

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460589

研究課題名(和文) IL-15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-15-producing cells in vivo

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：免疫組織におけるIL-15産生細胞の分布と機能を明らかにするために、まずIL-15-CFPノックインマウスを作製し、骨髄、胸腺、脾臓、リンパ節、腸管などでIL-15産生細胞の生体内分布を明らかにした。次にIL-15-floxマウスを作製し、Tie2-Cre、FoxN1-Cre、Villin-Creマウスと交配することで、骨髄血管内皮細胞、胸腺上皮細胞、腸管上皮細胞が産生するIL-15の機能を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：IL-15 is a cytokine critical for development, maintenance, and response of various immune cells. However, the distribution and function of IL-15-expressing cells in lymphoid organs are not well understood. To address these questions, we first established and analyzed IL-15-CFP knock-in mice. We found that IL-15 was expressed in medullary thymic epithelial cells, CXCL12-abundant reticular cells in bone marrow, fibroblastic reticular cells and blood endothelial cells in lymph nodes. Some IL-15-producing stromal cells were increased as mice aged and in LPS-induced inflammation. Overall, we have identified and characterized IL-15-expressing cells in primary and secondary lymphoid organs, providing a unique perspective of IL-15 niche in immune microenvironment. Next, we established and crossed IL-15-floxed mice with various Cre driver mice. We found unique functions of IL-15 produced by bone marrow endothelial cells, thymic epithelial cells, and intestinal epithelial cells.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫細胞 微小環境 サイトカイン ストローマ細胞 IL-15

1. 研究開始当初の背景

免疫微小環境はリンパ球の分化・維持・応答に重要な働きをしているが、機能的なマーカーが少ないためその実態は十分にはわかっていない。免疫微小環境において特に重要なサイトカインとして IL-7 と IL-15 が知られている。IL-7 は、骨髄の間葉系ストローマ細胞、胸腺上皮細胞、末梢リンパ節の細網線維芽細胞、皮膚や消化管の上皮細胞などから産生され、初期リンパ球の増殖・分化、CD8 T 細胞の正の選択、成熟 T 細胞の維持などに関与している。近年、IL-7 産生細胞を可視化するためにいくつかの IL-7-YFP/CFP BAC トランスジェニックマウスが作られたが、骨髄と胸腺以外では IL-7 の発現が検出されなかった。

一方、IL-15 も NK 細胞の増殖・分化や成熟 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-15 は骨髄では間葉系ストローマ細胞から産生され、NK 細胞の増殖・分化に必須である。また、リンパ節での T 細胞の維持、皮膚や消化管の上皮での $\gamma\delta$ T 細胞の維持、肝臓での NKT 細胞の維持に関与している。さらに、樹状細胞が産生する IL-15 は炎症反応の誘導に密接に関係している。しかしながら、IL-15 産生細胞の生体内における分布と局所における機能については詳細が不明である。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が独自に作製した IL-15-CFP ノックインマウスと組織特異的 IL-15 遺伝子破壊マウスを用いて、IL-15 産生細胞の生体内における分布と局所における機能を明らかにする。

(1) IL-15 産生細胞の生体内分布

IL-15-CFP ノックインマウスを用いて、骨髄、胸腺、リンパ節、脾臓、皮膚・腸管上皮、肝臓における CFP の発現を解析することで、IL-15 産生細胞の生体内分布の全容を明らかにする。

(2) IL-15 産生細胞の局所における機能

組織特異的 IL-15 遺伝子破壊マウスを用いて、胸腺上皮細胞、樹状細胞、皮膚上皮細胞、腸管上皮細胞、肝細胞などにおいて IL-15 遺伝子を破壊し、T 細胞と NK 細胞の分化・成熟・維持に対する影響を解析することで、IL-15 産生細胞の局所における機能を明らかにする。

3. 研究の方法

IL-15 遺伝子座に CFP 遺伝子をノックインした IL-15-CFP ノックインマウスを用いて、リンパ組織における IL-15 産生細胞の生体内の分布を解析する。さらに、新たに作製した組織特異的 IL-15 遺伝子破壊マウスとさまざまな組織特異的な Cre マウスを交配し、各組織における種々の免疫細胞の増幅・生存・分

化を解析することで、IL-15 産生細胞の局所における機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) IL-15 産生細胞の生体内分布

免疫組織はリンパ球と免疫微小環境から成り、微小環境は上皮細胞、内皮細胞、細網細胞などのストローマ細胞から構成されている。ストローマ細胞はサイトカイン、ケモカイン、接着分子などを産生し、リンパ球の分化、維持、応答に大きな役割を担っている。このサイトカインの一つに IL-15 があり、T 細胞、NKT 細胞、NK 細胞、樹状細胞の分化、維持、機能に重要な働きをしている。IL-15 mRNA はリンパ組織をはじめとして多くの器官で検出されるが、IL-15 産生細胞の実態については長く不明のままであった。そこで、IL-15 遺伝子座に CFP cDNA をノックインした IL-15-CFP KI マウスを作製し、生体内における IL-15 産生細胞の分布を解析した。骨髄では主に血管周囲に存在する VCAM-1 陽性の間葉系ストローマ細胞に IL-15 の発現が見られた。胸腺では MHC クラス II を強く発現する成熟した胸腺髄質上皮細胞に IL-15 の発現が検出された (図 1)。リンパ節では T 細胞領域の細網線維芽細胞や樹状細胞が IL-15 を産生していた。さらに、高内皮性細静脈とすべての血管内皮細胞で IL-15 が検出された (図 1)。脾臓では VCAM-1 陽性のストローマ細胞の一部が IL-15 を発現しており、その発現細胞は加齢とともに増加した。また、LPS を投与して炎症を惹起すると、血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞の IL-15 産生が亢進することを見出した。以上の結果から、生体内の IL-15 産生性ストローマ細胞を初めて同定し、その特徴的な分布と発現様式を明らかにした。

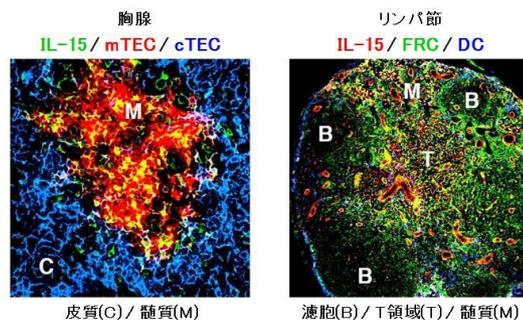


図1. IL-15産生細胞の分布

(2) 骨髄における IL-15 産生細胞の機能

CAR (CXCL12-abundant reticular) 細胞を含む間葉系ストローマ細胞にて IL-15 遺伝子が破壊される Prx1-Cre IL-15cKO マウスを解析した結果、骨髄における NK 細胞は影響を受けなかった。次に、血管内皮細胞と血液細胞にて IL-15 遺伝子が破壊される Tie2-Cre IL-15cKO マウスを解析した結果、NK 細胞の数が減少していた。一方、単球・マクロファージにて IL-15 遺伝子が破壊される LysM-Cre

IL-15cKO マウスや、樹状細胞にて IL-15 遺伝子が破壊される CD11c-Cre IL-15cKO マウスでは、NK 細胞の数に変化はなかった。以上の結果から、血管内皮細胞が産生する IL-15 が、骨髄における NK 細胞の分化・維持に重要であることが示唆された。

(3) 胸腺における IL-15 産生細胞の機能

胸腺上皮細胞と血管内皮細胞でそれぞれ IL-15 遺伝子が破壊される Foxn1-Cre IL-15cKO マウスと Tie2-Cre IL-15cKO マウスを解析した結果、Foxn1-Cre IL-15cKO マウスで NKT 細胞と CD8 T 細胞が減少していたが、Tie2-Cre IL-15cKO マウスでは変化がなかった。以上の結果から、胸腺上皮細胞が産生する IL-15 が、胸腺における NKT 細胞と CD8 T 細胞の分化・維持に重要であることが明らかとなった。

(4) 腸管における IL-15 産生細胞の機能：Villin-Cre IL-15cKO マウスにおいて腸管上皮内リンパ球の CD8 $\alpha\alpha$ + $\gamma\delta$ T 細胞が減少していた。Villin-Cre IL-7/IL-15cKO マウスではこれがさらに大きく減少していた。したがって、腸管上皮細胞が産生する IL-15 が、IL-7 とともに腸管上皮内 $\gamma\delta$ T 細胞の分化・維持に一定の働きをしていることが明らかとなった。

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 17 件)

Shinoda, K., Hirahara, K., Inuma, T., Ichikawa, T., Suzuki, A., Sugaya, K., Tumes, D. J., Yamamoto, H., Hara, T., Tani-ichi, S., Ikuta, K., Okamoto, Y., and Nakayama, T. Thy-1⁺IL-7⁺ lymphatic endothelial cells in iBALT provide a survival niche for memory T-helper cells in allergic airway inflammation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., in press, 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1512600113

Terashima, A., Okamoto, K., Nakashima, T., Akira, S., Ikuta, K., and Takayanagi, H. Immunosuppression caused by sepsis-induced osteoblast ablation. Immunity, in press, 査読有

Adachi, T., Kobayashi, T., Sugihara, E., Yamada, T., Ikuta, K., Pittaluga, S., Saya, H., Amagai, M., and Nagao, K. (2015). Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident memory T cell homeostasis and lymphoma. Nat. Med., 21: 1272-1279, 査読有
DOI: 10.1038/nm.3962

Abe, A., Tani-ichi, S., Shitara, S., Cui, G.,

Yamada, H., Miyachi, H., Kitano, S., Hara, T., Abe, R., Yoshikai, Y., and Ikuta, K. (2015). An enhancer of the IL-7 receptor α -chain locus controls IL-7 receptor expression and maintenance of peripheral T cells. J. Immunol., 195: 3129-3138, 査読有
DOI: 10.4049/jimmunol.1302447

Wagatsuma, K., Tani-ichi, S., Liang, B., Shitara, S., Ishihara, K., Abe, M., Miyachi, H., Kitano, S., Hara, T., Nanno, M., Ishikawa, H., Sakimura, K., Nakano, M., Kimura, H., and Ikuta, K. (2015). STAT5 orchestrates local epigenetic changes for chromatin accessibility and rearrangements by direct binding to the TCR γ locus. J. Immunol., 195: 1804-1814, 査読有
DOI: 10.4049/jimmunol.1302456

Alp, Ö. S., Durlanik, S., Schulz, D., McGrath, M., Grün, J. R., Bardua, M., Ikuta, K., Sgouroudis, E., Riedel, R., Zehentmeier, S., Hauser, A. E., Tsuneto, M., Melchers, F., Tokoyoda, K., Chang, H-D., Thiel, A., and Radbruch, A. (2015). Memory CD8⁺ T cells colocalize with IL-7⁺ stromal cells in bone marrow and rest in terms of proliferation and transcription. Eur. J. Immunol., 45: 975-987, 査読有
DOI: 10.1002/eji.201445295

Tsuneto, M., Kajikhina, E., Seiler, K., Reimer, A., Tornack, J., Bouquet, C., Simmons, S., Knoll, M., Wolf, I., Tokoyoda, K., Hauser, A., Hara, T., Tani-ichi, S., Ikuta, K., Grün, J. R., Grützkau, A., Engels, N., Wienands, J., Yanagisawa, Y., Ohnishi, K., and Melchers, F. (2014). Environments of B cell development. Immunol. Lett., 157:60-63, 査読有
DOI: 10.1016/j.imlet.2013.11.011.

Cui, G., Hara, T., Simmons, S., Wagatsuma, K., Abe, A., Miyachi, H., Kitano, S., Ishii, M., Tani-ichi, S., and Ikuta, K. (2014). Characterization of the interleukin-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 111:1915-1920, 査読有
DOI:10.1073/pnas.1318281111

Tsuneto, M., Tokoyoda, K., Kajikhina, E., Hauser, A. E., Hara, T., Tani-ichi, S., Ikuta, K., and Melchers, F. (2013). B cell progenitors and precursors change their microenvironment in fetal liver during early development. Stem Cells, 31:2800-2812, 査読有
DOI:10.1002/stem.1421

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., and Nakayama, T. (2013). CD49b-dependent establishment of T helper cell memory. *Immunol. Cell Biol.*, 91:524-531.
DOI:10.1038/icb.2013.36

Shitara, S., Hara, T., Liang, B., Wagatsuma, K., Zuklys, S., Holländer, G. A., Nakase, H., Chiba, T., Tani-ichi, S., and Ikuta, K. (2013). Interleukin-7 produced by thymic epithelial cells plays a major role in the development of thymocytes and TCR $\gamma\delta^+$ intraepithelial lymphocytes. *J. Immunol.*, 190:6173-6179,
査読有
DOI:10.4049/jimmunol.1202573

〔学会発表〕(計5件)

阿部真也、原崇裕、生田宏一：腸管関連リンパ組織における IL-7 ニッチの同定と特徴、BMB2015、神戸、2015年12月1日

原崇裕、生田宏一：Identification and characterization of IL-7 niche in gut-associated lymphoid tissue、第44回日本免疫学会学術集会、札幌、2015年11月19日

谷一靖江、我妻慶祐、生田宏一：Role of a TCR γ enhancer, E γ 4, in differentiation and function of $\gamma\delta$ T cell subsets、第42回日本免疫学会学術集会、千葉、2013年12月11日

Hara, T., Cui, G., Shitara, S., Tani-ichi, S. and Ikuta, K. Visualization and characterization of IL-7- and IL-15-expressing cells in vivo. The 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2013, Kyoto, June 4-5, 2013.

Ikuta, K., Cui, G., Shitara, S., Liang, B., Tani-ichi, S., and Hara, T. Visualization of the immune microenvironment by reporter mice. The 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2013, Kyoto, June 7, 2013.

原崇裕、崔広為、生田宏一：Distribution and function of IL-7- and IL-15-expressing cells in intestines、第43回日本免疫学会学術集会、京都、2014年12月12日

Cui, G., Hara, T., Simmons, S., Ishii, M., Tani-ichi, S., Ikuta, K.: Characterization of the IL-15 niche in vivo. The 6th FIMSA Congress, Singapore, July 1, 2015.

原崇裕、崔広為、生田宏一：Distribution and function of IL-7- and IL-15-expressing cells in intestines、第43回日本免疫学会学術集会、京都、2014年12月12日

西嶋仁、森本純子、毛利安宏、河野弘、生田宏一、松本満：Approaches to identify Aire-regulated non-tissue-restricted antigen genes by the ectopic expression of Aire in thymic cortex、第43回日本免疫学会学術集会、京都、2014年12月10日

榛葉旭恒、谷一靖江、増田喬子、原崇裕、河本宏、生田宏一：Differential roles of IL-7 and IL-2 receptor signals in lymphocyte development and maintenance revealed by IL-7R α /IL-2R β chimera knock-in mice、第43回日本免疫学会学術集会、京都、2014年12月10日

Cui, G., Hara, T., Simmons, S., Wagatsuma, K., Abe, A., Ishii, M., Tani-ichi, S., and Ikuta, K.: Identification and characterization of IL-15-expressing cells in vivo. The 9th International Symposium of the Institute Network, Osaka, June 19, 2014.

原崇裕、崔広為、設楽宗一郎、生田宏一：Distribution and function of IL-7-expressing cells in intestines、第42回日本免疫学会学術集会、千葉、2013年12月11日

〔その他〕

ホームページ等

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