

## 免疫細胞の機能分化に関わる遺伝子並びに遺伝子産物の解析 1

(財) 千葉県産業振興センター (非常勤研究補助員) 細川裕之、桑原誠、三木多香子  
(主任研究員) 古閑比佐志  
(研究開発指導者: 千葉大学大学院 医学研究院 免疫発生学 教授 中山俊憲)

### 【目的と概要】

CD4 陽性ヘルパーT (Th) 細胞は、産生するサイトカインの違いによって二つのサブセットに分類することができる。Th1 細胞は主に IFN $\cdot$  を産生し、Th2 細胞は IL-4、IL-5、IL-13 を産生する。Th1 細胞は細胞性免疫を誘導し、細胞内寄生細菌の排除に重要であるのに対し、Th2 細胞は液性免疫を誘導して細胞外寄生細菌などの免疫応答を担うことがわかっている。Th1 細胞と Th2 細胞は互いにバランスを取りながら生体防御機構における中心的な役割を演じていると考えられている。しかし一方では、感染症や自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫関連疾患において、Th1/Th2 バランスの偏りが認められており、それがこれらの疾患の発症や病態形成に大きく関わっていることが推測されている。このことから、Th1/Th2 バランスを制御する事は、様々な疾患の新たな治療戦略の開発につながると考えられる。私たちはこれまで、いくつかの転写因子に注目し Th2 細胞の分化誘導機構について解析を行ってきた。本研究ではその経験を生かして、Th1 細胞、Th2 細胞分化を制御する分子をレトロウイルスによる遺伝子導入系を用いて効率的に探索し、機能解析を行うとともに応用研究に役立てる事を目的とした。

### 【研究成果の概要と今後の取り組み】

#### (1) レトロウイルスによるマウス CD4T 細胞への遺伝子導入システムの確立

2系統のマウス (C57BL/6、Balb/c) を用いて、脾臓 CD4T 細胞へのレトロウイルスを用いた遺伝子導入システムの確立を行った。導入する遺伝子には GFP を用いて、その蛍光を指標に簡便に感染効率を解析出来るようにした。レトロウイルスは増殖期の細胞に感染する事から、はじめに固層化抗 CD3 抗体で刺激をした後、レトロウイルスの感染を行った。刺激と同時にレトロウイルスを感染させた場合と比べて、活発に増殖している刺激後 2 日目の感染が約 50% ともっとも効率が良かった。刺激時に抗 CD28 抗体や IL-2 を添加する事で約 70% とさらに高い感染効率が得られた。この高い感染効率はマウスの系統に関係なく認められた。

一方、導入する遺伝子のサイズが大きい場合、感染効率の著しい低下が認められた。この感染効率の低下は刺激やサイトカインの条件に関わらず認められた。

今後、長鎖 cDNA クローンを効率よく導入する方法を検討する必要がある。将来、ヒト CD4T 細胞への遺伝子導入を目指す事もあわせて考え、非増殖細胞やヒト由来の細胞にも効率よく感染する、レンチウイルスを用いた遺伝子導入システムを確立する予定である。

#### (2) マウス長鎖 cDNA の遺伝子導入による Th1 細胞、Th2 細胞分化への影響

Th1 または Th2 細胞分化条件下で刺激した CD4T 細胞に、刺激から 2 日後に長鎖 cDNA を遺伝子導入した。さらに 3 日後、モネイシン存在下で再刺激によって誘導される IL-4 および IFN $\cdot$  の産生を細胞内染色法により検出し、マウス長鎖 cDNA クローンの Th1/Th2 細胞分化に与える影響を検討した。導入遺伝子として、我々が興味をもっている Zinc Finger を持った転写因子をマウス長鎖 cDNA クローンの中から 2 つ選んだ。ポジティブコントロールとして Th2 細胞分化のマスター遺伝子と考えられている GATA3 を導入した。空ベクター導入細胞に対して、Th1 条件下で GATA3 を遺伝子導入した細胞では、Th2 細胞の誘導、すなわち IFN $\cdot$  の産生抑制および IL-4 の産生が認められた。これに対して、今回導入した 2 つの遺伝子は、IFN $\cdot$  や IL-4 の産生に影響を与えなかった。

今後、マウス長鎖 cDNA クローンの Th1/Th2 細胞分化に与える影響を数多く調べるため、レトロウイルスベクタープラスミドの構築、レトロウイルスの作製、ウイルス感染細胞の解析などを素早く、効率よく検討出来るシステムの開発が必要であると考えられる。Th1/Th2 細胞分化に影響を与える分子が見つかった場合、その分子機構を解析するためにいくつかの実験系 (ELISA 法、RT-PCR 法、ウエスタンブロット法、ク

ロマチン免疫沈降法、マウス喘息モデルなど)はすでに確立済みである。