



Th2分化の調節機構

東京理科大学生命科学研究所 生命工学技術研究部門

久保 允人

感染・炎症・免疫 第40巻 第1号 別刷

平成22年4月10日発行

東京 医薬の門社

Th2 分化の調節機構

久保 允人*



くぼ まさと

1991年東京大学大学院医学系研究科にて医学博士を取得後、トロント大学に続きSyntex Research研究所に留学。日本シンテックス新治リサーチセンター免疫研究所にて研究員を経て、1995年より東京理科大学生命科学研究科、2000年より同助教授。2003年より理研横浜研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター シグナルネットワークチーム チームリーダー、2009年より東京理科大学生命科学研究科 生命工学技術部門 教授を兼任。阪神タイガース/柏レイソルファン。

Summary

Th2細胞は、抗体産生を制御することにより細胞外で増殖する微生物に対する感染防御反応を制御するヘルパーT細胞と考えられている。特にTh2細胞から産生されるインターロイキン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抗体のクラススイッチを誘導する事から、Th2細胞はアレルギーを制御するヘルパーT細胞としてよく知られる存在となった。Th2細胞を含めたヘルパーT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、Th2細胞の分化制御に関わる分子メカニズムについて、分化の方向性を制御するサイトカインシグナル、直接的に分化を方向付ける転写因子、これら転写因子によって制御される遺伝子レベルでの制御(エピジェネティクスな制御)それぞれについてこれまでの知見をもとに紹介する。

Key words : T細胞, サイトカイン, 分化, 転写因子, エピジェネティクス

I. Th2細胞の機能

Th2細胞はIL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13などを産生することにより、抗体産生を制御するとともに、原虫・寄生虫・マイコプラズマなど主に細胞外で増殖する微生物に対する感染防御反応を制御するヘルパーT細胞である(図1)。特にこの細胞から産生されるIL-4は、抗原認識に伴うT-B相互作用の際、IgG1とIgE抗体のクラススイッチを誘導することにより、B細胞を抗体産生細胞(プラズマ細胞)へと変化させる。一方、IL-5は好酸球の増殖を制御することにより、IL-9とIL-13はこれらの受容体を多く発現する気道上皮に働くことにより、ともに喘息病態において炎症反応を制御する機能性サイトカインとして働く。肥満細胞上には、IgEに特異的な受容体が発現しており、IL-4によりB細胞からの産生が誘導されたIgE

抗体は、その受容体に結合する。この肥満細胞上のIgE抗体に特異抗原が結合すると、肥満細胞が活性化され、さまざまなメディエーターが放出されることにより、アレルギー反応は制御されている。このことから、Th2細胞は、アレルギー病態と深い関係があるサブセットといえる。ヘルパーT細胞はナイーブT細胞より分化する機能型T細胞である。本稿では、この細胞の分化制御のメカニズムについてこれまでの知見をもとに紹介する。

II. Th2分化を制御するサイトカインシグナル

Th2細胞の分化過程には、T細胞抗原レセプター(TCR)を介した抗原による刺激に加え、IL-4の存在が必要とされる。これはIL-4-STAT6を介して誘導されるGATA-3が、Th2への運命決定に際して重要な働きを持つからである(図2)。IL-4

* 東京理科大学生命科学研究科
生命工学技術研究部門
〒278-0022
千葉県野田市山崎2669
理化学研究所横浜研究所
免疫・アレルギー
科学総合研究センター
シグナル・ネットワーク
研究チーム
〒230-0045
神奈川県横浜市鶴見区末広町
1-7-22
E-mail
raysolfc@rcai.rikem.jp

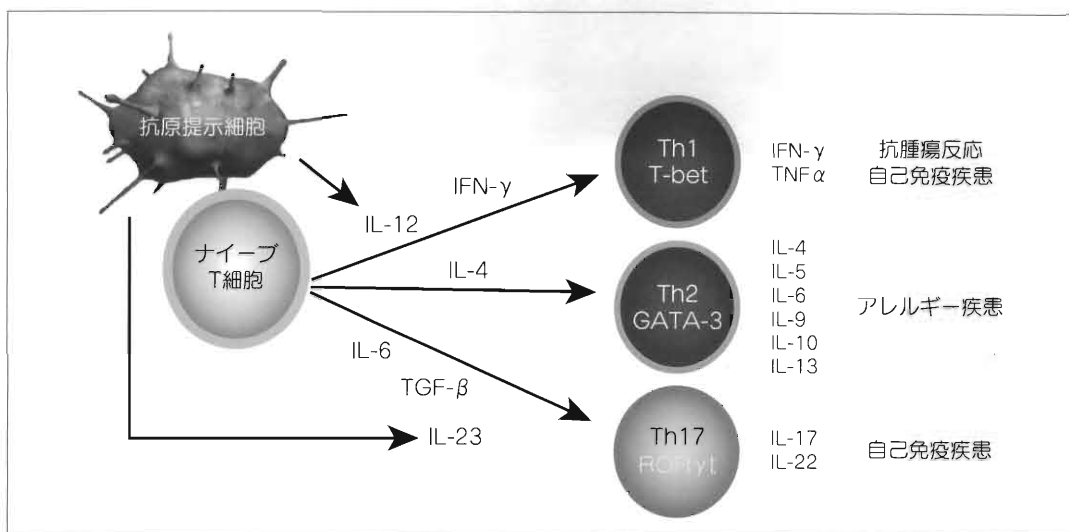


図1 免疫反応を制御するヘルパー T細胞とサイトカイン

IFN- γ : マクロファージの活性化, CTLの活性化, Th1細胞の分化制御, Th2分化抑制

TGF- β : 細胞障害活性, マクロファージの活性化, 好中球の活性化

IL-4: B細胞・T細胞の増殖因子, B細胞 IgEクラススイッチ, Th2細胞の分化制御, Th1分化抑制

IL-13: 喘息 気道炎症反応

IL-5: 好酸球の増殖因子, B細胞 IgAクラススイッチ

IL-10: マクロファージ活性化抑制

IL-17: 上皮細胞などからのIL-6の誘導, 炎症病態に関連

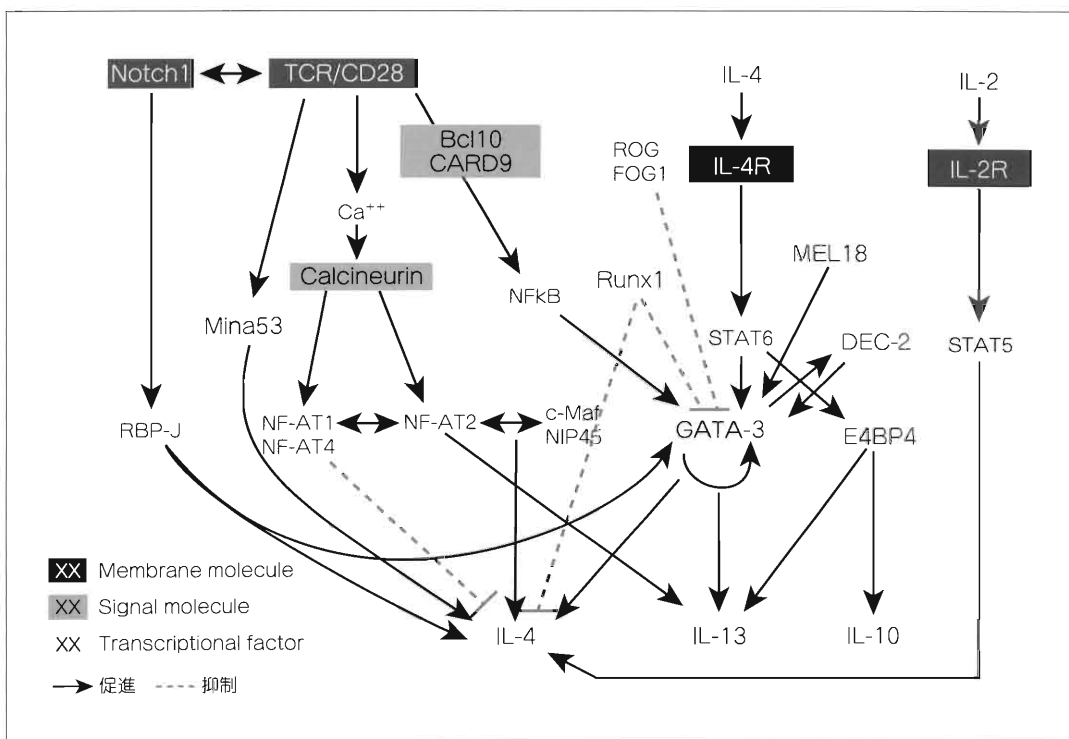


図2 Th2分化にかかわるシグナル伝達経路

受容体の活性化によって, Jak-STAT 経路はSTAT6をリン酸化させ, 核へと移行させる. STAT6はGATA-3の遠位プロモーターに存在する認識配列に結合してGATA-3の発現を誘導する. IL-4によって誘導されたGATA-3蛋白はGata3遺伝子

座の近位プロモーター領域に存在する認識配列にさらに結合し, オートクライン経路によりその発現を増強させ最終的にTh2分化を誘導する(図2)¹⁾. このように発現が誘導されたGATA-3は, *Il4* 遺伝子座に結合することにより, そのクロマ

チン構造に変化を与え、Th2分化を決定している²⁾。IL-4シグナルの下流で働くSTAT6を欠損するマウスでは、起点となるGATA-3が発現しないため、Th2分化は抑制されてしまう。このSTAT6欠損T細胞にGATA-3をレトロウイルスベクターを用いて高発現させると、*Il4*遺伝子座にクロマチンの構造変化を引き起こすと同時にTh2分化が誘導される^{3~5)}。さらにGATA-3分子の重要性は、OX40のpromoterを用い、活性化したT細胞特異的にGATA-3の発現を欠失させたT細胞において証明されている。GATA-3を欠くT細胞は、ナイーブT細胞からのTh2分化過程が完全に消失するのに対し、分化を完了したTh2細胞のIL-4産生は正常であることから、GATA3はTh2分化を制御するマスターレギュレーターである事が証明された⁶⁾。

ナイーブT細胞がTh2分化する際、低レベルのIL-4の発現が必要であると考えられている。この初期抗原刺激時でのIL-4の産生には、IL-2を介したSTAT5の活性化が必要とされる(図2)^{7, 8)}。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、分化過程でのIL-4の添加で再構築することができる⁹⁾。すなわち、ナイーブT細胞がTh2分化するために必要とされる微量なIL-4を発現するためには、IL-2-STAT5経路の活性化が必要と考えられている。

III. Th2バイアスを決める遺伝的要因

アレルギーに「なりやすい」「なりにくい」

といった体質には、過剰なTh2反応を引き起こす遺伝的要因が関係していると考えられてきた。我々はTh2反応が異なる近交系マウスを用い、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¹⁰⁾。この遺伝子はMina53という脱メチル化酵素活性を有するJmjdドメイン構造を持った分子で、その発現はTCR刺激によって上昇する。高いTh2反応を示すTh2バイアスマウス系統(BALB/c)ではMina53の発現が低レベルで留まるのに対し、低い反応性を持つマウス系統(C57BL/6, C57BL10)ではその発現が高いことから、Mina分子はIL-4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働きを持つことから、Mina分子はIL-4のリプレッサーとして働くことで、Th2バイアスを決める遺伝的因子として働いている(図2)。

IV. Th2分化のマスターレギュレーター GATA-3

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細胞の初期分化過程から発現しており、この分子を欠損するマウスではT細胞の分化は発生初期段階で止まってしまうため、T細胞が存在しない。GATA-3にはファミリーが存在し、GATA-1, GATA-2などの存在が知られおり、GATA-3のみがT細胞で発現する。GATA-3の発現は胸腺における分化初期過程で高く、成熟したCD4 T細胞では非常に低く、末梢に存在

するT細胞ではその発現は非常に低く保たれ、前述したようにその発現は末梢ではIL-4によって厳格に制御されている。

GATA-3の発現にはIL-4-STAT6経路だけではなく、NF κ B経路の存在が必要とされる(図2)¹¹⁾。NF κ Bはp55とp65の2量体からなる転写因子で、広範囲な炎症性サイトカインの転写制御に関わっている。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誘導されることが知られている。NF κ Bを欠損するマウスでは、GATA-3が発現しないためTh2分化が起こらないことが報告されている。このことからTCRやCD28で活性化が規定されているNF κ Bは、IL-4シグナルと協調することによってGATA-3の発現を誘導していることが示された¹²⁾。

また、*Gata3*遺伝子の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ている。Notch1-Jagged1を介して起動されたシグナルはRBP-Jが遠位プロモーターに結合することによりGATA-3の発現を制御している可能性が示されている(図2)^{13, 14)}。この場合NotchシグナルはIL-4シグナルを必要としないため、IL-4シグナル非依存的に起こるTh2分化はこの経路を介している可能性が考えられている。一方で、このNotchシグナルは*Il4*遺伝子に直接働くことで、NKTやメモリーT細胞におけるIL-4産生を制御している(図2)¹⁵⁾。

また最近、Th2で高く発現する転写因子としてDec2の存在が注目されている。Dec2はGATA-3が効率よく発現するため

に必須な分子である(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¹⁶⁾。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¹⁷⁾。

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¹⁸⁾。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に結合してその働き抑制的に制御する^{19, 20)}。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²¹⁾。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、*Gata3*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。これによりTCRからのシグナルは、Runx-1の発現を抑えることにより、GATA-3の発現抑制を解除している²²⁾。

V. Th2サイトカイン遺伝子座におけるクロマチン制御

1. Th2サイトカイン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

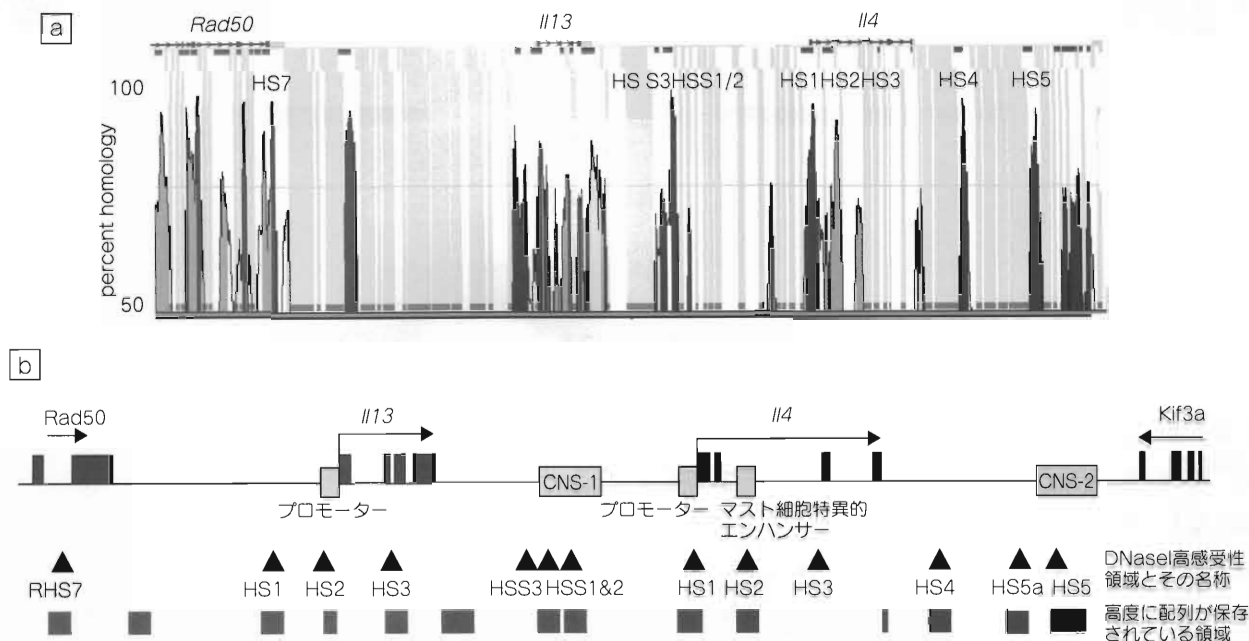


図3 IL13/IL4遺伝子座におけるゲノム配列の保存とDNase I高感受性領域(HS領域)

① 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：イントロン、黄色：3'非転写領域、赤：非転写領域

② IL13/IL4遺伝子座におけるHS領域

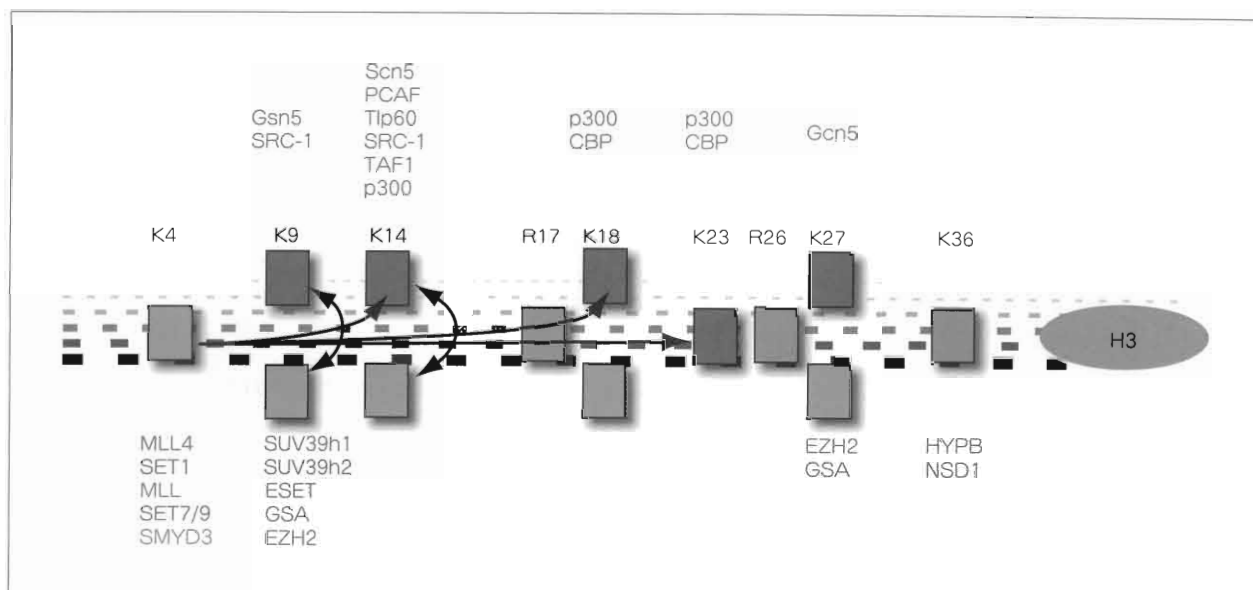
ければならない。そのためには、クロマチンの立体構造を変化させ、転写を制御する領域に転写因子が会合し易い状況を作るクロマチンの構造変化(クロマチンリモデリング)が必要となる。この構造変化が起こる動態はDNase Iの制限酵素に対する感受性を指標に追跡することができ、このDNase Iに対して高感受性を持つ領域をHS領域と呼んでいる。IL4遺伝子座の両側に存在する2つの遺伝子、IL13遺伝子座と分子モーター Kif3a遺伝子座の間には11カ所のHS領域が存在し、IL13とIL4遺伝子間に存在するHSS3とIL4遺伝子3'側にあるHS4以外は、Th2分化特異的に現れるHS領域である。HSS3とHS4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IL13遺伝子でも3カ所存在している(図3)^{23, 24)}。

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第5染色体の5q31領域に、マウスでは第11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良く保存されている。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、非常に限られた領域においてのみ高い相同性が見られる。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(CNS; conserved noncoding sequence)が16カ所存在する(図3)²⁵⁾。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と呼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に渡る領域でマウスとヒトとの間で84%の相同性が保たれ、HS領域HSS1とHSS2に相当する。CNS-2はIL4遺伝子の3'下流約6.5Kに存在する163 bpに渡る領域で、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. クロマチン制御とヒストン修飾

Th2分化過程におけるサイトカイン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呼ばれ、4種類のヒストン(H2A, H2B, H3, H4)からなるコアヒストンの周りに146塩基からなるDNA二重らせんが巻き付いた構造からなる。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、クロマチンレベルでの構造変化、リモデリングを引き起こす必要がある。

チルトランスフェラーゼ (HAT ; Histone acetyl transferase) 活性を持つ p300, CBP によって制御され, 一方 H3K4 のメチル化はメチルトランスフェラーゼである MLL によって制御される. *Il13/Il4* 遺伝子座に存在する HS 領域の多く (HSS1, HSS2, HS1, HS2, HS3, HS5) は, Th2 分化に伴いヒストンがアセチル化され, H3K4 がメチル化される事によりクロマチンリモデリングが決定する²⁶⁾. ナイーブ CD4 T 細胞は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れた状態となり, 転写因子が結合しやすい状況が作られる. Th1 分化環境下でこのアセチル化はその後急速に減衰する一方, Th2 分化環境下ではアセチル化は維持される. このとき, H3K4 のメチル化は刺激後 36 ~ 48 時間の間で Th2 でのみ観られる²⁷⁾ ことから, H3K4 のメチル化は 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. また, この IL-4 を介した GATA-3 による Th2 への運命決定は, TCR シグナル導入後

48時間以内に規定されていることと考え合わせると、GATA-3によるTh2分化決定とH3K4のメチル化のタイミングは一致していることと言える²⁸⁾。

H3K9とH3K27で起こるメチル化はサイレンシングに関わるヒストンマークとして知られている。メチル化したH3K27にはポリコーム分子であるEZH2が、H3K9にはSuv39が特異的に会合する。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。そのため、HS4はEZH2などのポリコームにより抑制的制御される領域とも考えられている²⁹⁾。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産生が起こることから、ここは抑制制御に関わるサイレンサー領域と考えられている³⁰⁾。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することで、サイレンサー機能が制御されることが報告されている³¹⁾。

3. ゲノム欠損マウスによるHS領域の役割の解析

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。いずれのマウスも、2次抗原刺激時での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^{32, 33)}。我々の解析では、CNS-2はNotchシグナルによって制御されており、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産生に局限している¹⁵⁾。実際、CNS-2欠損マウスでは、初期抗原刺激時におけるIL-4産生が完全に消失する一方、ナイーブT細胞をTh2分化条件においたときに見られる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。

IL13欠損マウス

このTh2サイトカインを包括的に制御するLCRの存在は、*Il13*遺伝子のエクソン3とエクソン1いずれかを欠く*Il13*欠損マウスにおいても、IL-13とは無関係なIL-4産生に対してもTh2細胞特異的に抑制が認められることから予想されてきた^{34, 35)}。この抑制はIL-13を添加しても回復しないことから、ゲノムを欠失したことによる構造変化による影響とも考えられる。この*Il13*遺伝子には、2つのプロモーター領域HS1とHS2が存在しており、山下らはH3のアセチル化の解析から、遠位プロモーター(HS1)が*Il4*と*Il13*遺伝子の両方を共通に制御できる領域である可能性を提唱している²⁷⁾。しかしながら、我々が作成したpIL13 HS1の欠損マウスでは、IL-13の産生は完全に消失したが、IL-4産生には全く影響を与えることはなかったことから、この領域は*Il13*遺伝子に特異的に働くプロモーターと考えられた。

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³⁰⁾。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³¹⁾。しかしながら、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細胞でも見られることから、ナイーブT細胞において発現が見られるRunx1がリプレッサーとして機能する可能性も示唆されている。

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として働いていることが示唆されている³⁶⁾。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、この領域のLCRとしての働きであるというInterchromosomal associationsと呼ぶ新しい制御メカニズムを提唱している³⁷⁾。

Il13/Il4 locusを含めた200kbに渡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 AT0rich sequence binding protein 1)が報告されている³⁸⁾。STAB1を中心として、*Il4* locusに存在するCNS-1やCNS-2は、*Il13*や*Il5*遺伝子上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領域への結合は比較的弱いことは、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的働きを持つCCCTC-binding factor (CTCF)³⁹⁾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⁴⁰⁾。このように、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見えるが、単一な細胞でみた場合、IL-4とIL-13の産生が必ず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による制御が何処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。

おわりに

以上述べてきたように、これまで多くの転写因子の関与、エピジェネティクスな制御などが報告され、Th2分化のメカニズムについては、かなり詳細な部分まで明

らかにされたことは言うまでもない。しかしながら、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ことも事実である。

1) GATA-3が発現することがTh2分化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、分化を規定しているのか？

2) GATA-3とTh2クラスター遺伝子の包括的制御あるいはLCRとの関係

どうやって、GATA-3はTh2クラスター遺伝子の発現制御を包括的に制御しているのか？

3) LCRによる包括的制御の必要性

それぞれの遺伝子が単独で制御されており、GATA-3のような共通の転写因子が関わることで、一見包括的制御が成されたように見えている可能性。

私がTh2に関する研究を始めた20年前は、*Il4*のプロモーターの存在さえ分からなかった時代だったが、以後の急速な研究の進展から考えると、これらの疑問が明らかになるときはそれほど遠くないように思う。

参 考 文 献

- 1) Ranganath S, and Murphy KM. Structure and specificity of GATA proteins in Th2 development. *Molecular and cellular biology* 2001; 21: 2716-25.
- 2) Zheng W, and Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89: 587-96.
- 3) Kurata H, Lee HJ, O'Garra A, and Arai N. Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity* 1999; 11: 677-88.
- 4) Ouyang W, Lohning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A, and Murphy KM. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 2000; 12: 27-37.
- 5) Lee HJ, Takemoto N, Kurata H, Kamogawa Y, Miyatake S, O'Garra A, and Arai N. GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *The Journal of experimental medicine* 2000; 192: 105-15.
- 6) Zhu J, Min B, Hu-Li J, Watson CJ, Grinberg A, Wang Q, Killeen N, Urban JF Jr, Guo L, and Paul WE. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nature immunology* 2004; 5: 1157-65.
- 7) Cote-Sierra J, Foucras G, Guo L, Chiodetti L, Young HA, Hu-Li J, Zhu J, and Paul WE. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 3880-5.
- 8) Yamane H, Zhu J, and Paul WE. Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4+ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. *The Journal of experimental medicine* 2005; 202: 793-804.
- 9) Zhu J, Cote-Sierra J, Guo L, and Paul WE. Stat5 activation plays a critical role in Th2

- differentiation. *Immunity* 2003; 19: 739-48.
- 10) Okamoto M, Van Stry M, Chung L, Koyanagi M, Sun X, Suzuki Y, Ohara O, Kitamura H, Hijikata A, Kubo M, and Bix M. Mina, an Il4 repressor, controls T helper type 2 bias. *Nature immunology* 2009; 10: 872-9.
- 11) Das J, Chen CH, Yang L, Cohn L, Ray P, and Ray A. A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nature immunology* 2001; 2: 45-50.
- 12) Rodriguez-Palmero M, Hara T, Thumbs A, and Hunig T. Triggering of T cell proliferation through CD28 induces GATA-3 and promotes T helper type 2 differentiation *in vitro* and *in vivo*. *European journal of immunology* 1999; 29: 3914-24.
- 13) Amsen D, Antov A, Jankovic D, Sher A, Radtke F, Souabni A, Busslinger M, McCright B, Gridley T, and Flavell RA. Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* 2007; 27: 89-99.
- 14) Fang TC, Yashiro-Ohtani Y, Del Bianco C, Knoblock DM, Blacklow SC, and Pear WS. Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* 2007; 27: 100-10.
- 15) Tanaka S, Tsukada J, Suzuki W, Hayashi K, Tanigaki K, Tsuji M, Inoue H, Honjo T, and Kubo M. The interleukin-4 enhancer CNS-2 is regulated by Notch signals and controls initial expression in NKT cells and memory-type CD4 T cells. *Immunity* 2006; 24: 689-701.
- 16) Yang XO, Angkasekwina P, Zhu J, Peng J, Liu Z, Nurieva R, Liu X, Chung Y, Chang SH, Sun B, and Dong C. Requirement for the basic helix-loop-helix transcription factor Dec2 in initial TH2 lineage commitment. *Nature immunology* 2009; 10: 1260-6.
- 17) Liu Z, Li Z, Mao K, Zou J, Wang Y, Tao Z, Lin G, Tian L, Ji Y, Wu X, Zhu X, Sun S, Chen W, Xiang C, and Sun B. Dec2 promotes Th2 cell differentiation by enhancing IL-2R signaling. *J Immunol* 2009; 183: 6320-9.
- 18) Miaw SC, Choi A, Yu E, Kishikawa H, and Ho IC. ROG, repressor of GATA, regulates the expression of cytokine genes. *Immunity* 2000; 12: 323-33.
- 19) Zhou M, Ouyang W, Gong Q, Katz SG, White JM, Orkin SH, and Murphy KM. Friend of GATA-1 represses GATA-3-dependent activity in CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 2001; 194: 1461-71.
- 20) Kurata H, Lee HJ, McClanahan T, Coffman RL, O'Garra A, and Arai N. Friend of GATA is expressed in naive Th cells and functions as a repressor of GATA-3-mediated Th2 cell development. *J Immunol* 2002; 168: 4538-45.
- 21) Kimura M, Koseki Y, Yamashita M, Watanabe N, Shimizu C, Katsumoto T, Kitamura T, Taniguchi M, Koseki H, and Nakayama T. Regulation of Th2 cell differentiation by mel-18, a mammalian polycomb group gene. *Immunity* 2001; 15: 275-87.
- 22) Komine O, Hayashi K, Natsume W, Watanabe T, Seki Y, Seki N, Yagi R, Sukzuki W, Tamauchi H, Hozumi K, Habu S, Kubo M, and Satake M. The Runx1 transcription factor inhibits the differentiation of naive CD4+ T cells into the Th2 lineage by repressing GATA3 expression. *The Journal of experimental medicine* 2003; 198: 51-61.
- 23) Lee DU, Agarwal S, and Rao A. Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. *Immunity* 2002; 16: 649-60.
- 24) Crawford GE, Holt IE, Mullikin JC, Tai D, Blakesley R, Bouffard G, Young A, Masiello C, Green ED, Wolfsberg TG, and Collins FS. Identifying gene regulatory elements by genome-wide recovery of DNase hypersensitive sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 992-7.
- 25) Loots GG, Locksley RM, Blankespoor CM, Wang ZE, Miller W, Rubin EM, and Frazer KA. Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science (New York, N.Y)* 2000; 288: 136-40.
- 26) Baguet A, and Bix M. Chromatin landscape dynamics of the Il4-Il13 locus during T helper 1 and 2 development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 11410-5.
- 27) Yamashita M, Ukai-Tadenuma M, Kimura M, Omori M, Inami M, Taniguchi M, and Nakayama T. Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal from the interleukin-13 gene locus. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277: 42399-408.
- 28) Seki N, Miyazaki M, Suzuki W, Hayashi K, Arima K, Myburgh E, Izuhara K, Brombacher F, and Kubo M. IL-4-induced GATA-3 expression is a time-restricted instruction switch for Th2 cell differentiation. *J Immunol* 2004; 172: 6158-66.
- 29) Koyanagi M, Baguet A, Martens J, Margueron R, Jenuwein T, and Bix M. EZH2 and histone 3 trimethyl lysine 27 associated with Il4 and Il13 gene silencing in Th1 cells. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280: 31470-7.
- 30) Ansel KM, Greenwald RJ, Agarwal S, Bassing CH, Monticelli S, Interlandi J,

- Djuretic IM, Lee DU, Sharpe AH, Alt FW, and Rao A. Deletion of a conserved IL4 silencer impairs T helper type 1-mediated immunity. *Nature immunology* 2004; 5: 1251-9.
- 31) Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, and Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence IL4 in T helper type 1 cells. *Nature immunology* 2007; 8: 145-53.
- 32) Mohrs M, Blankespoor CM, Wang ZE, Loots GG, Afzal V, Hadeiba H, Shinkai K, Rubin EM, and Locksley RM. Deletion of a coordinate regulator of type 2 cytokine expression in mice. *Nature immunology* 2001; 2: 842-7.
- 33) Solymar DC, Agarwal S, Bassing CH, Alt FW, and Rao A. A 3' enhancer in the IL-4 gene regulates cytokine production by Th2 cells and mast cells. *Immunity* 2002; 17: 41-50.
- 34) McKenzie GJ, Emson CL, Bell SE, Anderson S, Fallon P, Zurawski G, Murray R, Grecis R, and McKenzie AN. Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity* 1998; 9: 423-32.
- 35) Guo L, Hu-Li J, Zhu J, Pannetier C, Watson C, McKenzie GJ, McKenzie AN, and Paul WE. Disrupting IL13 impairs production of IL-4 specified by the linked allele. *Nature immunology* 2001; 2: 461-6.
- 36) Lee GR, Spilianakis CG, and Flavell RA. Hypersensitive site 7 of the TH2 locus control region is essential for expressing TH2 cytokine genes and for long-range intrachromosomal interactions. *Nature immunology* 2005; 6: 42-8.
- 37) Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, Lee GR, and Flavell RA. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* 2005; 435: 637-45.
- 38) Cai S, Lee CC, and Kohwi-Shigematsu T. SATB1 packages densely looped, transcriptionally active chromatin for coordinated expression of cytokine genes. *Nature genetics* 2006; 38: 1278-88.
- 39) Sekimata M, Perez-Melgosa M, Miller SA, Weinmann AS, Sabo PJ, Sandstrom R, Dorschner MO, Stamatoyannopoulos JA, and Wilson CB. CCCTC-binding factor and the transcription factor T-bet orchestrate T helper 1 cell-specific structure and function at the interferon-gamma locus. *Immunity* 2009; 31: 551-64.
- 40) Ribeiro de Almeida C, Heath H, Krcic S, Dingjan GM, van Hamburg JP, Bergen I, van de Nobelen S, Sleutels F, Grosveld F, Galjart N, and Hendriks RW. Critical role for the transcription regulator CCCTC-binding factor in the control of Th2 cytokine expression. *J Immunol* 2009; 182: 999-1010.