

概日リズムとアレルギー性疾患発症機構のクロストーク

自治医科大学大学院 医学研究科 生化学講座 病態生化学部門

柏田 正樹

1. はじめに

日本人の2~3人に1人は何らかのアレルギー疾患に罹患していると言われ、大きな社会問題となっている。喘息や鼻炎などのアレルギー性疾患を含む多くの疾患は、経験的に早朝に発症、憎悪しやすいという、明らかな時間特異性があることが知られている。しかし、なぜこのような時間特異性があるのかは未だ不明である。時間特異的な疾患の発症には体内時計の関与があると思われるが、時計遺伝子が疾患の発症や憎悪に関わる遺伝子の発現制御に直接関与していることを示す研究はほとんどない。これまで申請者らは、時計遺伝子の一つ NFIL3 の遺伝子欠損 (KO) マウスを作成し、以下のような点を明らかにしてきた。IL-4 により誘導される IgE 定常部領域の転写 (germline transcription) を直接制御し、IgE クラススイッチを制御する (1)。Th2 細胞に強く発現し、IL-13 遺伝子の転写を直接負に制御する。また JunB を含む AP1 を介して間接的に IL-4 遺伝子の転写を正に制御する (2)。クロスプレゼンテーションを担う CD8 α 樹状細胞の分化を制御する (3)。腸管マクロファージにおいて炎症性サイトカインの一つ IL-12 遺伝子の転写を直接制御し、ヒトとマウスの大腸炎発症に関与している (4, 5)。概日リズムの制御下で ROR γ t の転写を制御することにより、炎症性細胞 Th17 の分化を制御する (6)。これらの知見は、時計遺伝子 NFIL3 が広く免疫反応の制御に関わっていることを示唆しており、アレルギー発症においても NFIL3 をはじめとする時計遺伝子が、その発症メカニズムに関与している可能性がある。特に IL-13 はアレルギー発症において中心的な役割を果たすサイトカインであることから、NFIL3 が IL-13 の発現制御を介してアレルギー反応を制御している可能性があり、さらに興味深いことに、NFIL3 発現の日内変動と喘息発症の時間特異性には強い相関が見られる。そこで本研究では、「NFIL3 は時計遺伝子として、IL-13 遺伝子の発現を制御し、時間特異的に炎症反応を制御する」という仮説を立てて、これを検証する。

2. 方法

NFIL3は、Th2細胞においてIL-13遺伝子の発現を抑制的に制御することから、NFIL3がエピジェネティックな制御に関与している可能性がある。転写因子による標的遺伝子の転写抑制には、エピジェネティックな制御が重要で、特にヒストン修飾酵素 (HDAC や G9a など) などの転写補因子との協調作用が中心的な役割を果たす。本研究ではヒストン修飾酵素とNFIL3との相互作用と、その転写への影響を調べる。具体的には、NFIL3 KOマウスと野生型 (WT) マウスのTh2細胞、あるいはTh2細胞株D10. G4. 1をモデルとして、各種ヒストン修飾を検出する抗体によるChIPアッセイにより、ヒストンの修飾状態を調べる。また各種ヒストン修飾酵素阻害剤を用いて、それぞれのヒストン修飾酵素のIL-13遺伝子転写への関与をRT-qPCR法で調べる。さらにNFIL3の発現が、IL-13遺伝子発現活性化に必須のGATA-3へ影響 (発現量や修飾状態など) を与えるかどうかについても、293細胞などを用いて調べる (IP, Western Blotなど)。

3. 結果

(1) NFIL3はIL-13遺伝子座においてヒストン修飾に関与する。

まずWTとNFIL3 KOマウスの脾臓naïve CD4⁺ T細胞よりTh2細胞を誘導し、ChIPアッセイによりそれぞれの細胞におけるヒストン修飾状態について調べた。転写の活性化の指標であるヒストンH3のアセチル化 (Lys9) については、IL-13遺伝子座 (プロモーター領域、エンハンサー領域、イントロン) において、NFIL3 KOマウスのTh2細胞で高かった。また同様に転写活性化の指標であるヒストンH3のジ、トリメチル化 (Lys4) についても、調べたIL-13遺伝子座すべての領域において、NFIL3 KOマウスのTh2細胞で高かった。さらに転写抑制の指標であるヒストンH3のジメチル化 (Lys9) については、すべての領域において有意差は見られないものの、NFIL3 KOマウスのTh2細胞で低い傾向にあった。

またD10. G4. 1細胞において、PMA/Ionomycin刺激によるIL-13遺伝子発現に対するヒストン

脱アセチル化酵素 (HDACs) の阻害剤の効果を調べると、HDAC阻害剤Trichostatin A (TSA) により有意にIL-13遺伝子の発現量の増加が見られた。しかし、Lys9のジメチル化阻害剤 (BIX01294) の効果を調べたが、多少転写量の増加が見られる程度であった。以上の結果から、NFIL3はIL-13遺伝子の発現制御において、ヒストン修飾を介する転写調節 (エピジェネティック制御) に関与することが示唆された。

- (2) NFIL3はクラスI HDACと複合体を形成する。

次に、NFIL3によるヒストンアセチル化の抑制の機構として、直接HDACとの結合を介するかどうか調べるために、293細胞にNFIL3とクラスI HDACs (HDAC1, HDAC2) を共発現させ、免疫沈降法とウェスタンブロット法により調べた。NFIL3はHDAC1と非常に強く共沈降し、またHDAC2ともHDAC1と比べると弱い、明らかな共沈降が認められた。従ってNFIL3はHDACをIL-13遺伝子座にリクルートすることによって、ヒストンの脱アセチル化を誘導し、転写を抑制している可能性が考えられる。

- (3) NFIL3はGATA-3の不安定化を誘導する。

NFIL3はIL-13遺伝子のエンハンサー領域 (CGRE領域) に結合する。またNFIL3の結合部位に隣接してGATA-3の結合部位が存在する。従ってNFIL3が直接GATA-3の転写活性化を抑制している可能性がある。そこでNFIL3とGATA-3の共沈降を293細胞にて検討したが、共沈降は認められなかった。しかしNFIL3の発現により、GATA-3の発現量の低下が、NFIL3の発現量依存的に認められた。またプロテアソーム阻害剤であるMG-132の処理により、GATA-3の発現量の回復が見られたことから、NFIL3がユビキチンリガーゼなどをリクルートし、GATA-3の分解を誘導している可能性が示唆される。

4. 考察

本研究において、概日時計遺伝子NFIL3が、アレルギー発症に関わるサイトカインIL-13遺伝子の発現に対して、ヒストン修飾酵素のリクルートによるエピジェネティックなメカニズムでその発現制御を行っていることを示した。またNFIL3はユビキチン化などのプロテアソーム依存的な分解系を介して、GATA-3を介したIL-13遺伝子の転写活性化を抑制している可能性を示した。現在さらに解析中であるが、ヒストンメチル化酵素を介する転写制御に対し、NFIL3が直接関与している可能性もある。*in vitro*系において、ステロイド刺激による細胞周期の同調によって、NFIL3の発現が概日リズムを示すが、HDACなどのヒストン修飾酵素の発現やリクルートにも概日リズムを示すものがある。従って、*in vitro*系でIL-13遺伝子などの発現と、NFIL3やヒストン修飾酵素の活性のリズムとの関係を今後示す必要がある。*in vivo*系でも、免疫感作の時間帯や細胞採取の時間を考慮した検討も必要である。さらにNFIL3とHDACなどの結合部位を同定することにより、NFIL3を介したエピジェネティックな発現制御をコントロールできる低分子化合物の同定、開発を目指す。従って本研究は、時間医学の観点からアレルギー発症の分子メカニズムの解析を行うという、これまでにない切り口で研究を展開する萌芽的研究であり、さらなる研究の展開が期待される。

5. 参考論文

- (1) Kashiwada et al., IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107, 821-826
- (2) Kashiwada et al., NFIL3/E4BP4 controls type 2 T helper cell cytokine expression. *EMBO J.* 2011; 30: 2071-2082
- (3) Kashiwada et al., NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8 α ⁺ dendritic cell development. *Blood* 2011; 117, 6193-6197
- (4) Kobayashi et al., NFIL3 is a regulator of IL-12 p40 in macrophages and mucosal immunity. *J. Immunol.* 2011; 186, 4649-4655
- (5) Kobayashi et al., NFIL3-deficient mice develop microbiota-dependent, IL-12/23-driven spontaneous colitis. *J. Immunol.*, 192, 1918-1927 (2014)
- (6) Yu et al., TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science*, 342, 727-730 (2013)