

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08999

研究課題名(和文) サイトカインIL-7によるインスリン抵抗性改善の可能性の検討

研究課題名(英文) Cytokine IL-7-mediated amelioration of insulin resistance

研究代表者

谷一 靖江 (Tani-ichi, Shizue)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：50432331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：内臓脂肪にはTregが多く、脂肪組織の炎症を防ぐことでインスリン抵抗性を抑制している。サイトカインIL-7はT細胞の生存維持に必須のサイトカインであるが、過去の報告から、TregはIL-7受容体(IL-7R)の発現が低く、生存維持もIL-7非依存性であることが示唆されていた。本研究で、内臓脂肪のTregは例外的にIL-7R発現が高く、Treg特異的IL-7欠損マウスでは内臓脂肪のTregが減少することを見出した。これらの結果から、IL-7投与によって2型糖尿病が抑制されるメカニズムには、脂肪組織のTregが関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に、TregはIL-7Rの発現が低いT細胞集団であると考えられている。しかし、インスリン抵抗性の発症抑制を担う内臓脂肪のTregはIL-7Rの発現が高く、生存維持にIL-7Rシグナルを必要としていることを明らかにした。また、IL-7投与により肥満に伴う高血糖を抑制できることが過去に報告されていたものの、このメカニズムは不明であったが、Tregがこれに寄与している可能性が示唆された。これらの結果は、2型糖尿病の新規治療法としてIL-7によるTregの生存支持が有効である可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Tregs) are immune suppressive T cells. Tregs are enriched in visceral adipose tissue (VAT). VAT Tregs prevent insulin resistance by suppressing inflammation in VAT. IL-7 is a cytokine essential for survival of T cells. Reportedly, Tregs express IL-7 receptor (IL-7R) at low level and their survival is IL-7-independent. However, we found that VAT Tregs express IL-7R at high levels and mice lacking IL-7R specifically in Tregs have fewer VAT Tregs. These results suggest that IL-7R signaling in Tregs contributes to the suppression of type II diabetes by IL-7 injection.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞(Treg) 2型糖尿病

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サイトカイン インターロイキン 7 (Interleukin 7: **IL-7**)は胸腺や骨髄のストローマ細胞、末梢組織ではリンパ管内皮細胞などから産生され、T細胞の生存維持に必須のサイトカインである。

制御性 T 細胞 (regulatory T cells: **Tregs**)は、免疫反応を抑制する T 細胞である。Tregs 以外の T 細胞 (conventional T cells: Tconv)が免疫反応を促進するのに対し、Tregs は免疫反応を抑制する。Tconv は IL-7 受容体 (IL-7 receptor: **IL-7R**)を高レベルに発現しており、生存維持に IL-7 を必須とするのに対して、Tregs は IL-7R 発現が低く、生存維持に IL-2 を必須とする。

これまでに、複数のグループが、リコンビナント IL-7 や IL-7R ブロッキング抗体の投与によって、Treg に発現する IL-7R の機能を解析しているが、生理的条件下において、Treg に発現する IL-7R の機能を解析した論文はこれまでに 1 報しか存在しない。2015 年に報告された論文では、Treg 特異的に IL-7R を欠損するマウス由来の Treg は、異系間の皮膚移植を拒絶する T 細胞反応を抑制しにくいことが示されている (Schmaler M., et al., *PNAS*, 2015)。一方、ヒトの末梢血中の Treg は IL-7R の発現が低いほど抑制活性が強いことが報告されており、Treg の抑制活性に IL-7R シグナルが必要か否かは明確になっていない。

近年、血中を循環しない「組織局在型 Treg」の機能が次々と報告されており、免疫反応を抑制するのみならず、組織の修復を行っていることも明らかになってきている。組織局在型 Tregs の一つ、内臓脂肪局在型 Treg は炎症抑制能を持つサイトカイン IL-10 を多く産生しており、2型糖尿病の抑制に重要であることが知られている (Feuerer M., et al., *Nat. Med.*, 2009)。内臓脂肪の Treg が減少すると、内臓脂肪に局在するマクロファージが活性化し、マクロファージが産生する炎症性サイトカイン TNF- α が増加する。TNF- α は脂肪細胞に発現するインスリン受容体下流のシグナル伝達分子 IRS (Insulin receptor substrate) のリン酸化を抑制する。その結果、インスリンシグナル伝達が阻害され、脂肪細胞表面のグルコース輸送体 Glut4 (glucose transporter-4) の発現が上昇しないため、インスリンが分泌されるにも関わらず、血液中の糖が脂肪細胞内に取り込めず、血糖値が下がらない、すなわち、2型糖尿病が発症する。これらの内臓脂肪局在型 Tregs を含めた組織局在型 Treg における IL-7R の機能はこれまで全く解析されていない。

2. 研究の目的

2012 年に、高脂肪食を与えて肥満を誘導したマウスに IL-7 を皮下注射にて投与すると、糖尿病の発症が抑制されることが報告されているが (Lucas S., et al., *PLoS ONE*, 2012)、このメカニズムは明らかになっていない。本研究では、Treg 特異的に IL-7R を欠損するマウスを用いて、内臓脂肪局在型 Treg に発現する IL-7R が、IL-7 投与による 2型糖尿病抑制に関与しているのかを調べる。また同時に、Treg の IL-7R 欠損によって、内臓脂肪以外の組織局在型 Tregs への影響も解析する。

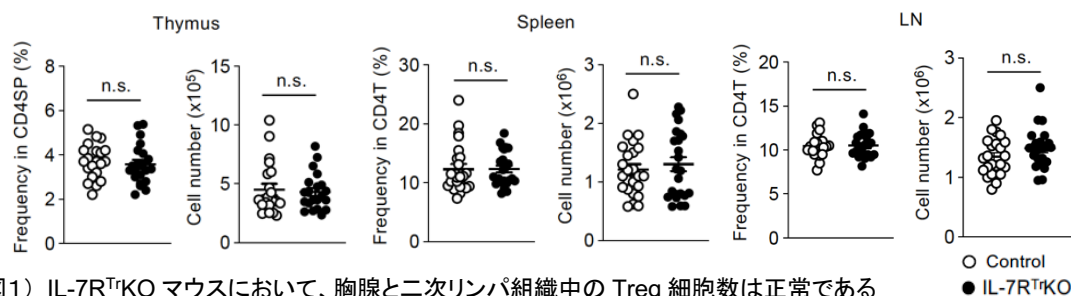
3. 研究の方法

我々のグループが過去に作製した IL-7R α -floxed マウス (Tani-ichi S., et al., *PNAS*, 2013) と、Treg 特異的に Cre を発現するマウス Foxp3-YFP-Cre ノックインマウス (Rubtsov, Y. P., et al., *Immunity*, 2008) を交配し、Treg 特異的に IL-7R を欠損するマウス (IL-7R^{Treg}KO マウス) を作製して、その表現型を観察した。

4. 研究成果

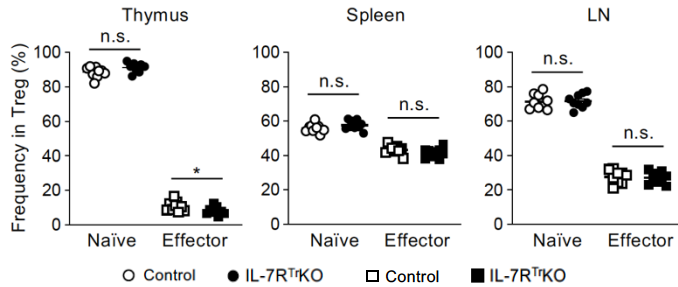
(1) Treg に発現する IL-7R は、Treg の胸腺内分化やリンパ組織での生存維持に不要である

まず、control マウス (Foxp3^{YFP-Cre}IL-7R^{+/+}) と IL-7R^{Treg}KO マウス (Foxp3^{YFP-Cre}IL-7R^{flx/flx}) における胸腺、脾臓、リンパ節の Treg の細胞数をフローサイトメトリーで解析した。胸腺、脾臓、リンパ節の Treg 細胞数は control マウスと IL-7R^{Treg}KO マウスで差がみとめられなかった (図 1)。



(図 1) IL-7R^{Treg}KO マウスにおいて、胸腺と二次リンパ組織中の Treg 細胞数は正常である

活性化したエフェクターTregは、ナイーブTregに比べてIL-7Rの発現が高いことが過去に報告されている(Simonetta F., et al., *Eur. J. Immunol.*, 2010)。そこで、controlマウスとIL-7R^{Tr}KOマウスのTregに占めるエフェクターTregとナイーブTregの割合を胸腺、脾臓、リンパ節で調べた。IL-7R^{Tr}KOマウスでは、胸腺でエフェクターTregの割合の若干の減少がみとめられたが、脾臓とリンパ節では全く変化がなかった(図2)。これらの結果から、Tregに発現するIL-7Rはナイーブ/エフェクターTregのいずれにおいても末梢二次リンパ組織での生存維持に影響を与えないことが明らかになった。

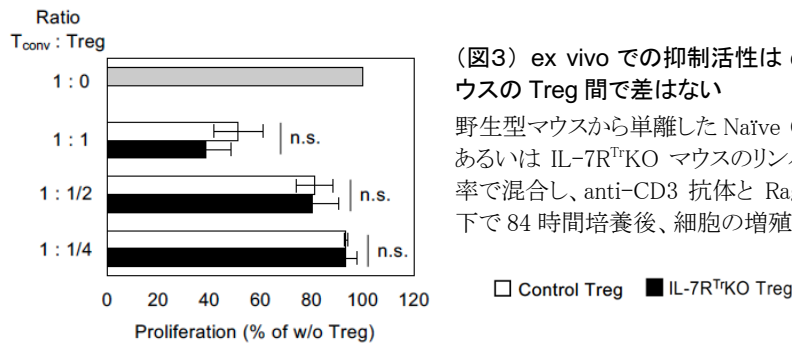


(図2) IL-7R^{Tr}KOマウスにおいて、二次リンパ組織中のTregのナイーブ/エフェクター比は正常である

各リンパ組織のTregに占めるナイーブ(CCR7^{high}CD44^{low})とエフェクター(CCR7^{low}CD44^{high})の比率をフローサイトメトリーで解析した。

(2) Tregの抑制活性にIL-7Rシグナルは不要である

① IL-7RシグナルがTregの抑制活性に与える影響を調べるため、ex vivoでsuppression assayを行った。controlマウスのTregとIL-7R^{Tr}KOマウスのTregは、TCR刺激によるT細胞の増殖を同様に抑制することができた(図3)。

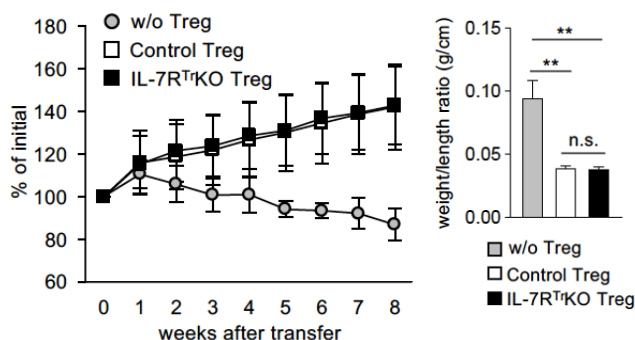


(図3) ex vivoでの抑制活性はcontrolマウスとIL-7R^{Tr}KOマウスのTreg間で差はない

野生型マウスから単離したNaïve CD4 T細胞と、controlマウス、あるいはIL-7R^{Tr}KOマウスのリンパ節から単離したTregを各比率で混合し、anti-CD3抗体とRag2欠損マウス脾臓細胞の存在下で84時間培養後、細胞の増殖をMTS assayで測定した。

② 次に、controlマウスとIL-7R^{Tr}KOマウスのTregのin vivoでの抑制活性を比較するため、Rag2欠損マウスへのCD45RB^{high} CD4 T細胞移入による大腸炎モデルを解析した。IL-7R^{Tr}KOマウスのTregはcontrolマウス由来のTregと同様に、大腸炎を抑制することができた(図4)。

これらの結果から、IL-7Rシグナルの有無は、リンパ組織に存在するTregの抑制活性には影響を与えないことが示唆された。



(図4) in vivoでの抑制活性もcontrolマウスとIL-7R^{Tr}KOマウスのTreg間で差はない

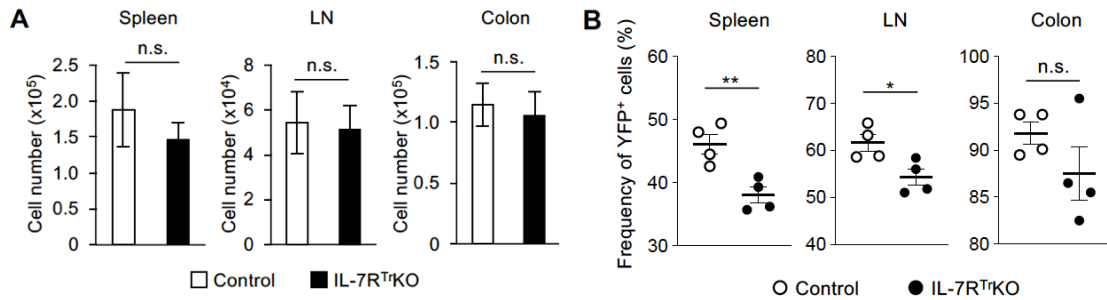
CD45RB^{high} CD4 T細胞のみ、CD45RB^{high} CD4 T細胞とcontrolマウス、あるいはIL-7R^{Tr}KOマウスのリンパ節から単離したTregを混合して、Rag2欠損マウスに移植した。(左)移植後8週間の体重変化。(右)8週間後の大腸の重さ/長さの比。

(3) Tregの可塑性におけるIL-7Rシグナルの役割

① Tregに発現するIL-7Rはlymphopenic環境下においてFoxp3発現の安定性に寄与する

Treg、特にCD25陰性のTregは、lymphopenicな環境下において、Foxp3の発現を失い、ヘルパーT細胞へと変化することが知られている。このTregの‘可塑性’に与えるIL-7Rシグナルの影響を調べるため、controlマウスとIL-7R^{Tr}KOマウスのTreg(ドナー細胞)をRag2欠損マウスへ移植した。移植4週間後にRag2欠損マウスを解剖し、リンパ節、脾臓、大腸内のドナー細胞に占めるFoxp3陽性率を調べ

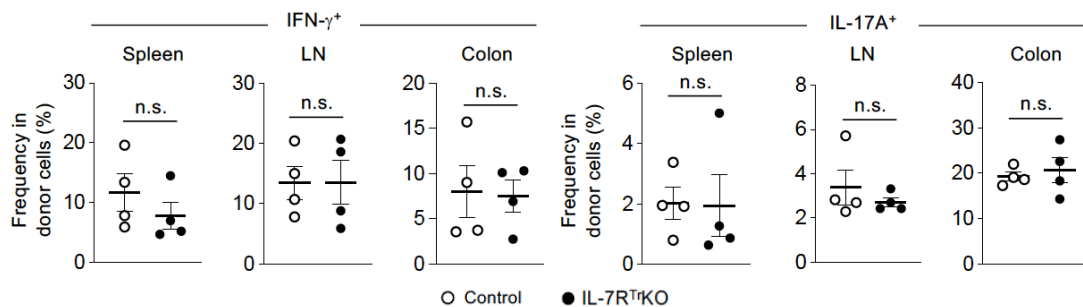
た。いずれの組織でも、control マウスと IL-7R^TKO マウス由来のドナー細胞数はレシピエント Rag2 欠損マウス内で同程度維持されていた(図5A)。ただし、ドナー細胞に占める Foxp3 の発現は IL-7R^TKO マウスにおいて低下していた(図5B)。この結果から、lymphopenic な環境下においては、IL-7R シグナルは Treg の Foxp3 発現の安定性に寄与している可能性が示唆された。



(図5) lymphopenic 環境下において、IL-7R シグナルは Treg の Foxp3 発現の安定性に寄与する control マウス、あるいは IL-7R^TKO マウスのリンパ節から単離した Treg を Rag2 欠損マウスに移植した。移植後4週間後の各組織中のドナー細胞数(A)、各組織のドナー細胞に占める Foxp3 陽性細胞率(B)。

② Treg に発現する IL-7R は Treg のヘルパーT 細胞への可塑性に影響しない

Treg、特に CD25 陰性の Treg は周囲にサイトカインが多く存在する環境下において、Foxp3 の発現を失い、ヘルパーT 細胞へと変化することが知られている。そこで、図5と同様の実験を行い、ドナー細胞のサイトカイン産生を調べた。その結果、二次リンパ組織と大腸においては、IFN- γ と IL-17A 産生量は control マウスのドナー細胞と IL-7R^TKO マウスのドナー細胞の間で差がみとめられなかった(図6)。以上の結果から、Treg の可塑性に IL-7R シグナルは大きく影響しない可能性が示唆された。



(図6) IL-7R シグナルは Treg の可塑性に寄与しない

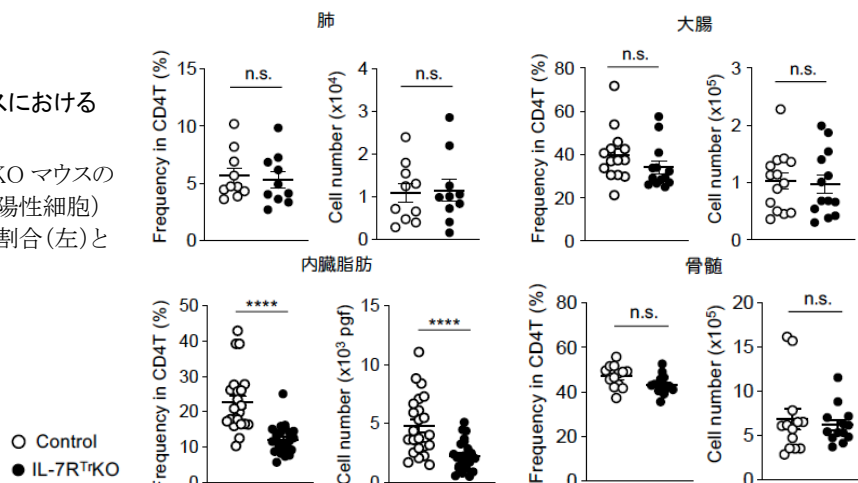
control マウス、あるいは IL-7R^TKO マウスのリンパ節から単離した Treg を Rag2 欠損マウスに移植した。移植後4週間後に各組織から単離したリンパ球を PMA + Ionomycin + Brefeldin A で 4 時間培養後、サイトカインの産生をフローサイトメトリーによる細胞内染色で解析した。

(4) 組織局在型 Treg の IL-7R シグナル依存性は組織によって異なる

組織局在型 Treg における IL-7R シグナルの影響を調べるために、肺、大腸、内臓脂肪、骨髄の Treg の細胞数を調べた。その結果、IL-7R^TKO マウスでは内臓脂肪でのみ、Treg の細胞数が減少することが判明した(図7)。

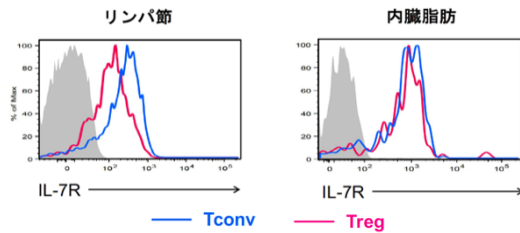
(図7) IL-7R^TKO マウスにおける組織局在型 Treg

control マウスと IL-7R^TKO マウスの各組織の Treg (Foxp3 陽性細胞) の CD4 T 細胞に占める割合(左)と細胞数(右)。



(5) 内臓脂肪の Treg は IL-7R の発現が高い

一般的に、Treg の IL-7R の発現レベルは Tconv よりも低いとされている。リンパ節の Treg では過去の報告通り、Treg の IL-7R 発現は Tconv より低いことが確認されたが、内臓脂肪の Treg の IL-7R 発現レベルは Tconv と同程度に高いことが分かった(図8)。

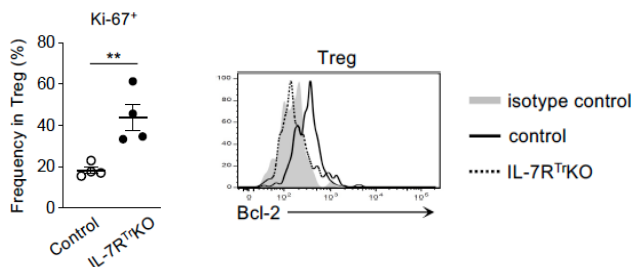


(図8) リンパ節と内臓脂肪の Treg における IL-7R の発現

野生型マウスのリンパ節と内臓脂肪の Treg における IL-7R の発現を Tconv と比較した。

(6) IL-7R^TKO マウスの内臓脂肪の Treg は生存が障害されている

IL-7R^TKO マウスでは内臓脂肪の Treg が減少していたことから、IL-7R シグナルが脂肪組織の Treg の生存と増殖のいずれを支持しているかを調べた。control マウスと IL-7R^TKO マウスの内臓脂肪の Treg において、増殖マーカーである Ki-67 の発現は、むしろ IL-7R^TKO マウスの Treg でやや高い傾向にあった。一方、IL-7R シグナルの標的遺伝子で、細胞生存を支持する抗アポトーシス分子 Bcl-2 の発現は IL-7R^TKO マウスで顕著な低下をみとめた(図9)。この結果から、IL-7R^TKO マウスの内臓脂肪の Treg は生存が障害される結果、細胞数が減少していることが示唆された。

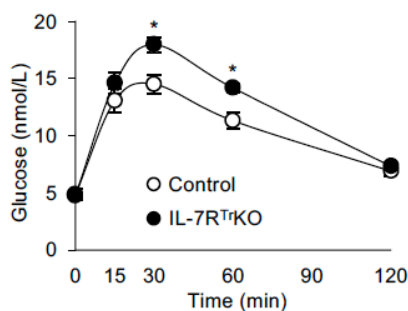


(図9) IL-7R^TKO マウスの内臓脂肪の Treg における Ki-67 と Bcl-2 の発現

control マウス、あるいは IL-7R^TKO マウスの内臓脂肪の Treg における Ki-67 陽性率(左)、Bcl-2 の発現量(右)をフローサイトメトリーで調べた。

(7) IL-7R^TKO マウスは耐糖能異常を示す

内臓脂肪の Treg は脂肪組織の炎症を抑制することで、2型糖尿病を抑制していることが知られている。そこで、control マウスと IL-7R^TKO マウスで耐糖能試験 (intraperitoneal glucose tolerance test) を実施した。その結果、IL-7R^TKO マウスは、空腹時血糖は control マウスと差がないものの、糖負荷を行うと耐糖能異常を示すことが判明した(図10)。



(図10) control マウスと IL-7R^TKO マウスの耐糖能試験

control マウスと IL-7R^TKO マウス(いずれも 15 週齢の雄)を一晩絶食後、2 mg/g body weight のβ-(D)-グルコースを腹腔内投与し、継続的に血糖値を測定した。

本研究から、これまで Treg は IL-7R 発現が低い T 細胞集団だと考えられていたが、内臓脂肪の Treg は例外的に IL-7R 発現が高いことが判明した。また、内臓脂肪の Treg において、IL-7R シグナルは Treg の生存をサポートすることで2型糖尿病を抑制していることが明らかになった。過去の文献で報告されている IL-7 投与による2型糖尿病の抑制効果は、Treg を介したメカニズムが関与している可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tani-ichi Shizue, Wagatsuma Keisuke, Hara Takahiro, Cui Guangwei, Abe Shinya, Miyachi Hitoshi, Kitano Satsuki, Ikuta Koichi	4. 巻 204
2. 論文標題 Innate-like CD27+CD45RBhigh T Cells Require TCR Signaling for Homeostasis in Peripheral Lymphoid Organs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2671 ~ 2684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1801243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Cui Guangwei, Shimba Akihiro, Ma Guangyong, Takahara Kazuhiko, Tani-ichi Shizue, Zhu Yuanbo, Asahi Takuma, Abe Akifumi, Miyachi Hitoshi, Kitano Satsuki, Hara Takahiro, Yasunaga Jun-ichirou, Suwanai Hirotsugu, Yamada Hisakata, Matsuoka Masao, Ueki Kohjiro, Yoshikai Yasunobu, Ikuta Koichi	4. 巻 204
2. 論文標題 IL-7R-Dependent Phosphatidylinositol 3-Kinase Competes with the STAT5 Signal to Modulate T Cell Development and Homeostasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 844 ~ 857
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷一靖江、生田宏一
2. 発表標題 制御性T細胞におけるIL-7レセプターの役割
3. 学会等名 第29回 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷一靖江、原崇裕、向平妃沙、生田宏一
2. 発表標題 Function of IL-7R in regulatory T cells
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------