

1 IL4遺伝子の制御とアレルギーとの関与

Regulation of IL4 gene expression and allergic responses

- 1) 東京理科大学 生命科学研究所 分子病態研究部門
2) 独立行政法人 理化学研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター

もとむら やすたか くほ まさと
本村 泰隆¹⁾・久保 允人¹⁾²⁾



本村 泰隆
2005年東京理科大学理工学部卒業，'05-'07東京理科大学大学院生命科学研究科修士課程，'07-'2010東京医科歯科大学生命情報科学教育部高次生命科学専攻博士課程，'10-'12東京理科大学大学院生命科学ポストドクトラルフェロー研究員。研究テーマ：Th2サイトカイン遺伝子の発現制御機構の解明。

Key words：GATA-3，クロマチン構造変化，DNase I 高感受性領域，包括的発現制御機構

Abstract

花粉症を代表とするアレルギー病態はTh2細胞により引き起こされることが明らかとなってきた。Th2細胞は、IL-4, IL-5, IL-13を産生することで好酸球などを活性化してアレルギー炎症を制御している。これらTh2が産生する一連のサイトカインはTh2サイトカインと呼ばれ、その発現は同調的に制御されている。この同調的制御をコントロールするマスターレギュレーターとして転写因子GATA-3の存在が明らかにされてきた。

しかしながら、GATA-3の同調的Th2サイトカイン遺伝子の制御機構については不明な点が多く残されている。我々は個々のサイトカイン遺伝子で起こるGATA-3によるエピジェネティックな制御を見つめることにより、この問題に向き合うことをしてきた。その結論として、抗原刺激によるT細胞の活性化はヒストンを制御することでGATA-3がアクセスできる足場を構築し、特定の場所にGATA-3がアクセスすると言うことが複数のTh2サイトカイン遺伝子で起こることが同調的制御に繋がることが分かってきた。本稿では、細

胞分化の過程においてTh2細胞におけるサイトカイン遺伝子の同調的発現機構について、これまで提唱されたモデルを紹介するとともに、最近の我々の研究成果を交え論議したい。

はじめに

ナイーブCD4T細胞は外来抗原に出会うと、ヘルパーT細胞へと分化する。その際、特定のサイトカインを産生する能力を獲得し、病原体を排除するのに適した免疫応答を誘導する。ヘルパーT細胞は産生するサイトカインのパターンによって、Interferon(IFN)- γ を主に産生するTh1細胞、IL-4, IL-5, IL-13を産生するTh2細胞、IL-17A, IL-17F, IL-22を産生するTh17細胞の少なくとも3種類のサブセットに分類されることが知られている。また、最近になってリンパ濾胞に局在して抗体産生に特化するヘルパー活性を持つT細胞；Follicular helper T cell (TFH)の存在が明らかにされている。これらT細胞サブセットは、産生するサイトカインの機能に基づき、異なる免疫応答や免疫疾患を制御している。Th2から産生されるIL-4は、B細胞におけるImmunoglobulin(Ig) G1あるいはIgE抗体の産

生に関与することで体液性免疫応答を制御するとともにTh2細胞の分化を促進する働きをもつ。

アレルギー病態ではアレルゲンの刺激により肥満細胞を活性化する。また、Th2細胞から産生されるIL-5、IL-13は、喘息病態においてエフェクターサイトカインとして働き、IL-5は好酸球の増殖・浸潤を制御し、IL-13は気道上皮に働いて炎症を誘導する。このことからアレルギー病態の誘導メカニズムの全貌を理解するためには、Th2細胞がこれらサイトカインを同時に産生できる能力を獲得するメカニズムを遺伝子レベルで理解することが重要な課題である。これまでの研究から、この過程にはTh2細胞分化決定のマスターレギュレーターである転写因子GATA-3の存在と複数のTh2サイトカイン遺伝子を包括的に制御する制御領域locus control region (LCR)の存在が必要であることが示されてきた。ところが、GATA-3とLCRがどのように複数のTh2サイトカインの発現を包括的に制御しているかについては、未解決の問題が数多く残されている。

1. クロマチン構造変化による Th2サイトカイン遺伝子の制御

IL-4、IL-5、IL-13などのTh2サイトカインの遺伝子はクラスターを形成してヒトでは第5染色体の5q31領域に、マウスでは第11染色体に載っており、その遺伝子座の構成は動物種で非常によく保存されている。遺伝子の転写スイッチは、それぞれの遺伝子座に存在するプロモーターやエンハンサーと呼ばれる制御領域で、構造を構成するクロマチンと呼ばれるゲノム構造自体が変化して、そこに転写を制御する蛋白質(転写因子)が会合できる状態になることでオン・オフが調節されている。ヘルパーT細胞としての機能を獲得する

ためには、分化の過程において特定のサイトカイン遺伝子の転写スイッチがオンになる必要となる。Th2細胞の分化過程において、Th2サイトカイン産生能の獲得はそれぞれの遺伝子座 (locus)でゲノムから構成される構造様式であるクロマチンに構造的変化が起こることで規定されている¹⁾。この構造変化を起したDNA領域は、DNase Iに対して感受性となることから、高感受性領域; hypersensitive site (HSもしくはHSSと呼ぶ)を指標としてクロマチン構造の変化を知ることができる。これまでにIL4遺伝子座、IL13遺伝子座には16ヶ所のHS領域が同定され²⁾(図1)、これらHS領域は動物種で非常によく保存されていることから、高い相同性を持つ非転写領域としてConserved Noncoding Sequence; CNSとも呼ばれている。

2. IL-4遺伝子のクロマチン制御と ヒストン修飾

染色体DNAの最小構造はヌクレオソームとよばれ、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、このヌクレオソ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いることが明らかにされており、ヒストン上の特定の場所で起こる化学修飾が遺伝子の活性化あるいは沈黙化の状態をコードしていることが提唱されている³⁾。活性化を示すヒストンコードとして、ヒストン3(H3)上の9番目と14番目のリジン残基(H3K9&K14)のアセチル化、と4番目のリジン残基(H3-K4)のメチル化がある。

IL-13/IL-4遺伝子座にはHS領域; HSS-1,

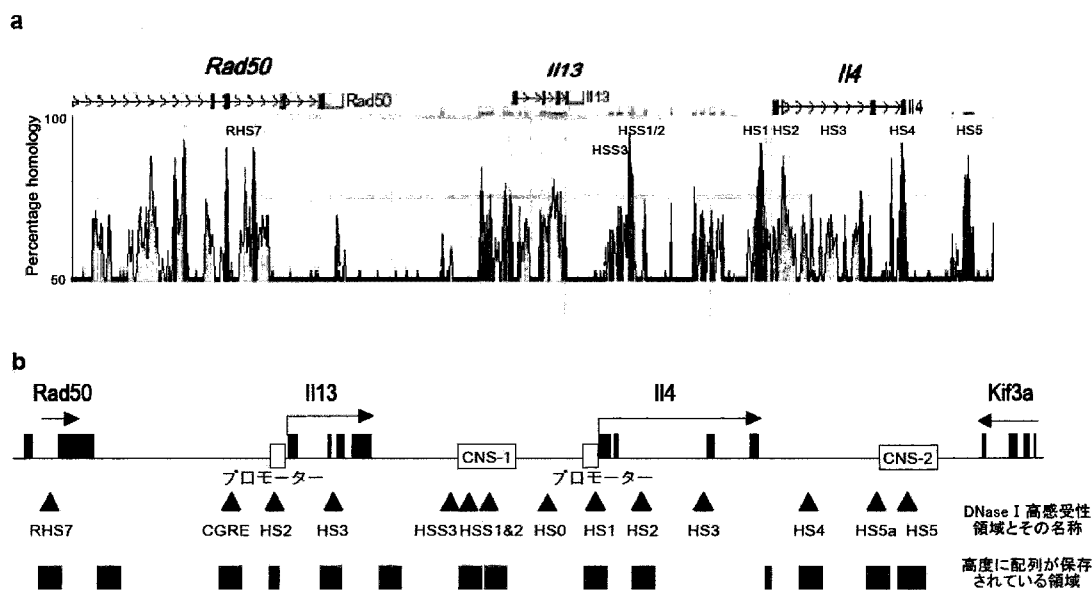


図1 II 13/II 4 遺伝子座における高度に保存されたゲノム領域と DNase I 高感受性領域(HS 領域)。HS 領域は、ヒトおよびマウスにおいて高い相同性を示す。

- a: マウスおよびヒト II13/II4 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 (モノクロ印刷のため判別不可)
b: II13/II4 遺伝子座における HS 領域

HSS-2, HS-1, HS-2, HS-3, HS-5, HS-5a が同定されており, これら領域は Th2 分化に伴いアセチル化され, H3-K4 のメチル化が観察される⁵⁾。分化前段階にあるナイーブ CD4T 細胞が, 抗原刺激を受けると分化条件に関わらず 24 時間以内にゲノム全体でヒストンのアセチル化が誘導され, 一時的にクロマチン構造が緩むため分化を制御する転写因子が結合しやすく状態が作られる⁶⁻⁸⁾。この一時的に起こるアセチル化は, Th1 細胞分化条件下ではそれ以後急速に減衰し, 最終的には完全に消失する。一方, Th2 細胞分化条件下では, アセチル化が維持されるとともに刺激後 48 時間以降に H3-K4 のメチル化が誘導されはじめる⁸⁾。以前, 我々は GATA-3 による Th2 への方向付けは抗原刺激後 48 時間以内に規定されことを報告した⁹⁾。これらの事実を考え合わせると, GATA-3 の働きは H3-K4 をメチ

ル化することで, クロマチンを活性化状態に固定する必要があることが想定された⁹⁾。

3. 転写制御領域 HS による IL-4 遺伝子の転写制御

我々は, Th2 細胞における制御領域 HS の働きを理解する目的で, II 4 遺伝子座に存在する CNS-1, CNS-2, 3' untranslated region (3' UTR), HS-2, HS-4 と II 13 遺伝子座の CGRE 領域それぞれを欠損させたマウスを作製した。それぞれの HS 領域を欠失したマウスより Th2 細胞を調整し, IL-4 産生に与える影響を検討する事でそれぞれの HS 領域の働きを解析した。CNS-1, CNS-2, 3' UTR の欠損では IL-4 の産生がそれぞれ 30%, 40%, 20% 程度低下していた。一方, HS-2 の欠損は, IL-4 の産生が非常に強く減弱されていた。この結果から, 当初マスト細胞特異的なエンハンサーと

◆特集/アレルギーの最先端研究—治療と予防への応用—◆

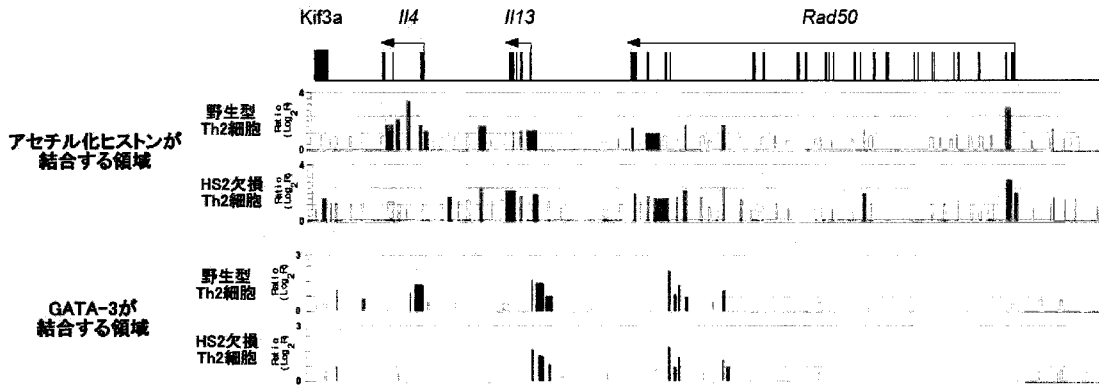


図2 HS2を欠失させたマウスにおけるアセチル化したヒストンが結合している領域と GATA-3 が結合する領域。赤で示した領域が結合している DNA 領域。HS2 を欠失させたマウスでは、IL-4 遺伝子座だけがアセチル化したヒストンも GATA-3 も結合できなくなる。

結合の度合い (赤:強い オレンジ:中程度 黄色:弱い 灰色:無し) (モノクロ印刷のため判別不可)

して同定された第2イントロンに存在する HS-2領域は、Th2細胞におけるIL-4の産生に必須であった¹⁰⁾。さらに、この領域はTh2マスターレギュレーターGATA-3が結合することができるが、クロマチン免疫沈降Chromosome immunoprecipitation (ChIP)法により証明された。したがって、Th2細胞におけるIL-4の産生には、HS-2領域にGATA-3が結合する必要があることが分かってきた。一方、HS-2欠損Th2細胞の分化誘導においては、TCR刺激後24時間で見られるヒストンのアセチル化は正常であったが、48時間以降にみられるメチル化とアセチル化は消失していた。この事から、HS-2はGATA-3が結合することによりII 4遺伝子座を転写可能な状態にする転写制御領域であることが明らかになった。また、HS-2の欠損は、IL-13、IL-5といったIL-4以外のTh2サイトカインの産生およびクロマチン制御には変化は及ぼさないことから、GATA3によるHS-2の制御はII 4遺伝子座に局限した現象である(図2)。

4. CGREによるIL-13産生制御

HS-2はその働きがII 4遺伝子座に局限して

いたことから、II 13遺伝子座にも同様にGATA3の制御を受けるHS領域の存在が想定された。Conserved GATA-3 responsive element(CGRE)はIL-13遺伝子の遠位プロモーターとして働くHS領域であり、当初GATA-3依存的にII 4~II 13遺伝子を包括的に制御するヒストンのアセチル化の起点となる領域として報告された⁹⁾。CGRE領域を欠損したマウスでは、IL-13遺伝子座へのGATA3の結合がなくなると同時に、Th2細胞におけるIL-13の産生は顕著に低下していた⁹⁾。これらIL-13に対する効果とは異なり、IL-4の産生は正常であったことより、GATA3によるCGREの制御はII13遺伝子座に局限した現象であった。この事から、GATA3はII13遺伝子座ではCGRE領域に、II 4遺伝子座ではCGRE領域にHS2領域にそれぞれ単独に結合してそれぞれの発現を包括的に制御している可能性が示された。

5. Th2サイトカイン遺伝子の包括的な発現制御

転写因子GATA-3は、Th2細胞分化のマスターレギュレーターとして知られ、その発現は

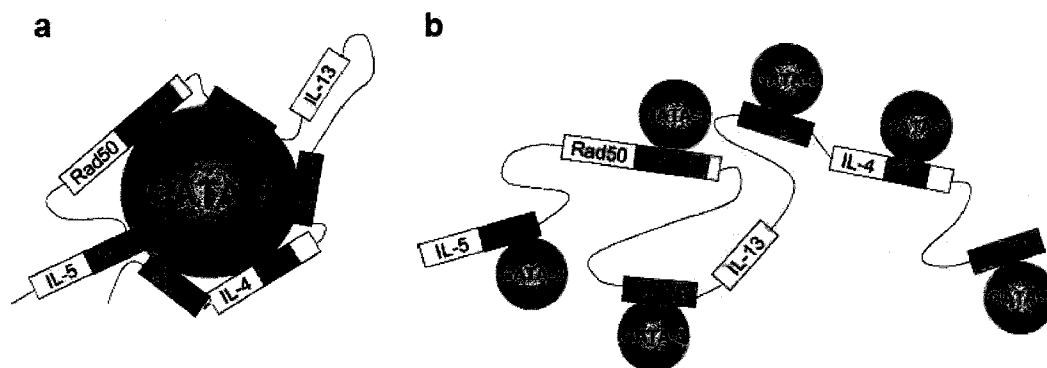


図3 Th2細胞におけるGATA-3によるTh2サイトカイン遺伝子座のHS領域を介したIL-4,IL-5,IL-13遺伝子の発現制御モデル

- a: GATA-3が‘ハブ’となり、複数のHS領域を集束することで、Th2遺伝子座におけるクロマチン構造を変化させ、Th2サイトカイン遺伝子の発現を「オン」にする。
 b: GATA-3は各遺伝子座におけるHS領域に独立して結合し、各々の遺伝子座におけるクロマチン構造を変化させ、発現を「オン」にする。

Th2の分化環境を構成するIL-4によって規定されている¹¹⁾。このことはGATA-3を欠失させたT細胞では、Th2細胞の分化が起らないことから明らかである¹²⁾。その際、GATA-3はTh2細胞で見られるHS領域を誘導することからTh2サイトカイン遺伝子の発現をクロマチンレベルでの制御が関与していることが示されている¹³⁾¹⁴⁾。GATA-3はTh2サイトカイン遺伝子クラスターに存在する複数のHS領域(RHS-7, CGRE, CNS-1, HS-2, CNS-2)に結合できる。Th2サイトカインに属する遺伝子は、包括的に発現が制御されていることから、GATA-3のこれらHS領域がこの包括的制御に関わることが従来から予想されていた。この包括的制御を説明するため、以下の2つのモデルが考えられる。

Flavellらは、Th2サイトカイン遺伝子クラスター全体をコントロールする制御領域、Locus Control Region, LCRの存在を想定したIntrachromosomal Interactionsモデル(図3a)を提唱し、IL-13遺伝子座の上流に位置する複製修復酵素Rad50遺伝子座の3'側イントロン内にLCRとして機能するRHS-7を同定した。このモデルでは、LCRとGATA-3が複

数のHS領域をつなぎ合わせる‘ハブ’として働くことが、クラスター内に存在するTh2サイトカイン遺伝子の包括的制御に繋がると考えている(図3a)¹⁵⁾¹⁶⁾。一方、我々は、ゲノム欠損マウスで得られた結果からSelective expressionモデル(図3b)を提唱している。このモデルでは、複数のTh2サイトカインには、CGRE, HS-2といったそれぞれ異なる制御領域が存在し、Th2分化環境下で発現誘導されたGATA-3がそれらの領域に結合することで、複数のTh2サイトカイン遺伝子座におけるクロマチンの構造変化が惹起され、一見包括的な制御が起こっている状況となる。現実的には、Th2細胞の一つ一つがすべて複数のTh2サイトカインを同時に産生しているわけでは無いと言う事例が多くの実験系で見られるようになってきたため、従来のIntrachromosomalモデルでは説明仕切れなくなっている。現状どちらが正しいという確固たる証拠は見つかってはならず、更なる解析が期待される。

おわりに

以上述べてきたように、Th2細胞でみられ

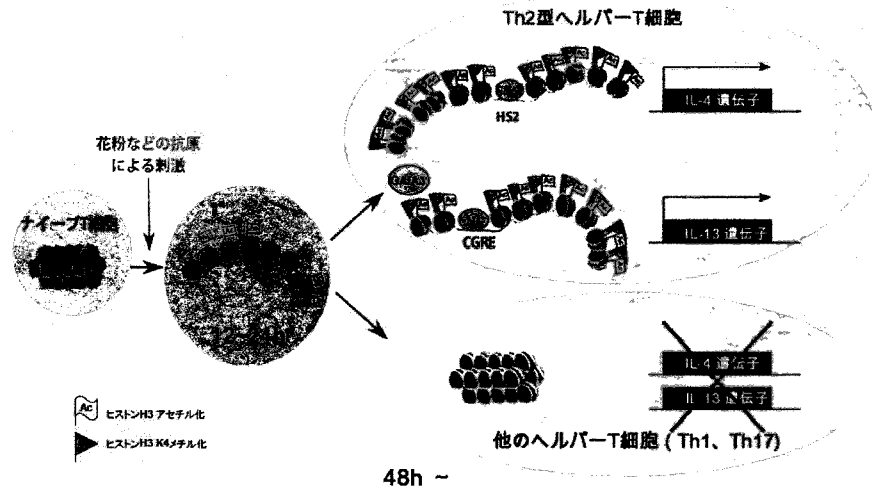


図4 ナイーブT細胞がヘルパーT細胞へと運命付けがなされる分子メカニズム

ナイーブT細胞ではTh2サイトカイン遺伝子座はクロマチンが凝集された状態にあり、抗原で刺激されると一時的にヒストンのアセチル化が起こり、クロマチン構造がほどける。そこにGATA-3が存在すると、クロマチンに結合できるようになる。この時GATA-3が、IL-4遺伝子内のHS2に結合すると、IL-4遺伝子の発現スイッチが「オン」になり、Th2に分化する。一方、IL-13遺伝子はCGREにGATA-3が結合することで発現スイッチが「オン」になる。GATA-3が結合できないとクロマチン構造はまた凝縮した構造に戻ってしまい、サイトカイン遺伝子の発現が「オフ」になる。

るGATA-3によるTh2サイトカイン遺伝子の包括的発現は、1) TCR刺激によるヒストンのアセチル化の誘導、2) IL-4シグナルによってGATA-3の発現が誘導される3) GATA-3がIL4・IL13遺伝子座上の認識配列HS2、CGRE領域に結合する、4) ヒストンのメチル化は誘導されヒストンアセチル化の維持がおこる、5) IL-4・IL-13の転写が誘導される(図4)と言う一連の行程が連続的に起こることで制御される。各々のTh2サイトカイン遺伝子には固有のGATA-3結合配列が存在することが、一見包括的に制御されているように見えるトリックではないかと考えられる。一方、IL-4を産生するT細胞はTh2だけではないことが分かってきている。実際、抗体産生に必要なとされるIL-4は、TFHから産生されると考えられるようになってきている。この細胞はIL-4を産生するが、IL-13は産生しない。最近の我々の知見からIL-4産生メカニズムもTh2とは異なっていることが示されている¹⁸⁾。したがって、T細胞はサブセットによ

って異なる産生メカニズムで制御されるのであろう。

文献

- 1) Agarwal, S. & Rao, Immunity 9, 765-775 (1998).
- 2) Takemoto, N. *et al.* Int Immunol.10, 1981-1985 (1998).
- 3) Ansel, K.M., Djuretic, I., Tanasa, B. & Rao, A. Annu. Rev. Immunol. 24, 607-656 (2006).
- 4) Jenuwein, T. & Allis, C.D. Science 293, 1074-1080 (2001).
- 5) Baguet, A. & Bix, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 11410-11415 (2004).
- 6) Yamashita, M. *et al.* J. Biol. Chem. 277, 42399-42408 (2002).
- 7) Avni, O. *et al.* Nat. Immunol. 3, 643-651 (2002).
- 8) Tanaka, S. *et al.* Nat. Immunol.12, 77-85.(2011)
- 9) Seki, N. *et al.* J Immunol 172, 6158-6166 (2004).
- 10) Henkel, G. *et al.* J Immunol 149, 3239-3246 (1992).
- 11) Zheng, W. & Flavell, R.A. Cell 89, 587-596 (1997).
- 12) Zhu, J. *et al.* Nat. Immunol.5, 1157-1165 (2004).
- 13) Lee, H.J. *et al.* J. Exp. Med. 192, 105-115 (2000).
- 14) Takemoto, N., Arai, K. & Miyatake, S. J Immunol 169, 4103-4107 (2002).
- 15) Spilianakis, C.G. & Flavell, R.A. Nat. Immunol.5, 1017-1027 (2004).
- 16) Lee, G.R., Spilianakis, C.G. & Flavell, R.A. Nat. Immunol. 6, 42-48 (2005).
- 17) Van Stry, M. & Bix, M. Nat. Immunol. 12, 16-17. (2011)
- 18) Harada, Y., Immunity 36, 2, p188-200, 2012