

氏 名	清 益 功 浩
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2234 号
学位授与の日付	平成 12 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Hypomethylation of the proximal and intronic regulatory regions of the IFN- γ gene is not essential for its transcription by naive CD4 ⁺ T cells cultured with IL-4 (IL-4 によるナイーブ CD4 陽性 T 細胞の IFN- γ の産生能獲得には IFN- γ 遺伝子の調節領域の脱メチル化は必須ではない)

論文調査委員	(主 査) 教 授 難波雄二郎	教 授 桂 義 元	教 授 中畑龍俊
--------	--------------------	-----------	----------

論 文 内 容 の 要 旨

IFN- γ は生体の防御をはじめとして免疫反応における重要なサイトカインである。ナイーブ CD4 陽性 T 細胞は IL-2 のみを産生するが、抗原刺激を受ける過程で分化し IFN- γ 産生能をも獲得する。抗原刺激により T 細胞が IFN- γ を産生するためには、これまでその遺伝子のプロモーター領域の DNA の脱メチル化とその領域に結合する核内因子の産生や活性化が必要とされている。一方、抗原刺激の非存在下でもナイーブ T 細胞は IL-4 や IL-7 により IFN- γ の産生能を獲得する事が報告されている。後者の IFN- γ 産生能の誘導は抗原刺激が無いという点で従来の IFN- γ 産生能の誘導機構と異なるが、その詳細な機序に関しては不明な点が多い。そこで IFN- γ 産生の分子機構を解明するために、ヒト臍帯血より精製したナイーブ CD4 陽性 T 細胞を抗原刺激の非存在下で IL-4 と培養する事により IFN- γ 産生能を誘導した T 細胞 (IL-4 刺激ナイーブ T 細胞) と、ヒト末梢血より樹立した PPD 特異的 T 細胞クローン (Th1 細胞) を作製し、両者における、IFN- γ 遺伝子 TATA box 近傍の近位プロモーター領域と第1イントロンプロモーター領域の DNA のメチル化の状態、クロマチンの構造、核内因子を比較検討した。

いずれの細胞も PMA とイオノマイシンで刺激することにより、同等量の IFN- γ を産生した。これらの細胞における、IFN- γ 遺伝子の両プロモーター領域の DNA メチル化の状態をメチル基感受性の制限酵素を用いて切断の上サザンブロット法で検討したところ、IL-4 刺激ナイーブ T 細胞ではこれらの領域はメチル化されていたが、Th1 細胞では脱メチル化されていた。また、精製した核を用いた DNase I hypersensitivity assay では、IL-4 刺激ナイーブ T 細胞では両プロモーター領域に感受性領域は存在せず、Th1 細胞では両領域に感受性領域が認められた。これは IL-4 刺激ナイーブ T 細胞と Th1 細胞では両プロモーター領域に関してクロマチンの構造が異なっており、Th1 細胞では核内因子の結合可能な構造をとっていることを示している。また、両者の細胞でこれまで IFN- γ 産生に必須とされている近位プロモーター領域に結合する核内因子を合成オリゴヌクレオタイドを用いたゲルシフトアッセイ法で検討したところ、IL-4 刺激ナイーブ T 細胞と Th1 細胞ではこのプロモーター領域に結合する核内因子の構成が数や泳動度で異なっていた。

これらの事実より、IL-4 刺激ナイーブ T 細胞と Th1 細胞では抗原刺激の有無などにおいて IFN- γ 産生能獲得に至る分化様式が異なっており、これらの細胞では抗原刺激による IFN- γ 産生の分子機構も、少なくとも使われるプロモーター領域及び核内因子の構成の二点で異なることを明らかにした。以上の結果は、IL-4 刺激ナイーブ T 細胞で、IFN- γ 産生には IFN- γ 遺伝子の近位プロモーター領域と第1イントロンプロモーター領域の脱メチル化は必須でなく、両プロモーター領域は使われていないことを示唆している。

本研究はヒト T 細胞における IFN- γ の産生機構を明らかにすることでヒト免疫機構の解明に新たな知見をもたらすと考

えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者は、ヒトヘルパー T 細胞の IFN- γ 産生機構を解析するために、臍帯血より抗原刺激無しに IL-4 で培養した CD 45 RA⁺CD 45 RO⁻CD 4⁺T 細胞 (IL-4 刺激ナイーブ T 細胞) と末梢血由来の PPD 特異的 CD 45 RA⁻CD 45 RO⁺CD 4⁺T 細胞 (Th 1 細胞) の IFN- γ 産生の分子機構を比較検討した。

両細胞とも IFN- γ 産生能を有していながら、IFN- γ 遺伝子の TATA box 近傍の近位と第 1 イントロンの両プロモーター領域の DNA のメチル化の状態に差を認め、IL-4 刺激ナイーブ T 細胞ではメチル化されていたが、Th 1 細胞では脱メチル化されていた。両プロモーター領域の近傍には、DNase I 感受性領域が、IL 4 刺激ナイーブ T 細胞では存在せず、Th 1 細胞では認められた。両細胞において近位プロモーター領域に結合する核内因子の構成は泳動度で異なっていた。

以上より、IL-4 刺激ナイーブ T 細胞では、Th 1 細胞と異なり、IFN- γ 産生には IFN- γ 遺伝子の両プロモーター領域の脱メチル化は必須でなく、クロマチンの構造上、同領域は使われていないと考えられた。つまり、ヘルパー T 細胞の IFN- γ 遺伝子発現機構は、分化機構により、対応するプロモーター領域や結合する核内因子が異なっていることが示された。

以上の研究はヒト T 細胞における IFN- γ の産生機構の解明に貢献しヒト免疫機構の解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 12 年 2 月 8 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。