

## Review Article

## Th1 細胞分化における Txk の機能と役割

武半優子

聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学

*Functions and expression of Txk, a non receptor tyrosine kinase of the Tec family*

Imbalance of Th1/Th2 responses is associated with the development of human autoimmune diseases and allergic diseases. We have studied a role of Txk, a member of Tec family non-receptor tyrosine kinase for the Th1/Th2 cell development.

We found that Txk is expressed Th1/Th0 cells with IFN- $\gamma$  producing potential. Txk transfection leads to several-fold increase in IFN- $\gamma$  production; neither IL-2 nor IL-4 production were affected. Thus, Txk acts as a Th1 cell specific transcription factor.

Furthermore, we found that Txk expression is enhanced by Th1 cytokines but is inhibited by Th2 cytokines. Txk expression of the peripheral blood T cells is decreased in patients with allergic diseases. Collectively, Txk expression is modulated by with Th1/Th2 cytokines and is importantly involved in immune aberration in patients with immunological disorders. These results suggest that Txk is a possible therapeutic target of the diseases with Th1/Th2 imbalance.

Rec.3/20/2003, pp151-156

Yuko Takeba

Departments of Immunology and Medicine,  
St.Marianna University School of Medicine

**Key words** Tec family, Txk, tyrosine kinase, Th1/Th2, IFN- $\gamma$

ヘルパーT(Th)細胞は産生するサイトカインのパターンによってTh1型とTh2型の2種類に分類される<sup>1)</sup>。Th1細胞はマクロファージや樹状細胞からのインターロイキン(IL)-12の存在により誘導され、(IL)-2, 腫瘍壊死因子(TNF)- $\beta$ , インターフェロン(IFN)- $\gamma$ などを産生し, 細胞性免疫に関係している。Th2細胞はNKT細胞やマスト

細胞からのIL-4によって分化し, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13などを産生することでB細胞の活性化および抗体産生を誘導する液性免疫に関与している。Th1およびTh2細胞は, それぞれのサブセットの細胞が産生するサイトカインにより, お互いの活性を制御し合いながら生体防御機構として働いている(図1)<sup>2)</sup>。

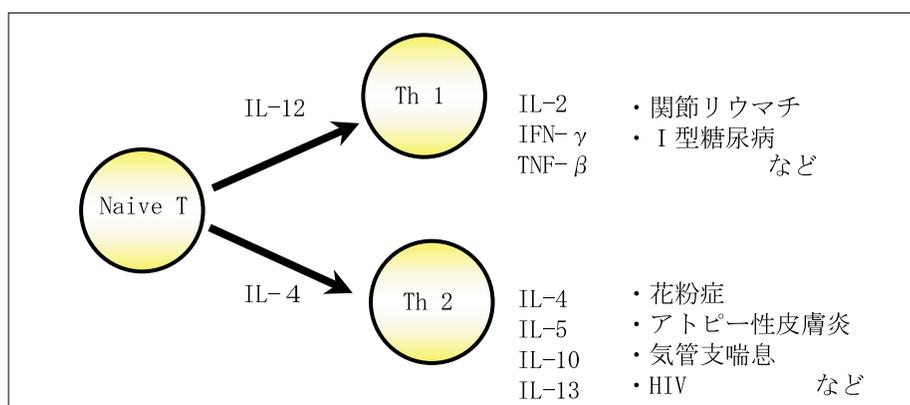


図1 Th1およびTh2細胞の分化と疾患の分類

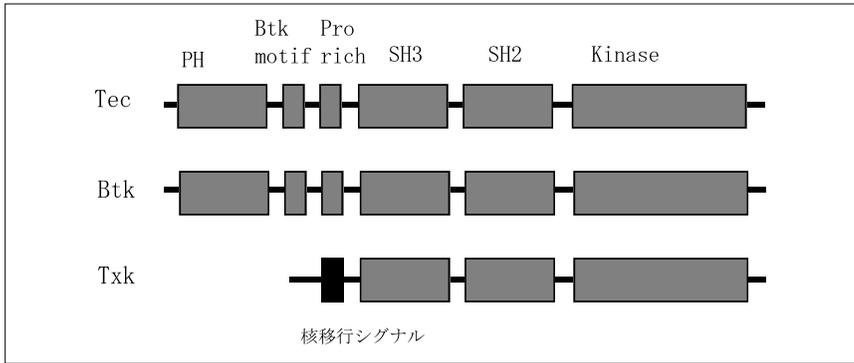


図2 Tec familyおよびTxkの構造

	Th0 clone	Th1 clone	Th2 clone	T cell (-)	IL-2	IL-12	IFN- $\gamma$	IL-18	IL-4	IL-13	IL-10
Txk 発現	++	++	-	+	+	++	++	++	-	-	+
					→	↑	↑	↑	↓	↓	→

図3 ヒト抗原特異的T細胞クローンおよびサイトカイン刺激によるT細胞におけるTxkの発現

TxkはTh0, Th1クローンで発現し, Th2クローンでは発現しなかった。また, ヒトT細胞のTxk発現はTh1サイトカインで増強し, Th2サイトカインで減弱した。

様々な自己免疫疾患, 感染症, アレルギー性疾患は, Th1/Th2細胞のバランスの不均衡が発症の原因や病態形成に深く関与している。例えば1型糖尿病や関節リウマチのような自己免疫疾患では, Th1型細胞の過剰な活性化が起きている<sup>3)</sup>。気管支喘息やアトピー性皮膚炎のようなアレルギー疾患では, Th2細胞の機能過剰が認められ, 逆にTh1細胞は減少している<sup>4)</sup>。自己免疫疾患やアレルギー疾患において, Th1/Th2分化の機構を解明し, Th1/Th2バランスの制御が可能になれば有効な治療手段になることは間違いない。

これまでにTリンパ球に特異的に発現し, Th1細胞を選択的に誘導できるTxk遺伝子が発見され, その役割について研究されてきた<sup>5,6)</sup>。Txk遺伝子はItk, Btk, Bmx, Rlkなどが属するTecファミリー非受容体型チロシンキナーゼの一つで, Tリンパ球や骨髄球系細胞に発現していることが報告されている<sup>5,6)</sup>。ヒトのTxkはHarieらによってクローニングされ, T細胞に特異的に発現していることが報告された<sup>7)</sup>。ヒトTxkの機能や役割についてはまだ不明な点は多くあるが, 最近TxkがTh1細胞分化に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた<sup>8,9)</sup>。

本稿では, 今までに報告されたTxkについて概説し, TxkのTh1細胞分化における機能と役割を得られた成績とともに紹介する。

### Txkとは

Txkは, 1994年にヒト末梢血からクローニングされたTecファミリーの非受容体チロシンキナーゼで<sup>7)</sup>, 1996年に詳細な遺伝子情報が明らかになった<sup>10)</sup>。Tecファミリー

チロシンキナーゼの多くは細胞内の刺激伝達系に関わっている。Txkの構造は他のTecファミリーと異なっており, ユニークな構造を持つ(図2)。一般的なTecファミリーはN末端側にpleckstrin homology domain (PH)とTec homology domain (TH)があり, さらにその下流にsrc homology domain (SH)3およびSH2があり, C末端側にkinase domainを持つ。一方, TxkはPHを持たず, さらにSH3上流に核内移行を起こす塩基配列(nuclear localization signal sequence; NLS)を持つ。このことはJurkatでPHA刺激をした時にTxkが核内移行することから確認できた<sup>8)</sup>。また, Txk遺伝子を導入したTxk発現プラスミドを作成し, このTxk発現プラスミドをJurkatに遺伝子導入後PHAで刺激すると, Txkは細胞質から核内に移行した。Txk遺伝子のNLSの一部を欠損したミュータントTxkを導入し, PHAで刺激してもTxkの核内移行は起こらなかった。したがって, Txkは核移行シグナルを持つことから, チロシンリン酸化酵素としての機能の他に, 転写因子としての機能を合わせ持つことが考えられる<sup>8)</sup>。

### Txkの発現とその機能

HuらはマウスのTxkとしてRlk (resting lymphocyte kinase)がTh2細胞には全く発現せず, Th1細胞にのみ特異的に発現することを報告した<sup>6)</sup>。そこでヒトT細胞におけるTxkの発現について検討した。ヒトの末梢血より抗原特異的T細胞株(Th0, Th1, Th2細胞)を樹立し, TxkのmRNA発現および蛋白発現を検討すると, Th1細胞およびTh0細胞に発現し, Th2細胞には全く発現していなかった(図3)。

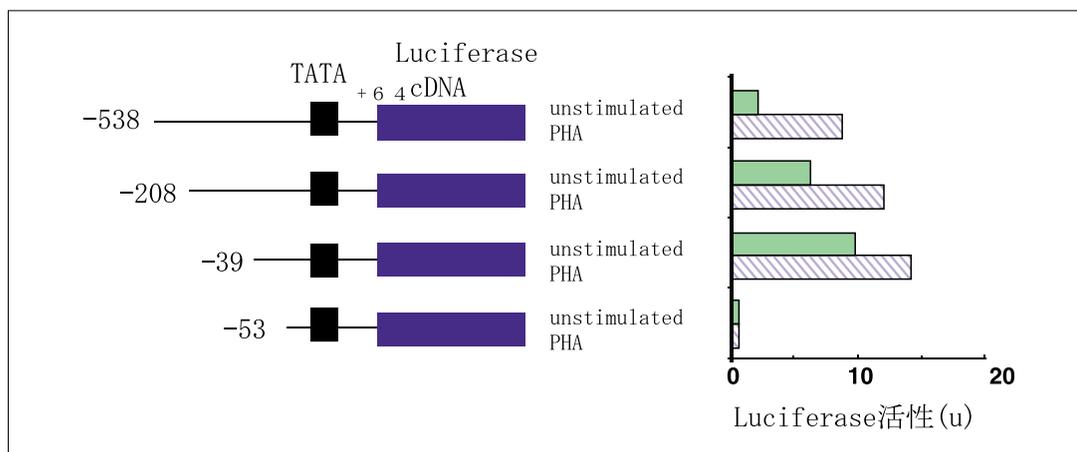


図4 IFN- $\gamma$  プロモータールシフェラーゼcDNAの構造と遺伝子導入によるルシフェラーゼ活性 Jurkatに4種類のIFN- $\gamma$  プロモータールシフェラーゼcDNAを遺伝子導入して、48時間培養後PHA刺激して遺伝子導入効率をルシフェラーゼ活性で測定した。

次にTh1細胞またはTh2細胞に分化させるサイトカインがTxkの発現に与える影響を検討した。正常人末梢血T細胞およびJurkatに各種サイトカインを添加し、経時的にTxkの発現をRT-PCR法およびウエスタンブロット法で解析した。Th1細胞へ分化させるIL-12, IFN- $\gamma$ , IL-18を添加すると、Txkの発現は増強し、Th2細胞への分化を誘導しTh1細胞分化を抑制するIL-4, IL-13を添加すると、Txkの発現は減少した(図3)。以上のことから、TxkはTh1細胞に分化した細胞に発現するのみでなく、サイトカインの産生により調節されていることが明らかになった。

さらにTh1/Th2細胞の分化誘導に対するTxkの機能を明らかにするために、Txk遺伝子の転写領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したTxkプロモータールシフェラーゼ発現プラスミドを作成した。JurkatにTxkプロモータールシフェラーゼ発現プラスミドを遺伝子導入し、各種サイトカインを添加して、転写活性を検討した。Txkプロモーターの転写活性は、Th1サイトカインで増強し、Th2サイトカインで減弱した。また、このTxk遺伝子の転写領域には、Th1細胞分化に重要な転写因子であるSTAT(Signal transducers and activators of transcription)-4<sup>(11)</sup>とTh2細胞分化に重要なSTAT-6<sup>(12)</sup>を含んでおり、Txkの転写活性に関与していることを示唆している。すなわち、Th1/Th2細胞の分化誘導は、Txk遺伝子の転写および蛋白発現が並行して起きていると考えられる。

### Th1細胞分化におけるTxk —IFN- $\gamma$ 産生に対する役割—

マウスTxkはTCRからのシグナル伝達を介し、ZAP-70のターゲットとして知られているリンパ球特異的アダプ

ター蛋白(SLP-76)のリン酸化により、T細胞の活性化およびTh1サイトカインの産生が誘導されることが報告されている<sup>(13)</sup>。そこでヒトTxkのTh1細胞分化における役割を検討した。IFN- $\gamma$ はTh1の代表的なサイトカインとして知られている。

Txkを発現したJurkatは、IFN- $\gamma$ の産生を増加させた。Txkのアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入したJurkatは、IFN- $\gamma$ は全く産生しなかった。同様にIL-2産生やTh2サイトカインとして知られるIL-4産生には全く影響を与えなかった。マウスTxkはIL-2産生を増強し、ヒトTxkの成績とは異なるが、これはヒトTxkがIFN- $\gamma$ 遺伝子の特異的な転写因子として作用することを示している。

また、Txkの遺伝子がIFN- $\gamma$ の産生に対する影響を検討した。Txkの遺伝子に存在するIFN- $\gamma$ プロモーター領域のうち、長さの違う4種類(-538, -208, -53, -39)の遺伝子にルシフェラーゼDNAを組み込んだプラスミドを作成し(図4)、Jurkatに遺伝子導入し、IFN- $\gamma$ 遺伝子プロモーター領域の転写調節に対するTxkの効果を評価した。

IFN- $\gamma$ 遺伝子プロモーター領域のうち、-538, -208, -53では転写活性が増強するが、-39では転写活性は増強しなかった(図4)。Txkの作用部位がIFN- $\gamma$ 遺伝子の転写開始点より39から53塩基上流にあることが明らかになった。次にIFN- $\gamma$ 遺伝子プロモーター領域の-39/-53を含むオリゴヌクレオチドをプローブとしてJurkatおよびTh1クローンの核蛋白結合をゲルシフト法で解析した。非刺激時には蛋白は結合されないが、PHAで刺激すると核蛋白が結合し、この結合がIFN- $\gamma$ 遺伝子プロモーターの-39から-53領域に特異的であった。さらにTxkのINF- $\gamma$ 遺伝子プロモーター領域-53/-39に3カ所に突然変異を導入した

human IFN- $\gamma$ promoter -53/-39	TAATCCTCAGGAGAC
human CCR5 promoter -899/-885	<u>CAACCACCAAGAGAG</u>
human TNF- $\alpha$ promoter -454/-440	<u>AAATCAGTCAGTGGC</u>

図5 ヒトIFN- $\gamma$ プロモーター領域のTxk結合モチーフと類似構造を持つTh1細胞関連遺伝子プロモーター領域(文献9)より改変)

ミュータントオリゴヌクレオチドを作成し、Txkとの結合を検討すると、この結合が抑制された。したがって、IFN- $\gamma$  遺伝子プロモーター領域に結合するTxk蛋白が転写因子として機能し、TxkはIFN- $\gamma$  遺伝子プロモーター領域-53/-39に結合することが示された。

このことはIFN- $\gamma$  遺伝子プロモーター-53から-39の領域全体が、Txkのresponsive elementとして重要であることを示唆している。Txk responsive elementのモチーフは、Th1型に関連する蛋白CCR5やTNF- $\alpha$ のプロモーター領域にも類似の配列が存在した(図5)。

以上の成績よりTxkがTh1細胞の分化に重要な転写因子であることが解った<sup>8,9)</sup>。

## Txkの発現と疾患—将来の展望—

マウスでは、Txk遺伝子のみをノックアウトしただけでは免疫異常は起こらない。同じTecファミリーチロシンキナーゼの一つでItkが、免疫機能の代償として働くためであり、TxkとItkの両者をノックアウトしたマウスでは、サイトカインの低下や刺激伝達系の免疫異常を起こすことが報告されている<sup>14)</sup>。ヒトにおいては、Txkの発現と免疫疾患の関連性については未だ報告がない。そこでTh2疾患である気管支喘息やアトピー性皮膚炎のようなアレルギー性疾患患者ではTxk発現が抑制されている可能性があると考えた。末梢血Tリンパ球のTxkの発現を検討すると、気管支喘息およびアトピー性皮膚炎患者末梢血のヘルパーT細胞では、Txk mRNAの発現および蛋白発現が著しく減弱していた。自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)もTh2型疾患に分類されるが、SLE患者末梢血においてもTxkの発現は低下していた。

Th1疾患として代表的な関節リウマチ(RA)患者におけるTxkの発現を検討した。そこでRA患者の関節病変の

滑膜組織におけるTxkの発現を検討した。滑膜組織の浸潤リンパ球は、活性化に伴って滑膜細胞の活性化および増殖を誘導し、炎症性サイトカインを産生することで慢性化が持続する。滑膜浸潤リンパ球のIFN- $\gamma$ の産生に伴ってTxkの発現が認められた。すなわち、病変局所におけるTxk発現が病態形成に深く関与していることが示唆された。

以上の成績は、Txkの発現が疾患のサイトカインバランスの異常または免疫異常に関与していることを示唆する。今後アレルギー疾患や自己免疫疾患におけるTxk発現と病態形成における役割について、さらに検討する必要がある。

## おわりに

感染症、アレルギー疾患、自己免疫疾患などの免疫関連疾患においてTh1/Th2細胞のバランスの崩れが様々な疾患の原因となっており、Th1/Th2細胞の分化の偏りを是正することが治療法になると期待されている。現時点では、サイトカインをターゲットとした抗サイトカイン療法<sup>15,16)</sup>もあるが、サイトカインは細胞接着分子の機能を含め、生体内において複雑なネットワークを形成しており、単一のサイトカインの抑制を行っても効果が十分得られないことが問題になっている。

今までTxk遺伝子の機能についてはあまり報告がなかったが、最近Txkのシグナル伝達機構に関する研究は、明らかになってきた<sup>17-19)</sup>。また、今回初めてTxkの発現がTh1/Th2サイトカインによって増強または抑制されることを見出した。自己免疫疾患やアレルギー疾患において、Txk発現に差異があることも明らかになった。今後、*in vivo*または*in vitro*においてTxk発現を調節し、サイトカインのバランス異常または免疫異常を是正することが可能になれば、治療応用につながると考えられる。例えば年々増加傾

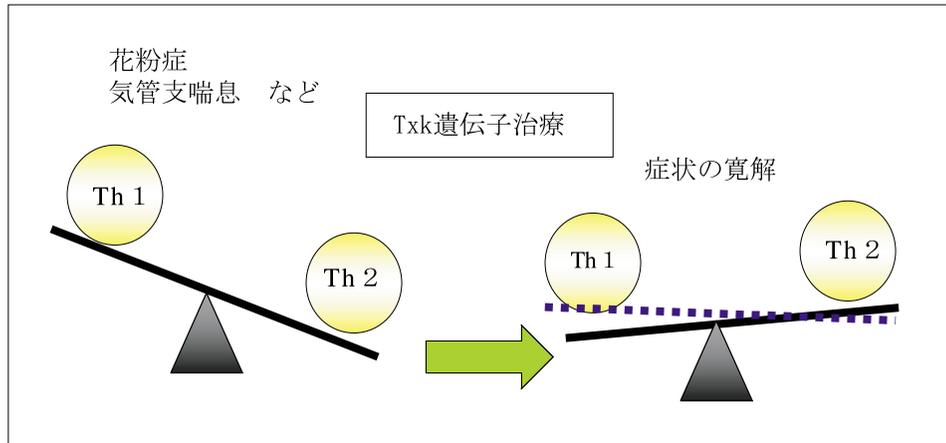


図6 アレルギー疾患におけるTxk遺伝子治療の将来性(仮説)

向にある花粉症などアレルギー疾患では、Txk遺伝子治療が夢の治療法になるかもしれない(仮説:図6)。このことからTxkの発現を調節する機構については、さらに検討が必要である。

現在は、アレルギーモデルマウスにTxk遺伝子導入し、アレルギー症状の緩解または改善が認められるか検討中である。Txk遺伝子の解明は今後アレルギー疾患や自己免疫疾患の病態の解明や治療に十分役立つものと考えられる。

本研究は聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学教室室員の共同研究によるものである。

## 文 献

- 1) Mosmann TR, Coffman RL: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7: 145-173, 1989.
- 2) Mosmann TR, Sad S: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, 17: 138-146, 1996.
- 3) Dolhan RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AM: Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 39: 1961-1969, 1996.
- 4) Kon OM, Kay AB: T cells and chronic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 118: 133-135, 1999.
- 5) Ellis JH, Suttmuller RPM, Sims MJ, Cooksley S: Functional analysis of the T-cell-restricted protein tyrosine kinase Txk. *Biochem J*, 335: 277-284, 1998.
- 6) Hu Q, Davidson D, Schwartzberg PL, Macchiarini F, Lenardo MJ, Bluestone JA, Matis LA: Identification of Rlk, a novel protein tyrosine kinase with predominant expression in the T cell lineage. *J Biol Chem*, 270: 1928-1934, 1995.
- 7) Heire RN, Ohta Y, Lewis JE, Fu SM, Kroisel P, Litman GW: TXK, a novel human tyrosine kinase expressed in T cells shares sequence identity with Tec family kinases and maps to 4p12. *Hum Mol Genet*, 3: 897-901, 1994.
- 8) Kashiwakura J, Suzuki N, Nagafuchi H, Takeno M, Takeba Y, Shimoyama Y, Sakane T: Txk, a nonreceptor tyrosine kinase of the Tec family, is expressed in T helper type 1 cells and regulates interferon gamma production in human T lymphocytes. *J Exp Med*, 190: 1147-1154, 1999.
- 9) Takeba Y, Nagafuchi H, Takeno M, Kashiwakura J, Suzuki N: Txk, a member of nonreceptor tyrosine kinase of Tec family, acts as a Th1 cell-specific transcription factor and regulates IFN-gamma gene transcription. *J Immunol*, 168: 2365-2370, 2002.
- 10) Ohta Y, Harire RN, Amemiya CT, Litman RT, Trager T, Riess O, Litman GW: Human *Txk*: genomic organization, structure and contiguous physical linkage with the Tec gene. *Oncogene*, 12: 937-942, 1996.
- 11) Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN: Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*, 382: 171-174, 1996.
- 12) Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle JN: Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature*, 380: 630-633, 1996.

- 13) Schneider H, Guerette B, Guntermann C, Rudd CE: Resting lymphocyte kinase (Rlk/T $\alpha$ k) targets lymphoid adaptor SLP-76 in the cooperative activation of interleukin-2 transcription in T-cells. *J Biol Chem*, 275: 3835-3840, 2000.
- 14) Sommers CL, Rabin RL, Grinberg A, Tsay HC, Faber J, Love PE: A Role for the Tec family tyrosine kinase T $\alpha$ k in T cell activation and thymocyte selection. *J Exp Med*, 190: 1427-1438, 1999.
- 15) Wendling D, Racadote E, Wijdenes J: Treatment of severe rheumatoid arthritis by anti-interleukin 6 monoclonal antibody. *J Rheumatol*, 20: 259-262, 1993.
- 16) Barrera P, Joosten LA, den Broeder AA, van de Putte LB, van Riel PL, van den Berg WB: Effects of treatment with a fully human anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody on the local and systemic homeostasis of interleukin 1 and TNF alpha in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 60: 660-669, 2001.
- 17) Chamorro M, Czar MJ, Debnath J, Cheng G, Lenardo MJ, Varmus HE, Schwartzberg PL: Requirements for activation and RAFT localization of the T-lymphocyte kinase Rlk/T $\alpha$ k. *BMC Immunol*, 2: 3, 2001.
- 18) Yang WC, Ching KA, Tsoukas CD, Berg LJ: Tec kinase signaling in T cells is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and the Tec pleckstrin homology domain. *J Immunol*, 166: 387-395, 2001.
- 19) Rajagopal K, Sommers CL, Decker DC, Mitchell EO, Korthauer U, Sperling AI, Kozak CA, Love PE, Bluestone JA: RIBP, a novel Rlk/T $\alpha$ k- and Itk-binding adaptor protein that regulates T cell activation. *J Exp Med*, 190: 1657-1668, 1999.