

## 論文の内容の要旨

論文題目：転写因子 IRF3 による遺伝子発現の新規制御機構とその免疫応答における役割

氏名：中島 啓

インターフェロン制御因子 (Interferone regulatory factor : IRF) ファミリーは免疫応答や発がんの調節を担う転写因子ファミリーとして近年大きな注目を浴びているが、その名の通り、抗ウイルス自然免疫応答を担うインターフェロン (IFN) 応答を惹起する転写因子として同定されたものであり、哺乳類における IRF ファミリーは、9つのメンバーから構成されている。その後の多くの研究から、免疫システムの多くの局面において必須の役割を果たしている事が明らかになっている。中でも IRF3 は多くの細胞、組織で恒常的に発現しており、ウイルス感染時の I 型 IFN 誘導に必須の転写因子であることが知られている。一方で、その他の生体防御反応における IRF3 の役割については不明な点が多い。本研究は生体防御における IRF3 の新たな役割を解明することを目的とし、IRF3 欠損マウスを中心に据えて解析を行った。

まず、IRF3 が DNA 損傷によるアポトーシスの誘導に関与するかについて解析を行った。IRF3 はウイルス感染時や DNA 損傷時の細胞のアポトーシスを増強するとの報告があるが、それぞれの報告が異なった細胞株を用いて IRF3 蛋白の過剰発現による解析を行っており、IRF3 欠損マウス由来の初代培養細胞を用いた報告はない。また、IRF3 のアポトーシス誘導における作用機序は全く不明であるのみならず、IRF3 がアポトーシス誘導能をもつ I 型 IFN などを誘導し、2 次的な作用によってアポトーシスが制御されるのか、もしくは IRF3 が直接アポトーシス経路に関わるのかも

明らかにされていない。そこで、私は IRF3 欠損マウス由来のプライマリーな細胞（マウス胎児繊維芽細胞：MEF）を用いてアポトーシス機能を解析したところ、IRF3 欠損 MEF では DNA 損傷による細胞のアポトーシス誘導が著明に減弱するが、この減弱は IRF3 欠損 MEF にレトロウイルスで IRF3 蛋白を発現しても、正常に戻らないことを発見した。そのため、IRF3 欠損マウスの作製工程を解析し直したところ、IRF3 欠損マウスでは作製当時に単離されていなかった隣接遺伝子、Bcl2L12 遺伝子が同時に欠損している事を見出した。すなわち、欠損マウスの作製時に用いた ES 細胞に於いて、相同組み換えを引き起こすために作製した遺伝子ベクターは、当時は予測しなかった Bcl2L12 遺伝子の欠損をも同時にもたらしたことが明らかとなった。Bcl2L12 は 2001 年に同定された Bcl2 ファミリー遺伝子であるが、現在までのところ、Bcl2L12 欠損マウスも作製されておらず、その機能に関しては一定の見解が得られていない。そこで Bcl2L12 及び IRF3 の機能解明のため、*Irf3*<sup>-/-</sup>*Bcl2l12*<sup>-/-</sup>MEF を用いて、様々なウイルス感染や核酸刺激による I 型 IFN 誘導、および DNA 損傷によるアポトーシス誘導の解析を行った。その結果、これまでの報告通り、ウイルス感染による I 型 IFN 誘導には IRF3 が必須であり、Bcl2L12 は関与していないことが明らかとなった。さらに DNA 損傷による細胞のアポトーシスには IRF3 ではなく Bcl2L12 が必須の役割を担っている事を新たに明らかにした。

さらに私はインターフェロン応答以外の IRF3 の役割について、特に自然免疫受容体シグナルによる適応免疫応答の誘導という視点に基づいて解析を行なった。すなわち、ウイルス感染時に活性化された IRF3 が自然免疫系活性化シグナルによる適応免疫応答の制御にどのように関わっているのかを明らかとすることを本研究の第二の課題とした。まず、私は、適応免疫応答に関わる遺伝子に着目し、ウイルス感染時に IRF3 によって制御されるものをマイクロアレイ解析により網羅的に解析した。その結果、Th1/Th17 細胞分化に重要な遺伝子である IL-12p40 が野生型と比較して IRF3 欠損細胞で顕著に増強されている事を見出した。さらに IL12p40 プロモーターには IRF ファミリー転写因子の結合配列である ISRE (IFN-stimulated response element) が存在したことから、IRF3 が IL-12p40 のプロモーターに直接結合するかをクロマチン免疫沈降法で検討したところ、ウイルス感染や RLR (RIG-I-like receptor) 刺激特異的に IRF3 が IL-12p40 プロモーターに結合する事を明らかにした。この IRF3 の結合によって、IL-12p40 の誘導に必須の転写因子 IRF5 のプロモーター

ターへの結合が阻害され、転写の抑制が引き起こされることが示唆された。さらに、このような IRF3 による IL-12p40 の抑制について、生体レベルでの重要性を明らかにするため、IRF3 欠損マウスにウイルス感染を行い、T 細胞応答を調べた結果、IRF3 欠損マウスは野生型マウスに比べ、Th1 応答が増強している事が分かった。これらの結果は RLR 刺激で活性化した IRF3 が IL-12p40 遺伝子の発現を抑制し、適応免疫応答の制御を担っている事を示唆しており、実際にウイルス感染した状態では、IRF3 依存的に Th1/Th17 応答が抑制され、その後のバクテリアによる二次感染の感受性が著明に増大することも分かった。

本研究により、IRF3 の生体防御における新しい役割が明らかとなった。すなわち、IRF3 は DNA 損傷時のアポトーシスには関与しないが、一方で、ウイルス感染時には自然免疫応答のみならず、適応免疫応答においても重要な役割を担っている事を明らかとした。一連の結果はウイルス感染による自己免疫疾患や重感染による病態増悪の分子機構の解明に新しい知見を提供し得るものと考えられる。