

# 博士論文

論文題目 抗腫瘍・感染防御における IRF 転写因子群の役割

氏 名 千葉 志穂

# 目次

要旨	3
はじめに	4
第1部 『IRF5の抗腫瘍応答における役割』	12
1.1 序文	12
1.2 結果	15
1.2.1 IRF転写因子群のがん排除における役割	15
1.2.2 骨髄移植を用いたIRF5の抗腫瘍応答における役割の検討	16
1.2.3 マクロファージ・樹状細胞におけるIRF5を介したNK細胞の殺傷力亢進作用 についての検討	20
1.2.4 がん細胞の刺激によるIRF5の活性化の検討	22
1.2.5 NK細胞の殺傷力を亢進させる細胞間相互作用	24
1.3 考察	27
1.4 方法	47
第2部 『Flox-IRF3マウスの作製とコンディショナルノックアウトに向けた解析』	59
2.1 序文	59
2.2 結果	63
2.2.1 Flox-IRF3マウスの作製	63
2.2.2 Flox-IRF3マウスにおけるBcl2L12の機能	65
2.2.3 樹状細胞・マクロファージにおけるIRF3依存的I型IFN誘導	66
2.3 考察	70
2.4 方法	85
謝辞	95
略語一覧	96
引用文献	99

## 要旨

自然免疫系の研究はパターン認識受容体群の発見と機能解析により大きく進展し、さらにこれらの受容体シグナルの下流で活性化され、自然免疫応答に必須の役割を果たす転写因子として、IRF 転写因子群が注目を浴びている。私は、自然免疫系の制御に関する典型的な二つの IRF についてそれぞれこれまでとは異なる視点に基づいた解析を行なった。まず、IRF5 がマクロファージ・樹状細胞において Dectin-1 を介したがん細胞の認識によって活性化され、NK 細胞の抗腫瘍活性の増強に寄与することを明らかにした。さらに、IRF3 コンディショナルノックアウトマウスを作製し、細胞特異的な IRF3 の機能解析に向けた新たな基盤を構築した。

## はじめに

免疫応答は、外来から侵入した病原体およびがん細胞のような異常な細胞を排除すべく誘導され、生体の恒常性維持に不可欠の役割を果たす。この応答は、脊椎動物において、自然免疫系および適応免疫系と呼ばれる性質の異なる 2 つのシステムによって達成される。自然免疫系の大きな特徴のひとつは、自己と非自己の見分けを「パターン認識受容体 (Pattern recognition receptors; PRRs)」と呼ばれるシグナル伝達性の受容体により行う点である。PRRs は、外来の病原体に特有の分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns; PAMPs)、あるいは自己の死細胞由来の分子パターン (Damage-associated molecular patterns; DAMPs) を認識することが報告されている<sup>1</sup>。この特異性の低い認識機構は、I 型インターフェロン (I 型 IFN; IFN $\alpha/\beta$ ) や炎症性サイトカイン・ケモカインの迅速な誘導、および抗原提示などを行い、T 細胞や B 細胞に担われるより特異性の高い応答を行う適応免疫系の活性化をも促進し、その結果、病原体や感染した宿主細胞の速やかな排除に寄与することが知られている<sup>2,3</sup>。

PRRs によって認識される分子パターンの中でも、ウイルスや細菌、および自己に由来する DNA や RNA などの核酸は、自然免疫応答を強力に惹起すること

が知られている<sup>4-7</sup>。この応答の異常は感染症や自己免疫疾患と密接な繋がりがあることから、核酸認識に関わる自然免疫受容体やそのシグナル伝達機構について精力的に解析がなされてきた。

実際、核酸を認識する自然免疫受容体がこれまでに数多く同定されている。例えば、エンドソームにおいては、膜貫通型核酸認識受容体である Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) 3, 7, 9 がそれぞれ、2 本鎖 RNA、1 本鎖 RNA および非メチル化 CpG モチーフを含む DNA を認識することが知られている<sup>1</sup>。また一方で、細胞質内には RNA を認識する RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I), MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) といった RIG-I 様受容体 (RIG-I-like receptors; RLRs) が存在する<sup>8-10</sup>。RLR は 2 本鎖 RNA (double-stranded RNA; dsRNA) や 5'-末端に三リン酸を有する RNA (5'-pppRNA)<sup>11,12</sup> といったウイルスに特異的な核酸の分子パターンを検出し、アダプター分子 IPS-1 (IFN- $\beta$  promoter stimulator-1)<sup>13-16</sup> 依存的に下流のシグナル伝達経路を活性化する<sup>17-20</sup>。さらに近年、細胞質内において病原体由来の DNA を認識する仕組みが複数同定されている<sup>21,22</sup>。その中には DAI (DNA-dependent activator of IRF)<sup>23</sup> をはじめとする細胞種特異的に核酸認識受容体として機能する分子が含まれる他、DNA が cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) と呼ばれる分子に認識されることにより cGAMP

(cyclic GMP-AMP) と呼ばれる低分子メディエーターが産生され、それが STING (stimulator of IFN genes protein)<sup>17-20</sup> に認識され、下流のシグナル伝達経路が活性化される<sup>24,25</sup> という間接的な細胞質内 DNA 認識の仕組みも明らかにされている。

これらの核酸認識 PRRs のシグナルによって活性化され、I 型 IFN やその他サイトカインの発現誘導を担っている重要な転写因子として、当研究室において同定された IRF (interferon regulatory factor) 転写因子群が知られている<sup>26</sup>。IRF 転写因子群は、哺乳類において 9 つのファミリー分子 (IRF1 – 9) からなり<sup>27</sup>、中でも IRF3, IRF7 はウイルス・バクテリア感染時の I 型 IFN の誘導に、IRF5 は TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-6 (interleukin-6), IL-12p40 といった炎症性サイトカインの遺伝子の転写誘導に不可欠であることが知られている<sup>26</sup>。

より詳細には、IRF3 は、ウイルス・バクテリア由来 DNA/RNA を認識する RIG-I や MDA5, cGAS などの細胞質内核酸認識受容体の下流において、IPS-1 あるいは STING 依存的に TBK1 (TANK-binding kinase 1) によってリン酸化され、核内移行し、I 型 IFN の誘導に不可欠の役割を果たす (序・図 1)<sup>1,26,28</sup>。また、IRF3 は TLR3 (Toll-like receptor 3) や TLR4 の下流でアダプター分子 TRIF (Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$ ) に依存して、IRF7 は TLR7, 9 の下流において、MyD88 (myeloid differentiation primary

response gene 88) に依存して I 型 IFN の誘導を行う<sup>26</sup>。一方、IRF5 は、TLRs の下流で MyD88 を介して活性化され核内移行し、炎症性サイトカイン遺伝子を転写誘導することが明らかにされている<sup>29,30</sup>。またさらに最近、IRF5 は、真菌由来の  $\beta$  グルカンを認識する C 型レクチン受容体 (C-type lectin receptors; CLR) <sup>31</sup> である Dectin-1 の下流においても活性化を受け、I 型 IFN や炎症性サイトカインの誘導を担うことが示されている<sup>32</sup>。

このように、IRF 転写因子の感染防御における不可欠の役割が明らかにされつつある一方、抗腫瘍免疫応答においてどのような役割を果たしているか、という課題についてはこれまで詳細な検討が為されていなかった。そこで本研究において私は、まず、自然免疫受容体の下流で活性化を受ける IRF 転写因子群の抗腫瘍免疫応答における役割を明らかにすることを目的として解析を行った。その結果、自然免疫担当細胞内在の IRF5 が、がん細胞自体を刺激として自然免疫受容体である Dectin-1 を介して活性化を受け、その活性化が NK 細胞のがん細胞殺傷活性の増強に帰結することを明らかにした。この新たに見出された知見について「IRF5 の抗腫瘍応答における役割」と題し、第 1 部にまとめた。

また一方で、先に述べた通り IRF3 の自然免疫応答における役割については、その機能の重要性ゆえに注目され詳細な研究がなされており、PubMed データベ

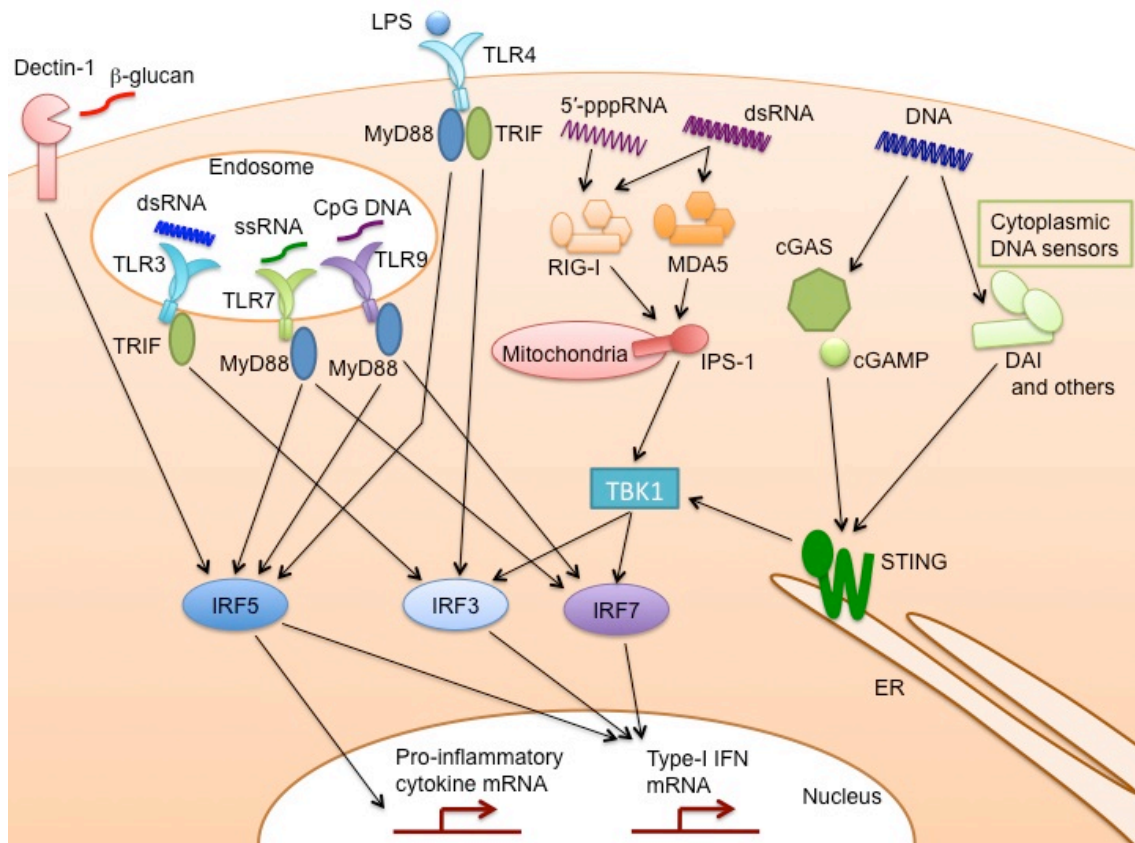
ースでのキーワード検索 (2014年11月現在) において、“IRF3”の該当数は1,300報以上にのぼる。また当研究室において作製された *Irf3* 遺伝子欠損マウス<sup>33</sup>を用いてなされた研究も数多く、“IRF3”および“mouse”での検索ヒット数は600報を超える。このように自然免疫応答における役割について多くが解析されてきた IRF3 であるが、一方で適応免疫系における IRF3 の機能についてはほとんど解析されていない。その理由として、自然免疫応答に必須である IRF3 を欠損したマウスでは、適応免疫応答の活性化が必然的にその影響を受けるため、T細胞またはB細胞における IRF3 の機能のみを検討することが非常に難しいことが挙げられる。興味深いことに、IRF3 は免疫系にとどまらず、循環器系の恒常性維持に関係するとの報告もあることから<sup>34</sup>、この転写因子には免疫系のみならず、より広汎に生体恒常性維持を担う未知の機能の存在が予想される。

一方で、当研究室において作製された *Irf3* 遺伝子欠損マウスは世界的に広く利用されているものの、このマウスには以下に述べる問題があることが判明した。すなわち、欠損マウスの作製当時<sup>33</sup>は同定されていなかった近接して存在する別の遺伝子 *Bcl2l12* の転写及び翻訳開始領域が、*Irf3* 遺伝子欠損マウスにおいて同時に欠失していることが後に明らかにされていた<sup>35</sup>。すなわち、既存の *Irf3* 遺伝子欠損マウスは実際には、*Irf3*<sup>-/-</sup>*Bcl2l12*<sup>-/-</sup>マウスであり、これを用いて得



られた知見では、IRF3 および Bcl2L12 のいずれの欠損がその表現型に寄与しているか、区別が困難であった<sup>35</sup>。

そこで私はこのような課題を追求する手段として、隣接する *Bcl2l12* 遺伝子に影響を与えず、かつ細胞・組織特異的に *Irf3* 遺伝子の欠失させることを可能にするため、新たに IRF3 コンディショナルノックアウトマウスの作製・解析を目指した。この研究は、「Flox-IRF3 マウスの作製とコンディショナルノックアウトにむけた解析」と題し、当マウスを用いた今後の IRF3 研究の展望も含め、第 2 部としてまとめた。一連の成果は IRF 研究に新しい展開をもたらすとともに、今後の IRF 研究の基盤構築にも貢献するものと考えられる。



序・図1 パターン認識自然免疫受容体と IRF 転写因子群

IRF 転写因子群の関与する自然免疫受容体シグナル経路を示す。エンドソームにおいては、膜貫通型核酸認識受容体である Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) 3, 7, 9 がそれぞれ、2 本鎖 RNA、1 本鎖 RNA および非メチル化 CpG モチーフを含む DNA を認識する<sup>1</sup>。また一方で、細胞質内には RNA を認識する RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I), MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) といった RIG-I 様受容体 (RIG-I-like receptors; RLRs) が存在する<sup>8-10</sup>。RLR はアダプター分子 IPS-1 (IFN- $\beta$  promoter stimulator-1)<sup>13-16</sup> 依存的に下流のシグナル伝達経路活性化を惹起する。細胞質内 DNA 認識受容体は複数同定されている<sup>21,22</sup>。その中には DAI (DNA-dependent activator of IRF)<sup>23</sup>をはじめとする細胞種特異的に核酸認識受容体として機能する分子が含まれる他、DNA が cGAS (cyclic GMP-AMP

synthase) と呼ばれる分子に認識されることにより cGAMP (cyclic GMP-AMP) と呼ばれる低分子メディエーターが産生され、それが STING (stimulator of IFN genes protein)<sup>17-20</sup> に認識されて下流のシグナル伝達経路が活性化される<sup>24,25</sup> という間接的な認識機構も明らかにされている。これらの細胞質内核酸認識受容体から IPS-1 や STING といった共通のアダプター分子を経由して、さらにその下流で、I 型 IFN やその他サイトカインの発現誘導を担っている転写因子が、当研究室において同定された IRF (interferon regulatory factor) ファミリー転写因子である<sup>26</sup>。中でも IRF3, IRF7 はウイルス・バクテリア感染時に I 型 IFN の誘導に、IRF5 は TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-6 (interleukin-6), IL-12p40 といった炎症性サイトカイン遺伝子の転写誘導に不可欠である。より詳述すると、IRF3 および IRF7 は、RIG-I や MDA5、cGAS などの細胞質内核酸認識受容体の下流で IPS-1 あるいは STING 依存的に TBK1 (TANK-binding kinase 1) によってリン酸化され、核内移行し、I 型 IFN の誘導に不可欠の役割を果たす<sup>1,26,28</sup>。また、IRF3 は TLR3 (Toll-like receptor 3) や TLR4 の下流で、IRF7 は TLR7, 9 の下流においても、それぞれアダプター分子 TRIF (Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$ ), MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) に依存して I 型 IFN の誘導を行う<sup>26</sup>。一方、IRF5 は、種々の TLRs の下流において、アダプター分子 MyD88 を介して活性化され、核内移行し、炎症性サイトカイン遺伝子を転写誘導することが明らかにされている<sup>29,30</sup>。また IRF5 は、真菌由来の  $\beta$  グルカンを認識する C 型レクチン受容体 (C-type lectin receptors; CLR) <sup>31</sup> である Dectin-1 の下流においても活性化を受け、I 型 IFN を誘導する<sup>32</sup>。(図中略称、dsRNA: double-stranded RNA, ssRNA: single-stranded RNA, ER: endoplasmic reticulum)

# 第 1 部 『IRF5 の抗腫瘍応答における役割』

## 1.1 序文

先に述べたように、免疫系は、PRRs によるウイルスやバクテリアの認識と下流のシグナルの活性化、サイトカインの誘導といった自然免疫応答に端を発し、これらの病原体の排除に寄与する。一方、免疫系は、外来からの異物だけでなく、宿主自身の細胞に由来する“内なる非自己”である、がんの排除にも重要であることが知られている。がんに対する免疫応答として、細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) によるがん細胞の殺傷作用が古くから知られており<sup>36</sup>、この細胞の機能を利用してがん細胞の効率的排除に導くために、がん特異抗原を用いた免疫療法等の研究が進んでいる<sup>37</sup>。また、抗腫瘍応答を担う自然免疫担当細胞として、やはりがん細胞を直接殺傷する機能を持つ NK (natural killer) 細胞の働きがよく知られている<sup>38,39</sup>。NK 細胞には MHC (major histocompatibility complex) クラス I 分子を認識することで細胞傷害活性が抑制される機構が備わっており、MHC クラス I 分子を発現する自己の正常細胞に対し

ては攻撃しないが MHC クラス I 分子を失ったがん細胞のような異常な細胞を攻撃対象とする<sup>40</sup>。そしてパーフォリンやグランザイムといったエフェクター分子によってがん細胞をアポトーシスに導く<sup>41</sup>。また、NK 細胞には NKG2D (natural killer cell group 2D) と呼ばれる受容体が発現しており、NKG2D リガンド (マウスでは Rae-1, Mult1, H-60 ヒトでは MICA, MICB, ULBP) を過剰発現しているがん細胞を攻撃対象として認識する<sup>42,43</sup>。また、NK 細胞の細胞傷害活性を増強させるとの報告がある分子として、I 型 IFN や IL-12 といったサイトカインに加え、細胞表面で機能する INAM, IL-15 および IL-15R $\alpha$  が知られている<sup>44-49</sup>。INAM は、樹状細胞、マクロファージ、および NK 細胞において発現しており、さらに樹状細胞においては TLR3-IRF3 シグナル依存的に発現誘導され、樹状細胞と NK 細胞表面の INAM がホモフィリック相互作用を行うことにより、NK 細胞の活性化に寄与する<sup>46</sup>。IL-15 は、樹状細胞表面に発現する IL-15R $\alpha$  と安定して複合体を形成し、細胞間相互作用を介してその受容体 (IL-2/15R $\beta$  と common cytokine-receptor  $\gamma$ -chain から成る) を発現する NK 細胞を活性化する<sup>48,50</sup>。

このように、免疫系はがんの排除にも重要な役割を果たしていることが知られている。しかしながら、感染防御に不可欠の役割を果たす自然免疫系、特に先に紹介した IRF 転写因子群が、がんの排除においてどのような役割を果たし

ているか、という問題についてはこれまで詳細な検討がなされていなかった。

本研究では、抗腫瘍応答における IRF ファミリー転写因子群の役割を明らかにすることを目的として解析を行い、その結果、樹状細胞やマクロファージによるがん細胞認識によって IRF5 が活性化を受けること、その活性化が NK 細胞のがん細胞に対する殺傷活性の亢進に繋がることを明らかにし、IRF5 が抗腫瘍応答において重要な役割を果たすことを新たに見出した。

## 1.2 結果

### 1.2.1 IRF 転写因子群のがん排除における役割

IRF 転写因子群の中でも IRF3, IRF5 および IRF7 は、ウイルス・バクテリアの感染時に TLR や細胞質内核酸認識受容体といったパターン認識受容体の下流で活性化し、I 型 IFN や炎症性サイトカインの誘導に必須の役割を果たすことが知られている<sup>26,30,33</sup>。ではこれらの転写因子は、抗腫瘍自然免疫応答には関与するであろうか。そこで、これらの転写因子の抗腫瘍免疫応答への寄与を解析するために以下のアプローチを試みた。IRF3, IRF5 および IRF7 それぞれの遺伝子欠損マウス (*Irf3*<sup>-/-</sup>, *Irf5*<sup>-/-</sup>, *Irf7*<sup>-/-</sup>マウス)、および野生型マウスに対し B16F1 メラノーマ細胞を尾静脈注射し、14 日後に肺に形成されたコロニー数を定量した (以下、B16F1 メラノーマ細胞肺転移モデルと称する)。その結果、*Irf5*<sup>-/-</sup>マウスにおいて、野生型マウスと比較して、肺に形成されたコロニー数に顕著な増加が見られた (図 1.1)。一方、*Irf3*<sup>-/-</sup>マウス、*Irf7*<sup>-/-</sup>マウスにおいては、肺転移コロニー数にそのような増加は見られなかった (図 1.1)。これらの結果から、B16F1 細胞の肺転移モデルにおけるがんの転移コロニー形成抑制に IRF3, IRF5, IRF7 のうち IRF5 が選択的に寄与していることが示された。また、B16F1 メラノーマ細胞

をマウスに皮下注射し、皮下に形成された腫瘍の体積を測定したところ、*Irf5*<sup>-/-</sup> マウスにおいて、野生型マウスと比較して、腫瘍増殖に著明な増悪が見られた (図 1.2)。この結果と合わせ、IRF5 はがんの肺組織への浸潤抑制等に影響するのではなく、がん細胞の排除に寄与している可能性が強く想定された。そこで、IRF5 の関与する抗腫瘍応答に着目し、その機構の詳細を明らかにすべく、さらなる検討を行うことにした。

### 1.2.2 骨髄移植を用いた IRF5 の抗腫瘍応答における役割の検討

前節の結果から、IRF5 が B16F1 メラノーマ細胞肺転移モデルにおいて、がん細胞の排除に寄与していることが明らかになった。IRF5 は全身の細胞で発現が認められるため、IRF5 がどの細胞において機能することががんの排除に寄与しているのか、さらなる知見を得るために骨髄移植と B16F1 メラノーマ細胞肺転移モデルを組み合わせて行った。Ly5.1 陽性 C57BL/6 コンジェニックマウス (Ly5.1-C57BL/6) に  $\gamma$ 線を照射した後、*Irf5*<sup>-/-</sup>マウス (Ly5.2 陽性) 由来骨髄細胞を尾静脈注射により移植し、骨髄由来細胞においてのみ IRF5 を欠損するマウスを作製した。また、その対照群としては、同様の手順で野生型マウス (Ly5.2 陽性) 由来骨髄細胞を移植した Ly5.1-C57BL/6 マウスを用意した。同時に、*Irf5*<sup>-/-</sup>



マウスに  $\gamma$ 線を照射した後、Ly5.1-C57BL/6 マウス由来骨髄細胞を移植し、骨髄細胞由来細胞以外の細胞において IRF5 を欠損するマウスを作製した。この対照群としては、野生型マウスに Ly5.1-C57BL/6 マウス由来骨髄細胞を移植したマウスを用意した。上記 4 群のマウスを前節と同様の B16F1 メラノーマ細胞肺転移モデルに供したところ、*Irf5*<sup>-/-</sup>マウス由来骨髄細胞を移植したマウスでは、野生型マウス由来骨髄細胞を移植した対照群に比べ、B16F1 メラノーマ細胞の肺転移数に著明な増加が見られた (図 1.3 A)。一方、レシピエントとして *Irf5*<sup>-/-</sup>マウスあるいは対照群として野生型マウスを用いた場合には、肺転移コロニー数に有意な差は見られなかった (図 1.3 B)。これらの結果から、IRF5 は骨髄由来の細胞において機能することで、がんの排除に寄与していることが示された。

これまでの報告から、B16F1 メラノーマ細胞肺転移モデルにおいては、抗アシアロ GM1 抗体の投与により NK 細胞を除去したマウス個体において、転移コロニー数が顕著に増大することから、このモデルにおけるがん細胞の排除には NK 細胞が必須であることが既に知られている<sup>38</sup>。このことから、NK 細胞中の IRF5 の欠損によって、がんの排除に異常を来す可能性が考えられた。そこで次に、野生型および *Irf5*<sup>-/-</sup>マウス由来の NK 細胞のがんに対する殺傷力の比較を試みた。NK 細胞の殺傷力の定量には、<sup>51</sup>Cr 遊離法を採用した<sup>51</sup>。放射性同位体 <sup>51</sup>Cr

を殺傷の標的となるがん細胞に取り込ませ、この標的細胞を NK 細胞等の殺傷のエフェクターとなる細胞と共培養すると、共培養中に標的がん細胞が殺傷され、死細胞から培養上清中に  $^{51}\text{Cr}$  が放出される。よってこれらの細胞を共培養した後、培養上清中の  $^{51}\text{Cr}$  の放射能を定量することにより、標的細胞の被殺傷率、すなわちエフェクター細胞の殺傷力を定量的に評価することができる。

まず、NK 細胞を含む脾細胞を用いての検討を行った。*Irf5*<sup>-/-</sup>マウス脾細胞中における細胞集団は、野生型マウスと同様であることが既に確認されている<sup>30</sup>。

野生型および *Irf5*<sup>-/-</sup>マウス由来の脾細胞をエフェクター細胞として用い、B16F1 細胞に対する殺傷を定量した。その結果、IRF5 が欠失した脾細胞を用いた場合には野生型細胞の場合と比較し、がん細胞の殺傷率に減弱が見られた (図 1.4A)。

また、野生型および *Irf5*<sup>-/-</sup>マウスそれぞれに抗アシアロ GM1 抗体を予め投与することにより NK 細胞を除去し、これらのマウス由来の脾細胞をエフェクター細胞として用いて殺傷を定量したところ、いずれの場合にも標的細胞の殺傷は検出されなかった (図 1.4B)。これらのことから、脾細胞中において IRF5 が機能することにより、NK 細胞によるがん細胞の殺傷に促進的に寄与することが明らかとなった。そこで次に、野生型あるいは *Irf5*<sup>-/-</sup>マウスの脾臓から NK 細胞をネガティブセレクションにより精製し (本研究に用いる NK 細胞の殺傷アッセイ

においては、NK1.1 や DX5 などの受容体に刺激を与えないよう、ネガティブセレクションによって NK 細胞を調製した)、これらをエフェクター細胞として用いて B16F1 細胞に対する細胞傷害活性を定量した。その結果、NK 細胞に内在する IRF5 がその細胞傷害活性に寄与するのではないかとの予想に反し、野生型 NK 細胞と *Irf5* 遺伝子欠損 NK 細胞の傷害活性には有意な差が見られなかった (図 1.4C)。これらの結果から、脾細胞による B16F1 細胞の殺傷には NK 細胞が必須であること、その殺傷活性に IRF5 が関与すること、しかしながら NK 細胞に内在する IRF5 は NK 細胞のがん殺傷能力に影響を与えないことが示された。なお、脾細胞に含まれる NK 細胞の割合が 3%程度であることを踏まえると、NK 細胞のみを精製してエフェクター細胞として用いた場合の NK 細胞 1 個あたりの細胞傷害活性は、脾細胞を丸ごとエフェクター細胞として用いた場合のそれと比較し、非常に低い値であることがわかる (図 1.4A, C)。すなわち、脾細胞中の NK 細胞以外の細胞が NK 細胞の抗腫瘍活性を増強しており、それらの細胞において IRF5 が機能することが重要である可能性が考えられる。

### 1.2.3 マクロファージ・樹状細胞における IRF5 を介した NK 細胞の殺傷力亢進作用についての検討

前節までの結果より、IRF5 は骨髄由来の細胞において機能し、また、B16F1 細胞の排除にはNK細胞が必須であることが明らかとなり、骨髄由来細胞の IRF5 は NK 細胞を介してのがんの排除に寄与していることが示唆された。しかしながら一方で、NK 細胞に内在する IRF5 は NK 細胞によるがん細胞の殺傷に必要ではないことが示された。このことから、私は NK 細胞以外の骨髄由来の何らかの細胞の作用により NK 細胞の殺傷機能が増強されており、この作用に対して IRF5 の機能が寄与しているのではないか、という仮説を立てた。では、いずれの細胞が NK 細胞の殺傷を亢進させる効果を持っているのか。この問題について知見を得るために、骨髄細胞に由来する免疫担当細胞である T 細胞, B 細胞, マクロファージ, 樹状細胞について、それらの細胞が豊富な脾細胞中より個々に精製し、各々が NK 細胞によるがん細胞の殺傷に対して与える影響について検討することにした。まず、脾細胞から精製した各種細胞を用いて *in vitro* で殺傷の条件を再構築する実験系を確立した。C57BL/6 マウス由来脾細胞から T 細胞, B 細胞, マクロファージ, または樹状細胞を精製し、同じく脾細胞から精製した NK 細胞を用いて、B16F1 細胞との共培養を行い、NK 細胞によるがん細胞の殺

傷を  $^{51}\text{Cr}$  遊離法にて定量した。その結果、NK 細胞と B16F1 細胞との共培養にマクロファージまたは樹状細胞を加えた場合には、加えた細胞数の増加に依存して、NK 細胞によるがん細胞の殺傷活性が増強されることが見出された (図 1.5)。一方、T 細胞, B 細胞を加えた場合には、そのような増強は見られなかったことから、マクロファージ, 樹状細胞が NK 細胞の抗腫瘍応答の増強に選択的に関与することが示された (図 1.5)。この結果と前節までの結果を総合すると、IRF5 がマクロファージ, 樹状細胞において機能することが NK 細胞の殺傷を亢進させるために重要であると考えられた。そこで、*Irf5*<sup>-/-</sup>マウス由来の脾細胞よりマクロファージおよび樹状細胞を調製し、野生型 NK 細胞を用いて上記と同様に B16F1 細胞の殺傷を定量した。その結果、*Irf5* 遺伝子欠損マクロファージおよび樹状細胞は、野生型のそれらの細胞と比較し、NK 細胞の殺傷力を亢進させる機能が有意に低下していることが見出された (図 1.6)。以上の一連の結果より、マクロファージ, 樹状細胞が NK 細胞の殺傷効果の増強に関与する細胞群であり、これらの細胞において IRF5 が機能することが、その効果を最大限に発揮するために重要であることが示された。

#### 1.2.4 がん細胞の刺激による IRF5 の活性化の検討

前節の結果から、がんと共培養したマクロファージ・樹状細胞において IRF5 が機能することが示された。IRF5 は TLR シグナル経路の下流で活性化し、炎症性サイトカインの発現誘導に必須の役割を果たすことが知られている<sup>30</sup>。また最近、真菌由来  $\beta$ グルカンを認識する C 型レクチン受容体 (C-type lectin-like receptor; CLR) である Dectin-1 の下流で活性化し、IFN- $\beta$  等の遺伝子発現を誘導するとの報告がなされている<sup>32</sup>。しかしながら、PRRs によってがん細胞由来分子が認識され IRF5 を活性化する、というような報告はなく、かつ上記のようながん細胞との共培養という系において IRF5 が活性化を受けるというようなことは、俄には信じ難く思われた。そこで、脾細胞と B16F1 メラノーマ細胞との共培養を *in vitro* 殺傷アッセイと同様の細胞比で行い、IRF5 が活性化されるかどうか検証を試みた。活性化の指標として、IRF5 の細胞質から核内への移行を immunoblotting によって特異的に検出することで検討した<sup>30</sup>。その結果、共培養前の脾細胞の核内画分からは IRF5 が検出されなかったが、がん細胞との共培養後には核内に IRF5 が検出された (図 1.7)。この結果から、がん細胞と出会うことにより、IRF5 が活性化を受け核内へ移行することが示された。では、がんを認識し、IRF5 の活性化に関与する PRR は一体何であるか。先述の通り IRF5 の

活性化に寄与する PRR としては、TLR および CLR の一つである Dectin-1 が知られている<sup>30,32</sup>。しかしながら TLR の共通アダプター分子である MyD88 の遺伝子を欠損したマウス由来の脾細胞は、野生型脾細胞とほぼ同等の細胞傷害活性を示すという知見<sup>52</sup>があり、TLR シグナルは *in vitro* 殺傷アッセイにおける NK 細胞によるがんの排除に寄与していないことが考えられた (この知見について、植木紘史氏 学位論文にて言及) ため、ここでは Dectin-1 に注目した。興味深いことに、Dectin-1 欠損脾細胞を B16F1 メラノーマ細胞と共培養した際には、IRF5 の核内への移行は見られなくなることが判明した (図 1.8)。このことから、がん細胞が IRF5 の活性化を引き起こす際に上流に位置する PRR は Dectin-1 であることが示された。Dectin-1 下流の主要なシグナル経路の一つとして NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) 経路が知られていることから<sup>53</sup>、NFAT の阻害剤である FK506 を加えて同様の共培養を行ったところ、IRF5 の核内への移行が確認された (図 1.9)。IRF5 の活性化は Dectin-1 に依存しているが、下流の NFAT 経路はこの活性化には関与しないことが示唆された。Dectin-1 の下流において IRF5 がどのように活性化を受けるのか、その分子機構は現在のところ明らかではなく、今後の検討が必要である。なお、本結果から予想されるように、*Dectin-1* 遺伝子欠損マウスは、B16F1 メラノーマ細胞肺転移モデルにおいて著明な転移

コロニー数の増加を示すことも明らかとなっている<sup>52</sup>。

## 1.2.5 NK 細胞の殺傷力を亢進させる細胞間相互作用

1.2.3 の結果から、Dectin-1-IRF5 経路によるシグナルを介してマクロファージおよび樹状細胞が NK 細胞の殺傷を亢進させることが示された。では IRF5 依存的に NK 細胞の殺傷を亢進させるその実体は何なのか。私は、がん細胞と接触したマクロファージや樹状細胞において、NK 細胞の殺傷力を活性化する因子が IRF5 依存的に発現誘導される、という仮説を立てた。そこでこの仮説を検証するため、野生型マウスおよび *Irf5*<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞から調製した樹状細胞を B16メラノーマ細胞と共培養した際、NK 細胞の活性化との関連性が報告されている分子の遺伝子発現の変化について検討した。これまでに、刺激によって誘導され、NK 細胞の活性化に関与するとの報告がある分子としては、サイトカインである I 型 IFN や IL-12、および細胞表面に結合した状態で機能する IL-15 および IL-15R $\alpha$ , そして INAM が知られている<sup>44-49</sup>。そこで、野生型マウスもしくは *Irf5*<sup>-/-</sup>マウス由来樹状細胞を B16F1 細胞と共培養し、トータル RNA を抽出して、IFN- $\beta$ , IL-12p40, IL-15, IL-15R $\alpha$ , および INAM の mRNA の発現レベルを qRT-PCR 法により解析した。その結果、IFN- $\beta$ , IL-12p40 の mRNA の発現レベルは、野生型マ



ウス由来もしくは *Irf5*<sup>-/-</sup>マウス由来のいずれの樹状細胞を共培養に用いた場合でも、共培養の前後で大きな変化を示さなかった (図 1.10)。またさらに、NK 細胞と樹状細胞、および B16F1 細胞を共培養させた際、IFN- $\alpha$ および IFN- $\beta$ に対する中和抗体、あるいは IL-12 に対する中和抗体を添加し、樹状細胞による殺傷亢進活性が低下するか否か検討した。その結果、これらの中和抗体の投与は樹状細胞による殺傷亢進効果を減弱させないことが判明し、やはり I 型 IFN 及び IL-12 は関与しないことが明らかとなった (図 1.11)。一方で、qRT-PCR の結果から、IL-15, IL-15R $\alpha$ , INAM は野生型樹状細胞とがん細胞との共培養により mRNA の発現が誘導されることが見出された (図 1.10)。またこのとき *Irf5* 遺伝子欠損樹状細胞を B16F1 細胞と共培養した場合には、INAM mRNA の発現は野生型細胞を用いた際と比較して顕著な減弱が見られ、IL-15, IL-15R $\alpha$ の mRNA の発現にも、わずかに減弱が認められた (図 1.10)。前節の結果と合わせて、これらの結果から、がん細胞の認識に伴って活性化された IRF5 によって誘導され、NK 細胞の活性化を行っている実体は、INAM、および IL-15 と IL-15R $\alpha$ といった細胞膜表面に存在するタンパク質による細胞間相互作用を介していることが示唆された。

以上の結果のうち、図 1.4 – 1.6 の実験については、医学系研究科博士課程 4 年 (生産技術研究所 炎症・免疫制御学) 植木紘史氏の協力を得て行った。また、

私が行なった研究の一部は植木氏らが得た実験データと共に、eLife 誌に学術論文として発表した<sup>52</sup>。

### 1.3 考察

本研究における解析から、(i) 感染防御において不可欠の役割を果たしていることが知られている転写因子 IRF5 が、抗腫瘍応答においても重要であり、*Irf5*<sup>-/-</sup> マウスでは B16F1 メラノーマ細胞の肺への転移、増殖が顕著に亢進すること、(ii) がん細胞との共培養により、マクロファージおよび樹状細胞において IRF5 が Dectin-1 シグナルを介した活性化を受け核内移行し、INAM や IL-15、IL-15R $\alpha$  などの NK 細胞の殺傷能を増強する分子群の遺伝子発現を誘導し、がん細胞の排除に寄与することが明らかとなった。これまで自然免疫シグナルの抗腫瘍応答における役割については不明であったが、本研究において、自然免疫応答に重要な役割を果たすことが知られている IRF5 が抗腫瘍応答においても重要な役割を果たしていることが明らかとなり、IRF5 の活性化を担う自然免疫受容体が想定され、実際その一つとして Dectin-1 (後述) によるがんの認識機構<sup>52</sup>が明らかになる契機となった重要な知見であると位置づけられる。一方で、何故、IRF3 や IRF7 ではなく、IRF5 が抗腫瘍応答を担うことになったのか、がんを認識する受容体とともにどのように進化してきたのかを知ることは、自己の細胞を認識するようになった経緯を考える上で重要であるのではないかと思われる。本研

究においては IRF5 が B16F1 メラノーマ細胞の排除に重要であることを見出した  
が、その他のがん細胞に対しても同様に排除に機能するのかどうか、関与しな  
い際には他の IRF 転写因子の関与はどうかなどを検討していくことで、対応す  
るがん種の傾向等が明らかになるのではないかと思われる。実際、野生型マウ  
スおよび *Irf5*<sup>-/-</sup>マウス由来脾細胞をエフェクター細胞とし、YAC-1 (マウスリンパ  
腫細胞株) に対する殺傷活性を定量したところ、*Irf5*<sup>-/-</sup>マウス由来脾細胞では、  
野生型マウス由来細胞と比較し殺傷活性の減弱が認められた (図 1.12)。このよ  
うに IRF5 が複数種のがんの排除に重要である知見が得られていることから、他  
のがん種に対する、PRR および自然免疫シグナル経路と NK 細胞の活性化機構  
との関連を明らかにすることで抗腫瘍自然免疫応答の全貌に迫ることができる  
と期待される。

IRF5 は従来、外来の病原体由来の PAMPs を認識する TLR シグナルによって  
活性化され、炎症性サイトカイン等の遺伝子の誘導を行う転写因子として知ら  
れていた<sup>30</sup>。本研究において新たに、がん細胞と共培養されたマクロファージ、  
樹状細胞といった自然免疫担当細胞において、がん細胞そのものを刺激として  
転写因子 IRF5 が活性化する、ということが見出された。では、どのような受容  
体によって、がん細胞の何を認識し、シグナルを活性化しているのか。当研究

室における解析により、がん細胞を認識し IRF5 の活性化を導く受容体として、真菌由来  $\beta$  グルカン を認識する CLR である Dectin-1 が同定され<sup>52</sup>、がん細胞上に発現している N 結合型糖鎖構造を Dectin-1 が認識すること、また、*Dectin-1* 遺伝子欠損樹状細胞では、がん細胞との共培養を経ても IRF5 の活性化による核内移行が検出されないことが見出された<sup>52</sup>。Dectin-1 による  $\beta$  グルカンの認識により、IL-12 を含め種々のサイトカインが産生されること、また、Dectin-1-IRF5 依存的に I 型 IFN が誘導されるとの報告がなされている<sup>32</sup>。

本研究で明らかになった、Dectin-1 によるがんの認識を介した IRF5 依存的な NK 細胞の活性化機構において I 型 IFN や IL-12 の関与が見られないとの知見を考え合わせると、Dectin-1 による  $\beta$  グルカンの認識、およびがん細胞由来分子の認識それぞれによって活性化される下流のシグナル伝達経路には違いがある可能性も大いに考えられる (図 1.13)。マクロファージや樹状細胞におけるがん細胞認識の際に IRF5 を活性化し、NK 細胞のがん殺傷能を効率良く増強させる機構を明らかにできれば、抗腫瘍自然免疫応答を利用したがんの予防・治療への応用が強く期待されることから、Dectin-1 依存的な IRF5 の活性化機構については興味深い今後の課題であると考えている。

本研究における NK 細胞の *in vitro* での殺傷アッセイの実験系においては、中

和抗体を用いた検討により、I型 IFN や IL-12 といった NK 細胞の活性化を誘導するサイトカインが、樹状細胞による NK 細胞の活性化促進に関与していないことが明らかにされた。また、この結果と一致して、殺傷アッセイを行う共培養条件において、IFN- $\beta$ , IL-12p40 の誘導は認められなかった。また別の解析から、樹状細胞と B16F1 メラノーマ細胞とを 4 時間共培養した、その上清を NK 細胞に処理しても、細胞傷害活性に亢進が見られないことも分かっており、上清中に放出される液性因子はこの機構に関与しないと考えられた<sup>52</sup>。そこで、マクロファージや樹状細胞と NK 細胞の細胞間相互作用が、NK 細胞の活性化亢進に関与するのではないかと考えた。過去の報告から、そのような機構に関与する分子として、INAM や IL-15, IL-15R $\alpha$ などが報告されていた。これらの分子の発現について qRT-PCR 法により解析した結果、がん細胞の刺激による INAM の誘導が *Irf5* 遺伝子欠損樹状細胞において顕著に低下することが分かった。また、さらに、前述の *Dectin-1* 遺伝子欠損樹状細胞を用いてマイクロアレイ解析を行っており、細胞膜表面に発現する分子をコードする遺伝子として、*Inam* 以外に *Chrn2*, *Fzd6*, *Lrrc19*, *Crtam*, *Adora2a*, *Ly6i*, *Tnfsf10* が *Dectin-1* 依存的に誘導されることが判明している<sup>52</sup>。これらの遺伝子については、NK 細胞やがんとの関連について報告がなされていなかったため、私はレンチウイルスを用いた発

現系により骨髄細胞から分化させた樹状細胞においてこれらの分子を発現させ、NK 細胞の活性化に寄与するか検討を行ったが、NK 細胞の活性化を見出すことが出来なかった。個々の遺伝子をそれぞれ単独で導入して検討したため、これらの膜表面タンパク質が NK 細胞の殺傷亢進に関与していないのか、あるいは複数の分子が同時に発現した時にのみ機能するのか、という点については明らかでない。あるいはその他の可能性として、INAM が樹状細胞と NK 細胞の両者に発現しホモフィリックな相互作用をすることにより、2 細胞間の接着を強化するとの機能の報告<sup>46</sup>を鑑みると、ごく近傍でのみ他の細胞に作用し得る液性因子が INAM とともに発現して、「免疫シナプス」のような近接する細胞間の間隙においてのみ受け渡されて NK 細胞を活性化しているということもあり得るかも知れない。樹状細胞やマクロファージによる、細胞間相互作用を経た NK 細胞の活性化の分子メカニズムについては、今後の興味深い検討課題であると考えられる。

本研究の結果から、自然免疫系のシグナル、すなわち Dectin-1 シグナルが IRF5 の活性化を介して抗腫瘍応答に重要な役割を果たすことが明らかとなった。がんの排除を導くシグナル経路の詳細、および NK 細胞の活性化促進機構を明らかにすることで、がんの予防・治療法への応用に向けた薬剤開発における分子

基盤の確立に繋がることを期待されるため、これらについて今後の解析により  
明らかにしていきたい。



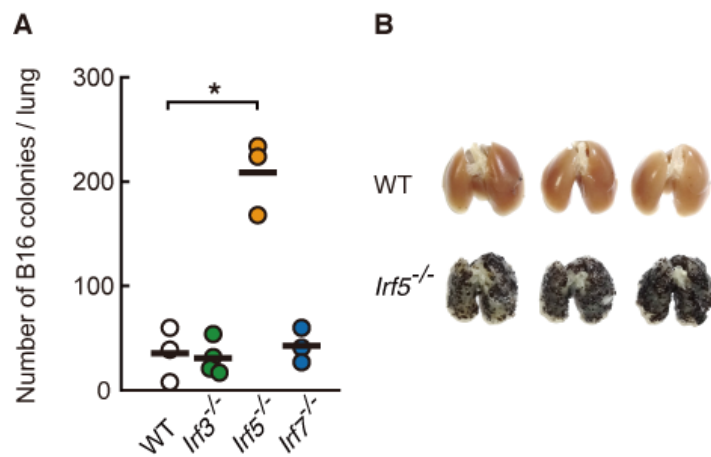


図 1.1 B16F1 メラノーマ細胞の肺転移における IRF 転写因子の関与

(A) 野生型 (WT), *Irf3*<sup>-/-</sup>, *Irf5*<sup>-/-</sup>, および *Irf7*<sup>-/-</sup> マウスに  $1 \times 10^6$  個の B16F1 メラノーマ細胞を尾静脈注射した。注射後 14 日目に各マウスから肺を摘出し、形成されたコロニーを計数した。黒線は各群の平均値を示す。 (B) WT および *Irf5*<sup>-/-</sup> マウスに  $2 \times 10^6$  個の B16F1 メラノーマ細胞を尾静脈注射し、注射後 14 日目に各マウスから肺を摘出した。アスタリスクは  $P < 0.05$  で有意差があることを示す。

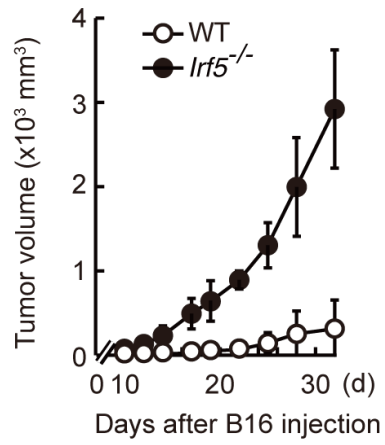


図 1.2 B16F1 メラノーマ細胞の皮下増殖への IRF5 の関与  
 野生型 (WT) および *Irf5*<sup>-/-</sup> マウスに  $1 \times 10^5$  個の B16F1 メラノーマ細胞を皮下注射し、皮下の腫瘍体積を測定した。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ ) を表す。

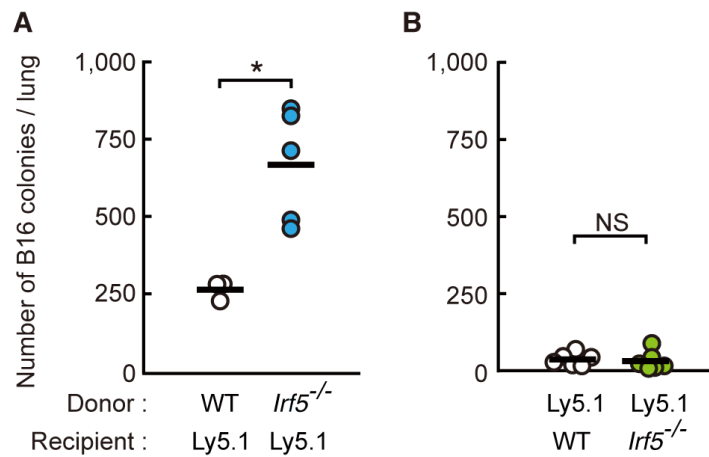


図 1.3 がん細胞の排除に対する骨髄由来細胞内在の IRF5 の寄与の検討  
 Ly5.1-C57BL/6 マウスにγ線 (5 Gy, 2回) を照射し、野生型 (WT), もしくは *Irf5*<sup>-/-</sup> マウス由来骨髄細胞 ( $5 \times 10^6$  個) を尾静脈注射により移植した (A)。一方、WT および *Irf5*<sup>-/-</sup> マウスにγ線 (5 Gy, 2回) を照射し、それぞれに Ly5.1-C57BL/6 マウス由来骨髄細胞 ( $5 \times 10^6$  個) を尾静脈注射により移植した (B)。骨髄移植から3ヶ月後に、移植レシピエントマウスに対し  $1 \times 10^6$  個の B16F1 メラノーマ細胞を尾静脈注射した。B16F1 細胞注射後14日目に各マウスから肺を摘出し、形成されたコロニーを計数した。黒線は各群の平均値を示す。アスタリスクは  $P < 0.05$  で有意差があることを示し、NS は  $P > 0.05$  で有意差がないことを示す。

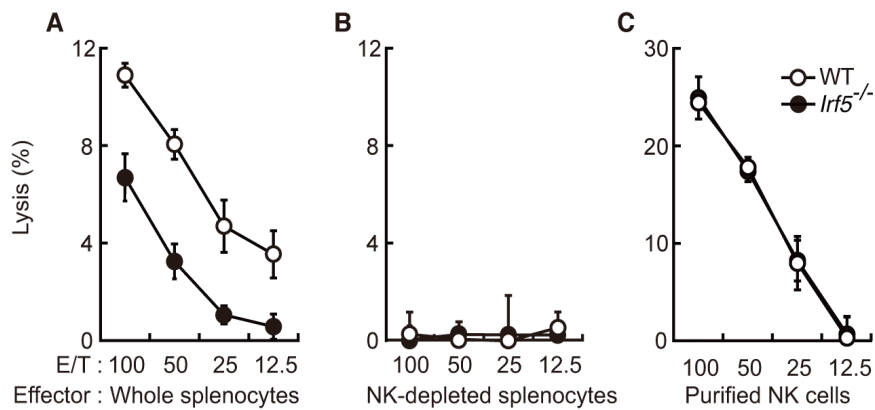


図 1.4 *Irf5*<sup>-/-</sup> マウス由来 NK 細胞を用いた細胞傷害活性の検討

野生型 (WT) マウスもしくは *Irf5*<sup>-/-</sup> マウス由来の脾細胞 (A), 同マウス由来の NK 細胞を除去した脾細胞 (B), および同マウスの脾細胞から精製した NK 細胞 (C), をエフェクター細胞とし、B16F1 メラノーマ細胞に対する殺傷を <sup>51</sup>Cr 遊離法により検討した。予め <sup>51</sup>Cr で標識した B16 細胞とエフェクター細胞を、図中に示した細胞数の比率で混合し共培養した。共培養開始から 4 時間後に培養上清を回収し、標的細胞から放出された培養上清中 <sup>51</sup>Cr 放射活性をγカウンタにより定量した。全ての検討において  $1 \times 10^4$  個の <sup>51</sup>Cr 標識 B16F1 細胞を用いた。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ ) を表す。脾細胞からの NK 細胞の除去は、抗アシアロ抗体をマウスに腹腔内注射することにより行った。抗アシアロ抗体では NK 細胞および好塩基球が除去されるとの報告がある<sup>54</sup>。しかしながら、図 1.5, 1.6 の *in vitro* 殺傷アッセイでは精製 NK 細胞を用いており、その purity の確認には抗 NK1.1 抗体を使用して、安定して purity 95%以上を示した。したがって、本研究において見出された IRF5 依存的ながん殺傷の亢進効果は、NK 細胞の細胞傷害活性を介するものと考えられる。

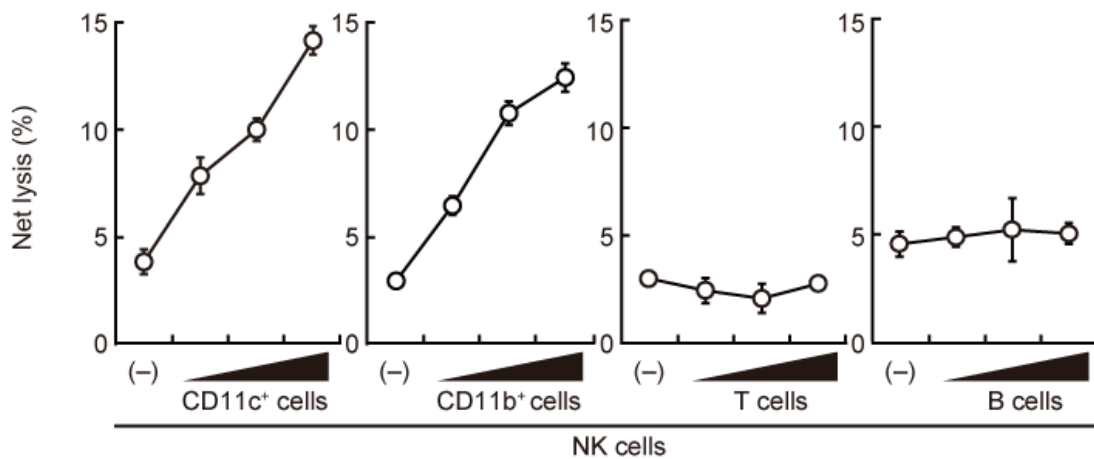


図 1.5 マクロファージおよび樹状細胞のがん排除における役割の検討

野生型マウス由来脾細胞から精製した NK 細胞 ( $1 \times 10^5$  個) に対し、野生型マウス脾細胞から調製した CD11b<sup>+</sup>細胞, CD11c<sup>+</sup>細胞, B 細胞, T 細胞をそれぞれ  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$  個添加し、予め  $^{51}\text{Cr}$  で標識した B16F1 細胞 ( $1 \times 10^4$  個) と共培養した。共培養開始から 4 時間後に培養上清を回収し、標的細胞から放出された培養上清中  $^{51}\text{Cr}$  放射活性を  $\gamma$  カウンタにより定量した。なお、CD11b<sup>+</sup>細胞, CD11c<sup>+</sup>, B 細胞, T 細胞を添加することによる B16F1 細胞の被殺傷数を除外するため、NK 細胞を加えず、野生型マウス脾細胞由来 CD11b<sup>+</sup>細胞, CD11c<sup>+</sup>, B 細胞, T 細胞  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$  個を  $^{51}\text{Cr}$  標識 B16F1 細胞 ( $1 \times 10^4$  個) と共培養した場合の培養上清中  $^{51}\text{Cr}$  放射活性を測定し、この値をバックグラウンドとして差し引いたデータを Net lysis (%) として示した。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ ) を表す。なお、これと同様の主旨の実験を独立して行った結果が、植木紘史氏の学位論文にも記載されている。

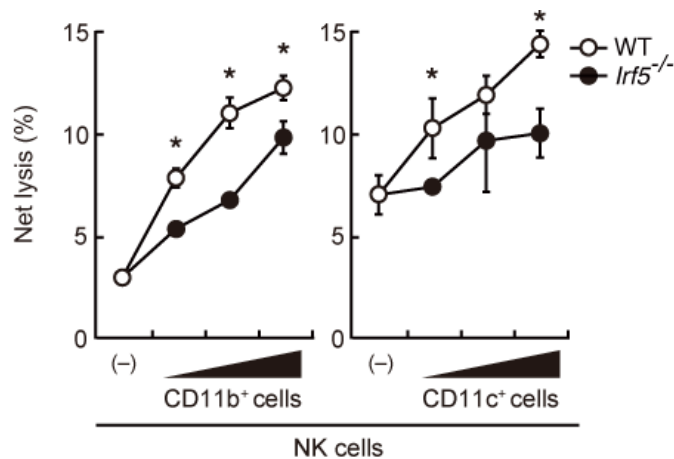


図 1.6 マクロファージおよび樹状細胞内在の IRF5 のがん排除における役割の検討

野生型マウスの脾細胞から精製した NK 細胞 ( $1 \times 10^5$  個) に対し、野生型マウスもしくは *Irf5*<sup>-/-</sup> マウス脾細胞由来 CD11b<sup>+</sup>細胞, CD11c<sup>+</sup>細胞をそれぞれ  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$  個添加し、予め <sup>51</sup>Cr で標識した B16F1 細胞 ( $1 \times 10^4$  個) と共培養した。共培養開始から 4 時間後に培養上清を回収し、標的細胞から放出された培養上清中 <sup>51</sup>Cr 放射活性をγカウンタにより定量した。なお、図 1.5 と同様に、CD11b<sup>+</sup>細胞, CD11c<sup>+</sup>細胞を添加することによる B16F1 細胞の被殺傷数を除外するため、CD11b<sup>+</sup>細胞, CD11c<sup>+</sup>細胞を <sup>51</sup>Cr 標識 B16F1 細胞 ( $1 \times 10^4$  個) と共培養した場合の培養上清中 <sup>51</sup>Cr 放射活性を測定し、この値をバックグラウンドとして差し引いたデータを Net lysis (%) として示した。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ )を表す。アステリスクは  $P < 0.05$  で有意差があることを示す。

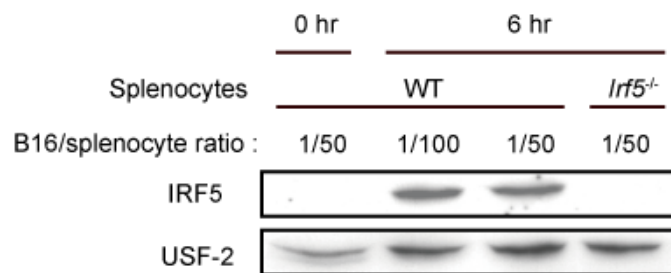


図 1.7 がん細胞との共培養による脾細胞における IRF5 の活性化の検討  
 野生型 (WT) マウス由来あるいは *Irf5*<sup>-/-</sup> マウス由来脾細胞 ( $1 \times 10^8$  個) を、 $1 \times 10^6$  個 (細胞数は脾細胞に対し 1/100) あるいは  $2 \times 10^6$  個 (同 1/50) の B16F1 細胞と共培養した。共培養開始から 6 時間後に細胞を全て回収し、それらの細胞の核内画分を抽出して、核内の IRF5 を抗 IRF5 抗体を用いて検出した。USF-2 は核画分のマーカーとして用いた。

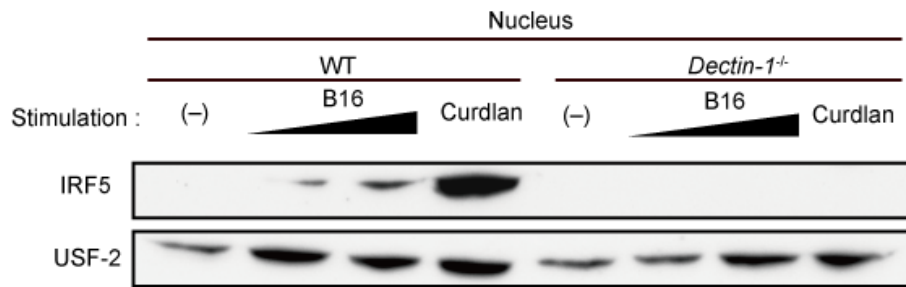


図 1.8 *Dectin-1* 遺伝子欠損が脾細胞における IRF5 活性化に与える影響の検討  
 野生型 (WT) マウス由来あるいは *Dectin-1*<sup>-/-</sup> マウス由来脾細胞 ( $1 \times 10^8$  個) を、 $1 \times 10^6$  個 (細胞数は脾細胞に対し 1/100) あるいは  $2 \times 10^6$  個 (同 1/50) の B16F1 細胞と共培養、もしくは *Dectin-1* のリガンドとして知られているカードラン (終濃度 30 ng/mL) により刺激した。培養開始から 6 時間後に細胞を全て回収し、それらの細胞の核内画分を抽出して、核内の IRF5 を抗 IRF5 抗体を用いて検出した。USF-2 は核画分のマーカーとして用いた。



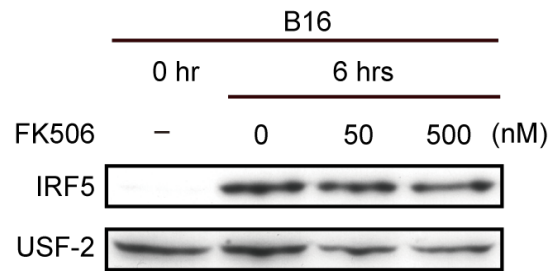


図 1.9 FK506 が脾細胞における IRF5 活性化に与える影響の検討

野生型 (WT) マウス由来脾細胞 ( $5 \times 10^7$  個) を  $1 \times 10^6$  個 (細胞数は脾細胞に対し 1/50) の B16F1 細胞と共培養した。50 nM あるいは 500 nM の FK506 を培地に添加した。培養開始から 6 時間後に細胞を全て回収し、それらの細胞の核内画分を抽出して、核内の IRF5 を抗 IRF5 抗体を用いて検出した。USF-2 は核画分のマーカーとして用いた。

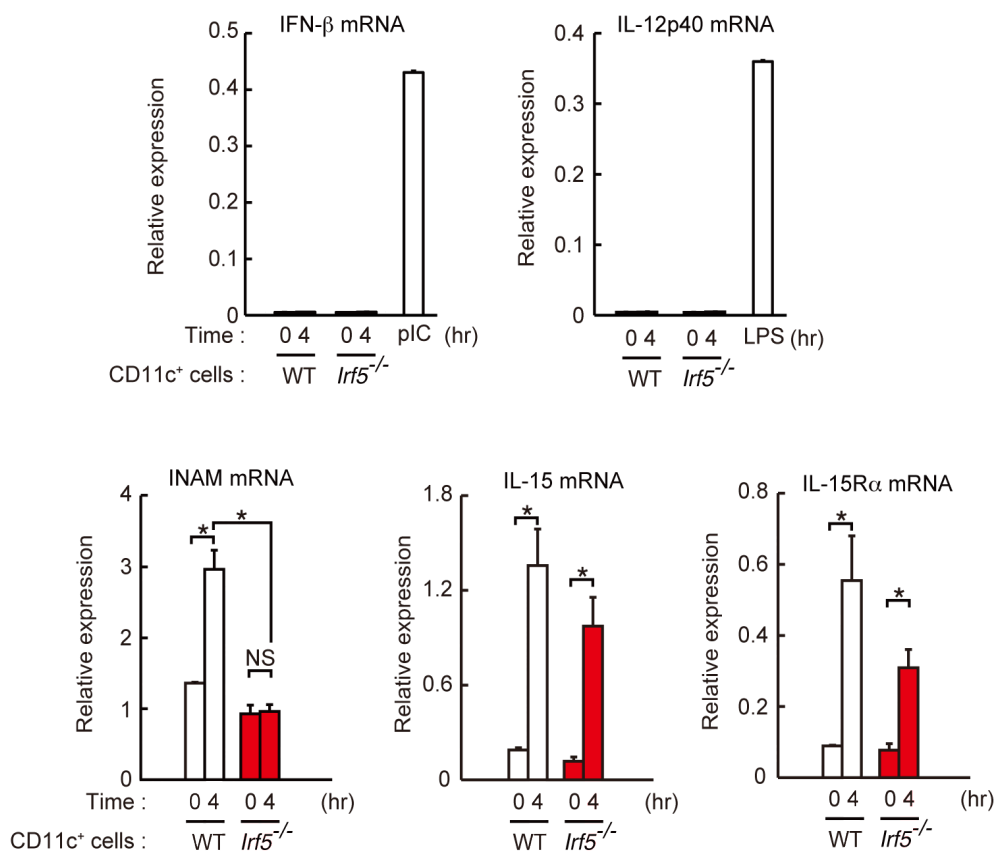


図 1.10 樹状細胞とがん細胞の共培養系における遺伝子発現誘導の検討  
 野生型 (WT) マウスもしくは *lrf5*<sup>-/-</sup> マウスから調製した脾細胞由来 CD11c<sup>+</sup>細胞 ( $1 \times 10^6$  個) を B16F1 細胞 ( $1 \times 10^4$  個) と共培養した。共培養開始前 (0 hr) 及び共培養から 4 時間後 (4 hr) に全細胞を回収し、トータル RNA を抽出して IFN-β (*Ifnb1*), IL12p40 (*Il12b*), INAM (*Fam26f*), IL15 (*Il15*), IL15Rα (*Il15ra*) の mRNA の発現レベルを qRT-PCR 法により解析した。IFN-β, IL-12p40 mRNA については検出限界に近い低い値であったため、陽性対照としてそれぞれ poly(I:C), LPS で 4 時間刺激した野生型 CD11c<sup>+</sup>細胞での発現レベルを示した。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ ) を表す。アスタリスクは  $P < 0.05$  で有意差があることを示す。NS は有意差がないことを示す。

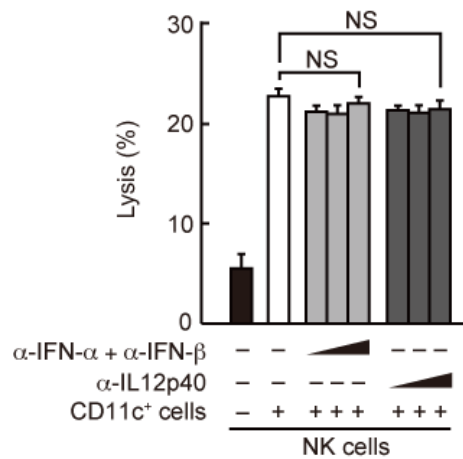


図 1.11 NK 細胞によるがん細胞の殺傷に対する I 型 IFN および IL-12 の寄与の検討

野生型 (WT) マウスから調製した脾細胞由来 NK 細胞 ( $1 \times 10^6$  個) および脾細胞由来 CD11c<sup>+</sup>細胞 ( $3 \times 10^6$  個) を、予め  $^{51}\text{Cr}$  で標識した B16F1 細胞 ( $1 \times 10^4$  個) と図中に示した細胞数の比率で混合し共培養した。このとき培地に、抗 IFN- $\alpha$  抗体および抗 IFN- $\beta$  抗体、もしくは抗 IL-12p40 抗体を加えた。共培養開始から 4 時間後に培養上清を回収し、標的細胞から放出された培養上清中  $^{51}\text{Cr}$  放射活性を  $\gamma$  カウンタにより計測し定量した。なお、図 1.5 と同様に、CD11c<sup>+</sup>細胞を添加することによる B16F1 細胞の被殺傷数を除外するため、CD11c<sup>+</sup>細胞を  $^{51}\text{Cr}$  標識 B16F1 細胞 ( $1 \times 10^4$  個) と共培養した場合の培養上清中  $^{51}\text{Cr}$  放射活性を測定し、この値をバックグラウンドとして差し引いた値を示した。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ ) を表す。NS は  $P > 0.05$  で有意差が見られないことを表す。

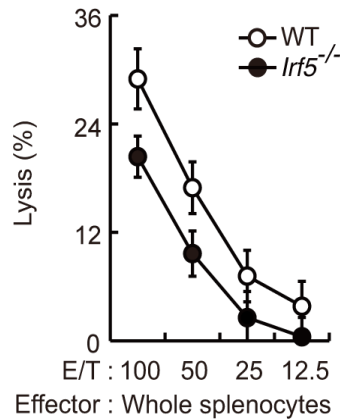


図 1.12 *Irf5*<sup>-/-</sup> マウス由来脾細胞を用いた YAC-1 細胞に対する細胞傷害活性の検討

野生型 (WT) マウスもしくは *Irf5*<sup>-/-</sup> マウス由来の脾細胞をエフェクター細胞とし、YAC-1 リンパ腫細胞株に対する殺傷を <sup>51</sup>Cr 遊離法により検討した。予め <sup>51</sup>Cr で標識した YAC-1 細胞とエフェクター細胞を、図中に示した細胞数の比率で混合し共培養した。共培養開始から 4 時間後に培養上清を回収し、標的細胞から放出された培養上清中 <sup>51</sup>Cr 放射活性をγカウンタにより定量した。1 × 10<sup>4</sup> 個の <sup>51</sup>Cr 標識 YAC-1 細胞を用いた。データは平均値と標準偏差 (*n* = 3) を表す。

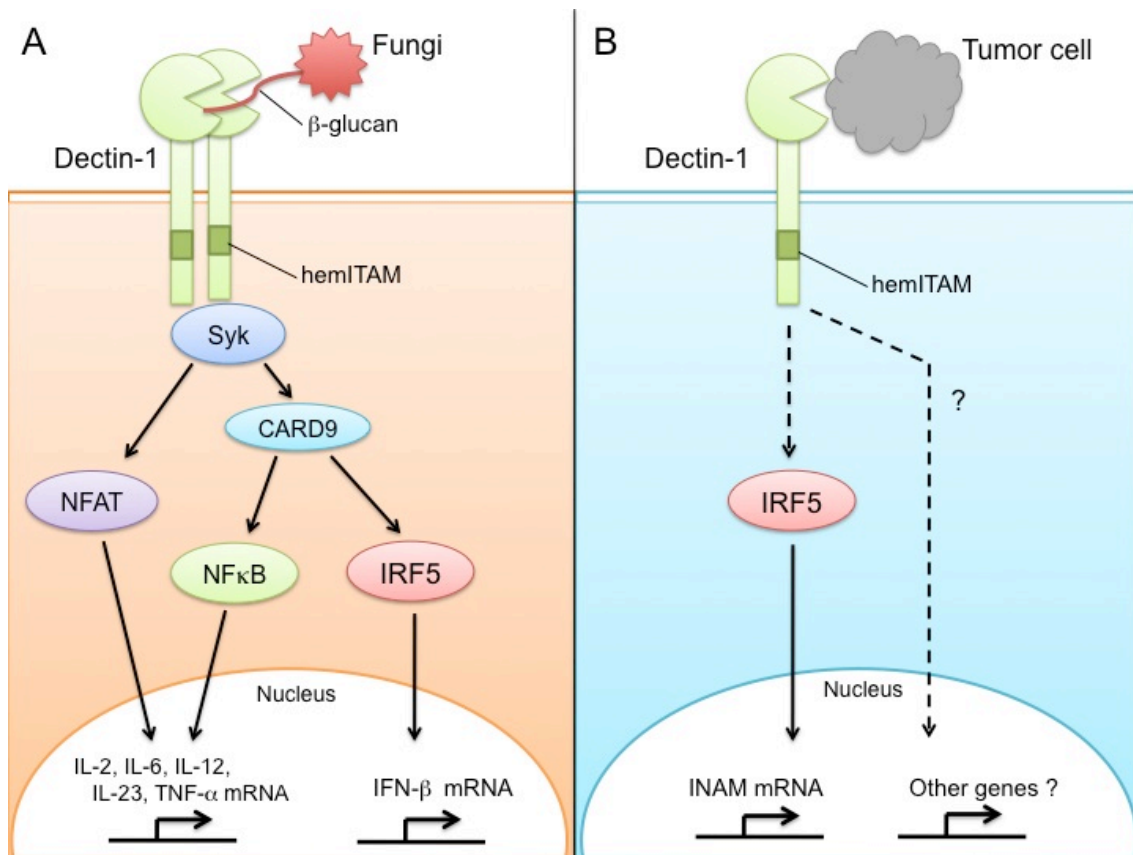


図 1.13 βグルカンおよびがん細胞を認識した Dectin-1 下流における IRF5 活性化機構の仮説の模式図

Dectin-1 による真菌由来βグルカン (A)、およびがん細胞 (B) の認識の際の、下流のシグナル伝達経路の差異に関する仮説を示す。Dectin-1 がβグルカンを認識すると (A)、Dectin-1 の細胞内ドメインのモチーフ (YxxL 配列; hemITAM と呼ばれる) に Syk チロシンキナーゼがリクルートされる。その下流において、NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) 経路およびアダプター分子 CARD9 (caspase recruitment domain-containing protein 9) を介して NFκB 経路が活性化され、IL-2, IL-6, IL-23, TNF-α, pro-IL-1β といったサイトカインの遺伝子が発現誘導される<sup>53</sup>。また、CARD9-IRF5 依存的経路の下流では IFN-β の発現が誘導される<sup>32</sup>。一方、本研究において、樹状細胞に発現する Dectin-1 ががん細胞を認識した際には (B)、IRF5 が活性化することにより INAM mRNA の発現が誘導されることが明らかになった。また、IL-15 及び IL-15Rα mRNA の誘導も、一部が IRF5 に担われていることが分かった。樹状細胞と NK 細胞の共培養による B16F1 細胞殺傷活性定量の実験系においては、*Irf5* 遺伝子欠損樹状細胞を用いた場合にも、

樹状細胞による NK 細胞の殺傷活性の増強が完全に無くなる訳ではないことから、NK 細胞の活性化に寄与する IRF5 非依存的シグナル経路が存在することも示唆された。また、樹状細胞と B16F1 細胞の共培養では IFN- $\beta$ , IL-12p40 の誘導が認められないこと、および I 型 IFN, IL-12 が NK 細胞の活性化に関与しないことが見出された。これらのことから、Dectin-1 の認識するリガンドの違いが、受容体下流のシグナル経路の活性化機構の違いにつながる可能性が考えられる。

## 1.4 方法

### [培地]

#### ・DMEM 培地

4.75 g のダルベッコ変法イーグル培地 (日水製薬) を MilliQ 水に溶解しオートクレーブ処理 (120°C, 15 min) した後、終濃度 0.12% 炭酸水素ナトリウム (和光純薬), 4 mM L-グルタミン (和光純薬), 10% 加熱非働化ウシ胎児血清 (fetal calf serum; FCS, HyClone) をシリンジフィルター (孔径 0.2  $\mu\text{m}$ , Corning) を通して加えて終容量 500 mL とした。

#### ・RPMI 培地

RPMI medium 1640 (ナカライテスク) に終濃度 100  $\mu\text{M}$  の MEM 非必須アミノ酸溶液 (ナカライテスク), 100  $\mu\text{M}$  MEM ピルビン酸ナトリウム溶液 (ナカライテスク), 50  $\mu\text{M}$  2-メルカプトエタノール (2-ME, ナカライテスク), 10% FCSを加えて終容量 500 mL とした。

#### ・PFE

PBS pH 7.2 (ナカライテスク) に 1 mM EDTA (GIBCO), 2% FCS をシリンジフィルター (孔径 0.2  $\mu\text{m}$ ) を通して加えた。

・DNase I・collagenase D 入り PBS

DNase I (Roche), collagenase D (Roche) を PBS に懸濁してシリンジフィルター (孔径 0.2  $\mu\text{m}$ ) に通し、それぞれ終濃度 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調製した。

### [試薬]

カードランは和光純薬から購入し、1N NaOH (和光純薬) 水溶液で溶解した後、使用した。FK506 は Enzo Life Science より購入した。

### [細胞]

・細胞株

B16F1 メラノーマ細胞 (B16 細胞) は理研バイオリソースセンターより購入し、DMEM 培地で培養 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) した。YAC-1 細胞は過去に報告のあるものを使用し<sup>55</sup>、RPMI 培地で培養 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) した。



- 骨髄細胞の調製

マウスから後肢大腿骨および脛骨をとり、その内腔に PFE を注入して細胞を回収した。

得られた細胞浮遊液をセルストレイナー (メッシュサイズ 40  $\mu\text{m}$ 、BD) に通し 1× RBC

Lysis Buffer (eBioscience) に懸濁して赤血球を溶血させ、さらに PFE で二度洗浄し

た後、再度セルストレイナーに通した。

- 脾細胞の調製

マウスの脾臓を細切しセルストレイナー (メッシュサイズ 40  $\mu\text{m}$ ) 上ですり潰した。通

過した細胞を 1× RBC Lysis Buffer に懸濁し赤血球を溶血させた後、さらに二度

PFE で洗浄しセルストレイナー (メッシュサイズ 40  $\mu\text{m}$ ) に通した。NK 細胞を除去し

た脾細胞の調製のためには、マウスに 200  $\mu\text{g}$  抗アシアロ GM1 抗体 (和光純薬)

を腹腔内注射し、翌日その脾細胞を調製した。

- NK 細胞の調製

マウスの脾臓を摘出し、これに DNase I・collagenase D 入り PBS を 25G の注射針

(ニプロ) で注入し、滲出した細胞浮遊液を回収した。さらに脾臓を新たな DNase I・

collagenase D 入り PBS 中で細切し、これを回収して 37°Cでインキュベーション (30 min) した。両者をセルストレイナー (メッシュサイズ 40  $\mu\text{m}$ ) に通し、1× RBC Lysis Buffer に懸濁し赤血球を溶血させた後、さらに二度 PFE で洗浄しセルストレイナー (メッシュサイズ 40  $\mu\text{m}$ ) に通した。得られた細胞をナイロンウール (和光純薬) カラム中でインキュベーション (37°C, 60 min) し、これを通過した細胞に対して NK cell isolation kit II (Miltenyi Biotec) を用いて添付のプロトコル通りに操作を行い、NK 細胞をネガティブセレクションにより調製した。精製度は安定して 95%以上を示すことをフローサイトメーターを用いた解析により確認した。

・ T 細胞, B 細胞, CD11b<sup>+</sup>細胞, CD11c<sup>+</sup>細胞の調製

マウスの脾臓を摘出し、これに DNase I・collagenase D 入り PBS を 25G の注射針で注入し、滲出した細胞浮遊液を回収した。さらに脾臓を新たな DNase I・collagenase D 入り PBS 中で細切し、これを回収して 37°Cでインキュベーション (30 min) した。両者をセルストレイナー (メッシュサイズ 40  $\mu\text{m}$ ) に通し、1× RBC Lysis Buffer に懸濁し赤血球を溶血させた後、さらに二度 PFE で洗浄しセルストレイナー (メッシュサイズ 40  $\mu\text{m}$ ) に通した。得られた細胞に対し、Pan T cell isolation kit II mouse (Miltenyi Biotec), CD45R (B220) MicroBeads mouse (Miltenyi Biotec), CD11b

MicroBeads mouse (Miltenyi Biotec), CD11c MicroBeads mouse (Miltenyi Biotec) を用いて添付のプロトコル通りに操作を行い、それぞれ T 細胞, B 細胞, CD11b<sup>+</sup>細胞, CD11c<sup>+</sup>細胞を調製した。

## [マウス]

野生型 C57BL/6J マウスは日本クレアより購入した。*Irf3*, *Irf5* および *Irf7* 遺伝子欠損マウスは本研究室において作製された<sup>30,33,56</sup>。Ly5.1-C57BL/6J マウスはジャクソン研究所より購入した。*Clec7a* (*Dectin-1*) 遺伝子欠損マウスは岩倉洋一郎博士から御供与頂いた<sup>57</sup>。マウスを用いた実験においては、東京大学医学系研究科動物実験委員会により実験の承認を頂いており（医-P10-122 及び医-P10-123）、「東京大学動物実験実施規則」並びに「東京大学動物実験実施マニュアル」を遵守しながら、動物愛護の観点に基づき遂行した。

## [手順]

- ・ マウス肺転移モデル

マウスに  $1 \times 10^6$  もしくは  $2 \times 10^6$  個の B16F1 細胞を尾静脈注射し、14 日後に肺に形成されたコロニーを計数した。

- ・皮下増殖モデル

マウスに  $1 \times 10^5$  個の B16F1 細胞を皮下注射し、32 日間にわたり皮下の腫瘍体積を計測した。腫瘍体積は、長軸を  $a$ 、短軸を  $b$  として  $\pi ab^2/6$  の式により算出した。

- ・骨髄移植

レシピエントマウスに 5 Gy の  $\gamma$ 線を 3 時間の休止をはさみ二度照射した後、 $5 \times 10^6$  個のドナーマウス由来骨髄細胞を尾静脈注射した。移植から 3 ヶ月後にレシピエントマウスを肺転移モデルに供した。キメラ率は 90 – 95% であることをフローサイトメーターを用いた解析により確認した。

- ・ $^{51}\text{Cr}$  遊離法による NK 細胞の殺傷活性の定量

脾細胞 (エフェクター細胞) は野生型マウスあるいは *Irf5* 遺伝子欠損マウスから調製した。B16F1 メラノーマ細胞 (ターゲット細胞) は 0.01% トリプシン溶液 (Life Technologies) を用いて回収し、あるいは YAC-1 細胞をターゲット細胞として用いる場合には浮遊細胞を回収して、それぞれ  $5 \times 10^6$  個/mL の細胞濃度で RPMI 培地に懸濁した。これに終濃度 500  $\mu\text{Ci/mL}$  の  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  (PerkinElmer) を添加し、37°C でインキュベーション (1 hr) した後、PBS で 3 回洗浄した。エフェクター細胞およびター

ターゲット細胞を、各実験について表記のエフェクター/ターゲット比になるように平底 96 穴細胞培養プレート (BD Biosciences) にプレーティングし、インキュベーションした (37°C, 4 hrs)。全ての殺傷活性アッセイにおいて、1 ウェルあたりの RPMI 培地の終容量は 200  $\mu$ L、ターゲット細胞は  $1 \times 10^4$  個とした。インキュベーションの後、培養プレートを遠心処理 (1,300 rpm, 5 min) し、各ウェルから慎重に培養上清のみを 170  $\mu$ L 回収して、その  $^{51}\text{Cr}$  放射活性を  $\gamma$  カウンタ (Packard COBRA II; PerkinElmer) で測定した。エフェクター細胞を加えずターゲット細胞のみをプレーティングした場合の培養上清の放射活性を spontaneous release、ターゲット細胞を終濃度 0.5% NP-40 (和光純薬) で全て溶解した場合の上清の放射活性を maximum release とし、各サンプルの experimental release から、以下のように細胞傷害活性を算出した:  $\text{specific lysis (\%)} = (\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release}) \times 100$ 。また、エフェクター細胞として精製 NK 細胞とこれに添加する脾細胞由来細胞 (CD11b+細胞, CD11c+細胞, T 細胞, B 細胞) を用いた場合には、NK 細胞を加えず脾細胞由来細胞のみをターゲット細胞と共培養した際の培養上清の放射活性を別に測定し、これをバックグラウンドとして引いた値を算出した。

- Immunoblotting による IRF5 の核内移行の検出

- 緩衝液 A

10 mM HEPES-KOH (pH 7.5) (ナカライテスク), 10 mM KCl (ナカライテスク), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (ナカライテスク), 0.5 mM 4-aminophenyl-methylsulfonyl fluoride (APMSF) (和光純薬)

- 緩衝液 B

10 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM APMSF, 0.4% NP-40 (ナカライテスク)

- 緩衝液 C

20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 600 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% glycerol (和光純薬)

(i) 核内タンパク質の分画

培養ディッシュから培地中の浮遊細胞および底面に接着している細胞の両者を回収し、PBS で洗浄した後 90  $\mu$ L の緩衝液 A に懸濁し、等量の緩衝液 B を加えて穏やかに混和し氷上に 5 分静置した。これを遠心分離 (3,000 rpm, 4°C, 5 min) して得たペレットを 500  $\mu$ L の緩衝液 A で洗浄、遠心 (3,000 rpm, 4°C, 5 min) し上清を除き、40  $\mu$ L の緩衝液 C で懸濁して、10 分ごとにタッピングしながら氷上に 30 分静置した。これを遠心分離 (14,000 rpm, 4°C, 15 min) し、上清を核内画分として回収した。

(ii) SDS-PAGE, immunoblotting

- 1× Running Buffer

25 mM Tris-HCl (pH 8.0) (ナカライテスク), 192 mM グリシン (関東化学), 0.1%

SDS (ナカライテスク)

- Transfer Buffer

50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 80 mM グリシン, 0.04% SDS, 20% メタノール (和光純

薬)

- 1× TBS

200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl (関東化学)

- TBS-T

1× TBS に Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20, 和光純薬) を

加え終濃度 0.1%とした。

- ブロッキング溶液

TBS-T にスキムミルク (Difco) を加え終濃度 5%とした。

- 一次抗体

ウサギ 抗 IRF5 ポリクローナル抗体 (Cell Signaling), ウサギ 抗 USF2 ポリクロー

ナル抗体 (SantaCruz)

- 二次抗体

抗 ウサギ IgG HRP 結合抗体 (GE Healthcare)

- ECL 試薬

Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) の Enhanced luminal reagent, Oxidizing reagent を使用直前に等量混合して用いた。

Immunoblotting により IRF5, USF2 を検出した。核内タンパク質分画によって得たサンプルを、12.5% アクリルアミドゲルで SDS-PAGE (40 mA, 定電流) した。ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Millipore) をメタノール に浸けた後 Transfer Buffer 中で振盪 (1 min) し、泳動後のゲルとともに Transfer Buffer で膨潤させた濾紙に挟みブロッキングを行った (200 mA, 定電流, 90 min)。PVDF 膜はブロッキング溶液中にて振盪 (室温, 60 min) した後一次抗体希釈液 (4°C, 一晚)、二次抗体希釈液 (室温, 60 min) 中で振盪し (その都度 TBS-T により 3 回洗浄)、ECL 試薬 により発光を行い X 線フィルム (富士フィルム) にて検出した。

・定量的 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) 法

細胞からのトータル RNA の抽出は、RNAiso plus (TaKaRa) を用いて添付のプロトコルに従って行った。トータル RNA からの相補的 DNA (cDNA) の合成は、



PrimeScript RT reagent with gDNA Eraser (TaKaRa) を用いて添付のプロトコルに従って行った。

qRT-PCR 解析には SYBR *Premix Ex Taq* II (TaKaRa) 及び LightCycler 480 (Roche) を用いた。SYBR *Premix Ex Taq* II 5  $\mu\text{L}$  に 10  $\mu\text{M}$  Forward primer と 10  $\mu\text{M}$  Reverse primer を各 0.5  $\mu\text{L}$ , 及び脱イオン水 2  $\mu\text{L}$  を混合して終容量 8  $\mu\text{L}$  とし、ここに、40 倍希釈した cDNA サンプルを 2  $\mu\text{L}$  添加した。各遺伝子の mRNA 発現量は、グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) の遺伝子の mRNA 発現量によって標準化した。本研究において使用した PCR プライマーの配列は表 1 の通りである。

#### ・統計解析

コントロール群とサンプル群の値に有意差があるか否かは、Student の  $t$  検定によって評価した。

表 1 qRT-PCR プライマー配列

遺伝子		配列
<i>Ifnb1</i>	Forward 鎖	5'- ACGCCTGGATGGTGGTCCGA -3'
	Reverse 鎖	5'- TGCCTGCAACCACCACTCATTCT -3'
<i>Il12b</i>	Forward 鎖	5'- ATCGTTTTGCTGGTGTCTCC -3'
	Reverse 鎖	5'- ACTGTTTCTCCAGGGGCATC -3'
<i>Fam26f</i>	Forward 鎖	5'- GACACAGTTGGCCGAAGAGA -3'
	Reverse 鎖	5'- AACGCTGAGATTCCTGCCA -3'
<i>Il15</i>	Forward 鎖	5'- CATCCATCTCGTGCTACTTGTG -3'
	Reverse 鎖	5'- GCCTCTGTTTTAGGGAGACCT -3'
<i>Il15ra</i>	Forward 鎖	5'- GCTGACATCCGGGTCAAGAA -3'
	Reverse 鎖	5'- CACTTGAGGCTGGGAGTTGT -3'
<i>Gapdh</i>	Forward 鎖	5'- CTCATGACCACAGTCCATGC -3'
	Reverse 鎖	5'- CACATTGGGGGTAGGAACAC -3'

## 第 2 部 『Flox-IRF3 マウスの作製とコンディショナ ナルノックアウトに向けた解析』

### 2.1 序文

IRF ファミリー転写因子は、哺乳類において 9 種類 (IRF1-9) が報告されており<sup>27</sup>、中でも IRF3 は、ウイルス・バクテリア由来 DNA/RNA を認識する RIG-I (retinoic acid-inducible gene-1) や MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5)、cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) などの細胞質内核酸認識受容体の下流で IPS-1 (IFN- $\beta$  promoter stimulator-1) あるいは STING (stimulator of IFN genes protein) 依存的に TBK1 (TANK-binding kinase 1) によってリン酸化され、核内移行し、I 型 IFN の誘導に不可欠の役割を果たすことが知られている (序・図 1)<sup>1,26,28</sup>。

また、IRF3 は、TLR3 (Toll-like receptor 3) の下流において、アダプター分子 TRIF (Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$ ) 依存的に TBK1 によるリン酸化を経て I 型 IFN の誘導を行う<sup>26</sup>。すなわち IRF3 は、ウイルス感染時に宿主細胞に曝露されるウイルス由来核酸によって速やかに活性

化され、宿主に有益な抗ウイルス応答を惹起するのに不可欠である。一方、IRF3 は、宿主細胞内に取り込まれたバクテリア由来核酸によっても活性化し I 型 IFN の発現誘導に寄与すること、またグラム陰性細菌の細胞壁成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) を認識する TLR4 の下流においても TRIF 依存的に I 型 IFN を誘導することにより<sup>58</sup>、マクロファージの細胞死を惹起し、抗バクテリア 応答には却って不利益をもたらすという側面を併せ持つ<sup>59,60</sup>。

このように自然免疫応答における役割が多く解析されてきた IRF3 であるが、一方で適応免疫系において、T 細胞分化や抗体産生等への直接の関与についてはほとんど解析されていない。その理由として、自然免疫応答に必須である IRF3 を欠損した個体では、樹状細胞やマクロファージといった自然免疫担当細胞による応答が低下することから、自然免疫系の活性化により制御される適応免疫 応答が必然的にその影響を受けるため、T 細胞または B 細胞における IRF3 の機能 を直接検討することが困難であることが挙げられる。

また、IRF3 が全身の多くの組織・細胞において恒常的に発現しているという ことを鑑みると、免疫系細胞以外においても様々な遺伝子を発現誘導すること で多彩な機能を発揮することが大いに考えられる。実際、当研究室における解 析から、心臓線維芽細胞において、アンジオテンシン II の刺激により ERK シグ

ナル経路依存的に IRF3 が活性化され、心筋線維症の病態進行に寄与することが見出されている<sup>34</sup>。

これらの背景を踏まえ、IRF3 を細胞種・組織特異的に発現を欠損させることができるコンディショナルノックアウトマウス (IRF3 cKO マウス)を新たに作製することで、IRF3 の細胞種特異的な生理的機能、中でも T 細胞や B 細胞などによる適応免疫応答にどのように関与しているか、より詳細に検討することが可能であると考えられた。また同時に、これと独立した問題点として、当研究室において作製された既存の *Irf3* 遺伝子欠損マウス<sup>33</sup> は、当時は同定されていなかった近接して存在する別の遺伝子 *Bcl2l12* の転写開始領域を同時に欠失させてしまっており、その発現が欠損していることが後に明らかにされた経緯がある<sup>35</sup>。すなわち、本マウスは実際には、*Irf3*<sup>-/-</sup>*Bcl2l12*<sup>-/-</sup>マウスであり、本マウスおよびその細胞を用いて得られた知見では、IRF3 および Bcl2L12 のいずれの欠損が表現型に寄与しているか、区別することが厳密には不可能であった。この問題についても、新規に作製した IRF3 cKO マウスを用いて解決がなされることが期待された。本研究では上記のような目的を持って、IRF3 cKO マウスを作製し、IRF3 の細胞・組織特異的な機能解析に向けた基盤構築を目指すとともに、ウイルス感染等により惹起される自然免疫応答について、これまでに用いられ

てきた全身性欠損マウス (*Irf3*<sup>-/-</sup>*Bcl2l12*<sup>-/-</sup>マウス) 由来細胞と新たな IRF3 cKO マウスとの比較解析を行った。

## 2.2 結果

### 2.2.1 Flox-IRF3 マウスの作製

序文にて述べた理由から、Cre/loxP システムを導入し組織・細胞種特異的に *Irf3* 遺伝子を欠損させることができるコンディショナルノックアウト (cKO) マウスの作製を試みた。Cre/loxP システムは、P1 バクテリオファージ由来の Cre リコンビナーゼおよびその認識配列 (loxP 配列) を利用したものである。Cre リコンビナーゼは2つの loxP 配列間の相同組換えを触媒するので、同じ向きに loxP 配列が存在する場合、loxP に挟まれた部位が切り出される。よって IRF3 の遺伝子上に2つの loxP 配列を導入した変異マウスを作製し、これに組織特異的に Cre リコンビナーゼを発現する変異マウスを交配することにより Cre リコンビナーゼを発現する細胞においてのみ IRF3 の発現を欠損する仕組みを構築した。IRF3 の mRNA は8つのエクソンから構成される (図 2.1A)。ゲノム上で IRF3 の第1エクソンに相当する部位は、IRF3 遺伝子と逆向きに転写される *Bcl2L12* の遺伝子の第1エクソンに相当する部位と重複する<sup>61</sup>。したがって *Bcl2L12* の遺伝子の転写に影響を及ぼすことを避けるため、IRF3 mRNA の翻訳開始点を含む第2エクソン、および第3, 第4エクソンを loxP 配列ではさむこととした。胚操作に

については、理研バイオリソースセンターに依頼した。キメラマウスと C57BL/6J マウスとの交配により ES 細胞のクローン#92, #155 の 2 ラインにおいて F1 マウスが得られ、以下の解析はクローン#92 の変異マウスを用いて行った。まずマウスゲノムに変異アリルが導入されたことをサザンブロットにより確認した (図 2.1B; 以下、*Irf3* 遺伝子に関し、野生型のアリルを “Wt”, この変異アリルを “Flox” と表記する)。また、CAG プロモーターにより全身で Cre リコンビナーゼを発現する CAG-Cre マウスとの交配を行い、これにより得られた Flox/Flox CAG-Cre(+) の遺伝子型をもつマウスを用いて、導入された変異アリルの loxP 配列間の相同組換えが Cre リコンビナーゼによって *in vivo* で正常に行われることをサザンブロットにより確認した (図 2.2A, B)。CAG-Cre マウスとの交配により、マウス胎児由来線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast; MEF) において *Irf3* 遺伝子を欠損させ (Flox/Flox CAG-Cre(+) MEF)、同時に対照群として野生型 (Wt/Wt CAG-Cre(+)) の MEF (以下、野生型 MEF と称する) を調製し、各細胞での IRF3 の発現を immunoblotting により解析したところ、野生型 MEF では IRF3 の発現が見られたが、Flox/Flox CAG-Cre(+) の MEF では発現が見られなかった (図 2.2C) ことから、タンパク質レベルでも IRF3 の発現が欠失していることが確認された。



## 2.2.2 Flox-IRF3 マウスにおける Bcl2L12 の機能

当研究室において以前に作製された *Irf3* 遺伝子欠損マウス (*Irf3*<sup>-/-</sup>*Bcl2l12*<sup>-/-</sup>)<sup>33</sup> は、Bcl-2 ファミリー分子でありアポトーシス促進機能を持つ Bcl2L12 を同時に欠損させてしまっていることが明らかになり、実際に *Irf3*<sup>-/-</sup>*Bcl2l12*<sup>-/-</sup> MEF では野生型 MEF に比べ紫外線 (UV) 照射により誘導されるアポトーシスの割合が著明に減少すること、および *Irf3*<sup>-/-</sup>*Bcl2l12*<sup>-/-</sup> MEF にレトロウイルスベクターの発現系を用いて Bcl2L12 を発現させることで、UV 誘導性のアポトーシスの割合が野生型 MEF と同様の割合まで回復することが、当研究室における先行研究により明らかにされている<sup>35</sup>。そこで新たに作製された IRF3 cKO マウスでは Bcl2L12 の発現および機能が正常であるか検討する目的で、以下のような実験を行った。まず、*Irf3* 遺伝子を欠損させた (Flox/Flox CAG-Cre(+)) MEF (以下、IRF3 欠損 MEF と称する)、および対照群として野生型の MEF を調製した。また、コントロールとして、*Irf3*<sup>+/+</sup>*Bcl2l12*<sup>+/+</sup>、および *Irf3*<sup>-/-</sup>*Bcl2l12*<sup>-/-</sup> MEF も調製した。これらの MEF における *Bcl2l12* mRNA の発現を qRT-PCR により解析したところ、*Irf3*<sup>-/-</sup>*Bcl2l12*<sup>-/-</sup> MEF ではこれまでの報告通り、*Bcl2l12* mRNA は全く検出されなかったが、*Irf3*<sup>+/+</sup>*Bcl2l12*<sup>+/+</sup> MEF、および野生型 MEF、IRF3 欠損 MEF において

*Bcl2l12* mRNA の発現が確認され、今回作製したコンディショナルノックアウトマウスでは、*Irf3* 遺伝子の発現が欠失し、*Bcl2l12* 遺伝子の発現には影響を及ぼさないことが明らかとなった (図 2.3)。さらに *Bcl2L12* の機能についても検討するため、上記の MEF それぞれに UV を照射し、18 時間後に細胞を回収し Annexin V で染色することにより、アポトーシス細胞を検出し、定量した。*Irf3*<sup>+/+</sup>*Bcl2l12*<sup>+/+</sup>, および *Irf3*<sup>-/-</sup>*Bcl2l12*<sup>-/-</sup> MEF について、UV 照射によってアポトーシス誘導された細胞の割合を比較したところ、これまでの報告通り、野生型 MEF に比べ、*Irf3*<sup>-/-</sup>*Bcl2l12*<sup>-/-</sup>において大きな減少が見られた (図 2.4A)。一方で、野生型および IRF3 欠損の MEF との間では差異は見られなかった (図 2.4B)。これらの結果から、新たに作製した IRF3 cKO マウスにおいては *Bcl2l12* mRNA が発現しており、UV 刺激によるアポトーシスも正常に誘導されることから、*Bcl2L12* の機能は正常であることが示唆された。また、*Irf3*<sup>-/-</sup>*Bcl2l12*<sup>-/-</sup> MEF で見られた UV 誘導性アポトーシスの異常は、過去に報告された通り<sup>35</sup>、IRF3 ではなく *Bcl2L12* の欠損に起因するものであることが確認された。

### 2.2.3 樹状細胞・マクロファージにおける IRF3 依存的 I 型 IFN 誘導

全身性に IRF3 を欠損する Flox/Flox CAG-Cre(+) マウスおよび野生型 (Wt/Wt

CAG-Cre(+)) マウスから、骨髄細胞由来樹状細胞 (bone marrow derived dendritic cell; BMDC) を調製した。まず IRF3 の発現を immunoblotting により解析したところ、Flox/Flox CAG-Cre(+) マウス由来 BMDC では、期待通りに IRF3 の発現が欠失していることが確認された (以下、これを IRF3 欠損 BMDC と称する) (図 2.5)。次に IRF3 欠損 BMDC および野生型 BMDC を用いて、細胞質内核酸認識受容体を活性化させた際の I 型 IFN、および IRF3 依存性に誘導されることが知られている RANTES, IP-10 について、その遺伝子発現誘導に対する IRF3 の関与を検討した。まず、細胞質内核酸認識受容体を活性化することが知られている、B 型らせんを形成する 2 本鎖 DNA である B-DNA<sup>62</sup>、または 2 本鎖 RNA の poly(I:C)<sup>63,64</sup> をリポフェクション法によって細胞内に導入して刺激を行い、qRT-PCR 法にて IFN- $\beta$ , RANTES, IP-10 の mRNA の誘導について検討した。その結果、IRF3 欠損 BMDC では、野生型 BMDC と比較し、これら遺伝子の mRNA の誘導が有意に減弱することが見出された (図 2.6A)。次に、1 本鎖マイナス鎖 RNA ウイルスである Newcastle disease virus (NDV) または vesicular stomatitis virus (VSV) を野生型、及び IRF3 欠損 BMDC に感染させ、IFN- $\beta$ , RANTES, IP-10 の mRNA の誘導を検討したところ、やはり IRF3 欠損 BMDC では、野生型 BMDC と比較し、それらの mRNA の誘導が顕著に低下することが見出された

(図 2.6A)。一方で、IRF3 がその誘導に関与しないことが知られている TNF- $\alpha$  の mRNA の発現レベルは、IRF3 欠損 BMDC および野生型 BMDC の間で有意な差が見られなかった (図 2.6B)。また、上記と同様の結果は、Flox/Flox CAG-Cre(+) マウスから調製した、IRF3 欠損骨髄細胞由来マクロファージ (BMM $\phi$ ) を用いての検討からも得られている (図 2.7)。これらの結果から、細胞質内核酸認識受容体下流において、これまでの報告通り、IRF3 は I 型 IFN および RANTES や IP-10 などの遺伝子の mRNA の誘導に重要であることが確認された。

また、グラム陰性細菌の細胞壁成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) により野生型 BMDC および IRF3 欠損 BMDC を刺激した際、および細胞内寄生細菌 *Listeria monocytogenes* を感染させた際の IFN- $\beta$  の mRNA の発現レベルを定量したところ、やはりこれまでの報告と一致して、IRF3 欠損 BMDC では野生型 BMDC と比較し、顕著に IFN- $\beta$  の mRNA の誘導が低下することを見出した (図 2.8)。同様の結果が、IRF3 欠損 BMM $\phi$  を用いての検討からも得られた (図 2.9)。バクテリア感染時の I 型 IFN の誘導は、マクロファージなどのアポトーシスを誘導し、抗バクテリア応答としては不利であることが知られている<sup>59</sup>。この刺激の際の I 型 IFN の誘導がやはり IRF3 に依存的であることが確認されたことにより、本マウスは個体レベルでもリステリア菌の感染に対して抵抗性を示

すことが示唆される。

これらの一連の解析結果から、新たに作製された IRF3 cKO では Bcl2L12 が正常に発現しており、これまでの報告にあった UV 刺激誘導性のアポトーシスの誘導には、IRF3 ではなく Bcl2L12 が寄与することが確認された。また、細胞質内核酸刺激時、およびウイルス感染時の I 型 IFN や他の IRF3 依存性サイトカインの mRNA の誘導が、改めて IRF3 そのものに起因することが IRF3 cKO マウスを用いた解析により再確認された。

## 2.3 考察

本研究において、新たに IRF3 cKO マウスを作製した。既存の *Irf3* 遺伝子欠損 (*Irf3*<sup>-/-</sup>*Bcl2l12*<sup>-/-</sup>) マウスでは、IRF3 に加え、*Bcl2l12* の遺伝子も欠損してしまっていたが、全身で IRF3 を欠損する Flox/Flox CAG-Cre(+) マウスから調製された MEF、BMDC、BMMφにおいては IRF3 の欠失が確認され、一方で、*Bcl2l12* の発現および機能は正常であることを示す結果を得た。また、これまで既存の *Irf3* 遺伝子欠損マウスを用いて示されてきた I 型 IFN 及び他の IRF3 依存性遺伝子の mRNA の誘導について、IRF3 欠損 BMDC、BMMφを用いて検討した結果、細胞質内核酸刺激時、ウイルス感染時のこれらの遺伝子の誘導は、やはり IRF3 に強く依存していることが再確認された。IRF3 は I 型 IFN の誘導をはじめとし、様々な免疫応答に関与することが報告されており、注目がなされている分子である。本 IRF3 cKO マウスを用いて、今後さらに、IRF3 の詳細な機能解析が可能になるものと期待される。

今後の研究の展望としては、T 細胞特異的、および B 細胞特異的 IRF3 を欠損する cKO マウスを作出し、IRF3 の適応免疫応答へ関与の解析を行いたいと考えており、実際に *Lck-Cre* マウス、*mb.1-Cre* マウスとの交配を行っている。これま

で T 細胞、B 細胞中の IRF3 の機能については詳細な解析がなされてこなかったが、最近、T 細胞における IRF3 が機能する可能性を示唆する知見が報告されている<sup>65</sup>。Th17 応答が病態進行に関与する実験的自己免疫性脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) において、*Irf3* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べ病態の軽減が見られている<sup>65</sup>。EAE モデルにおいては I 型 IFN 受容体欠損 (*Ifnar1*<sup>-/-</sup>) マウスは野生型マウスより病態が悪化することが報告されており<sup>66</sup>、I 型 IFN シグナルは EAE の病態進行に対し抑制的に寄与すると考えられている。自然免疫担当細胞において IRF3 依存的に I 型 IFN が誘導されることを踏まえると EAE モデルにおいては *Irf3* 遺伝子欠損マウスで病態が悪化することが予想されるが、それに反する結果であり、I 型 IFN の誘導以外に、T 細胞内在の IRF3 が T 細胞分化に影響を与えている可能性も考えられる。勿論、免疫系細胞以外の細胞中の IRF3 が EAE の病態進行に関与している可能性もあり、それがどのような細胞なのか、また IRF3 のどのような機能であるのか、大変興味深い。一方、B 細胞中の IRF3 の機能については、これまで全く知見が得られていない。同じファミリー分子である IRF4 や IRF5 が、B 細胞における抗体のクラススイッチに関与する等の報告<sup>67,68</sup>があるため、IRF3 も B 細胞応答に関与している可能性も充分考えられるのではないだろうか。このような可能性につ

いて、B細胞特異的に IRF3 を欠損させたマウスにおいて、種々の抗体産生モデルを用いた検討により明らかにしていきたいと考えている。

今後、IRF3 cKO マウスを用いた解析を通じ、これまで解析することが困難であった IRF3 の適応免疫応答における機能の解明、また同時に、免疫系細胞以外の組織・細胞における IRF3 の機能の解明に繋がるものと考えられる。これらの一連の解析から、IRF3 による自然免疫系・適応免疫系の制御についての総合的な理解や、自然免疫応答以外の生命現象における多様な機能について、理解が進むものと期待される。私の今回の IRF3 cKO マウス作製及び解析の成果が今後、生命体の恒常性維持あるいは破綻による疾患など、IRF3 研究の更なる新機能の解析に向けた基盤構築となることを期待したい。



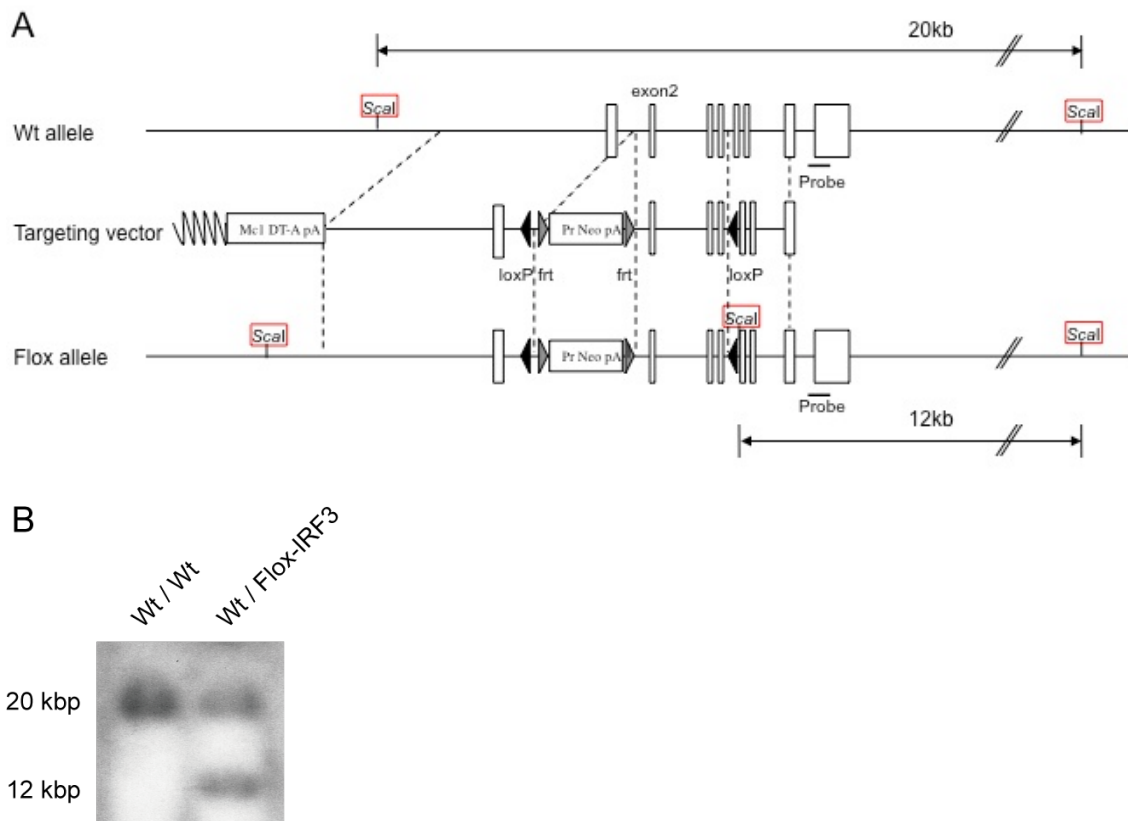


図 2.1 Flox-IRF3 変異マウス作製における概略図

(A) IRF3-Flox マウス作製の概略図を示す。IRF3 遺伝子の第 2 エクソン (図中、*exon2* と表記; 開始コドンを含む) 直前、および第 4 エクソン直後に相当するゲノム上の箇所に *loxP* 配列を挿入するターゲティングベクターを設計した (図中、*ScaI*: 制限酵素 *ScaI* の認識配列, *Mc1 DT-A pA*: ジフテリアトキシン A サブユニット遺伝子, *Pr Neo pA*: ネオマイシン耐性遺伝子, *loxP*: *loxP* 配列, *frt*: *frt* 配列の位置を示す。*frt* 配列は、出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来のリコンビナーゼ *flippase* の認識配列であり、CAG プロモーター下流で *flippase* を発現するトランスジェニックマウス・CAG-Flp マウスと交配することで、*Frt-FLP* システムにより *frt* 配列間で相同組換えを起こし、ネオマイシン耐性遺伝子を切り出すことが可能である)。(B) 野生型ホモ (*Wt/Wt*) マウスあるいは *Flox-IRF3* 変異アリルヘテロ (*Wt/Flox-IRF3*) マウスからゲノム DNA を抽出して制限酵素 (*ScaI*) で処理し、図 2.1A に示した箇所 (*Probe* と表記) に相補的な配列を持つ DNA プロブを用いてサザンブロッティングにより解析した。

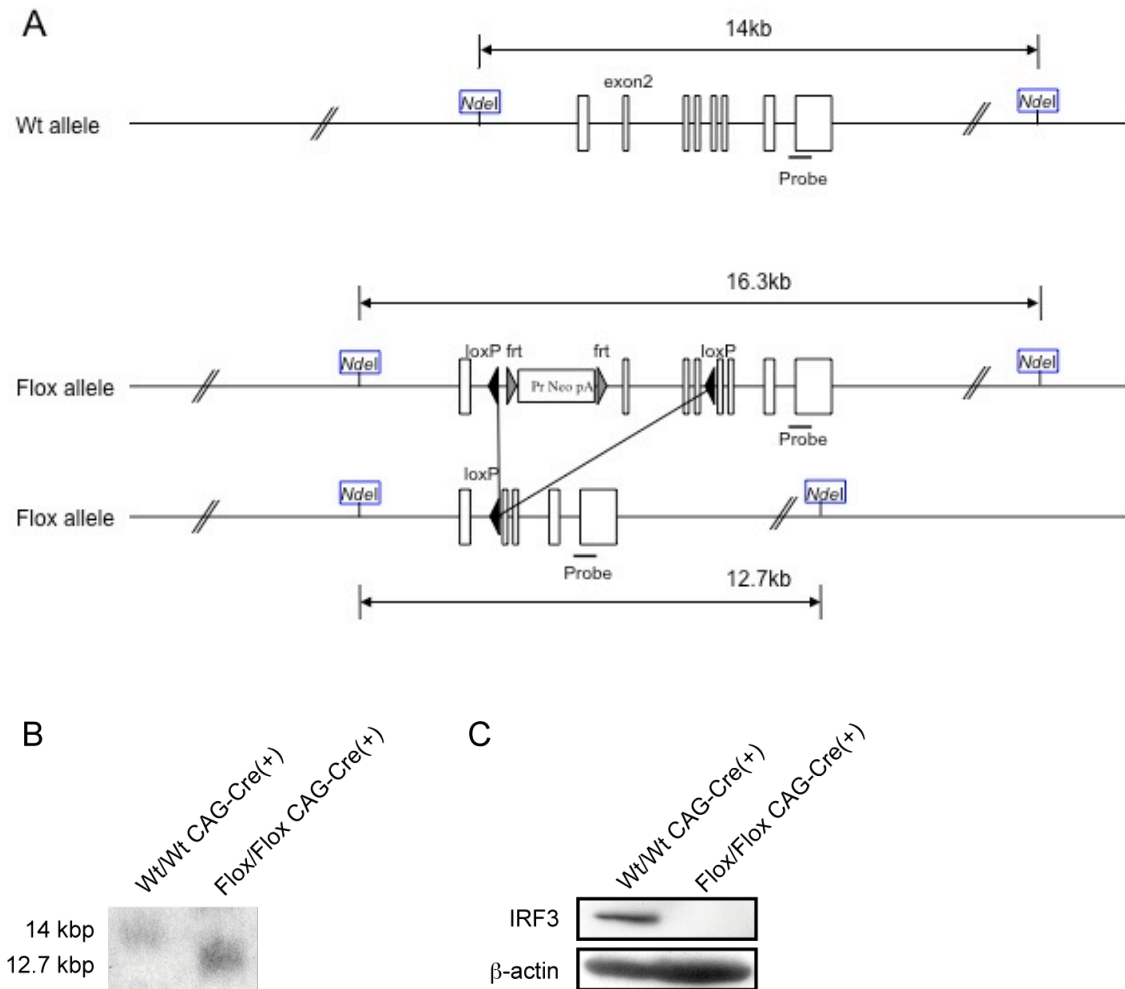


図 2.2 Flox-IRF3 変異マウスにおける Cre/loxP システムを利用した遺伝子欠損 (A) Flox-IRF3 マウスにおける loxP 配列間の相同組換えの概略図を示す。(図中、*NdeI* : 制限酵素 *NdeI* の認識配列, Pr Neo pA : ネオマイシン耐性遺伝子, loxP : loxP 配列, *frit* : *frit* 配列の位置を示す)。(B) CAG-Cre トランスジーンを持ち *Irf3* 遺伝子座に関し野生型ホモ (Wt/Wt CAG-Cre(+)) のマウス、あるいは CAG-Cre トランスジーンを持ち Flox-IRF3 変異アリルホモ (Flox/Flox CAG-Cre(+)) のマウスからゲノム DNA を抽出して制限酵素 (*NdeI*) 処理し、図 2.2(A) に示した箇所 (Probe と表記) に相補的な配列を持つ DNA プローブを用いてサザンブロッティングにより解析した。(C) Wt/Wt CAG-Cre(+)) あるいは Flox/Flox CAG-Cre(+)) の遺伝子型をもつ MEF を調製し、IRF3 の発現を immunoblotting により解析した。

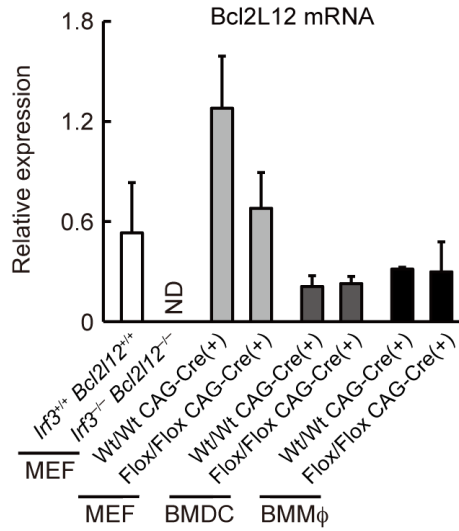


図 2.3 IRF3 cKO マウス由来細胞における Bcl2L12 の発現の検討

野生型 (*Irf3*<sup>+/+</sup>*Bcl2l12*<sup>+/+</sup>) あるいは *Irf3*<sup>-/-</sup>*Bcl2l12*<sup>-/-</sup> の遺伝子型をもつ MEF、および CAG-Cre トランスジーンを持ち *Irf3* 遺伝子座に関し野生型ホモ (Wt/Wt CAG-Cre(+)) あるいは CAG-Cre トランスジーンを持ち Flox-IRF3 変異アリルホモ (Flox/Flox CAG-Cre(+)) の遺伝子型をもつ MEF を調製した。また、Wt/Wt CAG-Cre(+)) あるいは Flox/Flox CAG-Cre(+)) の遺伝子型のマウスから骨髓細胞由来樹状細胞 (BMDC) および骨髓細胞由来マクロファージ (BMMφ) を調製した。それぞれの細胞における *Bcl2l12* mRNA の発現を qRT-PCR により検討した。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ ) を表す。ND はシグナルが検出されなかったことを示す。

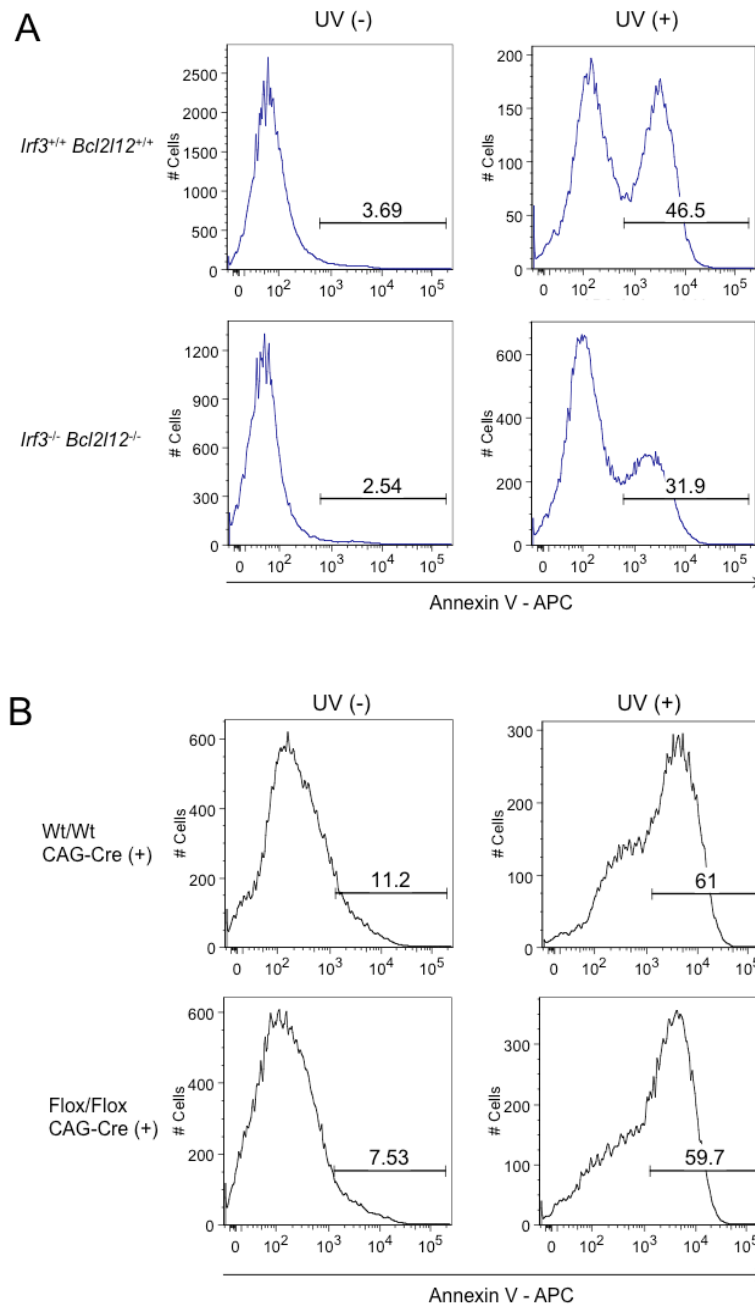


図 2.4 Flox-IRF3 変異マウスにおける導入変異が UV 誘導性アポトーシスに与える影響の検討

(A) 野生型 (*Irf3<sup>+/+</sup> Bcl2l12<sup>+/+</sup>*) あるいは *Irf3<sup>-/-</sup> Bcl2l12<sup>-/-</sup>* の MEF に UV (254 nm, 200  $\mu\text{J}/\text{m}^2$ ) を照射 (UV(+)) あるいは無照射 (UV(-)) の後 18 時間 37°C で培養し、全細胞を回収して Annexin V-APC 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーで定量した。(B) CAG-Cre トランスジーンを持ち *Irf3* 遺伝子座に関し野生型ホモ (Wt/Wt CAG-Cre(+)) あるいは CAG-Cre トランスジーンを持ち Flox-IRF3 変異ア

リルホモ (Flox/Flox CAG-Cre(+)) の遺伝子型をもつ MEF に UV (254 nm, 200  $\mu\text{J}/\text{m}^2$ ) を照射 (UV(+)) あるいは無照射 (UV(-)) の後 18 時間培養し、全細胞を回収して Annexin V-APC で染色し、陽性細胞の割合をフローサイトメトリーにより定量した。各パネル中の数値は、それぞれのサンプルにおける Annexin V-APC 陽性細胞の割合 (%) を示す。

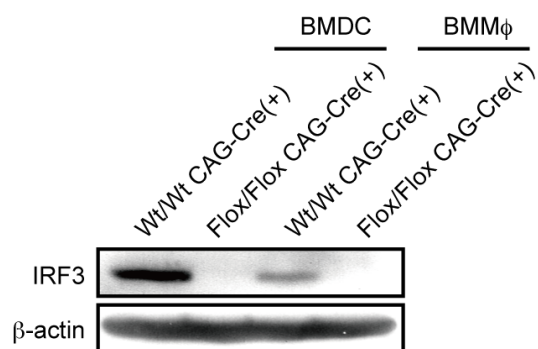


図 2.5 IRF3 cKO マウス由来細胞における IRF3 の発現の検討

CAG-Cre トランスジーンをもち *Irf3* 遺伝子座に関し野生型アレルホモのマウス (Wt/Wt CAG-Cre(+))、あるいは CAG-Cre トランスジーンをもち Flox- IRF3 アレルホモのマウス (Flox/Flox CAG-Cre(+)) から骨髓細胞由来樹状細胞 (BMDC) および骨髓細胞由来マクロファージ (BMMφ) を調製し、それぞれの細胞における IRF3 の発現を immunoblotting により検討した。

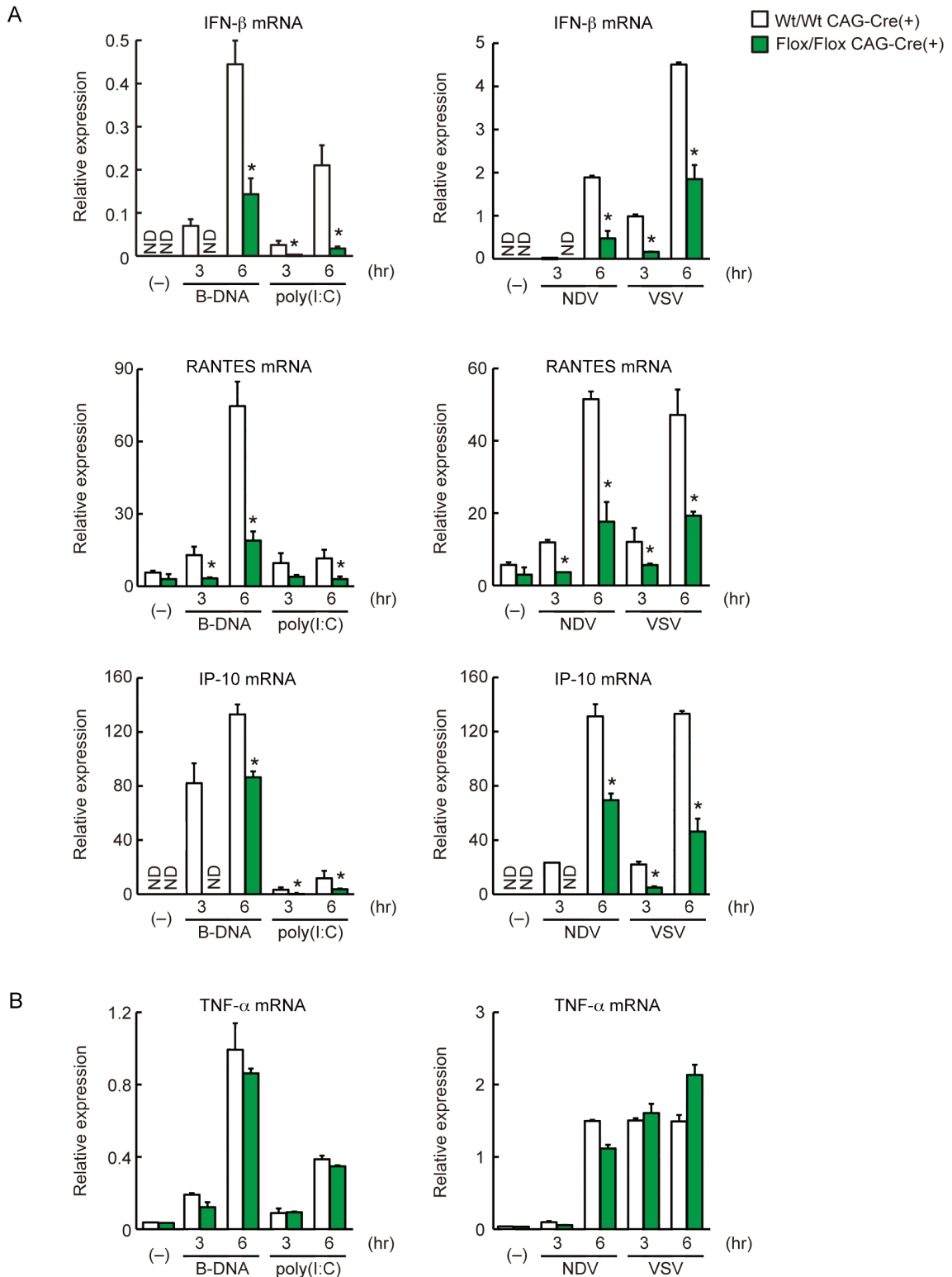


図 2.6 IRF3 欠損骨髄細胞由来樹状細胞における細胞内核酸刺激時のサイトカイン誘導の検討

CAG-Cre トランスジーンをもち *Irf3* 遺伝子座に関し野生型アレルホモのマウス

(Wt/Wt CAG-Cre(+)), あるいは CAG-Cre トランスジーンをもち Flox- IRF3 アリルホモのマウス (Flox/Flox CAG-Cre(+)) から骨髓細胞由来樹状細胞を調製し、B-DNA, poly(I:C) のリポフェクションによる細胞内導入 (各々終濃度 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、および NDV, VSV 感染 (各々 1 MOI (Multiplicity of Infection) で感染) により刺激した。各刺激から 3, 6 時間後に細胞を回収し、トータル RNA を抽出して、(A) IFN- $\beta$  (*Ifnb*), RANTES (*Ccl5*), IP-10 (*Cxcl10*) および (B) TNF- $\alpha$  (*Tnf*), の発現レベルを qRT-PCR により定量した。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ ) を表す。アスタリスクは  $P < 0.05$  で有意差があることを示す。ND はシグナルが検出されなかったことを示す。



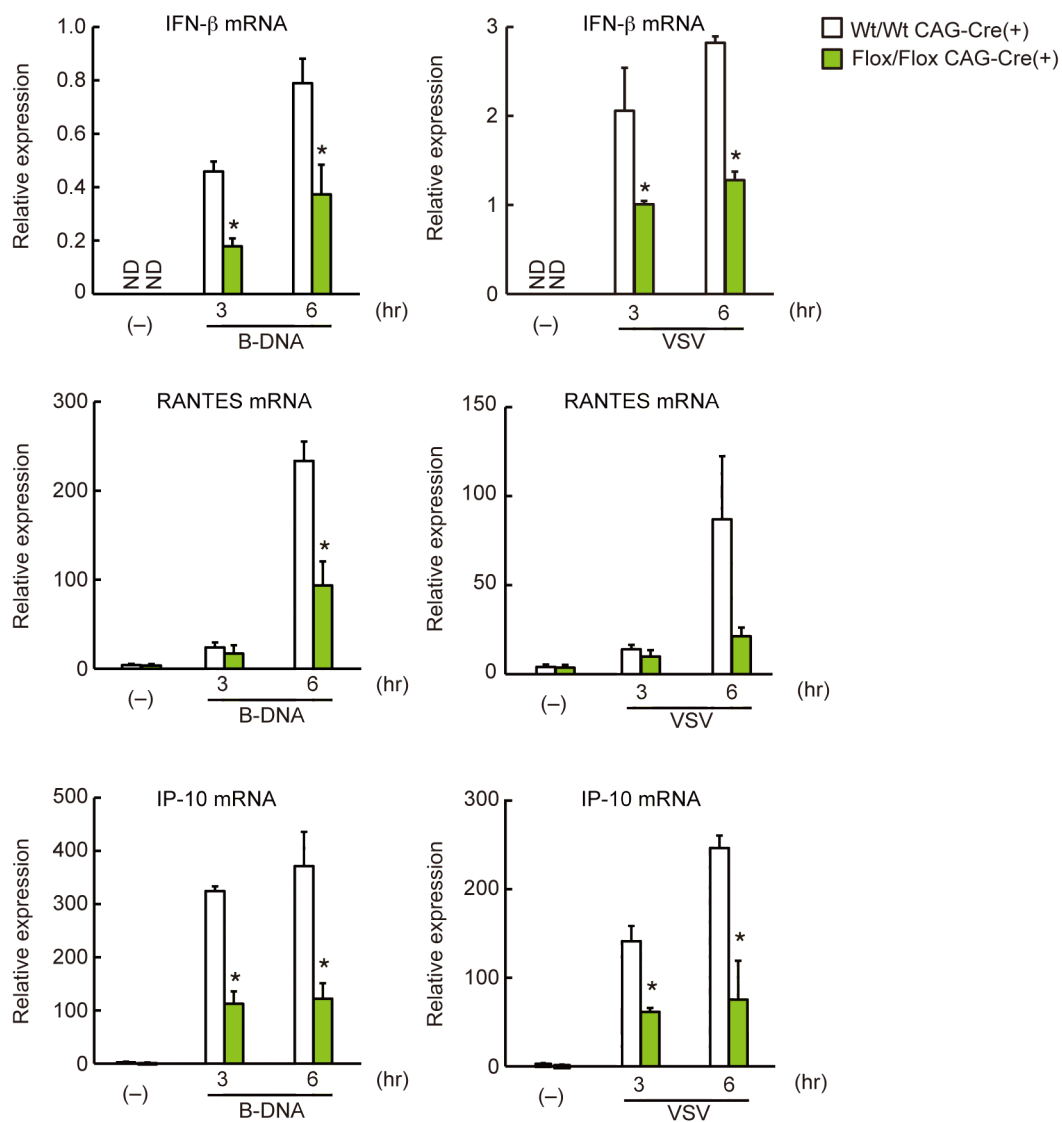


図2.7 骨髄細胞由来マクロファージにおける細胞内核酸刺激時のサイトカイン誘導の検討

CAG-Cre トランスジーンをもち *Irf3* 遺伝子座に関し野生型アリルホモのマウス (Wt/Wt CAG-Cre(+))、あるいは CAG-Cre トランスジーンをもち Flox-IRF3 アリルホモのマウス (Flox/Flox CAG-Cre(+)) から骨髄細胞由来マクロファージを調製し、B-DNA のリポフェクションによる細胞内導入 (終濃度 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、および VSV 感染 (1 MOI (Multiplicity of Infection) で感染) により刺激した後 3, 6 時間後の細胞からトータル RNA を抽出し、IFN- $\beta$  (*Ifnb*), RANTES (*Ccl5*),

IP-10 (*Cxcl10*) の発現レベルを qRT-PCR により定量した。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ ) を表す。アスタリスクは  $P < 0.05$  で有意差があることを示す。ND はシグナルが検出されなかったことを示す。

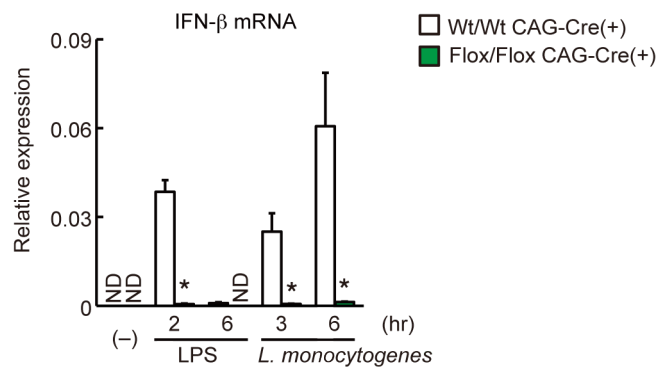


図 2.8 IRF3 欠損骨髄細胞由来樹状細胞におけるバクテリア刺激時の I 型 IFN 誘導の検討

CAG-Cre トランスジーンをもち *Irf3* 遺伝子座に関し野生型アレルホモのマウス (Wt/Wt CAG-Cre(+))、あるいは CAG-Cre トランスジーンをもち Flox-IRF3 アレルホモのマウス (Flox/Flox CAG-Cre(+)) から骨髄細胞由来樹状細胞 (BMDC) を調製し、LPS で刺激 (200 ng/mL) あるいは *Listeria monocytogenes* を感染させた (1 MOI)。 *Listeria monocytogenes* を感染させた細胞では、感染から 2 時間後に細胞培養培地を交換した。LPS 刺激から 2, 6 時間、および *Listeria monocytogenes* 感染から 3, 6 時間の後に細胞を回収し、トータル RNA を抽出して IFN-β (*Ifnb*) mRNA の発現レベルを qRT-PCR により定量した。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ ) を表す。アスタリスクは  $P < 0.05$  で有意差があることを示す。ND はシグナルが検出されなかったことを示す。

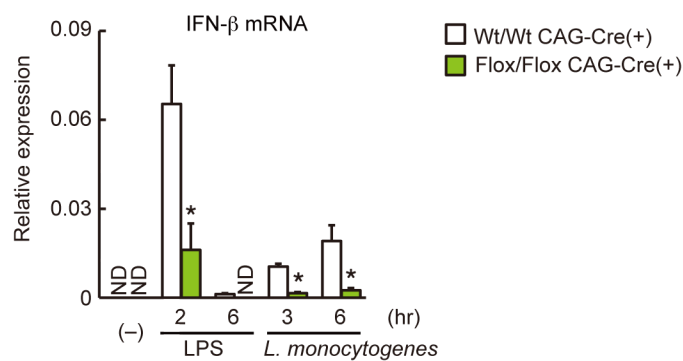


図 2.9 IRF3 欠損骨髄細胞由来マクロファージにおけるバクテリア刺激時の I 型 IFN 誘導の検討

CAG-Cre トランスジーンをもち *Irf3* 遺伝子座に関し野生型アレルホモのマウス (Wt/Wt CAG-Cre(+))、あるいは CAG-Cre トランスジーンをもち Flox- IRF3 アレルホモのマウス (Flox/Flox CAG-Cre(+)) から骨髄細胞由来マクロファージ (BMMφ) を調製し、LPS で刺激 (200 ng/mL) あるいは *Listeria monocytogenes* を感染させた (1 MOI)。 *Listeria monocytogenes* を感染させた細胞では、感染から 2 時間後に細胞培養培地を交換した。LPS 刺激から 2, 6 時間、および *Listeria monocytogenes* 感染から 3, 6 時間の後に細胞を回収し、トータル RNA を抽出して IFN-β (*Ifnb*) mRNA の発現レベルを qRT-PCR により定量した。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ ) を表す。アスタリスクは  $P < 0.05$  で有意差があることを示す。ND はシグナルが検出されなかったことを示す。

## 2.4 方法

### [培地]

DMEM 培地, RPMI 培地の作製については、「1.4 方法」の項に準ずる。

### [リガンド]

B 型らせんを形成する 2 本鎖 DNA である poly(dA-dT):poly(dT-dA) (B-form DNA<sup>62</sup>; 本研究では B-DNA と称する) は SIGMA-Aldrich から、2 本鎖 RNA である poly(I:C)<sup>63,64</sup> は Invivogen から購入した。 CpG-B ODN (ODN 1668)<sup>69,70</sup> は FASMAC から購入した。 Lipopolysaccharide (LPS; *Escherichia coli* O55:B5 由来) は SIGMA-Aldrich から購入した。 Newcastle disease virus (NDV), vesicular stomatitis virus (VSV; NJ 株) は以前から研究室で使用されているものを用いた<sup>33</sup>。 *Listeria monocytogenes* は笹川千尋博士 (東京大学) から御供与頂いた<sup>60</sup>。

B-DNA, poly(I:C) の細胞内導入には、リポフェクション試薬 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用した。具体的には、核酸と、核酸 1  $\mu\text{g}$  に対し 1  $\mu\text{L}$  の Lipofectamine 2000 を個別に無血清培地 Opti-MEM (Life Technologies) に懸濁し静置 (室温、5 min) した後、両者を混合してさらに 20 分間静置し、これを細胞培養培地

に添加した。

## [細胞]

### ・ 骨髄細胞の調製

マウスから後肢大腿骨および脛骨をとり、その内腔に PFE を注入して細胞を回収した。

得られた細胞浮遊液をセルストレイナー(メッシュサイズ 40  $\mu\text{m}$ 、BD)に通し  $1 \times \text{RBC}$

Lysis Buffer (eBioscience) に懸濁して赤血球を溶血させ、さらに PFE で二度洗浄し

た後、再度セルストレイナーに通した。

### ・ 骨髄細胞からのマクロファージ及び樹状細胞の分化

骨髄細胞を終濃度 100 ng/mL の (macrophage colony-stimulating factor; M-CSF,

Peprtech) を含む RPMI 培地で 6 日間培養することにより、骨髄細胞由来マクロ

ファージを得た。骨髄細胞由来樹状細胞は、骨髄細胞を終濃度 20 ng/mL の

(granulocyte macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF, Peprtech) を含む

RPMI 培地で 6 日間培養することにより得た。それぞれ、M-CSF, GM-CSF を含

む RPMI 培地は 2 日おきに交換した。

- ・マウス胎児由来線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast; MEF) の調製

胎生 13 日目のマウス胎児を母マウスの子宮から取り出し、PBS 中で軽く洗浄した後メスで細切し、0.05% トリプシン溶液 (Life Technologies) 中で 30 分間インキュベーション (37°C) し、これを DMEM 培地で培養した。得られた細胞は、継代回数 3 回以内に実験に用いた。

## [マウス]

野生型 C57BL/6J マウスは日本クレアより購入した。*Irf3* 遺伝子欠損マウス (*Irf3*<sup>-/-</sup>*Bcl2l12*<sup>-/-</sup>マウス) は本研究室において作製された<sup>33</sup>。CAG-Cre マウスは、CAG プロモーターの下流に Cre リコンビナーゼの遺伝子を持ち、全身で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスである<sup>71</sup>。CAG-Cre マウスは理研バイオリソースセンターから購入した。

## [手順]

- ・IRF3 コンディショナルノックアウト (cKO) マウスの作製

C57BL/6J マウス ES 細胞由来の BAC DNA (BAC ID RP23-343L20) をテンプレー

トとして、以下の配列のプライマーを用いた PCR により *Irf3* 遺伝子座のゲノム断片、5 arm, Flox arm, 3 arm 断片を得た。

5 arm Forward

5'-ggtgatggtagaacgctgcatgtctgtcctgactggatgcaatggctccagagctcagcgtcgacagcctgctttttgt

acaaactgtcccctcacagcttgtctgtaagcggatg-3'; 5 arm Reverse

5'-ttcccgtttgtacacaatggtgaaggaagacctgtgttgggcgggtcggagaggttgagcggccgcaccaacttttct

atacaaagttgtccccgctctcctgagtaggacaaat-3'; Flox arm Forward

5'-ggggtttccatgctctagcctgcgcaccacaggacagttcctgagcctgtctgtcacggggcaaatgcagctgactca

cagcttgtctgtaagcggatg-3'; Flox arm Reverse

5'-ccttctcccggacctccattcctccaccggttggtgcctcctgactcagctgaagctggtgacagtactgatatcgctc

tctgagtaggacaaatc-3'; 3 arm Forward

5'-aggggcccccaagatcaggccatcaaataacttcggtaggttttctgggggaggaggagggtgtagctgcaactttatt

atacaaagttgtcccctcacagcttgtctgtaagcggatg-3'; 3 arm Reverse

5'-gattgccttcatggaaggaagtggacactccccacgtacactctgtggttctgcatgggggaaatgtgaccagctttct

tgtacaaagtggccccgctctcctgagtaggacaaatc-3'

Gateway クローニングテクノロジー (Life Technologies) の利用により、5 arm

断片をドナーベクター pDONR221 P1-P4 の attL1, attL4 サイト間に、3 arm 断



片を pDONR221 P2-P3 の attL2, attL3 サイト間に挿入し、Flox arm 断片は attR4, attR3 配列を持つエントリーベクター pENTR Conditional FW の *XhoI/PacI* サイト間に挿入した。これらのベクターと、attR1, attR2 配列を持つ pDEST DT-ApA BSK ベクターとの attR-attL 配列間の特異的組換え反応によりターゲッティングベクターを得た。ターゲッティングベクターは *SalI* サイトの切断により直鎖化し、ES 細胞株 TT2<sup>72</sup> にエレクトロポレーション法にて導入した。ES 細胞を G418 含有培地にて培養し、G418 耐性コロニーのゲノム DNA に対し PCR 法により導入された変異遺伝子のスクリーニングを行った。PCR 法によるスクリーニングには Forward 5'-gtactcggatggaagccggtctgtc-3', Reverse 5'-cacaagcctcttgacctatggctgg-3' の配列のプライマーを用いた。得られた目的のクローンを 8 細胞期の ICR マウス卵に挿入し、その卵を仮親のマウスに移植してキメラマウスを産出させた。ES 細胞のスクリーニング、卵へのインジェクションは理研バイオリソースセンター 相澤慎一博士との共同研究によってなされた。その後、C57BL/6J マウスとの交配により F1 マウスを得た。

・ Southern blotting

- 5× TBE 緩衝液

54 g Tris (ナカライテスク), 27.5 g ホウ酸 (ナカライテスク), 20 mL の 0.5 M EDTA (pH 8.0, 同仁化学) を蒸留水に溶解して 1 L にメスアップし、終濃度をそれぞれ 445 mM, 445 mM, 10 mM とした。

- 20× SSC 緩衝液

175.32 g NaCl (関東化学), 88.23 g クエン酸三ナトリウム二水和物 (ナカライテスク) を蒸留水に溶解して 1 L にメスアップし、終濃度をそれぞれ 3 M, 0.3 M とした。

制限酵素 (*ScaI* あるいは *NdeI*; TaKaRa) 処理後のゲノム DNA 10 µg 分を 0.5× TBE 0.8% アガロース (関東化学) ゲルで電気泳動 (定電圧, 30V, 40 hr) した。泳動後のゲルを 0.25 N HCl (和光純薬) 溶液中で 20 分、0.4 N NaOH (ナカライテスク) 溶液中で 30 分振盪した後、0.4 N NaOH 溶液に浸した濾紙、ゲル、ナイロン膜 Hybond N+ (GE ヘルスケア)、濾紙、大量の紙タオルの順に重層して上から重しを掛け、DNA をナイロン膜に転写した (室温、12 hr)。ナイロン膜を 2× SSC 中で 15 分震盪した後、DNA とナイロン膜とのクロスリンクを目的として UV を照射 (120,000 µJ) した。

DNA プローブは C57BL/6J マウスのゲノム DNA を鋳型とし、Forward 鎖: 5'-gtagctgtagctgcaggtctttgc-3', Reverse 鎖: 5'-cagatgggaagactgagcctttag-3'の配列のプライマーを用いて PCR 法によりクローニングした。DNA プローブ 20 ng 分を、5 µL の

[<sup>32</sup>P]-dCTP (10 mCi/mL; PerkinElmer) および BcaBEST Labeling kit (TaKaRa)を用いて添付のプロトコルに従い <sup>32</sup>P 標識し、Probe Quant G-50 Micro Columns (GE Healthcare) を用いて精製した。DNA を固定したナイロン膜は 8 mL のハイブリダイゼーションバッファー ULTRAhyb (ABI) 中でインキュベーション (42°C, 1 hr) し、さらに <sup>32</sup>P 標識済 DNA プローブを加えハイブリダイゼーション反応を行った (42°C, 24 hr)。ハイブリダイゼーションの後、ナイロン膜を 2× SSC, 0.1% SDS 緩衝液中で 2 回 (42°C, 5 min)、0.1× SSC, 0.1% SDS 緩衝液中で 3 回 (42°C, 15 min) 洗浄し、β線を X 線フィルム RX-U (富士フィルム) にて検出した (-80°C, 24 hr)。

・ Immunoblotting による細胞内 IRF3 の検出

- 細胞溶解緩衝液

50 mM Tris-HCl (pH 7.4) (ナカライテスク), 500 mM NaCl (関東化学), 20 mM β-グリセロリン酸ナトリウム *n* 水和物 (和光純薬), 2 mM EDTA (同仁化学), 1.5% NonidetP-40 (ナカライテスク), 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (和光純薬), 200 μM Dithiothreitol (DTT, 和光純薬), 10 μg/mL Aprotinin (TaKaRa BIO), 10 μg/mL Leupeptin (和光純薬), 1 mM APMSF (和光純薬)

(i) Whole cell lysate の調製

細胞を PBS で洗浄した後、50  $\mu$ L の細胞溶解緩衝液に懸濁して穏やかに混和し、5 分ごとにタッピングしながら氷上に 20 分静置した。これを遠心分離 (10,000 rpm, 4°C, 10 min) し、上清を whole cell lysate として回収した。

(ii) SDS-PAGE, immunoblotting

- 一次抗体

ウサギ 抗 IRF3 ポリクローナル抗体 (Invitrogen), マウス 抗  $\beta$ アクチン モノクローナル抗体 (clone AC-15; SIGMA-Aldrich)

- 二次抗体

抗 ウサギ IgG HRP 結合抗体 (GE Healthcare), 抗 マウス IgG HRP 結合抗体 (GE Healthcare)

SDS-PAGE, immunoblotting の手順については「1.4 方法」の項に準ずる。

・アポトーシス誘導アッセイ

細胞培養ディッシュに播種後 24 時間経た MEF を PBS で洗浄し UV クロスリンカー (CL-100; UVP) により UV を照射 (254 nm, 200 J/m<sup>2</sup>) した後、DMEM 培地中で培養した (37°C, 18 hr)。培養後の細胞を全て回収し、Annexin V-APC (BD Pharmingen) で染色し、陽性細胞の割合をフローサイトメーター (LSRII/Fortessa;

BD Biosciences) により解析した。

- ・定量的 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) 法

細胞からのトータル RNA の抽出, cDNA の合成および qRT-PCR 解析の手順については、「1.4 方法」の項に準ずる。本研究において使用した PCR プライマーの配列は表 2 の通りである。

- ・統計解析

コントロール群とサンプル群の値に有意差があるか否かは、Student の  $t$  検定によって評価した。

表 2 qRT-PCR プライマー配列

遺伝子		配列
<i>Bcl2l12</i>	Forward 鎖	5'- GGTTCTGACGGCCTTCCTTA -3'
	Reverse 鎖	5'- GCAACCAGGGCATAGAACTC -3'
<i>Ifnb1</i>	Forward 鎖	5'- ACGCCTGGATGGTGGTCCGA -3'
	Reverse 鎖	5'- TGCCTGCAACCACCACTCATTCT -3'
<i>Ccl5</i>	Forward 鎖	5'- ACGTCAAGGAGTATTTCTACAC -3'
	Reverse 鎖	5'- GATGTATTCTTGAACCCACT -3'
<i>Cxcl10</i>	Forward 鎖	5'- TGCCTGCTCTTACTGACTGG -3'
	Reverse 鎖	5'- TCGGTTAGCAGTATGTTGTCCA -3'
<i>Tnf</i>	Forward 鎖	5'- TCATACCAGGAGAAAGTCAACCTC -3'
	Reverse 鎖	5'- GTATATGGGCTCATACCAGGGTTT -3'
<i>Gapdh</i>	Forward 鎖	5'- CTCATGACCACAGTCCATGC -3'
	Reverse 鎖	5'- CACATTGGGGGTAGGAACAC -3'

## 謝辞

本研究につきまして、大変ご多忙な中ご指導下さいました、東京大学生産技術研究所 炎症・免疫制御学社会連携研究部門 特任教授 (マックスプランク-東京大学統合炎症学センター長) 谷口維紹先生 に謹んで御礼申し上げます。また、実験及び博士論文執筆にあたり、大変熱心にご指導下さいました柳井秀元先生(特任准教授)をはじめ、根岸英雄先生(特任助教)、西尾純子先生(特任助教)、生島弘彬先生(特任助教)、新奈緒子博士(現・理化学研究所所属)に心より感謝申し上げます。特に博士課程4年の植木紘史さんは、一人では遂行不可能な NK 細胞を用いた実験に全てご協力下さった上、本研究をまとめるにあたり、充実した討論の場を下さいました。ありがとうございました。また、特別のご配慮により施設をご提供下さった医学部 RI 管理室の皆様にも心より感謝申し上げます。これまで学ばせて頂いたことを生かし、今後研究者としてサイエンスの発展に貢献できるよう、更なる成長を目指し努力致します。最後になりましたが、研究のみならず様々な局面で大変お世話になりました、炎症・免疫制御学研究室の皆様に、心より感謝申し上げます。

## 略語一覽

AMP	adenosine monophosphate
APC	allophycocyanin
APMSF	4-aminophenyl-methylsulfonyl fluoride
BAC	bacterial artificial chromosome
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BMDC	bone marrow derived dendritic cell
BMMf	bone marrow derived macrophage
CARD9	caspase recruitment domain-containing protein 9
cDNA	complementary DNA
cGAMP	cyclic GMP-AMP
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase
cKO	conditional knockout
CLR	C-type lectin receptor
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DAI	DNA-dependent activator of IRF
DAMP	damage-associated molecular pattern
dCTP	deoxycytidine triphosphate
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	deoxyribonucleic acid
dsDNA	double-stranded DNA
dsRNA	double-stranded RNA
DTT	dithiothreitol
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ER	endoplasmic reticulum
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
ES	embryonic stem
FCS	fetal calf serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor



GMP	guanosine monophosphate
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
IFN	interferon
IgG	immunoglobulin G
IL	interleukin
INAM	IRF3-dependent NK-activating molecule
IP-10	IFN- $\gamma$ -induced protein 10
IPS-1	IFN- $\beta$ promoter stimulator-1
IRF	interferon regulatory factor
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
Lck	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LPS	lipopolysaccharide
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MDA5	melanoma differentiation-associated protein 5
MEF	mouse embryonic fibroblast
MEM	minimum essential media
MHC	major histocompatibility complex
MICA	MHC class I chain-related gene A
MICB	MHC class I chain-related gene B
MOI	multiplicity of Infection
mRNA	messenger RNA
Mult-1	murine ULBP-like transcript 1
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
ND	none detected
NDV	Newcastle disease virus
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NF $\kappa$ B	nuclear factor k-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	natural killer
NKG2D	natural killer cell group 2D
ODN	oligodeoxynucleotide
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
PRR	pattern recognition receptor
PVDF	polyvinylidene difluoride
qRT-PCR	quantative reverse transcription polymerase chain reaction
Rae-1	retinoic acid early inducible 1
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RBC	red blood cell
RIG-I	retinoic acid-inducible gene-I
RLR	RIG-I-like receptor
RNA	ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park memorial institute
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis
SSC	saline sodium citrate
ssRNA	single-stranded RNA
STING	stimulator of IFN genes protein
Syk	spleen tyrosine kinase
TBK1	TANK-binding kinase 1
TBS	Tris-buffered saline
TLR	Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
TRIF	Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
ULBP	UL16 binding protein
USF2	upstream stimulatory factor 2
UV	ultraviolet
VSV	vesicular stomatitis virus

## 引用文献

- 1 Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820, doi:S0092-8674(10)00023-1 [pii] 10.1016/j.cell.2010.01.022 (2010).
- 2 Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* **327**, 291-295, doi:327/5963/291 [pii] 10.1126/science.1183021 (2010).
- 3 Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216, doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359 083001.084359 [pii] (2002).
- 4 Takeuchi, O. & Akira, S. Signaling pathways activated by microorganisms. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 185-191, doi:S0955-0674(07)00020-8 [pii] 10.1016/j.ceb.2007.02.006 (2007).
- 5 Holm, C. K., Paludan, S. R. & Fitzgerald, K. A. DNA recognition in immunity and disease. *Curr Opin Immunol* **25**, 13-18, doi:S0952-7915(12)00196-3 [pii] 10.1016/j.coi.2012.12.006 (2013).
- 6 Gurtler, C. & Bowie, A. G. Innate immune detection of microbial nucleic acids. *Trends Microbiol* **21**, 413-420, doi:S0966-842X(13)00075-9 [pii] 10.1016/j.tim.2013.04.004 (2013).
- 7 Goubau, D., Deddouche, S. & Reis e Sousa, C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity* **38**, 855-869, doi:S1074-7613(13)00204-5 [pii] 10.1016/j.immuni.2013.05.007 (2013).
- 8 Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730-737, doi:10.1038/ni1087 ni1087 [pii] (2004).
- 9 Kato, H. *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101-105, doi:nature04734 [pii] 10.1038/nature04734 (2006).

- 10 Yoneyama, M. *et al.* Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* **175**, 2851-2858, doi:175/5/2851 [pii] (2005).
- 11 Hornung, V. *et al.* 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-997, doi:1132505 [pii] 10.1126/science.1132505 (2006).
- 12 Pichlmair, A. *et al.* RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997-1001, doi:1132998 [pii] 10.1126/science.1132998 (2006).
- 13 Kawai, T. *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**, 981-988, doi:ni1243 [pii] 10.1038/ni1243 (2005).
- 14 Meylan, E. *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167-1172, doi:nature04193 [pii] 10.1038/nature04193 (2005).
- 15 Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K. & Chen, Z. J. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- $\kappa$ B and IRF 3. *Cell* **122**, 669-682, doi:S0092-8674(05)00816-0 [pii] 10.1016/j.cell.2005.08.012 (2005).
- 16 Xu, L. G. *et al.* VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN- $\beta$  signaling. *Mol Cell* **19**, 727-740, doi:S1097-2765(05)01556-X [pii] 10.1016/j.molcel.2005.08.014 (2005).
- 17 Ishikawa, H. & Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674-678, doi:nature07317 [pii] 10.1038/nature07317 (2008).
- 18 Jin, L. *et al.* MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals. *Mol Cell Biol* **28**, 5014-5026, doi:MCB.00640-08 [pii] 10.1128/MCB.00640-08 (2008).
- 19 Zhong, B. *et al.* The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* **29**, 538-550, doi:S1074-7613(08)00406-8 [pii] 10.1016/j.immuni.2008.09.003 (2008).
- 20 Sun, W. *et al.* ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**,

- 8653-8658, doi:0900850106 [pii] 10.1073/pnas.0900850106 (2009).
- 21 Barber, G. N. STING-dependent cytosolic DNA sensing pathways. *Trends Immunol* **35**, 88-93, doi:S1471-4906(13)00166-X [pii] 10.1016/j.it.2013.10.010 (2014).
- 22 Paludan, S. R. & Bowie, A. G. Immune sensing of DNA. *Immunity* **38**, 870-880, doi:S1074-7613(13)00201-X [pii] 10.1016/j.immuni.2013.05.004 (2013).
- 23 Takaoka, A. & Taniguchi, T. Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 847-857, doi:S0169-409X(07)00387-0 [pii] 10.1016/j.addr.2007.12.002 (2008).
- 24 Wu, J. *et al.* Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* **339**, 826-830, doi:science.1229963 [pii] 10.1126/science.1229963 (2013).
- 25 Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. & Chen, Z. J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* **339**, 786-791, doi:science.1232458 [pii] 10.1126/science.1232458 (2013).
- 26 Honda, K. & Taniguchi, T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* **6**, 644-658, doi:10.1038/nri1900 (2006).
- 27 Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D. & Taniguchi, T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* **26**, 535-584, doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400 (2008).
- 28 Hornung, V. & Latz, E. Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol* **10**, 123-130, doi:nri2690 [pii] 10.1038/nri2690 (2010).
- 29 Yanai, H. *et al.* Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3402-3407, doi:0611559104 [pii] 10.1073/pnas.0611559104 (2007).
- 30 Takaoka, A. *et al.* Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* **434**, 243-249, doi:10.1038/nature03308 (2005).
- 31 Brown, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* **6**, 33-43, doi:10.1038/nri1745 (2006).
- 32 del Fresno, C. *et al.* Interferon- $\beta$  production via Dectin-1-Syk-IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans*. *Immunity* **38**, 1176-1186,

- doi:10.1016/j.immuni.2013.05.010 (2013).
- 33 Sato, M. *et al.* Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- $\alpha/\beta$  gene induction. *Immunity* **13**, 539-548, doi:S1074-7613(00)00053-4 [pii] (2000).
- 34 Tsushima, K. *et al.* IRF3 regulates cardiac fibrosis but not hypertrophy in mice during angiotensin II-induced hypertension. *FASEB J* **25**, 1531-1543, doi:fj.10-174615 [pii] 10.1096/fj.10-174615 (2011).
- 35 Nakajima, A. *et al.* Cell type-dependent proapoptotic role of Bcl2L12 revealed by a mutation concomitant with the disruption of the juxtaposed *Irf3* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12448-12452, doi:0905702106 [pii] 10.1073/pnas.0905702106 (2009).
- 36 Ritter, M. *et al.* Lytic susceptibility of target cells to cytotoxic T cells is determined by their constitutive major histocompatibility complex class I antigen expression and cytokine-induced activation status. *Immunology* **81**, 569-577 (1994).
- 37 Apetoh, L., Locher, C., Ghiringhelli, F., Kroemer, G. & Zitvogel, L. Harnessing dendritic cells in cancer. *Semin Immunol* **23**, 42-49, doi:S1044-5323(11)00004-2 [pii] 10.1016/j.smim.2011.01.003 (2011).
- 38 Gorelik, E., Wiltrout, R. H., Okumura, K., Habu, S. & Herberman, R. B. Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int J Cancer* **30**, 107-112 (1982).
- 39 Hanna, N. Inhibition of experimental tumor metastasis by selective activation of natural killer cells. *Cancer Res* **42**, 1337-1342 (1982).
- 40 Yokoyama, W. M. Natural killer cell immune responses. *Immunol Res* **32**, 317-325, doi:IR:32:1-3:317 [pii] 10.1385/IR:32:1-3:317 (2005).
- 41 Trapani, J. A. & Smyth, M. J. Killing by cytotoxic T cells and natural killer cells: multiple granule serine proteases as initiators of DNA fragmentation. *Immunol Cell Biol* **71 ( Pt 3)**, 201-208, doi:10.1038/icb.1993.22 (1993).
- 42 Diefenbach, A. & Raulet, D. H. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev* **181**, 170-184 (2001).
- 43 Gonzalez, S., Lopez-Soto, A., Suarez-Alvarez, B., Lopez-Vazquez, A. & Lopez-Larrea, C. NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol* **29**, 397-403, doi:S1471-4906(08)00158-0 [pii]

- 10.1016/j.it.2008.04.007 (2008).
- 44 Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T. A. & Tagaya, Y. IL-15R  $\alpha$  recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity* **17**, 537-547, doi:S1074761302004296 [pii] (2002).
- 45 Steel, J. C., Waldmann, T. A. & Morris, J. C. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol Sci* **33**, 35-41, doi:S0165-6147(11)00173-8 [pii] 10.1016/j.tips.2011.09.004 (2012).
- 46 Ebihara, T. *et al.* Identification of a polyI:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J Exp Med* **207**, 2675-2687, doi:10.1084/jem.20091573 (2010).
- 47 Brilot, F., Strowig, T., Roberts, S. M., Arrey, F. & Munz, C. NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15R  $\alpha$ . *J Clin Invest* **117**, 3316-3329, doi:10.1172/JCI31751 (2007).
- 48 Mortier, E., Woo, T., Advincula, R., Gozalo, S. & Ma, A. IL-15R  $\alpha$  chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J Exp Med* **205**, 1213-1225, doi:jem.20071913 [pii] 10.1084/jem.20071913 (2008).
- 49 Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P. & Diefenbach, A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* **26**, 503-517, doi:S1074-7613(07)00186-0 [pii] 10.1016/j.immuni.2007.03.006 (2007).
- 50 Waldmann, T. A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* **6**, 595-601, doi:10.1038/nri1901 (2006).
- 51 Brunner, K. T., Mael, J., Cerottini, J. C. & Chapuis, B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on  $^{51}\text{Cr}$ -labelled allogeneic target cells *in vitro*; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* **14**, 181-196 (1968).
- 52 Chiba, S. *et al.* Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. *Elife* **3**, doi:10.7554/eLife.04177 (2014).
- 53 Sancho, D. & Reis e Sousa, C. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu Rev Immunol* **30**, 491-529, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101352 (2012).

- 54 Nishikado, H., Mukai, K., Kawano, Y., Minegishi, Y. & Karasuyama, H. NK cell-depleting anti-asialo GM1 antibody exhibits a lethal off-target effect on basophils in vivo. *J Immunol* **186**, 5766-5771, doi:10.4049/jimmunol.1100370 (2011).
- 55 Takahashi, M. *et al.* LPS induces NK1.1<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cells with potent cytotoxicity in the liver of mice via production of IL-12 from Kupffer cells. *J Immunol* **156**, 2436-2442 (1996).
- 56 Honda, K. *et al.* IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772-777, doi:10.1038/nature03464 (2005).
- 57 Saijo, S. *et al.* Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* **8**, 39-46, doi:10.1038/ni1425 (2007).
- 58 Kawai, T. *et al.* Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* **167**, 5887-5894 (2001).
- 59 O'Connell, R. M. *et al.* Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* **200**, 437-445, doi:10.1084/jem.20040712 jem.20040712 [pii] (2004).
- 60 Negishi, H. *et al.* Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nat Immunol* **13**, 659-666, doi:10.1038/ni.2307 (2012).
- 61 Scorilas, A. *et al.* Molecular cloning, physical mapping, and expression analysis of a novel gene, BCL2L12, encoding a proline-rich protein with a highly conserved BH2 domain of the Bcl-2 family. *Genomics* **72**, 217-221, doi:10.1006/geno.2000.6455 S0888-7543(00)96455-3 [pii] (2001).
- 62 Ishii, K. J. *et al.* A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* **7**, 40-48, doi:ni1282 [pii] 10.1038/ni1282 (2006).
- 63 Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738, doi:10.1038/35099560 35099560 [pii] (2001).
- 64 Kato, H. *et al.* Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic



- acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* **205**, 1601-1610, doi:10.1084/jem.20080091 [pii] (2008).
- 65 Fitzgerald, D. C. *et al.* Interferon regulatory factor (IRF) 3 is critical for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* **11**, 130, doi:1742-2094-11-130 [pii] 10.1186/1742-2094-11-130 (2014).
- 66 Guo, B., Chang, E. Y. & Cheng, G. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J Clin Invest* **118**, 1680-1690, doi:10.1172/JCI33342 (2008).
- 67 Savitsky, D. A., Yanai, H., Tamura, T., Taniguchi, T. & Honda, K. Contribution of IRF5 in B cells to the development of murine SLE-like disease through its transcriptional control of the IgG2a locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 10154-10159, doi:1005599107 [pii] 10.1073/pnas.1005599107 (2010).
- 68 Klein, U. *et al.* Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol* **7**, 773-782, doi:ni1357 [pii] 10.1038/ni1357 (2006).
- 69 Krieg, A. M. *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546-549, doi:10.1038/374546a0 (1995).
- 70 Whitmore, M. M., Li, S., Falo, L., Jr. & Huang, L. Systemic administration of LPD prepared with CpG oligonucleotides inhibits the growth of established pulmonary metastases by stimulating innate and acquired antitumor immune responses. *Cancer Immunol Immunother* **50**, 503-514 (2001).
- 71 Matsumura, H., Hasuwa, H., Inoue, N., Ikawa, M. & Okabe, M. Lineage-specific cell disruption in living mice by Cre-mediated expression of diphtheria toxin A chain. *Biochem Biophys Res Commun* **321**, 275-279, doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.139 S0006-291X(04)01411-1 [pii] (2004).
- 72 Yagi, T. *et al.* A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Analytical biochemistry* **214**, 70-76, doi:10.1006/abio.1993.1458 (1993).