

学 位 論 文 題 名

アルファーマクトプロテイン（AFP）の
生物学的機能に関する研究

—トランスジェニックマウスを用いた検討—

学位論文内容の要旨

ヒトをはじめマウス、ラット、ブタ等の哺乳動物において、妊娠の維持にAFPは重要な役割を果たすと考えられている。AFPは妊娠の後期にその血中濃度が最大となり、多くの動物種で出生直後から漸次低下し、やがてアルブミンに置換される。一方、ヘパトーマやある種の固形癌においてはAFPが再度血中に出現する。本論文では上記のように生体において挙動するAFPの生物学的機能を遺伝子導入(トランスジェニック)動物を用いて明らかにすることを試みた。

AFPを産生するトランスジェニックマウス作製のために発現ベクターを作製をした。プロモーターとしてヒト β -actin enhancer/promoter領域あるいはSV40 promoter領域を用いた。これらにヒトAFP cDNA、スプライスサイトおよびポリAシグナルを連結した融合遺伝子をそれぞれ β -act-hAFPおよびSV-hAFPと名付け、マウス受精卵に導入した。これらの遺伝子を導入して作製されたトランスジェニックマウスでは、導入遺伝子が安定に子孫に伝達した。またコピー数が複数のマウスにおいては、遺伝子の導入様式はすべての系統においてhead to tailであった。組織における発現は使用したプロモーターから予想されたように、特定臓器にかたよることなく多くの臓器においてAFPの発現が確認された。発現しているAFPはヒトヘパトーマ患者と同一の約65kDaであり、血中AFP量は1～20 μ g/mlであった。

AFPの生物学的機能の一つと考えられている免疫抑制能について、

リステリア菌の実験的感染による臓器内の菌の増殖状態と、生体防御反応として宿主の免疫担当細胞が産生するサイトカイン量により *in vivo* で検討した。AFP産生トランスジェニックマウスにおいては、AFPによる免疫抑制効果により、リステリア感染時において標的臓器における顕著な細菌の増殖が見られた。それを裏づけるようにトランスジェニックマウスにおいては、サイトカイン(IFN- γ およびTNF)産生量の低下が観察された。TNFの低下に比べIFN- γ の低下がより顕著であったことからIFN- γ の主産生細胞であるNK細胞が非特異的防御ではより影響を受けることが示唆された。同様にTNFの主産生細胞であるマクロファージにおいてもサイトカインの産生量が抑制される結果が得られた。以上のことよりAFPの免疫抑制能をトランスジェニックマウスを用いて *in vivo* で証明することができた。

自己免疫疾患におけるAFPの役割について、RAの誘導実験を行い、その症状の程度により検討した。RAは実験的にmBSAの投与によって容易に誘導可能であり、その発症の背景には、宿主のMHCクラスIIハプロタイプ、ホルモンおよび環境などが関連していることが示唆されている。免疫担当細胞に限定した場合、T細胞がその発症には深く関与している。AFP産生トランスジェニックマウスにおいてRAの誘導を行った場合、AFPの免疫抑制能によってT細胞の抗原に対する反応性が抑制され、その結果として関節における炎症やそれに伴う炎症性細胞の浸潤が低下する傾向が観察された。今回の結果は妊娠期にはRAやMSなどの自己免疫疾患の臨床的症状が軽減されることともよく一致する。以上の成績からAFPの免疫抑制能について臨床的な側面からも有用な情報が得られたと考えられる。

本論文ではAFPの生物学的機能を *in vivo* で検索するために、AFP産生トランスジェニックマウスを作製した。さらに、AFPの免疫抑制能については、実験的細菌感染を行った場合の増殖細菌数とその時に産生されるサイトカインの産生量およびRAの誘導実験により証明できた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 邊 智 正

副 査 教 授 金 川 弘 司

副 査 教 授 斉 藤 昌 之

副 査 教 授 林 正 信 (酪農学園大学)

学 位 論 文 題 名

アルファフエトプロテイン (AFP) の

生物学的機能に関する研究

—トランスジェニックマウスを用いた検討—

ヒトをはじめマウス、ラット、ブタ等の哺乳動物において、妊娠の維持にAFPは重要な役割を果たすと考えられている。しかしながらAFPを恒常的に産生するモデル動物が存在しない。そこで遺伝子導入(トランスジェニック)動物を作製し、AFPの生物学的機能の検索を試みた。

AFPを産生するトランスジェニックマウス作製のために発現ベクターを作製をした。プロモーターとしてヒト β -actin enhancer/promoter領域およびSV40 promoter領域を用いた。これらにヒトAFP cDNA、スプライスサイトおよびポリAシグナルを連結した融合遺伝子をそれぞれマウス受精卵に導入した。これらの遺伝子を導入して作製されたトランスジェニックマウスでは、導入遺伝子が安定に子孫に伝達し、特定臓器にかたよることなく多くの臓器においてAFPの発現が確認された。発現しているAFPはヒトヘパトーマ患者と同一の約65kDaであり、血中AFP量は1~20 μ g/mlであった。

AFPの生物学的機能の一つと考えられている免疫抑制能について、リステリア菌の実験的感染による臓器内の菌の増殖状態と、生体防御反応として宿主の免疫担当細胞が産生するサイトカイン量により*in vivo*で検討した。その結果、サイトカイン(Interferon-gammaおよびTumor necrosis factor)産生量の低下が観察された。同時に、増殖細菌数の有意な増加が観察され、AFPによる免疫抑制能が観察された。

一方、自己免疫疾患におけるAFPの役割について、リウマチ様関節炎の誘導実験を行い、その症状の程度によりAFPによる免疫抑制能を検討した。その結果、関節における炎症やそれに伴う炎症性細胞の浸潤の低下する傾向が

観察された。

この研究はトランスジェニックマウスを作製し、AFPの生物学的機能の一つと考えられている免疫抑制能について明らかにしたものであり、AFPの生物学的機能を解析するために重要な知見を提供するものである。よって審査員一同は山下匡氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。