

Effect of Major Histocompatibility Gene Complex on the Development of Carcinogen-induced Pulmonary Adenomas in Mice

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7856

化学発癌剤誘発マウス肺腫瘍発生に及ぼす 主要組織適合性遺伝子複合体の効果

金沢大学がん研究所分子免疫部 (主任: 右田俊介教授)

宮 下 信 泉

(昭和61年2月4日受付)

7系統の A.H-2 congenic 系および 12系統の B10.H-2 congenic 系マウスに対し、ウレタンおよび 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) を 1 回皮下注射し、肺腫瘍を誘発することにより、肺腫瘍発生に關与している H-2 complex 内の遺伝子座の同定を試みた。ウレタンの場合は 5 ヶ月後に、4NQO の場合は 7 ヶ月後に肺腫瘍の結節数を検査した。A 系 congenic マウスでは、ハプロタイプ a, t1 および a1 の系統において、b, s, f, および t2 の系統と比較して、有意に多くの結節が認められた。この結果は、H-2K-H-2D 間に存在する遺伝子により、発癌剤誘発肺腫瘍発生が遺伝的に統御されている可能性を示唆している。B10 系マウスにおけるウレタン誘発肺腫瘍結節数を比較すると、同様にハプロタイプ k, a および h2 の系統が、b, d, f, s, r, i3, h4, i5 および t4 の系統よりも、相対的に高発系であることが判明した。高発系の系統と低発系の系統との F_1 , (A × A.BY) F_1 および (B10 × B10.A) F_1 では、結節数が両親の中間値をとったのに対し、共に低発系である recombinant 系統の B10.A(4R) と B10.A(5R) の F_1 では、結節数が両親の系統よりも有意に多く認められた。以上のように、H-2 congenic マウスを用いたウレタンおよび 4NQO による肺腫瘍誘発実験においては、H-2 ハプロタイプにより宿主の感受性に差異が存在し、その系統分布のパターンは、乳酸脱水素酵素 B および免疫グロブリン G_{2a} 蛋白に対する免疫応答のパターンと一致した。つまり、この系統分布のパターンは、I-E 分子の多型性によるものと推測された。A/J 由来可移植性肺腫瘍の *in vivo* における増殖が、抗 I-E^k モノクローナル抗体の投与により抑制を受けるという実験結果もこれを支持する。以上の結果により、I-E^k 分子が肺腫瘍発生過程において、抗腫瘍免疫監視機構に対し、抑制的に機能している可能性が示唆された。

Key words pulmonary adenoma, urethan, 4NQO, H-2 complex, congenic mice

哺乳類の肺胞上皮には、I 型および II 型と呼ばれる 2 種類の上皮性細胞が存在している。マウスの呼吸器系に生ずる癌は、そのほとんどが II 型細胞由来の肺腺腫 (pulmonary adenoma) である^{1)~3)}。II 型細胞由来の肺腺腫に類似した腫瘍として、Clara 細胞由来の腺腫、及び腺癌がある。Clara 細胞由来の腺腫は、II 型細胞由来の肺腺腫とは性質の異なる腫瘍であるが、その発生機序には不明な点が多い⁴⁾。腺癌は肺腺腫が悪性化したものと考えられているが、II 型肺腺腫或いは Clara 細胞肺腺腫のどちらに由来するかは現在のところ不明である⁵⁾。これらの肺腫瘍は、マウスの肺葉の肺

胞膜直下に発生し、灰白色の限局性結節として認められ、周囲の正常組織とは識別が極めて容易である。このため解剖顕微鏡下での腫瘍結節数の測定が可能であり、定量的な発癌実験を行なうことができる。

マウスの近交系としては、主なものだけでもこれまでに 200 系統以上が報告されているが⁶⁾、そのうち数十系統について、これまでに自然発生および化学発癌剤を用いた誘発肺腫瘍発生に対する系統差が調べられている¹⁾²⁾⁶⁾⁷⁾。また 1926 年、Lynch⁸⁾がマウスの肺腫瘍発生には遺伝的要因が大きく関与していることを報告して以来、多くの研究者がこの遺伝的要因の解析に取

Abbreviations: APC, antigen presenting cell; CR, congenic recombinant; HBSS, Hanks' balanced salt solution; IgG2a, immunoglobulin gamma 2a; LDH-B, lactate dehydrogenase B; MHC, major histocompatibility gene complex; MoAb, monoclonal antibody; 4NQO, 4-

り組んできた。

肺腫瘍発生を支配している遺伝子に関しては、関与している遺伝子座が300近く存在しているという推定があるにもかかわらず⁹⁾、遺伝子の同定および染色体上の位置の決定はまだ行なわれていない。かつてHeston^{10)~12)}らが肺腫瘍発生に関連のある遺伝子座として、6種類の遺伝子 (*A^y, f, hr, sh-2, wa-2* および *ob*) を報告したが、これらは現在ではいずれも肺腫瘍発生を直接的に支配している遺伝子座とは考えられていない¹³⁾。また Tatchell¹⁴⁾、Falconer ら^{15)~17)}が、肺腫瘍高発系である A と低発系である C57BL/10 を用いた交雑および選択的交配実験により、肺腫瘍発生に対し抵抗性に機能している単一の劣性遺伝子を *pulmonary tumor resistance (ptr)* と命名し、第11番染色体上に存在する可能性を示唆した。しかしながら、recombinant inbred (RI) 系の一種である SWXL を用いたウレタン誘発肺腫瘍発生実験では、第11番染色体上には関与している遺伝子がマップされなかったことから (Taylor, B., 私信), *ptr* 遺伝子の染色体上の位置は依然として不明である。一方、他の RI 系を用いたウレタン誘発肺腫瘍発生に関与している遺伝子座の同定が、CXB 系統¹⁸⁾ および前述の A と C57BL/6 から作成された AXB, BXA 系統¹⁹⁾ で行なわれ、少なくとも3種類以上の遺伝子の関与が想定された。これらの遺伝子群は暫定的に、*pulmonary adenoma susceptibility (Pas)-1, -2* および *-3* と命名されている。

近年になり、主要組織適合性遺伝子複合体 (major histocompatibility gene complex, MHC) とヒトやマウスの腫瘍発生との関連性の解明が急速に進んで来た。特に、マウスにおけるウイルス性腫瘍発生に対する抵抗性を支配している遺伝子座が、マウスの MHC である H-2 complex に連鎖しているという報告が数多く出ている。また、これらの遺伝子群のほとんどが H-2 complex の class I および class II 遺伝子と同一であろうと想定されている²⁰⁾。

マウスの肺腫瘍発生と H-2 complex との関連性に関しては、H-2 congenic 系統が congenic recombinant (CR) 系統も含めて多数作成されるに従い、数例の報告が出ている。Smith ら²¹⁾は、H-2 および H-1 congenic 系統において、平均寿命の長さおよび自然発生腫瘍 (白血病, 肝癌, 乳癌および肺腫瘍) の発生率に系統差があることを報告している。Faraldo ら²²⁾は、自然発生肺腫瘍の発生率を支配している遺伝子座が、H-2 complex 内の I-B 領域に存在する可能性を示唆

したが、I 領域の DNA 解析により、I-B 領域に隣接していると考えられていた I-A および I-E 領域の DNA 塩基配列が連続している事実が証明され、I-B 領域の存在自体が否定的となっている²³⁾。

化学発癌剤による誘発肺腫瘍実験では、H-2 congenic 系統に対して、ジメチルニトロソアミンを腹腔内注射するか、一定期間飲み水に溶解させて投与した結果、H-2 ハプロタイプにより系統差が生じたことが報告されている²⁴⁾。また、エチルニトロソウレアを妊娠雌に投与し、その胎子が発育した後に生じた肺腫瘍の発生頻度および大きさを congenic 系統で比較したところ、肺上皮型の肺腫瘍の発生率を支配している遺伝子座は I-B から D 領域にかけて、嚢胞状型の肺腫瘍結節の増殖能を支配する遺伝子座は D 領域周辺に存在することが示唆されている²⁵⁾。

本研究においては、H-2 congenic および CR 系マウスに対し、ウレタンおよび 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) を皮下注射することにより肺腫瘍を誘発し、H-2 complex 内に存在が想定されている肺腫瘍発生に関与している遺伝子座の同定を試みた。さらに抗 I-E^k モノクローナル抗体 (monoclonal antibody, MoAb) 投与による可移植性肺腫瘍 (A/J 449LT) の増殖能の変化を *in vivo* で観察したので、これらの結果を報告する。

材料および方法

I. 材 料

1. マウス

以下にあげる系統は、Jackson 研究所 (米国) より分与された: A/WySnJ (ハプロタイプ H-2^a), A.SW/SnJ (H-2^s), A.CA/SnJ (H-2ⁱ), A.BY/SnJ (H-2^b), A/J (H-2^a), C57BL/10SgSnJ (H-2^b), B10.A/SgSnJ (H-2^a), B10.BR/SgSnJ (H-2^b), B10.D2/nSnJ (H-2^d), B10.M/SnJ (H-2ⁱ), B10.RIII(71NS)/SnJ (H-2^r), B10.A(2R)/SgSnJ (H-2^{h2}) および B10.A(5R)/SgSnJ (H-2^{h5})。また、A.AL/Ola (H-2^{al}), A.TL/Ola (H-2^{tl}), A.TH/Ola (H-2th), B10.A(3R)/Ola (H-2^{h3}), B10.A(4R)/Ola (H-2^{h4}), B10.S/Ola (H-2^s) および B10.S(9R)/Ola (H-2^{h9}) を Oxfordshire Laboratory Animal Colony (英国) から購入した。なお、これらの系統は国立遺伝学研究所 (三島) で維持されている。また、H-2 ハプロタイプの同定は城石らの方法によった²⁶⁾。(A×A.BY)F1, (B10×B10.A) F1 および (B10.A(4R)×B10.A(5R)) F1 は上記の系統の交配により作成した。

nitroquinoline 1-oxide; RI, recombinant inbred; Tc, killer T; Th, helper T; Ts, suppressor T; TSA, tumor specific antigen.

2. 可移植性肺腫瘍細胞株および MoAb

A/J 由来自家性肺腫瘍より樹立した可移植性肺腫瘍細胞株 (449LT) は、大阪大学医学部放射線基礎医学教室 (野村大成助教授) より分与を受け、同系の A/J マウスに継代移植し維持した。

また、腹水型抗 I-E^k MoAb (14-4-4) は、米国 NIH 尾里啓子博士より分与を受けた。

3. 試薬

ウレタン (和光純薬), 4NQO (和光純薬), ディスパーゼ (合同酒精), プロピレングリコール (和光純薬), Hanks' balanced salt solution (HBSS) (GIBCO), その他の試薬はすべて和光純薬特級を用いた。

II. 方法

1. 化学発癌剤誘発肺腫瘍発生実験

生後 21 日目のマウスの右腹部に 1.5 mg/g 体重の割合で 15%ウレタン水溶液を 1 回皮下注射した。ウレタン処理後 5 ヶ月目に、各器官の腫瘍の有無を検査したのち、肺を剔出し、エタノール/ホルムアルデヒド固定液 (9 : 1) で固定した。4NQO の場合も同様に、生後 21 日目のマウス右腹部に 12.5 μg/g 体重の割合で、0.125%4NQO プロピレングリコール 50%水溶液を皮下注射した。処理後 7 ヶ月目に器官の腫瘍の有無を検査し、ウレタンと同一の方法で肺を固定した。

誘発された腫瘍のうち、そのほとんどが肺腺腫 (pulmonary adenoma) で、まれに肉腫、胸腺型白血病、卵巣および肝臓等に腫瘍を持つものがあつた。肺に関しては、24 時間以上上記のエタノール/ホルマリン固定液で固定した後、解剖顕微鏡下で肺腫瘍結節数を測定した。肺腫瘍の頻度は、各系統ごとに以下の方法で求めた。

・ 個体あたりの肺腫瘍の結節数

$$\text{肺腫瘍発生率} = \frac{\text{肺腫瘍をもつマウスの全個体数}}{\text{観察時における生存マウスの全個体数}}$$

2. MoAb による腫瘍増殖抑制実験

449LT を継代移植している同系マウスから剔出し、37°C30 分間ディスパーゼ (1000 PU/ml) で消化した後、HBSS で 3 回洗浄し、2.0 × 10⁷ cells/ml の細胞浮遊液を調製した。次いで、この浮遊液 0.1 ml を 8 から 10 週令の A/J マウスの背部皮下に注射した。

腹水型抗 I-E^k MoAb (14-4-4) は HBSS で 10% に希釈し、449LT 移植当日から検査日 (3, 5, 8 および 10 日目) まで毎日尾静脈に 0.2 ml 注射した。皮下で増殖した腫瘍の直径を直角二方向に測定することにより²⁷⁾、腫瘍の表面積を算出した。

3. 統計学的検定法

化学発癌剤誘発肺腫瘍発生実験では、個体あたりの肺腫瘍平均結節数の比較は、Student の t-検定を用い、肺腫瘍の発生率は X²-検定を用いて系統間の比較を行った。

MoAb による肺腫瘍増殖抑制実験に関しては、それぞれの実験群において 3 頭から 5 頭のマウスを用い、群内の測定値の比較には、Student の t-検定を用いた。

成 績

I. A 系 H-2 congenic マウスにおけるウレタンおよび 4NQO を用いた肺腫瘍誘発実験

7 系統の A.H-2 congenic 系統において、ウレタンおよび 4NQO により肺腫瘍の誘発を試みた (表 1)。ウレタンを用いた場合、7 系統とも肺腫瘍発生率は

Table 1. Effect of H-2 complex on urethan- and 4NQO-induced pulmonary adenoma in H-2 congenic strains with an A/Wy background

Strain	H-2 haplotype	Alleles at H-2 loci						Urethan treatment ^a		4NQO treatment ^a	
		K	A _β	A _α	E _β	E _α	D	Tumor No. ^b , mean ± S.E.M.	Incidence: No. of mice with tumors/total No. of surviving mice	Tumor No. ^b , mean ± S.E.M.	Incidence: No. of mice with tumors/total No. of surviving mice
A/Wy	a	k	k	k	k	k	d	30.6 ± 1.3	24/24	9.0 ± 2.1	11/13
A. SW	s	s	s	s	(s)	(s)	s	12.3 ± 0.7*	51/51	5.0 ± 0.5*	24/25
A. TH	t2	s	s	s	(s)	(s)	d	15.6 ± 2.2*	7/7	4.0 ± 1.0*	14/16
A. AL	a1	k	k	k	k	k	d	26.9 ± 1.9	16/16	12.0 ± 2.0	15/16
A. TL	t1	s	k	k	k	k	d	25.8 ± 2.8	8/8	10.0 ± 2.4	13/14
A. CA	f	f	f	f	(f)	(f)	f	17.0 ± 0.6*	58/58	4.8 ± 0.9*	32/37
A. BY	b	b	b	b	(b)	(b)	b	13.8 ± 0.6*	53/53	5.0 ± 0.9*	7/10

^aMice received an injection of 1.5 mg urethan/g body weight or 12.5 μg 4NQO/g body weight.

^bStudent's t-test was applied. *p < 0.001, in comparison to A strain.

Alleles in parentheses are not expressed on the cell surface.

100%であったが、個体あたりの肺腫瘍結節数には H-2 ハプロタイプにより差が生じ、大別して2群に分けることができた。すなわち、A/Wy (H-2 ハプロタイプ: H-2^a), A.TL (H-2^l), および A.AL (H-2^a) は高発系, A.TH (H-2^b), A.SW (H-2^a), A.BY (H-2^b) および A.CA (H-2^l) は低発系であった。高発系および低発系の両群を比較すると、個体あたりの肺腫瘍の結節数には有意な差が存在した ($p < 0.001$)。4NQO の場合も同様に A/Wy, A.TL および A.AL が肺腫瘍結節数において高発系となり、A.TH, A.SW, A.BY および A.CA は低発系となった ($p < 0.001$)。肺腫瘍発生率は高発系群の A/Wy が 85%, A.TL が 93%, A.AL が 94% であったのに対し、低発系群の A.TH が 88%, A.SW が 96%, A.BY 70% および A.CA が 86% であった。肺腫瘍発生率においては、H-2 ハプロタイプによる差は検出できなかった ($p > 0.10$)。

II. B10 系 H-2 congenic マウスにおけるウレタンによる肺腫瘍誘発実験

12 系統の H-2 congenic マウスを個体あたりの肺腫瘍結節数で2群に分類すると、B10.A (H-2^a), B10.BR (H-2^k) および B10.A(2R) (H-2^{h2}) は高発系, B10 (H-2^b), B10.D2 (H-2^d), B10.S (H-2^s), B10.M (H-2^f), B10.RIII (H-2^r), B10.A (3R) (H-2ⁱ³), B10.A(4R) (H-2^{h4}), B10.A(5R) (H-2ⁱ⁵) および B10.S(9R) (H-2^{t4}) が低発系であった(表2)。肺腫瘍の発生率において高発系群と

低発系群を比較すると、B10.A と B10.S との間には有意な差が認められなかったが、他の系統間の比較においては X²-検定で有意な差 ($p < 0.05$) が認められた。

III. H-2 congenic 系統間の F₁ におけるウレタン誘発肺腫瘍発生

肺腫瘍高発系である A/Wy と低発系である A.BY の F₁ において、両親の系統とウレタン誘発肺腫瘍の頻度を比較した(表3)。(A×A.BY) F₁ における個体あたりの肺腫瘍結節数は、両親の系統の中間値をとり、両親のいずれの系統に対しても有意な差を示した ($p < 0.001$)。また、肺腫瘍発生率は両親の系統と同じく 100% であった。

高発系である B10.A と低発系である B10 の F₁ においても、肺腫瘍の結節数は両親の系統の中間値をとっているが、統計的に有意な差はなかった ($p > 0.10$)。一方、共に低発系である B10.A(4R) と B10.A(5R) の F₁ では、肺腫瘍結節数が両親の系統よりも有意に増加していた ($p < 0.05$)。

IV. 肺腫瘍発生と I-E (E_αE_β) 分子の相関関係

異種抗原である B 型乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase B, LDH-B) および BALB/c マウス形質細胞腫蛋白である免疫グロブリン G2a (immunoglobulin gamma 2a, IgG2a) に対する、H-2 ハプロタイプによる免疫応答能の差^{28)~31)}と、肺腫瘍発生に対する系統差を比較した。LDH-B および IgG2a に対する

Table 2. Urethan-induced pulmonary adenoma in H-2 congenic strains with a B10 background

Strain	H-2 haplotype	Type of E molecule	Tumor No. ^a , mean ± S.E.M.	Incidence: ^b No. of mice with tumors/total No. of surviving mice
B10.A	a	E _k E _k	1.2 ± 0.2	20/26
B10.BR	k	E _k E _k	1.3 ± 0.2	12/26
B10.A(2R)	h2	E _k E _k	1.2 ± 0.2	22/37
B10.D2	d	E _d E _d	0.3 ± 0.1**	4/15**
B10.RIII	r	E _r E _r	0.4 ± 0.1**	8/21*
B10.A(3R)	i3	E _k E _k	0.7 ± 0.2*	18/37*
B10.A(5R)	i5	E _k E _k	0.5 ± 0.1***	15/42**
B10.S(9R)	t4	E _k E _k	0.6 ± 0.2*	7/16*
B10	b	— ^c	0.7 ± 0.2*	17/37*
B10.S	s	—	0.7 ± 0.1*	14/24
B10.M	f	—	0.5 ± 0.1***	19/46**
B10.A(4R)	h4	—	0.6 ± 0.1**	28/59*

Mice were given single injections of 1.5 mg urethan/g body weight.

^aStudent's t-test was applied. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, in comparison to B10.A strain.

^bChi-square test was applied. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, in comparison to B10.A strain.

^cE molecules are not expressed.

免疫応答能は, *in vivo* における抗体産生能および *in vitro* における T 細胞増殖反応によって, I-E 分子によって遺伝的に拘束されていることが判明している. 肺腫瘍発生において高発系の系統は LDH-B および IgG2a に対し低反応性の系統と一致した. これらの系統は, いずれも E α 座と E β 座の遺伝子型が共に k であり, I-E^k 分子を細胞膜上に発現している (表 4).

V. 抗 I-E^k MoAb による可移植性肺腫瘍増殖の抑制

449LT を 2.0×10⁶ 細胞 A/J マウスに移植後, 抗 I-E^k MoAb (14-4-4) を毎日投与し, 3, 5, 8 および 10 日目に腫瘍の表面積を測定したところ, 腫瘍の表面積は対照実験 (HBSS 静注) に比較して有意に抑制された (3 日目, *p*<0.01; 5 日目, *p*<0.01; 8 日目, *p*<0.05; 10 日目, *p*<0.02) (図 1).

考 察

H-2 congenic マウスにおけるウレタンおよび

Table 3. Urethan-induced pulmonary adenoma in F₁ hybrids of H-2 congenic strains

Strain	H-2 haplotype	Type of E molecule	Tumor No ^a , mean±S.E.M	Incidence: No. of mice with tumors/total No. of surviving mice
A/Wy	a	E $\frac{1}{2}$ E $\frac{2}{2}$	30.6±1.3	24/24
A.By	b	— ^b	13.8±0.6	58/58
(A×A.BY)F ₁	a/b	E $\frac{1}{2}$ E $\frac{2}{2}$, E $\frac{2}{2}$ E $\frac{1}{2}$	23.9±1.3**	25/25
B10.A	a	E $\frac{1}{2}$ E $\frac{2}{2}$	1.2±0.2	20/26
B10	b	—	0.7±0.2	17/37
(B10×B10.A)F ₁	a/b	E $\frac{1}{2}$ E $\frac{2}{2}$, E $\frac{2}{2}$ E $\frac{1}{2}$	1.0±0.1	21/40
B10.A(4R)	h4	—	0.6±0.1	28/59
B10.A(5R)	i5	E $\frac{1}{2}$ E $\frac{2}{2}$	0.5±0.1	15/42
(B10.A(4R)×B10.A(5R))F ₁	h4/i5	E $\frac{1}{2}$ E $\frac{2}{2}$, E $\frac{2}{2}$ E $\frac{1}{2}$	1.0±0.2*	18/30

Mice were given single injections of 1.5 mg urethan/g body weight.

^aStudent t-test was applied. *, *p*<0.05; **, *p*<0.001, in comparison to both of parental strains.

^bE molecules are not expressed.

Table 4. Pulmonary adenoma formation and immune responses to LDH-B and IgG2a in H-2 congenic mice

H-2 haplotype	Type of E molecule	pulmonary adenoma formation	Immune response to			
			LDH-B		IgG2a	
			in vivo	in vitro	in vivo	in vitro
k	E $\frac{1}{2}$ E $\frac{2}{2}$	S	L	L	L	L
a	E $\frac{1}{2}$ E $\frac{2}{2}$	S	L	L	L	L
t1	E $\frac{1}{2}$ E $\frac{2}{2}$	S	L	N.T.	N.T.	L
a1	E $\frac{1}{2}$ E $\frac{2}{2}$	S	L	L	N.T.	N.T.
h2	E $\frac{1}{2}$ E $\frac{2}{2}$	S	L	L	L	L
d	E $\frac{1}{2}$ E $\frac{2}{2}$	R	H	H	L	N.T.
r	E $\frac{1}{2}$ E $\frac{2}{2}$	R	H	H	H	N.T.
i5	E $\frac{1}{2}$ E $\frac{2}{2}$	R	H	H	H	H
t4	E $\frac{1}{2}$ E $\frac{2}{2}$	R	H	H	N.T.	H
b	—	R	H	H	H	H
h4	—	R	H	H	H	H
s	—	R	H	H	H	H
f	—	R	H	H	H	N.T.
t2	—	R	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.

Abbreviations: S, susceptible strain; R, resistant strain; L, low responder; H, High responder.

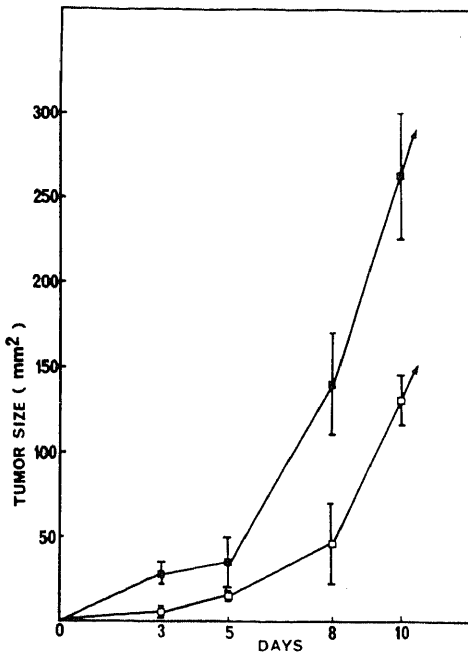


Fig. 1. Inhibition of tumor growth by 14-4-4 (anti-I-E^k MoAb) in A/J mice. Mice received 2×10^6 A/J 449LT cells subcutaneously on day 0. They were injected on day 0 to the day of observation with 0.2 ml of either HBSS (—■—) or a 1:10 dilution of 14-4-4 (—□—). Statistical analyses were performed by Student's t-test (day 3, $p < 0.01$; day 5, $p < 0.01$; day 8, $p < 0.05$; day 10, $p < 0.02$). Each value represents mean \pm S.E.M.

4NQOで誘発した肺腫瘍の個体あたりの結節数を比較すると、H-2ハプロタイプにより2つの群に大別された。すなわち高発系の系統はハプロタイプ a, a1, t1 および h2 であり、低発系の系統は b, d, s, f, r, i3, h4, i5 および t4 であった。

肺腫瘍高発系である A/Wy (遺伝子型 $K^k A^k E^k S^d D^d$) および低発系である A.SW ($K^s A^s E^s S^d D^d$) の2系統の CR 系に相当する A.TH ($K^s A^s E^k S^d D^d$) は低発系であったことから、肺腫瘍発生に関連のある遺伝子が、D遺伝子座より左側に存在していることになる。さらに高発系である A.AL ($K^k A^k E^k S^d D^d$) と A.SW ($K^s A^s E^s S^d D^d$) の CR 系統である A.TL ($K^s A^k E^k S^d D^d$) が高発系であったことから、肺腫瘍発生に関連のある遺伝子は K 遺伝子座より右側に存在することになる。

次に H-2 complex 内の K-D 間で組み換えを起している B10.H-2 congenic 系統で、ウレタン誘発肺腫瘍結節数および発生率を比較したところ、 E_β 遺伝子座および E_α 遺伝子座の遺伝子型が共に k である系統が、

それ以外の遺伝子型を保持している系統と比較して相対的に高発系となったことから、 E_β 座および E_α 座が肺腫瘍発生に関与している可能性が示唆された。この E_β 座および E_α 座の遺伝子産物は、それぞれ E_β 鎖 (分子量 28,000) および E_α 鎖 (分子量 32,000) と呼ばれ、主に B 細胞およびマクロファージの細胞膜表面で非共有結合で会合し、I-E ($E_\alpha E_\beta$) 分子として発現していることが知られている。E 分子を発現していない B10.A(4R) と $E_\alpha E_\beta$ 分子を発現している B10.A(5R) の F_1 の場合、両親の系統とは異なり、 $E_\alpha E_\beta$ 分子を膜上に発現している。この F_1 では、共に低発系である両親の系統よりも、有意に肺腫瘍の結節数が多くなっていた。つまり H-2 congenic 系統のうち I-E^k ($E_\alpha E_\beta$) 分子を発現している系統のみが、他の種類の I-E 分子を発現している系統、および I-E 分子を膜表面に発現していない系統と比較して、肺腫瘍発生に関して相対的に高発系であると考えられる。

特定の異種抗原に対する宿主の免疫応答能は、マウスの系統によって反応型に差異があり、高反応性の系統と低反応性あるいは無反応性の系統がある。この反応性は H-2 complex の I 領域によって支配をうけ、抗体産生は B 細胞と helper T (Th) 細胞の協同作用によって生じ、I 領域にコードされている I-A ($A_\alpha A_\beta$) および I-E ($E_\alpha E_\beta$) 分子によって、遺伝的に拘束されていることが知られている。特に LDH-B および IgG2a に対する抗体産生において、Th 細胞の誘導は I-A 分子で拘束され、suppressor T (Ts) 細胞の誘導は I-E 分子により拘束されていると考えられている。これは *in vitro* で、I-E^k 分子を発現している無反応性の系統 (例えば B10.A, A.AL 等) において抗 I-E^k MoAb 処理により T 細胞の増殖反応が観察され、逆に高反応性の系統 (例えば B6, B10.D2 等) において抗 I-A MoAb 処理により抑制を受けた実験結果により証明されている³⁰⁾。

I-E 分子によって遺伝的に統御されている肺腫瘍発生に対する宿主の応答が、LDH-B および IgG2a に対する免疫応答の機構と類似していると仮定した場合、肺腫瘍細胞の膜表面に抗原認識の対象となるような腫瘍特異抗原 (tumor specific antigen, TSA) が発現している必要がある。さらに抗原提示細胞 (antigen presenting cell, APC) の膜上で、Th 細胞は TSA と共に I-A 分子を認識し、Th 細胞および killer T (Tc) 細胞の増殖を特異的に抑制する Ts 細胞は TSA と共に I-E 分子を認識していることになる。

この仮説に従った場合、I-E^k 分子を発現している系統では、Ts 細胞が APC 上の I-E^k 分子に拘束されて誘導されるために、Th あるいは肺腫瘍細胞を標的細

胞として認識する Tc 細胞の増殖が抑制され、結果的に高発系になると考えられる。それに対し、他の種類の I-E 分子を発現している系統あるいは I-E 分子を発現していない系統では、Ts 細胞が誘導されないために、肺腫瘍発生に対する抗腫瘍免疫機構が抑制されず、低発系になると考えることができる。

また、*in vivo* における可移植性肺腫瘍の増殖が、抗 I-E^k MoAb により抑制された実験結果から、APC 上の I-E^k 分子を MoAb で覆うことにより、抗腫瘍免疫を抑制する Ts 細胞の増殖がおさえられた可能性が示唆され、やはりこの仮説を支持しているように思われる。

本研究におけるウレタンおよび 4NQO 皮下注射、ジメチルニトロソアミン腹腔内注射²⁴⁾、エチルニトロソウレア経胎盤投与²⁵⁾、さらに自然発生²¹⁾²²⁾のいずれの場合においても、I-E^k 分子を発現している系統が、他の系統よりも肺腫瘍高発系となっていた。肺腫瘍発生に関与している I-E 分子の遺伝的影響は、化学発癌剤の種類に対し非特異的であるといえる。つまり I-E 分子は特定の化学発癌剤の代謝に関与しているのではなく、肺腫瘍の発生過程において、抗腫瘍免疫監視機構に関与している可能性が示唆される。

H-2 complex 以外の遺伝的背景に存在する遺伝子で、肺腫瘍発生に関与しているものがあることは、これまでに多くの報告があるが⁶⁾¹⁹⁾²²⁾、それらの遺伝子の染色体上の位置および遺伝子産物の機能は不明である。Malkinson ら¹⁹⁾は、肺腫瘍発生に関与している遺伝子群を *Pas* と命名し、*Pas* 遺伝子群は癌原遺伝子を活性化させる機能か、癌遺伝子近傍の DNA 傷害を修復する機能を持っているのではないかと推定している。さらに、肺腫瘍発生に関与する主要遺伝子と想定されている *Pas-1* は、H-2 complex とは別の遺伝子であると報告している¹⁹⁾。

本研究により、H-2 complex の遺伝子産物のひとつである I-E 分子が、肺腫瘍発生に対して免疫的に関与している可能性が示唆されたが、肺腫瘍に対する免疫機構を解明していくためには、*in vitro* における細胞傷害試験等を行なう必要があると思われる。また肺腫瘍発生におよぼす、I-E 分子と同じ I 領域遺伝子産物である I-A 分子の機能、さらに *Pas* 遺伝子群と I 領域遺伝子の肺腫瘍発生における相関関係にも注目すべきであると思われる。

結 論

ウレタンおよび 4NQO により誘発される肺腫瘍発生に対する H-2 complex の遺伝的影響について、H-2 congenic マウスを用いて検討し、以下の成績を得

た。

1. 7 系統の A 系 congenic マウスにおける、ウレタンおよび 4NQO 誘発肺腫瘍の結節数を比較した結果、H-2 complex の K 座と D 座の間に肺腫瘍発生に関連のある遺伝子の存在が示唆された。

2. 12 系統の B10 系 congenic マウスにおける、ウレタン誘発肺腫瘍結節数および発生率を比較した結果、I-E 分子が肺腫瘍発生過程に関与している可能性が示唆された。

3. 抗 I-E^k MoAb の投与により、*in vivo* における A/J 由来可移植性肺腫瘍細胞株の増殖が抑制された。

以上の結果により、I-E^k 分子が肺腫瘍発生過程において、抗腫瘍免疫監視機構に対し抑制的に機能している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った右田俊介教授に深謝いたします。本研究の遂行にあたり、御指導、御教示を賜った国立遺伝学研究所森脇和郎教授に深く感謝いたします。また可移植性肺腫瘍細胞を分与して下さった大阪大学野村大成助教授、モノクローナル抗体を分与して下さった米国 NIH 尾里啓子博士に感謝いたします。

なお、本論文の研究内容は Immunogenetics に投稿中である。

文 献

- 1) Shimkin, M. B.: Pulmonary tumors in experimental animals. *Adv. Cancer Res.*, **3**, 223-267 (1955).
- 2) Shimkin, M. B., & Stoner, G. D.: Lung tumors in mice: application to carcinogenesis bioassay. *Adv. Cancer Res.*, **21**, 1-58 (1975).
- 3) Theiss, J. C. & Shimkin, M. B.: Neoplasms of respiratory system. p477-484. In H. L. Foster, J. D. Small & J. C. Fox (ed.), *The mouse in biomedical research*, vol IV, Academic Press, London, 1982.
- 4) Kauffman, S. L., Alexander, L., & Sass, L.: Histologic and ultrastructural features of the Clara cell adenoma of the mouse lung. *Lab. Invest.* **40**, 708-716 (1979).
- 5) Staats, J.: Standardized nomenclature for inbred strains of mice: eighth listing. *Cancer Res.*, **45**, 945-977 (1985).
- 6) Malkinson, A. M., & Beer, D. S.: Major effect on susceptibility to urethan-induced pulmonary adenoma by a single gene in BALB/cBy mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **70**, 931-936 (1983).

- 7) **Beer, D. G. & Malkinson, A. M.**: Genetic influence on type 2 or Clara cell origin of pulmonary adenomas in urethan-treated mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **75**, 936-969 (1985).
- 8) **Lynch, C. J.**: Studies of the relation between tumor susceptibility and heredity. III. Spontaneous tumors of the lung in mice. *J. Exp. Med.*, **43**, 339-355 (1926).
- 9) 近藤宗平・野村大成・梁 治子: 発癌性突然変異を考える—マウスとショウジョウバエを中心に—*Jpn. J. Genet.*, **57**, 321-336 (1982).
- 10) **Heston, W. E.**: Relationship between susceptibility to induced pulmonary tumors and certain known genes in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2**, 127-132 (1941).
- 11) **Heston, W. E.**: Relationship between the lethal yellow (A^y) gene of the mouse and susceptibility to induced pulmonary tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, **3**, 303-308 (1942).
- 12) **Heston, W. E.**: Relationship between the hairless gene and susceptibility to induced pulmonary tumors in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **10**, 119-124 (1949).
- 13) **Deringer, M. K.**: Influence of the lethal yellow (A^y) gene on development of reticular neoplasms. *J. Natl. Cancer Inst.*, **45**, 1205-1210 (1970).
- 14) **Tatchell, J. A. H.**: Pulmonary tumors, group VII and sex in the house-mouse. *Nature*, **190**, 837-838 (1961).
- 15) **Falconer, D. S., & Bloom, J. L.**: Inheritance of susceptibility to induced pulmonary tumors in mice. *Nature*, **190**, 1070-1071 (1961).
- 16) **Falconer, D. S., & Bloom, J. L.**: Changes in susceptibility to urethane-induced lung tumors produced by selective breeding in mice. *Brit. J. Cancer* **18**, 322-332 (1964).
- 17) **Bloom, J. L., & Falconer, D. S.**: A gene with major effect on susceptibility to induced lung tumors in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **33**, 607-617 (1964).
- 18) **Malkinson, A. M., & Beer, D. S.**: Pharmacologic and genetic studies on the modulatory effects of butylated hydroxytoluene on mouse lung adenoma formation. *J. Natl. Cancer Inst.*, **73**, 925-933 (1985).
- 19) **Malkinson, A. M., Nesbitt, M. N., & Skamene, E.**: Susceptibility to urethan-induced pulmonary adenomas between A/J and C57BL/6J mice: use of AXB and BXA recombinant inbred lines indicating a three-locus genetic model. *J. Natl. Cancer Inst.*, **75**, 971-974 (1985).
- 20) **Klein, J., Figueroa, F. & David, C. S.**: H-2 haplotypes, genes and antigens: second listing. II. The H-2 complex. *Immunogenetics* **17**, 553-596 (1983).
- 21) **Smith, G. S., & Walford, R. L.**: Influence of the H-2 and H-1 histocompatibility systems upon life span and spontaneous cancer incidences in congenic mice. *Birth Defects*, **14**, 281-312 (1978).
- 22) **Faraldo, M. J., Dax, A., Mühlbock, O., & Hart, G.**: Histocompatibility genes (the H-2 complex) and susceptibility to spontaneous lung tumors in mice. *Immunogenetics*, **9**, 383-404 (1979).
- 23) **Steinmetz, M., Minard, K., Horvath, S., McNicholas, J. Frelinger, J., Wake, C., Long, E., Mach, B., & Hood, L.**: A molecular map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse. *Nature*, **300**, 35-42 (1982).
- 24) **Den Engelse, L., Oomen, L. C. J. M., Van Der Valk, M. A., Hart, A. A. M., Dax, A., & Emmelot, P.**: Studies on lung tumors. V. Susceptibility of mice to dimethylnitrosamine-induced tumor formation in relation to H-2 haplotype. *Int. J. Cancer*, **28**, 199-208 (1981).
- 25) **Oomen, L. C. J. M., Demant, P., Hart, A. A. M. & Emmelot, P.**: Multiple genes in the H-2 complex affect differently the number and growth rate transplacentally induced lung tumors in mice. *Int. J. Cancer*, **31**, 447-454 (1983).
- 26) **Shiroishi, T., Sagai, T., & Moriwaki, K.**: A simplified micro-method for cytotoxicity testing using a flat-type titration plate for detection of H-2 antigens. *Microbiol. Immunol.*, **25**, 1327-1334 (1981).
- 27) **Drebin, J. A., Waltenbaugh, C., Schatten, S., Benacerraf, B., & Greene, M. I.**: Inhibition of tumor growth by monoclonal anti-I-J antibodies. *J. Immunol.*, **130**, 506-509 (1983).
- 28) **Shreffler, D. C. & David, C. S.**: The H-2 major histocompatibility complex and the I immune response region: genetic variation, function, and organization, p125-195. In F. J. Dixon & H. G.

Kunkel (ed.), *Advances in immunology*, vol.20, Academic Press, London, 1975.

29) Melchers, I., & Rajewsky, K.: Functional complementation and polymorphism of H-2 linked immune response genes, p77-86, In H. O. McDevitt (ed.), *Ir genes and Ia antigens*, Academic Press, London, 1978.

30) Baxevanis, C. N., Nagy, Z. A., & Klein, J.: A

novel type of T-T cell interaction removes the requirement for I-B region in the H-2 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3809-3813 (1981).

31) Gutmann, D. H., Allen, P. M., & Niederhuber, J. E.: Separation of the immune response genes for LDH-B and MOPC-173. I. Description of an immune response defect in B10.BASR1. *J. Immunol.*, 131, 2919-2923 (1983).

Effect of Major Histocompatibility Gene Complex on the Development of Carcinogen-induced Pulmonary Adenomas in Mice Nobumoto Miyashita, Department of Molecular Immunology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *J. Juzen Med. Soc.*, 95, 161-169 (1986)

Key words: pulmonary adenoma, urethan, 4NQO, H-2 complex, congenic mice

Abstract

The present study was performed to determine the locus in the H-2 complex which affects the development of pulmonary adenomas. For that purpose, a single subcutaneous injection of either urethan or 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) was administered to 7 H-2 congenic strains with an A/Wy background and 12 with a B10.

In H-2 congenic strains with an A/Wy background, the number of adenoma foci was checked 5 months after the urethan treatment, and 7 months after the 4NQO treatment. The average number of adenoma foci per mouse was significantly higher in H-2 haplotypes a, t1 and a1, than in b, s, f and t2. These data showed that some gene (or genes) in the H-2K - H-2D interval determined the susceptibility to the development of carcinogen-induced pulmonary adenomas. In the case of H-2 congenic strains with a B10 background, the average number of adenoma foci per mouse induced by urethan was also higher in H-2 haplotypes k, a and h2, than in b, d, f, s, r, i3, h4, i5 and t4. The number of adenoma foci in F1 hybrids between the susceptible and resistant strains, such as (A x A. BY) F1 and (B10 x B10.A) F1 hybrids, was intermediate between those of the two parental strains. On the other hand, in (B10.A(4R) x B10.A(5R)) F1 mice, the number of adenoma foci was higher than in resistant parental strains which were recombinants of H-2^a and H-2^b.

These patterns of response to carcinogens paralleled those obtained for immune response to lactate dehydrogenase-beta (LDH-B) and immunoglobulin gamma 2a (IgG2a) proteins. The difference in susceptibility to the development of pulmonary adenomas in H-2 congenic mice is likely to be due to the polymorphism of the I-E molecule, which is encoded by the E α and E β loci in the H-2 complex. This possibility was also supported by the fact that the injection of anti-I-E^k monoclonal antibody (MoAb) could inhibit the growth of A/J derived transplantable lung tumor *in vivo*. These results suggest that the I-E^k molecule has a function of suppression of immune surveillance system against the development of pulmonary adenomas.