャクソン研究所より購入し、さらに当研究室で N8 世代まで戻し交配を行ったものを実験に用いた。これらの KO マウスは全てホモ欠損マウス同士の交配で維持した。なお、*Apc^{Min}* マウスについては、ホモ変異 (*Apc^{Min/Min}*) マウスは胎生致死であり、またヘテロ変異 (*Apc^{Min/+}*) マウスでも加齢と共に高度の貧血を呈するため、交配は必ずオスをヘテロ (*Apc^{Min/+}*)、メスは野生型 (*Apc^{+/+}*) とした。また *Apc^{Min}* 遺伝子座の伝達は、マウスの尾より得た DNA を鋳型として用いて 3 種類のプライマー (oIMR033: 5'-GCC ATC CCT TCA CGT TAG-3', oIMR034: 5'-TTC CAC TTT GGC ATA AGG C-3', oIMR758: 5'-TTC TGA GAA AGA CAG AAG TTA-3') による PCR (*Apc^{Min}*: 300bp, *Apc⁺*: 600bp) を行い決定した(55)。

マウスは、すべて東京大学医科学研究所実験動物研究施設において、明 12 時間 (8:00~20:00)、暗 12 時間 (20:00~8:00) で照明をコントロールし、SPF (specific pathogen free) 環境下で飼育された。

腫瘍細胞

B16 悪性黒色腫株および YAC-1 リンパ腫株はルイ・パストゥール研究所の宇野賀津子博士から供与を受けた。B16 および YAC-1 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS: fetal bovine serum、大日本製薬、大阪) を含む RPMI 1640 (Gibco BRL, Rockville, MD) 培地にて 37°C、5%炭酸ガスインキュベーター内で培養した。

B16 細胞は実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンターにてマイコプラズマおよびマウス肝炎ウイルス (MHV) に感染していないことが PCR によって確認されたものを用いた。

B16 悪性黒色腫を用いた *in vivo* 実験

-80℃で凍結保存してある B16 細胞を 10%FBS を含む RPMI 1640 (Gibco BRL) 培地にて 37℃、5%炭酸ガスインキュベーター内で培養し、2 回継代後、生細胞数が 4×10^5 細胞/ml となるよう PBS(-)溶液に懸濁し、10-12 週令の C57BL/6J 背景のオスマウスに 250 μ l (1×10^5 細胞) 尾静脈内接種した。転移数は 14 日後解剖し、肺および肝臓に転移したコロニー数を肉眼で測定した。また生存日数は同様に処置したマウスについて観察した。

抗アジアロ GM1 (Wako, 大阪) 処理群は、B16 細胞を接種する前日に 100 μ l の抗アジアロ GM1 を尾静脈内投与を行った。

腫瘍塊の増殖速度測定実験では、B16 の生細胞数を 2×10^5 細胞/ml となるよう PBS(-)溶液に懸濁し、10-12 週令の C57BL/6J 背景のオスマウスの背中の皮下に 100 μ l (2×10^5 細胞) 接種し、肉眼で腫瘍塊が確認できる 7 日目から 1 日置きにノギスにより大きさを測定した。腫瘍塊の体積は便宜的に以下のように測定した。

$$(\text{腫瘍塊の体積}) = (\text{腫瘍塊の短径})^2 \times (\text{腫瘍塊の長径})$$

B16 悪性黒色腫に対する細胞傷害活性の測定

10-12 週令の C57BL/6J 背景のオスマウスに 1×10^5 細胞の B16 を尾静脈内接種 2 週間後に解剖し、脾臓を無菌的に摘出し、MEM 培地 (ニッスイ、東京) 中で細胞をほぐした。ばらばらにした脾細胞を 1000 rpm、10 分間遠心して回収し、赤血球除去トリス緩衝液 (0.75%塩化アンモニウム、17 mM Tris-HCl) で溶血させた後、2 回 MEM 培地で洗浄し、 1×10^7 細胞/ml になるよう 10%FBS を含む RPMI 1640 培地に懸濁した。その後、 8×10^6 細胞/well になるよう 12 穴培養皿で培養する。このとき、 10^4 Rad の放射線処理した B16 細胞を 8×10^6 細胞/well になるよう加えて 96 時間培養した。なお、IL-2 添加群には、rIL-2 を 5 units/ml となるよう添加した。

細胞傷害活性測定の際、標的細胞とする B16 と YAC-1 は $100 \mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4/10^6$ 細胞の割合で、37℃、30 分間標識した後、丸底の 96 穴プレートに 1×10^4 細胞/well となるよう分注しておき、ここに 96 時間培養した脾細胞を E/T 比が 50、12.5、3.1、0.8 となるようそれぞれ加え、37℃、4 時間後の上清中に遊離した ^{51}Cr を測定した。

なお、特異的傷害活性は以下の方法で算出した。

$$(\text{特異的傷害活性}) = (X \text{ cpm} - S \text{ cpm}) / (T \text{ cpm} - S \text{ cpm})$$

X: 測定値 T: 標的細胞全体の測定値

S：標的細胞のみの場合の上清の測定値

MCA 投与による化学誘導発癌

MCA (Wako) は 5mg/ml となるようにオリーブオイル (Wako) に溶解し、保存溶液とした。10~12 週齢のマウスの左脇腹の皮下に MCA を 100 μ g (1mg/ml 溶液を 100 μ l) または 25 μ g (0.25mg/ml 溶液を 100 μ l)、右脇腹には溶媒 (オリーブオイル) のみを 100 μ l 投与し、約 130 日間観察を行った。腫瘍形成は触診で判定 (直径約 5mm) できるものを腫瘍陽性とした。

Apc^{Min} マウスの腸管ポリープの測定

Apc^{Min}-C57BL/6J または *Apc^{Min}* x KO マウスは γ 線滅菌した通常飼育用 (粗脂肪分 4.5%、粗繊維分 3.4%) 試料 FR-1 (船橋農場、千葉) を与えて飼育し、3 ヶ月齢、4 ヶ月齢または 6 ヶ月齢の時点で解剖した。腸管は 23G 注射針・10ml シリンジを用いて 70%エタノールで還流することにより内容物を除去した後、切り開いて皺にならないよう広げ、中性緩衝 10%ホルマリンで固定した。腸管内部を実体顕微鏡下で観察し、直径が 0.5 mm 以上で形態的な特徴を持つものをポリープと判定した。

病理組織

Apc^{Min} マウスより腸管を摘出し、上記の要領で腸管を中性緩衝 10%ホルマリンで固定した。固定した組織を脱水→パラフィンで包埋した後、ミクロトーム (JUNG BIOCUT 2035, Leica) により厚さ 3 μ m の連続切片を作製した。病理組織像の検出にはキシレンによる脱パラフィン処理後、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を行った。

ノザンハイブリダイゼーション法

組織および細胞の RNA は AGPC (Acid Guanidium Thiocyanate Phenol-Chloroform) 法により調製した(15)。まず、解剖後摘出した臓器 (~150 mg) を素早く液体窒素により凍結させた後、3 ml の Solution D (4 M Guanidium Thiocyanate、25 mM クエン酸ナトリウム、0.5% N-ラウリルサルコシルナトリウム、100 mM 2-メルカプトエタノール) を加えてホモジネートした。その後、0.3 ml 2M 酢酸ナトリウム (pH4.0)、3.0 ml 水飽和フェノール、1.2 ml クロロホルム/イソアミルアルコール (49:1) を加えてよく攪拌した後、氷上に 30 分間放置する。その後、3500 rpm、4 $^{\circ}$ C、30 分遠心し、上層を分離する。回収した上層に等量のイソプロパノールを加えて、-20 $^{\circ}$ C、1 時間 30 分放置した後、3500 rpm、4 $^{\circ}$ C、30 分遠心する。液層を捨て、回収した沈殿物を 70%エタノールで

洗浄した後、0.2 ml の TE 溶液（10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA）に溶解させた。RNA を 1.2% 変性アガロース-ホルムアルデヒドゲル/MOPS 緩衝液（20 mM MOPS-NaCl,pH7.0、15 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA）の電気泳動をした後、キャピラリー法により RNA をナイロンメンブラン（Gene Screen Plus, NEN, Boston, MA）に移し、UV クロスリンクおよび 80°C、2 時間加熱することにより RNA をメンブランに固定した。ハイブリダイゼーションは、まずプレハイブリダイゼーション溶液（50% ホルムアミド、0.1% デンハルト氏溶液、50 mM Tris-HCl,pH7.5、1% ラウリル硫酸ナトリウム、10% デキストラン硫酸、0.1 mg/ml サケ精巢 DNA）で 42°C4 時間以上プレハイブリダイズした後、30 ng の cDNA をランダムプライマーにより ³²P-標識した（Multiprime DNA labelling system, Amersham, Buckinghamshire, UK）プローブを 1 x 10⁶ cpm/ml となるよう 95°C5 分加熱した後加えて、42°C18 時間ハイブリダイゼーションをおこなった。シグナルは BAS 2000 II Bio-Image-Analyzer（Fuji フィルム、東京）にて検出した。

2.4 結果

サイトカイン KO マウスの B16 悪性黒色腫の実験的転移

C57BL/6J 背景 (MHC ハプロタイプ: H-2^b) の IFN- γ KO、TNF- α KO、IL-1 α / β KO、IL-1Ra KO および野生型 (wt: wild-type) マウスに 1×10^5 細胞の B16 悪性黒色腫細胞 (H-2^b) を静脈内接種し、実験的転移を試みた。接種 14 日後に解剖して肺および肝臓への B16 の転移数を測定した (図 2.3.1)。B16 の転移コロニーは、実験毎に数が振れるが、野生型では肺に 5~20 個認められる。一方、肝臓にはほとんど転移は認められない。このような条件でサイトカイン KO マウスの転移について比較した。IFN- γ KO では大幅な転移数の増加が認められ (図 2.3.1A)、肺に 128.7 ± 72.6 個 (野生型 13.3 ± 16.4 個、 $p < 0.05$) であり、さらに肝臓にも転移が認められた (48.8 ± 16.8 個、野生型: 1.0 ± 0.8 個、 $p < 0.01$)。これに対して TNF- α KO (図 2.3.1B)、IL-1 α / β KO (図 2.3.1C)、IL-1Ra KO マウス (図 2.3.1D)、IL-6 KO マウス (図 2.3.1E) は野生型と転移数に有意な差は認められなかった。このことから、B16 の転移の抑制には IFN- γ が重要な役割を担っているが、TNF- α 、IL-1 および IL-6 は必須ではないことが明らかになった。

さらに、IFN- γ KO マウスにおける B16 転移コロニーの大きさを測定したところ (図 2.3.1F)、野生型よりも大型であることがわかった (IFN- γ KO: $379.2 \pm 210.1 \mu\text{m}$ 、野生型: $152.4 \pm 89.2 \mu\text{m}$ 、 $p < 0.001$)。このことから、内因性の IFN- γ が B16 細胞の転移のみならず転移部位での腫瘍の増殖の抑制にも重要な働きをしていると考えられた。

B16 悪性黒色腫に対する IFN- γ の *in vitro* での作用

まず B16 悪性黒色腫に対する IFN- γ の作用について *in vitro* で検討した。まず、IFN- γ の増殖抑制作用について評価した。培養液中にマウス IFN- γ をそれぞれ 0、1、10、100 units/ml となるように添加すると、B16 細胞の増殖遅延が認められた (図 2.3.2A)。増殖遅延は 1 unit/ml から認められ、100 units/ml では 3 日後以降増殖がほぼ停止した。また、IFN- γ は MHC を強力に発現誘導をすることが知られている。そこで IFN- γ 存在下 (10 または 1000 units/ml) で 24 時間培養したときの B16 細胞に対する MHC の発現誘導を FACSscan によって解析した (図 2.3.2B)。MHC クラス I (H-2K^b) は顕著に誘導されたが、MHC クラス II (I-A^b) は発現が認められなかった。さらに IFN- γ の下流のシグナル分子で増殖抑制に関与すると思われる代表的な遺伝子である 2-5OAS 遺伝子 (*Oas1a*) と PKR 遺

伝子について、発現誘導をノザンハイブリダイゼーション法により確認した(図 2.3.2C)。2-5OAS 遺伝子は IFN- γ によって強力的に誘導されたが、PKR 遺伝子については誘導は認められなかった。

以上の結果から、B16 細胞は機能的な IFN- γ 受容体を持ち、増殖抑制などの IFN- γ の直接の作用を受けることが明らかになった。

IFN- γ KO、IFN- γ R KO マウスにおける B16 悪性黒色腫の実験的転移

IFN- γ は直接の増殖抑制作用の他に、NK細胞やT細胞、マクロファージなどの免疫担当細胞の活性化因子でもあり、IFN- γ がこれらの細胞を活性化することによって転移抑制に働いていることも考えられた。そこで IFN- γ の転移抑制作用について、*in vivo*での作用点を明らかにするために IFN- γ R KO マウスを用いることにより検討を行った。1 x 10⁵細胞の B16 細胞をマウスの尾静脈より接種し、14 日後に転移したコロニー数を測定した(図 2.3.3)。IFN- γ KO マウスでは顕著な転移の増加が認められるのに対して、IFN- γ R KO マウスにおける B16 細胞の転移は、肺 10.0 \pm 8.7 個、肝臓 2.0 \pm 2.5 個であり、野生型(肺 10.0 \pm 8.2 個、肝臓 1.2 \pm 1.3 個)と有意な差は認められなかった。このように、IFN- γ KO、IFN- γ R KO マウスでは全く異なる結果となった。このことは、IFN- γ による抗腫瘍効果に宿主側の IFN- γ 受容体を介したシグナルは必須でなく、B16 細胞に対する IFN- γ の直接的作用が重要であることを示している。

IFN- γ R KO マウスでの B16 細胞に対する IFN- γ の直接作用が正常に起こりうることを証明するために、IFN- γ R KO マウスの IFN- γ 産生能を検討した。*in vitro*で脾細胞に対して TCR 刺激を加えたときの IFN- γ の産生量は野生型と変わらなかった(図 2.3.4A)。このことは TCR 刺激に対して IFN- γ R KO マウスは正常に反応することができることを示している。同様に B16 細胞を接種することにより感作した脾細胞に *in vitro*で B16 細胞で再刺激を加えても、IFN- γ R KO マウスでは IFN- γ の産生が認められた(図 2.3.4B)。以上により、IFN- γ R KO マウスにおいても野生型と同様に B16 細胞に対して IFN- γ が直接作用することが示唆された。

B16 悪性黒色腫に対する細胞障害活性

IFN- γ および IFN- γ R KO マウスの B16 細胞に対する細胞傷害活性が野生型マウスと異なっている可能性が考えられたので、それぞれのマウスの脾細胞を用いて検討した。

担癌 14 日目のマウスより調製した脾細胞を放射線照射した B16 細胞と共に 4

日間、5 units/ml IL-2 添加および非添加でそれぞれ培養後、B16 細胞および YAC-1 細胞に対する細胞傷害活性を測定した (図 2.3.5)。IL-2 非添加培養の脾細胞の B16 細胞に対する細胞傷害活性は、野生型、および両ノックアウトマウスとも 10%以下と低く、ほとんど認められなかった。一方、5 units / ml IL-2 添加培養時には著しい細胞傷害活性の誘導が認められ、IFN- γ および IFN- γ R KO マウスの細胞傷害活性には差が認められなかった。

このことも、B16 細胞の実験的肺転移における IFN- γ および IFN- γ R KO マウスでみられるコロニー数の差が、細胞傷害活性の差によるものではなく、IFN- γ の B16 細胞に対する直接作用であることを支持している。

ただし、この細胞傷害活性は、NK 細胞の細胞傷害活性の指標となる YAC-1 細胞に対する活性と相関すること、抗 Thy1.2 抗体によって T 細胞を除去してもほぼ同様の細胞傷害活性を示す (データ示さず) ことから、ほぼ NK 細胞による細胞傷害の結果であり、B16 細胞特異的 CTL による細胞傷害活性は非常に低いと考えられた。

NK 細胞と B16 悪性黒色腫の実験的肺転移

実験的肺転移においては NK 細胞が B16 細胞の排除の主要なエフェクターであることが知られていた。IFN- γ による直接の抗腫瘍効果が NK 細胞と比較してどの程度関与しているか、また IFN- γ による NK 細胞の活性化の関与をあきらかにするため、NK 細胞を抗アシアロ GM1 抗体によって欠損させた状態で IFN- γ および IFN- γ R KO マウスと野生型マウスを比較し、内因性の IFN- γ の効果を検討した (図 2.3.6)。抗アシアロ GM1 抗体を B16 細胞の接種 1 日前に静脈内投与したマウスは、肺において野生型、IFN- γ および IFN- γ R KO マウス共にコロニー数が激増したが、IFN- γ KO マウスでは相加的な転移コロニー数の増加が認められた。同様に、肝臓における B16 の転移コロニー数は、野生型マウスの 27.3 ± 4.3 個 ($n = 4$) IFN- γ R KO マウスの 43.3 ± 12.3 個 ($n = 4$) に対して IFN- γ KO マウスが 110.3 ± 12.5 個 ($n = 3$) と有意に転移数が多く ($p < 0.01$)、IFN- γ による相加的な効果がみられた。

一方、陰性対照の抗アシアロ GM1 抗体未処理のマウスは、野生型では肺に 10.0 ± 9.7 個、肝臓に 0.43 ± 0.73 個 ($n = 7$)、IFN- γ KO マウスでは肺に 98.0 ± 45.4 個、肝臓に 14.7 ± 9.7 個 ($n = 7$) であり、IFN- γ KO マウスでみられる転移数の亢進は抗アシアロ GM1 抗体処理した野生型マウスの転移数より少なかった。

以上のことより、B16 細胞の実験的転移において、NK 細胞が主要なエフェ

クター細胞として機能しているが、IFN- γ はNK細胞とは独立して抗腫瘍作用を持っており、生体における抗腫瘍の一部を担っていることがわかった。

B16 悪性黒色腫の転移後期および腫瘍形成後の増殖に対する IFN- γ の効果

IFN- γ および IFN- γ R KO マウスにおける B16 細胞の実験的転移時の生存日数について検討した (図 2.3.7)。 1×10^5 細胞の B16 悪性黒色腫を静脈内接種したときの野生型マウスの生存日数は 26.1 ± 3.7 日 ($n=15$) であったのに対して、IFN- γ KO マウスでは 21.7 ± 1.6 日 ($n=21$) であり、有意に短縮していた。一方、同様の条件で IFN- γ R KO マウスは野生型よりも生存日数が有意に短縮しており (23.1 ± 2.6 日、 $n=8$, $p < 0.05$ vs. wt)、IFN- γ KO マウスと中間の値を示した。このことは、転移後期の抑制においては IFN- γ の宿主側の受容体を介した間接的な作用が必要であることを示唆している。

さらに、B16 細胞を皮下に移植したときの腫瘍形成について IFN- γ および IFN- γ R KO マウスで検討した (図 2.3.8)。IFN- γ KOマウスではB16の腫瘍塊の形成が野生型よりも有意に早くなっており、移植後18日の時点で野生型の約2.5倍の体積となっていた。このことから IFN- γ は転移のみならず固形腫瘍に対しても抑制に重要な役割を担っていることがわかった。個体間の振れが大きいという実験系の問題点があったため有意差は得られなかったものの、興味深いことに、IFN- γ R KO マウスではB16の腫瘍塊の形成は IFN- γ KOと野生型の中間的な傾向を示し、転移数の結果とは一致しなかった。つまり、IFN- γ は直接作用だけでなく、固形腫瘍の抑制に対しては宿主側の受容体を介した抗腫瘍系の活性化を行っている可能性を示している。

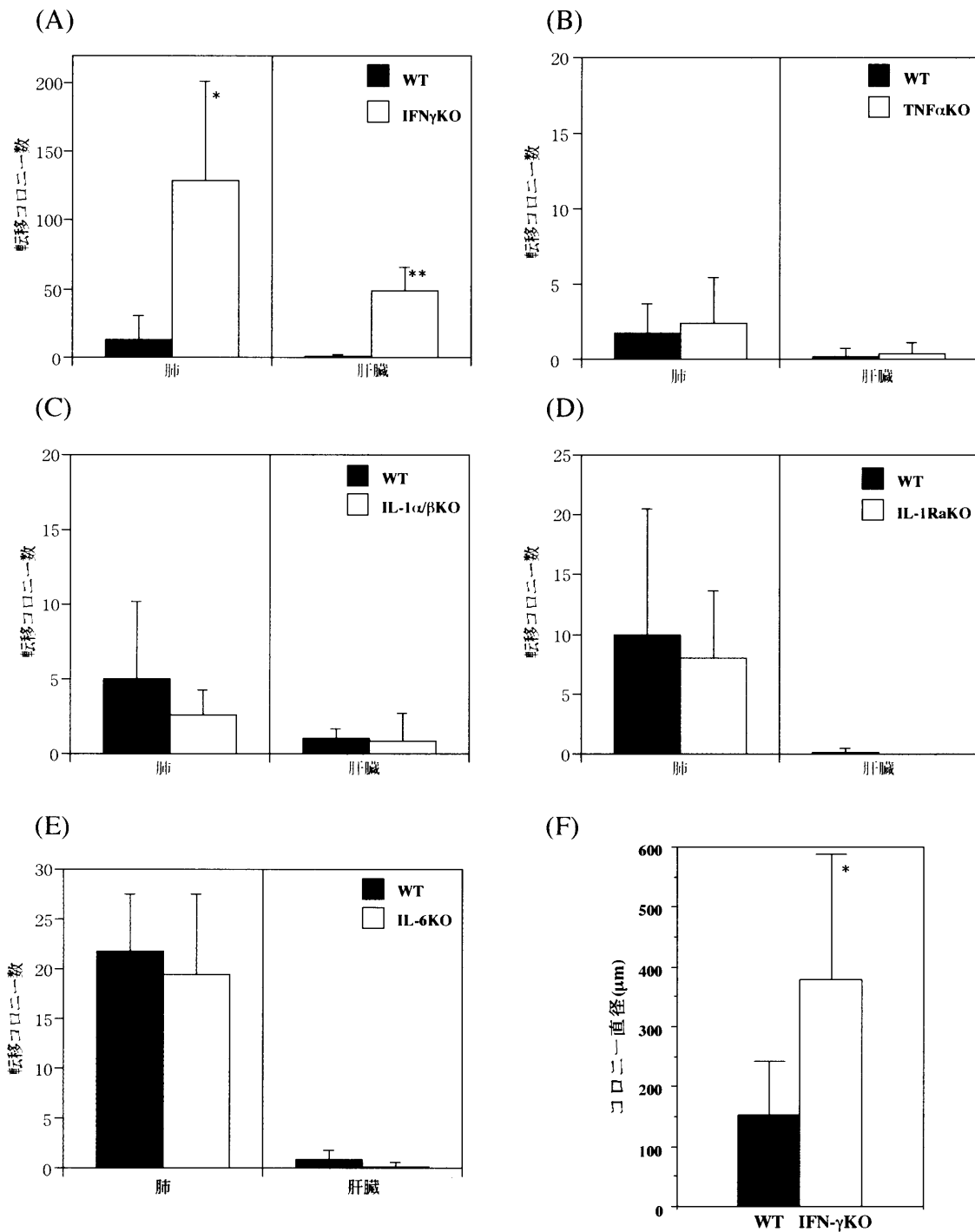
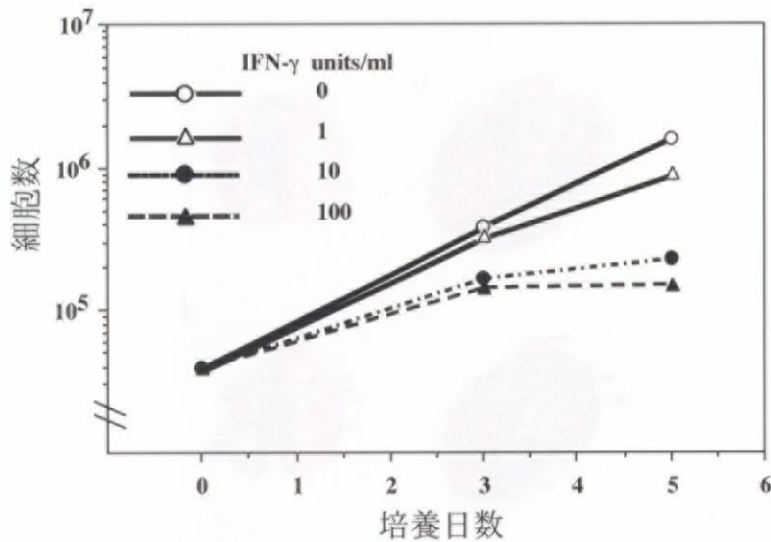
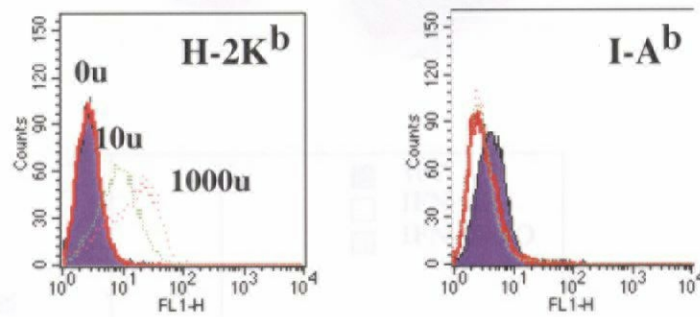


図2.4.1 サイトカインKOマウスにおけるB16悪性黒色腫の実験的転移
 1×10^5 細胞のB16細胞を尾静脈内接種14日後の肺および肝臓に転移したB16の
コロニー数。(A) IFN- γ KO (n=6) vs 野生型マウス(n=7), (B) TNF- α KO (n=8) vs
野生型マウス(n=13), (C) IL-1 α/β KO (n=8) vs 野生型マウス(n=5), (D) IL-1RaKO
(n=5) vs 野生型マウス(n=7), (E) IL-6KO (n=7) vs 野生型マウス(n=6)
(F) IFN- γ KO vs 野生型マウスのコロニーの大きさの比較
有意差 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

(A)



(B)



(C)

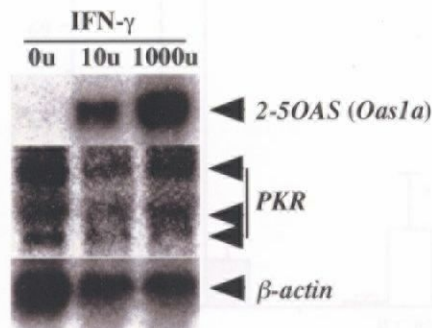


図2.4.2 *in vitro*におけるB16悪性黒色腫に対するIFN- γ の作用
IFN- γ 0, 1, 10, 100 units/ml存在下で培養したときのB16細胞の増殖(A)、およびIFN- γ 0, 10, 1000 units/ml存在下で24時間培養したときのB16細胞でのMHCクラスI (H-2K^b)とMHCクラスII (I-A^b) (B)、IFN誘導遺伝子2-5OASとPKRの発現(C)。MHCはFACScanで、IFN誘導遺伝子はノザンハイブリダイゼーション法で発現を確認した。なお、FACScanではバックグラウンドを紫色で示した。

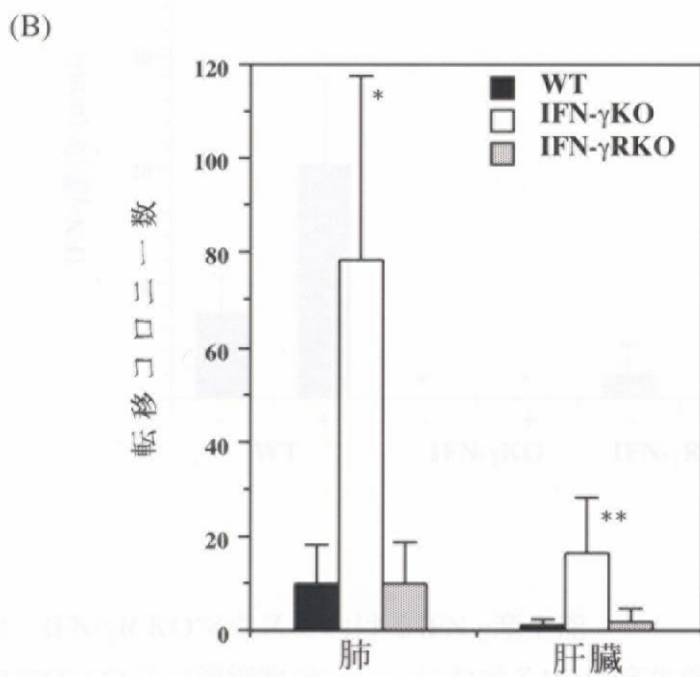
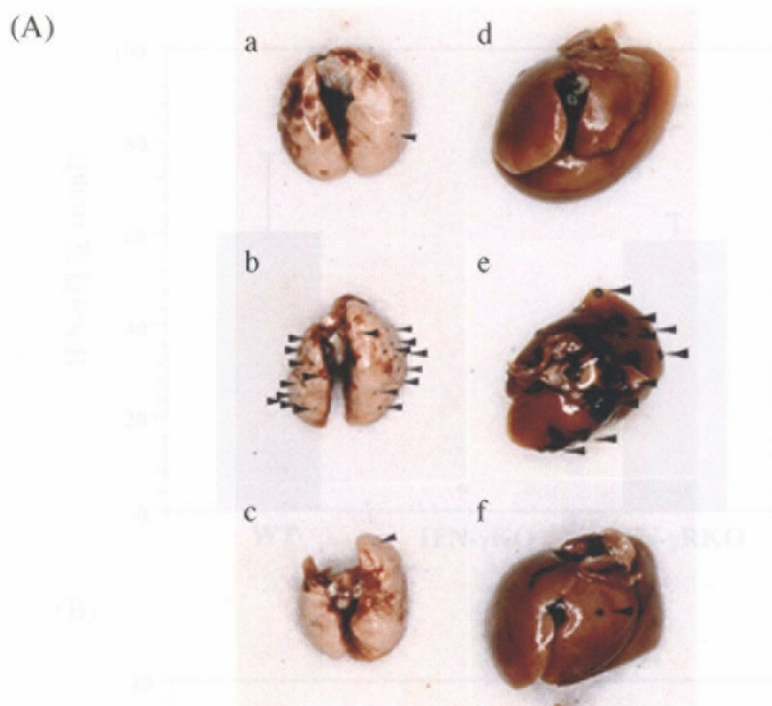
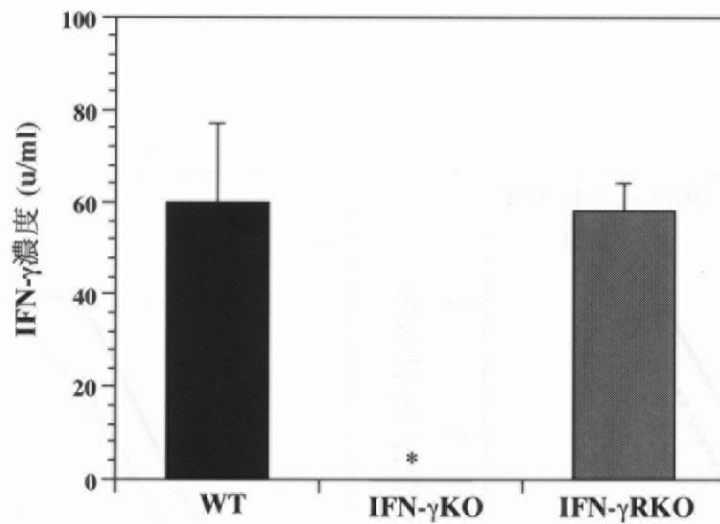


図2.4.3 IFN- γ KOおよびIFN- γ R KOマウスにおけるB16悪性黒色腫の実験的転移
 1×10^5 細胞のB16細胞を尾静脈内接種14日後のIFN- γ KO、IFN- γ R KO、野生型マウスの肺および肝臓

(A) 野生型 (a, d)、IFN- γ KO (b, e)、IFN- γ R KOマウス(c, f)の肺(a-c)および肝臓(d-f)の写真。矢頭はB16のコロニーを示す。

(B) 野生型、IFN- γ KO、IFN- γ R KOマウス(各n=7)の肺および肝臓へのB16の転移コロニー数。有意差 *: p<0.05, **: p<0.01

(A)



(B)

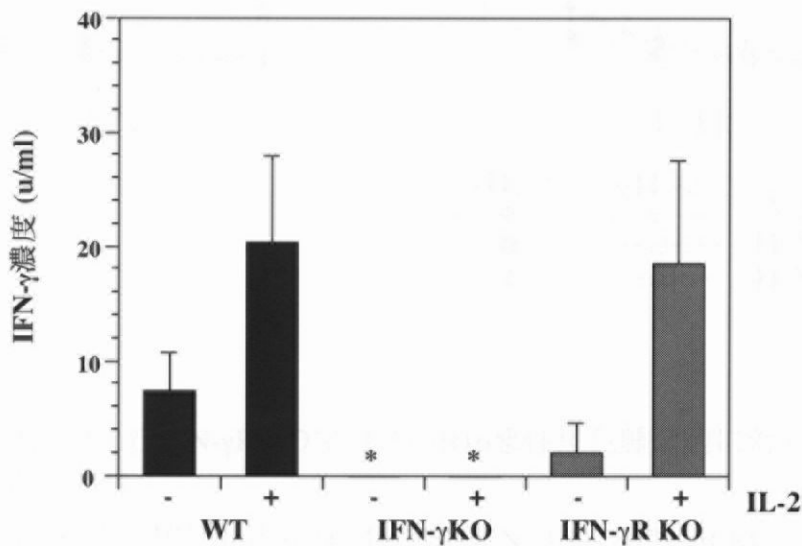


図2.4.4 IFN- γ R KOマウスにおけるIFN- γ 産生能

IFN- γ R KOマウスの脾細胞の*in vitro*におけるIFN- γ 産生能をELISA法により測定した。

(A) 野生型、IFN- γ KO、IFN- γ R KOマウスの脾細胞を抗TCR β 抗体で刺激したときのIFN- γ 産生量。

(B) 野生型、IFN- γ KO、IFN- γ R KOマウスの脾細胞を γ 線照射したB16細胞と96時間共培養したときのIFN- γ 産生量。培養液中に5units/mlのrIL-2を添加または非添加の2つの条件で行った。

*: 検出されず

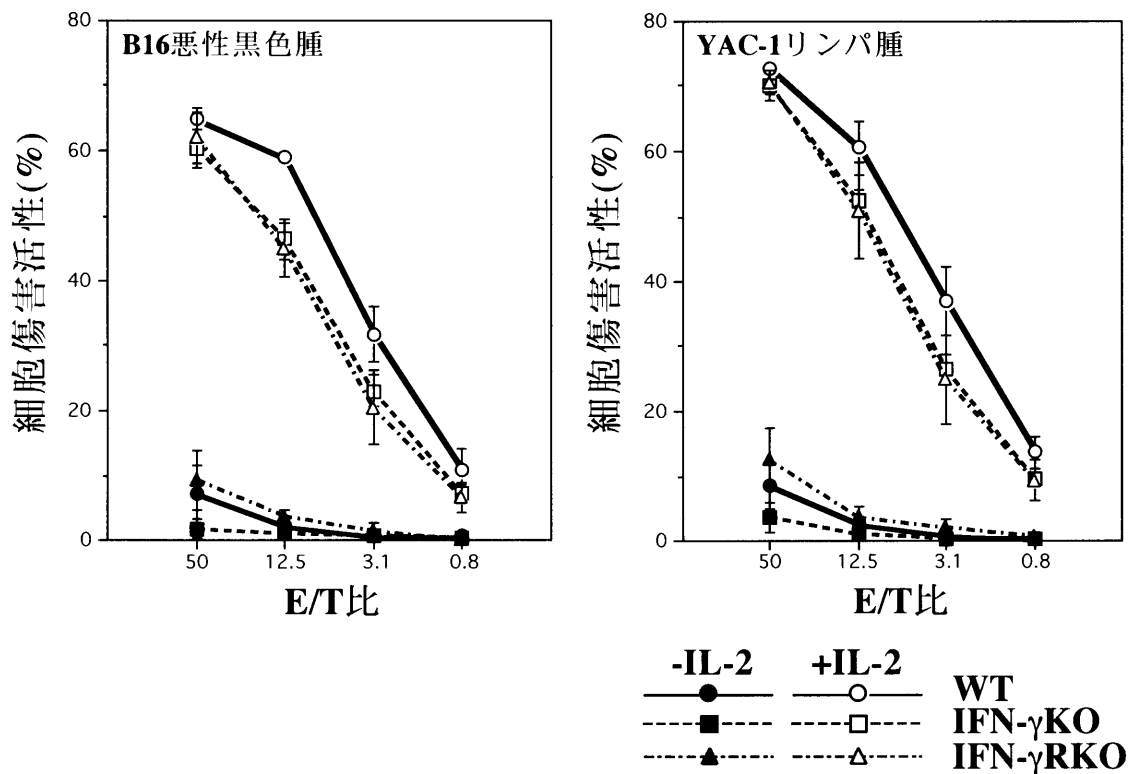


図2.4.5 IFN- γ KOおよびIFN- γ R KOマウスのB16悪性黒色腫細胞に対する細胞傷害活性

1 x 10⁵細胞のB16細胞を尾静脈内接種14日後のIFN- γ KO、IFN- γ R KO、野生型マウスより脾細胞を調製し、 γ 線照射したB16細胞と96時間共培することにより再刺激を加えたときの脾細胞のB16細胞およびYAC-1細胞に対する細胞傷害活性を示す。なお、培養液中に5units/mlのrIL-2を添加することにより刺激を増強した場合と非添加の2つの条件で行った。

エフェクターとターゲット細胞の比 (E/T比) は、50, 12.5, 3.1, 0.8の4段階とした。

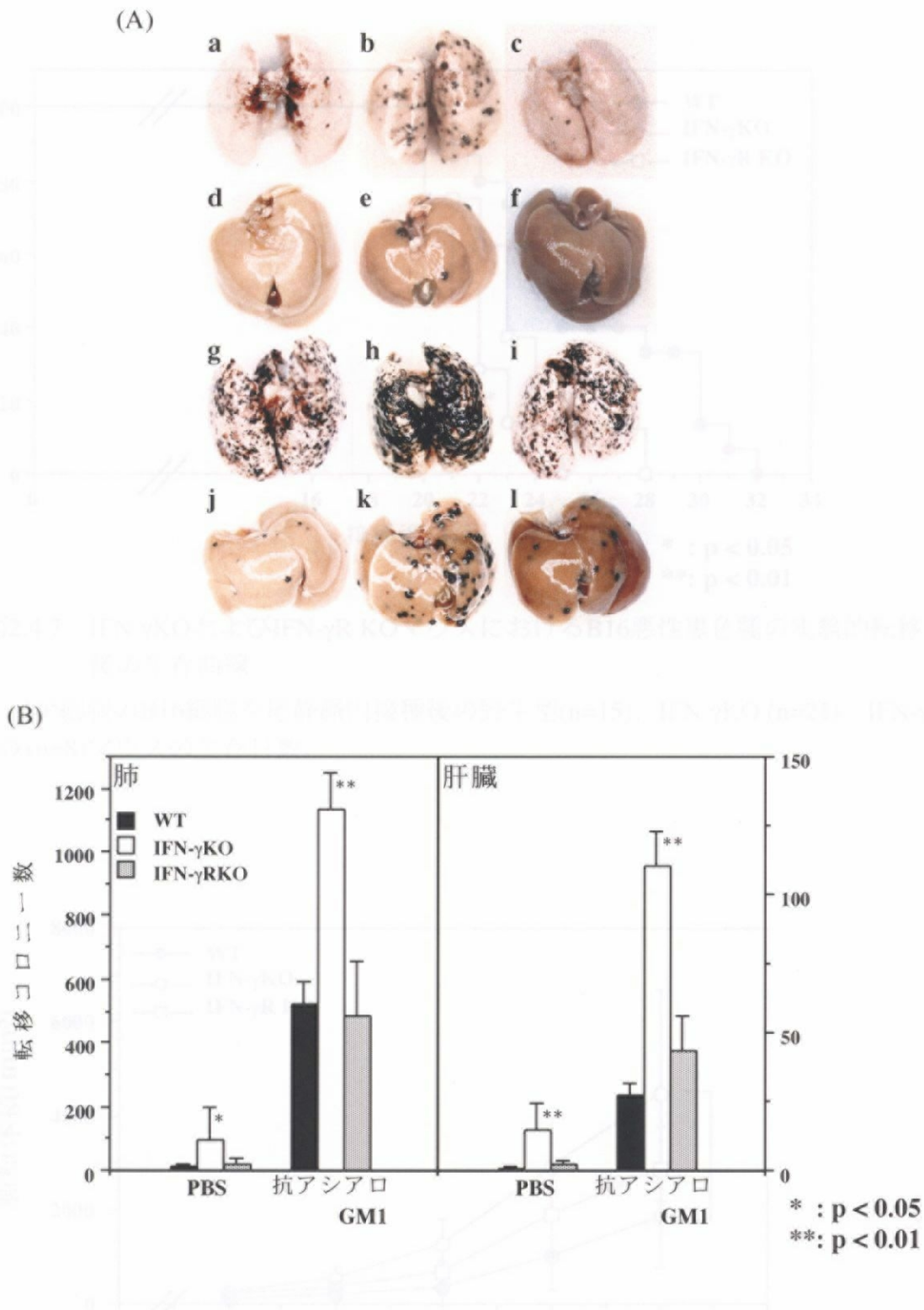


図2.4.6 抗アシアロGM1抗体処理によるNK細胞除去時のIFN- γ KOおよびIFN- γ R KOマウスにおけるB16悪性黒色腫の実験的転移
 抗アシアロGM1抗体またはPBS投与し、 1×10^5 細胞のB16細胞を尾静脈内接種14日後のIFN- γ KO、IFN- γ R KO、野生型マウスの肺および肝臓
 (A) 野生型 (a, d, g, j)、IFN- γ KO (b, e, h, k)、IFN- γ R KOマウス(c, f, i, l)の肺(a-c, g-i)および肝臓(d-f, j-l)の写真。抗アシアロGM1抗体処理(g-l)、および陰性コントロールとしてPBS投与(a-f)
 (B) 抗アシアロGM1抗体処理時の野生型、IFN- γ KO、IFN- γ R KOマウス(n=3~8)の肺および肝臓へのB16の転移コロニー数。

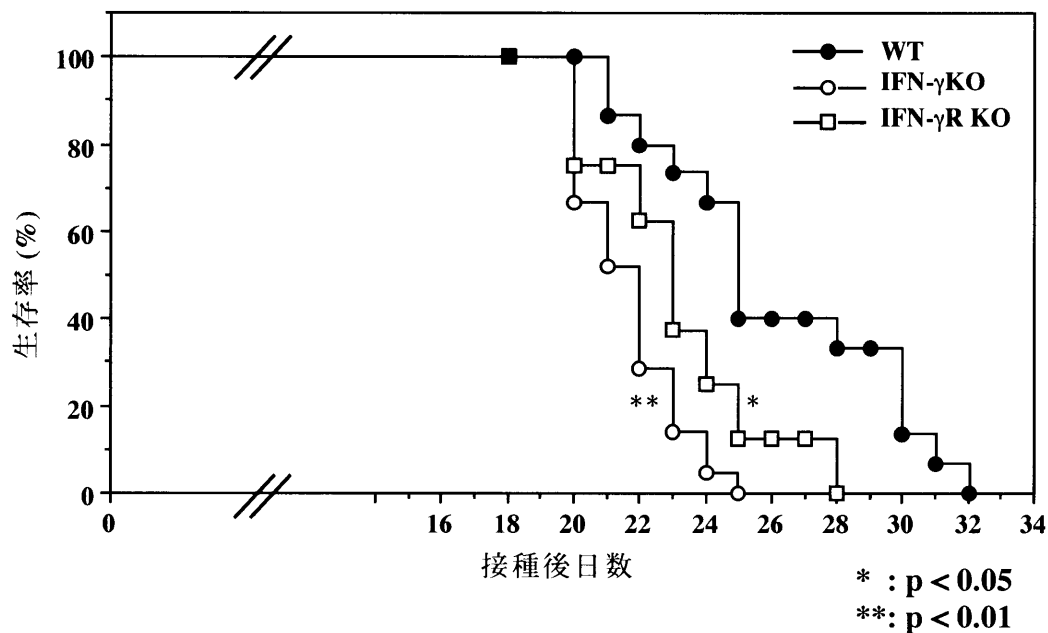


図2.4.7 IFN- γ KOおよびIFN- γ R KOマウスにおけるB16悪性黒色腫の実験的転移後の生存曲線

1 x 10⁵細胞のB16細胞を尾静脈内接種後の野生型(n=15)、IFN- γ KO (n=21)、IFN- γ R KO (n=8)マウスの生存日数。

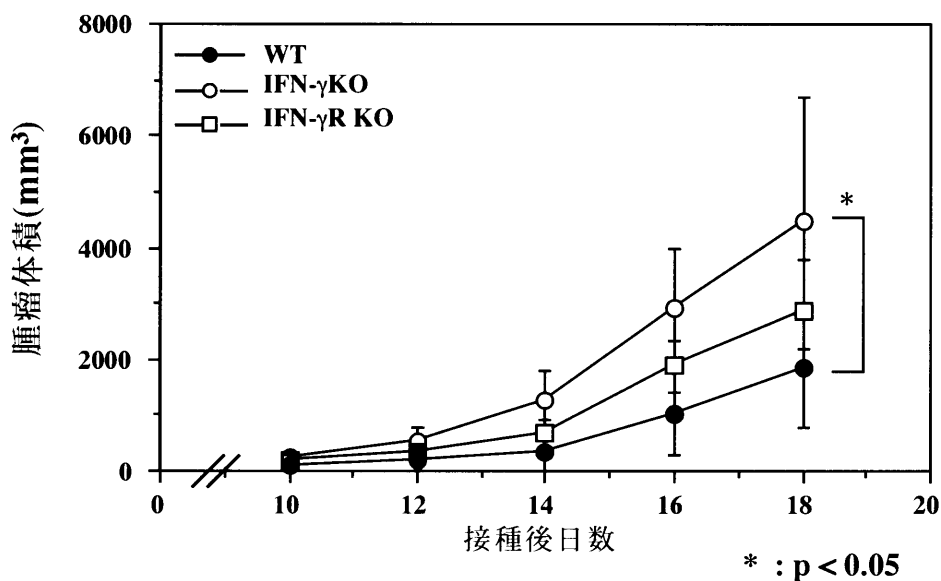


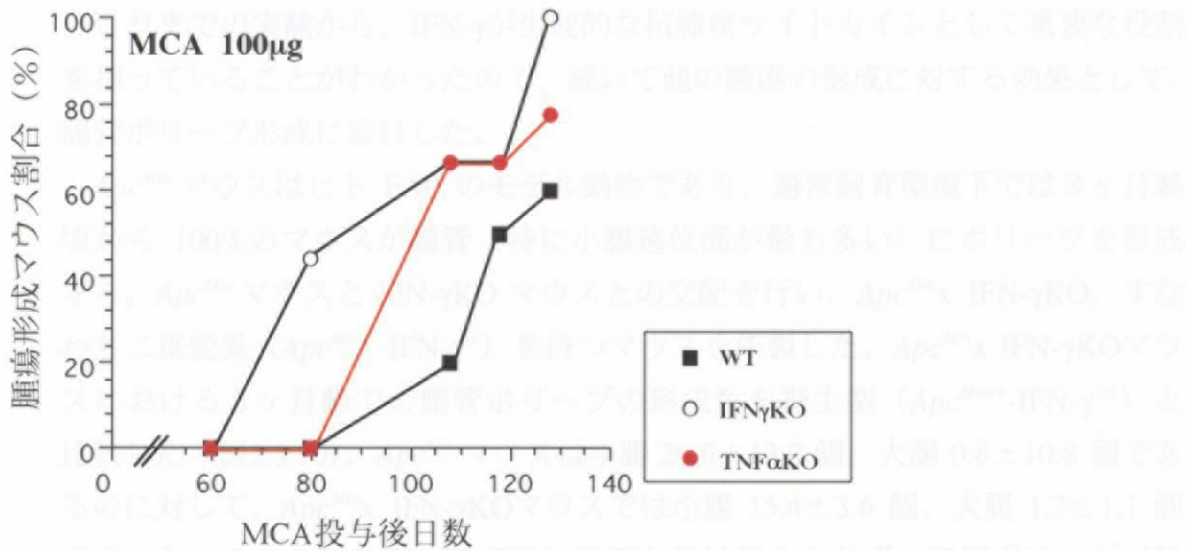
図2.4.8 IFN- γ KOおよびIFN- γ R KOマウスの皮下におけるB16悪性黒色腫の腫瘍形成速度

2 x 10⁵細胞のB16細胞を皮下接種後の野生型、IFN- γ KO、IFN- γ R KOマウス (各n=5)での腫瘍の体積の増加速度を示す。

MCA 投与による化学誘導発癌

続いて、腫瘍の発生過程からのサイトカインの作用を検討するために、化学発癌剤である MCA を KO マウスに投与することによって繊維肉腫 (fibrosarcoma) の誘導を行った。IFN- γ および TNF- α KO、野生型マウスの左脇腹の皮下にオリーブオイルに溶解した MCA を 100 μ g または 25 μ g 投与し、約 130 日間観察を行った。IFN- γ KO マウスでは Kaplan らの IFN- γ R KO マウスでの報告同様に腫瘍発生頻度の上昇および早期化が認められた (図2.3.9)。一方、TNF- α KO マウスは、実験 1 においては IFN- γ KO マウスほどではないものの、野生型マウスよりも腫瘍発生頻度の上昇が認められた。しかし、実験 2 においては有意な差は認められず、再現性は得られなかった。このことから、MCA 誘導発癌において TNF- α は発癌抑制にはほとんど作用していないことが明らかになった。

(A) 実験 1



(B) 実験 2

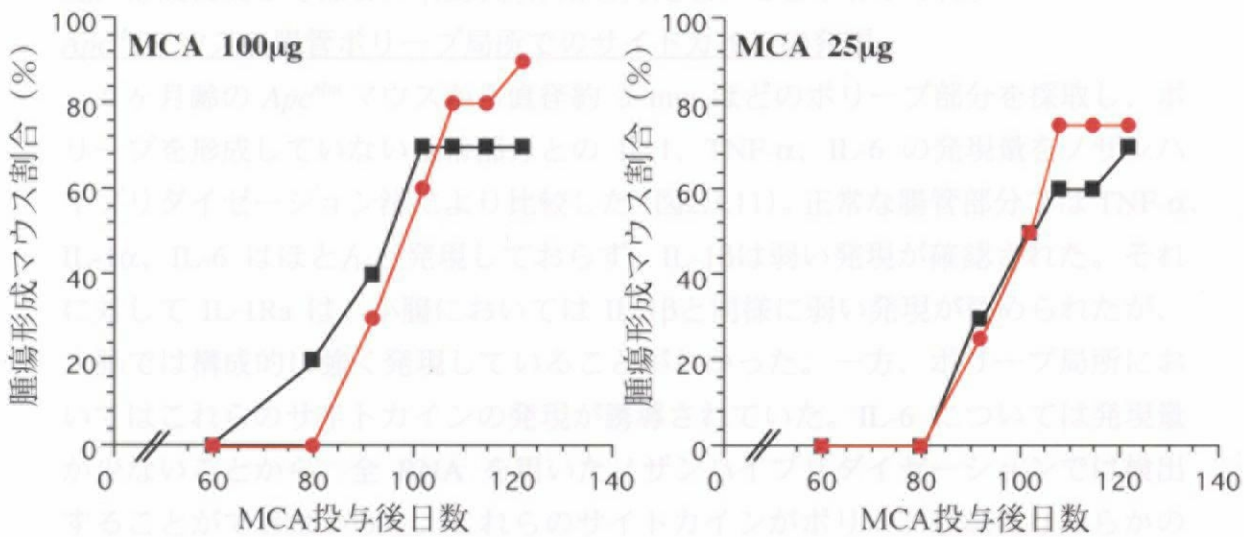


図2.4.9 IFN- γ KO、TNF- α KOマウスにおけるMCA誘導発癌実験

野生型、IFN- γ KO、TNF- α KOマウスの皮下にMCA 100 μ gまたは25 μ gを投与したときの腫瘍形成までにかかる日数を比較した。なお、腫瘍は5mm以上となったとき陽性と判定した。

実験 1 : 野生型マウス n=10、IFN- γ KOマウス n=10、TNF- α KOマウス n=9

実験 2 : 野生型マウス n=10、TNF- α KOマウス n=9 (100 μ g)、n=8 (25 μ g)

Apc^{Min}x IFN- γ KOマウスの腸管ポリープの形成

これまでの実験から、IFN- γ が生理的な抗腫瘍サイトカインとして重要な役割を担っていることがわかったので、続いて他の腫瘍の形成に対する効果として、腸管ポリープ形成に着目した。

Apc^{Min} マウスはヒト FAP のモデル動物であり、通常飼育環境下では3ヶ月齢頃から100%のマウスが腸管（特に小腸遠位部が最も多い）にポリープを形成する。*Apc*^{Min} マウスと IFN- γ KO マウスとの交配を行い、*Apc*^{Min}x IFN- γ KO、すなわち二重変異 (*Apc*^{Min/+}-IFN- γ ^{-/-}) を持つマウスを作製した。*Apc*^{Min}x IFN- γ KOマウスにおける3ヶ月齢での腸管ポリープの形成数を野生型 (*Apc*^{Min/+}-IFN- γ ^{+/+}) と比較した (図2.3.10)。*Apc*^{Min} マウスは小腸 20.6 \pm 13.2 個、大腸 0.8 \pm 10.8 個であるのに対して、*Apc*^{Min}x IFN- γ KOマウスでは小腸 15.4 \pm 3.6 個、大腸 1.2 \pm 1.1 個であった。このことから、両者間に顕著な差は認められず、腸管ポリープ（腺腫）形成に関しては IFN- γ は抑制作用を持たないことがわかった。

Apc^{Min}マウスの腸管ポリープ局所でのサイトカインの発現

6ヶ月齢の *Apc*^{Min} マウスから直径約 3 mm ほどのポリープ部分を採取し、ポリープを形成していない正常部分との IL-1、TNF- α 、IL-6 の発現量をノザンハイブリダイゼーション法により比較した (図2.3.11)。正常な腸管部分では TNF- α 、IL-1 α 、IL-6 はほとんど発現しておらず、IL-1 β は弱い発現が確認された。それに対して IL-1Ra は、小腸においては IL-1 β と同様に弱い発現が認められたが、大腸では構成的に強く発現していることがわかった。一方、ポリープ局所においてはこれらのサイトカインの発現が誘導されていた。IL-6 については発現量が少ないことから、全 RNA を用いたノザンハイブリダイゼーションでは検出することができなかった。これらのサイトカインがポリープ形成になんらかの影響を与えている可能性が示唆された。

Apc^{Min}x サイトカインKOマウスの腸管ポリープの形成

Apc^{Min} マウスを TNF- α KO マウス、IL-6 KO マウス、IL-1 α / β KO (IL-1 KO) マウス、IL-1Ra KO マウスとそれぞれ交配を行い、*Apc*^{Min}x TNF- α KO、*Apc*^{Min}x IL-6 KO、*Apc*^{Min}x IL-1 KO、*Apc*^{Min}x IL-1Ra KOマウスを作製した。*Apc*^{Min}x TNF- α KO、*Apc*^{Min}x IL-6 KOマウスの6ヶ月齢でのポリープの形成数は、野生型 *Apc*^{Min} マウスと有意な差は認められなかった (図2.3.12)。一方、*Apc*^{Min}x IL-1Ra KOマウスではポリープ形成の早期化が認められた。そこで、ポリープの大きさについても調べてみたところ、小腸において4ヶ月齢の時点で野生型 *Apc*^{Min} マウスの6ヶ月

月齢に相当するポリープの形成が認められた。さらに大腸においては顕著なポリープ形成の増加が認められた。これに対して、*Apc^{Min}*x IL-1 KO マウスでは *Apc^{Min}* マウスと有意な差は認められず、予想に反して、アゴニストとアンタゴニストで逆の結果にはならなかった (図 2.3.13)。これらの結果から、IL-1Ra は腸管ポリープの形成に対して抑制的に機能しているが、IL-1 の作用は他のサイトカインによって相補され得る可能性を示唆された。

*Apc^{Min}*x IL-1 KO、*Apc^{Min}*x IL-1Ra KOマウスのポリープについて組織切片を製作しHE染色を行い、組織学的な検討を行った (図2.3.14)。しかし、野生型 *Apc^{Min}* マウスに形成されたポリープとの間に顕著な差は認められず、*Apc^{Min}*x IL-1Ra KO マウスで特に悪性化が進んでいるということはなかった。

*Apc^{Min}*x IL-1 KO、IL-1Ra KO マウスの腸管ポリープ局所での遺伝子発現

ポリープ形成において特にプロモーションのステージで悪性化に関与し、また IL-1 によって強力に誘導されることが知られている *COX-2* mRNA の発現をノザンハイブリダイゼーション法で検討した。野生型、IL-1 KO、IL-1Ra KOマウスの正常腸管組織では *COX-2* mRNA の発現量が低く、また、特に差を認めることはできなかった (図2.3.15A)。

*Apc^{Min}*x IL-1 KO、*Apc^{Min}*x IL-1Ra KOマウスにおける腸管およびポリープ形成局所での遺伝子発現について検討した (図2.3.15B)。ポリープ形成に従って *COX-2* mRNA の発現は誘導される。IL-1Ra KO で発現の増強は認められたものの、IL-1 KO マウスではそれ以上に発現が増強されており、IL-1Ra KO マウス特異的な発現増強ではなかった。TNF- α の発現が IL-1 KO マウスで特に増強されており、TNF- α による代償が示唆された。これに対してポリープ形成促進に機能する分子として知られている核内受容体 PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) γ の発現は、IL-1Ra KO マウスで特に増強していた。このことから、IL-1Ra KO マウスにおけるポリープ形成の促進は PPAR γ の発現誘導による可能性が示唆された。

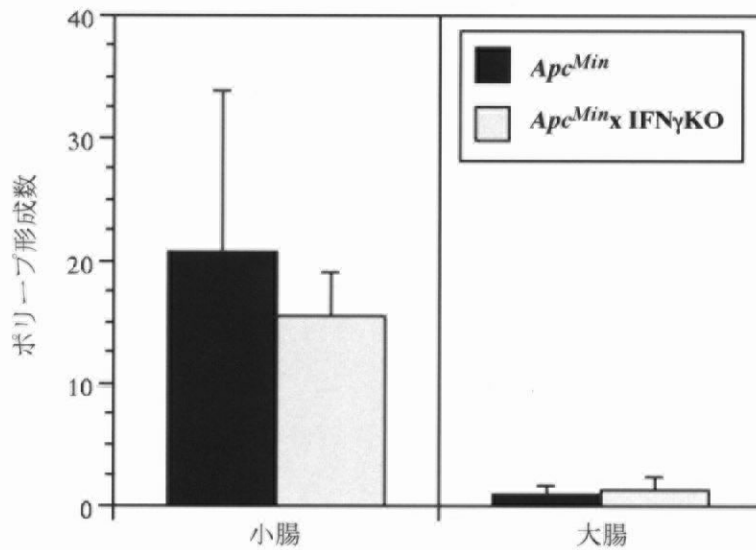


図2.4.10 *Apc^{Min}x IFN- γ KO*マウスにおけるポリープ形成
Apc^{Min}、*Apc^{Min}x IFN- γ KO*マウスの3ヶ月齢での腸管ポリープの形成数。
*Apc^{Min}*マウス n=5、*Apc^{Min}x IFN- γ KO*マウス n=5
 両者の間に有意な差は認められない。

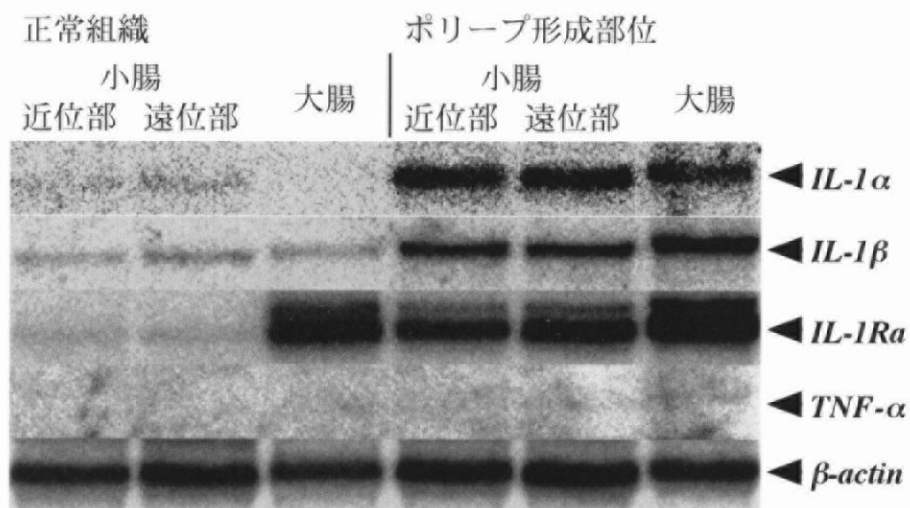


図2.4.11 *Apc^{Min}*マウスのポリープ形成部位でのサイトカイン遺伝子の発現
 6ヶ月齢の*Apc^{Min}*マウスにおける腸管の正常部分とポリープ形成部位から
 全RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションによりIL-1 α 、IL-1 β 、IL-
 1Ra、TNF- α 遺伝子の発現を検討した。

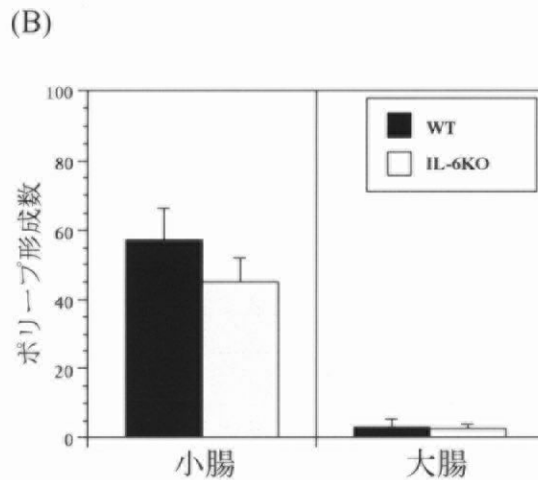
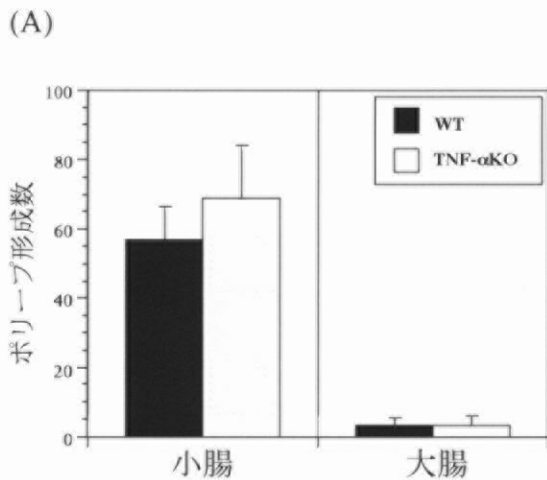


図2.4.12 Apc^{Min} $TNF-\alpha$ KO、 Apc^{Min} IL-6 KOマウスにおけるポリープ形成
 (A) Apc^{Min} マウス(n=7)および Apc^{Min} $TNF-\alpha$ KOマウス(n=5)、(B) Apc^{Min} マウス(n=7)および Apc^{Min} IL-6 KOマウス(n=3)の6ヶ月齢での腸管ポリープの形成数。両者の間に有意な差は認められない。

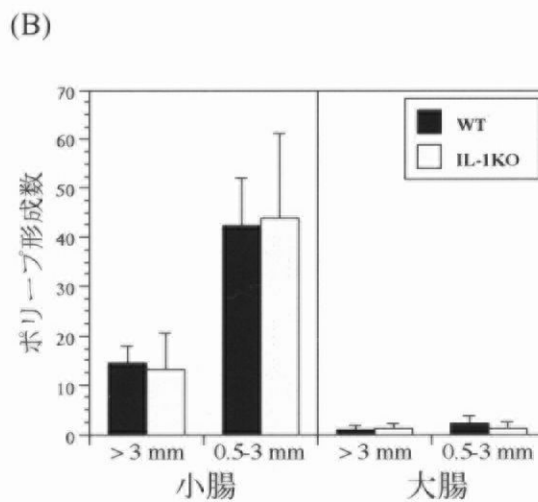
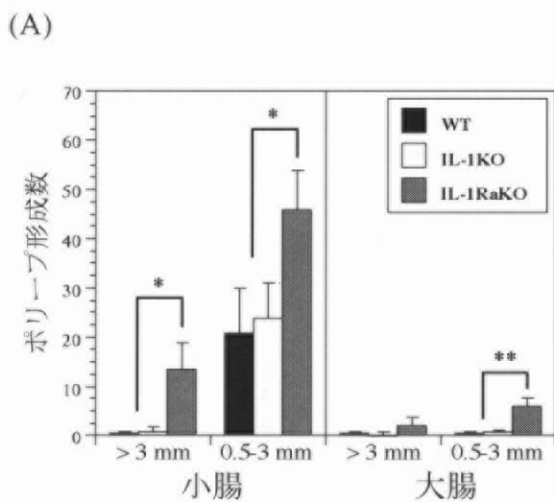


図2.4.13 Apc^{Min} IL-1 KO、 Apc^{Min} IL-1Ra KOマウスにおけるポリープ形成
 (A) 4ヶ月齢における Apc^{Min} マウス(n=3)、 Apc^{Min} IL-1 KOマウス(n=4)、 Apc^{Min} IL-1Ra KOマウス(n=3)および、(B) 6ヶ月齢における Apc^{Min} マウス(n=7)、 Apc^{Min} IL-1 KOマウス(n=5)の腸管ポリープの大きさ別の形成数。
 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$

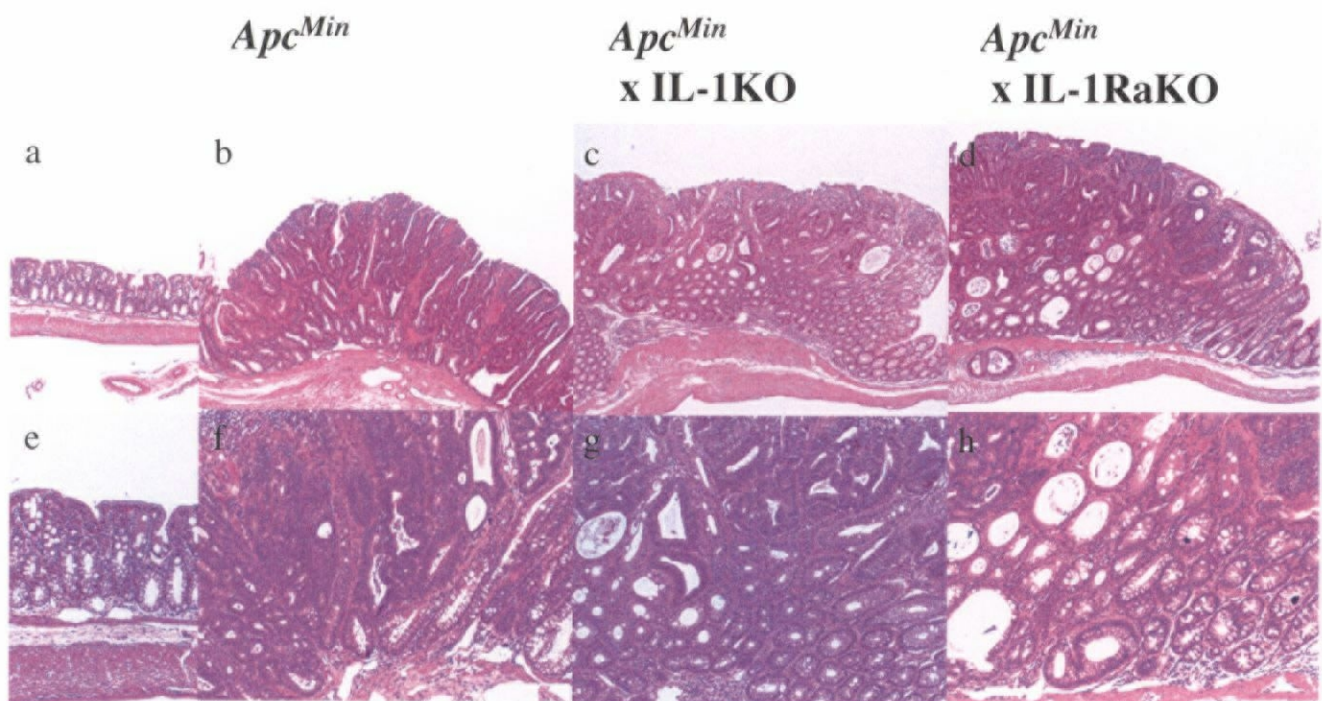
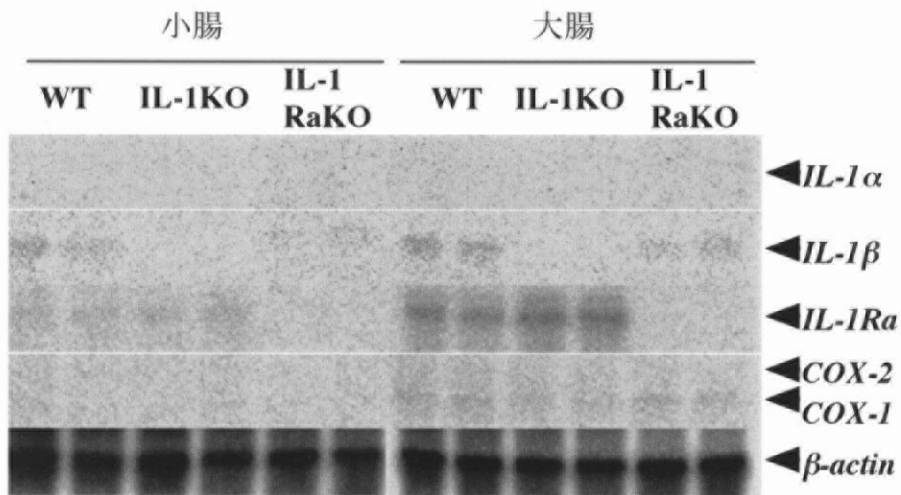


図2.4.14 *Apc^{Min} x IL-1 KO*、*Apc^{Min} x IL-1Ra KO*マウスの大腸ポリープの組織学的検討

Apc^{Min} (a, b, e, f)、*Apc^{Min} x IL-1 KO* (c, g)、*Apc^{Min} x IL-1Ra KO* (d, h)マウスの大腸に発生した直径が約3mmの大きさのポリープ(b-d, f-h)および正常粘膜(*Apc^{Min}*; a, e)のHE染色切片。腺腫の異形性に大きな差は認められない。a-d; x 40, e-h; x 100

(A)



(B)

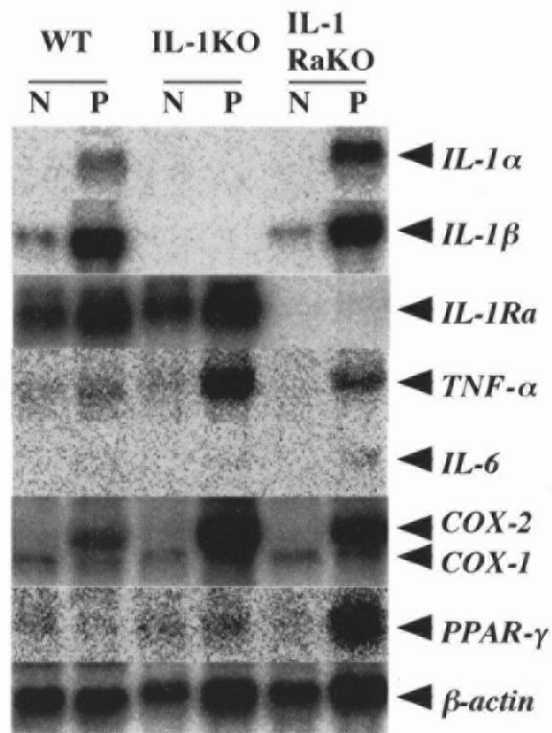


図2.4.15 *Apc^{Minx}* IL-1 KO、*Apc^{Minx}* IL-1Ra KOマウスのポリープ形成部位における遺伝子発現の検討

(A) 野生型およびIL-1 KO、IL-1Ra KOマウスの正常な腸管におけるCOX-2遺伝子の発現。(B) *Apc^{Min}*、*Apc^{Minx}* IL-1 KO、*Apc^{Minx}* IL-1Ra KOマウスの大腸ポリープ形成部位でのサイトカイン、COX-2、PPAR γ 遺伝子の発現。全RNAを用いたノザンハイブリダイゼーションを行った。

2.5 考察

本研究では各種サイトカイン KO マウスを用いて、内因性サイトカインの腫瘍に対する役割を検討し、免疫監視機構における IFN- γ の重要性と腸管上皮細胞の腺腫（ポリープ）形成における IL-1 システムの関与を明らかにした。

IFN- γ によるB16悪性黒色腫細胞の実験的転移の抑制

悪性黒色腫は皮膚に生じるがんの中でも最も悪性度の高いがんとして知られているが、B16 悪性黒色腫細胞株はそのマウスモデルとしてよく利用されている腫瘍細胞株である。B16 悪性黒色腫は、本研究でも明らかにした（詳細は後述）ように免疫原性が非常に低いことから CTL のターゲットになりにくい、MHC の発現が低いことから NK 細胞のターゲットになりやすいという特徴を持った腫瘍系である。B16 悪性黒色腫を用いた実験的転移は、このような特徴を持ったがん細胞に対する免疫的監視機構を評価することができる。今回検討したサイトカイン（IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 α/β 、IL-1Ra）KO マウスでは、B16 悪性黒色腫の実験的転移に影響が認められたのは IFN- γ KOマウスだけであり、それ以外は野生型マウスと差が認められなかった。このことから、IFN- γ 以外のサイトカインは B16 細胞の排除にはほとんど関与していないことが明らかになった。その一方でこの結果は、IFN- γ は抗腫瘍サイトカインとして重要な役割を担っていることを示している。

これまで、IFN- γ 投与による抗腫瘍効果としては、NK 細胞やマクロファージの活性化などの宿主の免疫系に対する作用や、腫瘍細胞そのものに対する増殖抑制作用およびアポトーシスの誘導作用などが報告されていた(128) (30) (92) (18, 123) (1) (37)。しかし、自然状態における個体の抗腫瘍機構の中で、IFN- γ がどのような役割を果たしているのかについては、これまで知られていなかった。そこで、IFN- γ のリガンドおよび受容体の KO マウスを用いて B16 悪性黒色腫の実験的転移をモデルとした IFN- γ の抗腫瘍機構における役割について検討し、IFN- γ RKO マウスでは野生型と変わらないことを明らかにした。このことにより、B16 悪性黒色腫の実験的転移の抑制においては IFN- γ は B16 細胞に対して直接作用することが重要であり、宿主側の IFN- γ 受容体を介した免疫系の活性化は特に必要でないことがわかった。一方で、転移後の生存日数および皮下での腫瘍形成速度には、宿主側の IFN- γ 受容体を介したシグナルが影響を与える

ことがわかった。

これらの結果は、*in vivo* における IFN- γ の腫瘍抑制には少なくとも2つの異なるメカニズムが存在していることを示唆している。すなわち、IFN- γ は、転移の初期段階においては B16 細胞に直接作用することにより転移阻止に働き、定着後の腫瘍形成段階では直接作用と宿主側の抗腫瘍機能を活性化することによる間接的な作用の両方を介して抑制していると考えられる。

最近、B16 細胞に IRF (interferon regulatory factor) -2 を過剰発現させることにより IFN- γ に対して非感受性にした状態で皮下に腫瘍を形成させると増殖速度が亢進することから、B16 の抑制には内因性の IFN- γ の直接の作用が重要であるという報告が Yim らによってなされた(132)。しかしながら、腫瘍形成のみで転移については検討していないこと、NK 細胞や CTL などの宿主側の免疫系の抑制機構についても検討していないことなどが、本研究と異なっていた。この点でも、本研究が内因性の IFN- γ が腫瘍細胞に直接作用することにより転移抑制に機能していることの最初の報告であると考えられる。

免疫系の抑制機構として、従来 NK 細胞が転移抑制に重要な役割を果たしていることが報告されていた(121)が、実際、本研究においても抗アジアロ GM1 抗体処理によって NK 細胞を除去したところ、やはり大幅に転移数の増加が認められ、NK 細胞がこの系においても転移抑制に大きな役割を果たしていることがわかった。このときの転移数の増加は IFN- γ KOマウスでの転移数の増加よりもはるかに大きいことから、B16 細胞の排除の主要なエフェクターは NK 細胞であり、IFN- γ のエフェクターとしての作用は NK 細胞のそれよりは小さいことを示している。また、抗アジアロ GM1 抗体処理の効果は、IFN- γ KO、IFN- γ R KO において未処理の場合に比較して相加的であったことから、IFN- γ の産生および IFN- γ による活性化の点で、NK 細胞と IFN- γ は独立した関係にあることが示唆され、以下のように考察できる。

まず、NK 細胞の IFN- γ の産生細胞としての機能について。Chediak-Higashi 症候群のモデルマウスである *beige* マウス(6)は、細胞内顆粒形成異常により NK 細胞の細胞傷害機能が欠損しているものの、NK 細胞自体は存在している。この *beige* マウスにおける B16 細胞の実験的転移数は、抗アジアロ GM1 抗体処理により NK 細胞を欠失させた野生型と差がないという報告がある(38)。このことは、アジアロ GM1 陽性細胞以外の細胞によって産生された IFN- γ が抗腫瘍に作用していることを示唆しており、本研究での、IFN- γ KO マウスに抗アジア

口 GM1 抗体処理をすると相加的な転移数の亢進がみられるという結果と一致する。生理的条件とは異なるが、V α 14NKT 細胞欠損マウス (TCR J α 281 鎖 KO マウス) や TCR V α 14J α 281 α 鎖トランスジェニックマウスを用いての検討から、B16 細胞を脾臓内接種し、優先的に肝転移させたときの IL-12 投与による IFN- γ 産生細胞は、V α 14NKT 細胞であると報告されている(21)。V α 14NKT 細胞はアシアロ GM1 陰性であることから、生理的条件でも IFN- γ の産生に V α 14NKT 細胞が関与している可能性があり、今後検討する必要があると思われる。

次に、IFN- γ による NK 細胞の活性化について。これまでにも、IFN- γ KO マウスでは、未刺激状態での NK 細胞の細胞傷害活性は野生型よりも低い値を示すものの、I 型 IFN の誘発物質であるポリ I:C 刺激を加えた場合は NK 細胞の活性化作用が代償され、必ずしも IFN- γ を必要としないと報告されている(23)。また、IFN- γ R KO マウスでも、同様に I 型 IFN で代償可能との報告がある(49)。これらの事実は、IFN- γ が NK 細胞の活性化に必須でないことを示しており、IFN- γ R KO マウスの場合は野生型マウスと同じだけの B16 細胞の転移が認められるという事実とよく一致する。実際、本研究における *in vitro* における B16 細胞に対する細胞傷害活性の測定結果 (図 2.3.5) から、IFN- γ KO、IFN- γ R KO マウスは野生型とほぼ同等な NK 細胞の活性化が認められている。

IFN- γ の作用として MHC の発現誘導を介した抗原提示能の増強を行うことが知られている(2, 115)。腫瘍細胞に IFN- γ が作用して癌特異抗原の提示を誘導し、免疫系による認識・排除を促進させる。実際、IFN- γ によるメチルコラントレン誘導腫瘍細胞の免疫原性を規定していることが報告されている(27, 59) (詳細は後述)。B16 細胞に対しても、IFN- γ は MHC クラス I である H-2K^b を誘導する (図 2.3.5B) が、IFN- γ の有無に関係なく B16 細胞特異的 CTL の誘導はほとんど認められなかった。B16 細胞にウイルス抗原を発現させることにより免疫原性を増強させた場合は、IFN- γ 誘導 MHC 依存的に特異的 CTL の誘導が認められることが報告されており(9)、B16 細胞は癌特異抗原が同定されてはいるものの(8)、免疫原性が非常に低いために B16 細胞特異的 CTL の誘導はほとんど認められないことを示している。

IFN- γ の B16 細胞に対する直接の作用として、*in vitro* で強い増殖抑制作用を示すことが知られている。細胞増殖抑制機構を担う分子としては代表的なものに PKR や 2-5OAS が知られている。PKR は、タンパク翻訳開始因子 eIF-2 の α サブユニットをリン酸化することにより不活化させ、結果としてタンパク合成

を阻害し(94)、2-5OAS は RNase L の活性化を調節することにより RNA の分解を促進させ、結果として細胞増殖を抑制する(44)。PKR はそのドミナントネガティブ変異体を過剰に発現させると細胞が悪性化することが知られている(4, 66)。2-5OAS は細胞に過剰発現させることにより増殖速度が低下するとの報告がなされている(104)。実際、B16 細胞に IFN- γ を作用させたときのこれらの遺伝子発現を調べたところ、PKR には発現誘導が認められなかったが、2-5OAS は強力に誘導されており、2-5OAS の細胞増殖抑制への関与が予想された。またその他にも、IFN- γ には、必須アミノ酸トリプトファンの代謝酵素 IDO の誘導や(91)、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS: inducible nitric oxide synthase) を介して産生される一酸化窒素によるアポトーシスの誘導(71)、並びに「death domain」を有する新規キナーゼ・DAP キナーゼによるアポトーシスの誘導などが他の腫瘍細胞で報告されている(25, 52)。DAP キナーゼの場合、ヒトの B 細胞白血病をはじめとする多くの癌で、高頻度に DAP キナーゼが欠損していることが報告されている(63)。従って、IFN の直接作用としての抗腫瘍作用のメカニズムにも多くの経路が存在することが推察され、これらは腫瘍細胞の種類によって異なることが予想される。そこで、これらの遺伝子の中で解析があまり進んでいない 2-5OAS に着目して、その抗腫瘍作用を含めた機能を解析するために KO マウスを作製し (第 2 章)、今後解析を進める予定である。

本研究の B16 悪性黒色腫の実験的転移において、IFN- γ R KO マウスは野生型マウスよりも有意に生存日数が短くなり、また皮下腫瘍を形成させた際には、有意ではないものの、増殖速度が速まる傾向が認められている。肺と肝臓に転移した B16 のコロニー数には IFN- γ R の欠損は影響を与えていないことから、転移初期には IFN- γ による直接作用のみで十分であるが、腫瘍塊が成長してくる後期には IFN- γ R を介した宿主側の抗腫瘍機構の活性化も関与していると結論できる。この観点での IFN- γ の作用としては、免疫担当細胞の腫瘍局所への遊走や腫瘍塊形成促進に必要とされる血管新生を抑制することなどが考えられる。実際、IFN- γ によって誘導される IP-10 などのケモカインがこれらの作用を持っていることが報告されている(18, 123)。これらのことから、IFN- γ の抗腫瘍作用は腫瘍形成のステージによって異なるメカニズムによって行われていると考えられる。

MCA 投与による化学誘導発癌

化学発癌剤である MCA の皮下投与による繊維肉腫を KO マウスで誘導することにより、IFN- γ と TNF- α の発癌防御における関与を検討した。

MCA 誘導発癌における IFN- γ の役割は、Schreiber らの研究グループによって既に明らかにされていた。IFN- γ R KO マウスは MCA 誘導発癌に対して高感受性であること、このマウスから樹立した IFN- γ R⁻の繊維肉腫細胞に IFN- γ R cDNA を導入することにより再構築した腫瘍の移植実験を行うと、再構築した繊維肉腫細胞のみが拒絶されること、さらにこの拒絶は T/B 細胞を欠損する RAG1 (recombination-activating gene-1) KO マウスでは認められないことが報告されている(59)。すなわち、免疫原性の高い繊維肉腫細胞に対して、IFN- γ が腫瘍細胞上の IFN- γ 受容体を介して MHC などの発現を誘導することにより癌特異抗原の提示能を上げ、結果として腫瘍細胞特異的 CTL の誘導を促進することにより拒絶を行っていることが示されている。また、RAG2 遺伝子と STAT1 遺伝子のダブル KO マウスを用いた MCA 誘導発癌では、それぞれの単独 KO マウスと有意な差は認められないことから、リンパ球依存性と IFN- γ 依存性の腫瘍抑制機構は大きく重複していることが示唆されている(108)。

TNF- α は繊維芽細胞の増殖を促進する作用を有していること、免疫担当細胞の遊走や活性化に関与していることなどから、MCA 誘導発癌においては抑制・促進のどちらにも機能している可能性が考えられた。しかし、TNF- α KO マウスでは2度の MCA 誘導発癌試験で再現性のある肉腫発生頻度の上昇が認められなかったことから、TNF- α は MCA 誘導発癌の抑制において IFN- γ のように重要な因子ではないと判断した。以上のことから、TNF- α KO マウスでのこれ以上の解析は行わなかった。

MCA 誘導発癌は、IFN- γ による腫瘍細胞の癌特異抗原の提示能の上昇による免疫担当細胞の活性化が抑制に重要であることが証明されているが、B16 細胞で認められたような IFN- γ による直接の増殖抑制作用がどれほど関与しているかについてはよくわかっていない。IFN- γ による直接の増殖抑制作用のメディエーターの一つである 2-5OAS 遺伝子 KO マウスを作製した(第2章)ので、今後、このマウスを利用して MCA 誘導発癌における IFN- γ による直接の増殖抑制作用の関与を検討したいと考えている。

Apc^{Min} マウスの腸管ポリープ形成におけるサイトカインの役割

遺伝子の変異による自然発症としてヒト FAP のモデルである Apc^{Min} マウスにおける腸管ポリープ形成に着目した。APC 遺伝子は FAP の原因遺伝子として単離同定された遺伝子であるが、同時に非遺伝性・散発性の大腸癌や腺腫においても高頻度に体細胞レベルでの変異が認められることから、大腸腺腫の抑制遺伝子であることが証明されている(81, 95)。このことから、Apc^{Min} マウスの腸管ポリープ形成に影響を与える因子は、一般的な大腸癌の発生に影響を与える因子として考えることができる。そこで、本研究ではサイトカイン KO マウスと交配することによって検討を行ったところ、IFN- γ はほとんど影響を与えず、IL-1Ra が抑制因子として重要な役割を担っていることがわかった。

IFN- γ は抗腫瘍“エフェクター”サイトカインとして重要であることが、本研究を含めてこれまでの研究で明らかになっている。IFN- γ は NK 細胞や、NKT 細胞、T 細胞などのリンパ球系細胞が産生するサイトカインであり、これらの細胞による腫瘍に対する免疫監視機構に重要な役割を担っていると考えられている(108)。これに対してポリープ形成については、T/B 細胞を欠損する SCID (severe combined immunodeficiency disease)や NK 細胞の機能異常を呈する beige 変異を Apc^{Min} マウスに導入しても差は認められないことから、ポリープ形成に免疫系は特に抑制的な働きを持っていないことが証明されている(28, 29)。Apc^{Min}x IFN- γ KOマウスではポリープ形成の亢進が特に認められないという結果は、ポリープ形成抑制に免疫系が関与していないという結果と一致する。すなわち、腸管上皮細胞が腺腫となるステージは免疫学的には“異常”と認識されていないと考えられ、IFN- γ は作用し得ないと思われる。その一方で、Apc^{Min} マウスは腺腫が悪性化して腺癌となる前に、物理的な腸管の機能障害や高度の貧血のために個体が死亡してしまう。そのため、腺腫から腺癌への進展には IFN- γ (免疫系) が抑制に関与する可能性については否定できない。

これまでに、ヒトでのアスピリン常用者の罹患率が低いという疫学調査の結果や、Apc^{Min} マウスや Apc KO マウスでの COX-2 特異的阻害剤を用いた実験、または Cox-2 KO マウスとの交配実験から、腸管ポリープの形成および大腸癌の発症に COX-2 が関与していることが示されていた(87)。また、最近、プロスタグランジン受容体 KO マウスとの交配実験から、COX-2 によって産生が誘導された PGE₂ が EP2 (prostaglandin E₂ receptor type II) を介して血管新生誘導サイトカインである VEGF (vascular endothelial growth factor) などを誘導するこ

とによりポリープの形成促進に働いていることが明らかになるなど(113)、COX-2 とポリープ形成の関係については詳細な研究がなされる一方で、COX-2 の誘導のメカニズムについてはほとんど研究されていなかった。本研究において、ポリープ局所で TNF- α や IL-1 などのサイトカイン遺伝子の発現が認められることが明らかになったこと、さらには TNF- α や IL-1、IL-6 は COX-2 を強く誘導するサイトカインとして知られていることから、腸管ポリープ形成促進に関与する可能性が考えられた。そこで、KO マウスを用いて検討を行ったが、*Apc^{Min}* x TNF- α KO、*Apc^{Min}* x IL-1 α / β KO、*Apc^{Min}* x IL-6 KO マウスではそれぞれ野生型 *Apc^{Min}* マウスと差が認められなかった。その一方で、IL-1 の内因性抑制物質である IL-1Ra の KO マウスではポリープ形成の亢進が認められたことから、少なくとも IL-1Ra がポリープ形成抑制に機能していることがわかった。また、IL-1 KO マウスのポリープ局所では TNF- α の産生が亢進していることなどから、IL-1 の機能は TNF- α などの他のサイトカインで相補される可能性が示唆された。しかし、ポリープ局所での COX-2 の産生誘導を検討したところ、IL-1Ra KO マウスで発現増強が認められたものの、野生型と同じ形成能を示した IL-1 KO マウスでも発現増強が認められた。TNF- α KO、IL-6 KO マウスのポリープ局所でも同様であった（データ示さず）。このことは、COX-2 の誘導にこれらサイトカインが関与していない可能性を示している。COX-2 の誘導因子は、これ以外のサイトカインなのか、それともサイトカインとは全く別の要因（細胞が過密になることからくる栄養・酸素供給不足のストレスなど）なのかを検討することが今後の課題である。また、IL-1Ra KO マウスでのポリープ形成の亢進は COX-2 の経路を介しているかを明らかにするために、COX-2 阻害剤 sulindac 投与により抑制できるかを検討する予定である。

当初、脂肪細胞の分化と脂肪酸代謝の調節因子として同定された核内受容体 PPAR γ は、その特異的合成アゴニストであるトログリタゾンやチアゾリジン誘導体を *Apc^{Min}* マウスに投与した実験から、ポリープ形成に促進的に機能していることが報告されている(73, 103)。今回、*Apc^{Min}* x サイトカイン KO マウスのポリープ局所での PPAR γ の発現をノザンハイブリダイゼーションにより検討したところ、IL-1Ra KO マウスでは発現が強く亢進していることが明らかになった。PPAR γ は IL-1 β による iNOS や PDGF (platelet-derived growth factor) - α 受容体遺伝子の誘導を妨げる(31, 120)。一方、IL-1 β による平滑筋細胞での type II-sPLA $_2$ 遺伝子の発現誘導には、転写因子 NF- κ B (nuclear transcription factor κ B) と協調

的に働き促進する (19)など、IL-1 シグナリングと PPAR γ の間には複雑なクロストークがあることが知られている。しかし、IL-1 が PPAR γ の発現を調節しているという報告はこれまでなされていない。実際、正常腸管での PPAR γ の発現には野生型と IL-1Ra KO マウスとの間で有意な差は認められなかったことから、ポリープ形成時の IL-1 による PPAR γ の発現誘導は間接的である可能性も考えられる。また、IL-1Ra KO マウスのポリープでの組織学的な検討では野生型と顕著な差は認められなかったが、このことは *Apc^{Min}* マウスに PPAR γ の特異的合成アゴニスト投与した場合も組織学的な差は認められなかったという報告(103)と一致する。しかし、PPAR γ の腸管上皮細胞での役割については未知であることから、IL-1Ra と PPAR γ の関係および PPAR γ の腸管上皮細胞での機能を解明することが、今後の研究課題である。

最近、IL-1RI KO マウスの腸管上皮細胞では、陰窩での増殖亢進および絨毛先端でのアポトーシス亢進（結果として異常は認められていないが）が報告されており(130)、IL-1 システムが腸管上皮細胞の調節に関与していることが示唆されている。本研究でも IL-1Ra は腸管上皮細胞（特に大腸）で構成的に強く発現していることを明らかにした。今後、IL-1 KO マウスおよび IL-1Ra マウスの腸管上皮細胞について異常がないか精査したいと考えている。

本研究によって、IL-1Ra が腸管ポリープの形成の抑制に重要な役割を担っていることが明らかになった。ヒトの IL-1Ra 遺伝子には多型が存在することが知られており、病気との関連が報告されているが、大腸癌との関連については報告がなされていない。今後、マウスモデルを用いて得られた本研究の知見が、ヒトの大腸癌の発生率に影響を与える遺伝素因として外挿できるか興味を持たれる。