

研究課題別評価

1.研究課題名 :免疫細胞遺伝子構築の人為的制御

2.研究者氏名 :山下 政克

グループメンバー :菅谷 薫子 (研究期間 H12.10.1. ~ H15.9.30.)

鵜飼 磨貴 (研究期間 H14.4.1. ~ H.15.7.31.)

3.研究の狙い :

免疫担当細胞は、いったん遺伝子内に構築されているプログラムを病原体排除のための最適なプログラムに作り替え、細胞機能を変換して生体防御反応を行なっている。この機能変換にはエピジェネティックな変化、つまりクロマチンのリモデリングが伴っていると考えられ、その異常は、免疫疾患発症の一因になっていると予想される。よって、免疫担当細胞におけるクロマチンリモデリング誘導・維持のメカニズムを解明することが、免疫疾患の治療法の開発に結びつくことが期待される。そこで、本研究ではアレルギー疾患の発症に深く関与している、Th2 細胞の機能分化に伴うTh2 サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリングの誘導機構について解析を行ない、アレルギー疾患発症のメカニズムを探りたい。

4.研究結果 :

(1)Th2 サイトカイン遺伝子座クロマチンリモデリング誘導機構の解析

ナイーブCD4T 細胞からTh2 細胞へ分化する過程において、Th2 サイトカイン遺伝子座でクロマチンのリモデリングが起きること、また、転写因子 GATA3 がリモデリングの誘導に必須であることをヒストン H3 のアセチル化を指標に明らかにした。さらに、分化に伴うGATA3 のゲノム上の結合部位の同定を行い、IL-13/IL-4 遺伝子座において CGRE (Conserved GATA Response Element)1、IL-5 遺伝子座において CGRE2 を同定した。IL-13/IL-4 遺伝子座と IL-5 遺伝子座におけるGATA3 の結合はGATA3 の発現量によって差が認められ、IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリングにはより高いGATA3 の発現が必要であった。これは、2つの GATA 結合領域におけるGATA3 に対する親和性の違いによるものであると推測された。また、分化に伴ってヒストンのアセチル化が誘導された領域に一致して、非翻訳領域においても広範囲にわたって転写が起きていることを見いだした。これらの知見をもとに、Th2 サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリング誘導機構に関して新しいモデルを提唱した。

(2)CD8 T 細胞におけるTh2 サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリング

末梢のT細胞は、CD4/CD8 分子の発現パターンにしたがってCD4 T細胞とCD8 T細胞に分けられる。CD8 T細胞もTh2 サイトカインを産生するTc2細胞に分化することが知られていたが、Th2細胞に比べてIL-4の産生能が低いためB細胞に作用して抗体産生誘導する能力が弱いことがわかっていた。そこで、Tc2細胞におけるTh2 サイトカイン遺伝子座のヒストンアセチル化の状態を解析したところ、IL-13 遺伝子エクソン4の直後から、Tc2細胞においてアセチル化レベルが低下することがわかった。この一因として、活性化CD8 T細胞に強く発現する転写抑制因子 ROG (Repressor of GATA)を同定した。ROGは、IL-13 遺伝子エクソン4の中にあるROG結合部位に結合し、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)-1、-2 をリクルートすることでIL-4の発現を負に制御していると考えられた。

(3) GATA3 発現誘導における Erk/MAPK 経路の役割の解析

Erk/MAPK 経路の活性化は Th2 細胞分化において重要であることは知られていたが、その標的分子は不明であったが、本研究において GATA3 がその一つであることが明らかとなった。GATA3 は、半減期が数時間の非常に不安定な分子でユビキチン-プロテアソーム系で素早く分解されることがわかった。Erk/MAPK 経路が活性化した場合、この分解が抑制されることで GATA3 タンパク質の発現量が上昇することがわかった。現在のところ、詳しい作用機序は不明ではあるものの、Erk/MAPK の Th2 細胞分化における役割の一つが、GATA3 の発現上昇にあることが明らかとなった。

(4) Th2 サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリング誘導に必要な GATA3 機能部位の同定

GATA3 による Th2 サイトカイン遺伝子座のクロマチン誘導機構をさらに詳しく解析するため、誘導に必要な GATA3 の機能部位の同定を行なった。その結果、GATA3 の C 末端付近の約 20 アミノ酸を欠失することによって、GATA3 の機能は完全に消失することがわかった。この変異体は CGRE を含む幾つかの GATA3 結合配列結合しうること、Th2 サイトカイン遺伝子座ヒストンのアセチル化誘導に必要な転写共役因子 p300 と正常に会合することが確かめられた。現在、機能が消失する原因を解析中である。

5. 自己評価：

3年前の研究計画は、今にして思えば非常に抽象的で焦点の絞りにくい計画であったと思う。その中で、Th2細胞の機能分化の誘導におけるGATA3の役割について明らかにできた点は評価できる。しかしながら、現時点においては現象論を見いだしたに過ぎず、この成果をアレルギー疾患の治療法開発に結びつけるためには、さらなるGATA3機能発現の分子メカニズムの解析が必要であると思われる。また、本研究においては分化の誘導について主に解析したが、実際の病気においては既に分化してしまったメモリーT細胞が病態に関与していることが予想されることから分化誘導から維持につながる分子機構の解明を行なわなければならない。今後、本研究で得られた知見をもとに研究を発展させていけるか否かが、本当の意味での評価になると考えている。

6. 研究総括の見解：

末梢 T 細胞の機能分化機構の解明を中心に免疫関連疾患の制御の実現を目指す。特にクロマチン構造の安定的調節と制御を遺伝子、分子レベルで実現しようとしている。見るべき成果があがりつつあるが、着想の秀抜さから、期待にこたえる為にもなお一層の努力が要求される。

7. 主な論文など：

論文

1. Omori, M., Yamashita, M., Inami, M., Ukai-Tadenuma, Maki., Kimura, M., Nigo, Y., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Taniguchi, M. and Nakayama, T.: CD8 T cell-specific downregulation of histone hyperacetylation and gene activation of the IL-4 gene locus by ROG, repressor of GATA. *Immunity* 19:281-294 (2003). (equally contributed)
2. Murata, K., Inami, M., Hasegawa, A., Kubo, S., Kimura, M., Yamashita, M., Hosokawa, H., Nagao, T., Suzuki, K., Hashimoto, K., Shinkai, H., Koseki, H., Taniguchi, M., Ziegler, S F. and Nakayama, T.: CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. *Int. Immunol.* 15:987-992 (2003).
3. Shirai, T., Magara, K K., Motohashi, S., Yamashita, M., Kimura, M., Suwazomo, Y., Nogawa, K., Kuriyama, T., Taniguchi, M. and Nakayama, T.: TH1-biased immunity induced by exposure to

- Antarctic winter. *Clinical Immunol.* 111:1353-1360 (2003).
4. Kamata, T., Yamashita, M., Kimura, M., Murata, K., Inami, M., Shimizu, C., Sugaya, K., Wang, C-R., Taniguchi, M. and Nakayama, T. : SH2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 controls the development of allergic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 111:109-119 (2003). (equally contributed)
 5. Yamashita, M., Ukai-Tadenuma, M., Kimura, M., Omori, M., Inami, M., Taniguchi, M., and Nakayama, T. : Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal from the IL-13 gene locus. *J. Biol. Chem.* 277:42399-42408 (2002).
 6. Shibata, Y., Kamata, T., Kimura, M., Yamashita, M., Wang CR., Murata, K., Miyazaki, M., Taniguchi, M., Watanabe, N., and Nakayama, T.: Ras activation in T cells determines the development antigen-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation. *J. Immunol.* 169:2134-2140 (2002).
 7. Kikkawa, E., Yamashita, M., Kimura, M., Omori, M., Sugaya, K., Shimizu, C., Katsumoto, T., Ikekita, M., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: T(h)1/T(h)2 cell differentiation of developing CD4-single positive thymocytes. *Int. Immunol.* 14:943-951 (2002). (equally contributed)
 8. Kimura, M., Koseki, Y., Yamashita, M., Watanabe, N., Shimizu, C., Katsumoto, T., Kitamura, T., Taniguchi, M., Koseki, H., and Nakayama, T.: Regulation of Th2 cell differentiation by mel-18, a mammalian polycomb group gene. *Immunity.* 15: 175-283 (2001).

総説・解説

1. 山下政克、中山俊憲 (2003) Th2 細胞分化とクロマチンリモデリング *Annual Review 免疫* 2003 17? 23
2. 山下政克 (2003) Th2 サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリングとTh2、Tc2 細胞分化制御 *医学のあゆみ* 225? 230

口頭発表・招待講演

口頭発表 12 回 (うち海外 3 回)
招待講演 1 回 (うち海外 1 回)