

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：24790469

研究課題名(和文) 時期特異的 IL-7R 欠損マウスを用いた末梢 T 細胞の機能的分化の解析

研究課題名(英文) Analysis of the peripheral T cell function by using IL-7R conditional knockout mice

研究代表者

谷一 靖江 (TANI-ICHI, SHIZUE)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：50432331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000 円、(間接経費) 1,050,000 円

研究成果の概要(和文)：インターロイキン7(IL-7)の末梢T細胞の機能における役割を調べるため、時期特異的IL-7レセプター(IL-7R)欠損マウスやIL-7R発現制御領域の変異マウスを用いて、末梢ナイーブT細胞のTCR刺激に対する応答性を解析した。その結果、ナイーブT細胞におけるIL-7シグナルはTCR刺激による増殖を高めるのに必要であり、さらに、ナイーブT細胞上のIL-7R発現レベルとTCR刺激に対する反応性には正の相関関係がある可能性が示唆された。また、IL-7Rを欠損する制御性T細胞(Treg)の増殖抑制活性は、in vitroにおいては野性型マウスのTregより弱いという結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Little is known about the roles of IL-7 signal in the peripheral T cell function. To address this question, we used peripheral naive T cells from IL-7 receptor (IL-7R) conditional knockout mice or mutant mice of IL-7R-regulatory region and analyzed their TCR responsiveness. We found the possibility that IL-7 signal in naive T cells is required for the proliferation when these T cells are activated by TCR stimulation, and there is positive correlation between IL-7R expression levels on naive T cells and their TCR responsiveness at least in vitro. In addition, we found that regulatory T cells (Tregs) from IL-7R conditional knockout mice show weak suppression activity compared to that of wild-type mice derived Tregs in vitro.

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：T細胞 IL-7レセプター TCR

### 1. 研究開始当初の背景

インターロイキン 7 (IL-7) は、リンパ球の生存と増殖にとって重要なサイトカインである。IL-7 や IL-7 レセプター (IL-7R) の欠損マウスでは、T 細胞分化が胸腺における分化初期の段階で大きな障害を受けるため、すべての T 細胞サブセットが激減してしまう。また、IL-7 は末梢組織でのナイーブ T 細胞の生存維持にとって必須のサイトカインであるため、IL-7 シグナルが生存以外に T 細胞の機能に及ぼす影響を、IL-7 や IL-7R 欠損マウスの末梢 T 細胞を用いて調べることは困難であった。

### 2. 研究の目的

IL-7R の T 細胞分化過程における主要な機能は生存と増殖であるが、末梢 T 細胞のエフェクター機能にも IL-7 シグナルが影響を与えるかどうかを、我々が作成した時期特異的 IL-7R 欠損マウス (IL-7R-flox マウス) の T 細胞を用いて解析する。

制御性 T 細胞 (Treg) においては、IL-7R がその抑制機能に対して、ネガティブに働くという報告とポジティブに働くという報告が両方存在しており、結論がはっきりしていない。そこで、IL-7-flox マウスの Treg を用いて、IL-7 シグナルが Treg の抑制活性に与える影響を調べる。

### 3. 研究の方法

(1) IL-7R シグナルがナイーブ T 細胞の TCR 刺激に対する応答性へ与える影響の解析

IL-7R のエクソン 2 を loxP 配列で挟んだ IL-7R-flox マウスを用い、各種 Cre トランスジェニック (Tg) マウス (CD4-Cre Tg, Ubc-CreERT2 Tg) と交配することで、分化後期以降で IL-7R を欠損させた。これらのマウスのナイーブ T 細胞と野性型 (WT) マウスのナイーブ T 細胞を分離し、in vitro で抗 CD3 抗体刺激を行った時の活性化に違いがあるかを検証した。また、我々が作製し、解析中である 2 種類の IL-7R 発現制御領域の点変異マウスを用いて、IL-7R 発現が低下している場合と上昇している場合におけるナイーブ T 細胞の活性化に違いがあるかを調べた。

(2) IL-7R シグナルが Treg の抑制活性に与える影響の解析

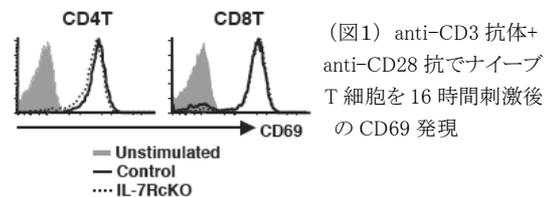
(1) で用いたマウスから、Treg を分離し、in vitro、in vivo の両方において、suppression assay を実施し、抑制機能に違いがあるかを調べた。

### 4. 研究成果

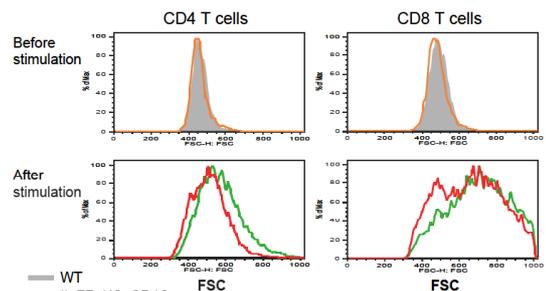
(1) IL-7R 欠損ナイーブ T 細胞の TCR 応答性

まず、IL-7R-flox マウスと CD4-Cre Tg マウスと交配し、胸腺 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP) 以降で IL-7R を欠損するマウス (以下、IL-7RcKO x CD4-Cre マウスとする) を得た。IL-7RcKO x CD4-Cre マウス

の末梢 CD4 T 細胞、CD8 T 細胞の数は WT マウスの約 40% まで減少しているが、リンパ節から分離したナイーブ CD4 T 細胞とナイーブ CD8 T 細胞の細胞表面の CD3、CD28 の発現レベルは WT マウスと差はなかった。分離したナイーブ CD4 T 細胞、CD8 T 細胞を in vitro で、5 μg/ml anti-CD3 抗体 + 1 μg/ml anti-CD28 抗体存在下で 16 時間培養した。初期活性化マーカーである CD69 の発現は、IL-7RcKO x CD4-Cre マウスと WT マウスの T 細胞で同様に上昇していたことから、IL-7R は TCR シグナル伝達には影響を与えないことが示唆された (図 1)。しかし、IL-7RcKO x CD4-Cre マウスの活性化 T 細胞は、CD4 T 細胞、CD8 T 細胞ともに、WT マウスの活性化 T 細胞に比べて細胞サイズの増加が弱かった (図 2)。なお、抗体刺激前のナイーブ T 細胞のサイズも、IL-7RcKO x CD4-Cre マウスで WT マウスに比べてわずかではあるが小さかった (図 2)。

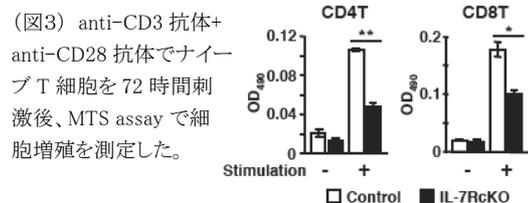


(図 1) anti-CD3 抗体 + anti-CD28 抗でナイーブ T 細胞を 16 時間刺激後の CD69 発現



(図 2) anti-CD3 抗体 + anti-CD28 抗体でナイーブ T 細胞を 16 時間刺激後の細胞の大きさ (前方散乱光 (FSC))

また、前述の条件で 72 時間培養後の細胞数は、IL-7RcKO x CD4-Cre マウスで WT マウスの 1/2 程度であり、IL-7R を欠損する T 細胞は、in vitro で IL-7 非存在下においても、TCR 刺激後の増殖能が弱いことが分かった (図 3)。



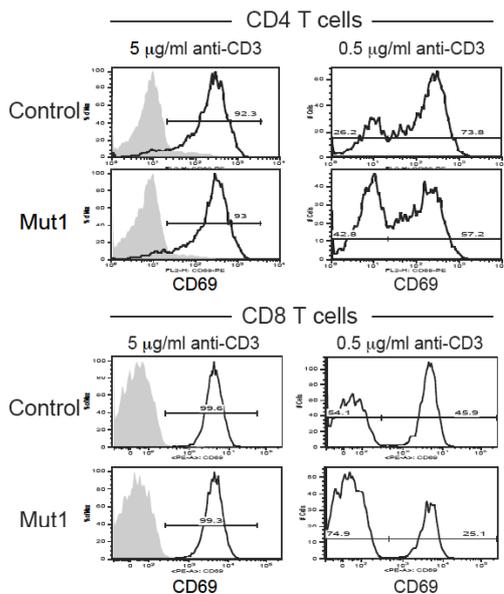
(図 3) anti-CD3 抗体 + anti-CD28 抗体でナイーブ T 細胞を 72 時間刺激後、MTS assay で細胞増殖を測定した。

IL-7RcKO x CD4-Cre マウスは胸腺 DP ステージから IL-7R の発現が消失するので、末梢組織で特異的に IL-7R を欠損させたナイーブ T 細胞を用いて同様の実験を行うために、IL-7R-flox マウスを Ubc-CreERT2 Tg マウスと交配し、タモキシフェン依存的に IL-7R の欠損が誘導できるマウス (IL-7RcKO x ERCre マウスとする) を準備

した。このマウスからナイーブ T 細胞を分離し、タモキシフェン処理した後、図1~3と同様の実験を実施したが、タモキシフェンの細胞毒性のため、死細胞が多くなり、明確なデータは得られなかった。

IL-7R は TCR 刺激によって、転写レベルで発現が抑制されることが知られており、TCR 刺激後の T 細胞は IL-7R シグナルを受け取れない。また、図1~3では IL-7 を添加していない。これらのことから、活性化前のナイーブ T 細胞が IL-7R シグナルを受け取っていることは、少なくとも in vitro では、TCR 刺激を受けた時の増殖能を高める上で必要である可能性を示唆している。

さらに、ナイーブ T 細胞の IL-7R 発現レベルと TCR シグナル応答性の関連を検証するため、我々の研究室で樹立した IL-7R の発現制御領域に点変異を導入したマウスを用いて、同様の実験を行った。点変異導入マウス‘Mut1’は、胸腺分化には影響はないが、末梢ナイーブ T 細胞の数が WT に比べて 10~30%程度少なく、ナイーブ T 細胞上の IL-7R の発現が WT マウスの約 1/2 に低下している(未発表)。Mut1 マウスのリンパ節からナイーブ CD4 T 細胞、CD8 T 細胞を分離し、in vitro で 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD3 抗体刺激を行った。刺激 16 時間後、ほぼすべての細胞で CD69 の発現が上昇し、WT マウスと Mut1 マウスで差はなかった(図4)。しかし、anti-CD3 抗体濃度を 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に下げると、WT マウスでは、生存している CD4 T 細胞集団のうち、約 75%で CD69 の発現が上昇するのに対して、Mut1 マウスでは 60%未満の CD4 T 細胞でしか、CD69 の発現上昇が起こらなかった(図4)。同様の傾向は、CD8 T 細胞でも観察された(図4)。すなわち、IL-7R 発現が低いナイーブ T 細胞は、in vitro で anti-CD3 抗体に対する応答性が弱いことが分かった。



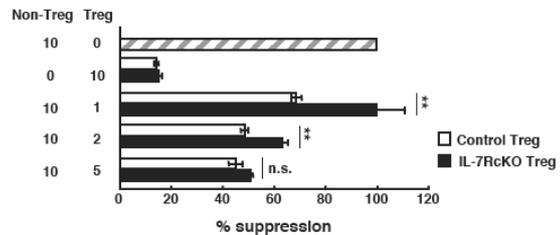
(図4) ナイーブ CD4 T、CD8 T 細胞を anti-CD3 抗体で 16 時間刺激後の CD69 発現。Filled area (gray)は、刺激なしの細胞集団の CD69 発現を示す。

次に、IL-7R 発現制御領域に点変異を入れた‘Mut2’マウスを用い、Mut1 マウスと同様の実験を行った。Mut2 マウスでは、胸腺細胞分化には影響はないが、ナイーブ T 細胞上の IL-7R 発現が WT マウスに比べて上昇している(未発表)。Mut1 マウスとは逆に、Mut2 マウスでは CD4 T 細胞、CD8 T 細胞ともに、低濃度の anti-CD3 抗体で刺激を行った時の CD69 陽性集団の割合が増加することが分かった。すなわち、IL-7R の発現が高いナイーブ T 細胞は、in vitro において、TCR 刺激に対する応答性が高いことが分かった。

以上の結果から、ナイーブ T 細胞上の IL-7R 発現レベルと in vitro における TCR 刺激に対する応答性には、正の相関関係があることが示された。この現象が in vivo でもみとめられるかを現在、解析中である。

## (2) IL-7R シグナルと Treg の抑制活性

WT マウスと IL-7RcKO x CD4-Cre マウスから Treg (TCR $\beta^+$ CD4 $^+$ CD25 $^+$ )を分離した。WT マウスのナイーブ CD4 T 細胞を 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD3 抗体と抗原提示細胞(ここでは Rag2 欠損マウスの脾臓細胞を抗原提示細胞として用いた)で刺激し、Treg を添加することで CD4 T 細胞の増殖が抑制されるか調べた(in vitro suppression assay)。その結果、CD4 T 細胞に対して Treg の割合が少ない場合において、IL-7RcKO x CD4Cre マウス由来 Treg は、WT マウス由来 Treg に比べて、増殖抑制活性が弱いという結果が得られた(図5)。これは、過去に IL-7R 欠損マウスの Treg で報告されていた結果と一致する(Mazzucchelli R, et al., *Blood* 112:3283-3292., 2008)。



(図5) IL-7R 欠損 Treg の in vitro での suppression assay

しかし、IL-7R シグナルが Treg の抑制活性に対して、ネガティブに働くという報告も多数存在するため、in vivo で IL-7R シグナルが Treg 機能へ与える影響の解析を試みた。WT マウス(ERCre トランスジェニックマウス)、または、IL-7RcKO x ERCre マウスの Treg を Rag2 欠損マウスへ移植し、タモキシフェンを投与した。ここに、CFSE ラベルした OT-1 あるいは OT-2 TCR トランスジェニックマウスの T 細胞を移植し、OVA を免疫後の OT-1、OT-2 T 細胞の増殖を測定した。しかし、タモキシフェン投与で IL-7R の発現は低下するものの、完全な deletion は誘導できていないため、実験条件の改善を図っている。

以上の結果から、IL-7R を発現しない Treg は in vitro においては WT マウスの Treg に比べて増殖抑制活性が弱いことが分かった。

## 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 Hanazawa A, Hayashizaki K, Shinoda K, Yagita H, Okumura K, Löhning M, Hara T, Tani-ichi S, Ikuta K, Eckes B, Radbruch A, Tokoyoda K, Nakayama T., CD49b-dependent establishment of T helper cell memory. *Immunol Cell Biol.*, 2013; 91(8): 524-531. (査読有) DOI: 10.1038/icb.2013.36.
- ② Shitara S, Hara T, Liang B, Wagatsuma K, Zuklys S, Holländer GA, Nakase H, Chiba T, Tani-ichi S, Ikuta K., IL-7 produced by thymic epithelial cells plays a major role in the development of thymocytes and TCR $\gamma\delta^+$  intraepithelial lymphocytes. *J Immunol.*, 2013; 190(12): 6173-6179. (査読有) DOI: 10.4049/jimmunol.1202573.
- ③ Tsuneto M, Tokoyoda K, Kajikhina E, Hauser AE, Hara T, Tani-ichi S, Ikuta K, Melchers F., B-cell progenitors and precursors change their microenvironment in fetal liver during early development. *Stem Cells.*, 2013; 31(12): 2800-2812. (査読有) DOI: 10.1002/stem.1421.
- ④ Sekai M, Tani-ichi S, Yoneyama M, Fujita T, Kina T, Ikuta K., Lymphocyte-stromal cell interaction induces IL-7 expression by interferon regulatory factors. *Mol Immunol.*, 2013; 54(3-4): 378-385. (査読有) DOI: 10.1016/j.molimm.2013.01.002.
- ⑤ Tani-ichi S, Shimba A, Wagatsuma K, Miyachi H, Kitano S, Imai K, Hara T, Ikuta K. Interleukin-7 receptor controls development and maturation of late stages of thymocyte subpopulations. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2013; 110(2): 612-617. (査読有) DOI: 10.1073/pnas.1219242110.
- ⑥ Liang B, Hara T, Wagatsuma K, Zhang J, Maki K, Miyachi H, Kitano S, Yabe-Nishimura C, Tani-ichi S, Ikuta K., Role of hepatocyte-derived IL-7 in maintenance of intrahepatic NKT cells and T cells and development of B cells in fetal liver. *J Immunol.*, 2012; 189(9): 4444-4450. (査読有) DOI: 10.4049/jimmunol.1201181.
- ⑦ Hara T, Shitara S, Imai K, Miyachi H, Kitano S, Yao H, Tani-ichi S, Ikuta K., Identification of IL-7-producing cells in primary and secondary lymphoid organs using IL-7-GFP knock-in mice. *J Immunol.*, 2012; 189(4): 1577-1584. (査読有)

DOI: 10.4049/jimmunol.1200586.

[学会発表] (計5件)

- ① TANI-ICHI Shizue, WAGATSUMA Keisuke and IKUTA Koichi : Role of a TCR $\gamma$  enhancer, E $\gamma$ 4, in differentiation and function of  $\gamma\delta$  T cell subsets : 第41回日本免疫学会学術集会、2013年12月11日、千葉
- ② WAGATSUMA Keisuke, TANI-ICHI Shizue and IKUTA Koichi : Enhancers control locus-wide accessibility of the TCR $\gamma$  locus in vivo. : 第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月5日、神戸
- ③ TANI-ICHI Shizue and IKUTA Koichi : NF- $\kappa$ B and AP-1 signals control IL-7R expression in T cells through CNS. : 第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月5日、神戸
- ④ 我妻慶祐、谷一靖江、梁冰霏、設楽宗一郎、生田宏一 : STAT5によるTCR $\gamma$ 遺伝子再編成の制御機構 : 第21回 Kyoto T Cell Conference、2012年7月6日、京都
- ⑤ 谷一靖江、生田宏一 : NF $\kappa$ BとAP-1シグナルはCNSを介してIL-7Rの発現レベルを制御する : 第21回 Kyoto T Cell Conference、2012年7月6日、京都

[図書] (計1件)

- ① 谷一靖江、原 崇裕、生田宏一 : T細胞におけるIL-7レセプターの転写制御と機能  
Transcriptional regulation and function of IL-7 receptor in T cells : 臨床免疫・アレルギー科 61(4), 450-456, 2014年4月, 科学評論社  
<http://ci.nii.ac.jp/nrid/9000248200929>

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等  
<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/about/y2012/ikuta20130124.html>

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者 谷一 靖江  
(TANI-ICHI SHIZUE)  
京都大学・ウイルス研究所・助教  
研究者番号 : 50432331
- (2) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者 なし