

論文の内容の要旨

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

免疫系は、ウイルスや細菌等の外来の病原体を非自己として認識し、排除に導く。免疫系は自然免疫系と適応免疫系に大別され、自然免疫系は、病原体に特有の分子パターン (PAMPs) を認識するパターン認識受容体を用いて下流のシグナル伝達経路を活性化し、サイトカイン遺伝子の発現誘導を行い、さらには抗原提示などを介して適応免疫系の活性化をも促進する重要な役割を持つ。PAMPs の中でもウイルス、細菌由来の核酸は、Toll-like receptor や細胞質内核酸認識受容体に認識され、免疫応答を強く誘導することが知られている。これらの自然免疫系核酸認識受容体の下流において、I型インターフェロン (IFN) および炎症性サイトカインの誘導に必須の役割を果たす転写因子として IRF 転写因子 (IFN regulatory factor; IRF) が知られており、感染防御において重要な役割を担っている。一方で、これらの転写因子群の抗腫瘍自然免疫応答に対する関与については、詳細な解析がなされていない。そこで本研究において IRF ファミリー転写因子群の抗腫瘍自然免疫応答における役割について、解析を行った (第1部)。また、第2部においては IRF3 の適応免疫系における役割、および細胞種特異的機能の解析を見据え IRF3 コンディショナルノックアウト (cKO) マウスの作製を行った。

第1部 『IRF5 の抗腫瘍応答における役割』

IRF3, 5, 7 の抗腫瘍自然免疫応答への関与を検討するため、*Irf3*, *Irf5*, *Irf7* それぞれの遺伝子欠損マウス (*Irf3*^{-/-}, *Irf5*^{-/-}, *Irf7*^{-/-}マウス) を NK 細胞によるがん排除のモデルである B16F1 メラノーマ細胞肺転移モデルに供したところ、*Irf5*^{-/-}マウスのみで野生型マウスと比較し著明な転移・増殖が見られた。また、骨髄移植と肺転移モデルを組み合わせて行

うことにより、骨髄由来細胞において IRF5 の機能することががんの排除に重要であることが示された。続いて、野生型および *Irf5*^{-/-} マウス由来の脾細胞をエフェクター細胞として B16F1 細胞に対する殺傷活性を ⁵¹Cr 遊離法により定量したところ、*Irf5*^{-/-} 脾細胞では、野生型細胞の場合と比較し B16F1 細胞の殺傷率に減弱が見られた。さらに同様の実験で、NK 細胞を除去した脾細胞による B16F1 細胞の殺傷は全く見られないこと、*Irf5*^{-/-} マウス脾臓から精製した NK 細胞の殺傷活性は野生型 NK 細胞と同等であったことから、NK 細胞に内在する IRF5 は NK 細胞のがん殺傷力に影響しないことが示唆された。

これらの結果から、NK 細胞のがん殺傷活性を亢進させる働きを持つ骨髄由来細胞が存在し、その細胞において IRF5 が機能することが重要であるのではないかと考えた。これを検証するため、野生型マウスの脾細胞からマクロファージを主とする CD11b⁺ 細胞、および CD11c⁺ 樹状細胞、T 細胞、B 細胞をそれぞれ精製し、これらを別個に野生型 NK 細胞と共培養することにより NK 細胞の B16F1 細胞傷害活性が亢進するか検討した。その結果、マクロファージ・樹状細胞を加えた際にのみ NK 細胞の殺傷の増強が見られた。さらに、*Irf5*^{-/-} マウスからマクロファージ・樹状細胞を精製して同様の検討を行ったところ、*Irf5*^{-/-} マクロファージ・樹状細胞を用いた場合は、野生型を用いた場合と比較して、NK 細胞によるがん殺傷活性の増強が有意に低かった。これらの結果から、マクロファージ・樹状細胞が NK 細胞による殺傷を増強させる細胞であり、これらにおいて IRF5 が機能することが必要であることが示された。

マクロファージ・樹状細胞が NK 細胞のがん殺傷活性を亢進させる際、IRF5 は活性化を受けるのだろうか。野生型マウス由来脾細胞を ⁵¹Cr 遊離法での検討と同様の細胞比で B16F1 細胞と共培養したところ、IRF5 の活性化の指標として知られる、細胞質から核内への移行が見られ、がん細胞からの刺激により IRF5 が活性化されることが示された。また、真菌由来βグルカンを認識して IRF5 を活性化させる C 型レクチン受容体である Dectin-1 の遺伝子欠損マウスから脾細胞を調製し、同様に B16F1 細胞と共培養したところ、これらの細胞においては IRF5 の核内への移行が観察されなかった。よって、マクロファージ・樹状細胞において、IRF5 はがん細胞を認識した Dectin-1 の下流で活性化されていることが示唆された。

IRF5 依存的に発現し NK 細胞の殺傷活性を亢進させるその実体は何か。がん細胞を認識したマクロファージや樹状細胞において、NK 細胞の殺傷力を増強させる因子が IRF5 依存的に発現誘導されるとの仮説に基づき、野生型および *Irf5*^{-/-} マウスから調製した樹状細胞をそれぞれ B16F1 細胞と共培養し、NK 細胞の活性化の効果が報告されている分子の遺伝子の発現変化を比較した。それぞれの共培養からトータル RNA を抽出し、

IFN- β , IL-12p40, IL-15, IL-15R α ,および INAM の mRNA を qRT-PCR により解析したところ、IFN- β , IL-12p40 の遺伝子発現レベルは共培養の前後で大きな変化を示さなかった。一方、IL-15, IL-15R α , INAM は野生型樹状細胞とがん細胞との共培養により mRNA の発現が誘導された。また *Irf5*^{-/-}樹状細胞を B16F1 細胞と共培養した場合には、INAM の誘導は認められず、IL-15, IL-15R α の誘導には野生型樹状細胞を用いた場合と比較し部分的低下が見られた。よってがんと共培養した樹状細胞では、IRF5 に依存して INAM の遺伝子発現が誘導され、IL15, IL-15R α についてもその誘導が IRF5 に部分的に依存する可能性が示された。

これらの結果を総合し、IRF5 依存的に発現し NK 細胞の活性化には、INAM, および IL15 と IL-15R α といった細胞膜表面に存在するタンパクが関与することが示された。一方で、NK 細胞、樹状細胞、B16F1 細胞を共培養する殺傷活性定量の実験系において、抗 IFN- α および抗 IFN- β 中和抗体、あるいは抗 IL-12 中和抗体を添加し、樹状細胞による NK 細胞活性化が減弱するか検討したところ、いずれの場合にも樹状細胞による NK 細胞の殺傷活性亢進の効果が減弱せず、これらの液性因子は活性亢進に関与しないことがわかった。すなわち本研究により、IRF5 は樹状細胞、マクロファージにおいてがん細胞の認識機構によって活性化を受け、細胞間相互作用を介して NK 細胞の活性化を促進することにより、がんの排除に寄与していることが明らかとなった。

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』

感染に対する自然免疫応答における IRF3 の重要性は既に示されているものの、適応免疫における役割については、詳細な解析がなされていない。その一つの理由として、IRF3 を欠損したマウスでは自然免疫応答の活性化が低下し、必然的に適応免疫応答の誘導能が低下するため、その影響を除外した検討が困難であることが挙げられる。またこれと独立した問題点として、既存の *Irf3*^{-/-}マウスは *Irf3* 遺伝子と近接する遺伝子 *Bcl2l12* の転写開始点を同時に欠失 (*Irf3*^{-/-} *Bcl2l12*^{-/-}) しており、これまでの全身性の *Irf3*^{-/-}マウスを用いた実験では、IRF3 と Bcl2L12 の機能を厳密には区別することが不可能であった。これらの事情から、Cre/loxP システムを導入し組織・細胞種特異的に *Irf3* 遺伝子のみを欠損できる IRF3 cKO マウスの作製に着手した。

サザンブロット法により、変異アリル (Flox-IRF3 と表記。 *Irf3* に関し野生型アリルを Wt とする) の導入を確認した。Flox-IRF3 マウスと CAG-Cre マウスを交配し、まず全身性に IRF3 を欠損したマウスを作成した。このマウスから、胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast; MEF) を調製し(以下 IRF3 欠損 MEF と称する)、タンパク質レベル

で IRF3 が欠失していることをイムノブロット法により確認した。また、Bcl2L12 の発現についても qRT-PCR 法にて検討したところ、IRF3 欠損 MEF において、Bcl2L12 は正常に発現していることが確認された。さらに、アポトーシス促進機能を持つ Bcl2L12 を欠損した *Irf3^{-/-}Bcl2l12^{-/-}* MEF では、野生型に比べ、紫外線照射によりアポトーシス誘導される細胞の割合に著明な減少が見られたが、IRF3 欠損 MEF では野生型 MEF と同様にアポトーシスが誘導され、Bcl2L12 は正常に機能していることが示された。また、全身性 IRF3 欠損マウスから骨髄細胞由来樹状細胞およびマクロファージを調製し、これらに細胞内核酸刺激およびウイルス感染を行い IFN- β mRNA の発現を qRT-PCR 法で定量したところ、IRF3 欠損細胞において、IFN- β mRNA 発現レベルが有意に減弱していた。よって IRF3 は核酸刺激、ウイルス感染時における I 型 IFN の mRNA 誘導に重要であることが確認された。今後、本研究において作製した変異マウスを用い、リンパ球で特異的に IRF3 を欠損した cKO マウスの作製・解析を行うことにより、IRF3 の適応免疫応答への関与について新知見が得られることが期待される。