

豚のインターロイキン18とその変換酵素に関する研究

宗田 吉 広

Studies on porcine interleukin-18 and interleukin-1 beta converting enzyme

Yoshihiro MUNETA

インターロイキン18 (IL-18) は、T細胞やNK細胞からのインターフェロン (IFN-) の発現をIL-12と相乗的に誘導し、Th1細胞の活性化とNK細胞活性を増強し、自然免疫と獲得免疫の両者に関与するサイトカインとしてその免疫学的役割が注目されている。IL-18は、当初IL-12と相乗的に働いてT細胞やNK細胞からのIFN-の産生を誘導する因子として、研究が進められてきたが、その後IL-18には多様な生物活性があることが明らかにされてきた。

まず、IL-18の注目すべき生物活性は、その強力なIFN-誘導能である。現在、家畜疾病の多くは、従来のワクチンで防御できない細胞内寄生病原体により引き起こされる。IL-18はIL-12とともに細胞内寄生病原体の防御や排除に中心的役割を果たすIFN-を誘導し、マクロファージを活性化して、生体防御能を高める役割を果たす。

また、IL-18はNK細胞の細胞傷害活性を増強することにより、自然免疫系を活性化する。家畜においては獲得免疫機構の未熟な幼弱期に疾病が多発するが、IL-18はこの時期の非特異的な生体防御能を高めて幼弱家畜の損耗を防ぎ、さらには、未熟な獲得免疫機構を刺激して、より早期に成熟させると考えられる。

さらに、IL-18はマクロファージのみならず、粘膜上皮細胞もその主要な産生細胞である。家畜臨床現場では、疾病はますます多様化、複雑化し、複合感染症や日和見感染症に代表される、呼吸器感染症や腸管感染症が問題化している。IL-18はこのような感染の最前線である粘膜上皮において、種々の病原体に対する適切な防御免疫反応の誘導に貢献していると考えられる。

ヘルパーT細胞はその産生するサイトカインのパターンから、IFN-やIL-2を産生し、細胞性免疫を誘導する

1型ヘルパーT (Th1) 細胞と、IL-4やIL-10を産生し、抗体応答を中心とした体液性免疫を誘導する2型ヘルパー (Th2) 細胞に分類される。最近の研究でIL-18は、IL-12存在下ではTh1免疫応答を引き起こすが、IL-12非存在下では、IL-4などの産生を誘導してTh2免疫応答を促進することが報告された。このIL-18の特性は、ワクチンアジュバントとしての応用を考える上で重要であり、IL-18はIL-12やIL-4などのサイトカインと組み合わせることにより、多様な病原体抗原に対して適切な防御免疫反応を誘導できることを示唆している。

このように、IL-18は獲得免疫と自然免疫、あるいは細胞性免疫と体液性免疫の両者に関与するサイトカインとして、獣医学領域を含め、IL-18によって制御される様々な病態の解明や、新たな予防・治療法の開発が期待されている。

以上のような背景から、本研究では、豚における様々な疾病の病態形成におけるIL-18の役割およびその予防・治療あるいはワクチンアジュバントへの利用の可能性を検討するため、まず、豚IL-18のcDNAをクローニングし、組換えタンパク質と抗豚IL-18モノクローナル抗体の作製を試み、モノクローナル抗体による豚IL-18の検出法および精製法を確立した。次いで、IL-18を前駆体から活性型へと変換するために必須な酵素である豚IL-1変換酵素 (ICE) 遺伝子のクローニングを行い、豚肺マクロファージにおけるICE、IL-1およびIL-18のmRNA発現を調べた。さらに、豚前駆体型IL-18と豚ICEの共発現による豚活性型IL-18の効率的生産系の開発に成功した。得られた成績は以下のように要約される。

第1章 豚IL-18遺伝子のクローニングと組換えタンパク質の発現

リポポリサッカライド (LPS) で刺激した豚の肺胞マクロファージより Total-RNA を抽出し、cDNA を合成した。豚IL-18の5'部分塩基配列を基に、3'RACE法により完全長の豚IL-18cDNAを得て、その塩基配列を決定した。豚IL-18のcDNAのオープンリーディングフレームは579塩基であり、192アミノ酸をコードしていた。予想されるアミノ酸配列はヒト、マウス及びラットのIL-18のアミノ酸配列とそれぞれ76.7%、64.7%および61.6%の相同性を示した。豚IL-18の前駆体型および活性型タンパク質をバキュロウィルスをベクターとして昆虫細胞Tn5中で発現させ、豚末梢血単核球からのIFN-誘導能を調べたところ、活性型IL-18にのみIFN-誘導能が認められた。

第2章 豚IL-18に対するモノクローナル抗体の作製とその利用

組換え豚IL-18に対するモノクローナル抗体を作製した。得られた抗体を用い、ウェスタンブロット法による豚IL-18の検出、ならびにイムノアフィニティークロマトグラフィーにより生物活性を有する豚IL-18の精製が可能となった。また、モノクローナル抗体を利用することにより、免疫組織化学染色による組織切片上での豚IL-18の検出や、サンドウィッチELISA法による、高感度な豚IL-18の定量が可能となった。

第3章 豚ICEのクローニング

ヒト、マウス及びラットのICEのアミノ酸配列に基づいて設計したプライマーを用いて、RT-PCR法により、豚ICEのcDNAをクローニングした。得られた豚ICEの

cDNAのオープンリーディングフレームは1215塩基であり、404アミノ酸をコードしていた。予想されるアミノ酸配列はヒト、マウス及びラットのICEのアミノ酸配列とそれぞれ72.5%、62.6%および64.1%の相同性を示した。LPSで刺激した豚肺胞マクロファージでのICE、IL-1およびIL-18のmRNA発現を調べたところ、LPS刺激によりICEの発現は増強され、IL-1とIL-18は異なった発現動態を示した。

第4章 豚活性型IL-18の効率的生産法の開発

通常、昆虫細胞は前駆体型IL-18が活性型IL-18にプロセッシングされるのに必要とされるICEを持たない。そこで、豚ICEを発現する組換えバキュロウィルスを作製し、昆虫細胞に感染させることにより、ICE活性を昆虫細胞に導入することに成功した。そして、豚ICEと豚前駆体型IL-18の共発現の系により、豚活性型IL-18を昆虫細胞培養上清中に効率よく分泌させることに成功した。得られた豚活性型IL-18は豚末梢血単核球からのIFN-産生をIL-12とともに強く誘導した。さらに、ICEの特異的阻害剤を用いたICE活性の阻害により、昆虫細胞中での前駆体型IL-18から活性型IL-18へのプロセッシングも阻害された。

以上の研究により、豚IL-18およびその変換酵素であるICEのcDNAを初めてクローニングすることができた。また、豚IL-18の検出や精製に有用な抗豚IL-18モノクローナル抗体および大量の組換え豚活性型IL-18が提供され、豚における様々な疾病での病態形成におけるIL-18の役割の研究、およびそれら疾病の予防・治療あるいはワクチンアジュバントとしてのIL-18の利用が可能となった。