

# 遺伝子改変マウスを用いた創薬研究

東京理科大学 研究推進機構 生命医科学研究所 客員教授 いわくら よういちろう  
岩倉 洋一郎

## ■ はじめに

遺伝子改変マウスをご存知でしょうか。遺伝子改変マウスとは、受精卵に遺伝子操作を加えて、外から新たな遺伝子を導入したり、あるいは特定の遺伝子を破壊したりしたマウスのことです。ご存知のように、生体の全ての機能は遺伝子の働きによるものですので、このような操作を行ったマウスの各組織の異常や病気に対する感受性などを調べることにより、操作した遺伝子が生体の中でどのような役割を果たしているかを知ることができます。外から新たな遺伝子を導入したマウスのことをトランスジェニック (Tg) マウスと呼び、1980年に Gordonらによって初めて作製されました。細いガラスの針でマウス受精卵の前核にDNAを注入すると、導入された外来DNAはそのまま染色体に組み込まれ、子孫に伝達されます【図1-1】。1982年には、豚の成長因子遺伝子を導入した Tg マウスが Palmiterらによって作られ、体重が通常の2倍以上にもなることが示されました (ジャイアントマウス)。この結果は、成長因子に体重を増加させる機能があることを明確に示すものでした。

その後1987年には、外部から導入した突然変異を持つ遺伝子断片と内在性遺伝子の間で、相同遺伝子組み換えを起こさせることによって、特定の遺伝子に突然変異を導入する方法が Capecchiらによって開発されました。この方法の開発には、1981年に初め

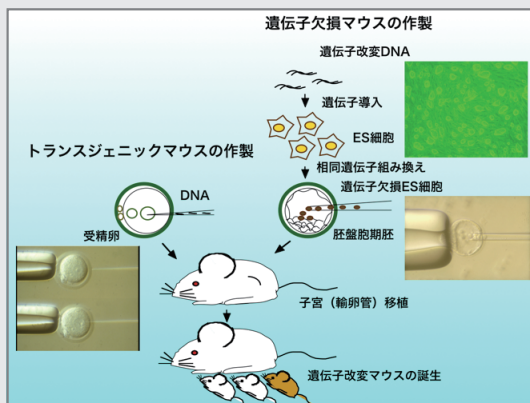
て樹立された、多分化能をもつ培養未分化細胞 (ES細胞) が大きな役割を果たしました。ES細胞を胚盤胞期胚に移植することによって、ES細胞由来の細胞が種々の組織に分布した個体 (キメラマウス) を作ることができます【図1-1】。精子や卵子がES細胞由来の細胞で作られている場合は、生まれてくる子孫はES細胞由来のものになります。そこで、予めES細胞に突然変異を導入し、この変異ES細胞からマウス個体を発生させることによって、特定の遺伝子に突然変異を持つマウスを作ることが可能になりました。

現在では、ES細胞を使わないで、直接CRISPR-Cas9法によって受精卵に突然変異を導入することで、より簡便に遺伝子改変マウスを作ることができる様になっています【図1-2】。特定の遺伝子の機能が失われたマウスは、遺伝子の機能を知るために有用で、多くの創薬研究で利用されています。本稿では私の行ってきた遺伝子改変マウスを用いた研究を中心に、創薬研究への応用について紹介したいと思います。

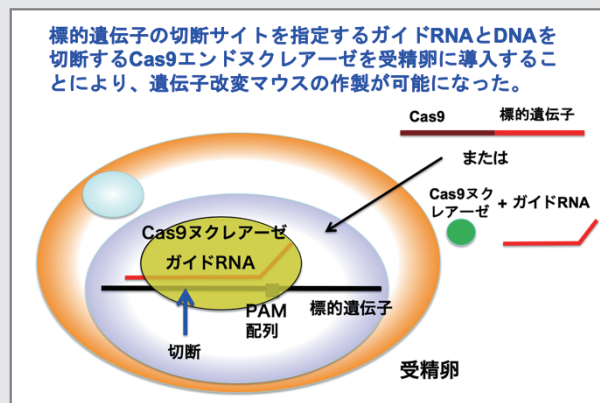
## ■ インターフェロン (IFN) 遺伝子導入 Tgマウスの作製

私は大学院時代、京都大学ウイルス研究所の由良隆、石浜明先生の下で大腸菌RNAポリメラーゼの分子遺伝学的研究を行いました。分子遺伝学においては、特定の遺伝子の突然変異体を分離し、その変異が表現型

1) 従来法



2) CRISPR-Cas9法



【図1】 遺伝子改変マウスの作製

にどのような影響を与えるかを調べることで、遺伝子の機能解析の基本となります。ところが当時、哺乳動物では突然変異体を作製する方法が無く、遺伝子の機能解析にこの方法は使えませんでした。Palmiterらの、胚に特定の遺伝子を導入して発生させ、個体レベルでその遺伝子の機能を調べる、というアプローチはとても斬新で、大きく発展することを予感させました。そこで自分も Tg マウスを作製することを決意しました。しかし、当時私は、ウイルス研の川出由己教授の下で IFN の研究を行っており、Tg マウスを作るための知識も装置もありませんでした。それでも、手探りで Tg マウスの作製を始め、3年後には何とか  $\beta$  型 IFN 遺伝子を導入した Tg マウスを世界で最初に作製することに成功しました。その結果、これらの Tg マウスがマウス脳心筋炎ウイルス感染に対して高い抵抗性を示すことがわかり、IFN がウイルス感染防御に重要な役割を果たしていることを初めて個体レベルで示すことができました。

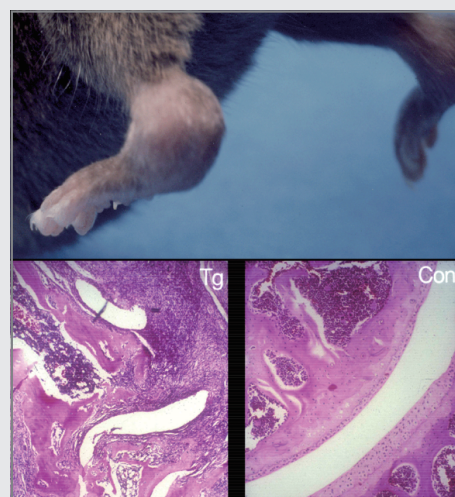
## ■ HTLV-I Tg マウスによる関節リウマチモデルの作製

ウイルス研の日沼頼夫教授がヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-I) を発見されたのは 1982 年のことでした。日沼先生は気さくなお人柄で時々私の部屋にいられて、その新しいウイルスについて話をして下さいました。私はこのウイルスに興味を持ち、同研究所の畑中正一教授からウイルス遺伝子を頂き、Tg マウスを作ることによって白血病のモデルができないかを試すことにしました。当時、ウイルス学分野でまだそのような試みはありませんでした。ところがこれらの Tg マウスはいつまで待っても一向に白血病を発症し

### コラム1

#### 関節リウマチ

関節リウマチは代表的な自己免疫病です。II 型コラーゲンなどの関節構成成分や血中の免疫グロブリン、シトルリン化蛋白質などに対する免疫応答が起きることが知られており、自己抗体が産生されます。このために関節に炎症が起き、骨破壊が引き起こされる病気で、関節の痛み、腫れ、変形などの他、発熱や倦怠感、食欲不振などの全身症状も引き起こします。我が国では 70 万人、世界では 500 万人もの患者がいると推計されています。

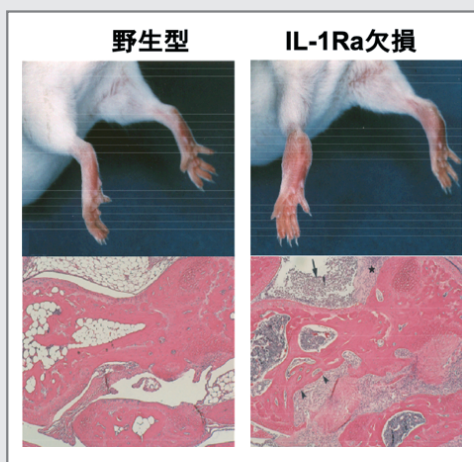


【図2】HTLV-I Tg マウスは関節リウマチ様関節炎を発症する<sup>1)</sup>。足首の肥大 (上) と炎症性細胞の浸潤および骨破壊 (下左)。右下は正常関節。

てくれませんでした。しかし、偶然にもある日これらのマウスの足首関節が腫れていることに気がつき、調べてみると、これらのマウスは自己免疫になっており、関節炎の病理像は人の関節リウマチに非常に良く似ていることが分かりました【図2】。この結果は、このウイルスが人でも関節リウマチを引き起こしている可能性を示唆するものでした。私達はこの結果を 1991 年に Science 誌に報告しました<sup>1)</sup>。その後、このウイルスが関節リウマチの発症に関与していることは疫学的にも示唆されており、発生工学的手法で作製した疾患モデルによって病因の一つが突き止められた最初の例になるのではないかと考えています。

## ■ 遺伝子欠損マウスを用いたサイトカイン機能の解析

私達は HTLV-I Tg マウスの関節炎の発症機構を解析する中で、関節炎局所で炎症性サイトカインの発現が亢進していることを見出しました。サイトカインとは、T 細胞や樹状細胞などの免疫担当細胞が分泌する一群の蛋白質のことで、受容体を介して他の細胞に作用して、これらの細胞を活性化したり、細胞死を誘導したり、あるいは遊走を引き起こしたりします。しかし、1990 年初頭の頃はまだ生体の中での役割はよく解っていませんでした。私達は、炎症性サイトカインと呼ばれる一群のサイトカインは炎症を誘起する活性を持つため、これらのサイトカインが関節炎の病態形成で重要な役割を果たしているのではないかと考えました。そこで、これらのサイトカイン遺伝子欠損マウスを作製し、その役割を検討することにしました。



【図3】IL-1Ra欠損マウスも関節リウマチ様関節炎を発症する<sup>2)</sup>

まず、一番産生量の多かったIL-1 ( $\alpha$ ,  $\beta$ の2種類存在するのでその両方)を欠損させたマウスを作製し、HTLV-1 Tgマウスと掛け合わせてIL-1 $\alpha/\beta$ 欠損HTLV-1 Tgを作製したところ、関節炎の発症が強く抑制されることを見出しました。この結果からIL-1が関節炎の発症に重要な役割を果たしており、IL-1を阻害することによって発症を抑制できることが示唆されました。

そこで、実際IL-1の過剰シグナルによって自己免疫が発症するかどうかを調べるために、IL-1受容体へのIL-1 $\alpha/\beta$ の結合を阻害する因子である、IL-1レセプターアンタゴニスト(IL-1Ra)の欠損マウスを作製しました。このマウスではIL-1 $\alpha/\beta$ の結合阻害因子が存在しないために、過剰なIL-1シグナルが入力すると考えられます。その結果、予想通りこのマウスが関節炎を自然発症することを見出しました【図3】<sup>2)</sup>。

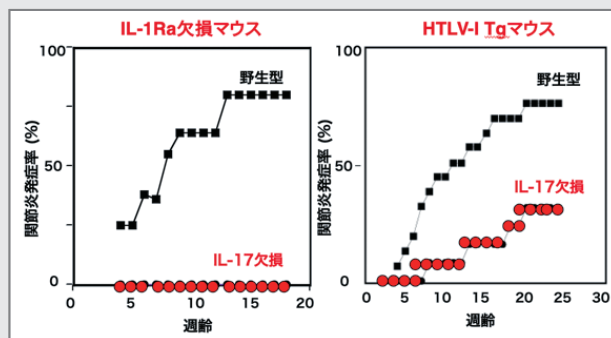
このマウスではII型コラーゲンやIgG抗体に対する自己抗体が検出されることや、このマウスのT細胞をヌードマウスに移植すると関節炎を誘導することができることなどから、自己免疫を発症していることが分かりました。この結果は過剰なIL-1シグナルが自己免疫を誘導することを示唆します。私達は、IL-1はT細胞上にCD40LやOX40などの副シグナル分子の発現を促進することにより、自己に対する免疫寛容を破綻させることを示しました。自己免疫発症の詳細なメカニズムは現在解析中です。

それではヒト関節リウマチ患者でもIL-1は重要な役割を果たしているのでしょうか。マウスの結果がそのままヒトで再現されるかどうかは、非常に気掛かりなことでしたが、実際、関節リウマチ患者でもIL-1Ra、あるいは抗IL-1 $\beta$ 抗体を投与することによって、治療できることが分かっています。ただし、これ

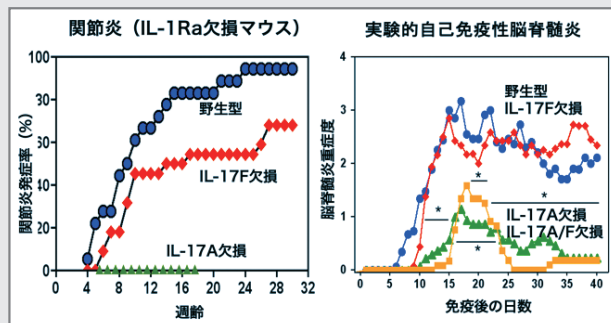
らのIL-1阻害剤は我国では関節リウマチ治療薬としては未承認です。また、IL-1Ra欠損マウスでTNFを欠損させた場合、あるいはHTLV-1 TgマウスでIL-6を欠損させた場合も、強く関節炎の発症が抑制されることが分かりました。既にTNFについては、イギリスのMainiとFeldmannらによって、IL-6については、阪大の岸本と平野らによって関節リウマチの病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆されておりましたが、私達の結果はこれらのデータを強くサポートするものでした。その後、TNFやIL-6の阻害抗体が開発され、関節リウマチの治療に著効を発揮することが示されています。このように、遺伝子改変マウスは、ヒト疾患の治療標的を探索する為に有用であることが分かります。

### ■ IL-17欠損マウスを用いたIL-17の機能解析

次に、私達はIL-17A, IL-17F, IL-17A/F欠損マウスを初めて作製することに成功しました<sup>3,4)</sup>。当時、IL-17Aは炎症性サイトカインの一つで、好中球を遊走させることによって細菌感染防御に関与することが知られておりましたが、アレルギー、自己免疫などへの関与は知られておりませんでした。私達はIL-17A欠損マウスを作製することにより、接触性過敏症、遅延型過敏症、気道過敏症などのアレルギー応答や、関節リウマチモデルや多発性硬化症のモデルである実験



【図4】IL-17A欠損による関節リウマチモデルの発症抑制<sup>4)</sup>



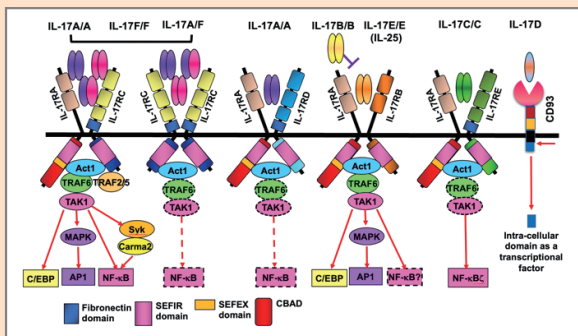
【図5】自己免疫の発症にはIL-17Aが関与している<sup>2)</sup>

## コラム2

### IL-17

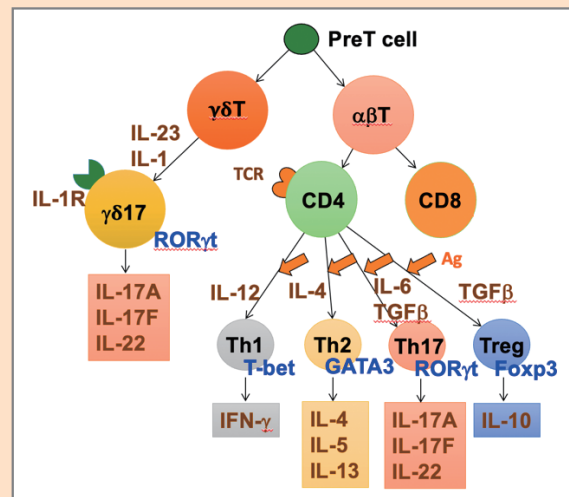
IL-17Aは分子量21kの糖蛋白質であり、相同性を持つ6個のファミリー分子(IL-17A~IL-17F)が存在し、ホモあるいはヘテロダイマーとして機能します【図1】<sup>4,5)</sup>。IL-17ファミリー受容体もIL-17RAからIL-17REまで5つのサブユニットが知られており、IL-17RA/RC, RA/RB, RA/RE, RA/RD, RC/RCなどのダイマーとして機能することが知られています。IL-17AとIL-17Fは50%のアミノ酸同一配列を持ち、ヘテロダイマーを形成できるだけでなく、それぞれのホモダイマーも同じ受容体(IL-17RA/RCおよびIL-17RC/RC)に結合することができます。最近、IL-17AのホモダイマーはIL-17RA/RDにも結合することが報告されました<sup>5)</sup>。

IL-17RA/RCは繊維芽細胞や上皮細胞、血管内皮細胞、マクロファージなど種々の細胞に発現しており、リガンドが受容体に結合すると、Act1-TRAF6-NF- $\kappa$ B軸、及びAct1-TRAF6-MAPK-AP1軸がそれぞれ活性化されます。その結果、G-CSFやTNF、IL-6、CCL1、CXCL2などの種々のサイトカイン、ケモカイン、細胞接着因子などの発現が誘導され、自己免疫や炎症を引き起こすと共に、好中球の産生や局所への遊走を引き起こし、細菌や真菌の感染防御にも重要な役割を果たします。IL-17RA/RC以外の受容体のシグナル伝達についてはまだ詳しく解析されておられません。



【図1】IL-17ファミリー分子とその受容体<sup>5)</sup>

IL-17Aの産生細胞は最初CD4陽性のヘルパーT細胞の一種として同定され、Th17細胞と命名されました。2000年頃、T細胞には主にIFN- $\gamma$ を産生するTh1サブセットと、IL-4、IL-5などを産生するTh2サブセットしか知られておりませんでした。そこに、IL-17を産生する新しいT細胞サブセットが発見されたことで、Th17細胞は非常に大きな注目を集めました。しかし、実際のIL-17A産生細胞は多様であり、 $\gamma\delta$ T細胞やグループ3自然リンパ球(ILC3)細胞なども産生します<sup>5)</sup>。IL-17Fの場合は、上記以外に腸管上皮細胞などでも産生されることがわかっています。IL-17Aの発現には転写因子としてRor $\gamma$ tが重要ですが、他のIL-17ファミリー遺伝子の転写因子についてはよく解っていません。Th17細胞の分化にはT細胞受容体(TCR)刺激とさらに(TGF- $\beta$ +IL-6)刺激が必要です。一方、 $\gamma\delta$ T細胞やILC3細胞の場合は、TCR刺激無しにIL-23とIL-1 $\beta$ によってIL-17Aの発現が誘導されます【図2】<sup>6)</sup>。この時、IL-23はIL-23受容体を刺激するだけでなく、IL-1受容体の発現を亢進させることによって、IL-23とIL-1シグナルのシナジーを引き出すことにも一役買っていると考えられますが、そのメカニズムはよく解っておらず、今後明らかにすべき課題です。

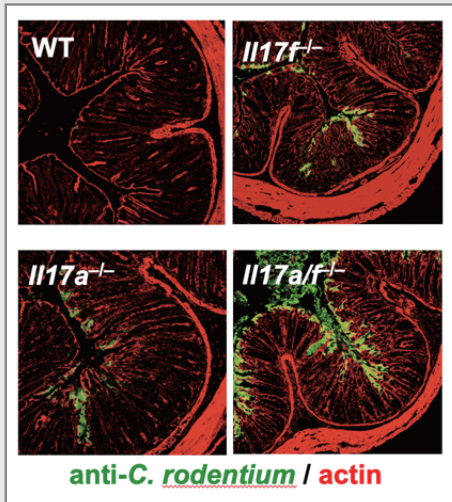


【図2】IL-17産生細胞の分化と関与因子<sup>6)</sup>

的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症などが強く抑制されることを初めて見出しました【図4, 5】<sup>3,4)</sup>。

これらの結果は、IL-17Aが感染防御だけでなく、アレルギーや自己免疫疾患において重要な役割を果たしていることを示唆するものです。これはIL-17AがG-CSFやTNF、IL-1などの炎症性サイトカインやCXCL2などのケモカインの発現を誘導すると共に、T細胞の活性化にも関与しているためと考えられます。

この結果、IL-17を阻害することにより、自己免疫疾患を治療できることが初めて示唆されました。そこで、製薬企業によりIL-17Aに対する阻害抗体が作製され、関節リウマチや多発性硬化症だけでなく、2010年頃、自己免疫が疑われていた乾癬や炎症性腸疾患などに対する治療効果が検証されました。その結果、後に述べるように乾癬や乾癬性関節炎、強直性脊椎炎などの治療に著効を発揮することが認められ、現在これらの治



【図6】大腸における *C. rodentium* (緑蛍光) の増殖<sup>7)</sup>

療に広く用いられるようになってきました。ただ、IL-17A に対する阻害抗体を用いた関節リウマチの臨床試験では、治療効果は認められるものの、既存薬に対する優位性が無いため治療薬としては承認されておられません。また、炎症性腸疾患については、抗IL-17A抗体によって却って悪化する場合がありますことが判り、治験は中断されました。多発性硬化症に対する効果は現在検証中です。

### ■ IL-17A は自己免疫の発症に重要な役割を果たすのに対し、IL-17F の関与は少ない

IL-17 ファミリー分子の中で、IL-17A と IL-17F はアミノ酸配列がよく似ており、ヘテロダイマーを形成し、同じ受容体に結合できることから、当初両者はよく似た生物活性を持つと考えられました。ところが、IL-17A の欠損は IL-1Ra 欠損マウスの関節炎や EAE の発症をほぼ完全に抑制するのに対し、IL-17F 欠損はほとんど影響を与えません【図5】。従って、IL-17A が自己免疫疾患の発症に重要な役割を果たすのに対し、IL-17F の関与は低いと考えられます。

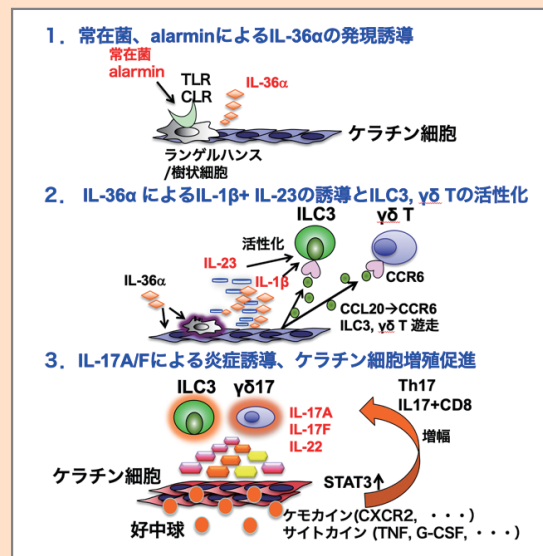
### ■ IL-17A/F は共に細菌、真菌に対する感染防御に重要

興味深いことに、IL-17A/F 二重変異マウスは日和見感染を受け易く、口周辺部の粘膜部位に黄色ブドウ球菌の感染が頻繁に起こることを見つけました<sup>7)</sup>。また、病原性大腸菌の一種である *Citrobacter rodentium* を感染させた場合も IL-17A/F 二重変異マウスで感受性が非常に高く、IL-17A あるいは IL-17F 単独欠損

### コラム 3

#### 乾癬・乾癬性関節炎・強直性脊椎炎

乾癬とは皮膚が炎症を起こし、表皮を構成するケラチン細胞が過剰増殖する結果、盛り上がった紅斑を生じる病気で、発症率は日本では人口の0.1%程度ですが、欧米では2~13%に及びます。発症にはIL-17A/F、IL-23が重要な役割を果たしています。発症メカニズムは、以下のように考えられます。まず、皮膚に存在するランゲルハンス細胞/樹状細胞上のTLR7やTLR9、Dectin-1などの自然免疫受容体が皮膚常在菌や死細胞由来のDNA(alarmin)などによって活性化されると、IL-1 $\beta$ やIL-23、IL-36 $\alpha$ などのサイトカインの発現が誘導されます。IL-36 $\alpha$ はIL-23やIL-1 $\beta$ の他、CCL20などの発現を誘導してCCR6陽性のILC3や $\gamma\delta$ T細胞などの自然免疫細胞を局所にリクルートします<sup>8)</sup>。そこで、IL-1 $\beta$ とIL-23がこれらの細胞に作用してIL-17A/Fの産生を誘導し、IL-17A/Fは皮膚のケラチン細胞に作用してTNFやG-CSF、CXCR2などの発現を誘導し、好中球を引き寄せると共に、STAT3を活性化してケラチン細胞の増殖を促し、乾癬を発症させるものと考えられます【図】。乾癬性関節炎や強直性脊椎炎においても同様にIL-17A/F、IL-23が重要な役割を果たしていることが知られています。



【図】乾癬の発症機構<sup>5)</sup>

マウスでもある程度感受性が亢進することが分かりました【図6】<sup>7)</sup>。これらの欠損マウスでは $\beta$ -ディフェンシンなどの抗菌蛋白質の発現が著しく低下しており、これが細菌の増殖を許した原因と考えられます。従っ

て、IL-17Fの機能としては免疫応答より、むしろ粘膜、表皮での感染防御で重要な役割を果たしている事が示唆されます。IL-17A/Fは共に細菌感染防御だけではなく、真菌の感染防御でも重要な役割を果たしています。これらの知見から、IL-17A/Fを共に抑制する治療を行う場合は、感染症に注意する必要があることが分かります。

## ■ IL-17A/Fは共に乾癬の発症に重要な役割を果たしている

乾癬については良い動物モデルがなく、発症機構の解析が遅れました。長い間自己免疫の一種ではないかと考えられてきましたが、2009年に尖圭コンジローマの治療薬であるイミキモドがマウスに乾癬様皮膚炎を引き起こすことが発見されてから、研究が大きく進展しました。イミキモドはトル様受容体7 (TLR7) のリガンドで、イミキモドを皮膚に塗布するとIL-23が誘導され、その下流でIL-17A/Fの発現が誘導されます。そして、IL-17AあるいはIL-17F、IL-23などを欠損させたマウスでは皮膚炎が強く抑制されることが示され、これらのサイトカインを阻害すると乾癬を治療できることが示唆されました。そこで、IL-17AやIL-17A/F、IL-23、あるいはIL-17RAに対する阻害抗体が作製され、現在これらの抗体は広く乾癬治療薬として用いられ、著効を発揮することがわかっています。これらの抗体は同様の発症メカニズムが示唆されている乾癬性関節炎に対して有効である他、IL-17の阻害は強直性脊椎炎に対しても有効です。

重要なことは、自己免疫を引き起こすTh17細胞は乾癬発症に殆ど関与しておらず、ILC3や $\gamma\delta$  Tなどの自然免疫細胞がIL-23およびIL-1 $\beta$ 刺激を受けてIL-17を産生していることです。従って、乾癬は従来考えられていたような自己免疫ではなく、自然免疫受容体を介したIL-23-IL-17軸の過剰活性化によって引き起こされた病態であると考えられます。

## ■ 遺伝子改変動物を使った創薬研究

この様に、遺伝子改変マウスを利用した遺伝子機能の解析は、その結果を直接創薬に結びつけることができる可能性が高いと言えます。ただ、マウスモデルの結果がヒトでは再現されないこともあります。これは見かけ上同じ様な病態に見えても、病因や発症メカニズムが異なっていることがあるためです。もちろん、

マウスとヒトという種間の相違も大きく影響します。こうした反省から、最近は患者材料を使った研究がこれまで以上に重視されるようになってきました。しかし、遺伝子を欠損させるような実験手法はヒトでは許されません。従って、実験動物を用いた創薬研究が今後も非常に重要な役割を果たすことは間違いありません。今後はヒトで治験を行う前に、より詳細に患者とマウスモデルの形態や遺伝子、蛋白質レベルでの病態比較を行い、疾患モデルとしての妥当性を検証することが求められるものと考えられます。

基礎研究には、ある現象の裏でその現象を引き起こしている原理やメカニズムを明らかにするという重要な使命があります。現象を引き起こす原理やメカニズムが解ると、次にはそのことを利用して現象を再現したり、制御したりすることが可能になります。従って、本当にある現象を理解するという事は、その現象を制御し、自由に操れる様になる事だとも言えます。最近応用研究の重要性が強調されることが多くありますが、しっかりとした基礎研究に基づく発症機構の解明がなければ、創薬などの応用研究はあり得ない事を心に留めておく必要があります。

今からわずか20年位前までは、関節リウマチや乾癬に対する治療は、痛みを抑えるなどの対処療法しかなく、病態の進行を食い止められませんでした。しかし、この間の発症機構の解析研究によってTNFやIL-6、IL-17、IL-23などの種々のサイトカインの関与が解ってくると、これらのサイトカインを標的とする生物学的製剤が次々と開発され、早期に治療を始めれば、寛解に持ち込むことも可能になってきました。大きな進歩であり、基礎研究の成果であると思います。遺伝子改変マウスを用いた研究がこの流れの中で果たした重要な役割を考えると、当初からこうした研究に参加できたことを誇らしく、かつ、幸せに思います。若い人達の中から遺伝子改変マウスを使った新たな創薬を目指す人が出てくることを期待しています。

## 参考文献

- 1) Iwakura Y. et al., *Science*, **253**, 1026–28 (1991).
- 2) Horai R. et al., *J. Exp. Med.*, **191**, 313–320 (2000).
- 3) Nakae S. et al., *Immunity*, **17**, 375–387 (2002).
- 4) Iwakura Y. et al., *Immunity*, **34**, 149–162 (2011).
- 5) Chung, S.-H. et al., *Int. Immunol.*, **33**, 723–729 (2021).
- 6) Akitsu A. et al., *Nat. Commun.*, **6**, 7464 (2015).
- 7) Ishigame, H. et al., *Immunity*, **30**, 108–119 (2009).
- 8) Hashiguchi, Y. et al., *J. Immunol.*, **201**, 167–182 (2018).