

## 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 2

千葉大学大学院 医学研究院 免疫発生学 教授 (共同研究員) 中山俊憲

### [目的と概要]

生体内に侵入したアレルゲン (抗原) は、抗原提示細胞によりナイーブヘルパーT (Th) 細胞に提示される。抗原を認識した Th 細胞は活性化し、サイトカインなどの影響を受けながら Th1 細胞、または Th2 細胞へ分化する。通常、生体内で保たれている Th1/Th2 バランスが何らかの原因によって崩れ、Th2 細胞優位になるとアレルギーが誘発される。Th2 細胞から産生される IL-4 は B 細胞のクラススイッチを引き起こし、アレルゲンに対する IgE 抗体の産生を誘導する。大量に産生された IgE 抗体は、肥満細胞上の高親和性 IgE 受容体 (Fc $\cdot$ RI) に結合する。そこに再び抗原が侵入すると肥満細胞上の Fc $\cdot$ RI が架橋され、ヒスタミンやロイコトリエンなどのケミカルメディエーターが放出される。これらのケミカルメディエーターは血管透過性の亢進や気道の収縮、知覚神経刺激などを引き起こし、I 型アレルギーの症状を呈することになる。また、Th2 細胞の産生する IL-5 は好酸球の生存を促進し、喘息などの気管支炎症に重篤な症状を及ぼすと考えられる。つまり Th2 細胞は、これらの I 型アレルギー反応の根源に位置する細胞と捉えることができる。このことから、アレルゲンに対する Th2 細胞の分化や機能を抑制することは、アレルギーの根治療法の確立に繋がると考えられている。しかし、ヒト Th 細胞の機能変化を正確かつ簡便に評価する方法が開発されていなかった。そこで、本研究ではヒト末梢血単核球からナイーブ Th 細胞を精製し、*in vitro* において遺伝子導入または薬剤の添加を行い Th1/Th2 細胞を分化させた後、細胞内染色法により Th1/Th2 細胞分化パターンの変化を、さらに DNA マイクロアレイにより特異的な遺伝子発現パターンの変化を検討することで導入遺伝子や薬剤の機能を評価するシステムの開発を目指した。

### [研究成果の概要と今後の取り組み]

#### (1) ヒト末梢血からのナイーブ CD4T 細胞の精製

ヒト末梢血中のリンパ球画分には約 50% の Th 細胞が含まれている。しかしこの中には、これまでに抗原に出会い機能分化を完了したメモリー Th 細胞が含まれている。メモリー Th 細胞の混入を防ぐために、ナイーブ T 細胞のマーカーである CD45RA を指標に、CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> のナイーブ Th 細胞を AutoMACS により精製した。

#### (2) Th1/Th2 細胞分化誘導系の確立

ナイーブ Th 細胞を、Th1 条件下では IL-2、IL-12、抗 IL-4 抗体を、Th2 条件下では IL-2、IL-4、抗 IFN $\gamma$  抗体を加え、固層化抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で 2 日間刺激した。刺激開始から一週間後、Th2 条件下で刺激を行った細胞からの IL-4 の産生は認められなかった。そこで、再び固層化抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で刺激を行い、さらに一週間 Th1、Th2 条件下で培養を続けた。その後、抗 IL-4 抗体および抗 IFN $\cdot$  抗体を用いた細胞内染色を行った結果、Th1 条件下では、IFN $\cdot$  を産生する Th1 細胞が、Th2 条件下では IL-4 を産生する Th2 細胞が効率よく誘導されていた。これらの細胞を再刺激後、産生されたサイトカインを ELISA 法で解析した結果、Th2 条件下で刺激した細胞からは、IL-4 だけでなく、IL-5、IL-13 の産生も認められた。このことから、一週間ごとに 2 回刺激を繰り返す事で、効率よく Th1、Th2 細胞分化を誘導出来る事がわかった。数名のサンプルを用いて解析を行った結果、Th1、Th2 細胞分化のレベルには個人差が認められた。このことは、遺伝的な背景の違いが影響していると考えられ、今後、アレルギーなどの疾患との関連を検討する事は非常に興味深い。この Th1/Th2 細胞分化誘導系に薬剤の添加やレンチウイルスによる遺伝子導入を行うことで、簡便に薬剤や導入遺伝子の Th1/Th2 細胞分化に与える影響を検討出来ると考えられる。

#### (3) ヒト Th1/Th2 細胞における特異的な遺伝子発現パターンの変化

薬剤や導入遺伝子の作用メカニズムを解析する方法の一つとして、ナイーブ Th/Th1/Th2 細胞において特異的に発現している遺伝子の発現パターンを cDNA マイクロアレイを用いて検討した。得られたナイーブ Th 細胞、Th1 細胞あるいは Th2 細胞での mRNA レベルの発現強度を解析したところ、Th1 細胞での発現強度に比較して Th2 細胞で 40 倍以上高い発現強度が認められた遺伝子が 34 種、100 倍以上高い発現強度

が認められた遺伝子が2種見出された。Th2細胞での発現強度に比較してTh1細胞で50倍以上高い発現強度が認められた遺伝子が47種、100倍以上高い発現強度が認められた遺伝子が9種見出された。

発現量が比較的高いTh2特異的発現遺伝子として、Th1/Th2の比率が0.025以下(40倍の差がある)、ナイーブTh/Th2の比率が約0.1以下(10倍の差)、かつTh2rawに示される蛍光強度が100以上として絞り込み6遺伝子を選択した。次に、発現量が比較的高いTh2特異的発現KIAA遺伝子として、Th1/Th2の比率が0.1以下(10倍の差がある)、ナイーブTh/Th2の比率が約0.14以下(約7倍の差)、かつTh2rawに示される蛍光強度が100以上として絞り込み4遺伝子を選択した。更に、発現量が比較的高いTh1特異的発現遺伝子として、Th1/Th2の比率が50以上(50倍の差がある)、ナイーブTh/Th1の比率が0.25以下(4倍の差がある)かつTh1rawに示される蛍光強度が100以上として絞り込み2遺伝子を選択した。

今後、薬剤や遺伝子の導入によって変化する遺伝子発現パターンを解析する事で、その作用メカニズムを解析する手がかりになるものと考えられる。

#### 【特許】

##### 1. ヒトTh1/Th2分化誘導系及びその用途

特願：2006-93086 (2006年3月30日)

出願人：千葉大学、かずさDNA研究所