



Title	An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes
Author(s)	石原, 正彦
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40012">https://hdl.handle.net/11094/40012</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	いし 石 原 まさ 正 ひこ 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 9 9 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes (Tリンパ球のアポトーシスにおける転写制御因子 IRF-1 の役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 近藤 寿人  (副査) 教 授 長田 重一 教 授 辻本 賀英

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

インターフェロンシステムにおける転写制御因子として発見された interferon regulatory factor-1 (IRF-1) は, IRF-1 欠損マウスより調製した胎児線維芽細胞を用いた解析から癌抑制遺伝子として機能し, 癌抑制遺伝子 p53 と同様に癌遺伝子が活性化した際にトランスフォームするかアポトーシスを引き起こすかを決定する重要な因子であることが明らかにされた。p53 のアポトーシス制御における機能については現在までに数多く解析されており, 特に DNA 傷害により誘導される未熟 T リンパ球のアポトーシスは p53 に依存していることが知られている。しかしその一方で, p53 非依存性アポトーシスも多数存在することが示唆されている。こうした中, IRF-1 はどのような標的遺伝子の活性化を介して, そしてどのようなアポトーシスに関与しているかは明らかでない。そこで, IRF-1 のアポトーシスにおける役割を検討する目的で, IRF-1 遺伝子及び p53 遺伝子欠損マウス由来の T リンパ球のアポトーシスに対する感受性を比較することを試みた。

### 【方法ならびに成績】

IRF-1 遺伝子或いは p53 遺伝子を欠損したマウスと野生型マウスから調製した胸腺細胞及びマイトジェン刺激した脾細胞に 10Gy の  $\gamma$  線を照射して生細胞数を測定し, 生存率を算出した。通常, 未熟な T リンパ球である胸腺細胞は  $\gamma$  線処理により速やかに細胞死を起こすが, p53 遺伝子を欠損した未熟な T リンパ球はこの細胞死に対して抵抗性を示した。これに対して IRF-1 遺伝子を欠損した未熟な T リンパ球は, 野生型と同様に  $\gamma$  線処理の後に細胞死が速やかに起こった。ところが ConA でマイトジェン刺激をした後の脾細胞, 即ち活性化成熟 T リンパ球の細胞死は, 逆の結果であった。p53 遺伝子を欠損した T リンパ球は野生型の T リンパ球と同様にみられるが, IRF-1 遺伝子を欠損した T リンパ球では抵抗性を示した。この細胞死はクロマチンの凝集や核の分断化が観察されることから, アポトーシスを起こしていると判断された。しかし, IRF-1 遺伝子を欠損した活性化 T リンパ球はこうした現象が現れにくくなっていた。こうした活性化成熟 T リンパ球のアポトーシスは  $\gamma$  線処理以外にも DNA 傷害を起こす抗ガン剤 (アドリアマイシン, エトポシド) でも同様にみられた。このことから T リンパ球の DNA 傷害を介したアポトーシスには少なくとも 2 つの機構が存在し, 未熟 T リンパ球では p53 依存性の経路, 活性化 T リンパ球では IRF-1 依存性の経路が存在することが示された。

IRF-1 は転写活性化因子であることから、何らかのアポトーシス関連遺伝子の発現誘導に関与している可能性が考えられる。そこで野生型及び IRF-1 遺伝子欠損脾細胞における ConA 刺激前後、及び ConA 刺激後  $\gamma$  線処理した際のアポトーシス関連遺伝子の発現を検討した。その結果、アポトーシスの制御因子と知られている interleukin-1  $\beta$  converting enzyme (Ice) 遺伝子が IRF-1 遺伝子を欠損した脾細胞で野生型に比べ低く、ConA 刺激後の誘導も見られなかった。このことから IRF-1 は Ice 遺伝子の転写を調節していることが示唆された。

次にマウス IRF-1 とエストロゲン受容体のホルモン結合ドメインとキメラタンパクを発現する BAF/B03細胞由来の細胞株を用いて、IRF-1 と Ice 遺伝子の発現誘導との関係を検討した。この細胞はエストロゲン刺激下で IRF-1 の転写活性化能が誘導される。Northern blot 法で検討したところ、IRF-1 の活性化に伴い Ice 遺伝子の発現が短時間で上昇した。また IRF-1 の活性化に伴う Ice 遺伝子の発現はタンパク合成阻害剤サイクロヘキシミドで処理しても影響を受けなかった。これらの結果から、IRF-1 は Ice 遺伝子の転写を直接制御していることが明らかにされた。さらにこの系を用いて IRF-1 を活性化すると、活性化しないものに比べ  $\gamma$  線処理によるアポトーシスの誘導が増強されたことから、この系においても IRF-1 が DNA 傷害で誘導されるアポトーシスを制御していることが示された。以上のことから IRF-1 依存性のアポトーシスの機構では Ice 遺伝子が関与していることが推測された。

#### 【総括】

T細胞の DNA 傷害により誘導されるアポトーシスには少なくとも2種類の機構が存在し、それぞれ p53, IRF-1 と異なった癌抑制遺伝子により制御されていることが示された。更にTリンパ球活性化によりアポトーシス関連遺伝子の一つである interleukin-1  $\beta$  converting enzyme (Ice) 遺伝子が IRF-1 依存性に誘導されること、Ice 遺伝子が IRF-1 により直接誘導されていることを見出した。また、培養細胞に IRF-1 を高発現させることで Ice 遺伝子が誘導され、この状態で放射線照射を行うとより強くアポトーシスが誘導されることが観察された。これらの結果から IRF-1 依存性のアポトーシスの機構には ICE が関与することが推測された。

#### 論文審査の結果の要旨

IRF1 は、インターフェロン遺伝子の転写制御因子として同定されたものであるが、IRF1 欠損マウス由来の線維芽細胞が活性化 H-ras 単独で transform されるなどのことから、がん抑制遺伝子としての活性をもつことが示唆されていた。一方で、がん抑制には DNA 損傷によって引き起こされる apoptosis が積極的に関与していることも知られている。本研究では、IRF1 欠損マウスを用いて IRF1 の apoptosis の制御への関与が、p53 欠損マウスの場合と比較検討された。

線維芽細胞では、DNA 損傷に依存した apoptosis には p53 と IRF1 の双方の活性が必要であることが明らかにされた。しかし、T細胞系列では状況は異なっており、未熟な胸腺由来 T細胞では apoptosis は p53 依存性に誘導されるのに対して、成熟した T細胞 (ConA 刺激脾臓 T細胞) では、apoptosis が IRF1 依存的に引き起こされた。このことから、p53 と IRF1 が、組織に応じて、apoptosis に対する多彩な調節を行なっていることが明らかになった。

また、IRF1 は、apoptosis の過程で重要な役割をになっていると考えられている ICE 遺伝子の転写活性化を行なうことも示されたが、また同時に ICE 欠損マウスを用いた実験から、ICE は IRF1 が関与する apoptosis には不可欠ではないことも示された。

以上の研究結果は、DNA 損傷にはじまる apoptosis の制御に関して大きな知見をもたらしたものであり、学位に値すると考えられる。