

## SUMMARY :

### REVIEW

#### AhR's key role in the intestinal microbiota and immunity

### PRODUCTS

#### AhR Agonists

- ITE
- L-Kynurenine
- FICZ

#### AhR Inhibitor

- CH-223191

#### AhR Reporter Cell Lines

- HT29-Lucia™ AhR cells
- HepG2-Lucia™ AhR cells

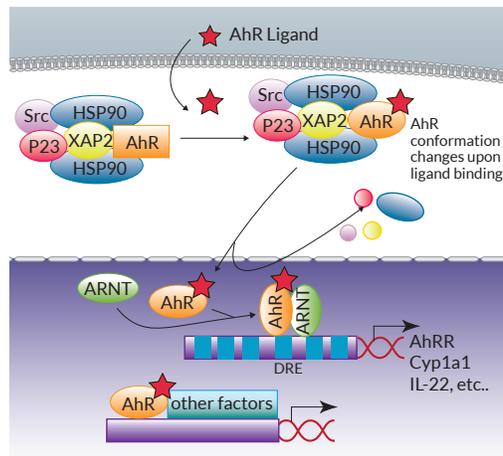
#### Gut Microbiota-Related Cell Lines

#### QUANTI-Blue™ Solution

# AhR's key role in the intestinal microbiota and immunity

アリール炭化水素受容体(AhR)は、バリア組織の免疫細胞、上皮細胞、内皮細胞、間質細胞等で広範に発現されるリガンド依存性転写因子です<sup>1</sup>。AhRは、歴史的にはダイオキシンなどの化学汚染物質という位置づけの中で研究されてきましたが、最近の研究では、宿主と腸内細菌叢との腸管恒常性を維持するといった、より広範な環境因子の中心的センサーとしての役割が、明らかになりました<sup>1</sup>。

AhRの標準的なシグナル伝達については広くレビューされていますが<sup>1</sup>、簡単に説明しますと、細胞膜を通過するリガンドが存在しない場合、AhRはHsp90: XAP2: p23: Src シャペロン・タンパク質複合体として、細胞質に存在しています。AhRがリガンドと結合すると、その複合体が構造変化し、AhRは核内に移行します。AhR以外のタンパク質複合体は細胞質に留まり、AhRタンパク質は核内移行後にAhR核輸送体(ARNT)とヘテロ二量体を構成します。AhR:リガンド:ARNT三量体は、①シトクロムP450依存性モノオキシゲナーゼCyp1a1、②AhR転写抑制因子(AhRR)、③IL-22インターロイキンなどのAhR標的遺伝子の上流調節領域内にあるダイオキシン応答配列(DRE)に結合します。特筆すべきことに、他の転写因子(例えばNF-κB)を介したゲノムレベル、あるいは非ゲノムレベル(例えばSrcキナーゼの放出)での非標準的なAhRシグナル伝達経路も報告されています<sup>2,3</sup>。

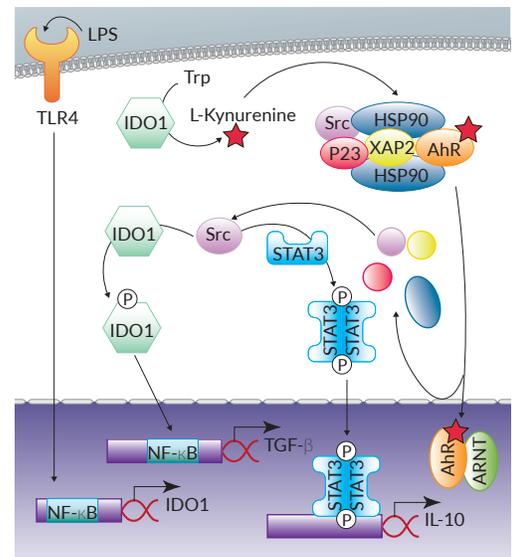


2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシン(TCDD)といった生体異物由来のAhRアゴニストの他に、様々な食物由来のAhRリガンドが同定されており、それらの多くはトリプトファン(Trp)アミノ酸代謝の副産物です<sup>4</sup>。AhRは、宿主腸内環境の共生調節因子として注目され始めています。食物由来のリガンドによるAhR活性化が腸内細菌の構成成分を変化させる一方で<sup>5</sup>、AhRセンシングは腸内の免疫細胞の恒常性と機能性を調節します<sup>6</sup>。

腸内細菌叢によるTrp代謝はAhRアゴニストを生成し、このAhRアゴニストにより、IL-17およびIL-22を産生する獲得性CD4T細胞(Th17/22)の先天性的カウンターパートである、腸内3型自然リンパ球(ILC3)の分化・維持を促します。また、AhRシグナル伝達はIL-22を産生する上皮内リンパ球(IEL)の維持にも関わっています。IL-22は、

腸管上皮細胞(IEC)による抗菌ペプチド(AMP)の産生および粘膜の創傷治癒に関与しています<sup>6</sup>。腸内のAhR-IL-22経路は、微生物の病原体に対する宿主防御において重要な役割を果たすと同時に、有害な影響を抑制するための耐病性に関与しています。この点について、AhR活性化の強度がCD4T細胞の応答を調節するというエビデンスが数多く出てきています。AhR活性が弱ければ炎症誘発性応答(Th17/22)が起こり、AhR活性が強ければ免疫寛容原性DCおよび制御性T細胞(Treg)の誘導が促進されます<sup>6-8</sup>。

AhRが炎症誘発性応答と寛容性応答の両者の調節にどのように関与しているかについては、種々のデータによってその機構を説明できるかもしれませんが、腸管免疫細胞での古典的なAhRシグナル伝達はIL-22産生をもたらしますが、非ゲノムレベルのAhRシグナル伝達は、少なくとも2つの抑制性を示します。マウスでのリポポリサッカライド(LPS)に対する過剰応答は、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼIDO1をリン酸化するAhR関連Srcキナーゼを介して抑制されます。具体的には、DCにおいて、IDO1は抑制性サイトカインTGF-β(トランスフォーミング増殖因子)のNF-κBの転写を誘導します<sup>9</sup>。さらに、IDO1によるTrp分解は、Treg産生に関与するL-キヌレニンなどのAhRアゴニストを産生します<sup>9</sup>。LPS誘発によるもう一つの抑制効果は、マクロファージにおけるAhR関連SrcキナーゼおよびSTAT3シグナル伝達を介した抗炎症性サイトカインIL-10の産生です。なお、TLR4によるLPS認識はマクロファージでのAhR発現を促進しますが、他のPRR(パターン認識受容体)リガンドによる刺激によっても同様のことが起こるかは分かっていません<sup>10</sup>。



腸疾患は腸内細菌叢免疫細胞の腸内毒素症と関連があり、腸内の不均衡が原因なのか結果であるのかは、まだ分かっていません。炎症性腸疾患では、腸内細菌叢由来のAhRリガンド濃度が低下することによって、免疫細胞の発現レベルの低下とAhR活性の抑制が起こる傾向にあります<sup>2,11</sup>。結腸直腸癌患者では、腫瘍微小環境において、腸内細菌叢の変化、AhRの発現増加、慢性的なIDO1活性化、およびTrp濃度の低下が起

こり、免疫応答が抑制されます<sup>11</sup>。対照的に、腸管の症状を伴う脊椎関節炎患者では、腸内微生物叢の多様性の低下および Trp の異化作用を示し、炎症の症状を引き起こします<sup>11</sup>。また、食物由来の Trp からの微生物性代謝物の濃度低下は、多発性硬化症の病態形成に関係しています<sup>3</sup>。したがって、AhR は、腸内だけでなく腸内以外においても、腸内細菌叢や宿主恒常性に重要な役割を果たしているのです。AhR 経路の調節は、魅力的な治療となりえます。とはいえ、AhR を標的とした薬物の最適化と適用には、リガンドの用量 / 供給源を変えながら、様々な細胞環境での AhR 分子シグナル伝達について、より深く理解することが必要です。

1. Stockinger B. et al., 2014. The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 32:403-32. 2. Lamas B. et al., 2018. Aryl hydrocarbon receptor

and intestinal immunity. *Mucosal Immunol.* 11(4):1024-38. 3. Gutiérrez-Vasquez C. et al., 2018. Regulation of the immune response by the aryl hydrocarbon receptor. *Immunity.* 48:19-33. 4. Hubbard T.D. et al., 2015. Indole and tryptophan metabolism: endogenous and dietary routes to Ah receptor activation. *Drug Metab. Dispos.* 43:1522-35. 5. Murray I.A. et al., 2016. Expression of the aryl hydrocarbon receptor contributes to the establishment of intestinal microbial community structure in mice. *Sci. Rep.* 6:33969. 6. Cervantes-Barragan L. & Colonna M., 2018. AHR signaling in the development and function of intestinal immune cells and beyond. *Semin. Immunopathol.* 40(4):371-77. 7. Ehrlich A.K. et al., 2018. TCDD, FICZ, and other high affinity AhR ligands dose-dependently determine the fate of CD4+ T cell differentiation. *Toxicol. Sci.* 161(2):310-20. 8. Boule L.A. et al., 2018. Aryl hydrocarbon receptor signaling modulates antiviral immune responses: ligand metabolism rather than chemical source is the stronger predictor of outcome. *Sci. Rep.* 8:1826. 9. Bessede A. et al., 2014. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature.* 511:184-90. 10. Zhu J. et al., 2018. Aryl hydrocarbon receptor promotes IL-10 expression in inflammatory macrophages through Src-STAT3 signaling pathway. *Front. Immunol.* 9:2033. 11. Gao J. et al., 2018. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:13.

## AhR Ligands

AhR は構造的に異なる様々な外因性・内因性分子を感知できます。AhR アゴニストは、汚染物質などの生体異物から生じ、胃や腸のほか、光酸化または酸化ストレス下にある他の器官で変換されたインドール代謝物から生じることが分かっています。InvivoGen 社は、お客様の研究のニーズに応えるため、食物由来の AhR リガンドおよび合成 AhR アンタゴニストを幅広く提供しています。

❖ **高品質**：純度 >95%、ろ過滅菌済み、バクテリア汚染がないことを確認済み

❖ **機能試験済み**：HepG2-Lucia™ AhR および HT29-Lucia™ AhR 細胞(次ページ参照)

## AhR Agonists NEW

AhR リガンドはその構造が多様で、それらの結合親和性はマウスとヒトの AhR 間で顕著に異なることがあります<sup>1</sup>。高親和性 AhR アゴニストである生体異物性 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシン (TCDD) は、ヒト AhR と比較してマウス AhR に対し 10 倍の高親和性を示します。対照的に、食物由来のインドール代謝物は、(おそらく進化の結果と考えられるが)、ヒト AhR に対してより優れた親和性を示します<sup>1,2</sup>。

● **ITE** (2-(1'H-インドール-3'-カルボニル)-チアゾール-4-カルボン酸メチルエステル) は、インドールベースの AhR リガンドであり、グルコブラシシン(アブラナ科の野菜で検出される代謝物)の胃での変換、またはトリプトファンとシステインという 2 つのアミノ酸間の縮合反応により生成されると考えられています<sup>1,3</sup>。

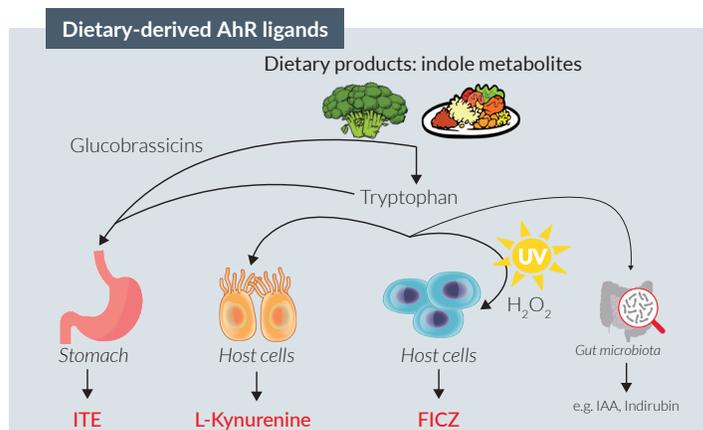
● **L-Kynurenine** は、L-キヌレニン製剤の化合物であり、宿主細胞内でのキヌレニン経路を介したトリプトファン代謝(トリプトファン代謝の 90% 以上を占める)の際に生成されます<sup>2,3</sup>。

● **FICZ** (6-formylindolol[3,2-b]carbazole) は、UV 依存性の光酸化または H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を介した酸化ストレスによるトリプトファン変換によって生じる、非常に強力な AhR リガンドです<sup>2,3</sup>。

## AhR Inhibitor

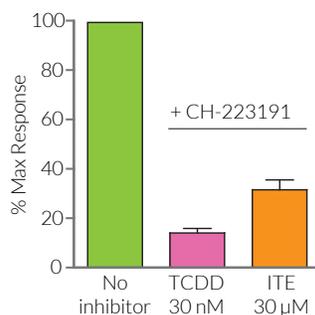
● **CH-223191** - AhR antagonist NEW

CH-223191 (2-メチル-2H-ピラゾール-3-カルボン酸) は、TCDD の競合的リガンドとして最初に発見された AhR の合成アンタゴニストです<sup>1</sup>。興味深いことに、CH-223191 はリガンド選択的な拮抗作用を及ぼし、FICZ などの多環芳香族炭化水素や、ITE などの非ハロゲン化芳香族炭化水素よりも、TCDD といったハロゲン化芳香族炭化水素に対してより有効だと考えられています<sup>2</sup>。



1. Lamas B. et al., 2018. Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. *Mucosal Immunol.* 11(4):1024-38. 2. Murray I.A. et al., 2017. Ligand activation of the Ah receptor contributes to gastrointestinal homeostasis. *Curr. Opin. Toxicol.* 2:15-23. 3. Hubbard T.D. et al., 2015. Indole and tryptophan metabolism: endogenous and dietary routes to Ah receptor activation. *Drug Metab. Dispos.* 43:1522-35.

[www.invivogen.com/AhR-ligands](http://www.invivogen.com/AhR-ligands)



**Inhibitor of AhR activity by CH-223191 in HepG2-Lucia™ AhR cells:** Cells were stimulated with 30 nM TCDD or 30 μM ITE in the presence of 10 μM CH-223191. After overnight incubation, the AhR response was assessed by determining Lucia luciferase activity in the supernatant using QUANTI-Luc™. Percentages of the maximal response for the ligand with no inhibitor are shown.

1. Kim, S.H. et al., 2006. Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Pharmacol.* 69:1871-78. 2. Zhao B. et al., 2010. CH223191 is a ligand-selective antagonist of the Ah (Dioxin) receptor. *Toxicol. Sci.* 117:393-403.

[www.invivogen.com/AhR-inhibitors](http://www.invivogen.com/AhR-inhibitors)

# Aryl Hydrocarbon Receptor Reporter Cells

InvivoGen 社は、ヒト HT29 結腸腺癌および HepG2 肝癌を遺伝子改変した 2 つの AhR レポーター細胞株を販売しています。HT29-Lucia™ AhR 細胞および HepG2-Lucia™ AhR 細胞を使用することで、生体異物由来や食物由来のインドール生成物といった様々なアゴニストと一緒に培養することにより、AhR の活性を調べることができます。InvivoGen 社の AhR レポーター細胞はヒト由来であり、内在性のヒト AhR を発現するため、ヒトサンプル中の内在性 AhR アゴニストのスクリーニングに非常に適しています。

- HT29-Lucia™ AhR Cells **NEW**
- HepG2-Lucia™ AhR Cells **NEW**

HT29-Lucia™ AhR 細胞および HepG2-Lucia™ AhR 細胞は、ヒト Cyp1a1 誘導性の Lucia ルシフェラーゼ活性を測定することによって、AhR の活性を調べることができます。ミクロソーム・シトクロム P450 依存性モノオキシゲナーゼ Cyp1a1 遺伝子は、重要な AhR 標的遺伝子です。両者の細胞株において、Lucia ルシフェラーゼレポーター遺伝子は、ヒト Cyp1a1 の調節性塩基配列による制御を受けます。リガンドと結合すると、細胞質の AhR は構造変化を起こして核に移行し、ARNT と結合して、Cyp1a1 調節性塩基配列中のダイオキシン応答配列 (DRE) と結合します。AhR の活性化は、QUANTI-Luc™ を使用して細胞培養上清中の分泌性 Lucia ルシフェラーゼ活性を測定することで、簡単に評価できます。HT29-Lucia™ AhR 細胞および HepG2-Lucia™ AhR 細胞は Zeocin™ に耐性を示します。両細胞株は、TCDD、FICZ、ITE、および L-Kynurenine (L-キヌレニン製剤) に対する機能性を検査済みです。

## HT29-Lucia™ AhR Cells

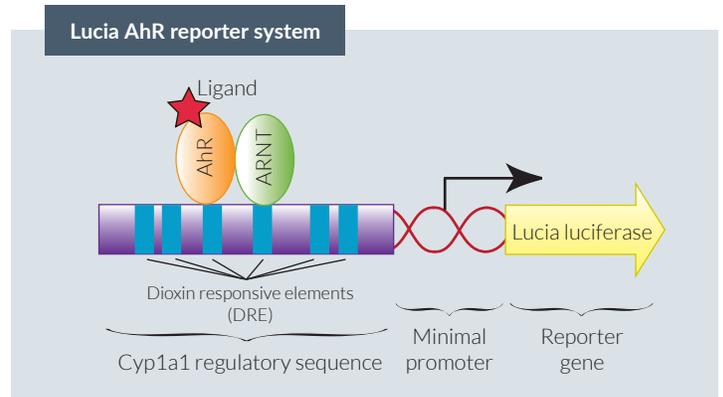
❖ 腸内細菌叢由来リガンドのスクリーニングに最適

InvivoGen 社では、ヒト HT29 結腸腺癌細胞株由来の初の AhR レポーター細胞株を販売しています。HT29-Lucia™ AhR 細胞は複数の利点があります。まず、その解剖学的由来に加え、腸管上皮細胞様細胞と粘液産生細胞への分化能があることから、AhR に対する腸管細菌叢関連リガンドの研究に最適です。AhR アゴニストの ITE、FICZ、および L-Kynurenine は、それぞれ最適濃度 30 μM、18 μM、および 150 μM で有意な Lucia ルシフェラーゼレポーター活性を示します。HT29-Lucia™ AhR 細胞では、その他の PRR (パターン認識受容体) リガンドによって Lucia ルシフェラーゼが発現することはありません。

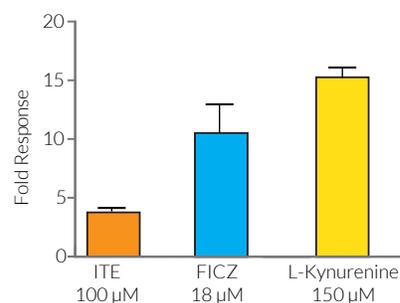
## HepG2-Lucia™ AhR Cells

❖ 生体異物性 AhR リガンドのスクリーニングに最適

HepG2-Lucia™ AhR 細胞は、内在性 AhR を発現するヒト HepG2 肝細胞癌細胞株に由来し、食品または環境サンプル中の AhR リガンドの検出 / スクリーニングに非常に有用です。InvivoGen 社の HepG2-Lucia™ AhR 細胞レポーターアッセイは、わずか 0.02 ~ 2 μM の低濃度の AhR リガンドを高感度で検出できます。HepG2-Lucia™ AhR 細胞は、ITE、FICZ、L-Kynurenine などの AhR アゴニストに特異的に反応します。また、これらの細胞では、その他の PRR (パターン認識受容体) リガンドによる Lucia ルシフェラーゼの誘導が起こりません。さらに、InvivoGen 社の AhR アゴニストは、インターフェロン調節因子の活性化、そして NF-κB 転写因子の活性化を示しません (HepG2-Dual™ 細胞で試験済み)。

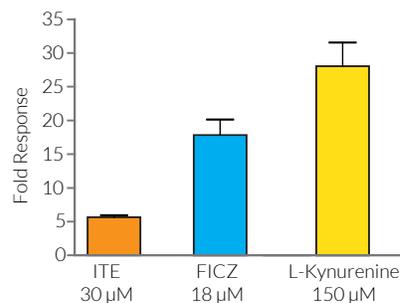


## HT29-Lucia™ AhR Cells



**Induction of AhR activity by tryptophan byproducts in HT29-Lucia™ AhR cells:** cells were incubated with 100 μM ITE, 18 μM FICZ, or 150 μM L-Kynurenine. After overnight incubation, the AhR activation was assessed by determining Lucia luciferase activity in the supernatant using QUANTI-Luc™. Data are expressed as fold responses as compared to non-induced cells.

## HepG2-Lucia™ AhR Cells



**Induction of AhR activity by tryptophan byproducts in HepG2-Lucia™ AhR cells:** cells were incubated with 30 μM ITE, 18 μM FICZ, or 150 μM L-Kynurenine. After overnight incubation, the AhR activation was assessed by determining Lucia luciferase activity in the supernatant using QUANTI-Luc™. Data are expressed as fold responses as compared to non-induced cells.

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
HepG2-Lucia™ AhR cells	<b>NEW</b> 3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	hpgl-ahr
HT29-Lucia™ AhR cells	<b>NEW</b> 3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	ht2l-ahr
FICZ	<b>NEW</b> 1 mg	tlrl-ficz
ITE	<b>NEW</b> 10 mg	tlrl-ite
L-Kynurenine	<b>NEW</b> 10 mg	tlrl-kyn
CH-223191	<b>NEW</b> 10 mg	inh-ch22
Quanti-Luc™	2 pouches (2 x 25 ml)	rep-qlc1
Quanti-Luc™ Gold	1 pouch (25 ml)	rep-qlcg1
Zeocin™	5 x 1 ml	ant-zn-05



# Gut Microbiota-Related Cell Lines

パターン認識受容体 (PRR) による病原体の検出は、自然免疫応答を開始するのに極めて重要です。さらに、PRR は、多くの異なる共生細菌、真菌、およびウイルスによる腸粘膜での微生物叢の定着を可能にします。これらの微生物を認識する最も知られている微生物叢 PRR は、膜関連 Toll 様受容体 (TLR)、C 型レクチン受容体 (CLR)、および細胞内ヌクレオチド結合性オリゴマー化ドメイン (NOD) 様受容体 (NLR) です<sup>1,2</sup>。

- TLR Reporter Cells
- NOD1/2 Reporter Cells
- Dectin-1a/b Reporter Cells

InvivoGen 社は、お客様の研究ニーズに応えるため、ヒト由来およびマウス由来の PRR レポーター細胞株ならびにアゴニストを幅広く揃えています。HEK-Blue™ レポーター細胞株は、NF-κB 活性を測定することで、種々の PRR シグナル伝達経路を調査できるようにデザインされたヒト胎児由来腎臓細胞 (HEK293) の細胞株シリーズです。HEK-Blue™ 細胞は、トランスフェクションした標的 PRR 遺伝子を過剰発現します。さらに、これらの細胞は、5 カ所の NF-κB および AP-1 結合部位に融合した最小プロモーターの制御下で、分泌性胎盤アルカリホスファターゼ (SEAP) レポーター遺伝子を発現するように、トランスフェクションしています。ジアシル化およびトリアシル化リポタンパク質 (それぞれ TLR2/TLR6、TLR2/TLR1)、サイトソール・ペプチドグリカン (NOD1/2)、または β グルカン (Dectin-1a/b) といった PRR リガンドで刺激すると、NF-κB および AP-1 が活性化し、SEAP が産生されます。SEAP の発現レベルは、InvivoGen 社の QUANTI-Blue™ Solution によって簡単に測定できます。

PRODUCT		QUANTITY	CAT. CODE
HEK-Blue™ hTLR2		3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	hkb-htlr2
HEK-Blue™ hTLR2-TLR1	<b>NEW</b>	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	hkb-htlr21
HEK-Blue™ hTLR2-TLR6	<b>NEW</b>	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	hkb-htlr26
HEK-Blue™ hTLR3		3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	hkb-htlr3
HEK-Blue™ hTLR4		3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	hkb-htlr4
HEK-Blue™ hTLR5		3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	hkb-htlr5
HEK-Blue™ hTLR9		3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	hkb-htlr9
HEK-Blue™ hNOD1		3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	hkb-hnod1
HEK-Blue™ hNOD2		3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	hkb-hnod2
HEK-Blue™ hDectin-1a		3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	hkb-hdect1a
HEK-Blue™ hDectin-1b		3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	hkb-hdect1b

Please see our website for full lists of human and murine PRR reporter cell lines and their agonists.

1. Swiatczak, B. & Cohen, I.R. 2015. Gut feelings of safety: tolerance to the microbiota mediated by innate immune receptors. *Microbiol Immunol.* 59:573-585. 2. Mu, C. et al. 2015. Crosstalk between the immune receptors and gut microbiota. *Curr Protein Pept Sci.* 16:622-631.

 [www.invivogen.com/reporter-cells](http://www.invivogen.com/reporter-cells)

## QUANTI-Blue™ Solution NEW

### Liquid formulation for SEAP detection

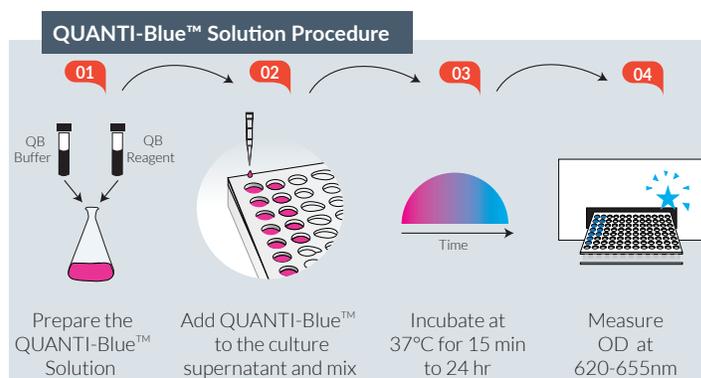
- ❖ 調製が簡単: 付属の 2 種類の試薬を混ぜるだけ
- ❖ 簡便性: 細胞培養に直接添加できます
- ❖ 高い適応性: ハイスループットスクリーニング (HTS) で使えます

InvivoGen 社が新しく発売した液体製剤の QUANTI-Blue™ は、分泌性胎盤アルカリホスファターゼ (SEAP) を高感度かつ迅速に検出でき、ピンク色から紫 / 青色への色の変化によって測定可能です。

QUANTI-Blue™ Solution は粉末製剤と同じ結果をもたらすうえ、より利便性に優れています。QUANTI-Blue™ Solution は 100 倍濃縮のため、お客様の様々なニーズに適応可能です。サンプルサイズに応じて、1 倍から最大 10 倍で使用できるよう最適化されています。さらに、培養プレートの細胞に直接添加できるため、HTS に最適です。

QUANTI-Blue™ Solution は、InvivoGen 社の幅広い SEAP レポーター細胞株シリーズと共に使用可能です。

PRODUCT		QUANTITY	CAT. CODE
QUANTI-Blue™ Solution	<b>NEW</b>	5 ml	rep-qbs
QUANTI-Blue™ Solution	<b>NEW</b>	Bulk	Please enquire



 [www.invivogen.com/quant-blue](http://www.invivogen.com/quant-blue)

**InvivoGen**

Europe Tel: +33 562 71 69 39  
USA Tel: +1 888 457 5873  
Asia Tel: +852 3622 3480

Fax: +33 562 71 69 30  
Fax: +1 858 457 5843  
Fax: +852 3622 3483

info.eu@invivogen.com  
info@invivogen.com  
info.hk@invivogen.com