

が、分化に必須の TCR からのシグナルのみで Th1、Th2 分化自体を直接調節しうるかに関しては未だに明らかではない。そこで私は CD4⁺ T 細胞の活性化に不可欠な最初のシグナルである TCR からのシグナルも重要な役割を持つと考え、TCR シグナルのみで Th1、Th2 分化を調節しうるかを明らかにする事を目的としサイトカインや副刺激分子の影響を除外した実験系を用いた。

ペプチド 25 (P25) は、強い免疫原性を有する結核菌分泌蛋白 Ag85B の 240-254 番目の 15 個のアミノ酸からなるペプチドでヘルパーエпитープとして同定された。これまでの *in vivo* 解析の結果、C57BL/6 を P25 で免疫すると Th1 分化のみ誘導され、その Th1 細胞の多くが P25 反応性 Vβ11 陽性 T 細胞であった。この事から P25 が TCR を介して Th1 分化を誘導している可能性が示唆された。

P25 を介した TCR 刺激による Th1、Th2 分化機構を解析するためには *in vitro* で CD4⁺T 細胞を P25 で活性化する必要がある。そのために P25 TCR トランスジェニックマウス (Tg) を作成し、P25 による Th1 分化誘導を *in vitro* 実験系で解析した。さらに、Th1、Th2 特異的サイトカインのクロマチンリモデリングを誘導し分化を最終的に調節している転写因子 T-bet、GATA-3 の発現調節における TCR の役割を検討した。

【方法と結果】

(1) TCR 刺激による Th1、Th2 分化誘導の検討

P25 TCR-Tg 脾臓由来 CD4⁺ T 細胞を C57BL/6 脾臓由来抗原提示細胞 (APC) と共に P25 刺激した場合、*in vivo* と同様に Th1 細胞への分化が誘導された。そこへ Th2 分化誘導サイトカインである IL-4 を添加すると Th2 細胞へ分化し、さらに P25 の TCR 結合部位の 1 アミノ酸を変異させ、TCR に対する親和性を低下させた変異ペプチド (APL) や低濃度の P25 刺激でも Th2 細胞へ分化した。

次に TCR シグナルのみで Th1、Th2 へ分化させられるか検討するため Th1、Th2 分化を調節するサイトカインや APC に発現する副刺激分子の影響を除外する事とした。APC としてサイトカイン産生や既知の副刺激分子の発現がない Chinese Hamster Ovary 細胞に I-A^b 分子を遺伝子導入した細胞 (I-A^bCHO) を用い、TCR からのみシグナルが伝達される系で解析したところ、脾臓 APC を用いた場合と同様に高濃度 P25 では Th1 分化が、APL 及び低濃度 P25 刺激では Th2 分化が誘導された。さらに IFN-γ、IL-12 中和抗体を加えても同様の結果が得られた。

以上より、TCR シグナルのみで Th1、Th2 への分化誘導が可能である事が明らかになった。

加えて Th1、Th2 分化を最終的に調節している転写因子である T-bet、GATA-3 の TCR 刺激後の発現変化を real-time PCR 法で経時的に解析した。P25 で刺激した場合、T-bet は刺激前にはほとんど発現がないが、刺激 3 時間後に一過性の上昇を認め、GATA-3 は刺激前に高発現であるが時間経過とともに減少した。一方 APL

で刺激した場合、T-bet、GATA-3 とも発現変化はほとんど見られなかったことから、TCR シグナルのみで Th1、Th2 分化を調節すると考えられている転写因子も調節可能である事が明らかになった。

(2) Th1 分化における T-bet の機能解析

これまでの結果より TCR シグナルによる Th1 分化には刺激 3 時間後の T-bet の一過性上昇が重要と考えた。そこで、T-bet を欠損させた P25 TCR-Tg (T-bet KO P25 TCR-Tg) を作成し、T-bet の影響を除外するとどうなるか検討した。

P25 刺激では、野生型より Th2 分化に傾くものの 3 割程度は Th1 細胞に分化した。また、T-bet が誘導するといわれている IFN- γ 遺伝子座のクロマチンリモデリングに関してクロマチン免疫沈降法により検討したところ、野生型より弱い T-bet KO においてもクロマチンリモデリングが誘導されている事が判明した。また T-bet が誘導するといわれている IL-12R β 2 発現に関しても real-time PCR 法及び細胞表面染色で検討したところ、野生型より少ないが発現上昇を認めた。

以上より、TCR による T-bet に依存しない Th1 分化経路が存在し、T-bet と同様の作用を持つ何らかの因子が関与する可能性が示唆された。

【考察】

本研究において、私は TCR シグナルによる Th1、Th2 細胞への分化誘導機序について検討した。その結果、Th1、Th2 分化ともに TCR 単独刺激で可能であり、これまで Th1 分化に必須と考えられていた T-bet とは異なる因子による Th1 分化誘導機構が存在する可能性を明らかにした。

Th1、Th2 細胞への分化はあらゆる免疫反応において重要であり、特にどちらのサブセットに分化するかは、病原体や異物排除の意味でも重要である。CD4⁺ T 細胞の分化には TCR 以外の多くの因子が影響するといわれているが、どれがどのタイミングで分化を決定づけるか、具体的には明らかになっていない。

私は、最初の活性化シグナル、つまり、TCR と APC 上の主要組織適合性複合体 (MHC) に提示された抗原との結合が分化を最初に決定するのではないかと考えた。これまでに結合親和性の強さにより分化が影響を受ける事は他の TCR-Tg マウスを用いた報告があり、高濃度又は親和性の高いペプチドは Th1 分化を、低濃度又は親和性の低いペプチドは Th2 分化を誘導しやすいといわれている。今回用いた APL は P25 の TCR 結合部位の 1 アミノ酸を変異させて結合親和性を約 1/30 まで低下させている。そのため、P25 では Th1 分化が誘導されるのに対し、同量の APL や低濃度の P25 では Th2 分化が誘導された。さらに、TCR とともにシグナルが伝達され、分化に重要とされる副刺激分子やサイトカインの影響を除くために APC として I-A^bCHO を用い

た実験系を確立した。この実験系はTh1、Th2分化誘導におけるTCRの役割を直接的に解析できる実験系である。この実験系においてもP25 TCR-TgCD4⁺ T細胞はTh1、Th2両方の分化が認められた。

また私はTCRシグナル下流にありTh1、Th2特異的サイトカインを誘導し分化を最終的に調節する転写因子T-bet、GATA-3にも注目した。TCRシグナルが分化に重要と考え、発現の経時的変化を検討したところ、Th1分化にはT-betの刺激3時間後の一過性上昇とGATA-3の減少、Th2分化にはGATA-3の発現量維持が特徴的である事が明らかになった。この事から、TCRはT-bet、GATA-3の発現を調節し、Th1、Th2分化を規定するTh1、Th2それぞれに特異的な活性化シグナルを伝達していることが示唆された。一方でT-bet KO P25 TCR-Tgの解析により、T-bet非依存的にTh1への分化誘導機構が存在する事も判明し、その際にT-betが誘導すると考えられてきたIL-12Rβ2発現、IFN-γ遺伝子座のクロマチンリモデリングも起きている事が明らかになった。つまり、T-bet非依存性のTh1分化経路が存在し、その際にはT-betと同様の作用を持つ何らかの因子が関与している事が示唆された。

Th1、Th2バランスの崩れや分化異常が多く自己免疫疾患やアレルギー疾患、悪性疾患に関与しているといわれている。Th1、Th2バランスをコントロールできればこれらの疾患を克服する一端となりうるが関係する因子があまりに多く、研究が進んでいないのが現状である。本研究でTCR刺激のみ伝達される実験系が確立され、それにより、TCRによるTh1、Th2分化誘導機序や転写因子の発現調節におけるTCRの重要性が明らかになった。今後この実験系を用いる事で各疾患の病態把握や原因究明、さらには治療戦略の開発につながる可能性がある。T-bet非依存経路におけるTh1分化誘導に関与する因子の探索が今後の課題である。