

論文内容の要旨

Molecular Mechanism of Th2 Cell Development (Th2 細胞分化の分子生物学的機序の解明)

倉田寛一

ナイーブ・ヘルパーT (Th) 細胞は抗原刺激後、抗原、副刺激、抗原提示細胞の種類や共存するサイトカインにより異なる機能をもつエフェクター・ヘルパーT 細胞に分化する。すなわち、IFN- γ や TNF- β を産生し細胞性免疫や遅延型過敏症に関与する Th1 細胞と IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 などを産生し寄生虫免疫やアトピー型アレルギー反応に関与する Th2 細胞である。IL-12 と IL-4 はそれぞれ Th1 細胞と Th2 細胞の分化に必須のサイトカインであり、IL-12, IL-12 受容体、または Stat4 遺伝子欠損マウスでは Th1 細胞分化が減少し、他方、IL-4, IL-4 受容体、または Stat6 遺伝子欠損マウスでは Th2 細胞分化が減少する。本研究では、Th2 細胞分化および Th2 型免疫応答の分子生物学的機序を解明すべく遺伝子組み換えレトロウイルスおよびアデノウイルスを用いて Th 細胞分化機序の解析を行った。

(I) 活性誘導型 Stat6 導入による Th2 細胞分化機序の解析

IL-4 により活性化される Stat6 は Th2 細胞分化に必須のシグナル分子である。組み換えレトロウイルスを用いて活性誘導型 Stat6 すなわち Stat6 : エストロゲン受容体キメラ分子 (Stat6:ER) を DO11.10 T 細胞受容体トランスジェニック・マウス由来ナイーブ Th 細胞に導入した。エストロゲン誘導体 4-hydroxytamoxifen (4-HT) の添加によりキメラ分子は核内に移行し Stat6 が活性化される。遺伝子導入 Th 細胞を抗原(卵白アルブミン)刺激し Th1 誘導条件(IL-12, 抗 IL-4 抗体)下で2週間培養したところ95%以上の細胞が Th1 細胞 (IFN- γ +, IL-4 -, IL-5 -) に分化したが、4-HT を添加すると約半数の細胞に Th2 形質 (IL-4 +, IL-5+) が誘導された。DNA 結合領域をアミノ酸置換または欠損、および transactivation (TAD) ドメインを欠損した変異 Stat6:ER によっては Th2 形質誘導が認められないことから Th2 形質誘導は Stat6 特異的な作用と考えられた。また、IL-4 遺伝子欠損 Th 細胞においても Th2 形質が誘導されることから IL-4 分泌を介さない細胞内シグナルによる Stat6 の直接効果と考えられた。2週間培養した Th1 細

胞では IL-12 受容体β2 鎖 mRNA が高発現するが、Stat6:ER 活性化により IL-12 受容体β2 鎖 mRNA 発現は抑制され、一方、Th2 細胞特異的転写因子である GATA-3 と c-Maf mRNA が発現誘導された。これらの結果は Stat6 が抗原刺激したナイーブ Th 細胞を Th2 細胞に分化させるのに必要・十分なシグナルを惹起し、下流標的分子として GATA-3 と c-Maf の発現を誘導することを明示した。

(II) GATA-3 による Th2 細胞分化誘導の機序の解析

GATA-3 による Th2 細胞分化の分子生物学的機序を解析するため、レトロウイルスにより変異 GATA-3 をナイーブ Th 細胞に導入し Th1 誘導条件下で培養して Th2 細胞形質誘導を検討した。C 末端側 zinc finger ドメイン(Cf) または TAD を欠損した GATA-3 は Th2 形質誘導能を完全に欠失したのに対し、N 末端側 zinc finger ドメイン(Nf) 欠損 GATA-3 では IL-4 発現誘導と IFN-γ 発現抑制は部分的に欠失し IL-5 発現誘導は完全に消失した。Nf による Th2 細胞分化誘導機序を解析するためナイーブ Th 細胞より分化 Th2 細胞に至る様々な分化段階の Th2 細胞より cDNA ライブラリーを作成し、yeast two-hybrid screening 法により GATA-3 Nf 結合分子を検索し、Friend of GATA (FOG)を同定した。定量的 RT-PCR(Taqman)法により FOG は脾臓・リンパ節・胸腺などリンパ組織にも発現され、in vitro 分化 T 細胞の検討よりナイーブ Th 細胞に高発現され、Th1/Th2 細胞分化に伴い発現が低下することが分かった。ルシフェラーゼ・レポーター・アッセイでは、FOG は GATA-3 による IL-5, IL-4, IFN-γ などのプロモーター活性化を抑制した。FOG による抑制は Nf を欠失・変異した GATA-3 では認められないことから GATA-3 結合依存的であった。レトロウイルスにより FOG をナイーブ Th 細胞に導入し Th2 細胞誘導条件下で培養すると IL-4 や IL-5 の産生が抑制され IFN-γ の発現が誘導されるなど Th2 細胞分化が抑制された。変異 FOG の導入実験は、既知の C-terminal binding protein 結合部位(PIDLS motif)ではなく FOG の N 末端領域が GATA-3 による Th2 細胞分化誘導の抑制に必須であることを明示した。

(III) 組み換えアデノウイルスによる Th2 サイトカインの生物学的効果の解析

E1 欠損アデノウイルスの in vitro 感染実験から、細胞感染性がピトロネクチン受容体とよく相関し、付着型細胞には高率で感染するが、リンパ球系細胞への感染性は低いことを示した。さらに in vivo マウス感染実験から、経静脈投与が高率に肝・脾にレポーター遺伝子を発現させるが一過性(数日間)であること、野生型ウイルスよりも軽度ではあるが肝に炎症性細胞浸潤を惹起することを示した。IL-4 および IL-13 発現ウイルスを投与したマウスは顕著な急性毒性症状を呈し、マクロファージの増殖・浸潤、さらに IL-13 では脾・骨髄の造血亢進を伴った。

(結論)

組み換えウイルスベクターによる in vitro および in vivo 実験により Th2 型免疫応答の機序を検討し、Th2 細胞分化における Stat6, GATA-3, FOG の役割を解明すると同時に、アデノウイルスベクターによる Th2 サイトカイン高発現の生体内効果・毒性を検討した。