

機関番号 : 14301

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2010 ~ 2011

課題番号 : 22790460

研究課題名 (和文) 胸腺細胞分化と末梢メモリー T 細胞形成における IL-7R の発現制御機構

研究課題名 (英文) Regulation of IL-7R expression in thymocytes and memory T cells

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

研究成果の概要(和文): IL-7 は T 細胞の増殖とホメオスタシスに重要なサイトカインである。IL-7 レセプター (IL-7R) 欠損マウスでは、T 細胞分化の初期に障害が現れ、すべての T 細胞サブセットが減少する。そこで、IL-7R-flox マウスを作製し、CD4-Cre トランスジェニックマウスと交配することで (IL-7RcKO)、胸腺分化後期以降の IL-7R の役割を解析した。IL-7RcKO では CD8SP 細胞、制御性 T 細胞、NKT 細胞が顕著に減少していた。また、CD4SP と CD8SP に占める成熟 T 細胞の割合が減少しており、これは増殖の低下が原因であることが分かった。IL-7RcKO の CD4SP と CD8SP では、機能に重要な分子の発現も一部低下していた。IL-7RcKO では、NKT 細胞の増殖と成熟に障害が生じており、制御性 T 細胞の増殖が低下していた。また、IL-7RcKO では野性型に比べて胸腺 B 細胞が 20 倍に、樹状細胞と  $\gamma\delta$ T 細胞の数もわずかに増加しており、 $\alpha\beta$ T 細胞による胸腺内 IL-7 濃度調整がこれらのサブセットの数を決定している一因である可能性が示唆された。以上の結果より、胸腺 T 細胞分化後期における IL-7R の多彩な役割を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文): IL-7 is a cytokine essential for T lymphocyte development and homeostasis. However, little is known about the roles of its  $\alpha$ -chain (IL-7R $\alpha$ ) in late stages of T cell development. To address this question, we established IL-7R $\alpha$ -floxed mice and crossed them with CD4-Cre transgenic mice. Resultant mice (IL-7RcKO) mice exhibited marked reduction in CD8 single positive (SP) T cells, regulatory T cells (Tregs) and natural killer T (NKT) cells. In addition, the proportion and proliferation of both mature CD4SP and CD8SP thymocytes were decreased, and expression of genes important for function of each subset was decreased. IL-7RcKO mice also showed impaired Treg and NKT cell proliferation and inhibition of NKT cell maturation. IL-7RcKO mice exhibited increased numbers of B,  $\gamma\delta$  T, and dendritic cells in thymus. Overall, this study demonstrates that IL-7R $\alpha$  has multiple functions in thymocyte subpopulations in late developmental stages and suggests that IL-7R expression on  $\alpha\beta$  T cells suppresses development of other cell lineages in thymus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 23 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

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：リンパ球、サイトカインレセプター

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、胸腺分化初期段階の T 細胞が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する。そのため、現在まで、胸腺分化後期における IL-7 シグナルの正確な役割は明らかになっていなかった。

また、IL-7R は胸腺細胞分化過程において最も未熟な CD4-CD8<sup>-</sup> (DN) 細胞から発現しているが、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP) 細胞で一度発現がシャットオフされ、ポジティブセレクションを受けたのち、再発現してくる。末梢のナイーブ T 細胞も IL-7R を発現しているが、活性化 T 細胞では IL-7R の発現が抑制され、メモリー T 細胞になると IL-7R が再発現される。この分子メカニズムは現在のところ、全く解明されていない。

2. 研究の目的

(1) IL-7R コンディショナルノックアウトマウスを作製し、CD4-Cre トランスジェニック (CD4-Cre Tg) マウスと交配することで、IL-7R を DP ステージ以降で欠損させ、胸腺細胞分化後期における IL-7R の役割を明らかにすることを試みた。

(2) IL-7R の発現制御の分子メカニズムを明らかにするため、IL-7R 遺伝子座エンハンサーと推定される領域 CNS (conserved non-coding sequence)-1 と CNS-2 が IL-7R の発現に及ぼす影響を調べた。

3. 研究の方法

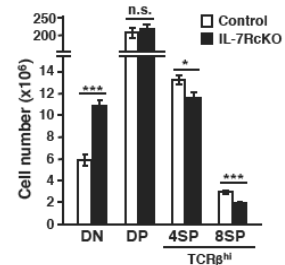
(1) IL-7R のエクソン 2 を loxP ではさんだ IL-7R-flox マウスを作製した。IL-7R-flox マウスを C57BL/6 マウスに 6~9 回バッククロスを行った後、CD4-CreTg マウスと交配し (IL-7RcKO とする)、フローサイトメトリーで胸腺細胞の分化に及ぼす影響を調べた。

(2) CNS-1、CNS-2 が胸腺で活性を持つ可能性を調べるために、胸腺から各分化段階の細胞を分取し、転写活性化の指標であるヒストン H3 のアセチル化状態を ChIP アッセイで調べた。また、培養細胞を用いて、CNS-1 と CNS-2 を活性化しうる転写因子のスクリーニングを行った。さらに、CNS-1 と CNS-2 の欠損マウスを作製し、IL-7R の発現に及ぼす影響をフローサイトメトリーで調べた。

4. 研究成果

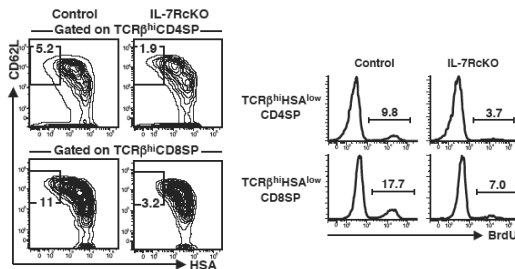
(1) 胸腺細胞の分化後期における IL-7R の役割解析

胸腺の総細胞数は、IL-7RcKO の方が野生型マウス (WT) に比べて 10%程度多く、DN 細胞が増加していた。また、CD4SP、CD8SP は、WT に比べてそれぞれ 10%、40%減少していた。(図 1)



(図 1) 胸腺細胞数

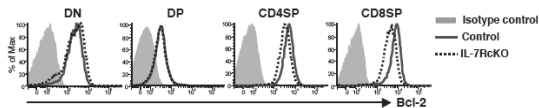
また、CD4SP、CD8SP 中に占める mature (HSA<sup>low</sup>CD62L<sup>hi</sup>Qa-2<sup>hi</sup>) な細胞の割合も IL-7RcKO では減少しており、増殖の低下が原因であることが分かった。(図 2)



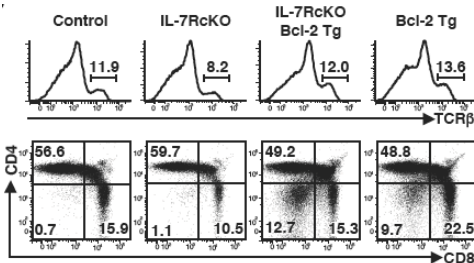
(図 2) 胸腺細胞の成熟 (左) と増殖 (右)

また、CD8SP の Eomes や CD4SP、CD8SP 両方の GITR (glucocorticoid induced TNF receptor) の発現が低下しており、CD4、CD8 両 T 細胞の機能に障害が生じる可能性が示唆された。

さらに、IL-7 シグナルの標的遺伝子で、細胞の生存に重要な抗アポトーシス因子 Bcl-2 の発現が、IL-7RcKO の CD4SP、CD8SP 両方で低下しており (図 3)、IL-7RcKO マウスと Bcl-2 Tg マウスを交配することで、CD8SP の減少は野生型のレベルまで回復させることができた (図 4)。



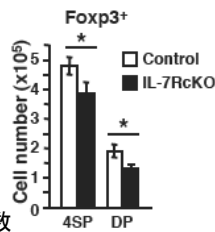
(図 3) Bcl-2 の発現



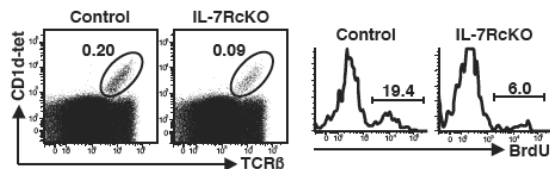
(図 4) TCRβ の割合 (上) と TCRβ<sup>+</sup>細胞中の CD4/CD8 分布 (下)

また、IL-7RcKO では胸腺で制御性 T 細胞の数が減少しており (図 5)、その原因は生存の障害ではなく、増殖の低下である可能性が示唆された。

(図 5) TCRβ<sup>+</sup>CD4SP、TCRβ<sup>+</sup>DP 中の Foxp3<sup>+</sup>細胞の数



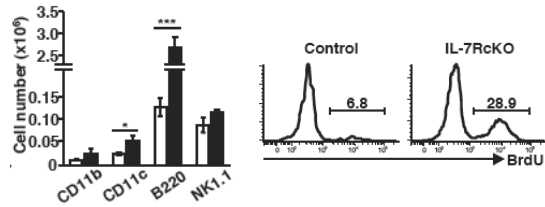
また、IL-7RcKO では、胸腺 NKT 細胞の数が WT の 50% に減少しており、増殖低下が主要な原因であることが分かった (図 6)。さらに、NKT 細胞の成熟にも IL-7 シグナルが必要であることも分かった。



(図 6) 胸腺内 invariant NKT (iNKT: TCRβ<sup>+</sup>CD1d-tetramer<sup>+</sup>) 細胞の割合 (左) と iNKT 細胞の増殖 (右)

さらに、IL-7RcKO では、胸腺内 B 細胞が激しく増殖しており、WT の 20 倍に増加して

いた (図 7)。樹状細胞と γδT 細胞も 1.5 倍程度に増加していた。胸腺 IL-7 濃度は、αβT 細胞による IL-7 消費によって調節されており、B 細胞、樹状細胞、γδT 細胞の数を規定する要因の一つとなっている可能性が示唆された。

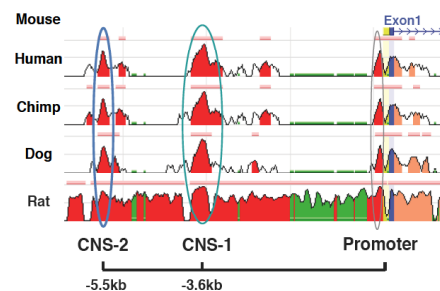


(図 7) 胸腺の CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> に占める各 population の数 (左) と B 細胞の増殖 (右)

以上の結果から、胸腺分化後期における IL-7R の多彩な役割を明らかにすることができた。

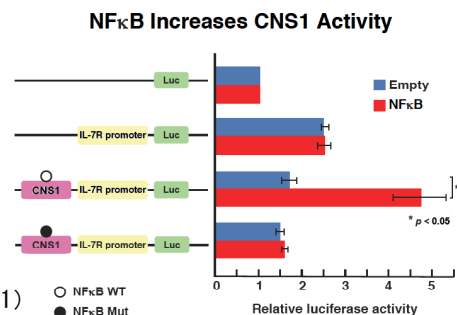
(2) IL-7R の発現制御の分子メカニズム  
IL-7R 遺伝子座のプロモーター上流 3.6kb と 5.5kb には種間で保存された non-coding 領域が存在する。(下図)

#### Conserved Non-coding Region of IL-7R Locus



CNS-1 と CNS-2 のヒストン H3 アセチル化レベルは、胸腺、末梢の T 細胞において、IL-7R の発現レベルとよく相関していたことから、CNS-1、CNS-2 とともに胸腺と末梢の T 細胞で活性を有する可能性が示唆された。

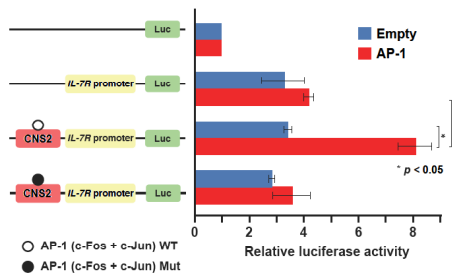
次に、CNS-1 と CNS-2 に存在する種間で保存された転写因子の結合サイトのうち、転写活性を上昇させるポテンシャルのあるものをルシフェラーゼレポーターアッセイでスクリーニングした。その結果、CNS-1 の NFκB と CNS-2 の AP-1 が活性上昇効果を示した。(図 1)



(図 1)

○ NFκB WT  
● NFκB Mut

### AP-1 Increases CNS-2 Activity



(図1) NFκB は CNS-1、AP-1 は CNS-2 の活性を上昇させる

さらに、CNS-1 と CNS-2 の欠損マウスを作製した。CNS-1 欠損マウスでは、胸腺細胞の IL-7R 発現に影響はなく、末梢 T 細胞上の IL-7R の発現が低下しており、T 細胞の数も減少していた。一方、CNS-2 欠損マウスでは、胸腺 CD4SP、CD8SP 細胞と末梢 T 細胞の IL-7R 発現が上昇していた。この傾向は、特に制御性 T 細胞で顕著にみとめられた。

以上の結果から、CNS-1 は末梢 T 細胞において IL-7R を正に、CNS-2 は胸腺-末梢 T 細胞の IL-7R 発現を負に制御する領域である可能性が示された。

現在、CNS-1 の NFκB 結合モチーフと CNS-2 の AP-1 結合モチーフに点突然変異を挿入したマウスを作製し、IL-7R の発現に及ぼす影響を解析している。さらに、これらの転写因子の活性化を誘導する上流のシグナルを明らかにするための解析も進めている。

#### 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 2 件)

- ① Tani-ichi, S., Satake, M., and Ikuta, K. (2011). The pre-TCR signal induces transcriptional silencing of the TCRγ 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 Vγ region by STAT5. *Int. Immunol.*, 22:693-703. 査読有  
DOI:10.1093/intimm/dxq054

[学会発表] (計 9 件)

- ① 谷一靖江、生田宏一：Function of IL-7R in the late stage of T cell development、第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉、2011 年

11 月 27 日

- ② 阿部昌史、谷一靖江、生田宏一：A conserved enhancer element controls the expression of IL-7 receptor α-chain in peripheral T cells、第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉、2011 年 11 月 28 日
- ③ 谷一靖江、生田宏一：T 細胞分化の後期における IL-7R の機能、第 21 回 Kyoto T Cell Conference、京都、2011 年 6 月 10 日
- ④ 阿部昌史、谷一靖江、生田宏一：IL-7Rα 鎖遺伝子の近位エンハンサーは末梢 T 細胞の IL-7R の発現を制御する、第 21 回 Kyoto T Cell Conference、京都、2011 年 6 月 10 日
- ⑤ Abe, A., Tani-ichi, S., and Ikuta, K.: IL-7R signal controls differentiation of CD8 T cells and maintenance of peripheral T cells. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, August 25, 2010.
- ⑥ Tani-ichi, S., and Ikuta, K.: Molecular mechanism of TCRγ silencing. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, August 24, 2010.

[その他]

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/ikut.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