

## 学位論文題名

Identification of Th1- and Th2-specific genes  
by microarray analysis

(マイクロアレイ解析による Th1, Th2 特異的遺伝子の同定)

## 学位論文内容の要旨

CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞(Th)は、特異的なサイトカインを産生するTh1、Th2細胞に分化して、免疫調節において非常に重要な役割を演ずる。Th1細胞はIL-2、IFN- $\gamma$ 、Lymphotoxinを産生して、細胞性免疫を調節する。一方、Th2細胞はIL-4、IL-5、IL-6、IL-10産生によって体液性免疫を調節する、免疫バランスはTh1、Th2、抗原提示細胞(APC)などの免疫調節細胞が産生する、さまざまなサイトカインによって適度に調整されている、しかし、一旦Th1/Th2免疫バランスが崩壊すると、Th1、Th2免疫の不均衡により様々な免疫病を引き起こす。T-betとGATA-3はTh細胞分化において、重要な転写調節因子である。また、染色体構造の変化により、Th2サイトカイン遺伝子群の発現が協調的に調節されていることが報告されている。しかし、個々の免疫反応がTh1優位になるかTh2優位になるかは免疫調節において重要であるけれども、その明確なメカニズムはまだわかっていない。したがって、Th1あるいはTh2に特異的な遺伝子発現の解明は、免疫調節機構を理解するのに役立つと考えられる。さらに、これらの解析は、Th1/Th2バランスの調節を通じた免疫病に対する新しい治療法の開発につながる可能性がある。

Th1細胞とTh2細胞における遺伝子発現の違いを明らかにするために、まず私たちは、OVA抗原に特異的なT細胞レセプターを持つDO11.10トランスジェニックマウスの脾臓細胞から、純粋なTh1、Th2細胞を調製した。このためには、FACS-Vantageを用いて脾臓細胞からCD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>+</sup>T細胞を回収し、10  $\mu$ g/mlの抗原ペプチド(OVA<sub>323-339</sub>)、マイトマイシンC処理脾臓細胞、20 U/mlのIL-2存在下で、Th1条件(20 U/ml IL-12、1 ng/ml IFN- $\gamma$ ならびに50  $\mu$ g/ml抗IL-4抗体存在下)あるいはTh2条件(1 ng/ml IL-4、50  $\mu$ g/ml抗IFN- $\gamma$ 抗体、50  $\mu$ g/ml抗IL-12抗体存在下)で、それぞれ12日間培養してTh1細胞、Th2細胞を得た。得られたTh1、Th2細胞を固相化抗CD3抗体で2時間刺激したものと、刺激しないものについて細胞を回収して、RNAを抽出した。ポリA<sup>+</sup>RNAを精製後、約8700個の遺伝子を載せたGEMマイクロアレイを用いて、遺伝子の発現量の違いを検討した。その結果、私たちはTh1細胞に多く発現する57個の遺伝子とTh2細胞に多く発現する37個の遺伝子を検出した。

個々の遺伝子の発現特異性を準定量的RT-PCR解析で確認するために、私たちは抗CD3抗体刺激前後のTh1、Th2細胞それぞれのRNAからcDNAを合成し、個々の遺伝子に対するプライマーでPCR反応を行い、対数増幅期の反応について電気泳動後、バ

ンドの強さを定量した。これにより、私たちは Th1 細胞に特異的な 11 個の遺伝子と Th2 細胞に特異的な 7 個の遺伝子を同定した。

特異的な遺伝子の中には、転写因子として Th1 に特異的な DEC1/stra13、Th2 に特異的な PPAR $\gamma$ 、CRABP2 があった。また細胞表面の蛋白質としては、Th1 に特異的なものとして CD97 と chandra があり、gp49A と、chandra と同じトランスメンブラン 4 スーパーファミリー (TM4SF, tetraspanin) の CD53 が逆に Th2 で強く発現していた。細胞内の蛋白質として G 蛋白質の GBP3、および rho の GTPase 活性化因子 TA-GAP、プリン代謝に関与する PNP が Th1 に、蛋白質の成熟に関与する furin が Th2 に特異的であった。リン脂質に結合する annexin A6 および annexin A2、また PIP<sub>3</sub> に結合する PIP<sub>3</sub>-E (AK0382257) は Th1 に特異的だった。分泌蛋白質では onzin、osteopontin が Th1 特異的であるのに対して、laminin  $\alpha$ 5、ECM1 は Th2 で多く発現していた。これらの中で、CD97、chandra、PPAR $\gamma$ は、これまでに既にその特異性が報告されている遺伝子であった。また GBP3 は Th2 特異的とする報告、osteopontin は Th1 特異的とする報告と Th2 特異的とする報告があったが、私たちの解析では Th1 に特異的だった。この違いは、種の違いや実験条件の違いによるものと考えられる。

今回同定された遺伝子は Th1、Th2 細胞の一方で特異的に発現していることから、これらのヘルパーT 細胞の分化や機能に重要であり、免疫反応の調節に関わっている可能性が高いと考えられる。これらの Th1、Th2 細胞における遺伝子発現の違いを指標にして、免疫バランスを診断する新しい方法の開発が可能であるほか、今後さらに解析を続けることにより、これらの遺伝子をターゲットにして、免疫反応を調節するための新しい方法が開発され、治療に応用できる可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 孝 司  
副 査 教 授 小 野 江 和 則  
副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

## Identification of Th1- and Th2-specific genes by microarray analysis

(マイクロアレイ解析による Th1, Th2 特異的遺伝子の同定)

申請者は、免疫調節において非常に重要な役割を演ずる Th1 細胞と Th2 細胞における遺伝子発現の違いを明らかにするために、DNA マイクロアレイを用いて特異的な遺伝子を検索し、準定量的 RT-PCR によってその発現パターンを検討した。まず OVA 抗原に特異的な T 細胞レセプターを持つ DO11.10 トランスジェニックマウスの脾臓細胞から、FACS-Vantage を用いて CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>+</sup>T 細胞を回収し、10 µg/ml の抗原ペプチド (OVA<sub>323-339</sub>)、マイトマイシン C 処理脾細胞、20 U/ml の IL-2 存在下で、Th1 条件 (20 U/ml IL-12, 1 ng/ml IFN-γ ならびに 50 µg/ml 抗 IL-4 抗体存在下) あるいは Th2 条件 (1 ng/ml IL-4, 50 µg/ml 抗 IFN-γ 抗体、50 µg/ml 抗 IL-12 抗体存在下) で、それぞれ 12 日間培養して純粋な Th1、Th2 細胞を調製した。得られた Th1、Th2 細胞を固相化抗 CD3 抗体で 2 時間刺激したものと、刺激しないものについて細胞を回収して、RNA を抽出し、ポリ A<sup>+</sup> RNA を精製後、約 8700 個の遺伝子を載せた GEM マイクロアレイを用いて遺伝子の発現量の違いを検討した。その結果、Th1 細胞に多く発現する 57 個の遺伝子と Th2 細胞に多く発現する 37 個の遺伝子を検出した。次に、個々の遺伝子の発現特異性を準定量的 RT-PCR 解析で確認するために、抗 CD3 抗体刺激前後の Th1、Th2 細胞それぞれの RNA から cDNA を合成し、個々の遺伝子に対するプライマーで PCR 反応を行い、対数増幅期の反応について電気泳動後、バンドの強さを定量した。これにより、Th1 細胞に特異的な 11 個の遺伝子と Th2 細胞に特異的な 7 個の遺伝子を同定した。

特異的な遺伝子の中には、転写因子として Th1 に特異的な DEC1/stra13、Th2 に特異的な PPAR<sub>γ</sub>、CRABP2 があった。また細胞表面の蛋白質としては、Th1 に特異的なものとして CD97 と chandra があり、gp49A と、chandra と同じトランスメンブラン 4 スーパーファミリー (TM4SF, tetraspanin) の CD53 が逆に Th2 で強く発現していた。細胞内の蛋白質としては G 蛋白質の GBP3、および rho の GTPase 活性化因子 TA-GAP、プリン代謝に関与する PNP が Th1 に、蛋白質の成熟に関与する furin が Th2 に特異的であった。リン脂質に結合する annexin A6 および annexin A2、また PIP<sub>3</sub> に結合する PIP<sub>3</sub>-E (AK0382257) は Th1 に特異的だった。分泌蛋白質では onzin、osteopontin が Th1 特異

的であるのに対して、laminin  $\alpha$ 5、ECM1 は Th2 で多く発現していることを示した。

発表後、上出利光教授から Th1 細胞、Th2 細胞のほかの分化段階での遺伝子発現について、またこの遺伝子発現の特異性がどの程度普遍的と考えられるかなどの質問があった。次いで小野江和則教授から Th1、Th2 細胞へのほかの細胞の混入の問題、PPAR $\gamma$  遺伝子の特徴などについての質問があった。最後に西村孝司教授からは、この研究の今後の応用の可能性についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自身の実験データや関連する論文報告などを引用し、概ね適切な回答をした。

この論文は、Th1、Th2 細胞で特異的に発現している遺伝子を新たに同定している点で高く評価され、今後 Th1、Th2 細胞における遺伝子発現の違いを指標にした免疫バランス診断法の開発や、これらの遺伝子をターゲットにした新しい治療法の開発が期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。