

[ 別紙 2 ]

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 陳 京 涛

本研究は、免疫応答に重要な役割を果たすと考えられている、転写因子 NFATx の末梢 T 細胞での細胞増殖や遺伝子発現に対する作用を、詳細に解明するため、活性化型 NFATx 変異体を用いたトランスジェニックマウスを作成し、解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. RT-PCR と gel shift 法による解析で、トランスジェニックマウス由来の末梢 T 細胞において、活性化型 NFATx は恒常的に核内に存在し、PMA 単独刺激により、AP-1/NFATx 複合体を形成することを確認し、トランスジェニックマウスでは、第一に活性化型の NFATx が発現していること、第二に NFATx が過剰に存在していることを示した。

2. CD4 陽性ナイーブ T 細胞における、活性化刺激による細胞増殖やサイトカイン産生に対する NFATx の機能を解析した結果、活性化型 NFATx は T 細胞に対する増殖促進効果があり、これは活性化型 NFATx が AP-1 と共同して T 細胞増殖活性を持つサイトカイン IL-2 の誘導と、IL-2 受容体  $\alpha$  鎖の誘導をおこなうためであることを示した。

3. NFATx の T 細胞表面分子の誘導に対する作用を、FACS で解析した結果、活性化型 NFATx は CD69 を増大させ、CD62L、CD40L を抑制し、CTLA4 (CD152) と FasL (CD95L)、には影響を与えないことを示した。NFAT1/NFATx ダブルノックアウトマウスの解析から、FasL の誘導は、NFAT1 または NFATx が、転写因子 Egr2 および Egr3 の誘導を介して引き起こすと考えられるが、NFATx トランスジェンによる Egr2/3 の誘導が見られなかったことから、FasL の発現の制御は、NFAT1 または NFATx と他の分子が共同して誘導する可能性が示唆された。

4. 活性化型 NFATx が、ヘルパー T 細胞サブセットの分化およびヘルパー T 細胞特異的サイトカインの産生に対して、どのような作用を持つか解析するため、in vitro でヘルパー T 細胞サブセットを分化させる実験系を用いて解析した。

Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  が強く誘導され、活性型 NFATx がこれらのサイトカイン遺伝子の転写に正の制御因子として機能することを示した。Th2 サイトカイン IL-4、IL-5、IL-10 および IL-13 は抑制され、NFATx が Th2 サイトカインに対して負の制御因子として働くことが示唆された。しかし、ヘルパーT 細胞サブセット分化のマスターレギュレーターとして機能する転写因子、GATA3 および T-bet の発現には影響しなかったことから、NFATx はヘルパーT 細胞サブセットの分化過程に作用するのではなく、それぞれのサイトカイン遺伝子の発現に直接作用する可能性が示唆された。

5. 胸腺での CD4、CD8 発現パターンの解析から、活性型 NFATx が胸腺での positive selection に促進的な影響を与える可能性を示した。レトロウイルスベクターを用いて、CD4 陽性ナイーブ T 細胞に活性化型 NFATx を導入し、ヘルパーT 細胞サブセット分化を誘導したところ、Th1 /Th2 サイトカイン産生に対する影響は、トランスジェニックマウス由来の T 細胞の結果と一致し、トランスジェニックマウスの末梢 T 細胞の表現型は、胸腺での selection に対する影響の結果ではないことが確認された。

以上、本研究は、活性型 NFATx の T 細胞が発現するサイトカインと T 細胞表面分子の発現に対する特異的な機能を明らかにした。NFAT ファミリーの各サブタイプは、特異的な機能と重複した機能があると考えられ、詳細な解析が難しい。すでに報告された各 NFAT サブタイプノックアウトマウスの表現型の解析と合わせて考えると、NFATx の作用が、NFAT1 と重複する部分と、NFAT ファミリーにおいて特異的な部分とに区別されることが示され、このような gain of function のアプローチによる解析の有効性が示された。本研究は、転写因子 NFATx の、T 細胞の活性化と分化に対する詳細な機能を明らかにし、NFAT ファミリーに属する各サブタイプが形成するネットワークの解明に重要な貢献をしたと考えられ、学位の授与に値する。