

# 機能食品成分による T 細胞分化のエピジェネティクス制御機構の解明

関 亦 正 幸

山形大学医学部看護学科 非常勤職員

## 緒 言

免疫システムは我々の身体を多種多様な病原体から守っており、ヘルパー T (Th) 細胞はこのシステムにおいて司令塔的役割を担っている。Th 細胞は侵入した病原体の種類に応じて機能の異なるエフェクター細胞 (Th1、Th2、Th17) に分化し、特有のサイトカインを産生することで病原体排除に最適な免疫応答を誘導する。例えば、Th1 細胞はインターフェロンガンマ (IFN- $\gamma$ ) を産生することで細胞性免疫に関与し、Th2 細胞はインターロイキン 4 (IL-4) を産生することで抗体産生の調節に関与する<sup>1)</sup>。このように、Th 細胞の産生するサイトカインは免疫応答のメディエーターとして重要な役割を果たす一方で、その不適切な産生は様々な免疫疾患の原因となる慢性炎症を誘発する。

炎症性サイトカイン IL-22 は IL-10 ファミリーに属するサイトカインであり、IL-10R2 と IL-22R1 からなるヘテロ二量体を受容体とする。IL-10R2 の発現が多岐にわたるのに対し、IL-22R1 の発現は小腸・呼吸上皮細胞、皮膚角化細胞、肝臓細胞などの非造血系細胞に限局している。このことから、IL-22 の標的となる細胞は、様々な病原体に暴露される上皮系細胞と考えられている。約 1 0 0 0 種類もの細菌が生息している腸管において、主に Th17 細胞から産生される IL-22 は、病原体からの防御機能や損傷組織の修復再生に重要なサイトカインである。ところが、長期にわたる IL-22 の過剰産生は、IL-17 や IFN- $\gamma$  などの他の炎症性サイトカインと協調作用することで、炎症性腸疾患を引き起こすと考えられている。このような背景から、IL-22 の遺伝子発現調節の分子機構を解明し、IL-22 の適切な発現を調節できれば、炎症性腸疾患の治療に貢献できるのではないかと期待されている<sup>2)</sup>。

染色体 DNA 上にはタンパク質をコードしている遺伝子以外に、遺伝子発現の調節に関与するプロモーター、エンハンサー、サイレンサーなどの様々なシス調節領域

が存在しており、これらの働きがあつてはじめて時間的、空間的な遺伝子発現が制御できると考えられている<sup>3)</sup>。腸管粘膜において重要な役割を果たしている IL-22 の発現調節においては、これまでにプロモーターについての解析が報告されているに過ぎない<sup>2)</sup>。本研究では、機能食品成分に含まれる低分子化合物によるエピジェネティックな T 細胞分化制御の分子基盤の構築を目指している。そこで、本研究目標遂行のための第一歩として、IL-22 遺伝子の発現制御に関与するプロモーター以外の未知なるシス調節領域を同定し、これらシス調節領域によるエピジェネティックな IL-22 遺伝子発現調節機構の解明を進めた。

## 結 果

### 1 IL-22 遺伝子シス調節領域の同定

シス調節領域には、主に二つの特徴があることが知られている。一つは、染色体 DNA 上のタンパク質非コード領域に存在しているにも関わらず、様々な生物種間で高度に保存されていることである。もう一つは、転写因子が結合できるように、細胞分化特異的に開いたクロマチン構造に変換していることである<sup>3)</sup>。そこで、これら二つの特徴に基づいて、IL-22 遺伝子近傍に潜む未知のシス調節領域の単離を試みた。まず、ウェブ上で提供されている VISTA プログラムにより、ヒトとマウス間で高度に保存された配列を検索し、IL-22 遺伝子上流に 3 つの非コード保存配列 (Conserved Noncoding Sequence : CNS) を同定した (図 1)。一方、IL-22 遺伝子の下流には CNS は認められなかった。これらの CNS はマウス IL-22 遺伝子の下流、-18、-25、-32kb 領域に、1kb 長程度の断片として存在していた。

同定した CNS のクロマチン状態を、我々がこれまで解析報告した DNaseI 超感受性部位のデータと比較した。その結果、これらの CNS は Th 細胞分化特異的に開いたクロマチン構造をしていることが判明した (図

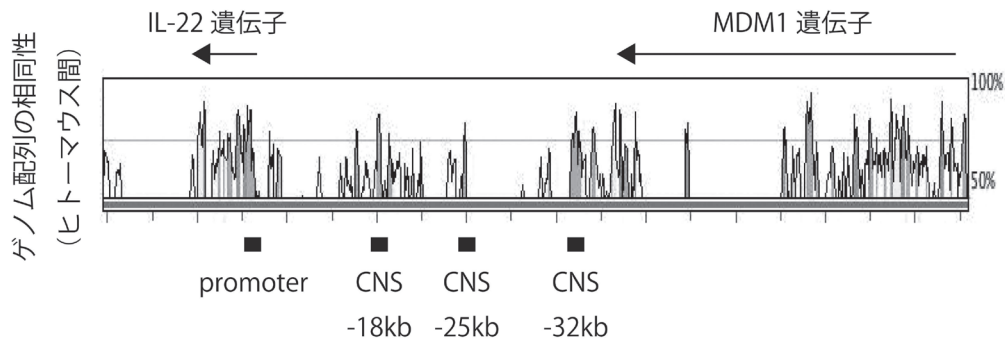


図1 VISTA プログラムによる非コード保存配列 (CNS) の同定

VISTA プログラム (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) による、ヒトとマウス間で高度に保存された IL-22 遺伝子近傍の非コード保存配列 (Conserved Noncoding Sequence: CNS) の同定。CNS は IL-22 プロモーターから 18、25、32kb 上流にのみ存在していた。

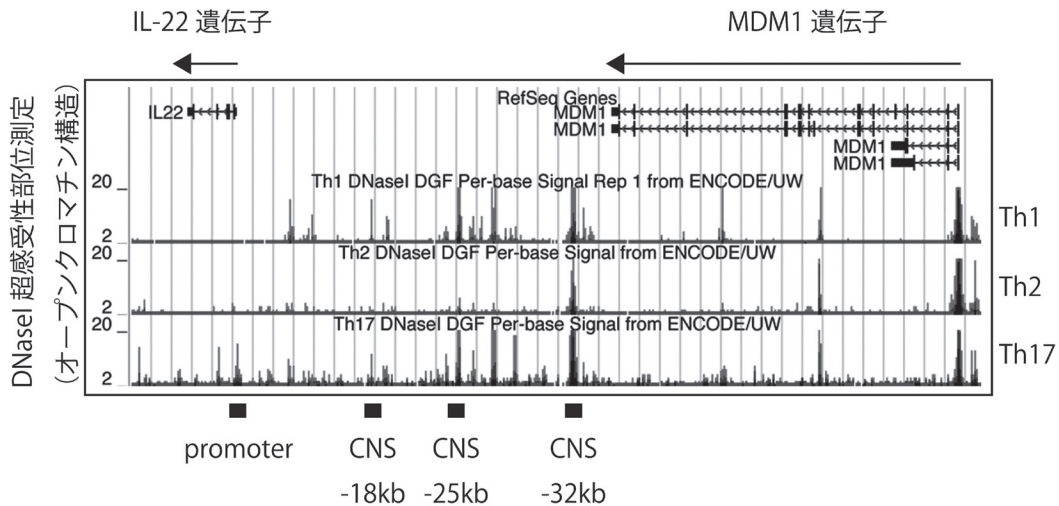


図2 DNaseI 超感受性部位決定法によるシス調節領域の同定

Th1、Th2、Th17 細胞の IL-22 遺伝子近傍において、細胞分化特異的に開いたクロマチン構造をしている領域を DNaseI 超感受性部位決定法で解析した。その結果、DNaseI 超感受性部位のピークと3つの CNS 領域が一致していることが判明した。

2)。以上のことから、同定した3つ CNS が IL-22 遺伝子のシス調節領域として機能している可能性が示唆された。

## 2 シス調節領域の機能解析

同定した3つ CNS の機能を、ルシフェラーゼレポーターベクターを用いたマウス胸腺腫細胞 EL-4 細胞へのトランスフェクション活性測定法で解析した<sup>4)</sup>。マウス IL-22 プロモーターをクローニングして、その上流に各 CNS を組み入れたルシフェラーゼレポーターベクターを作製し、転写されるルシフェラーゼ酵素活性を指標としてこれら CNS の機能を解析した。その結果、CNS-32 のみに IL-22 プロモーター活性を強く促進するエンハンサー活性があることが判明した (図3)。しかし、そ

他の CNS-18、CNS-25 には、IL-22 プロモーターに対する特異的な活性は認められなかった。

## 3 転写因子 I $\kappa$ B- $\zeta$ による CNS-32 エンハンサー機能の調節

次に、CNS-32 エンハンサーの機能を発揮するために必要な分子機構の解明を行った。Genomatix プログラムを用いて、CNS-32 エンハンサーに結合し、その活性調節に関与すると思われる転写因子の検索を試みた。これまでに他の研究者による解析から、IL-22 プロモーターに結合する STAT3 (Signal Transduction and Activator of Transcription)、c-Maf、AHR (aryl hydrocarbon receptor)、ROR $\gamma$ t (RAR-related Orphan Receptor Gamma)、Batf (Basic Leucine Zipper

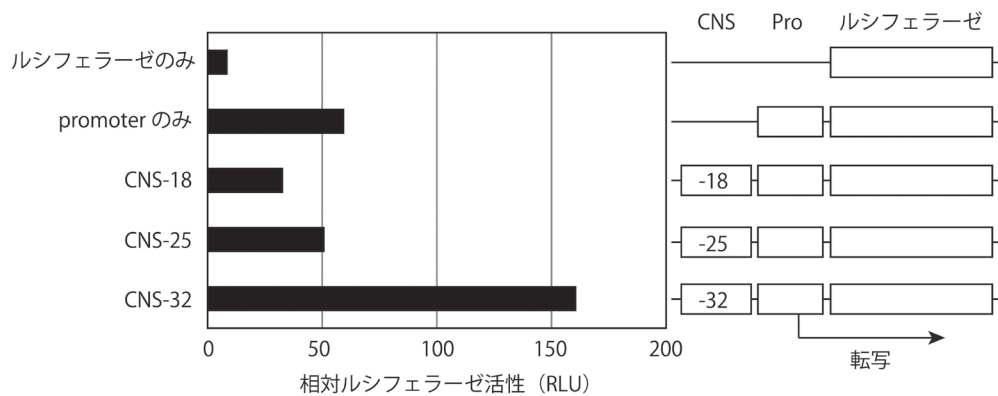


図3 CNS-32のエンハンサー活性測定とベクターの模式図

単離したIL-22プロモーターと各CNSを組んだルシフェラーゼレポーターのベクターをマウスEL-4細胞にトランスフェクション後、転写されるルシフェラーゼ酵素の活性を測定した。その結果、CNS-32のみにエンハンサー活性があることが判明した。

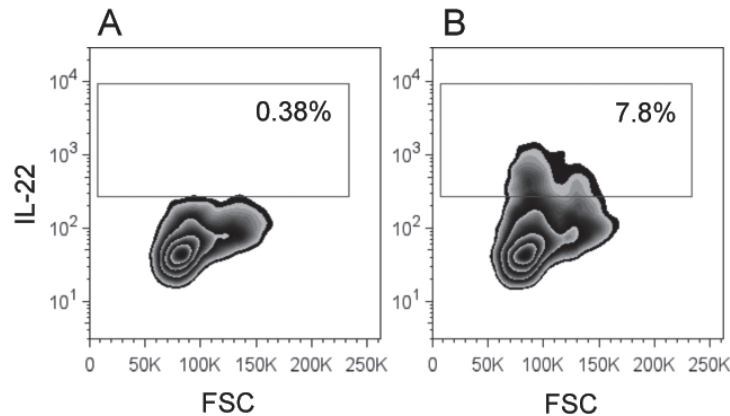


図4 フローサイトメーターによるIL-22の発現解析

IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-23刺激によるTh17細胞の分化誘導後、フローサイトメーターによって細胞内IL-22の発現解析を行った(B)。対象として、ニュートラルなTh0細胞の発現解析を行った(A)。転写因子I $\kappa$ B- $\zeta$ はIL-1 $\beta$ 刺激によって発現誘導されることが知られている核内NF- $\kappa$ B結合分子であり、Th17細胞においてIL-22の転写活性の増強に関与している可能性が示唆された。FSCは前方散乱光を示している。

Transcription Factor, ATF-like)、IRF4 (Interferon Regulatory Factor) などの転写因子がIL-22遺伝子発現調節に重要な役割を果たしていることが知られている<sup>2)</sup>。これらの転写因子の結合配列も、CNS-32エンハンサーに存在していることがGenomatixプログラムにより確認できた。今回、新たに転写因子NF- $\kappa$ Bの結合配列を、CNS-32エンハンサーに新たに同定することができた。このNF- $\kappa$ B結合配列は、様々な種間で高度に保存されていた。転写因子NF- $\kappa$ Bは広範囲な細胞に発現が認められ、様々な炎症反応に関与している分子である。一方、NF- $\kappa$ Bの核内結合パートナーI $\kappa$ B- $\zeta$ 分子(遺伝子名NFKBIZ)はIL-1 $\beta$ 刺激後に誘導されるNF- $\kappa$ B調節因子である<sup>5)</sup>。興味深いことに、このI $\kappa$ B- $\zeta$ 分子とIL-22の発現には相関関係がみられ、IL-22を高発現す

ることが知られているIL-1 $\beta$ 刺激Th17細胞では、I $\kappa$ B- $\zeta$ が高発現していることが報告されている<sup>5)</sup>。我々のフローサイトメーター解析においても、IL-1 $\beta$ 刺激Th17細胞ではIL-22の高発現が観察された(図4)。以上のことから、転写因子I $\kappa$ B- $\zeta$ 分子はNF- $\kappa$ Bと相互作用することでIL-22遺伝子の転写調節に何らかの関与をしている可能性が示唆された。そこで、I $\kappa$ B- $\zeta$ 発現ベクターを用いて、共発現法によるルシフェラーゼレポーター活性を測定した。IL-22プロモーターの影響を排除してエンハンサーの機能のみを純粹に観察するために、SV40最小プロモーターの上流にIL-22のCNS-32エンハンサーを連結したレポーターベクターを新たに作製した。解析の結果、転写因子I $\kappa$ B- $\zeta$ には濃度依存的な転写増強活性が認められた(図5)。以上の結果から、I $\kappa$ B- $\zeta$

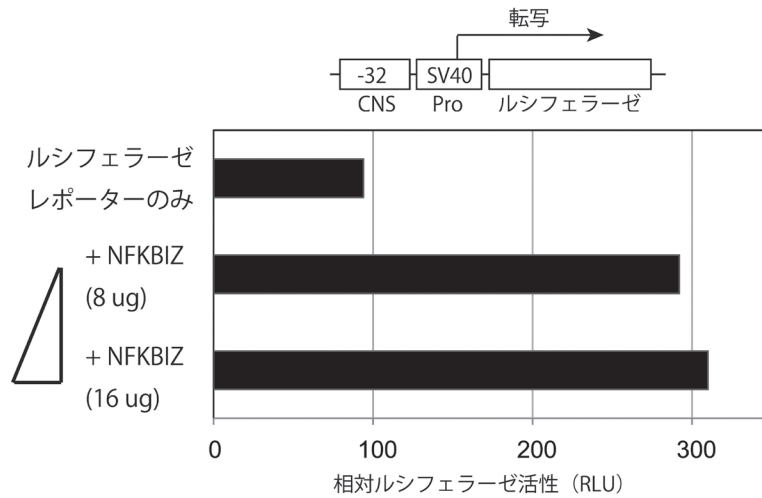


図5 転写因子I $\kappa$ B- $\zeta$ によるCNS-32エンハンサーの増強活性

SV40 最小プロモーターと各 CNS を組込んだルシフェラーゼレポーターベクターと I $\kappa$ B- $\zeta$  (遺伝子名 NFKBIZ) 発現ベクターのマウス EL-4 細胞への共トランスフェクション後、転写されるルシフェラーゼ酵素の活性を測定した。その結果、転写因子 I $\kappa$ B- $\zeta$  分子に CNS-32 エンハンサーの増強活性があることが判明した。

は NF- $\kappa$ B と相互作用することで CNS-32 エンハンサーの NF- $\kappa$ B 結合サイトに結合し、IL-22 遺伝子発現を増強していることが明らかになった。

### 考 察

本研究により、世界に先駆け IL-22 遺伝子のエンハンサーを同定することができた。さらに、このエンハンサーに結合すると思われる核内 NF- $\kappa$ B 調節因子 I $\kappa$ B- $\zeta$  (遺伝子名 NFKBIZ) が、エンハンサー活性の増強に関与していることを明らかにした。Th 細胞が分化の過程で産生する IL-22 などの炎症性サイトカインは、宿主の感染防御や感染による組織損傷修復にとって必須の分子である一方で、持続刺激による過剰な発現は様々な疾患の引き金となる慢性炎症の原因となっている。以上の理由から、厳密な炎症性サイトカイン遺伝子の発現調節の解明が求められている。遺伝子の直上流に位置するプロモーターの検索と解析は、これまで比較的容易に行われてきた。実際、IL-22 遺伝子のプロモーター解析については、いくつかの報告がなされている<sup>2)</sup>。しかし、プロモーターでは遺伝子発現の単純なスイッチのオン・オフの制御は可能であるが、分化過程での時間・空間特異的な発現制御や発現量の微調整にはその他のシス調節領域の働きが必須である。今回、IL-22 遺伝子特異的なエンハンサーをはじめ同定できた。さらに、このエンハンサーに結合する転写因子 I $\kappa$ B- $\zeta$  を同定できたことで、IL-22 遺伝子の分化特異的で発現量の微調整に必要

なエピジェネティクス制御機構の解明がさらに進展するものとする。

今回の測定で使用したレポーターアッセイ法では、その他の CNS-18、CNS-25 の機能は解明できなかった。今後はインスレーターやサイレンサーなど別の活性を測定できるレポーターベクターを用いて、CNS-18、CNS-25 の機能解明も進めたい<sup>7)</sup>。さらに、本研究で同定したエンハンサー CNS-32 と IL-22 プロモーターの織りなす高次クロマチン構造を、Chromosome Conformation Capture (3C) 解析法を用いて決定したいと考えている<sup>7)</sup>。同時に、この IL-22 を発現する Th17 細胞分化特異的な高次クロマチン構造形成に関与している分子の同定も進めたい。これらの解析により、高次クロマチン構造によるエピジェネティックな IL-22 遺伝子の「発現と抑制」を調節しているメカニズムの解明に迫りたいと考えている。

本研究は、高次クロマチン構造のエピジェネティックな遺伝子発現調節機構を解明することで、機能食品成分による IL-22 発現のスイッチを効率よく制御できる方法の確立を目指し研究を開始した。今後、IL-22 エンハンサーなどのシス調節領域が形成する高次クロマチンの同定を進め、高次クロマチンを分子標的とした機能食品成分による遺伝子発現制御法を確立したいと考えている。そして、この制御技術を IL-22 発現量の調節法に応用することで炎症性腸疾患やアレルギーの新たな治療法開発につなげていきたい。

## 要 約

本研究は、腸管粘膜における感染防御や組織損傷修復において主要な役割を果たしている Th17 細胞の産生する炎症性サイトカイン IL-22 遺伝子のエピジェネティックな発現制御機構を解析した。その結果、IL-22 遺伝子上流 32kb に位置する CNS-32 エンハンサーを同定した。さらに、核内 NF- $\kappa$ B 調節因子 I $\kappa$ B- $\zeta$  が、CNS-32 エンハンサーへの結合を介して、IL-22 遺伝子発現を正に制御しているトランス因子であることを解明した。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、貴重な研究助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) L.H. Glimcher, et al., *Genes Dev.*, 14, 1693-1711, 2000.
- 2) S. Rutz, et al., *Immunol. Rev.*, 252, 116-132, 2013.
- 3) C.B. Wilson, et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 9, 91-105, 2009.
- 4) J.R. Schoenborn, et al., *Nat. Immunol.*, 8, 732-742, 2007.
- 5) K. Okamoto, et al., *Nature*, 464, 1381-1385, 2010.
- 6) K. Ghoreschi, et al., *Nature*, 467, 967-971, 2010.
- 7) M. Sekimata, et al., *Immunity*, 31, 551-564, 2009.