

称号及び氏名 博士(獣医学) 栢沢 史朗

学位授与の日付 平成19年2月20日

論文名 「Type I interferon 活性増強薬開発のための基礎的研究」

論文審査委員
主査 竹内 正吉
副査 児玉 洋
副査 小森 雅之
副査 東 泰孝

論文要旨

Type I interferon (type I IFN)はウイルス感染症である慢性肝炎や悪性腫瘍に有効な薬剤であるが、その有効率が低いため他剤との併用療法が検討されている。しかしながら、現存する医薬品との併用効果はHepatitis C virus (HCV) genotype I型の慢性C型肝炎で有効率が上昇したものの、それでも40から45%であった。そこで、ウイルスや悪性腫瘍の増殖を抑制する新規医薬品の中で、type I IFN 活性を増強する薬剤を開発することは重要である。慢性肝炎患者、肝癌患者あるいは慢性骨髄性白血病患者で type I IFN 受容体発現量と治療効果が有意に相関することから、標的組織における受容体発現は type I IFN の治療効果を決定する要因の1つであると考えられる。すなわち、type I IFN 受容体発現量を上げる薬剤、type I IFN 受容体 upregulator も開発のターゲットとなる。しかし、type I IFN の効果に対する薬剤の作用を評価するための、簡便な type I IFN 受容体測定方法や type I IFN の生体反応性を測定する方法がこれまでなかった。本研究では、新たなそして簡便な type I IFN 受容体測定法ならびに IFN に対する反応性測定法を開発した。また、新規に医薬品を開発するためにはげっ歯類を用いた動物実験が重要となるが、ヒト type I IFN はげっ歯類の type I IFN 受容体に作用しない。そこで、マウスにヒト type I IFN 受容体遺伝子を導入し、ヒト type I IFN に反応するマウスを作製した。これらの3つの基礎研究は、type I IFN 受容体 upregulator あるいは type I IFN 活性増強薬の開発に際し重要であると考えられる。

1章 ヒト白血球 type I IFN 受容体測定方法の確立

これまでヒト type I IFN 受容体量を調べた臨床研究では、主に biopsy した組織の type I IFN 受容体量が測定されていた。最近の研究で末梢血単核球と肝組織の type I IFN 受容体量が相関することが示されたことから、臨床血液検査で測定できる可能性が示唆された。従来の研究において血液中の type I IFN 受容体量は、赤血球に type I IFN 受容体がないことから、単核球の mRNA を Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) を用いて測定してきた。しかしながら、

単核球の RNA を抽出し定量的に測定するためには、RT-PCR に影響しないように赤血球を比重遠心法で除去する必要があった。そのため、数 mL の血液が必要であり、しかも多くの時間と労力を必要とすることから頻りに測定することはできなかった。本章では、単核球を分離するかわりに溶血操作をおこない抗 type I IFN 受容体抗体で細胞を染色し Flow cytometer (FCM) で測定することで、50 μ L の極めて少量の血液で簡便に測定できる検査法を開発した。採血したヒト血液を、ヒト type I IFN 受容体の subunit の 1 つである IFNAR2 に対するウサギ抗体と、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ウサギ抗体で蛍光染色した。同時に、白血球 (CD45 陽性) と溶血処理後に残った赤血球 (CD45 陰性) を分離するために Phycoerythrin (PE) 標識抗 CD45 抗体を、単球 (CD14 陽性) とリンパ球 (CD14 陰性) および顆粒球 (CD14 陰性) を分離するために PE covalently linked to cyanin 5 (PC5) 標識抗 CD14 抗体を用いて蛍光染色した。この 3 種の抗体で蛍光染色した白血球を gating によってリンパ球、単球および顆粒球に分離し、それぞれの蛍光強度を測定した。抗 type I IFN 受容体抗体で処理した細胞の平均蛍光強度はコントロール抗体で処理した細胞のものより大きく、type I IFN 受容体量が測定できることが示された。単球および顆粒球は type I IFN 受容体発現量が多く、リンパ球では少なかった。また、健康人の type I IFN 受容体量は、日内変動および日差変動が少なく安定した値が得られた。Type I IFN が投与された患者では type I IFN 受容体発現が低下することから、それを考慮した投与スケジュールが検討されている。本研究で 1,000 IU/mL の type I IFN で処理した白血球の type I IFN 受容体量を測定したところ、リンパ球、単球、顆粒球いずれにおいても発現量が低下していた。このことから、type I IFN を投与した患者の type I IFN 受容体の低下を本方法で測定できる可能性が示唆された。

この type I IFN 受容体測定法は、少ない血液量で測定できることから患者に対する侵襲も少なく、また、測定にかかる労力も少ない。本方法によって、臨床の場で type I IFN 受容体に対する種々の治療の効果を観察でき、type I IFN 治療の最適化に利用できる可能性があると考えられた。さらに、type I IFN 受容体発現を上昇させる薬剤効果を評価する方法になると考えられた。

2 章 末梢血白血球の type I IFN 反応性の測定方法の確立

Type I IFN 受容体量を増加させると type I IFN の反応性が増すことが期待できるが、type I IFN の生体内の反応は他のサイトカイン同様に多くのファクターのネットワークの中で制御されている。薬物が生体内で type I IFN の反応性を増加させるかどうかを調べることは重要であるが、これまで生体内における type I IFN の反応性を簡便に調べる方法がなかった。本章では、ヒト白血球の type I IFN による signal を測定することで、生体内の type I IFN の反応性の変動を予測できる系を開発した。すなわち、type I IFN と受容体結合直後に細胞内で産生されるリン酸化 STAT1 量を測定した。1,000 IU/mL のヒト type I IFN で処理したヒト血液を、溶血、細胞固定、細胞透過処理をおこない、Alexa Fluor 488 標識抗リン酸化 STAT1 抗体で白血球中のリン酸化 STAT1 を蛍光染色した。同時に PE 標識抗 CD45 抗体で白血球を、PC5 標識抗 CD14 抗体で単球を染色し、FCM を用いてリンパ球、単球、顆粒球それぞれの Alexa Fluor 488 の蛍光強度を測定した。type I IFN で刺激した細胞はいずれも無刺激の細胞に比較し蛍光強度が増加したことから、リン酸化 STAT1 量が増加したことが示された。リンパ球および単球のリン酸化 STAT1 量の増加は顆粒球に比較し大きかったことから、リンパ球および単球の type I IFN に対する反応性は顆粒球より高いことが示された。

この type I IFN に対する末梢血白血球の反応が組織の反応性を反映しているかを調べるために、前述の標識抗体を用いてマウスで検討した。マウス血液にマウス type I IFN を添加し 1 時間後

のリンパ球のリン酸化 STAT1 量は, type I IFN 100 U/mL 以上で増加した。ヒト同様, リンパ球は顆粒球より type I IFN 刺激によるリン酸化 STAT1 量の増加が大きかった。続いてマウス type I IFN をマウスに静脈内投与し, 末梢血リンパ球のリン酸化 STAT1 量を測定したところ, 約1時間をピークに増加した。同時に脾臓, 肺, 肝臓のリン酸化 STAT1 量を Western blot 法で測定すると, それぞれ 30 分, 30 分, 1 時間をピークに増加した。また, 末梢血リンパ球のリン酸化 STAT1 量は 1,000 U/body 以上で増加し, 脾臓, 肺, 肝臓における変動もそれとほぼ一致した。一方, これら臓器の全 STAT1 量は, type I IFN 投与によって変化することはなかった。このように, 末梢血リンパ球のリン酸化 STAT1 量と臓器のそれとの変動が相関したことから, 末梢血リンパ球のリン酸化 STAT1 量を FCM で測定することによって臓器のリン酸化 STAT1 量の変動を推測できることが示唆された。

3 章 ヒト type I IFN 受容体遺伝子導入マウスのヒト type I IFN に対する反応性

ヒトとマウスの type I IFN および type I IFN 受容体の構造に種差があるためヒト type I IFN はマウスに反応せず, ヒト type I IFN に対する反応性をマウスで調べることができなかった。そこで, ヒト type I IFN 活性増強剤のマウスを用いた評価系を構築するために, ヒトの type I IFN 受容体をマウスに遺伝子導入し, ヒト type I IFN に反応するマウスの作製を試みた。ヒト type I IFN 受容体遺伝子を hydrodynamic-based delivery (HD) 法で導入したマウスのヒト type I IFN に対する反応性を, リン酸化 STAT1 量を測定することで調べた。ヒト type I IFN 受容体は IFNAR1 と IFNAR2 の heterodimer で高親和性になることから, IFNAR1 と IFNAR2 遺伝子を含む vector を混合しマウスに導入した。遺伝子導入 6 時間後の Western blot の検討から, このマウスは肝臓特異的に IFNAR1 と IFNAR2 を発現することが明らかになった。免疫組織化学分析から, IFNAR1 および IFNAR2 発現細胞は肝臓組織中に散在し, 連続切片の解析から IFNAR1 および IFNAR2 は同一の細胞で発現していることが示された。また, IFNAR1 および IFNAR2 は共に細胞表面に分布していた。これらの結果から, ヒト IFNAR1 および IFNAR2 は肝細胞表面で heterodimer の高親和性受容体を形成している可能性が示唆された。このヒト type I IFN 受容体の機能を調べるために, ヒト type I IFN 受容体導入マウスにヒト type I IFN を 10,000 IU/body 静脈内投与した。投与 1 時間後における肝臓内リン酸化 STAT1 量は, 溶媒投与群に比較して有意に増加していた。一方, コントロール遺伝子導入マウスでは, ヒト type I IFN 投与によるリン酸化 STAT1 量の増加は認められなかった。また, 免疫組織化学染色により, ヒト type I IFN 受容体発現細胞はリン酸化 STAT1 を発現していることが示された。以上のことから, マウスに遺伝子導入されたヒト type I IFN 受容体はヒト type I IFN と結合し signal が伝達されたことが示され, はじめてヒト type I IFN の反応性をマウスで調べることが可能となった。これにより, type I IFN の活性を増強する薬剤のヒト type I IFN 反応性をマウスで測定することが可能となった。

Type I IFN 受容体およびその signal を増強する薬剤の開発は, type I IFN 治療の改善に意義あることと考えられる。しかしながら, これまで生体における type I IFN 受容体量や type I IFN の反応性を簡便に調べることができなかった。本研究によって少量の血液でこれらの測定を行えることが示されたことから, type I IFN 活性を増強する薬の効果を臨床において簡便に調べることが可能にした。また, ヒト type I IFN 受容体導入マウスは type I IFN 活性増強薬のヒト type I IFN に対する反応性を実験動物で調べるためのよいモデルとなると考えられる。

審査結果の要旨

Type I interferon (type I IFN)はウイルス感染性慢性肝炎や悪性腫瘍に有効な薬剤であるが、その有効率が低いため他剤との併用療法が用いられている。このことは、ウイルスや悪性腫瘍の増殖を抑制する新規医薬品の中で、type I IFN 活性を増強する薬剤を開発する重要性を示している。しかし、type I IFN の効果に対する薬剤の作用を評価するための、簡便な type I IFN 受容体測定方法や type I IFN の生体反応性を測定する方法がこれまでなかった。本研究では、簡便に生体内における type I IFN 受容体量ならびに IFN に対する反応性を測定する方法を開発した。また、新規に医薬品を開発するためには、げっ歯類を用いた動物実験が重要となるが、ヒト type I IFN はげっ歯類の type I IFN 受容体に作用しないことから、マウスにヒト type I IFN 受容体遺伝子を導入し、ヒト type I IFN に反応するマウスの作製を試みた。

第1章では、ヒト単核球を分離するかわりに溶血操作をおこない抗 type I IFN 受容体抗体で細胞を染色し flow cytometer (FCM)で測定することで、50 μ L の極めて少量の血液で簡便に測定できる検査法を開発した。抗 type I IFN 受容体抗体で処理した細胞の平均蛍光強度はコントロール抗体で処理した細胞のものより大きく、type I IFN 受容体量が測定できることが示された。単球および顆粒球は type I IFN 受容体発現量が多く、リンパ球では少なかった。また、IFN α で前処理した白血球の type I IFN 受容体量を測定したところ、リンパ球、単球、顆粒球いずれにおいても発現量が低下していたことから、type I IFN を投与した患者の type I IFN 受容体の低下を測定できる可能性が示唆された。この type I IFN 受容体測定法は、臨床の場で type I IFN 受容体に対する種々の治療の効果を観察でき、type I IFN 治療の最適化に利用できる可能性があると考えられた。さらに、type I IFN 受容体発現を上昇させる薬剤効果を評価する方法になると考えられた。

第2章では、ヒト白血球を用い、type I IFN と受容体との結合直後に細胞内で産生されるリン酸化 STAT1 量を測定することで、生体内の type I IFN の反応性の変動を予測できる系を開発した。Alexa Fluor 488 標識抗リン酸化 STAT1 抗体でヒト type I IFN を処理した白血球中のリン酸化 STAT1 を蛍光染色したところ、type I IFN で刺激した細胞はいずれも無刺激の細胞に比較し蛍光強度が増加したことから、リン酸化 STAT1 量が増加したことが示された。この type I IFN に対する末梢血白血球の反応が組織の反応性を反映しているかを調べるために、前述の標識抗体を用いてマウスで検討した。マウス血液にマウス type I IFN を処置すると、リンパ球のリン酸化 STAT1 量は増加した。マウス type I IFN をマウスに静脈内投与すると、末梢血リンパ球のリン酸化 STAT1 量は増加した。同時に Western blot 法で測定した脾臓、肺、肝臓のリン酸化 STAT1 量も増加し、また、末梢血リンパ球のリン酸化 STAT1 量と脾臓、肺、肝臓におけるその変動はほぼ一致した。このことから、末梢血リンパ球のリン酸化 STAT1 量を FCM で測定することによって臓器のリン酸化 STAT1 量の変動を推測できることが示唆された。

第3章では、ヒトとマウスの type I IFN および type I IFN 受容体の構造に種差があるためヒト type I IFN はマウスに反応せず、ヒト type I IFN に対する反応性をマウスで調べることができなかったことから、ヒト type I IFN 活性増強剤のマウスを用いた評価系を構築するために、ヒトの type I IFN 受容体をマウスに遺伝子導入し、ヒト type I IFN に反応するマウスの作製を試みた。ヒト type I IFN 受容体遺伝子を hydrodynamic-based delivery (HD) 法で導入したマウスのヒト type I IFN に対する反応性を、リン酸化 STAT1 量を測定することで調べた。遺伝子導入 6 時間後における Western blot の検討や免疫組織化学分析から、ヒト type I IFN 受容体である IFNAR1 および IFNAR2 はマウス肝

細胞表面で heterodimer の高親和性受容体を形成している可能性が示唆された。このヒト type I IFN 受容体の機能を調べたところ、ヒト IFN α 投与 1 時間後における肝臓内リン酸化 STAT1 量は、溶媒投与群に比較して有意に増加していた。また、免疫組織化学染色により、ヒト type I IFN 受容体発現細胞はリン酸化 STAT1 を発現していることが示された。以上のことから、マウスに遺伝子導入されたヒト type I IFN 受容体はヒト IFN α と結合し signal が伝達されたことが示され、はじめてヒト type I IFN の反応性をマウスで調べることが可能となった。

本研究では、生体における type I IFN 受容体量の変化や type I IFN の反応性を少量の血液から単離した末梢白血球を用いることで簡便に測定できる方法確立し、また、ヒト type I IFN 受容体遺伝子導入マウスを作成することでヒト type I IFN の反応性を実験動物でも調べることが可能にした。これらの成果は type I IFN を用いた治療ならびに type I IFN 活性増強薬を開発するための基礎となるものであり、医学、動物医学に貢献するところが大きく、本論文の審査および学力確認の結果と併せて、博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。