

気管支喘息におけるIgE産生の抑制と インターロイキンを標的とした治療戦略

UNDERSTANDING THE MECHANISMS OF CHRONIC ALLERGIC INFLAMMATION

監修：中西 憲司 兵庫医科大学 学長

第2回

Th2細胞でのGATA-3依存的インターロイキン(IL)-4産生制御における分子機構

著：本村 泰隆¹，田中 伸弥²，久保 允人^{1, 2}

1. 東京理科大学 生命科学研究所 分子病態学研究部門

2. 理化学研究所 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オープンラボ

要約

花粉症を代表とするアレルギー病態は、Th2細胞を介した免疫応答が優位になることにより引き起こされることが明らかとなってきている。Th2細胞は、Th2サイトカインと呼ばれるIL-4、IL-13を産生し、B細胞からのIgE抗体産生を誘導するとともに、喘息病態においては気道上皮の炎症を制御する事でアレルギー病態において中心的役割を担っている。これらTh2サイトカイン遺伝子は、同一染色体上に近接して存在し、その遺伝子構造は哺乳類で高く保存され、その発現も同調的に制御されている。転写因子GATA-3はTh2サイトカインの発現を同調的にコントロールすることができる、マスターレギュレーターと考えられている。しかしながら、GATA-3がどのようにこの同調的Th2サイトカイン遺伝子の発現を制御しているのか？この疑問についてはいまだに明らかにされていない。この複数の遺伝子が同調的に制御される機構は、生物体において広義に存在する細胞分化の過程を考察する上でも重要な課題である。また、このメカニズムを明らかにすることは、アレルギーを規定するTh2サイトカインの発現制御を理解したうえで、新規創薬が目指せる可能性も生まれるであろう。そこで本稿では、細胞分化の過程においてTh2サイトカイン遺伝子の同調的発現の分子機構について、これまで提唱されたモデルとともに論議したい。

I. はじめに

ナイーブCD4T細胞はヘルパーT細胞へと分化することにより、特定のサイトカインを産生する能力を獲得し、免疫応答を制御する。このヘルパーT細胞は産生するサイトカインのパターンによっていくつかのサブセットに分類される。これらサブセットは、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。なかでもTh2細胞は、IL-4やIL-13などのサイトカインを介して、B細胞におけるImmunoglobulin (Ig) G1あるいはIgE抗体の産生を制御することで体液性免疫応答を制御している。IgE抗体は寄生虫などの細胞外寄生体の感染防御に有効とされる一方、アレルギー病態ではアレルゲンの刺激によりマスト細胞を活性化する働きを持つと言う生体には不都合な側面を持ち合わせている。また、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気道上皮に機能し、直接的にアレルギー性炎症を惹起することができる。そのため、アレルギーの誘導メカニズム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によるlocus control region (LCR)の制御が提唱されている。しかしながら、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

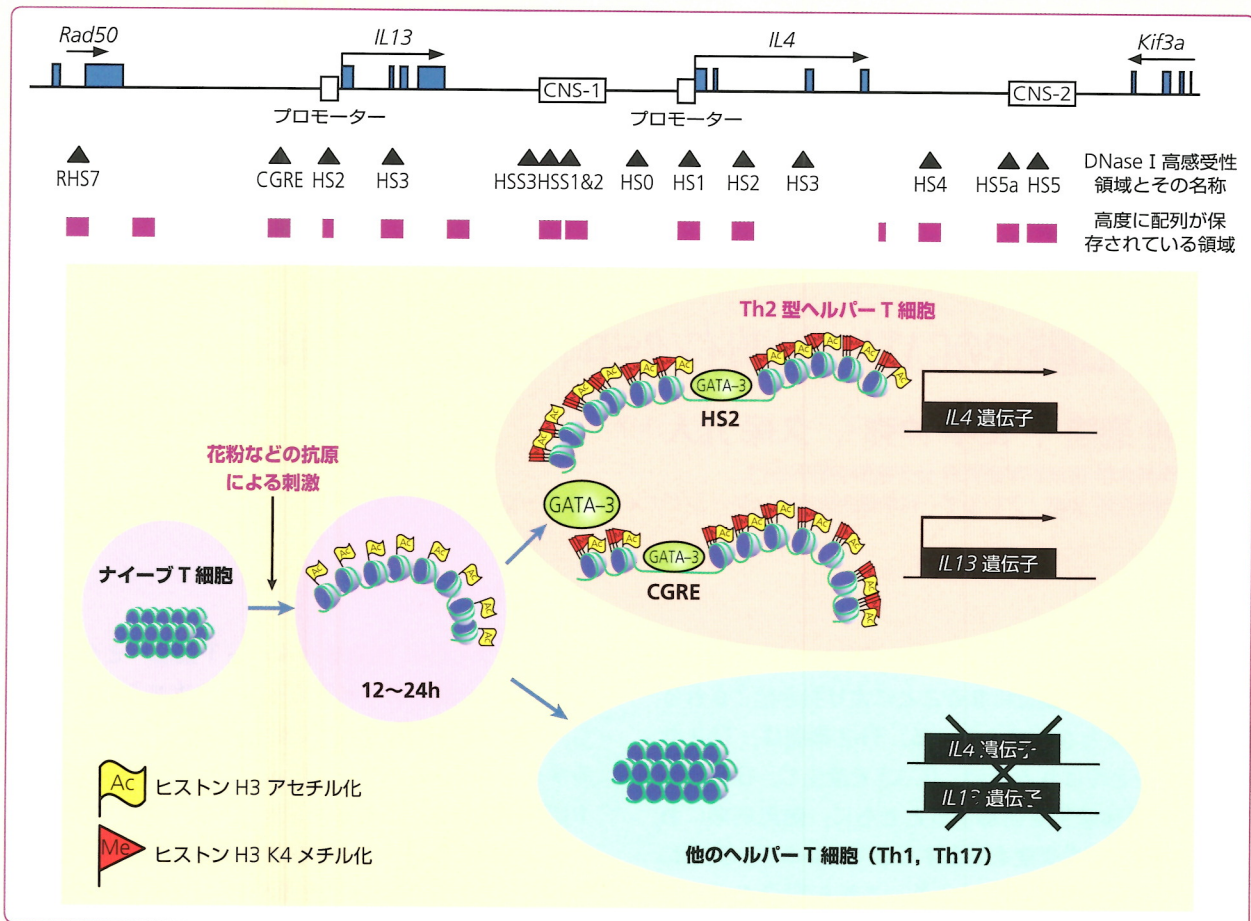


図1 IL13/IL4 遺伝子座におけるゲノム配列の保存と DNase I 高感受性領域 (HS 領域) とヘルパー T 細胞の運決定メカニズム

- A) IL13/IL4 遺伝子座において哺乳類間で保存される領域と DNase I 高感受性領域と HS 領域
 B) ナイブ 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、IL4 遺伝子内の HS2 に結合すると、IL4 遺伝子の発現スイッチが「オン」になり、Th2 に分化する。一方、IL13 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。

括的に制御できるのか？未解決の問題は数多く残されたままである。本稿では、我々の研究成果を含めてこの包括的制御に関わる分子機構について紹介していきたい。そして、これら知見がどう喘息などの臨床病態の制御に繋がっていくのかについて論議していく。

II. 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

遺伝子の転写スイッチのオンとオフは、プロモーターやエンハンサーと呼ばれる制御領域に転写因子が会合で

きる状態であるか否かにより決定され、そこにはクロマチン構造の変化できていさされている。胸腺で成熟したナイブ CD4T 細胞は、特定の機能活性を規定するサイトカインを産生するヘルパー T 細胞へと分化する。この分化の過程において、特定のサイトカインをコードする遺伝子の転写スイッチがオンになることが、ヘルパー T 細胞としての機能を獲得することに繋がる。Th2 細胞の分化過程において、Th2 サイトカイン遺伝子の転写スイッチは遺伝子座 (IL4, IL13 locus) で起こるクロマチン構造の変化によって規定されている^{1, 2)}。この構造

変化は、DNase I に対する感受性が高くなった DNase I 高感受性領域 (hypersensitive site [HS もしくは HSS]) を指標として知ることができる。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、このクラスター内の遺伝子座の配置は動物種で非常によく保存されている。これまでに *IL4* 遺伝子座、*IL13* 遺伝子座には16カ所の HS 領域が同定されている (図1)³⁾。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 non-coding sequence (CNS) とも呼ばれている。これら CNS のなかで、CNS-1 は HSS1 と HSS2 に相当し、CNS-2 は HS5 に相当する。

Ⅲ. *IL4* 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 DNA 二重らせんが巻き付いた構造からなる。転写の活性化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) が化学修飾されることと相関する。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活性化あるいは沈静化の状態をコードしていることが提唱されている⁴⁾。これをヒストンコードと呼び、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) のメチル化が知られている。

IL13/IL4 遺伝子座に存在する HS 領域 (HSS1, HSS2, HS1, HS2, HS3, HS5, HS5a) は Th2 分化に伴いアセチル化され、H3K4 がメチル化される⁵⁾。分化前段階にあるナイーブ CD4T 細胞では、アセチル化・メチル化はまったくみられないが、抗原刺激を受けると24時間以内にゲノム全体にわたりアセチル化が誘導される。これは、一時的にクロマチン構造が緩むことで、分化を制御する転写因子が結合しやすくするためである⁶⁻⁸⁾。このアセチル化は、Th1 細胞では以後急速に減衰し、最終的には完全に消失する。一方、Th2 細胞

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H3K4のメチル化が誘導されはじめる⁹⁾。これは、我々が以前報告したGATA-3によるTh2への分化が抗原刺激後48時間以内に規定されていること⁹⁾と考え合わせると、GATA-3の働きはH3K4をメチル化修飾することにあるとも考えられる⁹⁾。

Ⅳ. 転写制御領域 HS による *IL4* 遺伝子の転写制御

Th2 サイトカイン遺伝子クラスターには、複数の HS 領域が点在しているが、それぞれの働きは理解されていない。我々は、それぞれの HS 領域をゲノムから欠損させたマウスを作製することで、この問題の解決を試みた。本研究では *IL4* 遺伝子座に存在する CNS-1, CNS-2, 3' untranslated region (3' UTR), HS2, HS4 と *IL13* 遺伝子座の CGRE を解析の対象とした (図1)。そこで、それぞれの HS 領域を欠損したマウスより Th2 細胞を調整し、IL-4 産生に与える影響を検討した。CNS-1, CNS-2, 3' UTR の欠損マウスの Th2 細胞では、それぞれ30%, 40%, 20%程度のIL-4産生低下しか認められなかった。これに対して、HS2を欠損したTh2細胞はIL-4の産生が10分の1にまで減少していた。HS2は当初マスト細胞特異的なエンハンサーとして同定された第2イントロンに存在するHS領域である¹⁰⁾。このことから、HS2はマスト細胞のみならず、Th2細胞におけるIL-4の産生に必須の領域であった。

抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation; ChIP) 法を用いた解析から、Th2細胞におけるHS2ではGATA-3が強く結合していた。しかしながら、HS2欠損マウス由来のTh2細胞では、GATA-3の発現の有無にこだわらずIL-4の産生が顕著に減弱していた。このことは、IL-4産生制御にはGATA-3のHS2への結合が必須であることを示している。また、HS2欠損Th2細胞では、IL-13, IL-5といったIL-4以外のTh2サイトカインにはまったく減少はみられず、これら遺伝子座におけるクロマチン制御に変化はみられなかった。以上の知見から、*IL4* 遺伝子座に存在するHS2はGATA-3が結合することにより転写可能なクロマチン構造にするために必要な領域であり、この領域の働きは*IL4* 遺伝子特異的であった (図1)。

V. Conserved GATA-3 responsive element (CGRE) による IL-13 産生制御

IL-13 は気道炎症を構成する必須の Th2 サイトカインである。この遺伝子座には 2 つのプロモーターが存在しており、Th2 細胞では両方でクロマチンの構造変化が起こる。これらプロモーターのうち遠位に位置する CGRE は、Th2 細胞にみられる *IL4*、*IL13* 両遺伝子座に形成されるヒストンのアセチル化の起点となる領域として過去に報告されている⁶⁾。ところが、CGRE 欠損マウス由来の Th2 細胞の解析から、この領域は IL-13 の産生には必須であるが、IL-4 の産生には必要ではないことが示された (図 1)。CGRE も HS2 同様 GATA-3 依存的に転写を制御する領域であるが、その働きは IL-13 に特異的である。このことは、CGRE は IL-13 産生に重要な領域であるが、その欠損は他の Th2 サイトカインには影響しないことを示していた。

VI. Th2 サイトカイン遺伝子の包括的な発現制御

GATA-3 を欠失させた T 細胞では、Th2 細胞の分化が起こさないため¹¹⁾、GATA-3 は従来から Th2 細胞分化のマスターレギュレーターと考えられている¹²⁾。その際、GATA-3 は Th2 サイトカイン遺伝子クラスター内に存在する複数の HS 領域に同時に結合することによって、Th2 サイトカイン遺伝子の発現をクロマチンレベルで制御している^{13,14)}。ところが、ここで疑問となるのは Th2 サイトカインに属する遺伝子の包括的発現がどのように制御されているかである。この包括的制御は以下の 2 つのモデルで説明が可能である¹⁵⁾。

1. Intrachromosomal Interactions モデル

Flavell らは、血球系でのグロビン遺伝子で見られる同様の包括的制御の制御様式を模範として、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、LCR の存在を想定した。長年に渡る解析の末、彼らは *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 LCR として機能する RHS-7 を同定した。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 サイトカインの包括的制御に繋がると言うのがこのモデルのコンセプトであり、彼らのモデルが Intrachromosomal モデルと呼ばれている由縁でもある^{16,17)}。

2. Selective expression モデル (図 1)

このモデルは、我々のゲノム欠損マウスで得られた結果から提唱するモデルで、複数の Th2 サイトカインには、CGRE、HS2 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とするモデルである。現実的には、Th2 細胞の 1 つ 1 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な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ている。しかしながら、従来の intrachromosomal モデルではこの現象を説明することは困難であるのに対し、selective expression モデルでは容易にこの現象が説明できる。このことから、我々は selective expression モデルの妥当性を主張している。

VII. HS2 による IgE 抗体産生と気道性過敏反応の制御

では、これら制御領域がどれだけ生体で起こるアレルギー反応に影響を及ぼすのであろうか？生体内における HS2 の役割を検討するため、卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) で HS2 欠損マウスを免疫し、OVA 特異的抗体産生を解析した。HS2 欠損マウスでは IgG1 産生が 10% 程度にまで減少しており、さらにアレルギーに関わる IgE は検出限界以下であった。一方、Th1 サイトカイン IFN γ によって誘導される IgG2c 産生は、50 倍以上増加していた。さらに、OVA 感作した HS2 欠損マウスに OVA を吸引させ、気道性過敏反応を誘導したところ、気道狭窄が顕著に抑制されており、好酸球の気道への浸潤もほぼ完全に抑制されていた。このことから、GATA-3 によって制御される HS2 は、Th2 の分化を抑制することにより、生体内における IgE 抗体産生または、アレルギー反応の制御に重要な役割を担っており、この

HS領域の生体内での重要性が示された。

おわりに

以上述べてきたように、GATA-3によるTh2サイトカイン遺伝子座の分子制御機構は、IL-4シグナルによって誘導されたGATA-3がIL4遺伝子座など各々のTh2

サイトカイン遺伝子に存在する固有のGATA-3結合配列に結合して、Th2サイトカインの包括的発現を規定している。IL4遺伝子座の場合、HS2領域がそれに相対し、その欠損はIL-4を欠く事でTh2反応全体に影響を与えることとなる。

■ 文献

- 1) Agarwal S, Rao A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* 1998; 9: 765-75.
- 2) Takemoto N, Koyano-Nakagawa N, Yokota T, et al. Th2-specific DNase I-hypersensitive sites in the murine IL-13 and IL-4 intergenic region. *Int Immunol* 1998; 10: 1981-5.
- 3) Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, et al. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 607-56.
- 4) Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293: 1074-80.
- 5) Baguet A, Bix M. Chromatin landscape dynamics of the Il4-Il13 locus during T helper 1 and 2 development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11410-5.
- 6) Yamashita M, Ukai-Tadenuma M, Kimura M, et al. Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal from the interleukin-13 gene locus. *J Biol Chem* 2002; 277: 42399-408.
- 7) Avni O, Lee D, Macian F, et al. T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat Immunol* 2002; 3: 643-51.
- 8) Tanaka S, Motomura Y, Suzuki Y, et al. The enhancer HS2 critically regulates GATA-3-mediated Il4 transcription in T(H)2 cells. *Nat Immunol* 2011; 12: 77-85.
- 9) Seki N, Miyazaki M, Suzuki W, et al. IL-4-induced GATA-3 expression is a time-restricted instruction switch for Th2 cell differentiation. *J Immunol* 2004; 172: 6158-66.
- 10) Henkel G, Weiss DL, McCoy R, et al. A DNase I-hypersensitive site in the second intron of the murine IL-4 gene defines a mast cell-specific enhancer. *J Immunol* 1992; 149: 3239-46.
- 11) Zheng W, 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.
- 12) Zhu J, Min B, Hu-Li J, et al. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 1157-65.
- 13) Lee HJ, Takemoto N, Kurata H, et al. GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *J Exp Med* 2000; 192: 105-15.
- 14) Takemoto N, Arai K, Miyatake S. Cutting edge: the differential involvement of the N-finger of GATA-3 in chromatin remodeling and transactivation during Th2 development. *J Immunol* 2002; 169: 4103-7.
- 15) Van Stry M, Bix M. Explaining discordant coordination. *Nat Immunol* 2011; 12: 16-7.
- 16) Spilianakis CG, Flavell RA. Long-range intrachromosomal interactions in the T helper type 2 cytokine locus. *Nat Immunol* 2004; 5: 1017-27.
- 17) Lee GR, Spilianakis CG, Flavell RA. Hypersensitive site 7 of the TH2 locus control region is essential for expressing TH2 cytokine genes and for long-range intrachromosomal interactions. *Nat Immunol* 2005; 6: 42-8.



S

Selected Topics

海外学会トピックス

● 監修：一ノ瀬 正和
和歌山県立医科大学内科学第三講座
取材：メディカルレビュー社

American Academy of Allergy, Asthma & Immunology 2011, San Francisco, CA, March, 18-22

Q & A Workshop

ポリクローナル vs. 特異的IgE:アレルギー専門医が知るべきこと

Polyclonal vs. specific IgE: What the allergist should know

Thomas A.E. Platts-Mills, MD., PhD

Professor of Asthma and Allergic Diseases Center, University of Virginia Health System, Charlottesville, Virginia, US

ポリクローナルIgEに関する見識

Robert G. Hamilton, PhD., D.ABMLI

Director, Johns Hopkins University Dermatology, Allergy and Clinical Immunology (DACI) Reference Laboratory, Baltimore, US

IgE 抗体の存在はアレルゲンへの感作を意味している。アレルギー症状の発現には個体因子と環境因子が関与する。年齢や性別などの個体因子は不変であるが、アレルゲンや喫煙などの環境因子は変化する可能性があり、これによってアレルゲン特異的な反応も変化する。このため、アレルギー症状発現のリスク因子であるアレルゲン特異的 IgE 抗体の変化について研究が行われてきた。これまでの研究から、この変化は IgE の濃度、IgE の親和性、IgE の特異性と活性、特異的 IgE 抗体と血清中総 IgE 濃度の比という 4 つの基本的なパラメータに反映されることが示されている。また、これらの有用性を示す知見として、IgE 抗体の総量が喘息の重症度と相関すること、慢性鼻炎または喘息の重症度がアレルゲン特異的 IgE 抗体と相関すること、IgE 抗体から全身症状の重症度が予測できることが示されている。さらに、食物のアレルゲン特異的 IgE 抗体を用いて、アレルギー症状を発症すると思われる患者を特定できることが示された。

現在、特異的 IgE 抗体の定量値の測定には、ImmunoCAP[®]、IMMULITE[®]、および HYTEC システムの 3 つの自動分析装置が一般に使用されている。こ



れらはいずれも固相免疫測定法によるもので、再現性が高く、ばらつきもわずかで、比較的定量性を示す。しかし、3つのシステム間では、測定する IgE 抗体の分布がわずかに異なるという問題がある。例えば、IMMULITE[®]を用いて、ある食物のアレルゲン特異的 IgE 抗体を測定した場合、その結果の評価に ImmunoCAP[®]による閾値を適用できるかという問題が生じる。実際に、ピーナッツの負荷試験を受けた集団で IMMULITE[®]による IgE 抗体と ImmunoCAP[®]による IgE 抗体を比較すると、その比は 1.5~2 で、両者の値が大きく異なるわけではないことが示唆された。卵の負荷試験を受けた集団で、同様にこれら 2 つの測定システ

ムの IgE 抗体を比較したところ、両者の値には非常に密接な相関が認められた。しかし、両者による IgE 抗体値比は 4~5 の範囲に広がっていた。このため、結果の評価に別のシステムの閾値を用いる場合は、上記のような比を用いて関連付けを行う必要がある。

最近では、同じ検体で複数のアレルゲン特異的な測定を行う多重測定法や、患者の指を穿刺して数分以内に複数のアレルゲン特異的 IgE を測定できるポイントオブケア検査など、新たな手法も注目されている。今後、アレルゲン特異的 IgE 抗体のデータのより効果的な利用方法を確立し、アレルギー性疾患の診断と管理の向上を図ることが重要である。