

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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	いし 石 原 まさ 正 彦
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 12997 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、学位に値すると思われる。