

平成22年6月10日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19590264  
 研究課題名 (和文) 免疫細胞ホーミングにおけるレチノイン酸分解系の役割の解析

研究課題名 (英文) Cyp26b1 regulates the expression of the gut-homing receptor CCR9 in T cells.  
 研究代表者  
 竹内 一 (TAKEUCHI HAJIME)  
 徳島文理大学・香川薬学部・助教  
 研究者番号：00421298

## 研究成果の概要 (和文)：

レチノイン酸 (AtRA) には、免疫系の細胞に対する制御因子としての機能がある。生体内における AtRA の生理的濃度は、合成と分解のバランスによって制御されているが、CYP26 は AtRA を分解する酵素である。今回の研究で我々は、小腸の所属リンパ節に存在する T 細胞で CYP26 の一つ Cyp26b1 が発現していることを明らかにした。さらに Cyp26b1 の活性と小腸ホーミング受容体の発現が相関していることが判明した。

## 研究成果の概要 (英文)：

All-*trans* retinoic acid (AtRA) is an essential regulator in lymphocyte. Concentrations of AtRA are maintained by the balance between synthesis and degradation. CYP26 metabolizes AtRA into inactive derivatives. We found that *Cyp26b1*, one of CYP26 enzymes, was expressed in T cells in gut-related lymphoid organs. The expression level of *Cyp26b1* was significantly related to the AtRA-induced expression of the gut-homing receptor.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬理学一般

キーワード：炎症・免疫、レチノイン酸

## 1. 研究開始当初の背景

免疫機能が正しく効率良く発揮されるためには、免疫細胞が体内の特定の場所に迅速かつ的確に移動しなければならない。その乱れは、種々の疾患の原因や亢進要因となりうる。ナイーブ T 細胞は、リンパ系以外の組織内には移動できないが、エフェクター/メモリー T 細胞はリンパ系以外の組織内にも移動できる。その移動先は、初めに抗原刺激を受けた 2 次リンパ系器官が所属する組織となる傾向がある。例えば、小腸のパイエル板や腸間膜リンパ節で活性化された T 細胞は小腸の粘膜固有層などの組織に特異的に移動（ホーミング）する。これにはパイエル板や腸間膜リンパ節の樹状細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。当研究室では、樹状細胞が T 細胞に抗原提示する際にレチノイン酸 (AtRA) を分泌することによって、T 細胞に対して小腸へのホーミング特異性を賦与していることを発見した。AtRA 刺激を受けた T 細胞は、インテグリン  $\alpha 4 \beta 7$  とケモカイン受容体 CCR9 を細胞膜表面に発現することにより、そのリガンドが発現する小腸粘膜組織に選択的に移動する。さらに我々は、同様の機構が B 細胞のホーミング特異性の制御にも働いていることを明らかにした。

レチノイドは、食物より摂取されたビタミン A より合成される。ビタミン A はレチノールに変化した後、2 段階反応を経て活性型である AtRA へと変換される。第一段階のレチノールからレチナールへの変化は複数のアルコール還元酵素 (ADH) により触媒され、第二段階のレチナールから AtRA への変化はレチナール脱水素酵素 (RALDH) により触媒される。ADH は多くの組織で幅広く発現が確認されるのに対し、RALDH は AtRA が直接作用する組織で選択的に発現している。このことは、AtRA の合成経路の中でも特に RALDH が関与する段階が生物学的に重要であることを示している。

一方、活性型レチノイドである AtRA は、チトクローム P450 酵素の CYP26 により酸化され不活性化される。この反応は不可逆的であり、AtRA シグナルの調節に何らかの働きをしていることが推測されている。AtRA は発生初期段階において、モルフォゲンとして働いており、局所で合成された AtRA が拡散して濃度勾配を形成することが形態形成に重要とみられている。実際にマウス胎児で RALDH と Cyp26 の発現を調べると、RALDH は体幹中心部で発現が検出されるが、Cyp26 は対照的に前部と後部の末端部で発現が検出される。この対照的な発現パターン

から、発生段階での AtRA の濃度勾配の形成には合成酵素と分解酵素が共に中心的な役割を果たしていることが示唆されている。

免疫細胞が小腸へホーミングする際には、上記の通り AtRA による刺激が必須である。腸間膜リンパ節と小腸パイエル板の樹状細胞は RALDH を発現しており、AtRA は樹状細胞で合成・分泌され抗原刺激を受けた T 細胞にホーミング特異性をインプリントしている。マウス T 細胞に小腸ホーミング特異性をインプリントするためには、10nM 以上の AtRA が必要である。このような AtRA の局所的な濃度調整には、発生初期過程と同様に合成と分解のバランスをとることが重要であると予想される。例えば、分解酵素が過剰発現している場合、樹状細胞から分泌される AtRA が急速に分解されるため、インプリントが十分に起こらない可能性がある。逆に分解酵素の発現が抑制されている場合、過剰量の AtRA が周囲に放出されることによって、周辺の細胞へのホーミング特異性に影響を与える可能性が考えられる。したがって AtRA 至適濃度の維持機構を理解するためには、合成系のみならず分解系に対する解析も重要である。我々は、AtRA の分解系が免疫細胞のホーミング制御にどのように関与しているかを検討するために、予備的実験として Cyp26 の発現を調べた。その結果、AtRA の刺激を受けたマウス T 細胞中で Cyp26 の発現が誘導されることが明らかになった。Cyp26 は 3 種類 (Cyp26a1, Cyp26b1, Cyp26c1) 存在することが知られているが、T 細胞中ではこれらのうち Cyp26b1 だけが AtRA 刺激に応答し mRNA の発現が誘導された。他の 2 つの遺伝子の発現は刺激の有無にかかわらず検出されなかった。これまでに Cyp26a1 の発現が、AtRA 刺激により急性前骨髄性白血病細胞 (APL)、皮膚や細胞株で誘導されるという報告がなされている。また Cyp26a1 遺伝子の上流域には複数の AtRA 反応モチーフがあり、それらによって遺伝子の転写段階で発現が誘導されることが明らかになっている。しかし、Cyp26b1 が AtRA で誘導されるという報告はこれまでにない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ホーミング特異性のインプリメンティングにおいて局所的な AtRA 濃度を調整する合成酵素と分解酵素の拮抗作用の制御機構を調べることである。個体発生においては、Cyp26 の発現異常は形態形成の重篤な異常を引き起こす。また、AtRA を用い

て治療を行った後に再発した APL では、腫瘍細胞内で Cyp26 の発現が亢進しているため AtRA 抵抗性を示すことが多く難治性である。同様の現象は疥癬等の皮膚疾患でも認められる。このことは、AtRA 分解系酵素の制御機構の解明が複数の疾患の治療成績の向上に繋がる可能性を示しており、また診断のマーカーとして使える可能性を示唆している。本研究では、これらの疾患への診断や治療への応用の可能性の検討も行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

B10. D2 マウスは日本エスエルシーより購入した。TCR-D011.10/Rag2<sup>-/-</sup>マウスはタコニク社より購入した。すべての実験動物は SPF (specific pathogen free) 条件下で徳島文理大学香川キャンパス実験動物研究施設にて飼育された。すべての動物実験は、徳島文理大学動物実験委員会の承認の下、同大学動物実験規程に基づき行われた。

#### (2) リンパ系器官からの T 細胞の単離

B10. D2 マウスの腸間膜リンパ節、パイエル板、脾臓から細胞懸濁液を調製し、そこから CD4 陽性 T 細胞は Dynabeads Mouse CD4 を用いて単離し、CD8 陽性 T 細胞は PE 標識抗 CD8 抗体と抗 PE 抗体標識マイクロビーズを用いて単離した。それぞれの細胞は単離後ただちに RNA 抽出に用いられた。CD4 陽性 CD62L 高発現ナイーブ T 細胞は TCR-D011.10/Rag2<sup>-/-</sup>マウスの腸間膜リンパ節と脾臓から、Dynabeads Mouse CD4 と抗 CD62L 抗体標識マイクロビーズを用いて単離された。

#### (3) CD4 陽性 T 細胞の培養

AtRA 刺激に対する実験では、まずナイーブ T 細胞を AtRA 存在下で、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体をコートした 48 穴プレートで 2 日間培養し、その後 24 穴プレートに移して IL-2 と AtRA を含んだ培地でさらに 2 日間培養した。

#### (4) CD4 陽性 T 細胞への遺伝子導入

CD4 陽性 T 細胞への遺伝子導入は Amaxa Mouse T cell Nucleofector Kit を用いて行った。Cyp26b1 の過剰発現実験では、まずナイーブ T 細胞を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体をコートした 48 穴プレートで 2 日間培養した。その後 1x10<sup>6</sup> の細胞あたり 4μg の Cyp26b1 発現ベクターを導入した。その後、さらに抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体をコートした 48 穴プレートで 1 日培養した。次に T 細胞を AtRA と IL-2 を含んだ培地で 2 日間培養し、解析に用いた。

#### (5) 定量 PCR

RNA はそれぞれの細胞から Qiagen RNeasy Mini Kit を用いて抽出され、cDNA は Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit を用いて合成された。合成された cDNA を鋳型として Applied Biosystems Power SYBR Green Master Mix を用いて real-time PCR を行い、

それぞれの遺伝子の発現量を定量した。

#### (6) 統計学的解析

実験結果の比較は t 検定を用いて行い、有意確率が 0.05 未満の場合を統計学的に有意であると見なした。

### 4. 研究成果

(1) リンパ組織中の CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞における Cyp26b1 遺伝子の発現

各種マウスリンパ組織から単離された T 細胞を材料として、三種類の Cyp26 遺伝子 (Cyp26a1, Cyp26b1, Cyp26c1) の発現を調べた。その結果、腸間膜リンパ節、パイエル板といった小腸関連リンパ組織由来の CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞が Cyp26b1 遺伝子を発現していることが明らかになった (図 1)。それに対し、脾臓由来の T 細胞では、いずれの Cyp26 遺伝子の発現も検出されなかった (図 1)。これまでにさまざまな組織で Cyp26

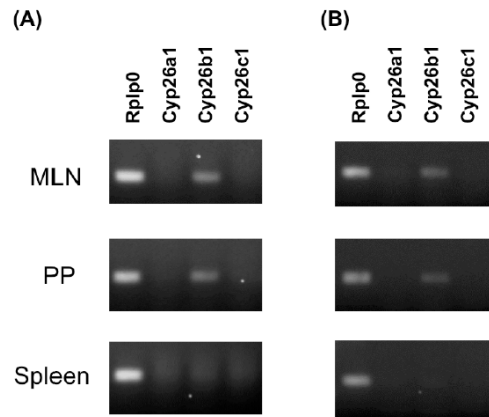


図 1. リンパ系組織由来の T 細胞内での Cyp26 遺伝子の発現様式

CD4 陽性 (A) または CD8 陽性 (B) T 細胞における Cyp26a1, Cyp26b1, Cyp26c1 及び内在性コントロールの Rplp0 の発現を調べた。T 細胞は腸間膜リンパ腺 (MLN)、パイエル板 (PP)、脾臓 (Spleen) からそれぞれ単離された。

遺伝子の発現が AtRA により誘導されることが報告されている。小腸の所属リンパ節中では樹状細胞が RALDH を高発現しており、T 細胞は AtRA の暴露を受けていると考えられている。一方脾臓の樹状細胞は RALDH を発現していない。これらのことから、Cyp26b1 遺伝子は AtRA 刺激を受けて T 細胞で発現していると推測された。3 種類の Cyp26 遺伝子はいずれも AtRA により発現が誘導されることが他の組織由来の材料を用いた実験で示されているが、その機構は異なっていることが示唆されている。最もよく研究されているのはマウスの初期発生の過程における CYP26 の発現様式である。発生過程においては、特定の組織を AtRA の影響から守るため CYP26 が発

現し他の部位から拡散してくる AtRA を不活性化している。しかし、3種類の Cyp26 遺伝子の発現する組織は異なっている。Cyp26a1 は脳神経系を中心とした領域、Cyp26b1 は四肢末端を中心とした領域、Cyp26c1 は顔面と神経の一部の領域に強い発現が認められる。このように、それぞれの Cyp26 遺伝子は AtRA 刺激に反応して発現が誘導されるものの、組織特異的な制御機構の影響も強く受けている。今回の我々の結果は、リンパ球では Cyp26 遺伝子のうち b1 のみが発現可能であることを示している。

## (2) CD4 陽性細胞における AtRA による Cyp26b1 遺伝子の発現誘導

上記の結果から T 細胞中では、AtRA により Cyp26b1 の発現が誘導される可能性が示唆された。そこで我々はナイーブ CD4 陽性細胞を用い、AtRA 存在下で活性化し Cyp26b1 の発現が誘導されるかどうかを調べた。AtRA 非存在下で活性化した場合、T 細胞中では Cyp26 遺伝子の発現は検出されなかった。一方、10nM または 100nM の AtRA 存在下で活性化した場合

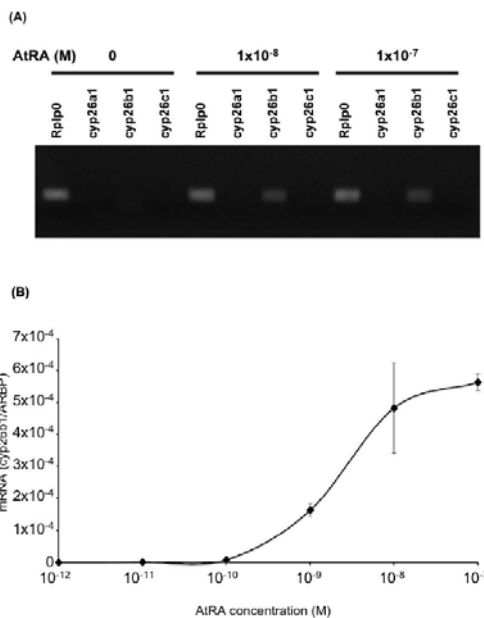


図2. CD4 陽性 T 細胞における Cyp26 遺伝子の発現誘導

(A) RT-PCR を用いた Cyp26 遺伝子の発現解析。ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を AtRA 存在下または非存在下で活性化し、Cyp26a1, b1, c1 の各遺伝子の発現を調べた。

(B) 定量 PCR を用いた AtRA 刺激による Cyp26b1 遺伝子発現量の変化の解析

合、Cyp26b1 遺伝子の発現が誘導された。また、生体内の場合と同様に他の 2 種類の Cyp26 遺伝子の発現は検出されなかった (図

2A)。

さらに詳細な誘導様式を調べるために次の実験を行った。まず、1pM から 100nM まで異なる濃度の AtRA 存在下で T 細胞を活性化し、Cyp26b1 の発現を調べた。その結果、発現は 1nM 以上の濃度で検出され、濃度依存的に発現量が上昇する傾向がみられた (図 2B)。Cyp26a1 の場合、P19 細胞を使ったレポーターアッセイの結果、10nM から発現が誘導されることが報告されており、Cyp26b1 遺伝子の誘導機構における AtRA 感受性は Cyp26a1 発

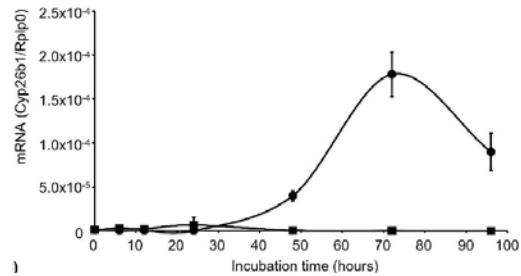


図3. T細胞内でのAtRA刺激によるCyp26b1遺伝子発現量の経時的変化

現誘導とはほぼ同等であるとみられる。次に発現が誘導される時間を調べるため、10nM の AtRA 存在下で T 細胞を活性化し、Cyp26b1 の発現量を解析した。その結果、Cyp26b1 の発現は AtRA 刺激開始後、48 時間経過した時点から検出され、72 時間後に最大量に達した (図 3)。

Cyp26a1 の場合、P19 細胞を使ったレポーターアッセイでは、AtRA 処理後 6 時間後に発現の誘導が検出されているのに対し、Cyp26b1 では、それよりも 40 時間以上遅い反応結果となった。Cyp26a1 遺伝子の上流域には少なくとも 2 か所の RARE が存在し、RAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  が直接結合して発現を制御していることが明らかになっている。ただし、一部の細胞株では AtRA による刺激をうけても Cyp26a1 の発現が全く誘導されず、またある種の細胞では AtRA 刺激の有無にかかわらず構成的に Cyp26a1 が発現している場合がある。これらのことから、AtRA 非依存的に Cyp26a1 の発現を制御し得る因子が存在する可能性もある。一方、Cyp26b1 の発現制御機構はこれまでほとんど解析がなされてこなかった。Cyp26b1 遺伝子の上流域には典型的な RARE モチーフはなく、Cyp26a1 との間に共通するような cis 領域も見つかっていない。このことから、Cyp26b1 の発現機構は a1 のそれとはかなり異なっていることも考えられる。これまでに 500 以上の AtRA により発現が誘導される遺伝子群が報告されている。このうち 27 の遺伝子については、RAR/RXR ヘテロダイマーが直接上流域に結合し発現を制御することが判明している。加えて約 100 の遺伝子について

も証明は十分になされていないものの、レチノイン酸受容体による直接制御の可能性が高いとみられている。しかし残りの大部分の遺伝子群では AtRA による発現制御は、先に誘導された転写因子などによる間接的なものであるとされている。Cyp26b1 遺伝子の場合にも、発現の誘導に比較的長いタイムラグがあること、そして遺伝子上流域に RARE モチーフが見つからないことから、その発現はレチノイン酸受容体の直接結合ではなく、他の転写因子などを介した間接的なものであると推測された。

### (3) Cyp26b1 遺伝子の過剰発現による CCR9 遺伝子の発現抑制効果

AtRA は CCR9 の発現を誘導することにより、リンパ球に小腸ホーミング特異性を付与することができる。我々はリンパ球内の Cyp26b1 遺伝子の発現量を変化させることで、AtRA により誘導される CCR9 遺伝子の発現量にどのような影響がみられるか調べた。CD4 陽性 T 細胞に Cyp26b1 発現ベクターまたはコントロールベクターを導入し、これらの細胞に AtRA 刺激を与えたときの CCR9 遺伝子の発現量を計測した (図 4)。その結果、いずれのベクターを導入した場合でも CCR9 遺伝子

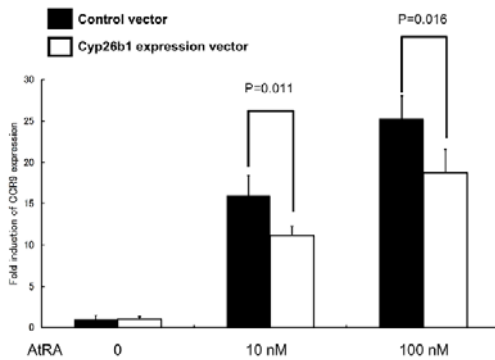


図 4. Cyp26b1 過剰発現細胞における Ccr9 遺伝子の AtRA による発現誘導

の発現量は AtRA の濃度依存的に上昇した。しかし同一濃度の AtRA 刺激と比較すると Cyp26b1 発現ベクターを導入した細胞では、コントロールベクター導入細胞に比べ CCR9 遺伝子の発現量は有意に低下していた。

### (4) CYP26 阻害剤処理による CCR9 の発現への影響

CD4 陽性 T 細胞に存在する内在性 CYP26 の酵素活性を阻害剤 Liarozole を用いて抑制した条件下で、AtRA により誘導される CCR9 の発現を検定した。CD4 陽性 T 細胞を様々な濃度の AtRA 存在下で活性化する培養液に Liarozole を添加し、CCR9 陽性細胞の割合を FACS で解析した。その結果、Liarozole を添

加した群では非添加群に比べ、20%以上陽性率が上昇した (図 5)。これらの結果から、内在性 CYP26 の活性が低下すれば、CCR9 の

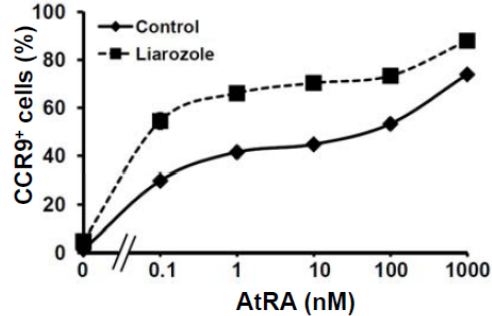


図 5. CD4 陽性 T 細胞における内在性 CYP26 阻害による AtRA 依存的 CCR9 発現誘導の増強

AtRA による発現誘導が増強されることが示唆された。

## 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 2 件)

- ① Takeuchi, H., Yokoto, A., Ohoka, Y. and Iwata, M. Cyp26b1 regulates the expression of the gut-homing receptor CCR9 in T cells. Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Conference on Cytochrome P450 査読無, 2009, 165-168
- ② 竹内 一, 岩田誠, 食物アレルギーにおけるレチノイン酸代謝酵素の役割の解明、食に関する助成研究調査報告書、査読無、No. 21、2008、117-124

[学会発表] (計 5 件)

- ① 竹内 一, Retinoid X receptor agonists and organotins markedly enhance the retinoic acid-induced CCR9 expression of T cells. 第 39 回日本免疫学会、2009 年 12 月 2 日、大阪
- ② 竹内 一, Cyp26b1 による小腸ホーミング受容体 CCR9 の発現制御、第 8 回四国免疫フォーラム、2009 年 6 月 27 日、香川
- ③ Takeuchi, H., Cyp26b1 regulates the expression of the gut-homing receptor CCR9 in T cells. 16<sup>th</sup> International Conference on Cytochrome P450, 2009 年 6 月 25 日、沖縄
- ④ 竹内 一, Cyp26b1 regulates the expression of the gut-homing receptor CCR9 in T cells. 第 38 回日本免疫学会、2008 年 12 月 2 日、京都
- ⑤ 竹内 一, Th1・Th2 細胞におけるレチノイン酸による小腸へのホーミングのイン

プリンティング、第 37 回日本免疫学会、  
2007 年 11 月 20 日、東京

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph05/index.htm>

1

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 一 (TAKEUCHI HAJIME)

徳島文理大学・香川薬学部・助教

研究者番号：00421298

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：