

徳永 隆幸 論文内容の要旨

主 論 文

ヒト肺癌におけるインターフェロン制御因子 3 の発現異常

Aberrant expression of interferon regulatory factor 3 in human lung cancer

徳永隆幸、成毛由紀、重松小百合、河野友子、安井潔、
馬玉華、蔡君柔、片山郁夫、中村卓、菱川善隆、小路武彦、
谷田部恭、永安武、藤田尚志、松山俊文、林日出喜

掲載雑誌名：

Biochemical and Biophysical Research Communications Vol.397, p202-207, 2010

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻

主任指導教員：永安 武 教授

【緒 言】

インターフェロン制御因子(interferon regulatory factor; IRF)ファミリーはインターフェロン(IFN)や IFN 応答遺伝子の発現を調整する転写因子群である。IRF3 は DNA 損傷がおこる様々な環境因子により活性化されることが知られており、IRF3 の過剰発現によって癌抑制遺伝子である p53 や p21^{WAF1} などが活性化され、細胞増殖が阻害される。さらに、正常細胞の IRF3 の機能を失活させると、癌細胞様の形質を得るという結果から、IRF3 が癌抑制遺伝子としての働きを持っている可能性が示唆されている。遺伝子変異などによる IRF3 の機能変化がヒト発癌にどのように関与しているかはこれまで不明であったが、近年、非小細胞肺癌において IRF3 の高発現が良好な予後と関連があるとする報告がなされた。

本研究では、肺癌組織における IRF3 発現の程度、細胞内局在と、臨床病理学的因子との関連を比較検討するとともに、IRF3 の遺伝子配列を決定し、機能解析を行った。

【対象と方法】

当施設で 1991 年から 1999 年までに手術を行い摘出された肺癌組織の 50 例を対象とした。腺癌 27 例、扁平上皮癌 23 例の切徐標本の病変部切片について HE 染色と IRF3 の免疫染色を行い、年齢、性別、予後等の臨床病理学的因子と比較・検討した。さらに IRF3 活性化の指標として核が染色されている症例に対して遺伝子配列異常がないかを調査した。

凍結標本から QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてゲノム DNA を抽出・精製し、

IRF3 の全領域を網羅するようにプライマーを設定し PCR を行った。PCR 生成物はダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

この解析で新たに判明した点突然変異に関して、野生型(WT-IRF3 の C-末端は S⁴²⁷ or T⁴²⁷ であり、既に多型として報告されている)と変異体とで細胞内の局在に違いがあるかを検討する目的で、HeLa 細胞に GFP-IRF3 融合タンパク質として発現させ、細胞内局在を調べた。

また、IRF3 の機能を定量的に調べるために、IRF3 の DNA-結合部位を LexA の DNA-結合部位に入れ替えた LexA-IRF3 融合タンパク質を発現するプラスミドを作成し、さらに LexA オペレーターを持つプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーター・プラスミドを作成してこれらを Human embryonic kidney (HEK) 293T 細胞に導入し、I κ B kinase ϵ (IKK ϵ)および NF κ B p65 による IRF3 の活性化に伴う核内移行の程度を、ルシフェラーゼ活性を指標として定量した。

【結 果】

肺癌組織標本の免疫染色の結果では、(1)正常組織と同様に細胞質内に染色(n = 33)、(2)核内に染色(n = 8)、(3)細胞質、核いずれにおいても染色されない(n = 9)、の 3 群に分類された。免疫染色の結果と各種臨床病理学的因子との間に有意な関連は認められなかった。

IRF3 をコードする全領域塩基配列決定の結果、扁平上皮癌においてこれまで報告のない S¹⁷⁵(AGC)→R¹⁷⁵(CGC)と A²⁰⁸(GCC)→D²⁰⁸(GAC)の変異を認めたが、これらの変異は癌周囲の正常部分でも認められ、癌細胞特異的ではなかった。

IRF3 の変異体の機能について検討するため、2 つの野生型 IRF3(WT/S⁴²⁷)、IRF3(WT/T⁴²⁷)にそれぞれ変異を導入した IRF3(R¹⁷⁵/S⁴²⁷)、IRF3(D²⁰⁸/S⁴²⁷)、IRF3(R¹⁷⁵/T⁴²⁷)、IRF3(D²⁰⁸/T⁴²⁷)を作成した。HA-tag をつけた IRF3 の変異体はウェスタン・ブロットで WT 同様 48kDa 付近に検出され、大きな分子構造の変化、安定性の変化は見られなかった。野生型、いずれの変異体も細胞質に局在することが判明した。機能的には D²⁰⁸ の変異体は野生型同様、NF- κ B p65 による核内移行(活性化)は認められたが、IKK ϵ による核内移行(活性化)が顕著に低下していた。

【考 察】

IRF3 は通常、細胞質内で発現しているため、免疫染色において核内で染色された 8 例と、細胞質・核内のいずれでも染色されなかった 9 例での IRF3 の異常発現、細胞内局在の変化は特筆すべき結果である。このような IRF3 の異常発現が肺癌に特異的であるかどうかは、さらなる症例の蓄積が必要である。

肺癌における IRF3 の発現状態の差異は、腫瘍内で IRF3 が様々に修飾されている可能性を示唆しており、この IRF3 の活性または抑制が複雑な癌の発育や進行に影響を与えている可能性もある。

今回の解析で、すでに報告されている C-末端の多型に加え、新しい 2 つの変異を発見した。R¹⁷⁵ の変異体は野生型と同様の機能活性を示し、おそらく多型であると考えられた。一方で D²⁰⁸ の変異体は IKK ϵ による核移行が、顕著に低下していた。さらにこの D²⁰⁸ 変異体は正常の IRF3 の機能を阻害するドミナント・ネガティブ変異体であることが判明し(未発表データ)、今後、細胞増殖との関連を解明したい。

IRF3 の発現異常や D²⁰⁸ 変異体は、肺癌における発癌や腫瘍増殖に関連している可能性があり、これらを引き続き検討することで病因解明の一助となることが期待される。