Role of natural killer activity in UVB-carcinogenesis revealed by using newly established immunodeficient mice

メタデータ	言語: eng
	出版者:
	公開日: 2017-10-05
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 石垣, 靖人
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16234

氏　　名	石 垣 靖 人
生 年 月 日	
本　　籍	石川県
学 位 の 種 類	博士（薬学）
学 位 記 番 号	博乙第169号
学位授与の日付	平成10年9月30日
学位授与の要件	論文博士（学位規則第4条第2項）
学位授与の題目	Role of natural killer activity in UVB-carcinogenesis revealed by using newly established immunodeficient mice （紫外線発がんにおけるナチュラルキラー活性の関与－新規免疫欠損マウスを用いた解析－）
論 文 審 査 委 員	（ 主 査 ）二階堂 修 （ 副 査 ）松永 司，宮本 謙一，中西 義信，早川 純一郎

学 位 論 文 要 旨

To evaluate a role of natural killer (NK) activity in ultraviolet (UV)-carcinogenesis, its participation was assessed by the experiments using newly established immunodeficient mouse strains. By the introduction of immunodeficient genes (*beige* that causes the lack of NK activity and *xid* that induces deficiency of B cell response) into KSN nude mice, various congenic immunodeficient strains with high reproductive performance were established. These strains are useful as immunodeficient model in comparative study.

Using parental KSN nude mice, systemic UVB-carcinogenesis model was established and compared with other reports using hairless mice. After clarifying no suppression of NK activity in KSN mice irradiated with UV continuously, I compared kinetics of UVB-carcinogenesis between KSN with high NK activity and NK-deficient KSN-bg mice. The data showed the suppressive contribution of NK activity in low dose UVB-carcinogenesis. In addition to this *in vivo* experiments, I succeeded in the detection of NK activity against UVB-induced skin tumor cells *in vitro*. Thus I conclude that NK

activity can kill UV-induced tumor cells and suppresses UV-tumorigenesis.

紫外線による皮膚がんの誘発には、紫外線によるDNA分子への直接的あるいは間接的な損傷の生成に加えて、T細胞を中心とした免疫系の抑制が必須であると考えられてきた。しかし、免疫監視機構の重要な一員と考えられてきたナチュラルキラー（NK）活性の紫外線発がん過程への関与については、未だにほとんど明らかにされていない。本研究ではNK活性の紫外線発がんへの関与を証明するために、遺伝的バックグラウンドを均一にして、高いNK活性を持つマウスと活性を欠損させたマウスを用意し、これらの実験的紫外線発がんの比較を試みた。NK活性欠損マウスにおいて紫外線発がんが促進されれば、NK活性の紫外線発がんへの関与を直接的に証明できると考えられる。さらに、紫外線で誘発された皮膚腫瘍より細胞を分離し、この腫瘍細胞に対する細胞傷害活性がNKによって担われていることを明らかにし、NK活性が紫外線発がん細胞を排除する働きを持つことを検証した。

はじめに、高い生産性を持つアルビノ（白子）ヌードマウス系統であるKSNマウスへNK活性を欠損させる*beige*遺伝子とB細胞系免疫反応を欠損させる*xid*遺伝子を導入し、多段階で免疫欠損を有し遺伝的バックグラウンドをKSN系にそろえた各種マウス系統を確立した。下表に確立された各系統の免疫学的性格をまとめた（+は免疫活性の強さを表し、-は活性を欠損していることを表す）。

系統	T 細胞	B 細胞	NK
KS	++	++	+
KSN	−	+	++
KSN-bg	−	+	−
KSN-xid	−	−	+++
KSN-BNX	−	−	−

表1　KSN系各種免疫欠損マウス

本研究では、NK活性に大きな差のあるKSNマウスとKSN-bgマウスを用いて紫外線発がんを比較することとした。

KSNマウスおよびKSN-bgマウスは体毛・体色を持たず紫外線発がん実験に適したモデル動物であると考えられるが、これまでにヌードマウスを用いた紫外線発がんに関する報告はほとんどない。KSNマウスとKSN-bgマウスでの発がん動態を比較するための基礎データを得る目的で、KSNマウスを用いて発がん系の確立を試みた。紫外線発がん実験はUVB領域にスペクトルを持つWestinghouse社のFS-20ランプを用いて週6回照射し、

週１回肉眼的に観察することによって行った。１日あたりの照射線量として1340、670、320、160 J/m^2/day を用意した。紫外線発がんの有病率と紫外線照射期間のプロットを図１に示した。

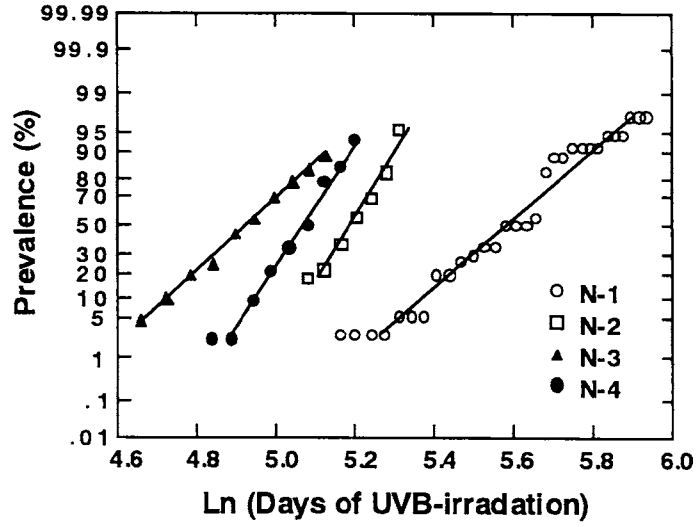

図１ KSN ヌードマウスにおける紫外線発がん動態.
N-1;160 J/m^2/day、N-2; 320 J/m^2/day 、N-3; 670 J/m^2/day 、N-4; 1340 J/m^2/day での有病率に対する照射期間を正規確率紙にプロットした結果.

この結果、160 から 670 J/m^2/day においては線量に依存して発がんまでの潜伏期間の短縮が認められた。意外なことに 1340 J/m^2/day の照射条件において 670 J/m^2/day の照射条件よりも長い潜伏期間が観察された。1340 J/m^2/day の照射条件では腫瘍の周辺に潰瘍の発生が認められ、高線量紫外線が、誘発した腫瘍細胞に対して細胞死を引き起こしたために潜伏期間の延長が観察されたと推定される。腫瘍の発生動態を統計学的に検討した結果、その分布は対数正規分布に従うことが明らかとなった。また、有病率と紫外線照射期間のプロットはマウス１匹あたりの平均発生腫瘍個数と紫外線照射期間とのプロットと良く相関し、発がん動態の記述にはいずれかあるいは両者のデータの表示が適切であると考えられた。また、発生した腫瘍の大きさを直接測定し、これをもとに換算した腫瘍重量から腫瘍の増殖速度を求めた結果、少なくとも肉眼的に観察される腫瘍の増殖速度と１日あたりの照射線量の間に有意な相関は認められなかった。また、50% 有病率に達するまでの照射期間と１日あたりの照射線量の関係を検討したところ、50% 有病率に達するまでの照射期間は１日あたりの照射線量の -0.49 乗に比例することが明らかとなった。また、50% 有病率までの累積照射線量は１日あたりの照射線量が大きくなればなるほど高くなる傾向が認められた。この結果は照射線量に応じて発がんに対して何らかの防御機構が働く可能性と高い照射線量によって発がん細胞の細胞死が引き起こされる可能性が考えられるが、詳細は不明である。病理学的な解析を行った結果、発生した腫瘍の大部分は扁平上皮癌であり、紫外線発がんの標的臓器は表皮層にあることが明らかとなった。以上の結果は、紫外線発

がん実験で繁用されるヘアレスマウスでの報告とほぼ一致し、ヌードマウスの紫外線発がん系は免疫欠損のないヘアレスマウスと同様の実験系であることが明らかとなった。
KSN マウスと KSN-bg マウスの発がん実験においては、潰瘍発生の恐れがない 320 および 160 J/m^2/day の 2 種類の照射条件を用いることとした。

KSN マウスと KSN-bg マウスにおける紫外線発がん実験を行う前に 5 週齢から 40 週齢までの NK 活性の変化を測定したところ、KSN マウスの活性は 5 週齢以降上昇し 12 週齢程度から 40 週齢にかけてゆっくりと低下することが明らかとなった。KSN-bg マウスでは測定した週齢を通じて活性の欠損が認められた。この活性の差が紫外線照射によって影響を受ける可能性を検討するために、1340、320、160 J/m^2/day の紫外線を KSN マウスに照射して経時的に NK 活性を測定したところ、活性に変化は認められなかった。また、KSN-bg マウスに照射しても活性の上昇は認められなかった。KSN マウスと KSN-bg マウスを用いて 320 および 160 J/m^2/day の照射条件で紫外線発がんを比較したところ、160 J/m^2/day の照射条件において、KSN マウスと比較して KSN-bg マウスの発がんが有意に早まることが明らかとなった（図 2）。

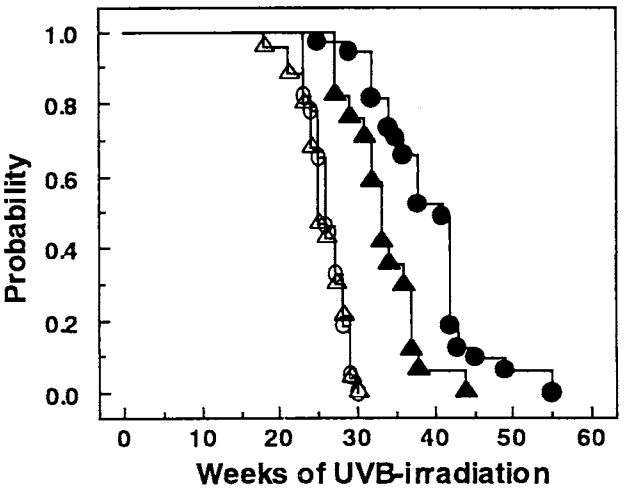

図 2　KSN マウスと KSN-bg マウスでの紫外線発がん実験の結果.

160 J/m^2/day での KSN マウス (●)、KSN-bg マウス (▲)、320 J/m^2/day での KSN マウス (○)、KSN-bgマウス (△) の腫瘍を持たないマウスの割合をキャプラン・マイヤー法によりプロットした結果.

KSN マウスと KSN-bg マウスの比較において、発生した腫瘍の増殖速度に有意差は検出されず、病理学的な解析においても KSN-bg マウスで未分化型の病理像の割合が高くなる傾向は認められたが有意な差は認められなかった。従って、NK 活性は肉眼的に観察されるようになった腫瘍の増殖抑制や悪性化に関与せず、腫瘍の発生頻度を抑制している可能性が示唆された。以上の結果から、NK 活性が紫外線発がんを抑制することが初めて直

接的に証明された。

ここまでの実験において、NK 活性の測定は脾臓細胞を NK 細胞として、NK 活性に高感受性な YAC-1 細胞への細胞傷害活性を指標として測定を行なってきた。本研究では、KSN マウスの NK 活性が紫外線発がん細胞を傷害している可能性を明らかにするため、また、今後紫外線発がん細胞に対する NK 活性の認識及び細胞傷害活性機構を明らかにしていくために、紫外線発がん細胞に対する脾臓中の細胞傷害活性を検討した。KSN マウスに紫外線で誘発された４種類の腫瘍細胞、KUB-7、8、12、24b を標的細胞として、これらに対する細胞傷害活性を測定したところ、感受性に差はあるものの有意な細胞傷害活性が検出された。NK 活性を特異的に欠損させる抗アシアロGM1 抗体を投与したマウスにおいては KUB 細胞に対する細胞傷害活性は検出されず、 NK 活性を遺伝的に欠損した KSN-BNX マウスにおいても KUB 細胞に対する細胞傷害活性が欠損していたことから、KSN マウスの NK 活性は確かに紫外線発がん細胞を傷害できることが明らかとなった。

以上の実験結果から、NK 活性は、紫外線誘発皮膚腫瘍細胞を傷害する能力があり、紫外線照射によって脾臓での活性は抑制されず、低線量の紫外線発がんを抑制しうることが明らかとなった。

学位論文審査結果の要旨

当該論文の審査は，各審査員が提出された論文の内容につき慎重な審査を行い，かつ申請者と面接して口頭試問を行った結果および平成 10 年７月１日開催の口頭発表の内容を基にし，平成 10 年７月１日に開催された論文審査委員会で審議を行った結果，以下の通り判定した。

申請者である石垣靖人氏は，紫外線発がんにおける免疫監視機構の一員としてのナチュラルキラー活性の関与を，免疫欠損マウスを用いた紫外線発がん実験によって直接的に証明することを試みた。彼はこのテーマを遂行するために，繁殖に優れたヌードマウス近交系へ *beige*, *xid* などの免疫欠損遺伝子を交配により導入して各種免疫欠損マウス系統を新規に確立し，その免疫学的な性格付けを明らかにすることから研究を開始した。免疫欠損マウスを用いた紫外線発がん実験系はこれまでに報告されていないため，適正な照射線量を決定し，発生したがん組織標本の病理学的検討を行うなどしてヌードマウスを用いた紫外線発がん系を樹立した。次に，高いナチュラルキラー活性を示すマウス(KSN, *nu/nu*, *+/+*) に比べて活性を完全に欠損したマウス(KSN beige, *nu/nu*, *bg/bg*) では紫外線発がんが早まることを明らかにした。さらに誘発された皮膚腫瘍細胞をナチュラルキラー活性が試験管内で傷害することを証明した。以上の実験結果からナチュラルキラー活性が一部の紫外線発がんを抑制し得ることを世界で初めて直接的に証明した。

以上，申請者の論文は紫外線発がんにおけるナチュラルキラー活性の関与を明らかにし，紫外線発がん機構に新たな知見を加えるものであると評価した。新規に確立した各種マウス系統の有用性と併せて，その学問的貢献は博士論文の業績としての基準を十分に満たすものと判定する。