

〔第一回千葉医学会賞：基礎医学部門〕

アレルギー発症を制御する Th2 細胞の分化と 機能維持のエピジェネティクス

山下 政 克

要 旨

CD4 陽性ヘルパー T (Th) 細胞は免疫反応の司令塔とも言える細胞であり、産生するサイトカインの種類により、幾つかのサブセットに分類できます。Th細胞サブセットは、通常は互いにバランスを取りながら免疫反応を担っていますが、そのバランスが崩れて Th2 細胞優位になった場合、アレルギー疾患が発症すると考えられています。この Th2 細胞は、IL-4, IL-5 や IL-13 などの Th2 サイトカインの産生を介してアレルギーの病態形成に関わっています。私たちは、この Th2 細胞の分化や機能を制御することで、IgE 産生や炎症部位への好酸球浸潤、気道過敏性亢進などのアレルギー反応の抑制が可能となり、アレルギー性疾患の根治療法を確立できると考えて、Th2 細胞の分化誘導ならびに形質維持のメカニズムを解明する研究を行ってきました。その結果、Th2 細胞の分化には、転写因子 GATA3 による Th2 サイトカイン遺伝子発現のエピジェネティックな変化が深く関わっていることを見出しました。また、アレルギーの慢性化のメカニズムとして、ヒストンメチル基転移酵素 MLL1 が、エピジェネティックな制御により、GATA3 発現を維持し続けることが重要であることも示しました。さらに、MLL1 の発現を低下させることで、アレルギー性気道炎症モデルの病態を改善できることも明らかにしました。現在は、これらの知見を基盤として、分子的解析に基づくアレルギー疾患の治療開発を目指して研究を継続しています。

Key words: アレルギー、ヘルパー T (Th) 細胞、Th2 サイトカイン、エピジェネティクス

はじめに

アレルギー疾患は、国民の 3 人に 1 人が罹患しているにもかかわらず、治療法は、対症療法がほとんどで、未だに根治療法は開発されていません。私たちは、これまで CD4 陽性ヘルパー T (Th) 細胞の役割解析を中心に、アレルギー発症の分子メカニズムを研究してきました。Th細胞は免疫反応の司令塔とも言える細胞であり、産生するサイトカインの種類によって、Th1, Th2, Th17, iTreg (inducible regulatory T細胞) の少なくとも 4 種類に分類されます (図 1) [1]。これらの細胞は、通常は互いにバランスを取りながら免疫反

応を担っていますが、サブセット間のバランスが崩れて Th2 細胞優位になった場合に、アレルギー疾患が発症すると考えられています。図 2 に示したように、Th2 細胞はアレルギー反応の最も上流に位置すること、また、実際のアレルギー反応の場においても、インターロイキン (IL)-4 や、IL-5, IL-13 といったサイトカイン (Th2 サイトカイン) の分泌を介して、抗体産生や好酸球の遊走に対して司令塔的な役割を演ずることから、アレルギー性疾患の根幹に位置する細胞であると言えます。私たちは、この Th2 細胞の分化や機能を制御することで、IgE 産生や炎症部位への好酸球浸潤、気道過敏性亢進などのアレルギー反応の

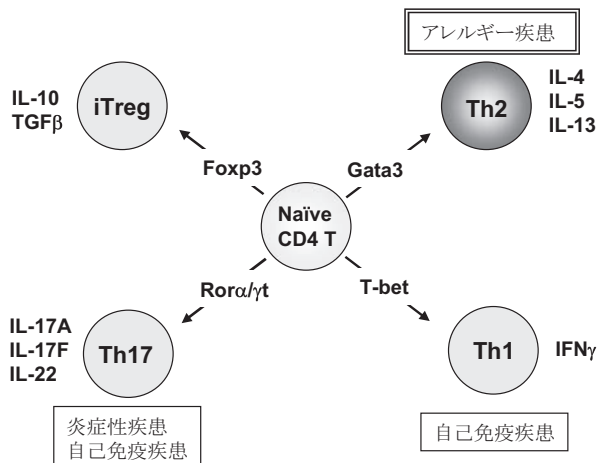


図1 ヘルパー T (Th) 細胞分化の概略

Th1/Th2/Th17/iReg細胞はともにナイーブCD4 T細胞から分化してくる。それぞれの細胞が主に産生するサイトカインと、細胞分化におけるマスター転写因子を記載してある。

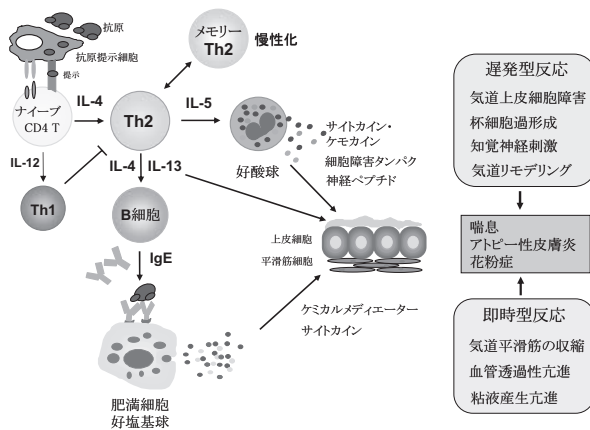


図2 アレルギー性(気道)炎症のメカニズム

生体内に侵入した抗原は抗原提示細胞によってナイーブCD4 T細胞に提示される。抗原刺激で活性化されたT細胞は、サイトカイン環境によってTh2やTh1細胞などへと分化する。アレルギー性炎症の発症には、このTh2細胞が重要な役割を担っている。Th2細胞から産生されるIL-4やIL-13はB細胞に作用して、抗体のクラスをIgEへとスイッチさせる。産生されたIgEは、肥満細胞や好塩基球上のIgE受容体と結合し、抗原によって架橋されてケミカルメディエーターを放出して平滑筋の収縮や血管透過性の亢進等の即時型反応を誘導する。一方、IL-5は好酸球の分化や遊走を促しする。好酸球はサイトカインやケモカイン、細胞障害性蛋白、神経ペプチドを産生して、気道上皮の障害や杯細胞の過形成、知覚神経過敏、最終的には気道のリモデリングにつながる遅発型反応を誘導する。また、Th2細胞から産生されたIL-13もこの反応に関与すると考えられている。

抑制が可能となり、アレルギー性疾患の根治療法の開発に結びつくと考えて、Th2細胞の分化誘導ならびに形質維持のメカニズムを解明する研究を行ってきました。その結果、このTh2細胞の分化には、Th2サイトカイン遺伝子発現のエピジェネティックな変化が深く関わっていることを見出しました[2]。エピジェネティック変化とは、DNAの配列変化を介さないで後天的に誘導される協調した遺伝子発現変化の総称であり、環境要因によって変化誘導が制御されていると考えられています。最近では、メタボリックシンドロームや心血管炎症性疾患なども、このエピジェネティックな遺伝子発現変化が原因で発症することも考えられています。本稿では、アレルギー疾患を制御するTh2細胞の分化と機能のエピジェネティクスについて概説するとともに、私たちの最近の取り組みを紹介させていただきます。

エピジェネティック変化の実態

外界からの刺激により、特定遺伝子領域のヒストン修飾やゲノムDNAのメチル化状態の変化が誘導され、その結果、転写因子や酵素などのアクセスしやすさが変わり、遺伝子発現が変化します。この一連の現象をエピジェネティック変化と呼びます。エピジェネティック変化は、細胞分化のごく初期に誘導され、長期間維持されると考えられていることから、その分子機構を解析することは、免疫反応を含めた外界からの刺激に対する生体反応を理解する上で非常に重要です。エピジェネティック変化のなかでもヒストン修飾と遺伝子発現の変化の関係は良く研究されています。ヒストンは、ヒストンH2A/H2B/H3/H4分子がそれぞれ2つずつ会合した8量体として存在し、酵母からヒトまで非常に良く保存されています。ヒストンのC末端領域はヒストンフォールドと呼ばれる球状のドメインであり、コアヌクレオソームの形成に寄与しています。一方、塩基性アミノ酸に富むN末端領域は一定の構造はとらず、ヒストンテールと呼ばれます。このヒストンテールは、アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化などの化学修飾を受け、エピジェネティックな制御において中心的役割を演じており、このヒストン

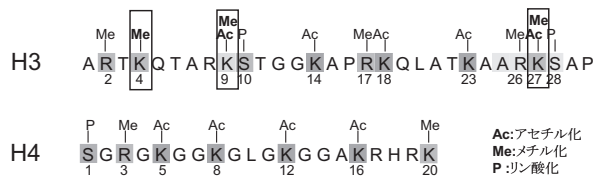


図3 ヒストンテールの化学修飾

ヒストンH3及びH4のN末端アミノ酸配列と化学修飾を示した。様々な残基がアセチル化 (Ac), メチル化 (Me), リン酸化 (P) 修飾を受ける。そのなかでも、ヒストンH3の4番目, 9番目, 27番目のリジン残基の修飾は転写と密接な関係にある。

修飾による遺伝子発現調節は“ヒストンコード”仮説として知られています[3]。

図3にヒストンH3・H4のN末端領域の代表的な修飾部位を示しました。ヒストンH3の9番目のリジン残基のアセチル化と4番目のリジン残基のメチル化は、それぞれ転写活性化状態と転写記憶に関与しているとされており、活性化クロマチンの指標となっています。また、9番目と27番目のリジン残基のメチル化は、遺伝子発現のサイレンシングと関わっています。

Th2 細胞分化誘導のエピジェネティクス

図1に示したように、Th細胞は、主にIFN γ を産生するTh1細胞とIL-4, IL-5, IL-13などを産生するTh2細胞, IL-17A, IL-17FやIL-22を産生するTh17細胞, IL-10やTGF β を産生し免疫反応の抑制に関わる抑制性T細胞であるiTreg細胞の少なくとも4つのサブセットに分けられます[1,4-6]。Th1細胞は細胞性免疫を誘導し細胞内感染病原体の排除に重要であるのに対し、Th2細胞は液性免疫を誘導して細胞外感染病原体などの免疫反応を担うことがわかっています。また、Th17は細胞外病原体に対して作用するとともに、種々の自己免疫性疾患の発症に関与していると考えられています。いずれのTh細胞サブセットも抗原刺激を受けた経験のない末梢CD4 T細胞である、ナイーブT細胞から抗原刺激を受けて分化します。これまでに多くの研究者によりサブセット特異的なサイトカイン発現を制御する転写因子の同定とその機能解析が精力的におこなわれ、Th1細胞分化には転写因子のT-betが、Th2細胞分化にはGata3, Th17細胞分化にはRor γ t/Ror α ,

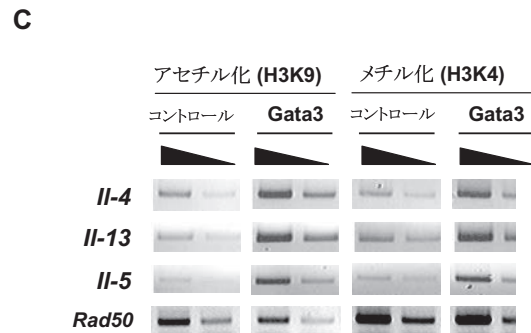
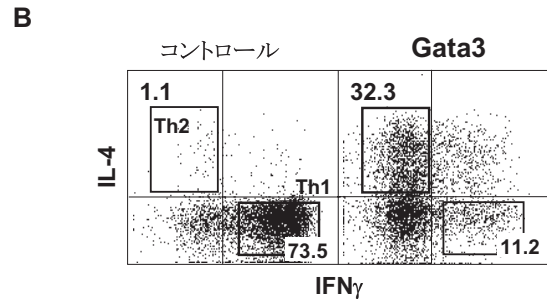
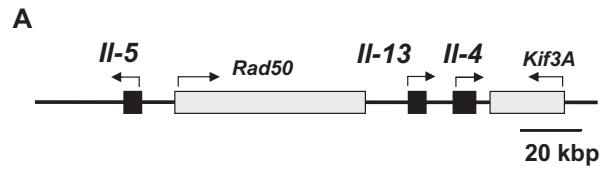


図4 Th2 サイトカインの協調的な発現誘導

- (A) Th2 サイトカイン遺伝子座の模式図。矢印は転写の方向を表している。
- (B) GATA3 導入 Th1 細胞からのサイトカイン産生。IFN γ 産生細胞 (青枠) が減少し, IL-4 産生細胞 (赤枠) が増加しているのが分かる。
- (C) エフェクター Th1 細胞にGATA3をレトロウイルスベクターにて導入した。GATA3 導入細胞のTh2 サイトカイン遺伝子座のヒストンH3K9/14のアセチル化, H3K4メチル化をクロマチン免疫沈降で検討した。

iTreg細胞にはFoxp3の発現が重要であることが見出されました。

Th2細胞から産生されるIL-4, IL-5, IL-13といったTh2サイトカインをコードする遺伝子は、ヒトでは第5染色体(5q31)に、マウスでは第11染色体上にクラスターを形成しており、その領域はTh2サイトカイン遺伝子座と呼ばれています(図4A)。Th2サイトカイン遺伝子座は120kpにわたるクロモゾームの領域で、ここには上記のサイトカイン遺伝子の他にRad50遺伝子が存在します。Th2サイトカイン遺伝子はクラスターとして存在し、協調的に発現が誘導されますが、その協調的な制御はTh2細胞分化マスター転

写因子のGata3によって行われていることを、私たちを含めた幾つかのグループが見出した[7,8]。Th2細胞分化時に、Gata3の発現がIL-4/Stat6依存的に起こり、それによりTh2サイトカイン遺伝子座のヒストン修飾変化をはじめとしたエピジェネティック変化が誘導されます。Th1細胞やStat6を欠損したTh2細胞では、Th2サイトカイン遺伝子座のエピジェネティック変化は誘導されませんが、これらの細胞にGata3を導入することでTh2サイトカインを産生するTh2細胞が分化するとともに、活性化ヒストン修飾が誘導されます(図4B, C)。また、細胞内のクロマチンの立体構造を解析する手法であるChromosome Conformation Captureアッセイにより、Th2サイトカイン遺伝子座のLocus Control Region (LCR)が、T細胞特異的にハブをTh2サイトカイン遺伝子座に形成すること、Gata3とStat6は、そのハブを介した遺伝子間の相互作用形成・維持に必要であることも示されています。Th2細胞特異的LCRは、このGata3/Stat6依存的に形成されるハブを介して、散在するTh2サイトカイン遺伝子座のプロモーターやエンハンサーを近傍に束ね集めることで、協調的な遺伝子発現を制御していると考えられています。

Th2細胞機能維持のエピジェネティクス

Th2サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリングに成功し、Th2細胞へと分化した細胞は、体内から抗原が除去された後もナイーブな状態に戻ることなく、Th2細胞としての機能を維持(記憶)します。その細胞がメモリーTh2細胞です。メモリーTh2細胞は、生体内に長期間生存し、アレルギーの慢性化にも関与していることが予想されています[2]。私たちは、Th2細胞記憶の維持にヒストンH3K4メチル基転移酵素の一つであるMixed-lineage leukemia 1 (MLL1)やMLL1複合体を形成する分子であるMultiple endocrine neoplasia (Menin)が必要であることを見出しました[9,10]。図5にMLL1/Menin複合体の模式図を示します。MLL1の発現を低下させると、Th2細胞分化に伴って一旦は誘導されたTh2サイトカイン遺伝子座/Gata3遺伝子座の活

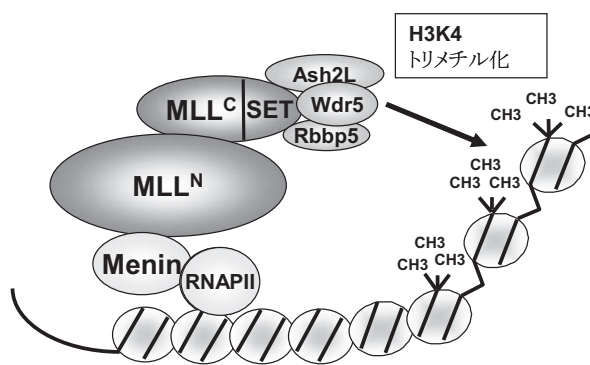


図5 MLL1複合体によるヒストンH3K4トリメチル化の制御

MLL1は、Menin, Ash2L, Rbp5やWdr5と複合体を形成し、H3K4をトリメチル化する。さらに、MLL1複合体にはRNAポリメラーゼII (RNAP II)も含まれる(文献[11]を改変)。

性化状態は維持されず、ナイーブCD4 T細胞に近い状態に戻ってしまい、Th2細胞記憶の形成ができません。また、私たちは、メモリーTh2細胞の機能を個体レベルで解析するため、メモリーTh2細胞依存的なアレルギー性気道炎症モデルを確立し、MLL1の役割について解析しました(図6A)。まず、卵白アルブミン(OVA)特異的TCRトランスジェニック(Tg)マウスであるDo11.10 TgマウスからナイーブCD4 T細胞を調製し、*in vitro*でエフェクターTh2細胞を分化誘導します。そのエフェクターTh2細胞をヌードマウスに移入して4週間後、生体内のCD4 T細胞の大部分はOVA特異的メモリーTh2細胞となります。私たちは、このマウスをメモリーTh2マウスと呼んでいます。メモリーTh2マウスに抗原であるOVAを経気道的に投与することで、メモリーTh2細胞特異的アレルギー性気道炎症を誘発することが出来ます。このモデルを用いて、メモリーTh2細胞機能が維持できないMLL1^{+/-}メモリーTh2細胞のアレルギー性気道炎症誘導能について検討を行いました。MLL1^{+/-}メモリーTh2マウスではMLL1^{+/+}メモリーTh2マウスに比べ、細気管支周囲への炎症細胞の浸潤が減少しており(図6B)、さらに細気管支における粘液産生の度合いも低いものでした(図6CB)。また、アレルギー性気道炎症において特徴的な、気管支肺泡洗浄液(BALF)中への好酸球を主体とする細胞浸潤もMLL1^{+/-}メモリーマウスにおいて優

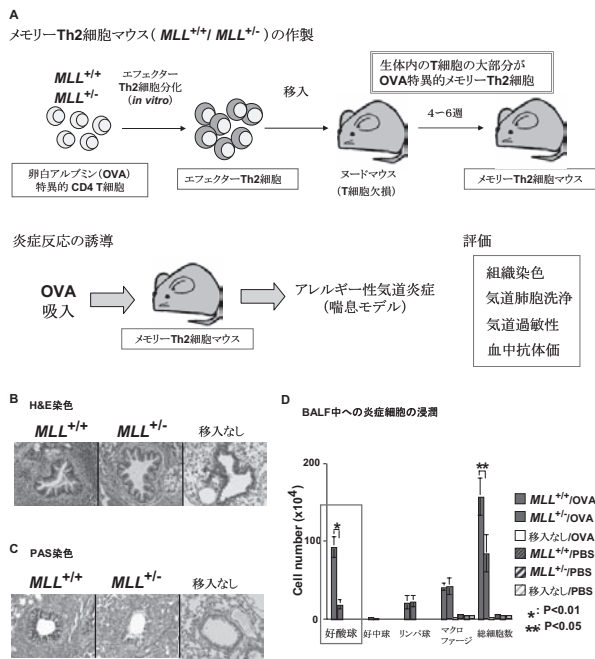


図6 $MLL1^{+/-}$ メモリー Th2 マウスでは、メモリー Th2 細胞依存性の気道炎症が低下する。

- (A) メモリー Th2 マウスの作製とアレルギー性気道炎症の誘導
- (B) 細気管支周囲への炎症細胞浸潤 (H&E 染色)
- (C) 粘液過剰産生 (PAS 染色)
- (D) 気管支肺胞洗浄液中の細胞組成

位に低下していました (図6D)。さらに機能的試験としてメサコリン感受性を指標に気道過敏性の亢進について検討を行ったところ、 $MLL1^{+/-}$ メモリーマウスでのメサコリン反応性は、Th2細胞を移入していないコントロールマウスとほぼ同程度であり、気道過敏性の発症がほとんど起こっていませんでした。これらの実験結果も、 $MLL1$ のメモリー Th2 細胞機能維持における重要性を支持しています。

おわりに

私たちの研究から、アレルギー発症の鍵を握る Th2 細胞の分化はエピジェネティックな制御を受けていることが明らかになってきました。また、最近、難治性炎症疾患の病態形成に関与する Th1 細胞や Th17細胞の分化もエピジェネティックな機構で制御されていることも報告され始めています[12]。今後は、エピジェネティクスの観点からの免疫疾患解析が進み、エピジェネティッ

ク制御による治療法開発が盛んになると予想されます。現在、私たちは Th2 サイトカインの一つである *IL-5* 遺伝子座の活性化を特異的に阻害する低分子化合物を見出し、その作用機構の解析を進めています。この取り組みを是非成功させ、世界でも報告がほとんどない遺伝子座特異的リモデリング阻害剤によるアレルギー性炎症の制御法の開発につなげたいと考えています。

最後になりましたが、このたびは、研究テーマ「Th2 細胞分化と機能維持のエピジェネティクス」で第一回千葉医学会賞を、また、受賞の研究内容について千葉医学雑誌に執筆の機会を賜り、誠に有り難うございました。この受賞と執筆を光栄に思いますとともに、これを励みにさらなる研究推進に取り組んで行きたいと考えております。本稿で紹介した研究は、千葉大学医学研究院免疫発生学教室の中山俊憲教授の指導の下で行った研究です。私は、第一回千葉医学会賞を受賞させて頂いた後、2010年1月1日付けで、かずさDNA研究所ヒトゲノム研究部ゲノム医学研究室の室長に転任しました。かずさDNA研究所は、千葉市から房総半島を車で1時間ほど下った木更津市のかずさアカデミアパーク内にあり、東京湾アクアラインを使うと東京や横浜からは1時間半位と比較的短時間で訪れることが出来ます。本研究所は、千葉県が支援する研究所として平成6年に開所し、ヒトだけでなく植物のDNA研究において数多くの研究成果をあげています。医学研究の場としてはなじみが薄いかもしれませんが、ヒトゲノム研究室ではこれまでも原発性免疫不全症の原因遺伝子の同定・解析が行われてきました。また、現在は、千葉大学・理化学研究所と共同で地域イノベーション戦略支援プログラム事業を推進しています。今後は、このネットワークとかずさDNA研究所の遺伝子解析技術を活用し、慢性炎症をターゲットとした疾患エピジェネティクス研究を行っていきたいと思っています。

SUMMARY

CD4 positive helper T (Th) cells act like a conductor in immune responses, and are subdivided into several populations based on their cytokine production profile. Th cells usually balance each

other, and regulate protective immune responses. However, if the balance shifts towards a type2 bias, the allergic diseases can develop. Th2 cells are involved in the earliest step of allergic reactions. They regulate the onset of allergic reaction through secretion of interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-13, so-called Th2 cytokines. We hypothesized that the control of Th2 cell differentiation and functions results in the inhibition of allergic responses, such as IgE production, recruitment of eosinophils at inflammatory lesions, and airway hyper-responsiveness. Therefore, we have investigated the molecular mechanisms involved in the induction of Th2 cell differentiation and the maintenance of Th2 cell identity. As a result, we found that the transcription factor GATA3 regulates Th2 cell differentiation via epigenetic regulation of Th2 cytokine expression. In addition, we found that a histone methyltransferase, MLL1 (Mixed lineage leukemia), plays a crucial role in the development of chronic allergic responses. MLL1 maintains GATA3 expression and the ability to produce Th2 cytokines in memory Th2 cells via epigenetic mechanisms. We also demonstrated that down-regulation of MLL1 expression results in the improvement of the symptoms in a model of allergic airway inflammation. In the future, we hope to find new strategies for the treatment of allergic disorders by defining of the molecular mechanisms that underlie disease.

文 献

- 1) Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 445-89.
- 2) Nakayama T, Yamashita M. Critical role of the Polycomb and Trithorax complexes in the maintenance of CD4 T cell memory. *Semin Immunol* 2009; 21: 78-83.
- 3) Turner BM. Cellular memory and the histone code. *Cell* 2002; 111: 285-91.
- 4) Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 485-517.
- 5) Dong C. T_H17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 337-48.
- 6) Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 775-87.
- 7) Nakayama T, Yamashita M. Initiation and maintenance of Th2 cell identity. *Current Opinion in Immunology* 2008; 20: 265-71.
- 8) Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A. Regulation of Th2 differentiation and Ii4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 607-56.
- 9) Yamashita M, et al. Crucial role of MLL for the maintenance of memory T helper type 2 cell responses. *Immunity* 2006; 24: 611-22.
- 10) Onodera A, et al. STAT6-mediated displacement of polycomb by trithorax complex establishes long-term maintenance of GATA3 expression in T helper type 2 cells. *The Journal of Experimental Medicine* 2010; 207: 2493-506.
- 11) Yokoyama A, et al. Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 5639-49.
- 12) Wei G, et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* 2009; 30: 155-67.