



## 解説

# Th2細胞でのGATA-3による IL-4・IL-13遺伝子発現制御機構\*

本村泰隆\*\* 久保允人\*\*,\*\*

**Key Words:** GATA-3, hypersensitive site (HS)-2, conserved GATA-3 responsive element (CGRE), chromatin remodeling, selective expression model

### はじめに

ナイーブCD4 T細胞はヘルパー T細胞(Th)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することができ, 産生するサイトカインによって異なる免疫応答を制御するいくつかの異なるサブセットへと変化する. 現在, ThはTh1, Th2, Th17, T<sub>FH</sub>などのサブセットに分類することができる. Th2細胞から産生されるサイトカインIL-4は, B細胞に働くことでimmunoglobulin(Ig) G1あるいはIgE抗体の産生を制御することが知られる. IgE抗体はアレルギー患者で優位に高値を示す抗体であり, 肥満細胞はこのIgEが結合できるFc受容体を発現しており, IgE抗体を介して肥満細胞を活性化して細胞内に貯蔵されるヒスタミンなどを含んだ顆粒を放出することで, アレルギー性炎症を構成している. また, IL-13は喘息やアトピー性皮膚炎においてエフェクターサイトカインとして上皮細胞上に存在する受容体に働くことで, 上皮細胞の繊維化などアレルギー性炎症自体を制御するサイトカインとして知られている. そのため, これらサイトカインを産生するTh2細胞が, どのようなメカニズムで制御しているのかを遺伝子レベルで理解することは, アレルギーを理解する上でかねてから重要な課題と考えられていた.

すべてのThは前駆細胞となるナイーブT細胞より分化することが知られており, Th2の分化過程はマスターレギュレーターとして働く転写因子GATA-3によって規定されている. Th2サイトカインをコードする遺伝子は, 同一染色体上にクラスターを形成して存在していることから, 複数のサイトカインが同調して発現するメカニズムは, クラスター全体を制御することができるlocus control region(LCR)によって制御されることが提唱された. しかしながら, 「Th2サイトカインの発現は同調的に制御されているのか?」「LCRが必要なのか?」「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するのか?」いくつかの未解決の問題点が残されている. 本稿では, われわれの研究成果を含めてこの包括的制御にかかわる分子機構について紹介していきたい.

### 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, 転写制御領域であるプロモーターやエンハンサーに転写因子が会合することによって決まっており, クロマチンの構造として転写因子が結合できる状態であるか否かにより規定されている. Thは分化の過程において, 特定のサイトカインをコー

\* Transcription factor GATA-3 regulates IL-4 and IL-13 gene expression in Th2 cells.

\*\* Yasutaka MOTOMURA, Ph.D. & Masato KUBO, Ph.D.: 東京理科大学生命科学研究分子病態研究部門[〒278-0022 千葉県野田市山崎2669]; Division of Biotechnology, Research Institute for Biological Sciences, Tokyo University of Science, Noda, Chiba 278-0022, JAPAN

\*\*\* 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シグナルネットワーク研究オープンラボ

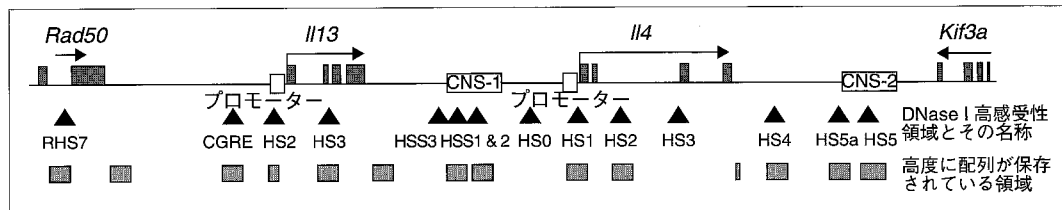


図1 IL13/IL4遺伝子座のゲノム構造  
IL13/IL4遺伝子座において哺乳類間で保存される領域とDNaseI高感受性領域(HS領域)。

ドする遺伝子の転写スイッチがオンになることが、Thとしての機能を獲得することにつながる。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で起こるクロマチン構造の変化で規定されている<sup>1)2)</sup>。この構造変化は、DNaseIに対する感受性が高くなることが指標となり、それら領域はhypersensitive site (HSもしくはHSS)と呼ばれている。IL4を含むIL5, IL13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か所のHS領域が同定されている(図1)<sup>3)</sup>。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。

#### IL-4遺伝子の クロマチン制御とヒストン修飾

転写の活性化は、染色体DNAの最小構造である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強く相関する。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することが提唱され、これをヒストンコードと呼んでいる<sup>4)</sup>。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、活性化を示すヒストンコードとして知られている。

IL-13/IL-4遺伝子座に存在するHS領域；HSS-1,

HSS-2, HS-1, HS-2, HS-3, HS-5, HS-5aはTh2分化に伴いアセチル化され、H3-K4がメチル化される<sup>5)</sup>。分化前段階にあるナイーブCD4 T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なるためと考えられる<sup>6)~8)</sup>。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H3-K4のメチル化が誘導されはじめる<sup>8)</sup>。これは、われわれが以前報告した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<sup>9)</sup>と考え合わせると、GATA-3の働きはH3-K4をメチル化修飾することにあるとも考えられる<sup>8)</sup>。

#### 転写制御領域HSによる IL-4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、そのすべてが必要なのか？ それともそれぞれが細胞特異性など異なる働きを持つのか？ などそれぞれの働きについては不明となっていた。われわれは、それぞれのHS領域をゲノムから欠損させたマウスを複製することで、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), HS-2, HS-4とIL13遺伝子座のconserved GATA-3 responsive element (CGRE)を解析の対象とした(図1)。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した。CNS-1, CNS-2, 3'UTRの欠損マウスのTh2細胞では、わ

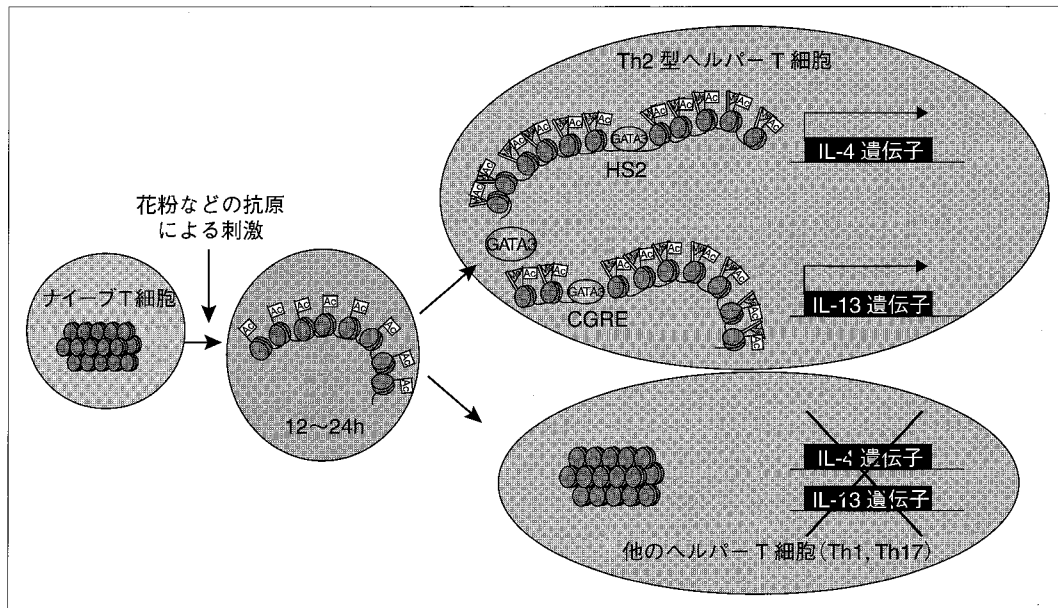


図2 Th2分化における運命決定メカニズム

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ぐれる。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。

わずかなIL-4産生の低下しか認められなかったが、HS-2欠損マウスのTh2細胞はIL-4の産生が10分の1にまで減少した。HS-2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領域であったが<sup>10)</sup>、欠損マウスを用いた解析からTh2細胞におけるIL-4の産生に必須の領域であることが明らかとなった<sup>8)</sup>。

次に、マスターレギュレーターGATA-3とHS-2との関係を明らかにするため、特異抗体を用いたクロマチン免疫沈降chromosome immunoprecipitation (ChIP)法を用いた解析が行われた。Th2細胞では、GATA-3がHS-2領域に強く結合しており、HS-2欠損マウス由来のT細胞でみられたIL-4の産生抑制は、GATA-3を過剰に発現させても回復することはなかった。このことから、HS-2領域はIL-4産生制御において必須のGATA-3結合領域であることが明らかにされた。一方、HS-2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も変

化はみられなかった。以上の知見から、IL-4遺伝子座のHS-2はGATA-3の結合領域であり、この領域がクロマチン構造変化を起こすことが、*Il4*転写には必要な行程であった(図2)。

### CGREによるIL-13産生制御

前述したように、IL-13は気道炎症を制御する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報告された<sup>6)</sup>。ところが、CGRE欠損マウスの解析から、この領域はIL-13の産生には必須であるが、IL-4の産生には関与しないことが示された<sup>8)</sup>(図2)。GATA-3に対する特異抗体を用いたChIP解析から、CGREにもGATA-3が結合することが示され、HS-2同様GATA-3依存的に転写を制御する領域であることが判明した。しかしながら、その働きはIL-13

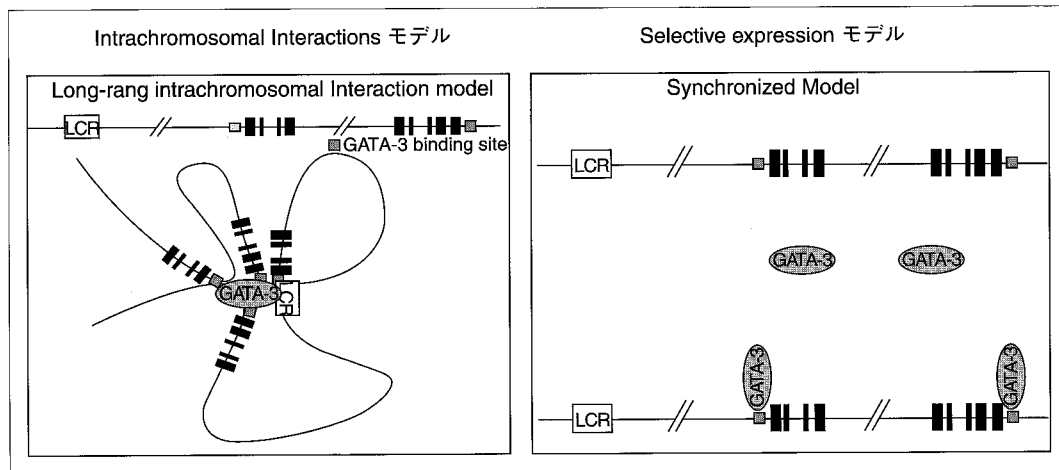


図3 Intrachromosomal interactionsモデルとselective expressionモデル

に対して限局しており、ほかのTh2サイトカインには影響を及ぼさないことが示された。

### 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<sup>11)</sup>、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<sup>12)</sup>。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<sup>13)14)</sup>。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つのモデルが提唱されている(図3)。

#### 1. Intrachromosomal interactionsモデル

Flavellらは、血球系でのグロビン遺伝子でみ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。長年にわたる解析の末、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GATA3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つながるとい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<sup>15)16)</sup>。

#### 2. Selective expressionモデル

このモデルはわれわれのゲノム欠損マウスで得られた結果から提唱したモデルで、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GATA-3によって制御を受ける領域が存在する。Th2分化環境下でGATA-3が高発現すると、これら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同時に惹起され、包括的な制御を誘導するとするモデルで、われわれはselective expressionモデルと呼んでいる。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するわけではない事例が多くの実験系で証明されているため、intrachromosomalモデルではこの現象を説明することは困難になってしまった。一方、selective expressionモデルではこの現象が容易に説明できることが、われわれがこのモデルの妥当性を主張する根拠となっている。

#### 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*遺伝子座などそれぞれの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。II4遺伝子座の場合、HS-2領域がそれに相当し、その欠損はIL-4を欠くことで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.
- 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.
- 3) Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* 2006 ; 24 : 607.
- 4) Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001 ; 293 : 1074.
- 5) Baguet A, Bix M. Chromatin landscape dynamics of the Il4-Il13 locus during T helper 1 and 2 development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 11410.
- 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.
- 7) Avni O, Lee D, Macian F, et al. T<sub>H</sub> cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat Immunol* 2002 ; 3 : 643.
- 8) Tanaka S, Motomura Y, Suzuki Y, et al. The enhancer HS2 critically regulates GATA-3-mediated Il4 transcription in T<sub>H</sub>2 cells. *Nat Immunol* 2011 ; 12 : 77.
- 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.
- 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.
- 11) Zhu J, Min B, Hu-Li J, et al. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T<sub>H</sub>1-T<sub>H</sub>2 responses. *Nat Immunol* 2004 ; 5 : 1157.
- 12) 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.
- 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.
- 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.
- 15) Spilianakis CG, Flavell RA. Long-range intrachromosomal interactions in the T helper type 2 cytokine locus. *Nat Immunol* 2004 ; 5 : 1017.
- 16) 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.

\* \* \*