

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590531

研究課題名（和文） IL-7産生細胞の生体内における分布と機能

研究課題名（英文） Distribution and function of IL-7-producing cells

研究代表者

生田 宏一（IKUTA KOICHI）

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：90193177

研究成果の概要（和文）：IL-7は胸腺や骨髄のストローマ細胞や上皮細胞が産生するサイトカインであり、リンパ球の増殖・生存・分化・成熟に不可欠である。しかしながら、リンパ組織におけるIL-7産生細胞の分布と機能については不明の点が多い。我々は、この問題を明らかにするために、まずIL-7-GFPノックインマウスを作製した。IL-7-GFPマウスでは骨髄ストローマ細胞、胸腺上皮細胞、腸管上皮細胞とともに、リンパ節やパイエル板のT細胞領域ストローマ細胞やリンパ管内皮細胞でGFPが発現していた。さらに、DSSにて大腸炎を誘導すると大腸上皮細胞におけるGFPの発現が上昇した。したがって、IL-7-GFPマウスは生理的ならび病的状態におけるIL-7産生細胞を明らかにするために有用であることがわかった。次に、我々はIL-7-floxedマウスを作製した。このマウスをFoxN1-Creトランスジェニック(Tg)マウスと交配し、胸腺上皮細胞でのみIL-7を欠損したコンディショナルノックアウト(cKO)マウスを得た。FoxN1-Cre IL-7^{lox/lox}マウスでは胸腺の全細胞数と $\gamma\delta$ T細胞数が1/15に減少した。一方、腸管上皮細胞でのみIL-7を欠損したVillin-Cre (Vil-Cre) IL-7^{lox/lox}マウスでは、小腸の $\alpha\beta$ IELにほとんど変化がなく、また $\gamma\delta$ IELも30%程度減少しているものかなりの数が残っていた。これらの結果から、胸腺上皮細胞が産生するIL-7が胸腺細胞の増幅と生存に大きなはたらきをしていることが明らかとなった。さらに、小腸の $\gamma\delta$ 型上皮内リンパ球が著しく減少したことから、この細胞集団が胸腺に由来することが示唆された。次に、Albumin-Cre (Alb-Cre) Tgマウスと交配し、肝細胞でのみIL-7を欠損したcKOマウスを得た。このマウスでは成体肝臓のNKT細胞とT細胞が減少し、胎児肝臓におけるB細胞の分化が低下していた。この結果から、肝細胞が産生するIL-7が肝臓におけるNKT細胞の維持やB細胞の分化に一定のはたらきをしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：IL-7 is an essential cytokine for lymphocyte development and survival produced by mesenchymal and epithelial cells in lymphoid organs. However, little is known about the precise nature and distribution of IL-7-expressing cells in vivo. To address this question, we established IL-7-GFP knock-in mice. We found that GFP is expressed in bone marrow stromal cells, thymic epithelial cells (TECs), fibroblastic reticular cells (FRCs) and lymphatic endothelial cells in lymph nodes, and intestinal epithelial cells. After induction of acute colitis with DSS, GFP expression was elevated in the intestinal epithelial cells. Thus, the IL-7-GFP knock-in mouse reveals unreported types of IL-7-expressing cells and provides a powerful tool to analyze the IL-7-niche in the lymphoid organs under physiological and pathological conditions. We next established IL-7-floxed mice and crossed with FoxN1-Cre transgenic (Tg) mice to obtain the conditional knockout mice deficient in IL-7 production from TECs. FoxN1-Cre IL-7^{lox/lox} mice showed severely reduced numbers of total and $\gamma\delta$ T cells in the thymus. These results suggested that IL-7 produced by TECs plays a major role in proliferation, survival, and maturation of thymocytes. In small intestine, cell numbers of $\gamma\delta$ IELs were significantly reduced in FoxN1-Cre IL-7^{lox/lox} mice, suggesting that IL-7 produced in the thymus is essential for $\gamma\delta$ IEL development. Thus, this study presents strong evidence for the thymic origin $\gamma\delta$ IELs. We next crossed IL-7-floxed mice with albumin promoter-driven Cre (Alb-Cre) Tg mice to establish conditional knockout of IL-7 in hepatocytes. We found that NKT and T cells were moderately decreased in adult

liver of IL-7^{fl/fl} Alb-Cre mice and that B cell development was impaired in perinatal liver of IL-7^{fl/fl} Alb-Cre mice. This study demonstrates that hepatocyte-derived IL-7 plays an indispensable role in maintenance of NKT and T cells in adult liver and development of B cells in fetal liver and suggests that hepatocytes provide a unique IL-7 niche for intrahepatic lymphocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

1. 研究開始当初の背景

IL-7 は、リンパ球前駆細胞の増殖・分化、胸腺内の正の選択、成熟 T 細胞の維持など免疫系において重要な働きをしている。IL-7 は、骨髄では間葉系ストローマ細胞から産生され、初期リンパ球の増殖・分化に必要である。また、胸腺では間葉系ストローマ細胞と胸腺上皮細胞から産生され、CD8 T 細胞の正の選択に関与している。一方、末梢では、リンパ節の T 細胞領域の細網細胞が産生し、T 細胞の維持に関与している。また、皮膚や消化管の上皮細胞にも発現しており、上皮内 T 細胞の分化・維持や局所における炎症の惹起にかかわっている。しかし、これらの報告は IL-7 mRNA を解析したものが多く、高感度の染色手段を欠くために IL-7 産生細胞の生体内分布や局所における機能については詳細が明らかでない。

2. 研究の目的

本研究は、組織特異的 IL-7 遺伝子破壊マウスと IL-7-GFP マウスを用いて、IL-7 産生細胞の生体内分布を明らかにし、胸腺上皮細胞が産生する IL-7 の役割を解明する。

(1) IL-7 産生細胞の生体内分布と IL-7 の誘導機構。まず、IL-7 遺伝子座に GFP 遺伝子をノックインした IL-7-GFP マウスを作製し、IL-7 産生細胞を GFP で標識する。IL-7-GFP マウスの骨髄、胸腺、二次免疫器官、皮膚・腸管上皮における GFP 陽性細胞の分布、特に gp38 などの細網細胞マーカーやケラチンなどの上皮細胞マーカーとの共局在、リンパ球との相対的位置関係を解析する。

(2) IL-7 産生細胞の生体内機能。Cre-loxP 系を用いて種々の上皮細胞において IL-7 遺伝子を破壊したマウスを作り、T 細胞の分化・選択・成熟・維持に対する影響を解析する。特に、胸腺上皮細胞の IL-7 遺伝子を破壊することで、DN 細胞の増幅、CD8 細胞の正の選択、SP 細胞の維持における胸腺上皮細胞由来 IL-7 の役割を明らかにする。また、皮膚や腸管の上皮細胞でも IL-7 遺伝子を破壊し、T 細胞の維持における上皮細胞の IL-7 の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) IL-7-GFP マウスの作製。BAC の Red 組換え系を用いて、IL-7 遺伝子座の第 1 エクソンの翻訳開始コドンの直下に GFP 遺伝子と poly(A)付加シグナルを挿入したターゲティングベクターを作製し、ES 細胞に導入する。相同組換え ES クローンを同定した後、Flp 組換え酵素を発現するアデノウイルスを感染させることで frt 配列に挟まれた Neo カセットを抜き、キメラマウスを作製する。さらに、得られた雄キメラマウスを雌 B6 マウスと交配させ、IL-7-GFP マウスを得る。

(2) IL-7 産生細胞の生体内分布。IL-7-GFP マウスの骨髄、胸腺、脾臓、リンパ節、皮膚、消化管などの凍結組織切片を作製し、GFP 陽性の IL-7 産生細胞の分布を共焦点顕微鏡にて観察する。骨髄については、GFP 陽性細胞と血管周囲、骨内膜、B 細胞との相対的な位置関係を解析する。胸腺においては、間葉系ストローマ細胞と皮質と髄質の胸腺上皮細胞における発現強度を比較する。リンパ節では、T 細胞領域の細網細胞と分布が一致す

るかどうかを確認する。他のリンパ組織についても GFP 陽性細胞の分布を詳細に解析する。

(3) 組織特異的 IL-7 遺伝子破壊マウスの作製。IL-7 遺伝子座の第4エクソンの両側に loxP 配列を挿入した IL-7-floxed マウスを、胸腺上皮細胞において Cre を発現する Foxn1-Cre Tg マウス、肝細胞において Cre を発現する Alb-Cre Tg マウス、腸管上皮細胞で Cre を発現する Vil-Cre マウスと交配を進める。

(4) 組織特異的 IL-7 遺伝子破壊マウスの解析。Foxn1-Cre Tg マウスによる組織特異的 IL-7 遺伝子破壊マウスにおいて、コラゲナーゼとトリプシン処理により胸腺から胸腺上皮細胞の単細胞浮遊液を得る。MHC クラス II や Ly51 等の標識抗体により、皮質胸腺上皮細胞と髄質胸腺上皮細胞を FACS で単離する。単離した胸腺上皮細胞において、IL-7 遺伝子の欠失と発現の低下を qPCR 法と qRT-PCR 法にて確認する。

次に、胸腺細胞の増殖・分化・維持における DN 細胞の増幅、CD8 細胞の正の選択、SP 細胞の維持について解析する。胸腺細胞を CD4、CD8、CD3、CD25、CD44、CD69 等の標識抗体と FACS にて解析し、各分化段階の細胞数と分化の程度を野生型マウス、IL-7 KO マウスと比較する。

4. 研究成果

(1) IL-7 は胸腺や骨髄のストローマ細胞や上皮細胞が産生するサイトカインであり、リンパ球の増殖・生存・分化・成熟に不可欠である。しかしながら、リンパ組織における IL-7 産生細胞の分布と機能については不明の点が多い。我々は、この問題を明らかにするために、IL-7-GFP knock-in マウスを作製した。IL-7-GFP マウスでは骨髄ストローマ細胞、胸腺上皮細胞、腸管上皮細胞とともに、リンパ節やパイエル板の T 細胞領域ストローマ細胞やリンパ管内皮細胞で GFP が発現していた。さらに、DSS にて大腸炎を誘導すると大腸上皮細胞における GFP の発現が上昇した。したがって、IL-7-GFP マウスは生理的ならび病的状態における IL-7 産生細胞を明らかにするために有用であることがわかった。(原ら、論文投稿中)

(2) 小腸上皮内リンパ球 (IEL) は $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞からなる。 $\alpha\beta$ IEL の起源については fate mapping の実験から胸腺に由来することが明らかにされているが、 $\gamma\delta$ IEL については詳しいことが不明である。一方、IL-7 KO マウスで $\gamma\delta$ IEL が完全に欠失することから、 $\gamma\delta$ IEL の分化に IL-7 が必須であることが報告

されている。そこで、我々は胸腺または腸管で特異的に IL-7 を欠損した IL-7 コンディショナル KO マウスを使い、 $\gamma\delta$ IEL の起源を解析した。IL-7-floxed マウスと、胸腺上皮細胞で Cre を発現する FoxN1-Cre マウス、腸管上皮細胞で Cre を発現する Vil-Cre マウスをそれぞれ交配した。FoxN1-Cre IL-7^{fllox/fllox} マウスでは、胸腺の $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞が激減していた。このマウスの小腸では $\alpha\beta$ IEL が減少傾向を示すものかなり残っていたが、 $\gamma\delta$ IEL はごくわずかしかな存在しなかった。一方、Vil-Cre IL-7^{fllox/fllox} マウスでは、胸腺の $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞に変化はなかった。このマウスの小腸では $\alpha\beta$ IEL にほとんど変化がなく、また $\gamma\delta$ IEL も 30%程度減少しているものかなりの数が残っていた。以上の結果から、胸腺上皮細胞が産生する IL-7 が $\gamma\delta$ IEL の分化に必須であることが明らかとなり、大部分の $\gamma\delta$ IEL が胸腺に由来することが示唆された。(設楽ら、論文投稿中)

(3) 肝細胞が産生する IL-7 の機能を解析した。Alb-Cre Tg マウスと交配し、肝細胞でのみ IL-7 を欠損した cKO マウスを得た。このマウスでは成体肝臓における NKT 細胞と T 細胞が減少し、胎児肝臓における B 細胞の分化が低下していた。この結果から、肝細胞が産生する IL-7 が肝臓における NKT 細胞と T 細胞の維持や B 細胞の分化に一定のはたらきをしていることが明らかとなった。(梁ら、論文投稿中)

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 Tani-ichi, S., Satake, M., and Ikuta, K. (2011). The pre-TCR signal induces transcriptional silencing of the TCR γ locus by reducing the recruitment of STAT5 and Runx to transcriptional enhancers. *Int. Immunol.*, 23:553-563. 査読有
DOI: 10.1093/intimm/dxr055
- ② Tani-ichi, S., Lee, H.-C., Ye, S.-K., and Ikuta, K. (2010). Accessibility control of TCR V γ region by STAT5. *Int. Immunol.*, 22:693-703. 査読有
DOI:10.1093/intimm/dxq054
- ③ Tani-ichi, S., Satake, M., and Ikuta, K. (2009). Activation of the mouse T cell receptor γ enhancers by STAT5. *Int. Immunol.*, 21:1079-1088. 査読有
DOI: 10.1093/intimm/dxp073

[学会発表] (計 7 件)

- ① 設楽宗一郎、梁冰霏、原崇裕、我妻慶祐、生田宏一：腸管上皮内 $\gamma\delta$ T 細胞は胸腺に由来する、第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉、2011 年 11 月 27 日
- ② 原崇裕、生田宏一：リンパ管内皮細胞が産生する IL-7 は末梢 T 細胞の組織分布を制御する 第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉、2011 年 11 月 28 日
- ③ 梁冰霏、原崇裕、我妻慶祐、設楽宗一郎、谷一靖江、生田宏一：肝細胞が産生する IL-7 は肝臓でのリンパ球の分化と維持を制御する、第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉、2011 年 11 月 28 日
- ④ Hara, T., Tani-ichi, S., and Ikuta, K.: Distribution of IL-7-expressing cells in lymphoid organs. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, August 23, 2010.
- ⑤ Liang, B., Hara, T., Tani-ichi, S., and Ikuta, K.: Local function of IL-7 produced by thymic and epidermal epithelial cells. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, August 25, 2010.
- ⑥ 生田宏一、原崇裕、梁冰霏、谷一靖江：胸線上皮細胞が産生する IL-7 の局所的役割。第 39 回日本免疫学会学術集会、大阪、12 月 2 日、2009.
- ⑦ 生田宏一、原崇裕、梁冰霏、谷一靖江：リンパ組織における IL-7 産生細胞の分布と機能。第 32 回日本分子生物学会年会 ワークショップ、横浜、12 月 9 日、2009.

[図書] (計 1 件)

- ① Ikuta, K. and Tani-ichi, S. (2009). Role of the IL-7 receptor in $\gamma\delta$ T-cell development from hematopoietic stem cells. In "Hematopoietic Stem Cell Biology". Kondo, M., ed. Humana Press Inc. pp143-159.
DOI: 10.1007/978-1-60327-347-3_6

[その他]

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/ikuta.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生田 宏一 (IKUTA KOICHI)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：90193177

(2) 研究分担者

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

原 崇裕 (HARA TAKAHIRO)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：90512301

(3) 連携研究者

今井 久美子 (IMAI KUMIKO)

京都大学・ウイルス研究所・教務補佐員

研究者番号：99999999