

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590106

研究課題名(和文) 腸管免疫系の恒常性維持におけるレチノイン酸産生酵素の役割とその発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the expression mechanism of retinoic acid-generating enzyme, RALDH2, which plays key roles in gut immunity

研究代表者

大岡 嘉治 (Ohoka, Yoshiharu)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：60303971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において、マウス骨髄細胞から分化誘導した樹状細胞におけるレチノイン酸産生酵素RALDH2遺伝子の発現がGM-CSFにより誘導され、その誘導がレチノイン酸自身により増強されることを報告した。RALDH2遺伝子の発現制御領域はグアニン-シトシンに富むGCリッチ領域を形成しており、GM-CSFとレチノイン酸の作用は、このGCリッチ領域上における転写因子Sp1と、GCリッチ領域近傍のRA応答配列(Retinoic acid responding element：RARE)ハーフサイトに結合したRA受容体(RAR)/レチノイドX受容体(RXR)の相互作用によることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：GM-CSF potently induces RALDH2 expression in DCs in an RA-dependent manner, and RA alone weakly induces the expression. In this study, we show that GM-CSF-induced activation of the transcription factor Sp1 and RA-dependent signaling via the RAR/RXR complex contribute to Aldh1a2 expression. The RAR antagonist LE540 and the Sp1 inhibitor mithramycin A inhibited GM-CSF-induced Aldh1a2 expression in Flt3L-generated BM-DCs. Sp1 and the RAR /RXR complex bound to GC-rich Sp1-binding sites and an RARE half-site, respectively, near the TATA box in the mouse Aldh1a2 promoter. The DNA sequences around these sites were highly conserved among different species. In the presence of RA, ectopic expression of RAR /RXR and Sp1 synergistically enhanced Aldh1a2 promoter-reporter activity. These results suggest that GM-CSF/RA-induced RALDH2 expression in DCs requires cooperative binding of Sp1 and the RAR/RXR complex to the Aldh1a2 promoter.

研究分野：免疫学 生化学 分子生物学

キーワード：腸管免疫 レチノイン酸 GM-CSF Sp1 RAR DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

様々なアレルギーや炎症性腸疾患などの発症には腸管免疫系の機能の恒常性の破綻が主な要因として挙げられており、その分子メカニズムの解明こそがこれらの疾患の効果的な予防や治療に重要であると注目されている。その中で、近年、ビタミン A の代謝物であるレチノイン酸が腸管における免疫細胞の機能制御に極めて重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。我々のグループは、腸関連二次リンパ系器官に存在する樹状細胞 (dendritic cells: DC) にはビタミン A からレチノイン酸を産生する能力を持つものが存在し、レチノイン酸の存在下で T 細胞を活性化すると、小腸へのホーミングに必要な受容体が発現誘導されることを世界に先駆けて発見し (Iwata M. et al. *Immunity* 21:527, 2004) 最近、その中でもレチノイン酸依存性の高い CCR9 ケモカイン受容体の発現誘導の分子機構を解明した (Ohoka Y. et al. *J.Immunol.* 186: 733, 2011) さらにレチノイン酸は、食物などに対する免疫反応の抑制 (免疫寛容) に関与する転写因子 Foxp3<sup>+</sup> 誘導型制御性 T 細胞 (iTreg) の分化誘導を促進し、炎症性腸疾患発症に関与する炎症誘導性ヘルパー T 細胞 Th17 の分化誘導を抑制することが、近年、相次いで報告された (Science 317:256, 2007, *J. Exp. Med.* (review) 204: 1737, 2007) 。従って、T 細胞に様々な機能を賦与することができる腸の DC におけるレチノイン酸産生の調節は、腸管免疫系の機能の恒常性維持に非常に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、これらの DC におけるレチノイン酸の産生が、生理的にどのような分子メカニズムで制御されているかについてはほとんど不明なままであった。

## 2. 研究の目的

腸管免疫系の恒常性維持にはビタミン A の代謝物であるレチノイン酸が極めて重要

な役割を果たしている。我々は腸の組織に存在する樹状細胞 (DC) の一部にビタミン A からレチノイン酸を産生する酵素 Retinal dehydrogenase 2 (RALDH2) を発現する特異的なサブセットが存在し、レチノイン酸を介して T 細胞を小腸組織に特異的に配備させる能力を持つことを見出した。この DC における RALDH2 の発現には顆粒球マクロファージ分化因子 (GM-CSF) が重要な働きをしていることから、本研究では、この特異的な DC サブセットにおいて GM-CSF が誘導する RALDH2 遺伝子発現の分子制御機構を解明し、腸管免疫系におけるレチノイン酸産生機能と免疫疾患との相関関係を明らかにすることによって、創薬をはじめ治療や診断に役立つ新たな分子基盤を構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

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 を主なモデル系として以下の実験を行った。

(1) 各種情報伝達系阻害剤を用い GM-CSF やレチノイン酸が誘導する RALDH2 遺伝子発現誘導に関与する転写因子を探索し、転写因子 Sp1 を同定した。また、同定した Sp1 が実際に RALDH2 遺伝子発現誘導に関与するかどうか明らかにするため、DNAP アッセイを用いた RALDH2 遺伝子のプロモーターへの結合、及び RALDH2 遺伝子のプロモーター領域を組み込んだレポーターベクターを作製し、その効果を検証した。

(2) 転写因子結合領域解析ソフトを用いて RALDH2 遺伝子プロモーター上流部を探索し RARE ハーフサイトが存在する可能性を見出し、実際に RAR $\alpha$  および RXR $\alpha$  がこれらのサイトに結合し、RALDH2 遺伝子のプロモーター活性をレチノイン酸依存的に亢進するこ

とを明らかにした。また、上記の Sp1 と RAR $\alpha$  および RXR $\alpha$  が協調的に RALDH2 遺伝子のプロモーター活性を亢進することを、DNAP アッセイおよび RALDH2 遺伝子のプロモーターアッセイで明らかにした。また、この作用をクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を用いて、実際に BM-DC で生じていることを確認した。

(3) RALDH2 遺伝子上流をコンピューター解析にかけた結果、DNA メチル化制御を受けることが知られる CpG アイランドが RALDH2 遺伝子のプロモーター領域と重複していたため、RALDH2 遺伝子の発現に DNA メチル化が関与している可能性を考慮し、BM-DC および通常 DC、T 細胞、マクロファージ、RAW264.7 細胞株などの RALDH2 遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドの DNA メチル化の状態をバイサルファイトシーケンス法を用いて明らかにした。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究課題において、マウス骨髄細胞から分化誘導した樹状細胞におけるレチノイン酸産生酵素 RALDH2 遺伝子の発現が GM-CSF により誘導され、その誘導がレチノイン酸自身により増強されることを見出し、マウス RALDH2 遺伝子の DNA 配列を解析した結果、プロモーター領域近傍に CpG に富む CpG アイランドと、その CpG アイランド中に RA 応答配列 (Retinoic acid responding element : RARE) ハーフサイトが存在することを見出した。(図 1)

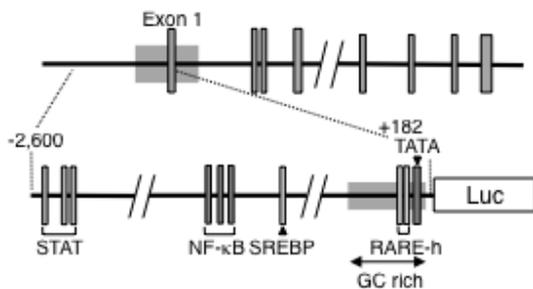


図 1 RALDH2 遺伝子のプロモーター近傍の

#### GC-rich 領域と RARE ハーフサイト

(2) この CpG 配列には転写因子 Sp1 が結合し、RALDH2 遺伝子の転写活性を促進した。また、RAR アンタゴニスト LE540 や Sp1 の阻害剤である Mithramycin A は樹状細胞における RALDH2 の発現を顕著に阻害した。一方、RARE ハーフサイトは、ヒト、マウスをはじめ広く種を超えて保存されており、実際、この RARE ハーフサイトに RA 受容体 (RAR) /レチノイド X 受容体 (RXR) が結合すると、RA 存在下、転写因子 Sp1 と協調して RALDH2 遺伝子の転写を活性化することを明らかにした。(図 2)

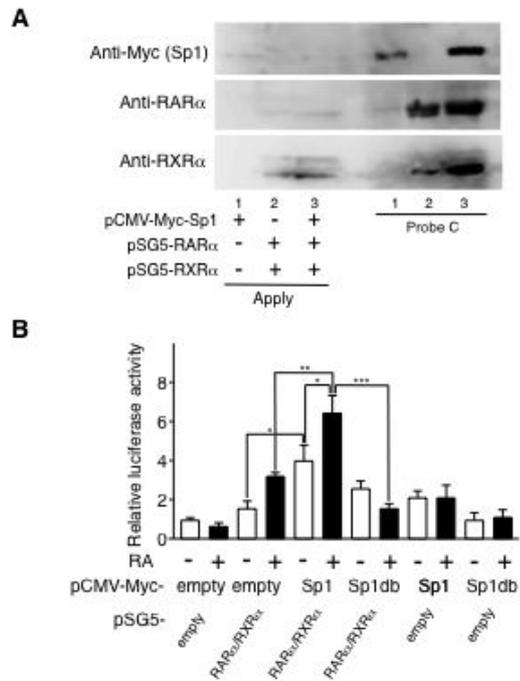


図 2 A. RALDH2 プロモーター領域への Sp1、RAR $\alpha$  および RXR $\alpha$  の結合 B. Sp1 と RAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  による RALDH2 遺伝子転写活性の亢進

(3) また、RALDH2 遺伝子プロモーター近傍の CpG アイランドは、RAW264.7 細胞株では高度にメチル化されていたが、BM-DC および通常 DC、T 細胞、マクロファージではすべてメチル化されていないことが明らかになった。

## 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3件)

Ohoka Y, Yokota-Nakatsuma A, Maeda N, Takeuchi H, Iwata M. Retinoic acid and GM-CSF coordinately induce retinal dehydrogenase 2 (RALDH2) expression through cooperation between the RAR/RXR complex and Sp1 in dendritic cells. **PLoS One.** 9 (5): e96512. (2014)

Yokota-Nakatsuma A, Takeuchi H, Ohoka Y, Kato C, Song SY, Hoshino T, Yagita H, Ohteki T, Iwata M. Retinoic acid prevents mesenteric lymph node dendritic cells from inducing IL-13-producing inflammatory Th2 cells. **Mucosal Immunol.** 7(4): 786-801. (2014)

Takeuchi H, Yokota-Nakatsuma A, Ohoka Y, Kagechika H, Kato C, Song SY, Iwata M. Retinoid X receptor agonists modulate Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell and Th17 cells differentiation with differential dependence on retinoic acid receptor activation. **J Immunol.** 191(7): 3725-33. (2013)

[学会発表](計4件)

大岡 嘉治、横田-中妻 彩、竹内 一、岩田 誠 Cooperation between the Sp1 and RAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  complex is involved in the regulation of RALDH2 expression in dendritic cells. 第87回日本生化学会大会 (国立京都国際会館(京都市)、10月15日~18日、2014年度)

大岡 嘉治、横田-中妻 彩、竹内 一、岩田 誠  
樹状細胞におけるレチノイン酸合成酵素

## RALDH2の遺伝子発現誘導機構の解析

四国免疫フォーラム(徳島大学医学部(徳島市)、6月21日、2014年度)

大岡 嘉治、横田-中妻 彩、竹内 一、岩田 誠 Involvement of the transcription factors Sp1, RAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ , and c-Rel in the regulation of RALDH2 expression in dendritic cells

第42回日本免疫学会学術総会(幕張メッセ(千葉市)、12月11日~13日、2013年度)

大岡 嘉治、横田-中妻 彩、竹内 一、岩田 誠 DNA methylation of a CpG island and SP1 binding regulate murine RALDH2 gene expression. 第41回日本免疫学会学術総会(神戸国際展示場(神戸市)、12月5日~7日、2012年度)

[図書](計 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 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 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
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>  
|

## 6. 研究組織 (1)研究代表者

大岡 嘉治(OHOKA, Yoshiharu)

徳島文理大学・香川薬学部・准教授  
研究者番号：60303971

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

中妻 彩 (Yokota-Nakatsuma Aya)  
徳島文理大学・香川薬学部・助教  
研究者番号：30446075