

IL-4の産生制御

Regulation of IL-4 production



久保 允人

Masato Kubo

東京理科大学生命科学研究科生命工学技術研究部門

◎インターロイキン 4(IL-4)は、花粉症などを代表とする 1 型アレルギーを制御する IgE 抗体の産生を制御するサイトカインである。IL-4 はおもに特定のヘルパー T 細胞、Th2 細胞から産生される。この Th2 細胞はナイーブ T 細胞がより分化する機能型 T 細胞であり、分化の方向性はナイーブ T 細胞が抗原刺激を受ける際のサイトカイン環境によって規定されている。そこで本稿では、IL-4 産生制御の分子メカニズムについて、転写因子による制御、遺伝子レベルでの制御、とくにエピジェネティクスな制御について、Th2 分化の方向性を制御するメカニズムも含めて、これまでの知見をもとに紹介する。



Key word : インターロイキン 4(IL-4), Th2, サイトカイン, GATA-3

IL-4産生制御とTh2分化

免疫反応において、インターロイキン 4(IL-4)は抗体産生やアレルギーを制御する重要なサイトカインのひとつといえる。T 細胞が IL-4 を産生できるようになるためには、ナイーブ T 細胞が機能型 T 細胞である Th2 に分化する必要がある(図 1)。この分化過程には、IL-4 の存在下で T 細胞抗原レセプター(TCR)を介した抗原刺激とサイトカインシグナル経路である IL-4-STAT6 を介してシグナル経路の両者が活性化され、転写因子 GATA-3 が誘導される必要があり、この転写因子の存在が Th2 の分化過程で絶対的条件となることから、分化決定のマスターレギュレーターと考えられている¹⁾(図 2)。誘導された GATA-3 は、*IL4* 遺伝子座に結合することにより、そのクロマチン構造を変化させて Th2 分化を制御するとともに、T 細胞における IL-4 産生を制御すると考えられている²⁻⁴⁾。

GATA-3 の重要性は、活性化した T 細胞特異的に GATA-3 の発現を欠失させることができる OX40 のプロモーターを使ったコンディショナルの系において証明されている。ナイーブ T 細胞が Th2 移行する過程で GATA-3 を欠損させた T 細胞

は Th2 に分化できないが、これに対して Th2 分化後に GATA-3 を欠損させた T 細胞では、正常に IL-4 を産生する⁵⁾。このことは、GATA-3 はナイーブ T 細胞から Th2 への分化過程に重要な働きをもつのに対し、一度 Th2 に分化してしまうと GATA-3 が存在しない状況でも IL-4 を産生することが可能であることを示している。

GATA-3によるIL-4産生制御

GATA-3 は 2 つの Zinc finger ドメインと DNA 結合ドメインからなる分子で、T 細胞の初期分化段階から発現しており、T 細胞の発生制御にかかわっている。T 細胞で発現される GATA ファミリーは GATA-3 のみであり、その発現は IL-4-STAT6 と NF- κ B 経路によって制御されている⁶⁾(図 2)。NF- κ B は p55 と p65 の二量体からなる転写因子で、T 細胞における NF- κ B の活性化は、TCR の下流で CARMA1 の Bcl10 との会合で誘導されるシグナルと補助シグナル分子 CD28 からの PI-3 キナーゼの活性化で制御されている。そのため、NF- κ B を欠損するマウスでは、GATA-3 が発現しないため Th2 へと分化することができない。

GATA3 遺伝子座には近位と遠位の 2 つのプロ

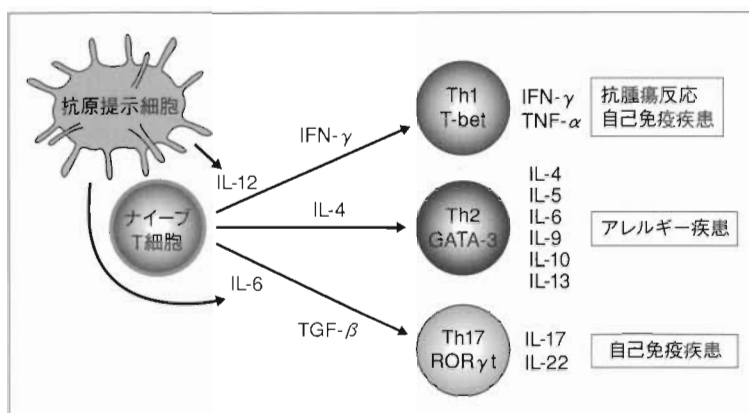


図 1 免疫反応を制御するヘルパーT細胞と、産生されるサイトカイン

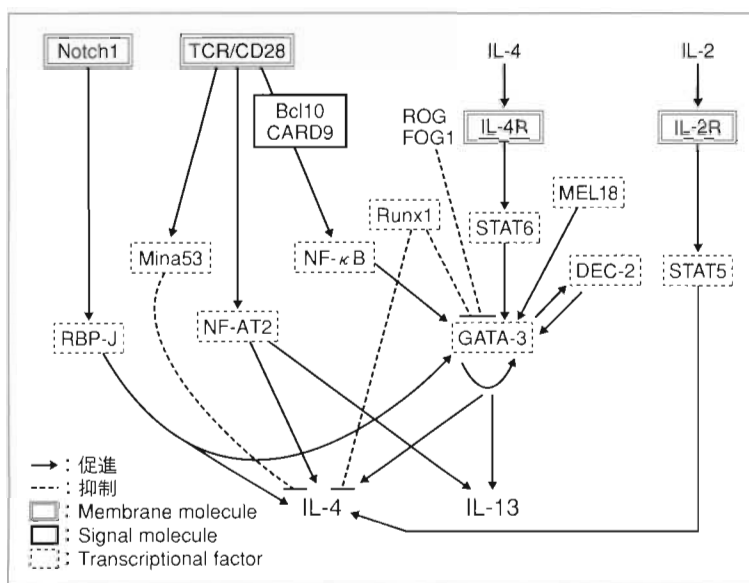


図 2 Th2分化にかかわるシグナル伝達経路

モーターが存在しており、IL-4 シグナルで活性化される STAT6 は近位プロモーターである。一方で、遠位プロモーターには Notch シグナルの下流分子 RBP-J に対する認識配列が存在し、T 細胞における Notch シグナルは Notch1 がそのリガンドである Jagged1 に結合することにより起動され、その下流に位置する転写因子 RBP-J が遠位プロモーターに結合することにより GATA-3 の発現を制御する^{7,8)}(図 2)。そのため、初期の IL-4 が存在しない IL-4 非依存下で起こる Th2 分化は、Notch シグナルを介して制御されていると考えられる。

さらに最近になって、Dec2 とよばれる転写因子は Th2 で高く発現しており、GATA-3 が効率よく発現するためには Dec2 の存在が必須であることが示された(図 2)。この転写因子は GATA-3 によってその発現が制御されるとともに、Gata3 遺伝子のプロモーター領域に直接結合して GATA-3 の発現を制御する⁹⁾。また、この Dec2 は IL-2 受容体からのシグナルを増強することで、Th2 分化を制御していることも示されている¹⁰⁾。

また、GATA-3 の発現やその働きを抑制的に制御している分子の存在も明らかにされている(図 2)。ROG は GATA-3 に会合する分子として同定

され、GATA-3 の働きを抑制する分子である¹¹⁾。FOG1 はナイーブ T 細胞で発現して TCR 刺激でその発現が減弱する分子であり、ヘリックスループを介して GATA-3 に結合し、その働きを抑制的に制御する^{12,13)}。ポリコム遺伝子 MEL-18 は GATA-3 の発現を正に制御する転写因子として知られる¹⁴⁾。また、急性白血病の原因遺伝子として知られる転写因子 Runx は、GATA-3 遺伝子のリプレッサーとして働く。Runx-1 はナイーブ T 細胞において恒常的に発現している転写因子であり、その発現は抗原認識に伴う TCR 刺激により減弱する。そのため TCR シグナルは、Runx-1 の発現を抑えることで、GATA-3 の発現抑制を解除し、Th2 分化を起こすスペースを作っている¹⁵⁾。

T細胞からの初期IL-4産生制御

T 細胞が Th2 として高濃度の IL-4 を産生するためには、GATA-3 を発現するために抗原刺激に加え IL-4 の刺激を受け取る必要がある。その産生源のひとつとして、ナイーブ T 細胞による低レベルの IL-4 発現がある。ナイーブ T 細胞が抗原刺激によって微量な IL-4 を産生するためには、IL-2 を介した STAT5 の活性化が必要とされることが報告されている^{16,17)}(図 2)。T 細胞特異的な STAT5 欠損は生体レベルで起こる Th2 反応性を減弱させるが、分化過程に IL-4 を存在させれば、この Th2 分化を再構築させることができる¹⁸⁾。すなわち、ナイーブ T 細胞が初期抗原刺激で IL-4 を発現するためには、IL-2-STAT5 経路の活性化が必要ではないかと考えられている。

また、著者らは IL-4 の産生源としてメモリー型 T 細胞と NKT 細胞の重要性を報告している¹⁹⁾。これら T 細胞が IL-4 を産生するためには Notch のシグナルが重要であり、T 細胞が抗原刺激を受ける際、その下流にある RBP-J が IL-4 遺伝子座に存在する *cis*-acting 領域に結合することにより、メモリー型 T 細胞と NKT 細胞は高濃度の IL-4 を産生できるようになる。生体内におけるこれら T 細胞の数は限られてはいるが、局所的に高濃度の IL-4 を産生することで効率のよい Th2 分化が誘導される。

アレルギーに“なりやすい”“なりにくい”といっ

た体質にも、この初期 IL-4 産生能を決める遺伝的要因が関与すると考えられる。著者らは Th2 反応が異なる近交系マウスを用い、初期 IL-4 産生能を指標に、この遺伝的要因を決める遺伝子がマウス染色体 16 番目に存在することを見出した²⁰⁾。この遺伝子は Mina53 という脱メチル化酵素活性を有する Jmjc ドメイン構造をもつ転写因子で、発現は TCR 刺激によって制御されている。高い Th2 反応を示すマウス系統(BALB/c)では Mina53 の発現が低く、低い反応性をもつマウスでは発現が高いことから、Mina 分子は *Il4* のリプレッサーであることが予想された。実際、Mina 分子は NFAT と競合することにより *Il4* プロモーターに結合して、その働きを強く抑制することから、Mina 分子は *Il4* のリプレッサーとして、Th2 バイアスを決める遺伝的因子として働いていることが明らかにされた(図 2)。

IL-4転写におけるクロマチン制御

1. IL-4遺伝子の制御領域とクロマチンリモデリング

ナイーブ T 細胞がヘルパー T 細胞へと分化するためには、特定のサイトカイン遺伝子の転写スイッチをオンの状態にしなければならない。そのためには、クロマチンの立体構造を変化させ、転写を制御する領域に転写因子が会合しやすい状況をつくるクロマチンの構造変化(クロマチンリモデリング)が必要となる。この構造変化が起こる動態は、DNase I の制限酵素に対する感受性を指標に追跡することができる。この DNase I 高感受性領域を HS 領域とよんでいる。IL-4 遺伝子座の両側に存在する 2 つの遺伝子 IL-13 遺伝子座と分子モーター KIF3A 遺伝子座の間には 11 カ所の HS 領域が存在し、IL-13 と IL-4 遺伝子間に存在する HSS3 と IL-4 遺伝子 3' 側にある HS4 以外は、Th2 分化特異的に現れる HS 領域である。HSS3 と HS4 は Th1 と Th2 いずれにおいても現れる HS 領域である。また、同様の Th2 特異的に現れる HS 領域は IL-13 遺伝子にも 3 カ所存在している(図 3)^{21,22)}。

IL-4 を含む IL-5、IL-13 などの Th2 サイトカイン遺伝子はヒトでは 5 番染色体の 5q31 領域

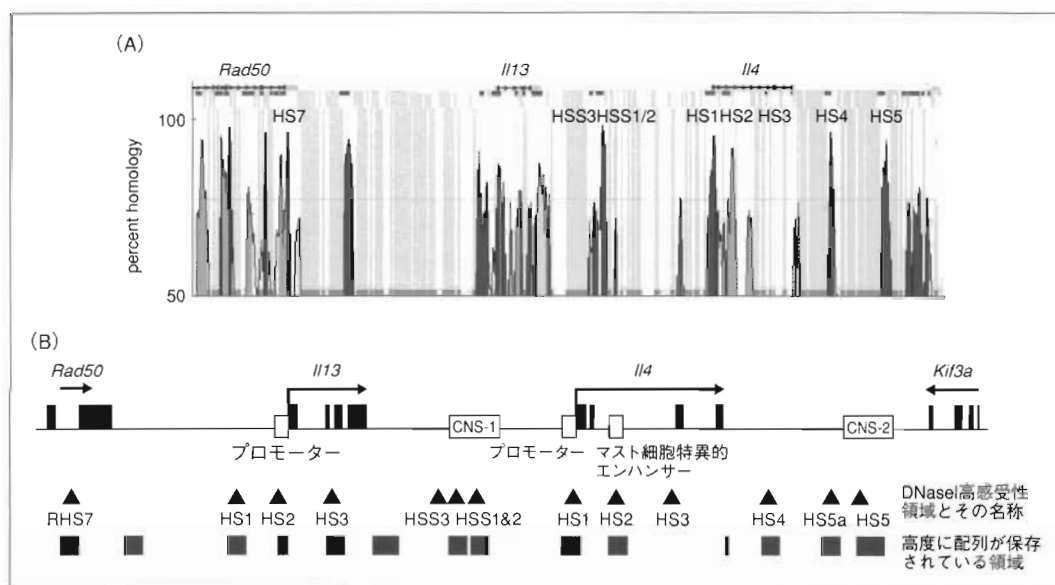


図 3 *Il13/Il4* 遺伝子座におけるゲノム配列の保存と DNase I 高感受性領域 (HS 領域)

A: マウスおよびヒト *Il13/Il4* 遺伝子座のゲノム配列の比較, 青: エクソン, ピンク: インtron, 黄: 3' 非転写領域, 赤: 非転写領域

B: *Il13/Il4* 遺伝子座における HS 領域

に, マウスでは 11 番染色体でクラスターを形成しており, 存在する遺伝子座の配置は動物種間で非常によく保存されている. ところがマウスとヒトとの間でゲノム配列を比較すると, 高い相同性がみられるのは非常に限られた領域においてのみである. マウスの 5q31 領域にはヒトの配列と非常に高い相同性をもつ領域 (conserved noncoding sequence: CNS) が 16 カ所存在する (図 3)²³⁾. これら CNS は HS 領域と高い相関関係にあり, そのうち *Il4* 遺伝子座の近縁には CNS-1 と CNS-2 とよばれる領域が同定されている. CNS-1 は *Il13* と *Il4* 遺伝子の間に存在する 401 bp にわたる領域で, マウスとヒトとの間で 84% の相同性が保たれ, これは HS 領域 HSS1 と HSS2 に相当する. CNS-2 は *Il4* 遺伝子の 3' 下流約 6.5 kb に存在する 163 bp にわたる領域で, 約 83% の相同性が保たれている. CNS-2 は, Th2 分化に伴いリモデリングが起こる HS5 に相当する.

2. IL-4 遺伝子のクロマチン制御とヒストン修飾

遺伝子の転写スイッチはクロマチンレベルで制御されており, 転写のオンあるいはオフはクロマチンが構造的変化をすることにより, 転写因子がアクセスできることが条件となる. 染色体 DNA

の最小構造はヌクレオゾームとよばれ, 4 種類のヒストン (H2A, H2B, H3, H4) からなるコアヒストンのまわりに 146 塩基からなる DNA 二重螺旋が巻きついた構造からなる. 遺伝子のスイッチをオンにするためには, このヌクレオゾームを構成するヒストン分子内の特定のリジン残基 (K) が化学修飾される必要がある. この修飾にはアセチル化, メチル化, リン酸化などが関与しており, ヒストン上の特定の場所で起こる化学修飾が遺伝子のオンあるいはオフの状態をコードしている. ヒストン 3 (H3) 上の 9 番目と 14 番目のリジン残基 (H3K9 & 14) のアセチル化, あるいは 4 番目のリジン残基 (H3K4) のメチル化は, 活性化を示すヒストンコードであり, 一方 H3K9 と H3K27 に起こるメチル化はサイレンシングを示すヒストンコードである.

Il13/Il4 遺伝子座に存在する HS 領域は, Th2 分化に伴いヒストンがアセチル化され, H3K4 がメチル化されることによりクロマチンリモデリングが進行する²⁴⁾. ナイーブ CD4 T 細胞が刺激を受けて分裂をはじめると, 分化環境にかかわらずクロマチンは一度ほどかかれた状態となり, 転写因子が結合しやすい状況がつけられる. このアセチル化

は、Th1 分化環境下ではその後急速に減衰するが、Th2 分化環境下では維持される。このとき、H3K4 のメチル化は刺激後 36~48 時間の間で Th2 でのみ起こることから、Th2 特異的に起こるアセチル化の維持に働いていると考えられる²⁵⁾。また、この IL-4 を介した GATA-3 による Th2 への分化決定は、TCR シグナル導入後 48 時間以内に規定されていると考え合わせると、GATA-3 の作用と H3K4 のメチル化のタイミングが一致していることがわかる²⁶⁾。

メチル化した H3K27 にはポリコーン複合体が、H3K9 には Suv39 が特異的に会合することで、サイレンシングをコードしている。Th2 と Th1 の両方でクロマチンリモデリングが起こる HS4 では H3K27 のメチル化が報告されていることから、HS4 は EZH2 などのポリコーンによりサイレンシングされる領域とも考えられる²⁷⁾。実際、ゲノムから HS4 領域を欠失させたマウスでは、Th1 環境下でも IL-4 産生が起こることが示されている²⁸⁾。一方、この HS4 領域には Runx に対する結合配列が存在しており、T-bet と Runx3 の複合体がこの領域に結合して、サイレンシングを制御していることが報告されている²⁹⁾。

3. ゲノム欠損マウスによるHS領域の役割の解析

① **CNS-1およびCNS-2欠損マウス**……Th2 分化に伴う IL-4 産生におけるそれぞれの HS 領域の機能を解析する目的で、HSS1-3(CNS-1)あるいは HS5a/5(CNS-2)を含む領域をゲノムから欠失させたマウスが作製されている。いずれのマウスでも、二次抗原刺激時における Th2 サイトカインの産生抑制が報告されているが、IL-4 産生が完全に抑えられることはない^{30,31)}。著者らの解析では、CNS-2 は Notch シグナルによって制御されていることが明らかにされており、この制御はメモリー型の T 細胞や NKT 細胞からの初期抗原刺激時における IL-4 産生に局限することがわかってきている¹⁹⁾。実際、CNS-2 欠損マウスでは、初期抗原刺激時における IL-4 産生が完全に消失している一方、ナイーブ T 細胞を Th2 分化条件においたときにみられる IL-4 産生の減弱は正常レベルの 1/3 程度であることから、CNS-2 は Th2 分化そのものを規定するというよりは、分化に必要と

される初期抗原刺激時におけるメモリー型の T 細胞や NKT 細胞からの IL-4 産生を制御するエンハンサーと考えられる。

② **HS4欠損マウス**……HS4 領域を欠失させたマウスでは、Th1 細胞だけではなくナイーブ T 細胞でも IL-4 産生が起こるようになることから、この領域はサイレンサーとしての働きがあることが報告されている²⁸⁾。前述したように、この領域には Runx に対する結合配列が存在しており、Th1 細胞での HS4 によるサイレンサー機能は、T-bet と Runx3 の複合体がこの領域に結合することによって制御されることが報告されている²⁹⁾。しかし、HS4 によるサイレンサー機能は、Runx3 や T-bet を発現しないナイーブ T 細胞でもみられることから、ナイーブ T 細胞では発現がみられる Runx1 がサイレンサーとして機能する可能性も考えられる。

4. Locus control region(LCR)によるTh2サイトカインの包括的制御

Il13 遺伝子座の上流に位置する複製修復酵素 *Rad50* 遺伝子座内の 3' 側のイントロン内に存在する HS 領域 RHS7 が、IL-4 産生とともに Th2 から産生されるサイトカインを包括的に制御する LCR として働きうることが示唆されている³²⁾。この RHS7 領域を欠損するマウスでは、*Il4* のみならず *Il13* や *Il5* といった同じ Th2 クラスターに載っている遺伝子の発現が顕著に抑制されることから、LCR としての働きが考えられている。Spilianakis らは、この領域が同一染色体上に存在する複数の遺伝子を統合的に結合することが LCR としての働きであるという、“Interchromosomal associations” とよぶ新しい制御メカニズムを提唱している³³⁾。

Il13/Il4 locus を含めた 200 kb にわたるクロマチンの構造変化を統合的に制御する転写因子として、STAB1(special AT0 rich sequence binding protein 1)が報告されている³⁴⁾。STAB1 を中心として、*Il4* locus に存在する CNS-1 や CNS-2 は、*Il13* や *Il5* のプロモーターと結合することにより、Th2 クラスターに載っている遺伝子の発現が統合的に制御される可能性を提唱している。この場合、STAB1 の RHS7 領域への結合が比較的弱いこと

は、RHS7 による LCR としての働きと STAB1 によるクロマチン構造の制御は別の働きであるとも考えられる。また、Th1 において STAB1 と同じような insulator 的働きをもつ CCCTC-binding factor (CTCF)³⁵⁾が、Th2 分化においてもクラスターに載っている遺伝子の発現に関与していることが、CTCF 欠損マウスの解析から報告されている³⁶⁾。Th2 クラスターに載っている遺伝子の多くは一見包括的にコントロールされているようにもみえるが、単一な細胞でみた場合、IL-4 と IL-13 の産生がかならずしも同調しているわけではない。また、LCR 欠損マウスで Th2 クラスター遺伝子が完全に消失するわけでもない。そのため、LCR による制御がどこまで有効な手段として Th2 クラスター遺伝子に働いているのか疑問も残るところである。

● マスト細胞・好塩基球における IL-4 産生制御メカニズム

IL-4 を産生する細胞は、なにも Th2 細胞や NKT 細胞だけではなく、マスト細胞、好塩基球、好酸球といった細胞集団からも産生があることが知られている。とくに好塩基球から産生される IL-4 は、アレルギー病体形成に重大な役割を担っていることが報告されている³⁷⁻³⁹⁾。しかし、その産生制御過程が T 細胞と同様のシステムを使っているのかどうかについては、ほとんどわかっていなかった。著者らは GFP をレポーターとしたトランスジェニックシステムを用い、HS2 と HS4 がそれぞれマスト細胞と好塩基球における IL-4 産生を制御するエンハンサーとして働くことを報告している⁴⁰⁾。実際、これら領域を欠損させたマウスでは、それぞれマスト細胞・好塩基球特異的に IL-4 の産生がなくなることがわかってきている。このことから、マスト細胞と好塩基球では、T 細胞とは異なるメカニズムを使って IL-4 の産生が制御されているようであった。

● おわりに

以上述べてきたように、IL-4 産生制御にはこれまで多くの転写因子の関与やエピジェネティックな制御などが報告されてきており、かなり詳細な

部分まで明らかにされたことはいうまでもない。しかし、以下に列挙するような大きな疑問が残されたままになっている。

- ① GATA-3 の発現が Th2 分化に伴う IL-4 産生制御に重要であることは明らかにされた、では、どのようにクロマチン構造の変化に影響を与え、IL-4 産生制御を規定しているのか。
- ② GATA-3 と複数の Th2 サイトカイン遺伝子の包括的制御について、GATA-3 がどのようにして複数の遺伝子の制御を同時にできるのか。
- ③ LCR による包括的制御の必要性。マスト細胞・好塩基球においても LCR は T 細胞と同じように働くのか。
- ④ マスト細胞・好塩基球における IL-4 産生制御メカニズム。

文献

- 1) Zheng, W. and Flavell, R. A. : *Cell*, **89** : 587-596, 1997.
- 2) Kurata, H. et al. : *Immunity*, **11** : 677-688, 1999.
- 3) Ouyang, W. et al. : *Immunity*, **12** : 27-37, 2000.
- 4) Lee, H. J. et al. : *J. Exp. Med.*, **192** : 105-115, 2000.
- 5) Zhu, J. et al. : *Nat. Immunol.*, **5** : 1157-1165, 2004.
- 6) Das, J. et al. : *Nat. Immunol.*, **2** : 45-50, 2001.
- 7) Amsen, D. et al. : *Immunity*, **27** : 89-99, 2007.
- 8) Fang, T. C. et al. : *Immunity*, **27** : 100-110, 2007.
- 9) Yang, X. O. et al. : *Nat. Immunol.*, **10** : 1260-1266, 2009.
- 10) Liu, Z. et al. : *J. Immunol.*, **183** : 6320-6329, 2009.
- 11) Miaw, S. C. et al. : *Immunity*, **12** : 323-333, 2000.
- 12) Zhou, M. et al. : *J. Exp. Med.*, **194** : 1461-1471, 2001.
- 13) Kurata, H. et al. : *J. Immunol.*, **168** : 4538-4545, 2002.
- 14) Kimura, M. et al. : *Immunity*, **15** : 275-287, 2001.
- 15) Komine, O. et al. : *J. Exp. Med.*, **198** : 51-61, 2003.
- 16) Cote-Sierra, J. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** : 3880-3885, 2004.
- 17) Yamane, H. et al. : *J. Exp. Med.*, **202** : 793-804, 2005.
- 18) Zhu, J. et al. : *Immunity*, **19** : 739-748, 2003.
- 19) Tanaka, S. et al. : *Immunity*, **24** : 689-701, 2006.
- 20) Okamoto, M. et al. : *Nat. Immunol.*, **10** : 872-879, 2009.
- 21) Lee, D. U. et al. : *Immunity*, **16** : 649-660, 2002.
- 22) Crawford, G. E. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** : 992-997, 2004.
- 23) Loots, G. G. et al. : *Science*, **288** : 136-140, 2000.
- 24) Bagut, A. and Bix, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** : 11410-11415, 2004.
- 25) Yamashita, M. et al. : *J. Biol. Chem.*, **277** : 42399-

42408, 2002.

- 26) Seki, N. et al. : *J. Immunol.*, **172** : 6158-6166, 2004.
- 27) Koyanagi, M. et al. : *J. Biol. Chem.*, **280** : 31470-31477, 2005.
- 28) Ansel, K. M. et al. : *Nat. Immunol.*, **5** : 1251-1259, 2004.
- 29) Djuretic, I. M. et al. : *Nat. Immunol.*, **8** : 145-153, 2007.
- 30) Mohrs, M. et al. : *Nat. Immunol.*, **2** : 842-847, 2001.
- 31) Solymar, D. C. et al. : *Immunity*, **17** : 41-50, 2002.
- 32) Lee, G. R. et al. : *Nat. Immunol.*, **6** : 42-48, 2005.
- 33) Spilianakis, C. G. et al. : *Nature*, **435** : 637-645,

2005.

- 34) Cai, S. et al. : *Nat. Genet.*, **38** : 1278-1288, 2006.
- 35) Sekimata, M. et al. : *Immunity*, **31** : 551-564, 2009.
- 36) Ribeiro de Almeida, C. et al. : *J. Immunol.*, **182** : 999-1010, 2009.
- 37) Sokol, C. L. et al. : *Nat. Immunol.*, **9** : 310-318, 2008.
- 38) Sokol, C. L. et al. : *Nat. Immunol.*, **10** : 713-720, 2009.
- 39) Yoshimoto, T. et al. : *Nat. Immunol.*, **10** : 706-712, 2009.
- 40) Yagi, R. et al. : *Mol. Cell. Biol.*, **27**(23) : 8087-8097, 2007.

* * *