

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月15日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009年度-2011年度

課題番号：21390089

研究課題名（和文）炎症による発癌における転写因子ファミリーIRFの役割に関する研究

研究課題名（英文）The role of IRF transcription factor family in inflammation-associated tumorigenesis

研究代表者

田村 智彦（TAMURA TOMOHIKO）

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：50285144

研究成果の概要（和文）：

近年、慢性炎症によってがんが引き起こされうること、そしてその際転写因子 NF- κ B ががんの増悪に深く関わっていることが示されている。本研究では、自然免疫刺激を含む多くの共通した刺激で NF- κ B と同時に活性化される Interferon Regulatory Factor (IRF) 転写因子ファミリーが、炎症による発がんに対して抑制的に作用することを、遺伝子欠損マウスを用いた発がんモデル系の解析により明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

A role for chronic inflammation in tumorigenesis is now generally accepted, and nuclear factor κ -B (NF- κ B) has been implicated in the cause or exacerbation of inflammation-induced cancers. The present study demonstrates that the interferon regulatory factor (IRF) transcription factor family, which can be activated simultaneously with NF- κ B by innate immune stimuli, possesses tumor-suppressing abilities in inflammation-induced cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：病態医化学

科研費の分科・細目：分子腫瘍学

キーワード：転写因子

1. 研究開始当初の背景

免疫は生体防御に必須であるが、逆に個体に不利益な応答によって自己免疫疾患やアレルギーといった疾患を生むこともある。また炎症によってむしろがんの発症が促進されうることも明らかになってきた。本研究者が十数年にわたり研究して来た Interferon Regulatory Factor (IRF) 転写因子ファミ

リー（哺乳動物では IRF 1~9 が存在）は元々 I 型インターフェロン (IFN) 系の制御因子として同定されたが、現在では IFN 系を超えて、免疫（免疫細胞の分化と応答の調節）とがん抑制（細胞増殖と生存の制御）という生体防御の二つの大きな柱において重要な役割を果たすことが示されている (Tamura et al, *Annu Rev Immunol* 2008)。例えば近年、複数

の IRF が自然免疫応答において細胞質と核を結ぶシグナル伝達分子として機能し、IFN 系のみならず他の様々なサイトカイン遺伝子の転写調節も担っている事や、様々な免疫細胞の分化や機能を調節すること、さらに IRF1・IRF8、最近では IRF5 が抗腫瘍活性を持つ事が、本研究者や他の多くの研究者によって示されて来た。また、IRF 遺伝子のヒトの腫瘍における欠失や発現異常も報告されており、がんの集学的治療の標的として IRF は大変魅力的である。

近年、慢性感染や炎症ががんを引き起こしうる事、そしてそれが Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) 経路によって担われていることが次々に明らかとされている。NF- κ B は感染防御において様々なサイトカインの転写活性化を行う重要な転写因子であるが、NF- κ B を活性化する自然免疫刺激 (病原体関連分子パターン (PAMPs)) による Toll 様受容体 (TLR) や細胞質内核酸受容体に対する刺激は同時に IRF も活性化する。IRF と NF- κ B は、感染防御においては IFN 系とサイトカインの転写誘導を行うことにおいて、欠かす事のできない二つの経路としてお互いに協調している。しかし一方、IRF と NF- κ B は細胞死の制御という観点では反対の作用を持つと思われる。一般に IRF が細胞のアポトーシス感受性を増強するのに対し NF- κ B は抗アポトーシス遺伝子群の発現誘導によって細胞死を抑制することが知られている。これらの知見から、自然免疫シグナルは二つの相反する作用のバランスによって、細胞の生死に与える影響を決定している可能性が考えられる。すなわち、免疫系の代表的な転写因子ファミリーの IRF と NF- κ B は免疫において分担・協調する一方、がんの制御に対しては逆に拮抗 (前者が抑制、後者は促進) する可能性がある。

2. 研究の目的

昆虫にも存在する NF- κ B とは異なり、IRF は脊椎動物の祖先である脊索動物において出現し、脊椎動物への進化の過程でその機能性を獲得して来たらしい。従って、IRF 系と NF- κ B 系のクロストーク (協調および拮抗) の機構の解析は、脊椎動物特異的な生体防御機構の理解のために大変重要と思われる。IRF は生体防御の二つの柱である感染防御ならびに腫瘍抑制の両方、さらには両者をつなぐ仕組みを担っていると思われる。極端なたとえではあるが、もしも脊椎動物が NF- κ B のみを持ち IRF の機能が不完全であれば、様々な感染症、たとえば風邪をひいただけでも、発がんのリスクが高まってしまうのではないだろうか。そのような根幹的な問いを本研究は包含している。

クローン病、潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患やヘリコバクター感染による胃炎にお

いては、慢性の炎症から発がんに至ることが臨床上の大きな問題である。転写因子 NF- κ B は、TNF- α をはじめとする炎症性サイトカインの誘導を担うばかりか、細胞生存・増殖をも促進的に制御することによって、それらのがん発症において主要な役割を果たす事が知られている。しかし、自然免疫シグナルの下流で NF- κ B・炎症性サイトカイン経路と同時に活性化されるものの、細胞生存や増殖については拮抗的に働く可能性のある転写因子 IRF ファミリーが、炎症による発がんにどのような役割を果たすかについてはよく判っていない。そこで IRF ファミリーの中でも抗腫瘍作用を持つ可能性が特に指摘されている IRF1 欠損マウス (IRF1 KO マウス) を用いて、慢性大腸炎による大腸がんや、ヘリコバクター感染による胃癌モデルを作成し解析を行う。

IRF はそれぞれの特異的な活性によって生体防御に多様性を付与する一方、共通の活性を併せ持つことによって、IRF 系としての普遍的な役割をも果たしている。例えば血球系細胞特異的に発現する IRF4 と IRF8 は互いに相同性が高く、B 細胞分化や樹状細胞の分化において一部機能を代償し合う。しかし自然免疫応答においては IRF8 が促進的に働く一方で IRF4 は抑制的にも働く。IRF8 に関しては抗腫瘍作用のあることが示されており、慢性骨髄性白血病患者で IRF8 の発現消失が認められ、IRF8 KO マウスは慢性骨髄性白血病様の病態を示す。慢性骨髄性白血病患者においては IRF8 同様に IRF4 の発現抑制が報告されているものの、ミエロイド系細胞の増殖や分化における IRF4 の果たす役割についてはよく判っていない。そこで、ミエロイド系細胞における IRF4 の果たす役割について、*in vitro* で検証すると共に、IRF4 KO マウス、IRF8 KO マウス、また両遺伝子の欠損マウス (DKO マウス) を用いて解析する。

本研究では、IRF という脊椎動物特異的な系による生体防御機構、特に腫瘍抑制の機構を解明し、がん病態の新たな理解と治療の確立に向けての基盤を築きたいと考えている。その中で、特に慢性感染や炎症によって引き起こされる腫瘍における、IRF 転写因子ファミリーの腫瘍抑制能について解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 自然免疫刺激がアポトーシス感受性に与える影響の検討

野生型マウスからマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を調製し、TLR を介した刺激が抗がん剤による細胞死に対して及ぼす影響を検討する。IRF によるアポトーシス感受性増強経路は通常は同時に活性化される NF- κ B による抗アポトーシス経路の作用によって顕在化しないこともあると考えられる為、super

repressor $I\kappa B\alpha$ を発現させて NF- κB 活性化を抑制した上でも検討する。

(2) AOM/DSS 投与による炎症性腸疾患および大腸がん誘発モデルにおける IRF1 の役割

自然免疫シグナルと発がんについて、IRF1 が生体内で果たしている可能性が高いと考えられるのは、炎症性腸疾患における大腸腫瘍である。そこで、よく確立されているアゾキシメタン (AOM) /デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 投与による炎症性腸疾患由来の大腸がん発がんモデルマウスを利用して解析する。AOM は DNA 塩基をアルキル化して DNA を容易に不対合し、腫瘍化を促進する発がんイニシエーターであり、DSS は腸管の上皮細胞バリアを破壊し、投与中は急性炎症、投与後は慢性炎症を惹起する発がんプロモーターとして作用する。DSS 投与開始 5 日前に野生型マウスならびに IRF1 KO マウスへ AOM を腹腔内注射した後、DSS 含有水の投与を 3 サイクル行って、大腸における腫瘍の数、大きさと性質を評価する。また、経時的に体重を測定し、便の状態および便潜血を数値化 (stool score) することによって炎症の程度を評価する。そして、DSS 投与開始から 55 日目にマウスの大腸を摘出し、組織切片を作成し病理組織像を観察する。

(3) ヘリコバクター感染による胃がん誘発モデルにおける IRF1 の役割

ヒトの胃がんでは IRF1 の機能不全を伴う点突然変異が報告されている。しかし、胃がん形成における IRF1 の役割はまだよくわかっていない。そこで、胃がん誘発能の知られているヘリコバクター株 (*Helicobacter felis*) を野生型マウスならびに IRF1 KO マウスに感染させ、IRF1 の役割を明らかにする。感染 3 か月後に組織切片を作成し、病理組織像を観察するとともに定量性 RT-PCR によりサイトカインの発現を調べる。

(4) ミエロイド系細胞の増殖と分化における IRF4 と IRF8 の役割

IRF8 欠損マウス由来のミエロイド前駆細胞株に IRF8 を発現させると増殖が停止しマクロファージに分化することをこれまでに示してきた。この系を利用して、IRF4 がミエロイド系細胞分化でどのような役割を果たしているかを明らかにするために、IRF4 を発現させ、*in vitro* における細胞増殖と分化を検討する。さらに、IRF4、IRF8 の両遺伝子欠損マウス (DKO) を作製し、野生型マウス、IRF4 KO マウス、IRF8 KO マウスと比較して、慢性骨髄性白血病の病態形成に対する影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 自然免疫刺激によるアポトーシス感受性に対する IRF1 の役割

野生型マウス由来の MEF に抗がん剤であるアドリアマイシンを加えるとアポトーシスが誘導されるが、このとき TLR4 リガンドである LPS 刺激を加えるとアポトーシスの抑制が認められた。しかし、 $I\kappa B\alpha$ 変異体 (いわゆる super repressor $I\kappa B\alpha$) を利用して NF- κB の活性を抑制すると、通常アポトーシスを抑制する LPS 刺激が逆に細胞死を促進するようになることを見出した。すなわち PAMPs による自然免疫刺激は NF- κB を介してアポトーシスを抑制するが、同時に、通常は顕在化していない細胞死促進シグナルをも伝達していることを示す結果を得た。

(2) AOM/DSS 投与による炎症性腸疾患および大腸がん誘発モデルにおける IRF1 の役割

AOM/DSS 投与した野生型マウスに比べ、IRF1 KO マウスでは stool score の回復が不完全で、体重の推移に関しても、野生型マウスでは DSS 投与中の体重減少の後回復を認める一方で、IRF1 KO マウスでは投与サイクルごとに体重回復が乏しくなった (図 1)。さらに、大腸の病理所見では、IRF1 KO マウスで

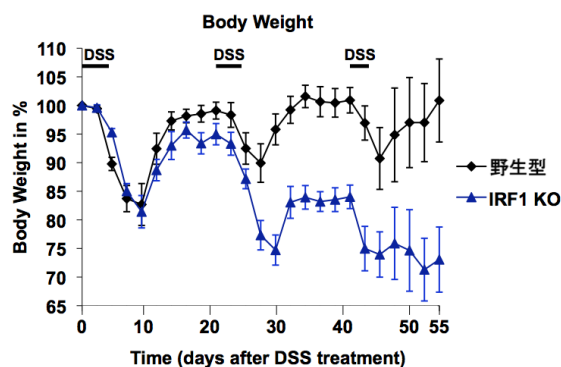


図1 AOM/DSS投与による体重変動

は野生型マウスと比較して有意に大腸が短縮しており、大腸腫瘍が大きく、腫瘍塊の数も多かった (図 2)。IRF1 KO マウスで体重が回復しないのは、腫瘍形成そのものによるものとしては早すぎることから、腸炎がより重篤であることによるものと思われる、予想に反して IRF1 がむしろ抗炎症的に働く可能性が考えられる。近年指摘されている IFN 系による抗炎症作用との関連が興味深い。これらの結果は、AOM/DSS 投与による炎症性腸疾患を経た大腸がん誘導に対して IRF1 が抑制的に働くことを示唆する。

(3) ヘリコバクター感染による胃がん誘発モデルにおける IRF1 の役割

ヘリコバクター感染 3 か月後にマウスを精査したところ、IRF1 KO マウスは野生型マ

ウスに比べ、胃腺頸粘液細胞の過形成、酸分泌性萎縮症、胃部の粘液細胞の異形成などを伴う重篤な胃癌症状を呈することが明らか

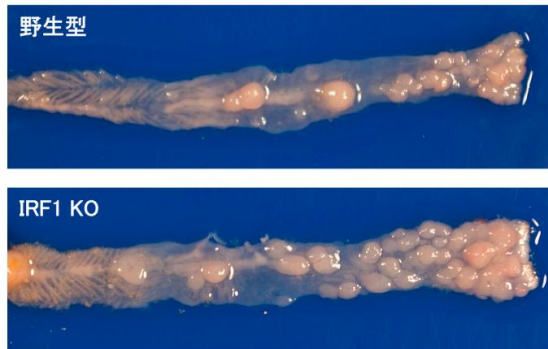


図2 AOM/DSS投与による大腸がん誘導

かとなった。また、IRF1 KO マウスは野生型マウスに比べ、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6) の発現が高かった。これらの結果は、IRF1 が炎症性腸疾患を経た大腸がんに対する抑制ばかりでなく、ヘリコバクター感染による胃癌誘発に対しても抑制的に働くことを示している。

(4) ミエロイド系細胞の増殖と分化における IRF4 と IRF8 の役割

ミエロイド前駆細胞培養株に IRF8 を導入するとマクロファージに分化し増殖を完全に停止することをこれまでに示してきたが、IRF4 を導入しても同様に、マクロファージ分化と増殖停止を導くことを明らかにした。一方好中球系の分化は、IRF8、IRF4 ともに逆に強く抑制したが、細胞増殖については、マクロファージのときと同様に強く抑制した。さらに、IRF8 KO マウスでは脾腫が認められるが、DKO マウスでは IRF8 KO マウスよりもさらに肥大した脾腫が観察された。脾臓と骨髄の細胞を精査すると、IRF8 KO マウスで認められる好中球数の増大が、DKO マウスでは IRF8 KO マウスよりもさらに増大し、早期に死亡することが明らかとなった。すなわち、DKO マウスは IRF8 KO マウスよりもさらに重篤な慢性骨髄性白血病様の病態を呈することが示された。ミエロイド前駆細胞における IRF4 の発現量が IRF8 のそれに比して低いため、IRF4 単独欠損マウスのミエロイド系細胞の異常は軽微であったが、IRF8 欠損環境下ではそのわずかな IRF4 発現が大きな意味を持つと考えられた。以上の結果は IRF4 が IRF8 と共通の活性を持ちミエロイド系細胞の増殖と分化を制御するとともに、両因子の発現消失が慢性骨髄性白血病の病態形成に深く関与していることを示すものである。

(5) まとめ

本研究では細胞レベルから生体レベルに

至るまで、炎症による発がんに着目して IRF が果たす役割を解析した。まず自然免疫シグナルがアポトーシスを抑制する一方で、促進するシグナルも伝達することを明らかにした。また、IRF1 が炎症の抑制と腫瘍形成の抑制に関わることを炎症性腸疾患由来の大腸がん形成実験、およびヘリコバクター感染による胃癌形成実験で示すことができた。さらに、IRF4 と IRF8 がミエロイド系細胞の増殖と分化において共通の制御能を持つことを示すと共に、両者の発現消失が慢性骨髄性白血病の病態形成に関与することを明らかにした。以上の結果は、IRF による腫瘍抑制を手がかりとし、がん病態の新たな理解と治療の確立に向けた基盤になると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

- ① Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Ozato K, Tamura T, Inoue K: IRF8 is a critical transcription factor for transforming microglia into a reactive phenotype. Cell Reports, 1, 334-340, 2012. 査読有
- ② Yamamoto M, Kato T, Hotta C, Nishiyama A, Kurotaki D, Yoshinari M, Takami M, Ichino M, Nakazawa M, Matsuyama T, Kamiyo R, Kitagawa S, Ozato K, Tamura T: Shared and distinct functions of the transcription factors IRF4 and IRF8 in myeloid cell development. PLoS One. 6, e25812, 2011. 査読有
- ③ Savitsky DA, Yanai H, Tamura T, Taniguchi T, Honda K: Contribution of IRF5 in B cells to the development of murine SLE-like disease through its transcriptional control of the IgG2a locus. Proc Natl Acad Sci USA 107, 10154-10159, 2010. 査読有
- ④ Savitsky D, Tamura T, Yanai H, Taniguchi T: Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. Cancer Immunol Immunother 59, 489-510, 2010. 査読有
- ⑤ 市野素英, 堀田千絵, 田村智彦: “治らない炎症”が引き起こす疾患の分子機構. 細胞工学 29, 793-798, 2010.
- ⑥ Nakajima A, Nishimura K, Nakaima Y, Oh T, Noguchi S, Taniguchi T, Tamura T: Cell type-dependent proapoptotic role of Bcl2L12 revealed by a mutation concomitant with the disruption of the

- juxtaposed Irf3 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 12448-12452, 2009. 査読有
- ⑦ Zhao B, Takami M, Yamada A, Wang X, Koga T, Hu X, Tamura T, Ozato K, Choi Y, Ivashkiv LB, Takayanagi H, Kamijo R: Interferon regulatory factor 8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. Nat. Med. 15, 1066-1071, 2009. 査読有
- ⑧ Choi MK, Wang Z, Ban T, Yanai H, Lu Y, Koshiba R, Nakaima Y, Hangai S, Savitsky D, Nakasato M, Negishi H, Takeuchi O, Honda K, Akira S, Tamura T, Taniguchi T: A selective contribution of the RIG-I-like receptor pathway to type I interferon responses activated by cytosolic DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 17870-17875, 2009. 査読有
- ⑨ Yanai H, Ban T, Wang Z, Choi MK, Kawamura T, Negishi H, Nakasato M, Lu Y, Hangai S, Koshiba R, Savitsky D, Ronfani R, Akira S, Bianchi ME, Honda K, Tamura T, Kodama T, Taniguchi T: HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic acid-mediated innate immune responses. Nature 462, 99-103, 2009. 査読有
- ⑩ Yanai H, Savitsky D, Tamura T, Taniguchi T: Regulation of the cytosolic DNA-sensing system in innate immunity; A current view. Curr. Opin. Immunol. 21, 17-22, 2009. 査読有
- [学会発表] (計15件)
- ① 加藤隆幸、山本道雄、堀田千絵、西山晃、高見正道、松山俊文、上條竜太郎、北川誠一、尾里啓子、田村智彦: 骨髄系細胞分化でのIRF8とIRF4の機能. 第89回日本生理学会大会 口演 (2012年3月31日、松本)
- ② Tamura T, Yamamoto M, Ozato N, Kurotaki D, Uno K, Nakazawa M, Nishiyama A, Ozato K: IRF8 physically interacts with C/EBP α to inhibit the generation of granulocyte-macrophage progenitors and neutrophils. 第34回日本分子生物学会年会 ワークショップ (2011年12月15日、横浜)
- ③ Watanabe T, Hotta C, Sato GR, Yamamoto M, Fujita H, Sakai R, Fujisawa S, Nishiyama A, Aihara M, Ishigatsubo Y, Tamura T: The transcription factor IRF8 rescues the dendritic cell development impaired by p210 Bcr/Abl. 第34回日本分子生物学会年会 口演 (2011年12月14日、横浜)
- ④ Kurotaki D, Ichino M, Nishiyama A, Sato G, Yamamoto M, Ozato K, Tamura T: Regulation of the development of monocyte subsets by interferon regulatory factor 8. 第40回日本免疫学会学術総会 ワークショップ (2011年11月28日、千葉)
- ⑤ Ozato K, Sarai N, Patel M, Debrosse M, Tamura T, Ura K: Interferon stimulation causes diverse changes in chromatin to regulate transcription. 9th Joint Meeting of the International Society for Interferon and Cytokine Research (ISICR) and the International Cytokine Society (ICS) 口演 (2011年10月12日、フィレンツェ、イタリア)
- ⑥ Kurotaki D, Ichino M, Nishiyama A, Sato G, Yamamoto M, Ozato K, Tamura T: Selective regulation of monocyte subsets by the transcription factor Interferon Regulatory Factor 8. 9th Joint Meeting of the International Society for Interferon and Cytokine Research (ISICR) and the International Cytokine Society (ICS) ポスター (2011年10月11日、フィレンツェ、イタリア)
- ⑦ 増田隆博, 津田誠, 吉永遼平, 齊藤秀俊, 田村智彦, 井上和秀: Interferon regulatory factor-8は、神経損傷後に見られる脊髄ミクログリアの過活動状態への移行に重要な転写因子である. 第54回日本神経化学学会大会 口演 (2011年9月28日、加賀)
- ⑧ Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Tamura T, Inoue K: IRF8 transcription factor directs microglia to be a hyperactive phenotype driving neuropathic pain. 10th Euroglia Meeting on Glial Cells in Health and Diseases ポスター (2011年9月17日、プラハ、チェコ)
- ⑨ 市野素英、堀田千絵、田村智彦: マラリアにおける樹状細胞分化の異常と転写因子IRFファミリー. 第80回日本寄生虫学会 口演 (2011年7月18日、東京)
- ⑩ 増田隆博, 津田誠, 吉永遼平, 田村智彦, 井上和秀: Interferon regulatory factor-8はミクログリア由来疼痛関連分子の発現を誘導する転写因子である. Neuro2010 (第33回日本神経科学大会、第53回日本神経化学学会大会ならびに第20回

日本神経回路学会大会) 口演 (2010年9月2日、神戸)

- ⑪ Yamamoto M, Kato T, Ichino M, Hotta C, Nakazawa M, Takami M, Matsuyama T, Kamiyo R, Kitagawa S, Ozato K, Tamura T: A shared role of transcription factors IRF4 and IRF8 in myeloid cell development. 14th International Congress of Immunology ワークショップ (2010年8月24日、神戸)
- ⑫ 増田隆博, 津田誠, 吉永遼平, 田村智彦, 井上和秀: 神経障害性疼痛における interferon regulatory factor-8の役割. 第83回日本薬理学会年会 口演 (2010年3月18日、大阪)
- ⑬ 加藤 隆幸、北川 誠一、尾里啓子、田村 智彦: A shared role of transcription factors IRF4 and IRF8 in myeloid cell development. 第32回日本分子生物学学会年会 ワークショップ (2009年12月10日、横浜)
- ⑭ 高見 正道, 趙 宝紅, 山田 篤, 王 九虎谷, 古賀 貴子, ヒュウ シアオユ, 田村智彦, オザト ケイコ, 催 容源, ライオネル イワシキフ, 高柳 広, 上條 竜太郎: Interferon regulatory factor 8 (IRF-8)による骨恒常性の調節. 第32回日本分子生物学学会年会 ワークショップ (2009年12月10日、横浜)
- ⑮ 中島 啓, 西村 啓士郎, 仲井真 優佳奈, 王 智彦, 谷口 維紹, 田村 智彦: Cell type-dependent pro-apoptotic role of Bcl2L12 revealed by a mutation concomitant with the disruption of the juxtaposed Irf3 gene. 第32回日本分子生物学学会年会 ポスター (2009年12月10日、横浜)

[その他]

ホームページ;

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~immunol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 智彦 (TAMURA TOMOHIKO)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 50285144

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

前田 慎 (MAEDA SHIN)

横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 40415956

柳井 秀元 (YANAI HIDEYUKI)
東京大学・医学研究科・助教
研究者番号: 70431765

堀田 千絵 (HOTTA CHIE)
横浜市立大学・医学研究科・助教
研究者番号: 80363810

黒滝 大翼 (KUROTAKI DAISUKE)
横浜市立大学・医学研究科・助教
研究者番号: 10568455