



Title	Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity in macrophages
Author(s)	田中, 貴志
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38984">https://hdl.handle.net/11094/38984</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	たなか たかし 田 中 貴 志
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 7 8 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 7 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity in macrophages (NF-IL 6 は、マクロファージの細胞内殺菌と腫瘍傷害に必須の 転写因子である)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岸 本 忠 三  (副査) 教 授 谷 口 直 之    教 授 山 西 弘 一

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

NF-IL 6 はロイシンジッパー構造を有する転写調節因子であり C/EBP ファミリーに属する。NF-IL 6 はこれまでの *in vitro* での研究から、急性炎症反応に関与する遺伝子の活性化・マクロファージの分化および TNF $\alpha$ 、G-CSF などのサイトカイン遺伝子の活性化・脂肪細胞の分化などに関与することが示唆されてきたが、その *in vivo* での機能は不明であった。そこで、NF-IL 6 の個体レベルでの機能を解明するために ES 細胞を用いたジーンターゲティングにより NF-IL 6 欠損マウスを作製し解析を行った。

### 【方法ならびに結果】

#### 1. NF-IL 6 欠損マウスの作製

NF-IL 6 遺伝子の DNA 結合領域およびロイシンジッパー領域を欠失させてこの部分にネオマイシン耐性遺伝子を挿入したターゲティングベクターを胚性幹細胞株 E14-1 に電気穿孔法にて導入した。そして G418 とガンシクロビルにて選別し、両薬剤に耐性となったコロニーの中から PCR 法にて相同組換えをおこしたクローンを同定し、さらにサザンブロッティングにて確認した。この相同組換え体を C57BL/6 の胚盤胞に注入しキメラマウスを得た。さらにこのマウスと C57BL/6 とを交配してヘテロ接合体を得、ヘテロ接合体同志の交配によりホモ接合体を作製した。

#### 2. NF-IL 6 欠損マウスの *Listeria* や *Salmonella* に対する抵抗性の著明な低下

NF-IL 6 欠損マウスは外見上異常なかったが、正常マウスには全く影響を与えない 500 CFU という少量の *Listeria monocytogenes* を腹腔内投与したところ、このマウスは 5 日目までに全例死亡した。また *Salmonella typhimurium* を腹腔内投与した場合も、NF-IL 6 欠損マウスは 6 日以内に全例死亡した。

#### 3. NF-IL 6 欠損マウスにおけるサイトカイン産生能

*Listeria* に対する生体防御には、IL-1、IL-6、TNF $\alpha$ 、IL-12 などのサイトカインが重要であるといわれている。そこで、NF-IL 6 欠損マウスのマクロファージからのサイトカインの産生を RT-PCR 法にて調べた。その結果、G-CSF の産生のみが正常マウスに比べて低下していたが、その他のサイトカインに関しては、正常マウスのマクロファージと差が認められなかった。

*Listeria* は生体内では活性化マクロファージがその最終的な排除を担う細胞内寄生細菌であり、このマクロファ-

ジの活性化には IFN $\gamma$  や TNF $\alpha$  などのサイトカインが重要であるといわれている。そこで、*Listeria* 感染 4 日目の血中の IFN $\gamma$ ・TNF $\alpha$  値を測定したが、NF-IL 6 欠損マウスと正常マウスとでは有意差が認められなかった。

#### 4. NF-IL 6 欠損マウスのマクロファージにおける、*Listeria* のファゴゾームから細胞質へのエスケープ

腹腔マクロファージを *in vitro* で LPS と IFN $\gamma$  で活性化した後で *Listeria* を感染させて電子顕微鏡で観察した。正常マウスのマクロファージでは 87% の *Listeria* が phagosome に存在し殺菌されていたのに対し、NF-IL 6 欠損マウスでは 84% の *Listeria* が細胞質にエスケープしてそこで増殖しており、マクロファージ自体の細胞内殺菌能が低下していることが示唆された。

#### 5. NF-IL 6 欠損マウスのマクロファージの一酸化窒素 (NO) 産生能

活性化マクロファージは、最終的に NO の産生を高めることにより *Listeria* を殺菌するといわれている。そこでマクロファージからの NO の産生を調べたところ、NF-IL 6 欠損マウスのマクロファージは正常マウスと同程度の NO を産生していた。次に *Listeria* を *in vitro* でマクロファージに感染させた場合、NO 合成酵素の特異的阻害剤である N<sup>G</sup>-monomethyl-arginine が、その後の細胞内殺菌にどのような影響を与えるかを検討した。正常マウスのマクロファージは、NO 産生を抑制すると細胞内殺菌が著明に障害された。一方、NF-IL 6 欠損マウスのマクロファージは、NO を十分に産生している状態においても、同様に殺菌能が著明に低下することが明らかとなった。

#### 6. NF-IL 6 欠損マウスのマクロファージの腫瘍傷害活性の異常

肥満細胞腫の細胞株である P815 を用いて *in vitro* におけるマクロファージの腫瘍細胞傷害活性および腫瘍細胞増殖抑制活性を調べたところ NF-IL 6 欠損マウスのマクロファージにおいてはいずれも正常マウスに比べて著明に低下していた。

#### 【考察および結論】

本研究により以下のようなことが明らかになった。

- (1) NF-IL 6 欠損マウスのマクロファージは、活性化されて NO をほぼ正常に産生するにもかかわらず、*Listeria* を細胞内で殺菌することができず、このためにこのマウスは *Listeria* に対する抵抗性が著明に低下していること。
- (2) NF-IL 6 欠損マウスのマクロファージは、活性化された状態においても腫瘍細胞を傷害する作用が正常マウスに比べて著明に低下していること。

これらの結果よりマクロファージの細胞内殺菌や腫瘍傷害作用においては、従来からいわれていた NO 依存性の経路以外に、NO 非依存性の NF-IL 6 を介する新たな機構が存在することが示唆された。今後このマウスを用いて、マクロファージにおいて NF-IL 6 が誘導するような分子を解析することにより、今まで明確には解明されていなかったマクロファージの細胞内殺菌機構や腫瘍傷害機構を明らかにできると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、ジーンターゲット法を用いて NF-IL 6 欠損マウスを作製し、NF-IL 6 の *in vivo* での本来の機能を明らかにしたものである。本研究から、NF-IL 6 欠損マウスのマクロファージは、活性化されて NO をほぼ正常に産生するにもかかわらず、*Listeria* に対する細胞内殺菌および腫瘍細胞傷害作用が正常マウスに比べて著明に低下しているということが明らかとなった。このことから、これらの機能に関して、従来からいわれていたような NO 依存性の経路以外に、NO 非依存性の NF-IL 6 を介する機構が存在するという新たな知見が得られた。以上のような研究は国際的にも高く評価されるものであり、単に 1 つの転写因子の機能を明らかにしただけにとどまらず、感染症や腫瘍免疫という広い視野にたったインパクトのある研究が展開されている。よって、本研究は学位論文に値するものと認められる。