

審査の結果の要旨

氏名 千葉 志穂

本研究の第1部においては、ウイルス感染に対する自然免疫応答において重要な役割を果たす転写因子群である Interferon regulatory factor (IRF) 転写因子群のひとつ IRF5 が、抗腫瘍自然免疫応答にいかに関与するか、その分子機構に着目した解析を試みており、以下の結果を得ている。

1. B16F1 メラノーマ細胞肺転移モデルにおいて、*Irf5* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べ著明に多数の転移コロニーが形成されることを見出した。さらに骨髄移植と当転移モデルを組み合わせた実験から、骨髄由来細胞における IRF5 の欠損によりその差が生じることを見出した。また、B16F1 メラノーマ細胞を皮下注射した際にも、*Irf5* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べ顕著な腫瘍の増大が認められた。これらの結果から、IRF5 が骨髄由来細胞において機能することががん細胞の排除に関与することが示唆された。
2. *Irf5* 遺伝子欠損マウスのナチュラルキラー (NK) 細胞の細胞傷害活性を ^{51}Cr 遊離法により定量したところ、脾細胞から精製した *Irf5* 遺伝子欠損 NK 細胞をエフェクター細胞として用いると、その細胞傷害活性は野生型と同等であった。一方 *Irf5* 遺伝子欠損脾細胞総体をエフェクター細胞として用いると、その細胞傷害活性には野生型細胞のそれに比べ著明な減弱が認められた。さらに野生型脾細胞総体をエフェクター細胞として用いた場合には、野生型 NK 細胞を精製してエフェクター細胞として用いた場合に比べ、NK 細胞 1 個あたりのがん細胞殺傷力が顕著に大きいことを見出した。これらの結果から、脾細胞を構成する NK 細胞以外の細胞が NK 細胞の細胞傷害活性を増強させるはたらきをもち、それらの細胞において IRF5 が機能することが NK

細胞によるがん細胞の効率的な殺傷に寄与することが示された。

3. 脾細胞を構成する細胞のうち CD11c⁺細胞, CD11b⁺細胞を精製し NK 細胞と B16 メラノーマ細胞の共培養に加えた場合に、NK 細胞によるがん細胞の殺傷が亢進することが見出された。一方、T 細胞および B 細胞を共培養に加えた際にはそのようながん細胞殺傷の亢進は見られなかった。これらの結果から、樹状細胞およびマクロファージが NK 細胞の細胞傷害活性を増強させることが示された。また *Irf5* 遺伝子欠損樹状細胞、マクロファージを共培養に用いた際には野生型細胞を用いた際に比べ NK 細胞の細胞傷害活性の増強効果が有意に低下することが見出されたことから、IRF5 が樹状細胞、マクロファージにおいて機能することで NK 細胞の殺傷力を亢進させていることが実際に示された。
4. 脾細胞を B16 メラノーマ細胞と共培養し、その核内画分を抽出して Immunoblot 解析することにより、がん細胞と出会った脾細胞において IRF5 の活性化の指標である核内への移行が見出された。また、*Dectin-1* 遺伝子欠損脾細胞を共培養に用いると IRF5 の核内への移行は見られなかった。このことから、生きたがん細胞を刺激として、*Dectin-1* 依存的に脾細胞において IRF5 が活性化されることが示された。
5. 野生型樹状細胞を B16 メラノーマ細胞と共培養し、トータル RNA を qRT-PCR 法で解析することにより、がん細胞と共培養された樹状細胞では、INAM, IL-15 および IL-15R α の遺伝子発現が誘導されることが見出された。また *Irf5* 遺伝子欠損樹状細胞を共培養に用いることで、この発現誘導は、INAM mRNA は IRF5 に大きく依存すること、IL-15 および IL-15R α mRNA についても誘導が部分的に IRF5 に依存する傾向が見出された。これらの結果から、がん細胞を刺激として INAM, IL-15 および IL-15R α といった細胞膜表面において NK 細胞の活性化に機能する分子の発現が亢進され、NK 細胞によるがん細胞の効率的な排除がなされていることが示された。

また、本研究第 2 部においては、IRF3 のコンディショナルノックアウトマウスの作製に着手し、以下の結果を得ている。

1. Cre-loxP システムを利用して組織・細胞種特異的に *Irf3* 遺伝子を欠失させる

仕組みを設計・構築した。Flox-IRF3 変異アレルがマウスゲノムに導入されたことを Southern blot によって確認した。また、全身で Cre リコンビナーゼを発現するマウス (CAG-Cre マウス) との交配により、マウス生体内で loxP 配列間の相同組換えが正常に行われることを Southern blot によって確認した。

2. 既存の全身性 *Irf3* 遺伝子欠損マウスでは隣接する別の遺伝子 *Bcl2l12* の同時欠損によりその発現および機能が欠失していたが、新たに作製された Flox-IRF3 変異アレルホモのマウスでは、*Bcl2l12* mRNA が発現していることが qRT-PCR 法により示された。また UV 刺激時のアポトーシス誘導の機能が Flox-IRF3 変異アレルホモのマウス胎児由来線維芽細胞 (MEF) において野生型アレルホモの場合と同等であることが確認された。よって新たな変異マウスでは *Bcl2L12* の発現および機能が正常であることが示された。
3. Flox-IRF3 変異アレルホモかつ CAG-Cre 陽性の遺伝子型をもつマウスの骨髄細胞由来樹状細胞、骨髄細胞由来マクロファージおよび MEF において、タンパク質レベルで IRF3 を欠損していることが Immunoblot により確認された。IRF3 欠損骨髄細胞由来樹状細胞、および IRF3 欠損骨髄細胞由来マクロファージでは、野生型細胞と比較し、細胞内核酸刺激した際の IFN- β , Rantes, IP-10 の mRNA 発現、および LPS 刺激あるいはリステリア菌感染時の IFN- β mRNA 発現が、それぞれ有意に低下することが qRT-PCR 法により示され、これらの遺伝子発現が IRF3 そのものに依存することが再確認された。

以上、本論文は第 1 部において、自然免疫系転写因子 IRF5 ががん細胞自体を刺激としてマクロファージ・樹状細胞において活性化され、そのシグナル経路が NK 細胞による抗腫瘍自然免疫応答に寄与するとの新たな仕組みを見出した。また、第 2 部においては *Irf3* cKO マウスの作製により、IRF3 の組織細胞種特異的な機能の解析を可能にする基盤を構築した。今後 IRF3 の未知の機能の解明に重要な貢献をなすことが期待される。よってこの研究は IRF 転写因子について、新たな側面を見出し、かつ将来の研究に繋がる業績を得たものであり、学位の授与に値するものと考えられる。