

Functional and Genetic Analysis of Macrophage Nitric Oxide Production in Mice

（マウスにおけるマクロファージの
一酸化窒素生産能に関する機能的および遺伝的解析）

学位論文内容の要旨

本研究では、マウスを用いてサイトカイン刺激後および *S.typhimurium* 感染時の NO 産生に関する *Nramp1* と *Tnfa* 遺伝子の役割について解析を行った。またサイトカイン刺激後比較的高い NO 産生を示すと考えられるいくつかのマウス系統のマクロファージを用いて NO 産生にかかわる他の遺伝的要因についても解析した。

第一部では、*Nramp1* 抵抗性系統 (*Nramp1*^r) である C3H/He マウスを *Nramp1* 感受性系統 (*Nramp1*^s) である C57BL/6 マウスに 8 世代バッククロスさせ、遺伝的バックグラウンドが C57BL/6 である *Nramp1*^r コンジェニックマウスを作製した。さらに、*Nramp1*^r コンジェニックマウスと C57BL/6 を遺伝的バックグラウンドに持つ TNF- α ^{-/-} マウスと交配させ、*Nramp1* と *Tnfa* について 4 つの組み合わせを持つマウスを作製した。

IFN- γ と LPS で刺激したマウス腹腔マクロファージの iNOS による NO 産生は *Nramp1*^s に比べ *Nramp1*^r マクロファージの方がきわめて高いという結果が得られた。また、*Nramp1* の遺伝子発現はサイトカインの刺激に関らず両タイプのマクロファージで差が見られず、恒常的に検出された。したがって *Nramp1*^s は機能欠損遺伝子と考えられた。TNF- α ^{-/-} マクロファージにおいて IFN- γ 、LPS、TNF- α それぞれ独立に、もしくは組み合わせて刺激した場合の NO 産生は、*Nramp1*^r と *Nramp1*^s 両方の TNF- α の正常マクロファージに比べて著しく低かった。

S.typhimurium 6203 株の感染時、*Nramp1*^r と *Nramp1*^s マクロファージの CFUs に大きな差は無かった。加えて TNF- α ^{-/-} マクロファージを用いたところ、特にその *Nramp1*^s マクロファージでは *S.typhimurium* がより増殖することが観測された。さらに *Nramp1*^s マ

クロファージは感染後 24 時間で *Nramp1*⁺ に比べ高い NO 産生が見られたが、このことは *Nramp1*⁺ マクロファージでは細菌感染に対してすばやく反応ができるため長時間 NO 産生が必要のないことが示唆された。これらの結果から正常マクロファージでは TNF- α が *S.typhimurium* 感染時の NO 産生を補助していることが示された。また、短時間（1 時間以内）感染実験のデータから *Nramp1* 遺伝子は *S.typhimurium* 感染防御の初期に働くことが示された。RT-PCR の結果においても、*S.typhimurium* 感染時 *Nramp1*⁺ マクロファージでは iNOS 遺伝子の誘導がすみやかに起こったが、その発現は持続しなかった。逆に *Nramp1*⁻ マクロファージでは iNOS mRNA の発現は遅く、長い時間保持されていた。さらに TNF- α mRNA は、正常マクロファージからは検出されたけれども、TNF- α ⁻ マクロファージからは全く検出されなかった。

以上の結果より、*Nramp1* と TNF- α は NO 産生に重大な役割を持ち、サイトカインの組み合わせによって NO 産生が増強された。全ての組み合わせのマクロファージが初期の *S.typhimurium* の増殖を抑制することから、*Nramp1* 遺伝子や *Tnfa* 遺伝子に加えて他の因子も細菌の増殖抑制に関与していると推測された。これらの結果から、*S.typhimurium* 感染の制御に対して NO が唯一の因子ではないことが示唆された。

第二部では IFN- γ と LPS での刺激後の NO 産生を計 12 系統の *Nramp1*⁺ マウスで測定した。この 12 系統において NO 産生レベルは様々で一定ではなかった。すなわち、NZB/N、DBA/2N、AKR/N、A/J は低い NO 産生を、NJL、129/J、MOG、SJL/J、CBA/N、NOD/Shi は中間の、C3H/He、SPR は最も高い NO 産生を示した。

そこで高い NO 産生を示す C3H/He マウスと低い NO 産生を示す A/J、AKR/N、DBA/2N との間で F1 を作製した。さらにそれぞれの F1 の NO 産生に基づいて 3 種のバッククロス群を作製した。A/J と C3H/He、および AKR/N と C3H/He の F1 は高い NO 産生を示し、それぞれ A/J と AKR/N とにバッククロスさせた。DBA/2N と C3H/He の F1 は低い NO 産生を示し、C3H/He にバッククロスさせた。バッククロス群の NO 産生は個体間できわめてばらつきが観察された。

これらのバッククロス群の実験から、マクロファージにおける NO 産生の制御は複数の遺伝子によることが示唆され、さらに NO 産生に関する遺伝的因子についての解析を

行った。高い NO 産生を示す 10 個体と低い NO 産生を示す 10 個体をそれぞれのバッククロス群から選び、マイクロサテライトマーカーによる遺伝子タイピングに供した。

遺伝子タイピングの結果、18 番染色体の *Cdl4*、19 番染色体の *Jak2* と *Mif-ps9*、11 番染色体の *Il12b*、*Il4*、*Csfgm*、*Nos2* が NO 産生を制御する候補遺伝子の一つである可能性が推測された。

一方、iNOS プロモーター領域のシーケンス解析で、MOG 系統の-960 番の G が A に、NJL 系統の-846 番の C が T に、SPR 系統の-839 番の G の欠失といった塩基置換がそれぞれ確認された。これらの置換は MOG では NF- κ B 結合領域に、SPR では γ -IRE 結合領域に近接した部分で起こっており、NO 産生の差との係わりが示唆された。MOG と SPR における iNOS プロモーター領域の塩基置換と NO 産生との関係については今後の解析が待たれる。

以上の結果から NO 産生と細菌感染に対しての機能にはいくつもの因子が関っていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜 田 宏
副 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 桑 原 幹 典
副 査 教 授 渡 辺 智 正 (農学研究科)

学 位 論 文 題 名

Functional and Genetic Analysis of Macrophage Nitric Oxide Production in Mice

(マウスにおけるマクロファージの
一酸化窒素生産能に関する機能的および遺伝的解析)

マウスを用いてサイトカイン刺激後および *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) 感染時の一酸化窒素(NO)産生に関する *Nramp1* と TNF- α 遺伝子の役割について解析した。また NO 産生に係わる他の遺伝的要因についても検討した。

Nramp1 感受性系統(*Nramp1*^s)である C57BL/6 に、*Nramp1*^r 遺伝子を導入しコンジェニックマウスを作製した。それらを C57BL/6-TNF- α ^{-/-}マウスと交配させ、*Nramp1* と TNF- α について4つの組み合わせを得た。サイトカイン刺激後、マクロファージの NO 産生は *Nramp1*^r の方が *Nramp1*^s に比べ高かった。*S. typhimurium* 感染時 *Nramp1*^r は inducible NO synthase(iNOS)遺伝子の誘導がすみやかに起こったが、*Nramp1*^s はその発現が遅く、逆に長い時間保持されていた。*Nramp1* 遺伝子は感染防御の初期に働くことが示された。一方、TNF- α ^{-/-} マクロファージにおいて NO 産生は著しく低く、感染実験でも *S. typhimurium* がより多く増殖することが観測された。以上の結果より、*Nramp1* と TNF- α は NO 産生に重要な役割を果たすことが示唆された。

12 系統の *Nramp1*^r マウスにおいて高い NO 産生を示す系統と低い系統との間でバッククロス群を作製した。バッククロス群において著しい NO 産生のばらつきが観察された。これらのことから、マクロファージにおける NO 産生は複数の遺伝子によることが示され、さらに高い NO 産生を示す個体と低い NO 産生を示す個体をバッククロス群から選び、遺伝子タイピングに供した。遺伝子タイピングの結果、いくつかの NO 産生を制御する遺伝子が候補として推測された。iNOS プロモーター領域のシークエンス解析でも、塩基置換や欠失といった変異が確認され、これらの変異は NF- κ B 結合領域あるいは γ -IRE 領域に近接しており、NO 産生の差との係わりが示唆された。

本研究は感染防御に係わる NO 産生に関して *Nramp1* と TNF- α 遺伝子が重要な役割

を果たし、さらには他の遺伝的因子の存在を予測した貴重な知見を提供するものである。よって審査員一同はアブレス・ジーン・ペナフローア氏が博士(獣医学)の学位を授与されるのに十分な資格を有するものと認めた。