

## 論文の内容の要旨

論文題目 Role of NFATx (NFAT4/c3) in T cell activation and differentiation

和訳 T細胞活性化と分化におけるNFATxの役割

指導教官 新井 賢一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成11年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 陳 京涛

転写因子NFATは、T細胞におけるサイトカイン遺伝子やその他の免疫応答遺伝子の転写を担う、重要な核内因子として同定された。非刺激状態のT細胞において、NFATは通常リン酸化された状態で細胞質に認められる。T細胞抗原受容体(TCR)を介する刺激に引き続く細胞内Ca<sup>2+</sup>の増加によるカルシニューリン(CN)の活性化にともなって、NFATのN末端にあるカルシウム制御ドメインとの直接結合を介して、脱リン酸化を誘導する。NFATの脱リン酸化は分子の構造変換、あるいは他の分子との相互作用など、未知の変化を誘導することにより、NLS(nuclear localization sequence)がたんぱく質表面に露出し、それが核への輸送機構により認識され、NFATが核へ移行する。核内に移行したNFAT分子は、small G protein、Ras/MAPキナーゼカスケードに依存したシグナルを経て新たに誘導されるAP-1(Jun/Fos)と複合体を形成して、NFATとAP-1の認識配列に結合し、転写を誘導すると考えられている。一方、免疫抑制剤であるシクロスポリンA(CsA)およびタクロリムス(FK506)は、それぞれシクロフィリン(CyP)とFK506結合タンパク質(FKBP)との複合体としてCNと結合し、その活性を抑制しNFAT機能を阻害することが知られている。

転写因子NFATファミリーは、NFAT1(NFATp/c2)、NFATc(NFAT2/c1)、NFAT3(NFATc4)、NFATx(NFAT4/c3)、NFATz(NFAT5, TonEBP)の5種

類のサブタイプが知られている。NFAT5 以外のサブタイプは、すべてカルシニューリンにより制御されている。いずれも特異的な塩基配列を認識し、様々な細胞系列において発現している。T細胞では NFAT3 以外のサブタイプが発現している。NFAT1、c、x、3それぞれのサブタイプに対するノックアウトマウスが作製された。NFAT1 ノックアウトマウスでは初回抗原刺激による IL-4 産生は抑制されていたが、分化誘導後において Th2 サイトカインの上昇が観察され、この傾向は NFATx とのダブルノックアウトマウスにおいてさらに増大した。これに対して NFATc ノックアウトマウスでは抗原刺激による Th2 サイトカインの産生低下が認められた。NFAT1 /NFATc ダブルノックアウトマウスでは IL-2、IL-4、IFN- $\gamma$ などのサイトカインの産生が著しく阻害されていた。NFATx ノックアウトマウスでは、末梢 T 細胞でのサイトカインの産生は正常であった。これらの結果から、NFAT は種々のサイトカイン遺伝子の発現に重要であるが、サブタイプにはある一定の機能分担があること、重複した機能があること、制御される遺伝子によっては、抑制される場合があることなどが明らかとなった。サブタイプ間で重複した機能がある場合、より詳細な解析には loss of function だけでは不十分であり、gain of function の実験もおこなう必要がある。そこで、活性化型 NFAT のトランスジェニックマウスを作製し解析した。

## 結果と観察

NFATx は NF- $\kappa$ B と相同性のある DNA 結合領域 (Rel 相同領域) とカルシニューリンにより制御される領域を持つ。後者は、リン酸化を受けるセリン残基が豊富に存在する、セリンリッチ領域 (SRR)、3 個のセリン・プロリンリピート (SP1、SP2 および SP3) と核移行シグナル(NLS)を含む。NFATx の SRR、SP1 および SP2 を欠失させることにより、カルシウムシグナル非存在下でも高い頻度で核内に存在する活性化型 NFATx (constitutive nuclear NFAT4、cnNFATx) を作製し、細胞に特異性を持つ lck プロモーターを用いてトランスジェニックマウス (cnNFATx-tg) を作製した。cnNFATx-tg の CD4 陽性末梢 T 細胞を分離し、活性化によるサイトカイン産生や細胞表面蛋白質の誘導の変化、活性化による細胞増殖、ヘルパー T 細胞の Th1/Th2 サブセットへの分化に対する影響などを検討した。

cnNFATx-tg の CD4 陽性 T 細胞の核抽出液を調製し、NFAT 結合配列

をプローブに EMSA (electrophoretic mobility shift assay) を行った。cnNFATx-tg の T 細胞では、刺激なしで NFAT 結合活性がすでに核内に存在すること、活性化した時の活性が野生型より亢進していることが見られた。さらに、抗 NFAT 抗体で super shift assay をおこなったところ、非刺激時の核内の NFAT 活性や活性化時の増大した NFAT 活性は、ほとんど NFATx タンパク質によることが明らかとなり、cnNFATx が末梢 T 細胞で強く発現していることが確認された。NFAT と AP-1 の活性化が T 細胞増殖活性を持つサイトカイン IL-2 の産生に必要と考えられている。そこで、cnNFATx-tg マウスの末梢 CD4 陽性 T 細胞を分離し、活性化による細胞の増殖とサイトカインの産生を解析した。野生型由来の CD4 陽性 T 細胞は MAP キナーゼカスケードを介して AP-1 を活性化するフォルボールエステル (PMA) と細胞質内 Ca を増大させる Ca イオノフォアの両薬剤の処理により、はじめて IL-2 の産生と細胞増殖の誘導が見られたのに対して、cnNFATx-tg 由来の T 細胞では、PMA 処理だけで、IL-2 産生および細胞増殖が誘導された。また CsA 処理に対して抵抗性を示した。この増殖は IL-2 受容体に対する抗体で阻害されたことから、産生された IL-2 がオートクリンあるいはパラクリンに作用するためであることが示された。この解析結果より、NFATx は CD4 陽性 T 細胞で、抗原刺激による IL-2 の産生を誘導できることが示唆された。

CD4 陽性 T 細胞の活性化マーカーの発現を解析したところ、PMA 単独の刺激で CD25 と CD69 は、野生型より強い誘導が見られた。また活性化により発現が減少する CD62L は、cnNFATx-tg 由来 T 細胞では、より強い減少が見られた。すなわち NFATx は、これらの活性化マーカーの誘導あるいは減弱に正の制御因子として機能していることが示された。活性化にともない増大し、T-B 間相互作用において B 細胞の活性化に必須である CD40L は、サイトカイン遺伝子同様、NFAT により誘導されると考えられているが、cnNFATx の発現で抑制され、NFATx はむしろ負の制御因子である可能性が示唆された。

遺伝子欠損マウスの解析から、NFAT1 と NFATx がアポトーシス誘導因子 FasL (CD95) と早期増殖因子 Egr-2、Egr-3 の誘導に重要であることが報告されているが、cnNFATx-tg 由来 T 細胞では、これらの遺伝子発現に変化は見られなかった。これは、NFAT サブクラス間での機能重複ではなく、複数の NFAT サブクラスが共同で発現制御している遺伝子が存在する可能性を示唆する。

Th1 および Th2 サイトカインに対する cnNFATx の作用を解析するため、in vitro で CD4 陽性ナイーブ T 細胞を Th1 および Th2 に分化させ解析した。cnNFATx-tg mouse とニワトリ卵白アルブミン特異的 TCR トランスジェニックマウス (OVA-tg) を交配し、cnNFATx +/- TCR +/- mouse をを用いた。CD4<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup> のナイーブ T 細胞を in vitro で Th1 あるいは Th2 に分化させ、産生するサイトカインの量を解析した。cnNFATx-tg 由来 Th1 においては IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  が強く誘導された。PMA 単独の刺激でも誘導された。Th2 サイトカイン IL-4, IL-5, IL-10 および IL-13 は、野生型に比べ逆に減少した。NFATx が Th1 への分化誘導を促進する活性を持つという可能性が考えられるが、Th1、Th2 それぞれの分化においてマスターレギュレーターとして機能すると考えられる T-bet および GATA-3 の発現を野生型と cnNFATx-tg で比較したところ、差が認められなかった。これは NFATx が個々のサイトカイン遺伝子に対して直接作用し、Th1 サイトカイン遺伝子には正の、Th2 サイトカイン遺伝子には負の制御因子として機能することを示唆する。これらのサイトカインに対する作用が胸線でのセレクションにより特殊な細胞が選択された可能性もレトロウイルスの実験から否定された。

NFAT は、活性化により誘導されるサイトカイン遺伝子群やその他の免疫制御遺伝子に対して、正の制御因子として機能すると考えられてきたが、NFATx は、標的遺伝子によっては負の制御因子として機能することが明らかとなった。レポーターアッセイなどによる転写活性の解析では、転写抑制活性は認められておらず、その分子機序の解明が重要である。また他のサブタイプでも同様の解析をおこない、遺伝子欠損による解析と合わせて、免疫細胞活性化における各 NFAT サブタイプの特異的機能や NFAT サブタイプが形成するネットワークとしての機能の全貌を明らかにする必要がある。