

Th2サイトカイン遺伝子座における新規エンハンサー領域の同定

—エンハンサーHS2, CGREによるIL-4, IL-13産生制御
Characterization of novel enhancers at Th2 cytokine gene loci



田中伸弥(写真) 久保允人

Shinya TANAKA and Masato KUBO

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チーム

◎ヘルパー T 細胞はそれぞれ固有のサイトカイン産生パターンを有し、獲得免疫系の中心を担う免疫細胞である。2 型ヘルパー T (Th2) 細胞は抗体産生、寄生虫の排除に寄与するとともに、アレルギー疾患にかかわる T 細胞サブセットである。これらヘルパー T 細胞は抗原刺激によりナイーブ T 細胞より分化し、Th2 サイトカインとよばれるインターロイキン (IL)-4, IL-5, IL-13 を産生する。また、それぞれをコードする遺伝子は哺乳類では同一の染色体上に近接し、かつ同調して発現する。この Th2 細胞分化を制御するマスターレギュレーターとして GATA-3 が知られているが、どのように GATA-3 がこれら Th2 サイトカイン遺伝子のスイッチを同時に制御するのか、そのメカニズムは明らかになっていなかった。今回著者らは、それぞれの Th2 サイトカイン遺伝子には個別のエンハンサーが存在し、GATA-3 はそれらのエンハンサー領域に結合することにより Th2 サイトカイン遺伝子の発現を制御していることを明らかにした。つまり *Il4* 遺伝子座の第 2 イントロンに存在する DNase I hypersensitive site (HS)2、*Il13* 遺伝子座の conserved GATA-3 responsive element (CGRE) とよばれるエンハンサーが、*Il4* 遺伝子、*Il13* 遺伝子の転写をそれぞれ制御していた。また、GATA-3 はこれらの領域に結合してクロマチン構造を変化させることにより一度に複数のサイトカイン遺伝子のスイッチを制御していること、また HS2 がアレルギー病態形成に重要な役割を担っていることが明らかになった。

Key word : GATA-3, ヒストン修飾, インターロイキン-4, DNase I 高感受性領域

Il4-*Il13* 遺伝子座周辺におけるクロマチン構造変化とヒストン修飾

遺伝子の転写は、プロモーターを含む非転写領域に転写因子が会合することによって制御される。Takemoto や Rao らは Th2 細胞の *Il4*-*Il13* 遺伝子座において、DNase I に対する感受性を示す領域 (DNase I hypersensitive site [HS あるいは HSS]; 「サイドメモ 1」参照) を特定することにより、これら遺伝子座周辺にクロマチンの構造変化が起こることが転写につながることを示唆した^{1,2)}。哺乳類種間におけるゲノム DNA 配列の比

較により、転写領域だけでなく、非転写領域にもゲノム DNA 配列が高度に保存されている領域が存在し³⁾、興味深いことにこれら高度に保存された領域はクロマチン構造変化を起こす HS 領域に相

サイド
メモ
1

DNase hypersensitive site

DNase I に対して高感受性を示すゲノム DNA 領域。エンハンサー、プロモーター、サイレンサーなど遺伝子転写に対する制御領域を含む。

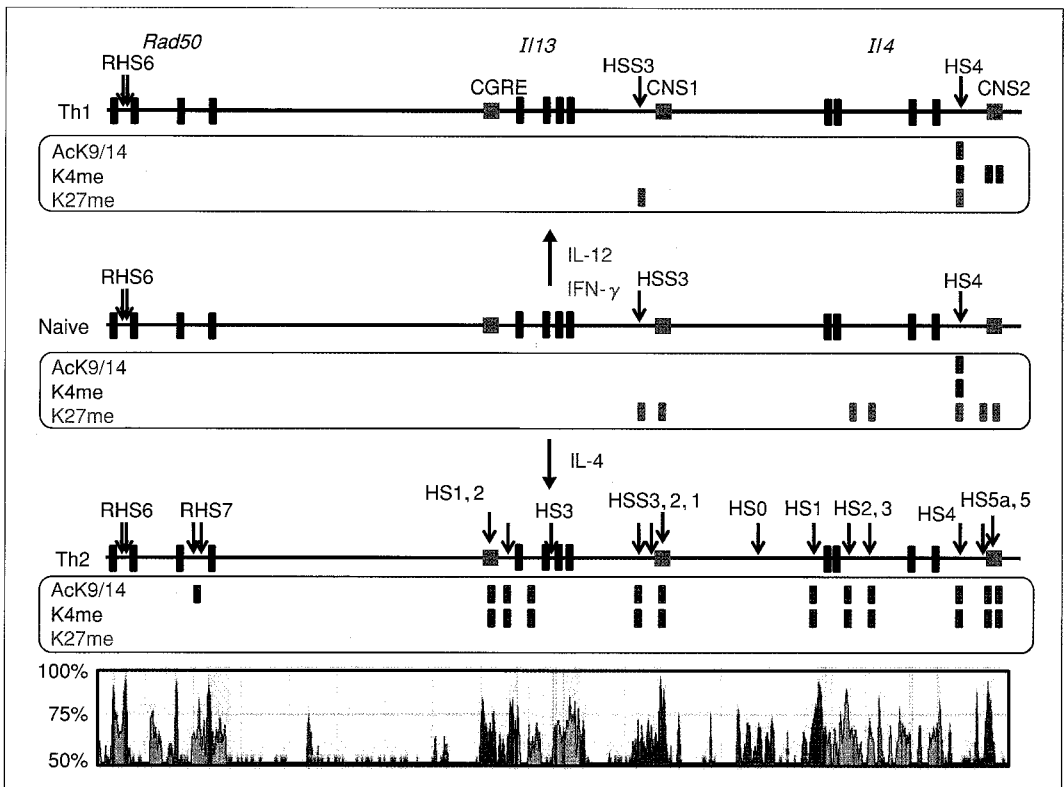


図 1 *Rad50-Il13-Il4* 遺伝子座におけるクロマチン修飾とクロマチン構造変化

矢印はナイーブ CD4 T, Th1, Th2 細胞においてクロマチン構造変化が起こる領域を示す。転写が起こっている遺伝子座に認められるヒストンのアセチル化 (AcK9/14), K4 メチル化 (K4me), 転写が抑制されている遺伝子座に認められる K27 メチル化 (K27me) をそれぞれ赤色, 茶色, 青色で示す。さらに, 最下段のパネルはヒトマウスのゲノム DNA の配列の比較を示している (赤: 遺伝子間領域, 青: エクソン, 黄: UTR, 桃: インtron)。クロマチン構造変化が起こる各領域はゲノム DNA 配列上保存された領域に一致している。また, *Il4*, *Il13* 遺伝子の転写活性の高い Th2 細胞ではナイーブ CD4 T, Th1 細胞と比較して, *Rad50-Il13-Il4* 遺伝子座全体にクロマチン構造変化が起こり, AcK9/14, K4me のクロマチン修飾が認められる。

当する (図 1)。また, これら HS 領域の多くは, Th2 細胞特異的に遺伝子転写活性の指標であるヒストン H3 第 9 リジン, 第 14 リジンアセチル化 (H3K9/14ac), ヒストン第 4 リジンメチル化 (H3K4me) を示すことから (図 1), これらの HS 領域の転写制御との関係が想定されている。しかし, それぞれの HS 領域の存在意義については不明な点が多く残されている。

本稿では *Il4*, *Il13* 遺伝子座に存在する HS 領域の転写制御におけるこれまでの知見と, 最近著者が得た結果を交えて紹介する。

1. *Il4*, *Il13* 遺伝子座に存在する HS 領域

Il4 遺伝子座に存在する HS 領域には, HS1, HS2, HS3, HS4, HS5, HS5a が同定されている。*Il4* 遺伝子座と *Il13* 遺伝子座の間には, HSS1, 2, 3

が同定されている。高い相同性をもつ非転写領域は conserved noncoding sequence (CNS) ともよばれ, HSS1/HSS2 は CNS-1 に, HS5 は CNS-2 にそれぞれ相当する。以下に, 解析が進んでいる HS 領域について紹介する。

2. HS5/CNS-2, HS5a

HS5 は *Il4* 遺伝子エクソン 4 下流に存在する Th2 細胞で特異的に認められる HS 領域で, CNS-2 ともよばれる (図 1)。さらに, この領域の上流には再刺激された Th2 細胞で特異的に構造変化を起こす HS5a が存在する⁴⁾。これらの領域には Th2 細胞においてヒストン H3 のアセチル化または K4 メチル化がみられるが, Th1 細胞では認められない。さらに HS5a には, Th2 分化のマスターレギュレーター GATA3, NFAT の結合がみら

れ、HS5a は NFAT を介して IL-4 プロモーター活性を制御している⁴⁾。著者らは、CNS-2 が Notch (「サイドメモ 2」参照) シグナルを介してメモリー型 CD4 T 細胞、または NK T 細胞における IL-4 産生を制御していることを報告した⁵⁾。また、HS5a/CNS-2 を欠損したマウスにおいては、Th2 分化条件下において CD4T 細胞からの IL-4 産生が減少することが報告されていることから⁶⁾、この領域は Th2 細胞においてもエンハンサーとして機能をもつことが示されている。

3. HS4

HS4 は HSS3 とともにナイーブ CD4 T 細胞や Th1 細胞においても構造変化がみられ、転写抑制の指標となるヒストン第 27 番目リジンのメチル化 (H3K27me) が認められることから⁷⁾、転写を負に制御するサイレンサーとして働くことが想定された (図 1)。HS4 欠損マウスでは、本来 IL-4 を産生しないはずの Th1 細胞から IL-4 産生が認められ、*Leishmania major* (*L. major*) 感染実験において原虫排除に欠陥が認められた⁸⁾。これは、HS4 が存在しないため IL-4 産生が亢進し、Th1 反応が抑制されたためと考えられる。この抑制メカニズムについて完全に理解されているわけではないが、Th1 細胞に比較的高く発現されるリプレッサー runt-related transcription factor 3 (Runx3) が、Th1 分化のマスターレギュレーター T-bet と会合して HS4 に結合することで、この抑制活性を誘導すると報告されている⁹⁾。さらに、ナイーブ CD4 T 細胞では、*IL4-IL13* 遺伝子間領域に存在する HSS3 と HS4 に K27 メチル化がみられる。K27 メチル化ヒストンにはポリコーム複合体を構成する

EZH2 が結合することが知られており、K27 メチル化は Th1 細胞で維持される⁷⁾。このことは、HS4 と HSS3 における K27 メチル化と EZH2 の結合が Th1 細胞にみられる *IL4* 遺伝子発現抑制を制御する可能性を示唆している。しかしこれまでのところ、Runx3/T-bet 複合体とポリコーム複合体の関係については明らかにはなっていない。

4. HSS1, 2/CNS-1

HSS1, 2 は *IL4* 遺伝子座と *IL13* 遺伝子座に同定された HS 領域で、Th2 細胞特異的にクロマチン構造変化とヒストン H3 のアセチル化または K4 メチル化を起こす²⁾。CNS-1 欠損マウスでは IL-4 産生が顕著に低下し、*L. major* をより効率よく排除することが報告されている¹⁰⁾。

5. Locus control region (LCR)

Th2 細胞には上述したように複数の *IL4* 遺伝子制御領域が存在する。ルシフェラーゼをレポーター遺伝子とするトランスジェニック (Tg) マウスを用いて、Th2 細胞特異的な制御領域を同定する試みがなされ、IL-4 プロモーター活性を得るためには複数の制御領域の協調的な作用が必要であった¹¹⁾。このことから *IL4*、*IL13* 遺伝子を包括的に制御する LCR の存在が想定され、DNA 修復酵素 RAD50 のイントロンに RHS7 として同定された¹²⁾。*IL4*、*IL13* 遺伝子座に存在する複数の HS 領域が RHS7 を中心として核内で 1 カ所に集束するような立体構造をとることが報告され¹³⁾、RHS7 欠損により、この三次元構造が失われると同時に、IL-4,13 産生の半減が認められることから、RHS7 が各制御領域の協調性を維持することが Th2 サイトカインの包括的制御に重要であると報告されている¹⁴⁾。しかし一方で、Th2 細胞のなかには IL-4 と IL-13 をそれぞれ発現する細胞が存在していることから、かならずしも両者の発現は同期しない事例も報告されている¹⁵⁾。また、Th2 サイトカインである IL-5 の発現は RHS7 欠損によって減少しなかった¹⁴⁾。よって、これらの実験結果は、*IL4*、*IL13* 遺伝子がかならずしも包括的に発現制御されていない可能性を示唆するものであり、LCR ではこれら単独の発現は説明しきれない。

このように、Th2 細胞における *IL4*、*IL13* 遺伝子

サイド メモ 2

Notch

細胞間相互作用によって発生・分化などに関与するシグナルを伝達する細胞膜貫通型受容体。リガンドである Delta, Jagged ファミリーと相互作用することにより Notch 分子の細胞内領域が核移行し、recombination-signal-binding protein for immunoglobulin- κ J region (RBP-J κ) と複合体をつくることにより標的遺伝子の発現を制御する。

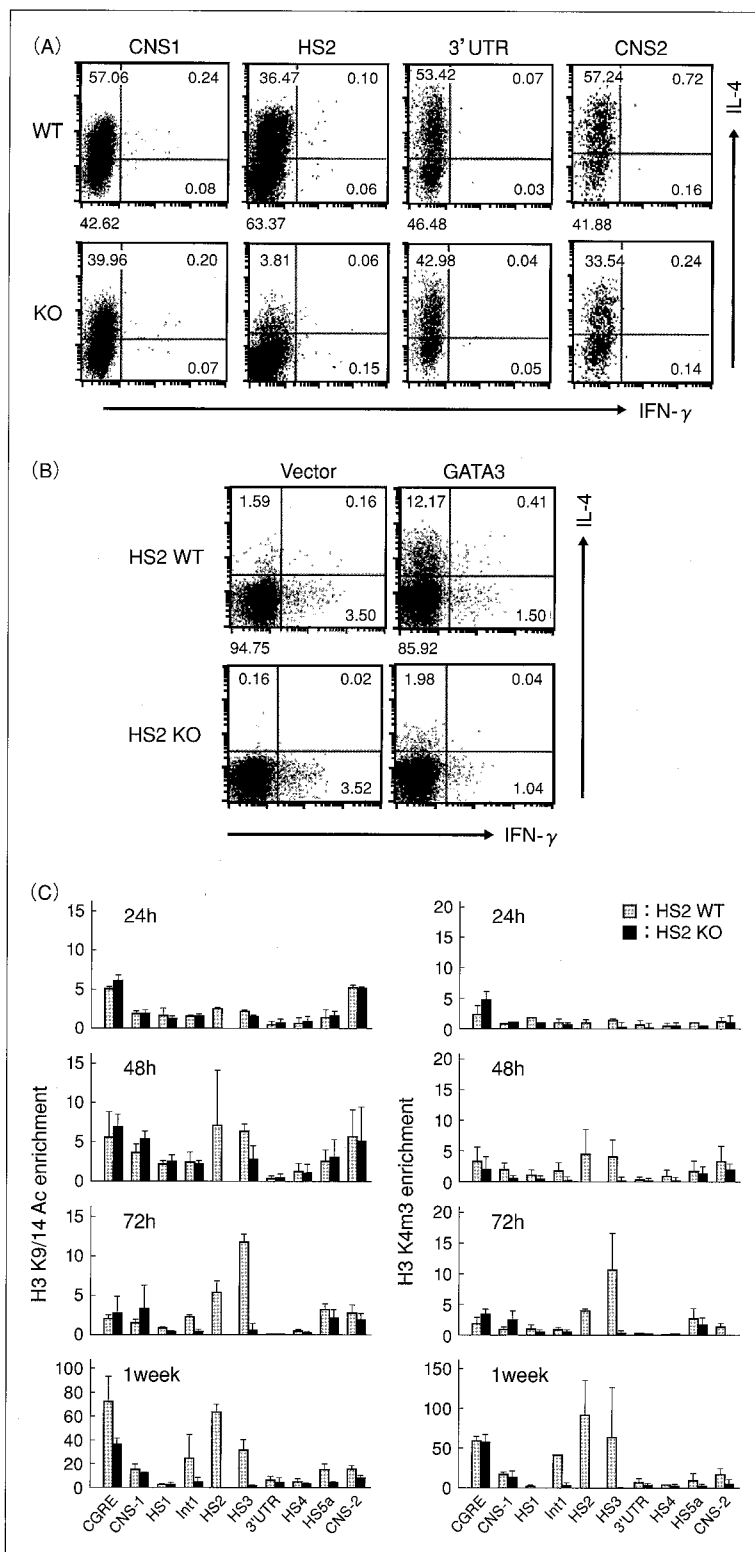


図 2 HS2欠損CD4T細胞におけるサイトカイン産生とクロマチン構造変化

A: 野生型(WT), CNS-1, HS2,3'

UTR, CNS-2 各欠損(KO)マウスからナイーブ CD4 T 細胞を単離し, Th2 分化条件下において培養し, 7日後に再刺激し IL-4, IFN- γ 産生を細胞内染色法により検出した。

B: HS2 欠損マウスよりナイーブ CD4 T 細胞を単離し, Th1 分化条件下においてレトロウイルス遺伝子導入系を用いてコントロールベクター(ベクター), GATA3 発現ベクター(GATA3)を導入した。培養 7 日後, 細胞を再刺激し, 感染した細胞における IL-4, IFN- γ 産生を検出した。

C: 野生型, HS2 欠損マウスよりナイーブ CD4T 細胞を単離し, Th2 分化条件下において培養を行った。初期刺激, 24, 48, 72 時間, 7 日後において細胞を回収し, *Il13-Il4* 遺伝子座におけるヒストン修飾(左: Ac9/14, 右: K4me)をクロマチン免疫沈降法により検討した。

発現を制御する領域が複数同定されているが、それぞれの HS 領域の役割、そしてどの領域が Th2 細胞における IL-4、IL-13 産生に必須のものなのか不明なままであった。著者らはこれらの疑問に答えるべく、それぞれの HS 領域の役割を同一条件で比較することを試みた。

HS2/Intronic enhancerによる

IL4 遺伝子の転写制御

著者らは、Th2 サイトカイン発現における CNS または HS のエンハンサー活性を網羅的に解析する目的で、それぞれの領域を欠損したマウスを作製し、T 細胞における IL-4 産生を解析した。CNS-1 および CNS-2、*IL4* 遺伝子 3' untranslated region (3' UTR) をそれぞれ欠損させたマウスより得られた Th2 細胞では、それぞれ 30%、40%、50% の IL-4 産生減少がみられた。一方で、*IL4* 遺伝子座の第 2 イントロンに存在する HS2 の欠損により、IL-4 産生は 10% 以下に減少した(図 2)。HS2 は 1994 年に Brown らによって、マスト細胞特異的な *IL4* 遺伝子のエンハンサーとして同定された HS 領域である¹⁶⁾。この領域には Th2 細胞においてクロマチンの構造変化と非常に強いヒストン H3 のアセチル化または K4 メチル化が観察される(図 2-C)。HS2 を欠損した Th2 細胞は IL-4 の産生が 1/10 にまで減少していたことから、この領域は Th2 細胞における IL-4 産生制御に必須であることが明らかにされた。

Th2 マスターレギュレーター GATA-3 は、*IL4* 遺伝子の HS2 近傍に強く結合する¹⁷⁾。レトロウイルスを用いて GATA-3 を強制発現させた場合でも、HS2 欠損 T 細胞は IL-4 を産生することができない。このことは、HS2 への GATA-3 の結合が Th2 細胞における IL-4 産生に必須であることを示唆している(図 2-B)。また、HS2 の欠損は IL-5、IL-13 の産生に影響しないことから、HS2 領域は *IL4* 遺伝子固有の制御領域であることがわかる¹⁷⁾。

つぎに GATA-3 がいかんして IL-4 産生を制御しているか検討するため、まず、*IL4*、*IL13* 遺伝子座の各 HS 領域において、H3K9/14ac、H3K4me3 のヒストン修飾について検討した。抗原刺激後の経時的な解析によって刺激後 24 時間では Th1、Th2

細胞ともにアセチル化が起こるが、72 時間後には Th2 細胞においてのみヒストンアセチル化が維持されていた。一方で、H3K4me3 は抗原刺激後 48 時間、72 時間において Th2 細胞に特異的に認められた。HS2 欠損 T 細胞を用いた場合、24 時間におけるアセチル化は認められたが、時間経過とともに減弱した。また、H3K4me3 修飾は HS2 欠損により *IL4* 遺伝子座の各 HS 領域で著しく減少した(図 2-C)。

以前に著者らは、HS2 による IL-4 プロモーター活性制御をモニターするレポーター Tg マウスを作製した。この Tg マウス由来の Th2 細胞では、HS2 による IL-4 プロモーターの活性化はみられなかった¹⁸⁾。このことは、GATA-3 のこの領域への結合は IL-4 プロモーター活性を惹起するのではなく、むしろ *IL4* 遺伝子座全体におけるアセチル化の維持、または K4 メチル化の誘導を制御することで、*IL4* 遺伝子座に転写可能なクロマチン構造変化を誘導し、IL-4 産生を促進するという考え方を示唆している。

HS2欠損による抗原特異的抗体産生または気道性過敏反応の減少

生体内における HS2 の役割を検討するため、aluminum hydroxide(alum)と混合した ovalbumin (OVA)で野生型マウス、HS2 欠損マウスを免疫し、OVA 特異的抗体産生を解析した。HS2 欠損マウスにおいて、IL-4 で誘導される IgG1 産生は野生型の 10%程度にまで減少しており、さらに IgE 産生は完全に消失していた。一方で、インターフェロン(IFN)- γ によって誘導される IgG2c 産生は、HS2 欠損マウスにおいて 50 倍以上に増加していた(図 3-A)。また、HS2 欠損マウスにおける気道性過敏反応は顕著に抑制されていた(図 3-B)。これに伴って、HS2 欠損マウスでは好酸球の肺胞への浸潤がほぼ完全に抑制された(図 3-C)。よって、HS2 は生体内において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いた。

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

IL-13 はアレルギー性喘息において気道性過敏

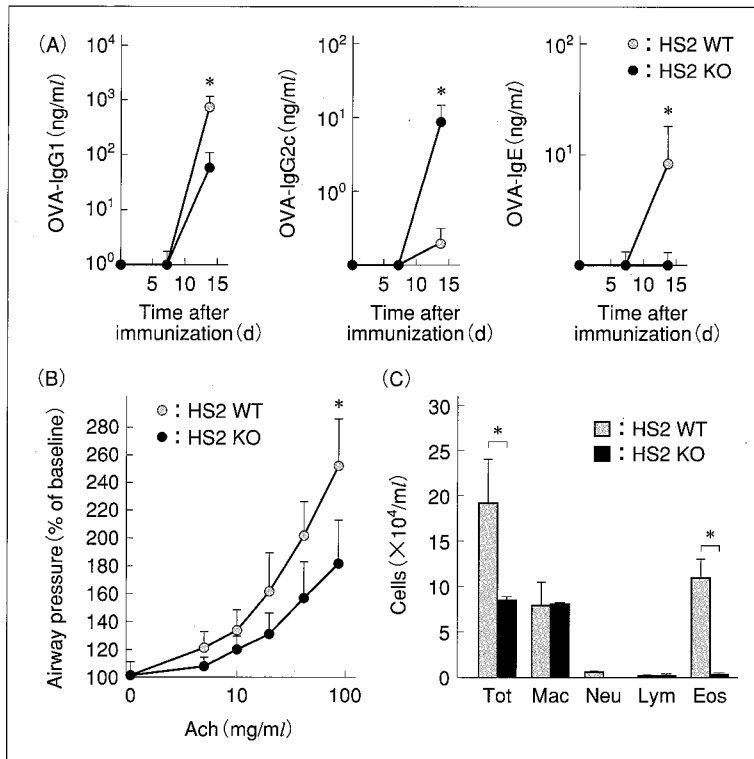


図3 気道性過敏反応と抗体産生に対するHS2の役割

- A: 野生型, HS2 欠損マウスを aluminum hydroxide(alum)と混合した ovalbumin(OVA)で免疫し, 0, 7, 14 日後における血中の OVA 特異的 IgE, IgG1, IgG2c を評価した。
- B: 野生型, HS2 欠損マウスを alum-OVA で免疫後, OVA 噴霧を行い, アセチルコリン依存的な気道の抵抗を測定した。
- C: B における気道抵抗測定後, 肺胞に浸潤した免疫細胞数を野生型, HS2 欠損マウスで比較した。Tot: 総細胞数, Mac: マクロファージ, Neu: 好中球, Lym: リンパ球, Eos: 好酸球。
- *: $p < 0.05$.

反応を規定するサイトカインであるが¹⁹⁾, その産生制御機構は十分に明らかにされていなかった。Th2 細胞の *Il13* 遺伝子座には, そのプロモーター領域においてクロマチンの構造変化を起こす 2 つの領域が同定されている¹⁾。遠位に位置する HS 領域 CGRE は Th2 細胞において, *Il4*, *Il13* 両遺伝子座に形成される包括的なヒストンアセチル化を制御する領域として報告されている²⁰⁾。この領域を欠損した Th2 細胞では顕著に IL-13 産生が減少するが, IL-4 産生能には変化を示さなかった(図 4)。このことにより, CGRE は Th2 細胞において IL-4 産生とは独立して IL-13 産生を制御する領域であることが明らかにされた。

おわりに——Th2 サイトカイン遺伝子の包括的発現制御についての考察

転写因子 GATA-3 は, IL-4 によってその発現が規定される Th2 のマスターレギュレーターである。これは GATA-3 を欠損した T 細胞では Th2 分化が起こらないことから明らかである²¹⁾。Th2 分化過程において, 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(RHS7, CGRE, CNS-1, HS2, CNS-2)に結合でき, Th2 細胞特異的に Th2 サイトカイン遺伝子座にヒストンアセチル化, メチル化を誘導することから, クロマチンレベルでの Th2 サイトカイン遺伝子の包括的発現制御に関与していることが示唆されていた^{11,22)}。この制御機構を説明す

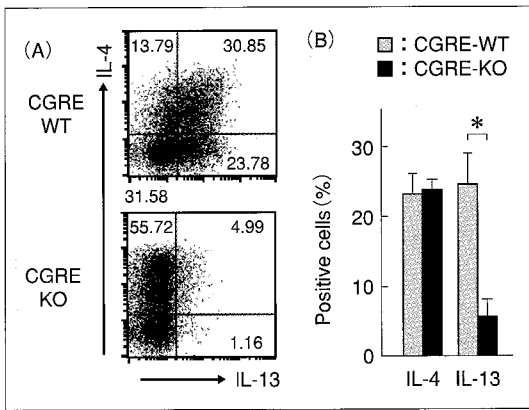


図 4 CGREによるIL-13産生制御

野生型、HS2欠損マウスからナイーブ CD4T 細胞を単離し、Th2 分化条件下において培養し、7日後に再刺激し IL-4、IL-13 産生を細胞内染色法により検出した(A)。B は、A で示された実験で得られた野生型、HS2 欠損 Th2 細胞における IL-4 または IL-13 産生細胞の割合をまとめたものである。* : $p < 0.05$ 。

るために、以下のモデルが想定される。

① **Intrachromosomal Interaction model**(図 5-A)……血球系でみられるグロビン遺伝子の包括的制御様式と同様に、Flavell らは複数の Th2 サイトカイン遺伝子の発現を制御する領域 LCR の存在を想定した。一連の解析によって、*Il13-Il5* 遺伝子間に存在する DNA 修復酵素 *Rad50* 遺伝子座

内のイントロン内に、LCR として機能する *RHS7* を同定した。このモデルでは *GATA-3* が *RHS7* に結合することにより複数の HS 領域をつなぎ合わせる“クロマチンハブ”として働くことが Th2 サイトカイン遺伝子の包括的制御につながる^{13,14}。

② **Selective expression model**(図 5-B)

このモデルは著者らの HS 領域欠損マウスの解析結果から提唱するモデルである。このモデルにおいては、Th2 サイトカイン遺伝子座における複数の HS 領域に *GATA-3* が結合することにより *Il4*、*Il5*、*Il13* といった Th2 サイトカイン遺伝子座におけるクロマチン構造変化、修飾が誘導されることで、包括的な発現誘導が説明される。

実際に、Th2 細胞のひとつひとつがすべて複数の Th2 サイトカインを同時に産生しているわけではないという結果がいくつも報告されている。この現象に対して、intrachromosomal interaction model で説明することは困難があるのに対し、selective model では容易である。以上のことから、推察して包括的な Th2 サイトカイン発現制御は selective model によって説明されるのが妥当であろう。

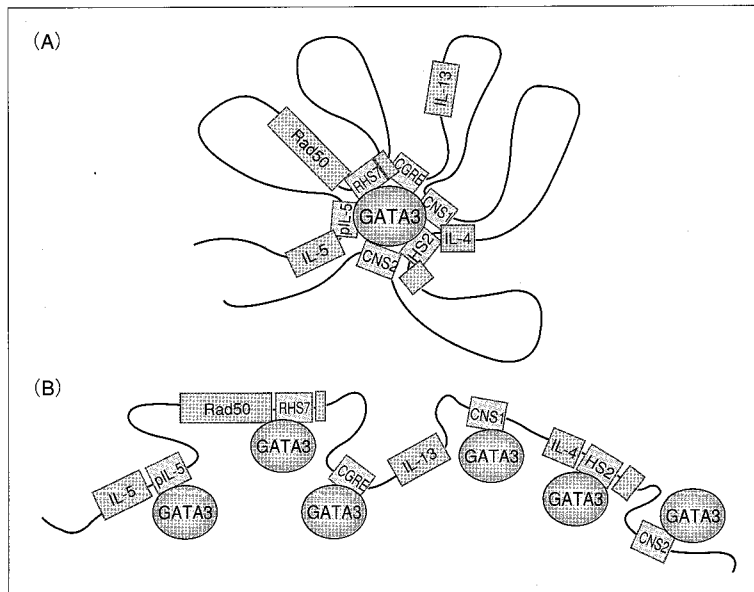


図 5 Intrachromosomal interaction model(A)とSelective expression model(B)

文献

- 1) Agarwal, S. and Rao, A. : *Immunity*, **9** : 765-775, 1998.
- 2) Takemoto, N. et al. : *Int. Immunol.*, **10** : 1981-1985, 1998.
- 3) Loots, G. G. et al. : *Science*, **288** : 136-140, 2000.
- 4) Agarwal, S. et al. : *Immunity*, **12** : 643-652, 2000.
- 5) Tanaka, S. et al. : *Immunity*, **24** : 689-701, 2006.
- 6) Solyman, D. C. et al. : *Immunity*, **17** : 41-50, 2002.
- 7) Koyanagi, M. et al. : *J. Biol. Chem.*, **280** : 31470-31477, 2005.
- 8) Ansel, K. M. et al. : *Nat. Immunol.*, **5** : 1251-1259, 2004.
- 9) Djuretic, I. M. et al. : *Nat. Immunol.*, **8** : 145-153, 2007.
- 10) Mohrs, M. et al. : *Nat. Immunol.*, **2** : 842-847, 2001.
- 11) Lee, H. J. et al. : *J. Exp. Med.*, **192** : 105-115, 2000.
- 12) Fields, P. E. et al. : *Immunity*, **21** : 865-876, 2004.
- 13) Spilianakis, C. G. and Flavell, R. A. : *Nat. Immunol.*, **5** : 1017-1027, 2004.
- 14) Lee, G. R. et al. : *Nat. Immunol.*, **6** : 42-48, 2005.
- 15) Guo, L. et al. : *Immunity*, **23** : 89-99, 2005.
- 16) Henkel, G. and Brown, M. A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91** : 7737-7741, 1994.
- 17) Tanaka, S. et al. : *Nat. Immunol.*, **12** : 77-85, 2011.
- 18) Yagi, R. et al. : *Mol. Cell. Biol.*, **27** : 8087-8097, 2007.
- 19) Grunig, G. et al. : *Science*, **282** : 2261-2263, 1998.
- 20) Yamashita, M. et al. : *J. Biol. Chem.*, **277** : 42399-42408, 2002.
- 21) Zhu, J. et al. : *Nat. Immunol.*, **5** : 1157-1165, 2004.
- 22) Takemoto, N. et al. : *J. Immunol.*, **169** : 4103-4107, 2002.

* * *