

令和元年6月19日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07956

研究課題名(和文) 腸管免疫系における樹状細胞分化を制御する転写因子Eosの機能解明

研究課題名(英文) The Role of transcription factor Eos in dendritic cells development in gut immunity

研究代表者

大岡 嘉治 (Ohoka, Yoshiharu)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：60303971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸の樹状細胞に発現するレチノイン酸産生酵素RALDH2は腸の免疫系において重要な働きをしている。本研究では、RALDH2遺伝子の発現制御機構を明らかにするため、DNAマイクロアレイ法を用いて関連遺伝子の探索を行った結果、転写因子Ikarosファミリーに属するEos遺伝子を同定した。Eos遺伝子の発現は骨髄細胞から分化誘導させた樹状細胞および腸管リンパ節から採取した樹状細胞サブセットにおいてRALDH2遺伝子と極めて類似した発現パターンを示した。またEos遺伝子siRNAはRALDH2遺伝子の発現を抑制した。以上の結果は、Eos遺伝子がRALDH2遺伝子の発現制御に関与する可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管免疫系においては免疫反応の促進と抑制のバランスを保つことが重要であり、その乱れは様々なアレルギー疾患や炎症性腸疾患発症等を引き起こす。この腸管免疫系における免疫反応のバランスの制御には、ビタミンAの代謝物であるレチノイン酸が重要な役割を果たしており、その産生酵素RALDH2の発現制御機構に転写因子Ikarosファミリーに属するEos遺伝子が関与することが明らかになった。この成果は今後、アレルギー疾患や炎症性腸疾患発症等の治療を目的とした新たな創薬ターゲットの分子基盤構築に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Retinal dehydrogenase 2 (RALDH2) encoded by Aldh1a2 plays key roles in generating RA in dendritic cells (DCs) in gut-related lymphoid organs. To identify gene involved in the regulation of Aldh1a2 gene expression, gene expression of GM-CSF/LPS-treated and untreated BM-DCs was measured using DNA microarray. We identified Eos (ikzf4) gene whose expression was up-regulated by GM-CSF/LPS treatment in BM-DCs. Eos is a member of a zinc-finger transcription factor of the Ikaros (ikzf1) family. Eos siRNA partially downregulated Aldh1a2 gene in GM-CSF/LPS-treated BM-DCs. The expression of Eos mRNA was observed in MLN-DC but not in SPL or PLN in a manner similar to Aldh1a2 mRNA. Furthermore, both Eos and RALDH2 mRNA is specifically expressed in MLN-DC subset, CD11b \pm CD8 $^{-}$ CD103 $^{+}$ which has been thought to be a retinoic acid-producing anti-inflammatory DCs. These results suggest that Eos may be involved in the regulation of Aldh1a2 gene expression in DCs in gut-related lymphoid organs.

研究分野：免疫学 分子生物学 生化学

キーワード：樹状細胞 レチノイン酸 RALDH2 Eos 転写因子 Ikarosファミリー 免疫寛容

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビタミン A の代謝産物であるレチノイン酸は T 細胞に小腸ホーミング能を付与し、また、腸における免疫寛容誘導機能に置いて重要な役割を担っている Foxp3⁺誘導型制御性 T 細胞 (iTreg) の分化を促進する一方、潰瘍性大腸炎、クローン病など様々な自己免疫疾患の発症に關与する IL-17 産生ヘルパー T 細胞 (Th17) の分化を抑制する (*Science* 317:256, 2007, *J. Exp. Med.* (review) 204: 1737, 2007)。つまり、レチノイン酸は腸における免疫反応の抑制 (Treg) と亢進 (Th17) のバランスの維持に重要な役割を果たしており、そのバランスの乱れがアレルギーや自己免疫疾患発症の一つの要因となると考えられる。これら T 細胞の機能分化は、抗原提示細胞である DC によって制御されているが、特に腸間膜リンパ節 (MLN) に存在する DC はレチノイン酸産生能力が高く、その能力はレチノイン酸産生酵素、Retinal dehydrogenase 2 (RALDH2) の発現に依存している (*Immunity* 21:527, 2004)。我々は、RALDH2 がいくつかの性質の異なる MLN-DC のサブセットのうち、成熟型の CD8 α -CD103⁺ conventional DC (cDC) に特異的に発現し、iTreg を誘導することを見出したが (*Int Immunol* 21:361, 2009)、この DC サブセットの機能分化がどのような分子メカニズムで制御され、制御性 DC としての性質が賦与されるのかは不明である。

2. 研究の目的

腸管免疫系においては免疫反応の促進と抑制のバランスを保つことが重要であり、その乱れは様アレルギー疾患や炎症性腸疾患の発症等を引き起こす。この腸管免疫系における免疫反応のバランスの制御には、レチノイン酸を産生する制御性樹状細胞 (dendritic cell; DC) サブセットの役割が重要であり、その性状や分化制御の解明は、腸管免疫系の理解に欠かせない。我々はこの制御性 DC サブセットに転写因子 Ikaros ファミリーに属する Eos 遺伝子が構成的に高発現していることを発見した。本研究では、腸の DC サブセットにおいて Eos 遺伝子消失・発現による機能変化を解析するとともに、Eos の標的遺伝子群の転写制御機構の解明を目的とし、アレルギー疾患や炎症性腸疾患の発症等の治療に役立つ新たな創薬ターゲットの分子基盤構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) GM-CSF や TLR リガンドに応答して顕著な RALDH2 遺伝子の発現が誘導出来る BM-DC をモデル系として用い、EOS 遺伝子の発現や siRNA の効果を検討した。また、各種情報伝達系阻害剤を用い GM-CSF/TLR リガンドが誘導する EOS 遺伝子発現誘導に關与する情報伝達系を検討した。さらに、EOS 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、作製したレポーターベクターを用いて EOS 遺伝子の発現制御機構を検証した。また、RALDH2 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、作製したレポーターベクターを用いて EOS 遺伝子産物の RALDH2 遺伝子発現への影響を検討した。

(2) マウスの腸間膜リンパ組織、パイエル板、末梢リンパ節、脾臓から樹状細胞を調整し、EOS 遺伝子および他の Ikaros ファミリー遺伝子 (Ikaros (ikzf1)、Helios (ikzf2)、Aiolos (ikzf3)、Pegasus (ikzf5)) の発現を比較検討した。また、腸間膜樹状細胞を抗 B220 抗体を用いて cDC と pDC に分画し、それぞれの EOS 遺伝子および RALDH2 遺伝子の発現を比較検討した。さらに、腸間膜リンパ組織の樹状細胞を抗 CD8 抗体、抗 CD103 抗体、抗 CD11b 抗体とフローサイトメトリーを用いて分画し、それぞれの分画の EOS 遺伝

子および RALDH2 遺伝子の発現を比較検討した。

(3) マウス単球・マクロファージ系細胞株 RAW264 細胞を用い、EOS 遺伝子および他の Ikaros ファミリー遺伝子(Ikaros (ikzf1)、 Helios (ikzf2)、 Aiolos (ikzf3) 、 Pegasus (ikzf5))の発現を検討するとともに、EOS 遺伝子の安定発現株を作成し、その性状を通常 RAW264 細胞と比較検討した。

4. 研究成果

(1) マウス骨髄から調整した BM-DC を GM-CSF および TLR リガンドとして LPS を単独またはその組み合わせで刺激した場合、EOS 遺伝子の発現は RALDH2 遺伝子の発現と同様に、GM-CSF と LPS の両方の刺激により著しく亢進することが明らかになった。また、RALDH2 遺伝子の発現は GM-CSF/LPS の刺激後約 6 時間から誘導されるのに対し、EOS 遺伝子の発現は刺激後約 1.5 時間から誘導されることが明らかになった。BM-DC における EOS 遺伝子の発現に対する各種シグナル伝達阻害剤の効果を検討したところ、p38MAP キナーゼ阻害剤、NF- κ B シグナル阻害剤で効果的に抑制されることが明らかになった。これらの阻害剤の効果は RALDH2 遺伝子に対する効果と類似していた。一方、EOS 遺伝子のタンパク質発現ベクターを構築し、RALDH2 遺伝子プロモーター領域に対する転写促進効果を検討したが、顕著な促進効果は観察されなかった。以上の結果は、EOS 遺伝子産物は直接 RALDH2 遺伝子の発現を制御している可能性は低いものと考えられた。

(2) EOS 遺伝子の発現は、腸間膜リンパ組織、パイエル板、末梢リンパ節、脾臓の樹状細胞のうち、主に腸間膜リンパ組織樹状細胞に発現しており、RALDH2 遺伝子の発現と一致していた。これに対し、他の Ikaros ファミリー遺伝子である Ikaros (ikzf1) 遺伝子と Helios (ikzf2) 遺伝子は脾臓樹状細胞に、Aiolos (ikzf3) 遺伝子はパイエル板樹状細胞に多く発現していることが明らかになった。また、cDC と pDC における EOS 遺伝子の発現も RALDH2 遺伝子同様に cDC に限定して発現していることが明らかになった。さらに腸間膜リンパ組織の樹状細胞を抗 CD8 抗体、抗 CD103 抗体、抗 CD11b 抗体を用いて分画すると、EOS 遺伝子は RALDH2 遺伝子と同様に CD11b⁺CD8 α ⁻CD103⁺ の分画に発現することが明らかになった。(図 1)

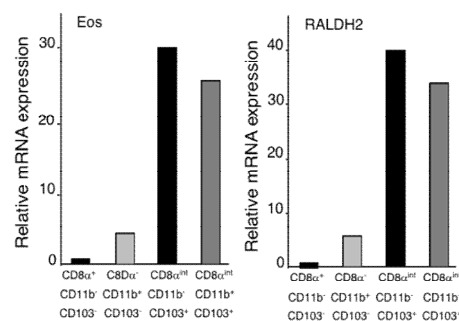


図 1. マウス腸間膜リンパ節樹状細胞各分画における Eos および RALDH2 遺伝子の発現

この様に、マウス樹状細胞において EOS 遺伝子の発現は RALDH2 遺伝子の発現と極めて相関性が高いことが明らかになった。しかしながら、ビタミン A 欠乏マウスから調整した腸間膜リンパ組織の樹状細胞では、RALDH2 遺伝子の発現は著しく低下するのに対し、

EOS 遺伝子の発現はほとんど影響を受けなかった。この結果は、腸間膜リンパ組織における RALDH2 遺伝子の発現に関わるレチノイン酸シグナルと EOS 遺伝子産物のシグナルとは無関係であることが示唆された。

(3) マウス単球・マクロファージ系細胞株 RAW264 細胞では EOS 遺伝子および Helios (ikzf2) 遺伝子が LPS 刺激により誘導されレチノイン酸アナログである Am80 によりその発現は顕著に促進された。次に RAW264 細胞を用い EOS 遺伝子の安定発現株を作成し、サイトカイン遺伝子 IL-6、IL-10 および TNF- α 遺伝子の発現に対する影響を検討した。その結果、EOS 遺伝子の安定発現株では、LPS により誘導される IL-6 の発現が顕著に減少することが明らかになった。(図2)

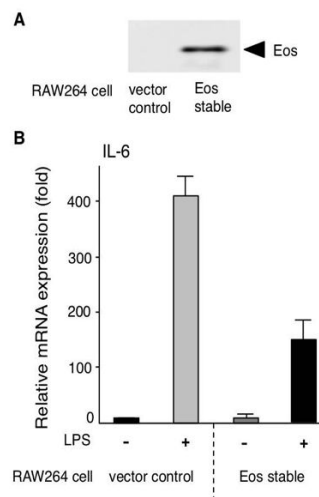


図2. A. RAW264 細胞で作製した Eos 安定発現株 B. RAW264 細胞 Eos 安定発現株における IL-6 の発現抑制

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yokota-Nakatsuma A, Ohoka Y, Maeda N, Takeuchi H, Iwata M. Beta 1-integrin ligation and TLR ligation enhance GM-CSF-induced ALDH1A2 expression in dendritic cells, but differentially regulate their anti-inflammatory properties. **Scientific Reports**. 2016 May 2; 9(5): e96512. (2016)

〔学会発表〕(計 6 件)

岩倉裕璃、植松美月、岩田誠、中妻彩、大岡嘉治. 「Th1、Th2 サイトカイン遺伝子発現に対するレチノイン酸シグナルの解析」日本薬学会 第 139 年会、幕張メッセ、千葉県、3 月、2019.

植松美月、岩倉裕璃、岩田誠、中妻彩、大岡嘉治. 「ヒト IL-13 遺伝子発現に対するレチノイン酸シグナルの役割」日本薬学会 第 139 年会、幕張メッセ、千葉県、3 月、2019

松本佳奈子、劉康、岩田 誠、大岡嘉治、中妻彩. 「新規 IL-13 高産生炎症性ヘルパーT (Th) 細胞と Th2 細胞及び Th9 細胞の誘導条件の比較」日本薬学会 第 139 年会、幕張メッセ、千葉県、3 月、2019

劉康、松本佳奈子、岩田 誠、大岡嘉治、中妻彩. 「ビタミン A 欠乏マウスにおける経口抗原特異的な新規 IL-13 高産生炎症性ヘルパーT (Th) 細胞の誘導」日本薬学会 第 139 年会、幕張メッセ、千葉県、3 月、2019

大岡嘉治、中妻彩、竹内一、岩田誠 「GM-CSF contributes to the RALDH2 expression in dendritic cells through two distinct pathways involving β -catenin and c-Rel」日本生化学会 第89回、仙台国際センター、宮城県、9月、2016

大岡嘉治、中妻彩、竹内一、岩田誠 「GM-CSF induces RALDH2 expression in dendritic cells through two distinct pathways involving β -catenin and c-Rel」日本免疫学会 第44回、札幌コンベンションセンター、北海道、11月、2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中妻 彩 （申請時は連携研究者）

ローマ字氏名：Yokota-Nakatsuma Aya

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。