

# 進藤久和 論文内容の要旨

## 主 論 文

Interferon regulatory factor-4 activates IL-2 and IL-4 promoters  
in cooperation with c-Rel

インターフェロン制御因子4はc-Relと協調してIL-2とIL-4のプロモーターを活性化する。

Shindo H, Yasui K, Yamamoto K, Honma K, Yui K, Kohno T, Ma Y, Chua KJ, Kubo Y, Aihara H, Ito T, Nagayasu T, Matsuyama T, Hayashi H  
進藤久和、安井 潔、山本一男、本間季里、由井克之、河野友子、馬 玉華、蔡 君柔、久保嘉直、相原仁、伊藤 敬、永安 武、松山俊文、林日出喜

(Cytokine、2011年 掲載予定)

長崎大学大学院医学研究科外科系専攻  
(指導教授：永安 武 教授)

## 緒 言

インターフェロンはウイルス感染防御において重要な役割を果たしており、その発現調節は主としてインターフェロン制御因子(interferon regulatory factors, IRFs)により行われている。IRF-4は、IRFファミリーに属し、その発現がリンパ球や骨髄系細胞に限られ、インターフェロン誘導とは関係のない、PMA/Ionomycin(以下P/I)といった増殖因子処理、TCR(T-cell receptor)刺激等によって誘導されるという特徴を持っている。さらにIRF-4欠損マウスを使った実験から、*in vivo*においてもT細胞やB細胞の増殖や分化の過程において重要な役割を果たしていることがわかってきた。そこで、T細胞内でIRF-4と会合する新規タンパク質を探求し、T細胞内のさらなるIRF-4の機能を解明するために、この研究を行った。

## 対象と方法

- 1) IRF-4が恒常的に発現しているHTLV-1(human adult T-cell leukemia virus type 1)感染T細胞を用いて、TAP (tandem affinity purification) 法によるタンパク質精製と質量分析を行い、T細胞内でIRF-4と会合するタンパク質の同定を試みた。
- 2) ATLL(adult T-cell leukemia/lymphoma)患者において、IRF-4および今回IRF-4と会合するタンパク質の候補として同定されたc-Relの共発現で予後が悪化するとの報告があり、実際にこれらのタンパク質が特異的に会合するかを調べた。
- 3) IRF-4はNFAT (nuclear factor of activated T-cells) c2やNFATc1と会合して、インターロイキン4 (以下IL-4)の発現を増強させることが知られている。(IL-4はヘルパーT細胞の分化

や増殖を誘導する因子である。)そこで IRF-4 の IL-4 発現誘導に対する c-Rel の影響を調べるために、IL-4 のプロモーターを用いたレポーターアッセイを行った。

4) IRF-4 はインターロイキン 2 (以下 IL-2) の発現を促すことが知られている。(IL-2 は T 細胞の増殖因子である。) IL-2 の発現に関して IRF-4 と c-Rel の相互作用を調べた。

5) IRF-4 欠損マウスを用いて、生体内での IL-2 と IL-4 の産生に対する IRF-4 の影響を調べた。

## 結 果

1) IRF-4 と会合する 14 種のタンパク質が候補として同定され、そのうちの 1 つが NF- $\kappa$ B ファミリーの c-Rel であった。

2) 免疫沈降法で、IRF-4 と c-Rel の特異的な会合を確認した。さらにそれぞれの欠失変異体では、IRF-4 の C 末端側の IRF 結合ドメインと c-Rel の N 末端側の Rel ホモロジドメインで会合がみられた。

3) P/I 刺激下で、IRF-4 に c-Rel を追加すると、IL-4 のプロモーター活性が増加していた。さらにクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法で、IL-4 のプロモーター領域に IRF-4 と c-Rel が結合していた。

4) HTLV-1 感染 T 細胞に IRF-4 や c-Rel を導入し、P/I 刺激を行うと、IRF-4 と c-Rel の共導入群で IL-2 の産生が促進された。マウスリンパ腫 EL-4 細胞に IRF-4 や c-Rel を強制発現させて、ELISA サンドイッチ法で IL-2 タンパクの発現量を測定すると、IRF-4 と c-Rel の共発現群で有意に IL-2 の発現量が増加していた。

5) 野生型マウスと IRF-4 欠損マウスの脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞を、TNF- $\alpha$  でプライミングして抗 CD3 抗体刺激下での IL-2 と IL-4 の発現量を PCR で測定した。IL-2 の発現は IRF-4 欠損マウスで有意に低下していた。一方、IL-4 の発現は野生型マウスと IRF-4 欠損マウスともに確認できなかった。

野生型マウスにおいて、さらに抗原性を増強させた CFA (complete Freund's adjuvant) でプライミングを受けたナイーブ T 細胞では、抗 CD3 抗体刺激下で IL-2 と IL-4 タンパクの産生が確認された。一方で、IRF-4 欠損マウスでは、この CFA のプライミング効果が全くみられなかった。

野生型マウスでは、IL-2 の mRNA の発現量も増加していたが、IRF-4 欠損マウスでは、c-Rel 欠損マウスでの報告と同様に、CFA によるプライミングの効果が確認できなかった。また IRF-4 欠損マウスでは IL-4 の mRNA の発現量が野生型マウスと比較して低下していた。しかし野生型と IRF-4 欠損型ともに IL-4 の発現に関しては、CFA のプライミングの効果は確認できなかった。

以上から生体内において IL-2 と IL-4 のプロモーターを最大限に活性化するには、c-Rel と同様に IRF-4 が不可欠であることが示され、IRF-4 が IL-2 と IL-4 の最適な産生量を調整していた。

## 考 察

本報告では、T 細胞内で IRF-4 と NF- $\kappa$ B ファミリーの c-Rel が会合していることを示した。IRF-4 と c-Rel の結合部位は、それぞれが細胞増殖や細胞死、免疫に関与したタンパクとの結合部位であった。

さらに IRF-4 と c-Rel が協調的に IL-2 と IL-4 のプロモーターを活性化させていることが示された。この協調のメカニズムはさらに究明が必要であるが、生体内で IRF-4 は c-Rel と同様に、IL-2 と IL-4 の最適な発現に不可欠であった。

以上から、IL-2 と IL-4 のプロモーターを最適に活性化する巨大な転写因子複合体の中に IRF-4 と c-Rel が含まれているのではないかと推察される。

ATLL 患者は、c-Rel と IRF-4 の発現上昇で病状増悪や治療抵抗がみられる。今回 IRF-4 と c-Rel の会合部位が同定されたことは、T 細胞増殖に対する特異的な阻害剤の開発に重要な情報であると考えられる。