

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659475

研究課題名(和文) 新たなIL-4産生調節経路によるアレルギー抑制法の開発

研究課題名(英文) A novel function of Interferon regulatory factor-1

研究代表者

浅野 喜博 (Asano, Yoshihiro)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・客員研究員

研究者番号：70114353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：病原体感染時のTh2免疫応答の抑制機序におけるIRF-1の役割に焦点を絞って解析した。その結果、IRF-1が直接Th2細胞のIl4遺伝子転写を抑制する事をみいだした。リステリア感染APCから産生される可溶性因子の作用により、IRF-1がIl4遺伝子のサイレンサー部分に結合し、Il4遺伝子転写を抑制する。この可溶性因子の活性はIL-1によって担われている。これらの結果から、IRF-1がTh1細胞へのシフトを引き起こすと同時に、Th2細胞の中で作用して、積極的にIl4遺伝子転写を抑制することによりTh2細胞へのシフトを抑制するという、IRF-1の新しい機能が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We focused on the role of IRF-1 during a pathogen infection, especially the involvement of IRF-1 in the suppression of Th2 during the pathogen infection. We found that IRF-1 directly suppresses the transcription of Il4 gene of Th2 cells. IRF-1 binds to the silencer region of Il4 gene by the influence of soluble factor that produced by Listeria-infected APCs and down-regulates the Il4 gene transcription. We identified that IL-1 mediates the activity of the soluble factor. According to the results presented, we propose that IRF-1 functions to induce the Th1 shift via two distinct mechanisms, the previously known mechanism and a novel function described here. IRF-1 activates the Il12 p40 gene promoter activity and induces the gene transcription, resulted in the shift to Th1 subset. In addition, IRF-1 acts on the silencer region of Il4 gene by the influence of IL-1 and inhibits the transcription of the Il4 gene in Th2 cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー 転写因子IRF-1 IL-4 Th2免疫応答

1. 研究開始当初の背景

IRF-1 が Th1 細胞を誘導するのみならず、Th2 機能を積極的に抑制することが明らかになってきた。すなわち、*Irf1* 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスで認められる感染による Th2 細胞誘導抑制が認められない。Th2 細胞クローンと T 細胞を除いた *Irf1* 遺伝子欠損マウス脾細胞との混合培養に細菌を感染させると、IL-4 産生の抑制が認められた。この作用は感染樹状細胞・マクロファージの産生する可溶性因子の作用によるもので、すでに分化した Th2 細胞機能を抑制するのみならず、Th2 への分化をも抑制することが明らかになった。

2. 研究の目的

この因子の遺伝子を分離し、リコンビナント蛋白を作成し、抗アレルギー作用の詳細な機序を明らかにし、それをを用いたアレルギー抑制法を開発する。

3. 研究の方法

本研究では、この因子の遺伝子を分離・同定し、そのリコンビナントタンパクを用いた、アレルギー・免疫関連疾患治療に結びつく Th2 細胞への分化抑制、また分化した Th2 細胞機能抑制法を開発するのが目標である。

4. 研究成果

① リステリア感染による Th2 免疫応答抑制には IRF-1 が必要である。

BALB/c マウスに *in vivo* でリステリア (*Listeria monocytogenes*, Lm) を感染させ 3 日後に脾細胞を採り、T 細胞を刺激して産生するサイトカインを調べると、感染マウス脾細胞では非感染マウス脾細胞に比べて IFN- γ 産生の増加と、IL-4 産生の低下が認められた(図 1)。この結果は、病原体感染により宿主免疫系が Th1 免疫応答優位にシフトしていることを示している。*Il12p40* 遺伝子ノックアウトマウスでは、リステリア感染による IFN- γ 産生の増加は認められないことから、リステリア感染による Th1 免疫応答誘導には IL-12 は必須である。ここで興味あることは、野生型マウスで認められた病原体感染による Th2 免疫応答の抑制は、*Il12p40* 遺伝子ノックアウトマウスでも認められることである。すなわち、ここで認められる Th2 免疫応答の抑制は IL-12 の作用によるものではないことが分かる。このマウスでは Th1 免疫応答が誘導されていないにもかかわらず、Th2 免疫応答の抑制が認められる。すなわち、病原体感染による Th2 細胞サブセットの誘導抑制は、単なる Th1/Th2 バランスによるものではないことを示している。

次に、*Il12p40* 遺伝子発現に重要であるとされている *Irf1* および *Stat1* 遺伝子ノックアウトマウスを用いて検討したところ、興味ある結果が得られた。興味あることにリステリア感染 *Irf1* 遺伝子ノックアウトマウスでは Th1 免疫応答が

認められた。このことは、*Il12p40* 遺伝子発現に必須とされている IRF-1 は、リステリア感染による Th1 免疫応答誘導には必須ではないことを意味している。前述したように *Il12p40* 遺伝子発現は Th1 免疫応答には必須であることから、感染が生理的な Th1 細胞分化での経路とは異なる経路でも *Il12* 遺伝子発現を誘導していることを示唆している。一方、Th2 免疫応答抑制には IRF-1 が必須であり、IL-12 は関与しない。このことは、Th1 細胞を誘導する刺激が Th2 細胞誘導を抑制している訳ではないことを示している。すなわち、Th1 免疫応答誘導と、Th2 免疫応答抑制は、鏡像関係にあるものではないことを示していると考えられる。

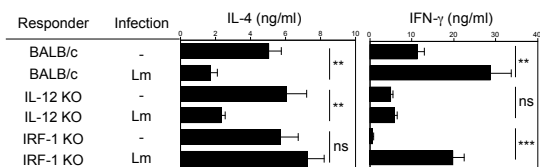


図 1. 種々の遺伝子ノックアウトマウスにリステリアを感染し、3 日後に脾細胞を採りだし、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し、脾臓 T 細胞の産生するサイトカインを測定した。

② リステリア感染による Th2 免疫応答抑制には T 細胞の IRF-1 が関与している。

リステリア感染は Th0 から Th2 細胞への誘導過程を抑制することが明らかになっている。前項で述べたように、*Irf1* 遺伝子ノックアウトマウスでは抑制が認められないことから、Th2 細胞への誘導抑制に IRF-1 がどのように関わっているかを検討した。リステリア感染の場合となる樹状細胞/マクロファージと T 細胞での IRF-1 の働きを別々に調べるために、Th2 細胞クローン (MS-SB 細胞) と、T 細胞を除いた脾細胞の混合培養にリステリアを感染し、Th2 細胞の IL-4 産生を検討した結果から二つの興味あることが示唆された。第一に、感染脾細胞が直接 T 細胞とコグネートに反応することにより、あるいは、可溶性因子を介した間接的な反応により IL-4 産生を抑制している。そこでリステリア感染脾細胞の培養上清 (LmSN) 中に Th2 細胞による IL-4 産生を抑制活性が認められた。種々のサイトカインに対する抗体を用いた中和実験から、この抑制活性は IL-1 により担われていることが示された。

第二の興味あるポイントは、図 1 で認められた IRF-1 要求性が T 細胞のレベルであることである。自然免疫系細胞の中で作用していると考えられてきた転写因子 IRF-1 が、分化した T 細胞の中で直接その機能をコントロールしていることが示唆され、IRF-1 の機能を考える上で興味ある知見である。

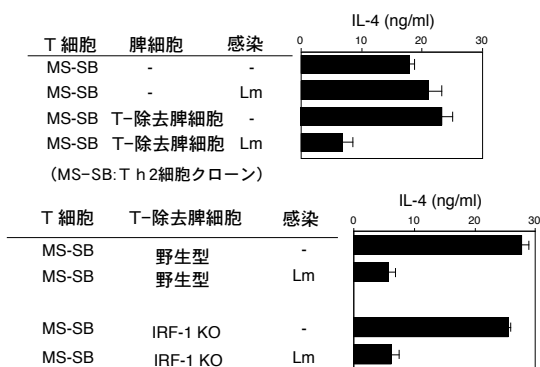


図 2。MS-SB 細胞 (C3H マウス由来 CD4Th2 細胞クローン) と T 細胞を除いた脾細胞の混合培養にリステリアを 1 時間感染し、T 細胞刺激 24 時間後の IL-4 産生を測定した。

③ IRF-1 は *Ii4* 遺伝子プロモーター活性を抑制しない。

IRF-1 転写因子は *Ii12p40* 遺伝子プロモーターに結合しその転写を活性化する³。IL-12 は Th1 細胞サブセット分化に必須のものであり、この遺伝子発現をコントロールしている転写因子が Th2 細胞サブセットの分化に関わる *Ii4* 遺伝子発現をもコントロールしているとすると、極めて興味深い。そこで IRF-1 転写因子が *Ii4* 遺伝子プロモーター活性を抑制するかを検討した (図 3)。*Ii4* 遺伝子プロモーターを結合した Luciferase レポーターを Th2 細胞に導入し、同時に導入した *Irf1* 遺伝子 (pAct-1) を強制発現させると、PMA と Ionomycin での刺激による内因性の *Ii4* 遺伝子発現および IL-4 産生が抑制された。しかし内因性 *Ii4* 遺伝子と同じプロモーターを持つ Luciferase レポーター遺伝子の活性は抑制されなかった。したがって、*Ii4* 遺伝子発現抑制はプロモーター活性の抑制によるものではない。IFN- γ が IRF-1 の *Ii4* 遺伝子プロモーターへの結合を誘導してその転写を抑えるとする報告があるが、今回の解析では Luciferase 活性が抑制されず、IRF-1 の *Ii4* 遺伝子プロモーターへの抑制作用は認められなかった。Elser らの結果との乖離の理由は不明であるが、今回の結果は、*Ii12p40* 遺伝子プロモーターに結合しその転写を活性化する転写因子 IRF-1 が、*Ii4* 遺伝子プロモーターを抑制することなく、何らかの機序で *Ii4* 遺伝子転写を抑制していると考えられる。

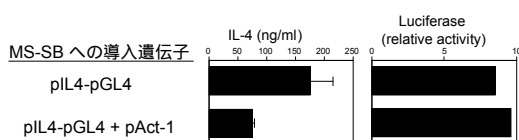


図 3。*Ii4* 遺伝子プロモーター部位を Luciferase レポーター遺伝子上流に挿入

し (pGL4-pIL4)、IRF-1 発現プラスミド (pAct-1) とともに MS-SB 細胞に導入し、PMA と Ionomycin で刺激し、IL-4 産生量と Luciferase 活性を測定した。

④ リステリア感染での *Ii4* 遺伝子転写抑制には *Ii4* 遺伝子サイレンサーへの IRF-1 の結合が関与している。

Th1 細胞の *Ii4* 遺伝子は、そのサイレンサー部位への T-bet および Runx3 の作用で抑制されていることが報告されている。そこで、Th2 細胞の *Ii4* 遺伝子発現におけるサイレンサーの働きを検討した (図 4A)。Luciferase 遺伝子上流に *Ii4* 遺伝子プロモーター部位を、Luciferase 遺伝子下流に IL-4 サイレンサー部位を挿入したレポーターを構築し、Th2 細胞 (MS-SB 細胞) に導入し、リステリア感染脾細胞培養上清 (Lm-SN) を添加し検討した。Luciferase 活性は、サイレンサーを含むレポーターを用いたときのみ、Lm-SN 添加により抑制された。この結果は、Lm-SN による *Ii4* 遺伝子発現抑制には、*Ii4* 遺伝子サイレンサーが関与していることを示している。図 3 の結果を含めて考えると、Lm-SN により IRF-1 が *Ii4* 遺伝子サイレンサーに作用し、*Ii4* 遺伝子転写を抑制していることが考えられる。

次に、IRF-1 が *Ii4* 遺伝子サイレンサーに結合するかを検討した。MS-SB 細胞を LmSN 存在下で培養後、PMA と Ionomycin で刺激し、細胞溶解後、抗 IRF-1 抗体を用いて ChIP 法を行い、*Ii4* 遺伝子サイレンサー部位を qPCR で検出した (図 4B)。LmSN 存在下では、*Ii4* サイレンサー部位へ結合する IRF-1 が増加していることが示された。したがって、Th2 細胞での *Ii4* 遺伝子転写は IRF-1 が *Ii4* 遺伝子サイレンサーに結合することにより負に制御されていると考えられる。

感染状況下では、感染樹状細胞/マクロファージの産生する可溶性因子が Th2 細胞に作用し何らかの機序で *Irf1* 遺伝子転写が持続し、IRF-1 の *Ii4* 遺伝子サイレンサーへの強い結合が生じ、*Ii4* 遺伝子転写抑制がおきると考えられる。ここまで述べてきたように、Th2 細胞での *Irf1* 遺伝子発現は樹状細胞とは異なる機序で制御されており高い発現レベルを維持していること、*Irf1* 遺伝子欠損マウスでは種々の抗原刺激で Th2 細胞が強く誘導されること、さらに *Irf1* 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスで認められる感染による Th2 細胞抑制が認められないことなどが観察されている。これらの現象は、IRF-1 による *Ii4* 遺伝子サイレンサーを介した *Irf1* 遺伝子転写制御機序により説明が可能であると考えられる。

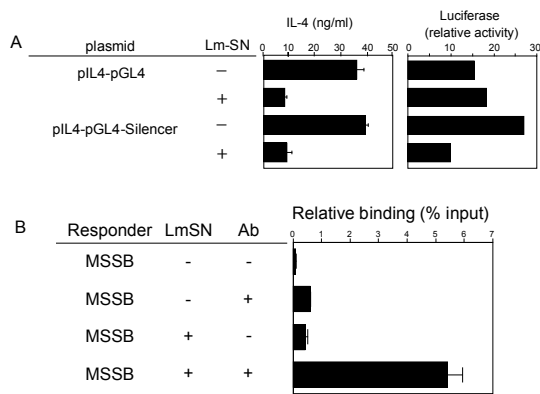


図 4. A) Luciferase 遺伝子上流に *Ii4* 遺伝子プロモーター部位を、Luciferase 遺伝子下流に *Ii4* 遺伝子サイレンサーを挿入したレポーター(pIL4-pGL4-Silencer)を MS-SB 細胞に導入し、リステリア感染培養上清(Lm-SN)を添加し、PMA と Ionomycin で刺激し、IL-4 産生量と Luciferase 活性を測定した。

B) MS-SB 細胞を LmSN 存在下で PMA と Ionomycin で刺激し、細胞溶解後、抗 IRF-1 抗体を用いて DNA 断片を調製し、*Ii4* 遺伝子サイレンサー部位を qPCR で検出した。

⑤ リステリア感染培養上清の作用は Th2 細胞に局限している。

分化した Th2 細胞の IL-4 産生を抑制するリステリア感染培養上清(LmSN)が、ナイーブな T 細胞から Th1/Th2 細胞への分化にどのように作用するかを調べた(図 5)。興味あることに、LmSN の作用は Th2 細胞に対してのみで、Th1 細胞に対する効果は見られなかった。これは、LmSN の作用が T 細胞に対して局限されており、樹状細胞/マクロファージでの IRF-1 を介した *Ii12* 遺伝子発現には影響しないためと考えられる。その詳細な機序は未だ不明である。

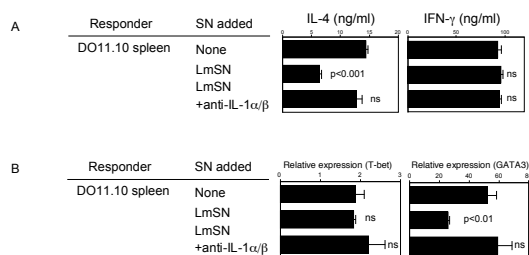


図 5. OVA 特異的な TCR を持つ DO11.10 トランスジェニックマウス(BALB/c バックグラウンド)の脾細胞を *in vitro* で LmSN 存在下で培養し、Th1/Th2 細胞サブセットへのシフトを調べた。

⑥ 結語

従来、IRF-1 は樹状細胞・マクロファージ細胞内で、*Ii12p40* 遺伝子プロモーターに作用してその発現を増強し、Th1 細胞へのシフトを強く誘導するという働きが注目されてきた。本研究で明らかにしたように、IRF-1 が Th1 細胞へのシフトを引き起こすと同時に、Th2 細胞の中で作用して、積極的に *Ii4* 遺伝子転写を抑制することにより Th2 細胞へのシフトを抑制するという、IRF-1 の新しい機能が明らかになった。さらに、Th2 サイトカインの中でも *Ii4* 遺伝子に特異的な抑制であり、*Ii5* 遺伝子および *Ii13* 遺伝子の発現には影響が認められなかった。

リステリア感染時に認められるこのような抑制活性は、感染樹状細胞/マクロファージから産生される IL-1 によるものである。本研究の結果から、IL-1 の T 細胞に対する作用は、Th1 細胞を増やすことなく、Th2 細胞の増殖や活性化のみを抑制することが可能であり、副作用の少ない新規アレルギー疾患制御法への応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. M. Kuwahara, J. Suzuki, S. Tofukuji, T. Yamada, M. Kanoh, A. Matsumoto, S. Maruyama, K. Kometani, T. Kurosaki, O. Ohara, T. Nakayama, M. Yamashita: The Menin-Bach2 axis is critical for regulating CD4 T-cell senescence and cytokine homeostasis. *Nat. Commun.* 2014. Doi:10.1038/ncomms4555
2. M. Kanoh, S. Maruyama, Y. Asano: Listeria infection inhibits IgE production in regional lymph nodes by suppressing chemotaxis of basophils to lymph nodes. *Microbiol. Immunol.* 57:842-848, 2013.
3. A. Matsumoto, S. Maruyama, S. Takahashi, Y. Miyoshi, M. Kanoh, M. Kuwahara, T. Yamada, M. Yamashiita, Y. Asano: Autophagic control of Listeria determines the infection-induced death of macrophages. *J Vaccine Immunotechnology* 1:6-11, 2013.

[学会発表] (計 1 件)

S. Maruyama, M. Kanoh, A. Matsumoto, M. Yamashita, Y. Asano: A novel function of Interferon regulatory factor-1 to inhibit Th2 cells by silencing *Ii4* gene during Listeria infection. 2013.12.11-2013.12.13, JSI Annual Meeting, Chiba.

[図書] (計 1 件)

丸山砂穂、浅野喜博: Th2 細胞における IL-4 遺伝子発現の IRF-1 による制御---Th1/Th2 バランス調節における IRF-1 の新しい役割---臨床免疫・アレルギー科、59:18-24,2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 喜博 (ASANO Yoshihiro)
独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学
研究センター・客員研究員
研究者番号:70114353

(2) 研究分担者

丸山 砂穂 (MARUYAMA Saho) 愛媛大学・
医学系研究科・助教
研究者番号:10301328

(3) 連携研究者

友杉直久 (TOMOSUGI Naohisa) 金沢医科大学
・総合医学研究所・教授
研究者番号 : 80155580