

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790468

研究課題名(和文) 内皮細胞由来 IL-7 による B 細胞分化、末梢 T 細胞維持の機構

研究課題名(英文) Endothelial cell-derived IL-7 controls B cell development and peripheral T cell maintenance

研究代表者

原 崇裕 (Hara, Takahiro)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：90512301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000 円、(間接経費) 720,000 円

研究成果の概要(和文)：サイトカイン IL-7 は、リンパ球の分化・増殖・生存にとって重要な分子であるが、IL-7 を産生する細胞の種類および、IL-7 の局所的機能について詳細な解析はなされていない。本研究では末梢リンパ管内皮細胞や骨髄血管内皮細胞が産生する IL-7 が末梢 T 細胞や骨髄 B 細胞に与える影響を明らかにすることを目的とした。内皮細胞特異的 IL-7 欠損マウスを解析した結果、内皮細胞に由来する IL-7 は末梢 T 細胞の動態および、骨髄における B 細胞の分化を制御していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：IL-7 is an essential cytokine for the development, proliferation and survival of lymphocytes. However, the precise distribution and the local function of IL-7-expressing cells are largely unknown. In this research project, I aimed to clarify the effects of IL-7 produced by lymphatic endothelial cells and bone marrow endothelial cells on peripheral T cells and bone marrow B cells. By using endothelial cell specific IL-7 deleted mice, I found that endothelial cell-derived IL-7 controls the peripheral T cell migration and bone marrow B cell development.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：サイトカイン IL-7 内皮細胞 T細胞 B細胞

1. 研究開始当初の背景

IL-7は、リンパ球の増殖・分化・維持にとって必須なサイトカインであり、免疫系の自己形成と自己識別に重要な役割を果たしている。これまでに我々は、生体内におけるIL-7の機能を明らかにするために、IL-7受容体(IL-7R)の鎖欠損マウス(IL-7R^{-/-})を作製し解析を行ってきた。このマウスの骨髄ではB細胞分化に障害があり、成熟B細胞の数が著減していた。また胸腺細胞の数も同様に激減しており、T細胞の分化にも重要であることを明らかにしてきた(Maki *PNAS*, 93:7172, 1996)。一方、リガンドIL-7の欠損マウス(IL-7^{-/-})に関する報告(Freedman-Jeffrey *Immunity*, 7:147, 1997)があり、IL-7は抗アポトーシス蛋白の発現を正に制御し、成熟T細胞の維持に大きな役割を果たしていることも知られている。しかしながらIL-7タンパクの発現量は比較的少なく、抗体による検出が困難なため、IL-7産生細胞は正確には同定されていなかった。IL-7産生細胞に関するこれまでの知見は、mRNAを検出する方法によるものが殆どであり、胸腺上皮細胞、リンパ節間葉系細胞(細網線維芽細胞)、腸管上皮細胞などがIL-7産生細胞であると考えられていた。近年になり、IL-7遺伝子座の転写開始コドンATGの直下にYFPやCFPなどの蛍光タンパク質cDNAを挿入したbacterial artificial chromosome(BAC)が作製され、複数のグループからトランスジェニックマウスの解析結果が報告された。しかしこれらのマウスでは、胸腺および骨髄の一部の細胞でしか蛍光を検出できておらず、末梢組織では蛍光を確認できていなかった(Alves *PNAS*, 106:1512, 2009)(Mazzucchelli *PLoS ONE*, 4:e7637, 2009)。BACトランスジェニックマウスは、内在性遺伝子と同様の発現が起きることを期待して作製されるが、転写に必要な制御領域の遺伝子配列が含まれていない可能性も考えられる。そこで申請者は、IL-7遺伝子の第一エキソンをGFPに置き換えたIL-7-GFPノックインマウスを作製し、IL-7産生細胞の同定を行った。このマウスでは胸腺のみならず、リンパ節T細胞領域の細網線維芽細胞(FRC)や腸管上皮細胞からGFPの発現が見られたことから、従来のBACトランスジェニックマウスに比べて、より内在性IL-7遺伝子に近い発現様式を反映していると考えられた。更に申請者は、IL-7-GFPノックインマウスの解析から、末梢組織のリンパ管内皮細胞および骨髄の血管内皮細胞がIL-7を産生していることを初めて見出した。しかしながら、IL-7が

各組織で局所的にどのような機能を果たしているのか詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

申請者は、IL-7-GFPノックインマウス組織切片の観察過程において、末梢組織のリンパ管内皮細胞および骨髄の血管内皮細胞がIL-7を産生していることを見出した。そこで本研究では『内皮細胞が産生するIL-7が、リンパ球の分化や維持・動態に対してどのような役割を果たしているのか』を解明することを目的としている。具体的には、(1)末梢におけるT細胞の生存とhomingに与える影響(2)骨髄B細胞の分化に与える影響について解析することを目標とする。

3. 研究の方法

(1)末梢T細胞の生存とhomingに与える影響の解析

内皮細胞特異的IL-7 conditional knockoutマウスを用いて、胸腺、末梢リンパ組織や末梢血のT細胞のphenotypeを解析する。またT細胞について、アポトーシス関連分子や細胞移動に関与する分子の発現量も調べる。

T細胞のhoming機能については、内皮細胞特異的IL-7 conditional knockoutマウスおよびコントロールマウスから単離した末梢T細胞をrecipientマウスに移植し、リンパ組織へのhomingを比較検討する。

(2)骨髄B細胞の分化に与える影響の解析

内皮細胞特異的IL-7 conditional knockoutマウスの骨髄や末梢リンパ組織に存在するB細胞のphenotypeを解析する。骨髄においては、pre-pro B細胞、pro B細胞、pre B細胞の各前駆細胞についても調べる。これにより、内皮細胞から骨髄中へ放出されるIL-7が、B細胞の分化に与える影響を明らかにする。

4. 研究成果

(1)末梢T細胞の生存とhomingに与える影響の解析

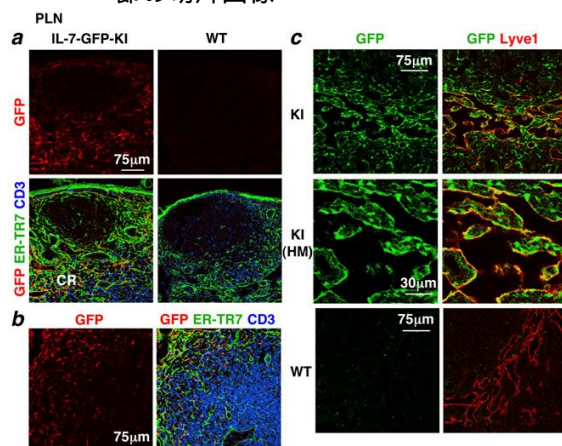
IL-7-GFPノックインマウスの解析から、末梢組織のリンパ管内皮細胞がIL-7を産生していることを初めて見出した(図1)。内皮細胞特異的IL-7 conditional knockoutマウスの末梢リンパ節をFACS解析した結果、CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞が有意に減少していた。一方、胸腺ではDN細胞、DP細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NKT細胞に有意差はなく、胸腺内でのリンパ球分化は正常であ

った。また、末梢血中の CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞の integrin 発現を調べた結果、細胞表面での発現量が低下していることが判明した。また、内皮細胞特異的 IL-7 conditional knockout マウスおよび野生型マウスの末梢 T 細胞を同時に recipient マウスに移入した結果、内皮細胞特異的 IL-7 conditional knockout マウスの末梢 T 細胞はリンパ組織への移入が低下していることが判明した。一方で末梢 T 細胞のアポトーシス関連分子の発現は変化がなかった。従って、内皮細胞特異的 IL-7 欠損マウスにおける末梢リンパ節 T 細胞の減少は、リンパ組織への移入障害に起因すると考えられた。以上の結果から、内皮細胞が産生する IL-7 は、末梢 T 細胞の生存には関わっておらず、むしろリンパ組織への移動を制御していることが示唆された。

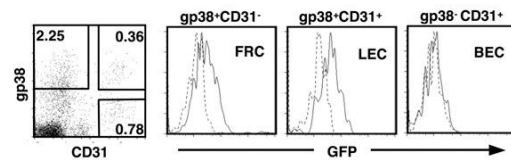
(2) 骨髄 B 細胞の分化に与える影響の解析

骨髄では血管内皮細胞が IL-7 を発現していることを見出した。一方で末梢リンパ組織の血管内皮細胞では IL-7 の発現が見られなかった(図 2)。内皮細胞特異的 IL-7 conditional knockout マウスの骨髄を FACS 解析した結果、B 細胞において有意な減少が認められた。従って、血管内皮細胞に由来する IL-7 は B 細胞分化に一定の寄与があることが判明した。逆に、末梢のリンパ管内皮が産生する IL-7 は、骨髄の B 細胞分化に影響を及ぼさないことも判明し、骨髄内への IL-7 の流入は多くはないことが示唆された。一方で骨髄においては、血管内皮細胞以外にも IL-7 を産生する他のストローマ細胞の同定も行った。これらの骨髄ストローマ細胞が産生する IL-7 の局所機能を包括的に理解することを目指し、現在解析を継続中である。

(図 1) IL-7-GFP ノックインマウスのリンパ節の切片画像



(図 2) リンパ節ストローマ細胞における IL-7 の発現比較



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 7 件)

1. Soichiro Shitara, Takahiro Hara, Bingfei Liang, Keisuke Wagatsuma, Saulius Zuklys, Georg A. Hollander, Hiroshi Nakase, Tsutomu Chiba, Shizue Tani-ichi, and Koichi Ikuta. IL-7 Produced by Thymic Epithelial Cells Plays a Major Role in the Development of Thymocytes and TCR $\gamma\delta$ ⁺ Intraepithelial Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 190(12):6173-6179 (2013)
査読有 doi: 10.4049/jimmunol.1202573.
2. Motokazu Tsuneto, Koji Tokoyoda, Ekaterina Kajikhina, Anja E. Hauser, Takahiro Hara, Shizue Tani-ichi, Koichi Ikuta and Fritz Melchers. B cell progenitors and precursors change their microenvironment in fetal liver during early development. *Stem Cells*, 31:2800-2812 (2013)
査読有 doi: 10.1002/stem.1421.
3. Asami Hanazawa, Koji Hayashizaki, Kenta Shinoda, Hideo Yagita, Ko Okumura, Max Löhning, Takahiro Hara, Shizue Tani-ichi, Koichi Ikuta, Beate Eckes, Andreas Radbruch, Koji Tokoyoda and Toshinori Nakayama CD49b-dependent establishment of T helper cell memory. *Immunol Cell Biol*, 91:524-531 (2013)
査読有 doi: 10.1038/icb.2013.36.
4. Shizue Tani-ichi, Akihiro Shimba, Keisuke Wagatsuma, Hitoshi Miyachi, Satsuki Kitano, Kumiko Imai, Takahiro Hara, and Koichi Ikuta. The

interleukin-7 receptor controls development and maturation of late stages of thymocyte subpopulations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110:612-617 (2013)
査読有 doi: 10.1073/pnas.1219242110.

5. Takahiro Hara, Soichiro Shitara, Kumiko Imai, Hitoshi Miyachi, Satsuki Kitano, Hisayuki Yao, Shizue Tani-ichi, Koichi Ikuta. Identification of IL-7-producing cells in primary and secondary lymphoid organs using IL-7-GFP knock-in mice. *The Journal of Immunology* 189(4): 1577-84 (2012)
査読有 doi: 10.4049/jimmunol.1200586.
6. Bingfei Liang, Takahiro Hara, Keisuke Wagatsuma, Jia Zhang, Kazushige Maki, Hitoshi Miyachi, Satsuki Kitano, Chihiro Yabe-Nishimura, Shizue Tani-ichi, and Koichi Ikuta. Role of Hepatocyte-Derived IL-7 in Maintenance of Intrahepatic NKT Cells and T Cells and Development of B Cells in Fetal Liver. *The Journal of Immunology* 189(9): 4444-4450 (2012)
査読有 doi: 10.4049/jimmunol.1201181.
7. 原 崇裕、生田宏一、IL-7 産生細胞のリンパ組織内分布 医学のあゆみ Vol.246、No.12、2013、p.1055-p.1056 査読なし

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Takahiro Hara, Guangwei Cui, Soichiro Shitara, and Koichi Ikuta. Distribution and function of IL-7-expressing cells in intestines. 日本免疫学会総会・学術集会(幕張メッセ) 2013 年 12 月 11 日
2. Takahiro Hara, Guangwei Cui, and Koichi Ikuta. Visualization and characterization of IL-7- and IL-15-expressing cells in vivo. International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2013 (京都大学 芝蘭会館) 2013 年 6 月 3 日~6 月 7 日

〔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://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/ikut_a.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 崇裕 (Takahiro Hara)
京都大学・ウイルス研究所・助教
研究者番号: 90512301

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し