

学 位 論 文 題 名

Allograft inflammatory factor-1 augments productions of interleukin-6, -10 and-12 by a mouse macrophage line.

(アログラフト炎症因子-1は、マウスマクロファージ細胞株のインターロイキン-6, -10, -12産生を促進する)

学位論文内容の要旨

I. 背 景

臓器移植後の慢性期に、移植臓器に限局して生じる動脈硬化症は、ドナー臓器とレシピエントの炎症細胞の間で誘導される複雑な炎症反応の結果形成され、慢性期予後や再移植の最も重要な規定因子である。アログラフト炎症因子-1 (以下 AIF-1)は、ラットの異所性心移植モデルにおいて同定された分子で、アロ移植後の慢性拒絶心では発現が亢進するが、宿主心や同系移植心では発現されない。AIF-1 はアロ移植心の冠動脈周囲に浸潤するマクロファージ (Mφ) 内に発現され、この発現は IFN-γによって制御されることから、当初はアロ免疫応答において機能する分子と想定されていた。しかし、近年実験的自己免疫性脳脊髄炎・神経炎・ブドウ膜炎ラットや、ヒト脳腫瘍・脳梗塞などの病巣に浸潤するMφ系細胞、さらにバルーン傷害したラット頸動脈血管平滑筋細胞においても AIF-1 の発現が亢進していることが、相次いで報告された。従って AIF-1 は、移植免疫に限らず炎症反応など、より広範な病態の形成に関与する分子であると考えられた。しかし、未だ AIF-1 の直接の機能は解明されていない。

II. 目 的

本研究の目的は、Mφにおける AIF-1 の機能をマウスの系を用いて明らかにすることである。現在まで AIF-1 は、主にラットを用いて解析されてきたが、免疫系に関与する分子の解明は、遺伝的背景がより明確なマウスを用いる方が有利である。

III. 方 法

マウス AIF-1 cDNA の塩基配列は、ラット AIF-1 の配列をもとに BALB/c マウスの脾臓 cDNA ライブラリーから、5'-RACE・3'-RACE 法で同定した。得られた塩基配列からリコンビナント蛋白を作成し、フロインド完全アジュバントとともにラットを免疫し、2 週後、腸骨リンパ節を用いて、常法に従い抗 AIF-1 単クローン抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。得られた単クローン抗体を用いて正常マウス臓器における AIF-1 の発現を解析した。次に単球/Mφ系細胞における AIF-1 の機能を検討する目的で、AIF-1 cDNA をサイトメガロウイルスプロモーターをもつベクターに挿入して、マウス Mφ系細胞株、RAW 264.7 に導入し、恒常的に AIF-1 を強発現する安定形質細胞株 (#182 < #24 = #203) を樹立した。コントロールにはベクターのみを導入した mock と wild-type (wt)をおいた。これら 5 種類の細胞株を大腸菌由来のリポポリサッカライド (LPS) 1 μg/ml で 24 時間刺激

し、各種サイトカインの転写・発現を RT-PCR と培養上清の ELISA 法で比較した。

#### IV. 結 果

マウス AIF-1 cDNA は、全長 598 bp、コード領域は 444 bp、147 アミノ酸長で、推定分子量は 16,910 であった (DDBJ accession No. AB013745)。PKA, PKC, カゼインキナーゼ II のリン酸化コンセンサス配列や、Ca<sup>2+</sup>結合蛋白に共通する EF hand 様のドメインを 1 個保有していた。データベース検索から、マウス AIF-1 は主要組織適合抗原複合体 (MHC) class III 領域に座位することが判明した。現在まで報告されている様々な生物の AIF-1 を比較すると、AIF-1 の塩基配列は種の境界を超えて高度に保存されていた。AIF-1 の発現は、正常マウスにおいては精巣に高度、脾臓・リンパ節・肝臓・胸腺などのリンパ系臓器に軽度から中等度、認められた。精巣においては germ cell が、脾臓では赤脾髄の Mφ系細胞が AIF-1 を発現していた。AIF-1 過剰発現細胞株は、コントロール細胞と比較して、未刺激の状態でも扁平で接着性に富む性格を示し、LPS 刺激後この傾向はより顕著となった。次に、AIF-1 過剰発現細胞株を一種選択し(#24)、mock とともに各種サイトカインの発現を RT-PCR で検索した。LPS 活性化後、#24 のみで IL-6, IL-10, IL-12p40 の転写が亢進していた。一方、IL-1α, TNF-α, TNF-β, TGF-β1, Mac-1, tissue factor の発現は、活性化の有無にかかわらず、#24, mock 両細胞間で差は認められなかった。サイトカイン産生が蛋白レベルでも上昇していることを確認するために、3 種の AIF-1 過剰発現細胞株とコントロール(mock, wt)を同様に刺激し、ELISA 法で定量した。コントロールと比し AIF-1 過剰発現細胞株では、3 種いずれも IL-6, IL-10, IL-12p40 の産生量が有意に上昇していた。一方、活性型 IL-12p70 の発現は、いずれの細胞でも見られなかった。

#### V. 考 案

今回の結果から、AIF-1 は種の境界を超えて高度に保存され、マウスにおいては MHC class III 領域に座位していることが明らかになった。この事は AIF-1 が免疫系に関与する重要な分子である可能性を示唆する。正常マウスにおいても、AIF-1 は精巣とリンパ系臓器において発現されていたことから、AIF-1 は生体の恒常性維持にも機能している可能性が考えられた。特に、精巣においては germ cell が AIF-1 を高度に発現しており、Mφとは異なる機能を有すると考えられた。AIF-1 を Mφ細胞株に強制発現させたところ、活性化に伴い IL-6, IL-10, IL-12p40 の著しい産生増強を見た。活性型 IL-12p70 は p40 と p35 のヘテロダイマーから構成されるが、p40 のみが過剰に存在する場合は p70 の機能を拮抗するとの報告がある。そのため IL-12p70 も測定したが産生は認められなかった。以上を考えあわせると AIF-1 は活性化に伴い Mφのサイトカイン産生バランスを Th2 側にシフトさせて、免疫反応の進展を制御していると考えられた。AIF-1 の発現量と上記サイトカインの産生量を比較すると、IL-10 は正相関、IL-12p40 は逆相関を示したが、IL-6 に関しては一定の傾向が見られなかった。サイトカインの産生は複雑なネットワークで制御されている。従って AIF-1 作用点のより詳細な解析が必要である。また今回の結果をふまえ、現在 in vivo の系を用いて、AIF-1 の機能を検討中である。

#### VI. 結 語

AIF-1 は、単球/Mφ系細胞のサイトカイン産生能を修飾することにより、慢性拒絶移植片の動脈硬化やその他の炎症性疾患の進展を規定する可能性が示された。今後 AIF-1 発現の制御に基づく、これらの疾患の新しい治療法が開発されることが期待される。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎  
副 査 教 授 小 野 江 和 則  
副 査 教 授 北 島 顕

### 学 位 論 文 題 名

## Allograft inflammatory factor-1 augments productions of interleukin-6, -10 and-12 by a mouse macrophage line.

(アログラフト炎症因子-1は、マウスマクロファージ細胞株の  
インターロイキン-6, -10, -12産生を促進する)

臓器移植後の慢性期に、移植臓器に限局して生じる動脈硬化症は、ドナー臓器とレシピエントの炎症細胞間で誘導される複雑な炎症反応の結果形成され、慢性期予後や再移植の最も重要な規定因子である。しかしながら、移植片動脈硬化形成の詳細な機序は不明である。アログラフト炎症因子-1 (以下 AIF-1) は、ラットの異所性心移植モデルにおいて同定された分子で、アロ移植後の慢性拒絶心では発現が亢進するが、宿主心や同系移植心では発現されない。AIF-1 はアロ移植心の冠動脈周囲に浸潤するマクロファージ (M $\phi$ ) 内に慢性期をピークに発現され、この発現は IFN- $\gamma$ によって制御される。近年 AIF-1 は拒絶心に限らず様々な炎症性疾患において、病巣の M $\phi$ 系細胞へ誘導されることが報告され、AIF-1 の広汎な病態への関与が示唆されている。申請者は AIF-1 に着目し、その機能を検討した。方法は、まず遺伝的背景がより明確で免疫系に関与する分子の解析に有利なマウスを用いた実験系の樹立を行った。ラット AIF-1 の配列をもとに BALB/c マウスの脾臓 cDNA ライブラリーから、5'-RACE・3'-RACE 法でマウス AIF-1 cDNA の塩基配列を同定した (DDBJ accession No. AB013745)。マウス AIF-1 は主要組織適合抗原複合体 (MHC) class III 領域に座位し、種の境界を超えて高度に保存されていることが判明した。このことから AIF-1 が免疫系に関与する重要な分子である可能性が示唆された。次に、得られた塩基配列からリコンビナント蛋白を作成し、フロインド完全アジュバントとともにラットを免疫し、2週後、腸骨リンパ節を用いて常法に従い、抗 AIF-1 単クローン抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。得られた単クローン抗体を用いた免疫組織化学、およびノーザンブロット法で、正常マウス臓器における AIF-1 の分布を解析した。AIF-1 の発現は、正常マウスにおいては精巣に高度、脾臓・リンパ節・肝臓・胸腺などのリンパ系臓器に軽度から中等度に認められた。精巣においては germ cell が、脾臓では赤脾髄の M $\phi$ 亜分画が AIF-1 を発現していた。正常臓器において

も、AIF-1 が発現されていたことから、AIF-1 は生体の恒常性維持においても機能している可能性が考えられた。特に、精巣とリンパ系臓器では発現細胞の系統が異なり、ノーザンブロット法では AIF-1 のバンドの長さが異なっていたことから、Mφ と germ cell では AIF-1 は異なる機能を有することが予想された。次に単球/Mφ系細胞における AIF-1 の機能を解析する目的で、AIF-1 cDNA をサイトメガロウイルスプロモーターをもつベクターに挿入し、マウス Mφ系細胞株、RAW 264.7 に導入し、恒常的に AIF-1 を強発現する 3 種類の安定形質細胞株 (#182 < #24 = #203) を樹立した。コントロールにはベクターのみを導入した mock と野生株をおいた。これら 5 種類の細胞株を大腸菌由来のリポポリサッカライド (LPS) 1 μg/ml で 24 時間刺激し、各種サイトカインの転写・発現を RT-PCR と培養上清の ELISA 法で比較した。AIF-1 過剰発現細胞ではコントロール細胞と比較して、活性化に伴い細胞形態が変化し、IL-6, IL-10, IL-12p40 の産生が著しく増強した。AIF-1 の発現量と上記サイトカインの産生量を比較すると、IL-10 は正相関、IL-12p40 は逆相関を示したが、IL-6 に関しては一定の傾向が見られなかった。活性化型 IL-12p70 は p40 と p35 のヘテロダイマーから構成されるが、p40 のみが過剰に存在する場合は p70 の機能を拮抗抑制するとの報告がある。そのため IL-12p70 も測定したが、産生は認められなかった。一方、IL-1α, TNF-α, TNF-β, TGF-β1, Mac-1, tissue factor の発現は、活性化の有無にかかわらず差は認められなかった。以上より、AIF-1 は活性化 Mφ において特定のサイトカイン産生能を修飾することにより、移植片動脈硬化や、その他の炎症性疾患の進展を制御している可能性がある」と結論づけた。なお、申請者は今回の結果をふまえ、Mφ 特異的に AIF-1 が発現するトランスジェニックマウスを作成し、現在 in vivo の系を用いて、AIF-1 の機能を検討している。

発表後、副査の北島教授から、粥状動脈硬化形成への AIF-1 の関与について、冠動脈形成術後の血管再狭窄に対する AIF-1 を用いた遺伝子治療の可能性について、また、副査の小野江教授から、獲得免疫系を持たない生物における AIF-1 の機能について、次いで、主査の長嶋教授から、toll like receptor 群と AIF-1 の関連について、AIF-1 分子の生化学的な機能調節についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識を駆使して、誠実にかつ概ね適切に回答し得た。

この論文は、綿密かつ精緻な分子生物学的・免疫学的手法を駆使して、Mφ における AIF-1 の機能を解析した上で高く評価され、今後 AIF-1 の発現制御に基づく新たな疾患治療法の開発が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。