

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007-2008

課題番号：19390278

研究課題名（和文）ゲノム情報を基盤とした次世代アレルギー治療法の開発

研究課題名（英文）Development of second generation therapeutic strategy based on genome information

研究代表者

久保 允人(KUBO MASATO)

独立行政法人理化学研究所 シグナル・ネットワーク研究チーム・チームリーダー

研究者番号：40277281

研究成果の概要：

花粉症、喘息、アトピー性皮膚炎などのアレルギーは、Th2 と呼ばれる特殊な T 細胞サブセットから主に産生されるサイトカインによって制御されている。これらサイトカイン遺伝子の多くは、同一染色体上にクラスターとして存在し、そのゲノム構造は哺乳動物間で高度に保存されることにより、遺伝情報を共有している。本研究は、タンパク質として翻訳される以外のゲノム領域にある遺伝情報に焦点を当て、その情報を明らかにすることにより、次世代に向けたアレルギー治療法の開発を目指すものである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：アレルギー・喘息、シグナル伝達、免疫学

1. 研究開始当初の背景

花粉症、喘息、アトピー性皮膚炎などのアレルギー性病態の多くは、IL-4, IL-5, IL-13 等の Th2 と呼ばれる特殊な T 細胞サブセットから主に産生されるサイトカインによって制御されている。また、これらサイトカインは T 細胞のみならず、エフェクター細胞である肥満細胞、好塩基球等からも産生される。胸腺にて成熟分化した T 細胞は、抗原刺激を受けることにより、異なるサイトカインを産生して機能を発揮するヘルパー T 細胞へと分化していく。ヘルパー T 細胞のサブセットには IFN- γ を産生する Th1、アレルギー炎症に関連するサイトカイン IL-4, IL-5, IL-13 を産生する Th2、自己免疫性のサイトカイン

IL-17 を産生する Th17 の存在が明らかにされている。アレルギーに関与する Th2 サイトカイン遺伝子の多くは同一染色体上にクラスターを形成して存在し、そのゲノム構造は高度に哺乳動物間で進化的に保存されている。一般的に約 90%以上のゲノムは蛋白に翻訳されることなく、翻訳領域の制御をしていることが分かりつつあるが、この Th2 サイトカイン遺伝子クラスター内には良く配列が保存された非翻訳領域が点在していた。クロマチンレベルでのエピジェネティックな解析より、これら保存された領域は、DNase I に対して高感受性であることから DNase I 高感受性 (HS) 領域と呼ばれ、ヒストンのアセチル化と高い相関性を持つことから、Th2 サイトカイン

ンの転写を制御する分化スイッチとしての働きが示唆されている。

2. 研究の目的

花粉症、喘息、アトピー性皮膚炎などのアレルギー性病態の多くは、IL-4, IL-5, IL-13等のTh2と呼ばれる特殊なT細胞サブセットから主に産生されるサイトカインによって制御されている。アレルギーに關与するTh2サイトカイン遺伝子の多くは同一染色体上にクラスターを形成して存在し、そのゲノム構造は高度に哺乳動物間で進化的に保存されている。これら保存された領域は、DNase Iに対して高感受性であることからTh2サイトカインの転写を制御する分化スイッチとしての働きが示唆されている。そこで、本研究計画ではそれぞれの制御領域に焦点を当て、GFPをレポーター遺伝子にしたトランスジェニック(Tg)マウスのシリーズ、およびゲノム上よりこれらHS領域を欠失させたノックアウト(KO)マウスを作製することにより、実際の分化制御するかかわる可能性が想定される領域の同定を目的とする。

3. 研究の方法

1) Th2サイトカイン遺伝子の包括的制御機構の存在を明らかにする

- 複数存在するHS領域が、Th2分化におけるIL-4産生をどのようなメカニズムによりTh2特異的発現を制御しているのかという疑問に答えるべく、Th2遺伝子座クラスター内のそれぞれの制御領域を欠失させたマウスシステムを構築し、Th2分化過程でのIL-4産生における各HS領域の役割を明らかにしていく。
- Th2遺伝子座クラスター内の複数のアレルギー関連サイトカイン遺伝子は、統一した制御機構により包括的に制御され流値考えられている。本計画では、Th1細胞においてTh2サイトカインであるIL-13が産生する制御機構を解析する事により、IL-4とIL-13遺伝子が異なる制御機構を持つことを明らかにする。
- ゲノム制御領域 KOマウスを用いることにより、ある特定の制御領域が複数のアレルギー関連サイトカイン遺伝子を包括的に制御するかどうかを明らかにする。

2) HS領域に存在するSNPsとアレルギー体質との関係を明らかにする

本研究計画では、SNPsをもとにヒトにおけるHS4のサイレンサーとしてのメカニズムを解明し、これを基盤として新しい治療法の開発を目指す。

3) IL-4の肥満細胞および好塩基球特異的発現を制御する機構の解明

特異的発現を制御する転写制御領域を制御する転写因子を明らかにしていくとともに、GFP Tgマウスを使って、アレルギー病態におけるこれら細胞の動態を可視化する。またGFPをジフテリア毒素に対する受容体に置き換えることより、ジフテリア投与によりこれら細胞を選択的に除去する技術を用い、肥満細胞および好塩基球を欠失させたマウスを作製し、これら細胞のアレルギー病態における意義を明らかにする。

4) それぞれの転写制御領域によるアレルギー性病態制御を明らかにする。

それぞれのゲノム制御領域のKOマウスを用い、アレルギー性疾患モデルにおける機能を解析する事により、それぞれの転写制御領域の生理学的意義を明らかにする。

4. 研究成果

GFPをレポーター遺伝子にしたTgマウスのシリーズを構築するとともに、ゲノム上よりこれらHS領域のそれぞれを欠失させたマウスを作製し、その解析から以下のことを計画内に明らかにした。

- 1) GFP Tgマウスの解析では、対象としたHS領域(プロモーター, HS2, サイレンサー, HS4, CNS-2)にはいずれもTh2特異的にIL-4産生を中枢的に制御する働きは認めなかった。しかしながら、CNS-2領域は、メモリー型CD4T細胞やNKT細胞等におけるTh2サイトカインの産生を制御する働きを持つ。このエンハンサーは、Notchシグナルを介してその活性が制御されており、このマウスの解析からTh2分化におけるNotchシグナルの働きの側面を明らかにすることができた(Immunity, 2004, Immunity, 2006, Immunity, 2007)。
- 2) 各HS領域を欠失させたマウスにおける解析結果は、いずれのHS領域もTh2分化過程におけるIL-4産生を中枢的に制御する働きを持たないことが明らかとなった。このことは複数の制御領域が複合的に働くことで、IL-4のTh2特異的産生を制御する事を示唆していた。
- 3) HS2, サイレンサー, HS4, CNS-2のそれぞれのゲノム領域を欠失させたマウスを作成した。メモリー型CD4T細胞やNKT細胞で機能を持つCNS-2を欠損させたマウスは、抗原を過免疫してもIgE抗体が全く認められず、IL-4欠損マウス同様IgEを介する如何なるアレルギーも発症しないマウスであった。このことから、CNS-2はアレルギー

一反応の惹起において重要な働きを持つエンハンサーであることが明らかとなった。

- 4) HS4欠損マウスは、ナイーブT細胞においてIL-4産生を誘導することから、サイレンサー活性を持つ領域であった。ヒトにおいてもこの涼気にはSNPが見つかったことから、このHS4領域のアレルギー発症への意義が明らかにされてきた。
- 5) GFP Tgマウスシリーズの解析から、Th2サイトカインを産生する肥満細胞と好塩基球では、Th2細胞とは異なる特定のHS領域が、異なるメカニズムを介して特異的にIL-4産生を制御していた(Mol. Cell. Biol. 2007)。肥満細胞ではHS2が、そして好塩基球ではサイレンサー領域が細胞特異的発現を制御していた。ノックアウトマウスの解析からCNS-2は肥満細胞のIL-4産生は制御しているが、好塩基球の制御には関与しないこと、HS-4は肥満細胞・好塩基球いずれにも関与していないことが示された。これに対し、サイレンサー領域は好塩基球のIL-4産生制御に働いていることが分かってきた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計18件)

1. Okamoto, M., Van Stry, M., Chung, L., Koyanagi, M., Sun, X., Suzuki, Y., Ohara, O., Kitamura, H., Hijikata, A., M., Kubo, M.; MINA53, an I14 co-repressor controlling Th2-bias *Nat. Immunol.* in press 「査読有り」
2. Kohu, K., Ohmori, H., Wen, F. W., Onda, D., Wakoh, T., Yamashita, M., Toshinori Nakayama, T., Kubo, M., and Satake, M.; Runx3 transcription factor promotes Th1 differentiation by interacting with and attenuating GATA3. *J. Immunol.* in press 「査読有り」
3. Tanaka, S., Yoshimoto, T., Naka, T., Nakae S., Iwakura Y., Cua, D. and Kubo, M.; Non-canonical IL-17 producing memory T cells regulate the initial phase of neutrophil mediated airway responses. *J. Immunol.* in press 「査読有り」
4. Fukuyama, S., Nakano, T., Matsumoto, T., Oliver, B. G. G., Burgess, J., Moriwaki, A., Tanaka, K., Kubo, M., Hoshino, T., Tanaka, H., McKenzie, A. N. J. Matsumoto, K., Aizawa, H., Nakanishi, Y., Yoshimura, A., Black, J. L., and Inoue, H.; Pulmonary suppressor of cytokine signalling (SOCS)-1 induced by IL-13 as regulates allergic asthma. *Am. J. Respiratory and Critical Care Med.* in press 「査読有り」
5. Lu, L-F., Thai, T-H, Dinis Pedro Calado, D.P., Chaudhry, A., Kubo, M., Kentaro Tanaka, K. Gabriel, B. G., Lee, H., Yoshimura, A., Klaus Rajewsky, R., Alexander Y. Rudensky Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells through targeting SOCS1. *Immunity* 30: 80-91, 2009 「査読有り」
6. Nakayama, J., Yamamoto, M., Hayashi, K., Satoh, H., Bundo, K., Kubo, M., Goitsuka, R., Farrar, M.A., Kitamura, D., BLNK suppresses pre-B cell leukemogenesis though inhibition of Jak3. *Blood*, Feb 12;113(7):1483-92, 2009 「査読有り」
7. Kano, S., Sato, K., Morishita, Y., Vollstedt, S., Kim, S., Taki, S., Honda, K., Kubo, M., & Taniguchi, T.; Regulation of Th1 vs. Th17 differentiation: Selective contribution of the transcription factor IRF1 to the IFN- γ -IL-12 axis of signaling networks in CD4⁺ T cells. *Nature Immunology* 9(1):34 - 41, 2008
8. Myburgh, E., Horsnell, W., Cutler, A.J., Arendse, B., Kubo, M., Brombacher, F., ^{Bix} Murine IL-4 is able to signal via chimeric human IL-4R α /mouse γ -chain receptor, *Mol. Immunol.* 45(5):1327-1336. 2008 「査読有り」
9. Kohfu, K., Kubo, M., Ichikawa, H., Ohno, S., Habu, S., Sato, T., and Satake, M.; Pleiotropic Roles of Runx Transcription Factors in the Differentiation and Function of T Lymphocytes. *Current Immunology Reviews* 4, 101-115, 2008 「査読有り」
10. Seki, Y., Yang, J., Okamoto, M., Tanaka, S., Goizuka, Farrar, M.A., R., and Kubo, M.; The role of IL-7/STAT5 pathway and suppressor of cytokine signaling 1 in maintenance of naive and memory CD4 T cells in peripheral lymphoid organs. *J. Immunol.* 1;178(1):262-70, 2007 「査読有り」
11. Inoue, H., Fukuyama, S., Kubo, M., and Yoshimura, A.; Role of endogenous inhibitors of cytokine signaling in allergic asthma, *Current Medicinal Chemistry* 14, 181-189,

- 2007 「査読有り」
12. Numata, K., Kubo, M., Watanabe, H., Takagi, K., Mizuta, H., Okada, S., Ito, T., and Matsukawa, A.; Overexpression of Suppressor of Cytokine Signaling-3 in T cells Exacerbates Acetaminophen induced Hepatotoxicity. *J. Immunol.* 178 3777-3785, 2007 「査読有り」
 13. Kitazawa, Y., Fujino, M., Wang, Q., Kimura, H., Azuma, M., Kubo, M., Abe, R., and Li, X-K., Involvement of the Programmed Death-1/Programmed Death-1 Ligand Pathway in CD4⁺CD25⁻ Regulatory T-Cell Activity to Suppress Alloimmune Responses, *Transplantation* 83: 774 782, 2007 「査読有り」
 14. Yoshimura, A., Naka, T., Kubo, M.; SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature Review Immunology* 7, 454-465, 2007 「査読有り」
 15. Kubo, M.; Notch: filling a hole in T helper 2 cell differentiation. *Immunity* 27, 3-5, 2007 「査読有り」
 16. Yagi, R., Tanaka, S., Motomura, Y., and Kubo, M., The regulation of *Il4* gene expression in mast cells and basophils is regulated by distinct proximal and distal 3 enhancers. *Mol. Cell. Biol.* 27(23), 8087-8097, 2007 「査読有り」
 17. Fujita, S., Sato, Y., Sato, K., Eizumi, K., Kubo, M. Fukaya, T., and Sato, K., Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus -host disease mediated through CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Blood*,110 (10),3793-803 2007 「査読有り」
 18. Hijikata A, Kitamura H, Kimura Y, Yokoyama R, Aiba Y, Bao Y, Fujita S, Hase K, Hori S, Kanagawa O, Kawamoto H, Kawano K, Koseki H, Kubo M, Kurita Miki, Kurosaki T, Masuda K, Nakata M, Oboki K, H, Okamoto M, Okayama Y, O-Wang J, Saito H, Saito T, Sakuma M, Sato K, Sato K, Seino K, Setoguchi R, Tamura Y, Tanaka M, Taniguchi M, Taniuchi I, Teng A, Watanabe T, Watarai H, Yamasaki S, Ohara O., Construction of an open-access database that integrates crossreference information from the transcriptome and proteome of immune cells, *Bioinformatics*, 23(21): 2934-2941,2007 「査読有り」
- 〔学会発表〕(計 12 件)
1. 田中 伸弥、久保允人 : IgE産生誘導に IL-4 エンハンサー-CNS-2 は必須である、第 17 回京都 T 細胞会議、2007 年 6 月 15-16 日、京都
 2. 本村 泰隆、久保允人 : I 型ヘルパー T 細胞における IL-13 遺伝子の発現機構、第 17 回京都 T 細胞会議、2007 年 6 月 15-16 日、京都
 3. Motomura, Y., Azuma, T., Matsumoto, K., Inoue, H., Kubo, M.: A putative clock-controlled transcriptional factor, E4BP4/NFIL3 regulates selective IL-13 expression in chronic Th1 immune responses. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, November 20-23,2007, Tokyo
 4. Tanaka, S., Kubo, M.: The regulation of IL-17A expression by memory-phenotype (MP) CD4 T cell, The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, November 20-23, 2007, Tokyo
 5. Tanaka, S., Kubo, M.: Regulation of non-canonical IL-17 expression by Memory phenotype (MP) CD4 T cells, 95th Annual Meeting of the American Association of Immunologists (AAI), April 5-9 2008, San Diego
 6. 本村 泰隆、久保允人 : E4BP4 による I 型ヘルパー T 細胞における IL-13 遺伝子の発現制御、第 18 回京都 T 細胞会議、2008 年 6 月 14 日、京都
 7. 田中伸弥、久保允人 : 免疫性疾患における CNS-2 エンハンサーの重要性、第 18 回京都 T 細胞会議、2008 年 6 月 14 日、京都
 8. 河府和義、大森秀孝、Wong Wen Fen、久保允人、佐竹正延 : Runx3 と GATA3 の相互作用による Th1/Th2 分化制御機構、第 18 回京都 T 細胞会議、2008 年 6 月 14 日、京都
 9. 大野慎一郎、久保允人 : TGF-beta1 Ohno inhibits Th1/Th2 development through epigenetic modification of cytokine locus independent on Foxp3 expression, 第 38 回日本免疫学会総会、2008 年 12 月 1 日 京都
 10. 本村 泰隆、久保允人 : ヘルパー T 細胞分化における サイトカイン 遺伝子の 時空的 制御、第 38 回日本免疫学会総会、2008 年 12 月 1 日 京都
 11. 澤口 穰、田中 伸弥、中江 進、久保允人 好塩基球、肥満細胞の誘導型欠損マウスの

作製、第 38 回日本免疫学会総会、2008 年
12 月 3 日 京都

12. Fushimi S, Takahata T, Wakabayashi H,
Ogino T, Kubo M: ConA 肝炎における T 細胞
SOCS3 の役割解明、第 38 回日本免疫学会総会、
2008 年 12 月 3 日 京都

〔図書〕(計 9 件)

1. 久保 允人: メモリー型 T 細胞:
アレルギー反応を制御する新たな T 細胞サブ
セット、**アレルギー・免疫**、vol.14, No.2,
12-18, 2007
2. 田中伸弥、久保允人 Th2 細胞とマスト
細胞における IL-4 発現制御 **臨床免疫**
vol.47, No.1, 26-32, 2007
3. 久保允人 免疫応答と免疫病態の総合的
分子理解に向けて、第 II 部 適応免疫から
の展望、第 10 章 Th1/Th2 応答とクロマチン
制御、南山堂、77-86, 2007
4. 久保允人 (監修): 特集 T 細胞研究新章:
免疫疾患解明に向けた新たな展開、**細胞
工学** 秀潤社、vol.27, No.2, 2-4, 2008
5. 田中伸弥・久保允人: Notch によるアレル
ギー・Th2 分化制御、**細胞工学**、秀潤社、
vol.27, No.2, p132-136 2008
6. 松野有希子、久保允人: Phosflow™
Technology によるフローサイトメーターを
用いたリン酸化 STAT の検出、**BD
Biosciences Phosflow Review**, vol.1 p1-4,
2008
7. 久保允人 特集「ヘルパー T 細胞の機構と
分化制御」Th1/Th2 分子細胞治療 vol. 7,
No.3, p107-114, 2008
8. 久保允人 アレルギーとエピジェネティク
ス **分子消化器病** vol. 5, No.4, p20-26,
2008
9. 久保允人: 好塩基球による IL-4 遺伝子
発現制御 **アレルギー・免疫** vol.16, No. 3
p26-32, 2009

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

発明の名称: アトピー性皮膚炎の発症予測診
断方法、予防剤および治療剤

発明者: 吉田尚弘、安田琢和、若菜茂晴、

久保允人

権利者: 独立行政法人理化学研究所

出願番号: (出願のため手続き中)

出願日:

発明の名称: IL-4 初期発現系トランスジェニ
ック非ヒト動物およびその利
用

発明者: 田中伸弥, 八木良二、久保允人

権利者: 独立行政法人理化学研究所

理研整理番号: 20236

出願番号: 2007-042726

出願日: 平成 19 年 2 月 22 日

国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 允人 (KUBO MASATO)

独立行政法人理化学研究所・シグナル・ネ
ットワーク研究チーム・チームリーダー

研究者番号: 40277281

(2) 研究分担者

玉利 真由美 (TAMARI MAYUMI)

独立行政法人理化学研究所・アレルギー体
質関連遺伝子研究チーム・チームリーダー

研究者番号: 00217184

井上 博雅 (INOUE HIROMASA)

九州大学大学院・附属胸部疾患研究施設・
講師

研究者番号: 30264039