

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860048

研究課題名(和文) 胸腺内CD8陽性T細胞分化におけるFGF21の生理的役割の解明

研究課題名(英文) The physiological role of FGF21 in thymic CD8 T cell development

研究代表者

増田 有紀 (Masuda, Yuki)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40421284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：FGF21は肝臓や胸腺で発現する分泌因子であり、最近の研究で胸腺老化予防作用が報告された。本研究の結果より、若年期のFGF21 ノックアウト(KO)マウス胸腺において、成熟T細胞の減少が確認された。FGF21 KOマウスの胎児胸腺器官培養でも成熟T細胞が減少していたが、FGF21タンパクの添加によって、アポトーシスによる未熟T細胞の減少と、成熟T細胞の回復がみられた。しかし、FGF21の共受容体として知られる Klotho KOマウス胸腺では上記の表現型はみられなかった。以上より、FGF21は新生児期および若年期の胸腺内で Klotho非依存的にT細胞の分化を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that Fgf21 is expressed in the thymus as well as in the liver. Recently, Fgf21 was reported to protect against ageing-related thymic senescence. However, the function of Fgf21 in the juvenile thymus remained to be elucidated. In this study, we demonstrated that young Fgf21 knockout mice, but not -Klotho knockout mice, showed a significant reduction in the percentage of single-positive CD4+ and CD8+ thymocytes without obvious alteration in thymic epithelial cells (TECs). Furthermore, treatment with recombinant FGF21 rescued the impairment in fetal thymus organ culture (FTOC) of Fgf21 knockout mice. Annexin V staining revealed FGF21 protein enhanced apoptosis of immature thymocytes undergoing selection process in FTOC, suggesting that FGF21 may facilitate the selection of developing T cells. Our data suggest that Fgf21 acts as one of intrathymic cytokines in the neonatal and juvenile thymus, involving thymocyte development in a -Klotho-independent manner.

研究分野：免疫学

キーワード：FGF21 胸腺 胸腺上皮細胞

### 1. 研究開始当初の背景

多機能性細胞間シグナル因子である線維芽細胞増殖因子 (FGF) ファミリーの一つである FGF21 は、主に肝臓で産生され、糖・脂質代謝を調節すると考えられている。一方で申請者は、FGF21 が 4 週齢のマウスの胸腺において肝臓の約 8 倍の発現量を示すことを認めた。予備検討において、胸腺を構成する CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (DN)、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP)、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (CD4 SP)、CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (CD8 SP) 細胞、胸腺上皮細胞をそれぞれ単離し、FGF21 の発現を測定したところ、FGF21 は胸腺上皮細胞 (TEC) に特異的に発現していることが分かった。そこで、FGF21 の新たな生理機能として、T 細胞の分化、成熟に関与する可能性を考えた。

さらに作成済みの FGF21 ノックアウト (KO) マウス (*Endocrinology* 150, 4625-33, 2009) を用いて野生型 (WT) と FGF21 KO マウスを比較した。その結果、胸腺細胞数に違いはみられなかったが、KO マウス胸腺において CD4 T 細胞は減少傾向を示し、さらに CD8 T 細胞は有意に減少していた。末梢血においては、CD4 T 細胞はほとんど変化がなかったものの、CD8 T 細胞は KO マウスにおいて有意に減少していることが確認された。

以上より、FGF21 は胸腺において CD8 T 細胞の分化に関与しており、その結果末梢における CD8 T 細胞数にも影響を及ぼしているものと考えられた。

### 2. 研究の目的

予備検討の結果より、本研究では、FGF21 が CD8 T 細胞の分化・成熟に関与していると考え、その生理的役割について解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) FGF21 の発現細胞の解析のために、4 週齢 C57BL/6 マウス胸腺を採取し、セルソーターを用いて T 細胞 (CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>-</sup>)、TEC (CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>)、TEC 以外の胸腺ストローマ細胞 (CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>-</sup>) に分画した。これらの細胞の FGF21 mRNA 発現を定量的 RT-PCR を用いて測定した。また、FGF21 の受容体と考えられている FGFR1 と Klotho の発現細胞については、T 細胞サブセット (T1; TCR<sup>+</sup>CD69<sup>-</sup>, T2; TCR<sup>int</sup>CD69<sup>-</sup>, T3; TCR<sup>int</sup>CD69<sup>+</sup>, T4; TCR<sup>hi</sup>CD69<sup>+</sup>, T5; TCR<sup>hi</sup>CD69<sup>-</sup>) と、TEC、TEC 以外のストローマ細胞に分画し mRNA 発現を同様に検討した。

(2) FGF21 の胸腺における生理的役割の解明と Klotho の寄与について調べるために、C57BL/6 を遺伝的背景に持つ FGF21 KO マウスと Klotho KO マウスそれぞれの胸腺および脾臓における T 細胞サブセットと胸腺ストロ

マ細胞の解析を行った。

(3) FGF21 の胸腺内 T 細胞分化における役割をさらに詳しく調べるために、胎児胸腺器官培養 (FTOC) を行った。具体的には、胎生 15.5 日目の胎児胸腺を採取し、Millicell 0.4 μm inserts (Millipore) 上で AIMV 培地を用いて培養した。このとき、recombinant human FGF21 (rhFGF21, 500 ng/ml) を添加し、3 日おきに培地を交換した。培養 14 日目に細胞を回収し、T 細胞サブセットの割合についてフローサイトメトリーを用いて解析した。アポトーシス細胞は Annexin V 染色を用いて検出した。

### 4. 研究成果

本研究の研究期間中に、胸腺に発現する FGF21 が老齢マウスにおける胸腺老化を抑制するという報告がされた (*Proc. Natl. Acad. Sci* 113, 1026-1031, 2016)。そこで本研究では、新生児期および若年期の胸腺に焦点をあて、FGF21 の生理的役割の解明を試みた。

(1) マウス胸腺における FGF21 の発現は、胎生 15.5 日から確認され、12 週齢まで維持されていた。胸腺組織は外側の皮質と内側の髄質に分かれており、それぞれ皮質上皮細胞 (cTEC)、髄質上皮細胞 (mTEC) によって特徴的な微小環境が作られている。予備検討の結果と同様に、FGF21 は TEC に特異的に発現していた。さらに cTEC と mTEC に分画すると、FGF21 は成熟 mTEC (CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>UEA-1<sup>+</sup>MHC<sup>high</sup>) に最も高い発現が認められ、未成熟および成熟 cTEC (CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>UEA-1<sup>-</sup>MHC<sup>low or high</sup>) にもわずかに発現していた。

(2) 次に、1 週齢と 4 週齢の FGF21 KO マウス胸腺における T 細胞サブセットの解析を行うと、WT マウスと比較して CD4 SP および CD8 SP が共に有意に減少、あるいは減少傾向を示した。二次免疫器官である脾臓においても同様の結果が得られた。以上より、予備検討の結果とは異なり、FGF21 が CD8 T 細胞の分化に限らず、CD4 T 細胞への分化も制御することが示唆された。さらに、胸腺 T 細胞を TCR と CD69 の発現パターンから 5 つの段階 (T1; TCR<sup>+</sup>CD69<sup>-</sup>, T2; TCR<sup>int</sup>CD69<sup>-</sup>, T3; TCR<sup>int</sup>CD69<sup>+</sup>, T4; TCR<sup>hi</sup>CD69<sup>+</sup>, T5; TCR<sup>hi</sup>CD69<sup>-</sup>) に分け解析を行った。1 週齢 FGF21 KO マウス胸腺では、WT マウス胸腺と比較して、後期の分化段階である T4 と T5 の割合が減少していた (図 1)。これらの結果より、FGF21 は胸腺において T 細胞の後期の分化段階である DP から SP への分化を制御している可能性が示唆された。

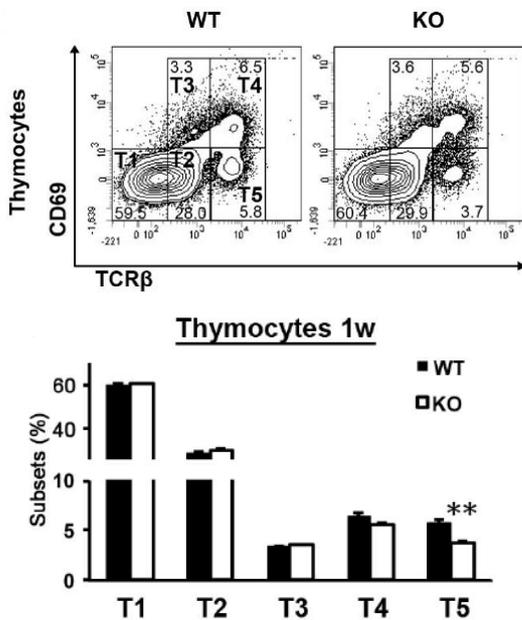


図 1. FGF21 KO マウス胸腺における成熟 T 細胞の減少

1 週齢の FGF21 KO マウス胸腺における T 細胞サブセットの解析を行った。上：代表的なフローサイトメトリーのプロット。下：各 T 細胞サブセットの割合。 \*\* $P < 0.01$

(3) FGF21 は、FGFR1 と共受容体である Klotho に結合することで活性を示すといわれている。FGFR1 および Klotho は、胸腺で TEC を含む胸腺ストローマ細胞に高発現していたが、T 細胞にはほとんど発現していなかった。このことから、FGF21 は TEC または繊維芽細胞や血管内皮細胞などの胸腺ストローマ細胞に作用すると考えられた。しかし予想に反して、FGF21 KO マウス胸腺では、WT マウス胸腺と比較して、TEC、繊維芽細胞、血管内皮細胞数や、機能遺伝子 (*Aire*, *5t*, *IL7*, *Ccl19*, *Ccl21a*, *Ccl21b*, *Foxn1*)、皮質や髄質などの組織形態に違いはみられなかった。以上より、FGF21 は TEC の増殖や機能に影響を与えないものと考えられた。

Klotho は共受容体として FGF21 シグナルを誘導することが知られている。しかし、Klotho KO (*Klb<sup>-/-</sup>*) マウス胸腺では、*Klb<sup>-/-</sup>* マウスと比較して、FGF21 KO マウス胸腺で見られた成熟 T 細胞の減少がみられなかった。このことは、胸腺において FGF21 が Klotho 非依存的に T 細胞の分化を制御することを示唆している。

(4) FGF21 の胸腺内 T 細胞分化における役割を確認するために、胎児胸腺器官培養 (FTOC) を用いて FGF21 タンパク質添加による影響を検討した。その結果、WT マウス FTOC への rhFGF21 添加により、未熟 T 細胞 (T1, T2) の割合は減少し、正の選択後 (T4) および成熟 (T5) T 細胞の割合は増加した。細胞数については、rhFGF21 添加により未熟な T 細胞

(T1-T4) が減少したが、成熟 T 細胞 (T5) に影響はみられなかった。さらに、1 週及び 4 週齢の結果と同様に、FGF21 KO マウス FTOC でも T4 および T5 の割合の減少が確認されたが、rhFGF21 添加により、これらの細胞割合の回復がみられた (図 2)。以上の結果より、FGF21 は胸腺内 T 細胞分化を促進することが示された。

WT FTOC への rhFGF21 添加により、未熟 T 細胞数が減少したことから、FGF21 は未熟 T 細胞のアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。一般的に胸腺では、未熟な T 細胞のうち、無応答あるいは自己反応性の T 細胞が、TEC との相互作用による選択の過程でアポトーシスによって排除される。WT FTOC への rhFGF21 添加により、選択の過程の T 細胞 (T3) におけるアポトーシス細胞の割合が有意に増加した。以上の結果より、FGF21 が胸腺内の分化過程における未熟 T 細胞の選択を促進している可能性が考えられた。

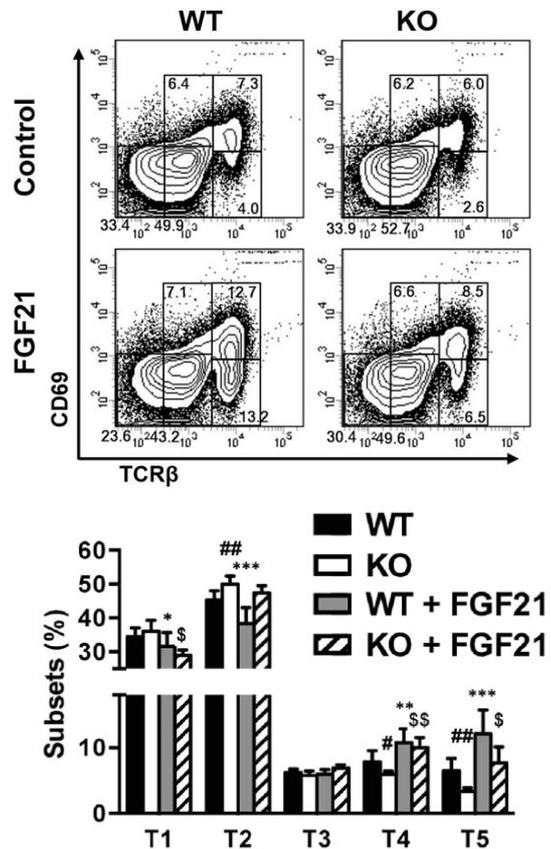


図 2. FGF21 タンパク質処理は FTOC における T 細胞分化を促進する

FGF21 (500 ng/ml) 存在下、非存在下で WT および FGF21KO マウスの FTOC を 14 日間行った。上：代表的なフローサイトメトリーのプロット。下：各 T 細胞サブセットの割合。\*, # $P < 0.05$ , \*\*, ## $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  versus WT without rhFGF21, \$ $P < 0.05$ , and \$\$ $P < 0.01$  versus Fgf21 KO without rhFGF21.

## 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 1 件)

Nakayama Y, Masuda Y, Ohta H, Tanaka T, Washida M, Nabeshima YI, Miyake A, Itoh N, Konishi M. Fgf21 regulates T-cell development in the neonatal and juvenile thymus. *Scientific Reports*, (査読あり) 2017, 7(1):330. doi: 10.1038/s41598-017-00349-8.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 増田有紀、中山喜明、伊藤信行、小西守周. 胸腺における Fgf21 の役割. 第 39 回日本分子生物学会、2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
2. 増田有紀、中山喜明、伊藤信行、小西守周. 胸腺における Fgf21 の役割. BMB2015、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 有紀 (MASUDA, Yuki)  
神戸薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号: 40421284