

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670213

研究課題名(和文) Notch/IL-7R axisによるCD30L依存性感染防御機構

研究課題名(英文) Host defense against bacterial infection in Notch/IL-7Ralpha axis and CD30L dependent manner.

研究代表者

吉開 泰信 (Yoshikai, Yasunobu)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：90158402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：IFN- γ 産生型 T細胞には胎生期胸腺のCD4-CD8-ダブルネガティブ(DN)細胞のDN2aステージから直接分化するものとDN3ステージから分化する2種類が存在した。一方、IL-17A産生 T細胞はDN2bのステージからNotch1/Hes1、Notch1/Bcl11b依存性、およびNotch-RBP-J -IL-7R に直接分化するということがわかった。IL-17A産生 T細胞は選択的にCD30L/CD30を発現しており、リステリアおよびMycobacterium bovis (BCG)感染早期の防御にCD30L/CD30が重要であることが明らかした。

研究成果の概要(英文)：Early T cell precursors at the double-negative (DN) 2 or 3 stages in fetal thymus are committed to IL-17A or IFN- γ T cells. We found that IL-17A T cells developed directly from DN2b cells in Notch/Hes1, Notch/Bcl11b and Notch/IL-7R -dependent pathways, whereas two types of IFN- γ T cells developed from DN2a or DN3 stage in fetal thymus, respectively. CD30 and CD30L were selectively expressed by IL-17A T cells and the number was drastically reduced in CD30L or CD30 knock out mice. In vivo administration of soluble CD30 protein (CD30-Ig) impaired the early protection against *Listeria monocytogenes* or *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infection, while agonistic anti-CD30 monoclonal antibody enhanced the protection by activating the IL-17A T cells. CD30L/CD30 signaling plays an important role in the activation of IL-17A T cells at the early stage for protection against bacterial infection.

研究分野：細菌学

キーワード：NOTCH Bcl11b IL-7R IL-17A IFN- γ T細胞 CD30L CD30

1. 研究開始当初の背景

1992年にCD30遺伝子が(Cell 68:421,1992)、1993年にCD30リガンド(CD30L)遺伝子がクローニングされた(Cell 73:1349,1993)。CD30はおもに活性化T細胞に発現され、そこからのシグナルはTRAF1,2,3,5を介して、増殖、分化、アポトース抑制などに働く。一方、CD30Lも活性化T細胞に発現される。CD30LはタイプIIの膜型タンパク質でN末端が短い細胞内ドメインを形成するが、そのリバースシグナルはTh17細胞分化を阻害するIL-2産生を抑制する(J.Immunol.185:2222-30, 2010)。CD30L/CD30は、T-T相互作用によりT細胞機能分化に関与していると考えられる。(Annu.Rev.Immunol. 23:23, 2005. Immunology. 118: 143-152, 2006)。我々はマウスのin vitroの培養系の解析からCD30L/CD30シグナルは $\alpha\beta$ 型Th17細胞の分化に関与していることを示した。(J.Immunol 185:2222-30, 2010)。in vivo実験でも炎症性腸炎モデル(ハプテン誘導腸炎、CD45陽性T細胞移入SCIDマウス、オキザゾロン誘導腸炎、デキストラン硫酸誘導腸炎)でTh17細胞の誘導に(Gastroenterology 134:447-458, 2008. J.Immunol.185:7671-80, 2010)、アレルギー性鼻炎や喘息モデルでTh2細胞応答に(J.Allergy.Clin. Immunol. 118:942-8.2006, Eur.J.Immunol.41:2947-54,2011)CD30L/CD30シグナルの関与を報告した。一方、IL-7R α はナイーブT細胞のみならず、IL-17を産生する自然免疫リンパ球やTh17細胞、さらにメモリーT細胞に発現が高いことが知られている(Nat Rev Immunol. 11:330-42,2011)。CD30LはIL-7によって誘導されるという報告があり、またNotchシグナルがIL-7R α の発現に関与している(J.Immunol. 174: 6686-6691,2005)。これらの結果からNotchシグナルがIL-7R α の発現を誘導し、IL-7RからのシグナルはCD30LをT細胞に発現させ、さらにCD30LからのリバースシグナルがIL-2産生を抑制することでIL-17A産生T細胞の機能分化に働くことが考えられる。

2. 研究の目的

CD30/CD30は活性化T細胞に同時に発現され、T-T細胞相互作用によって、CD30からのシグナルとCD30LからのリバースシグナルがIL-17A産生T細胞の機能分化に関与する。我々の今までの研究成果などからNotchシグナルがインターロイキン(IL)-7R α の発現を誘導し、IL-7RからのシグナルはCD30LをT細胞に発現させ、さらにCD30LからのリバースシグナルがIL-2産生を抑制することでIL-17A産生T細胞の機能分化に働くという仮説をたてた。本研究はNotch/IL7-R α /CD30Lの一連のプロセスが $\gamma\delta$ 型Th17細胞と $\alpha\beta$ 型Th17細胞の機能分化と細菌感染防御機構としての働く機序を解明し、Notch/IL7-R α /CD30Lによる感染症制御法の開発研究を行う。

3. 研究の方法

(1)IL-17A産生T細胞の分化維持におけるNotch/IL7-R α 制御機構
T細胞は胸腺で分化する過程でNotchシグナルとIL-7Rシグナルが必要であるが、両者の関連性は不明である。Dll4-Notch1の持続的シグナルによるIL-7R α の分子機構産生の分子機構を明らかにする。胎生期胸腺のCD4-CD8-double negative (DN)ステージをさらにCD44、CD25、CD117の発現でCD44+CD25-CD117+(DN1)ステージ、CD44+CD25+CD117+(DN2)ステージ、CD44^{low}CD25+CD117-(DN3)ステージにわけて、IFN- γ 産生型とIL-17A産生型の $\gamma\delta$ 型T細胞のIL-7R α がどのステージから発現するのかまたDll4/Notch1シグナルがその決定に関与しているのかDLL4発現ストローマ細胞株(TSt4-Dll4; Ikawa et al. Science. 329:93-6, 2010)を用いたin vitro培養系で解析する。

In vivoでのIL-17A産生型 $\gamma\delta$ 型T細胞の分化でのNotchシグナルのIL-7R α 関与について、intracellular Notch遺伝子を導入した胎生期肝細胞(Hozumi et al. J Exp Med. 205:2507-13,2008)を放射線照射マウスに移入して胸腺および末梢組織でのIFN- γ 産生型とIL-17A産生型の自然免疫T細胞をフローサイトメーターで解析する。Rosa26-loxP-stop-loxP-ICN1-IRES-GFP x MX1-CreマウスでNotchシグナルを末梢で強制的に誘導したマウスとNotchシグナルノ下流転写因子conditional RBP-Jノックアウト(KO)マウス、(Rag1Cre x RBP-J(fl/fl)マウス)を用いてin vivoで解析する。DLL4/Notch1シグナルで誘導されるIL-7R α (Gonzalez-Garcia S, J Exp Med, 2009)のT細胞の機能獲得と維持での役割を明らかにするためにIL-7R α KOマウスの胸腺と末梢組織でのIFN- γ 産生型とIL-17A産生型の $\gamma\delta$ 型T細胞を解析する。IL-7R α KOマウスではTCR γ 鎖遺伝子の再構成が起こらないので我々が既に作成しているTCR γ 鎖トランスジェニックマウスとかけあわせて分化してきた $\gamma\delta$ 型T細胞のIFN- γ 産生型とIL-17産生型を胸腺と末梢組織で検討する。
(2)感染防御機構におけるCD30L/CD30制御機構の役割

*Listeria monocytogenes*を用いた急性感染症モデルと*Mycobacterium bovis* (BCG)を用いた慢性感染症モデルでのintracellular Notch遺伝子を導入した胎生期肝細胞(Hozumi et al. J Exp Med. 205:2507-13, 2008)を放射線照射マウスに移入したマウスとRosa26-loxP-stop-loxP-ICN1-IRES-GFP x MX1-CreマウスでNotchシグナルを末梢で強制的に誘導したマウスを用いてIL-17A産生 $\gamma\delta$ 型T細胞をフローサイトメトリーにて解析して、Notch依存性を比較検討する。

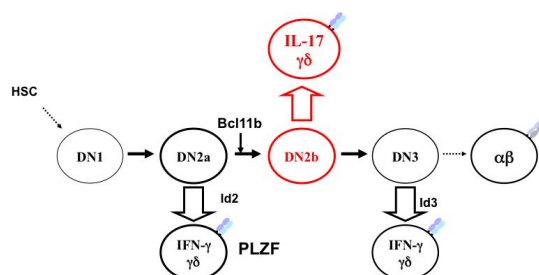
in vivoでのCD30L/CD30の役割を*Listeria monocytogenes*を用いた急性感染症モデルと*Mycobacterium bovis* (BCG)(を用いたBALB/c及びC57BL/6背景のCD30LKOマウスおよび

CD30KO マウスの感染実験で、生存率、菌数、IL-17A 産生 $\gamma\delta$ 型 T 細胞と $\alpha\beta$ 型 CD4+Th17 細胞の運命を解析する。

CD30-免疫グロブリン融合蛋白(CD30-Ig)および antagonistic CD30L 抗体を用いた阻害実験、agonistic CD30 抗体を用いた刺激実験によって急性感染、慢性感染症での応用研究を行う。まず *in vitro* のおけるこれらの生物学的製剤の効果を知るために抗原特異的 CD4+T 細胞を使って、抗原特異的 CD4+T 細胞と CD30LKO マウスからの樹状細胞で抗原特異的応答を調べる。さらに抗原刺激した Wild type および CD30LKO マウスの抗原特異的 CD4+T 細胞を混合培養して抗原特異的応答が変化するか検討する。次に CD30-Ig で阻害実験、agonist CD30 抗体を用いた *in vivo* での急性および慢性感染実験によって、生存率、菌数、 $\gamma\delta$ 型および $\alpha\beta$ 型 T 細胞のサイトカイン産生能を調べる。

4. 研究成果

(1)Notch / IL-7R シグナルの T 細胞の胸腺で分化における役割を明らかにするために、胎生期胸腺の CD4-CD8-double negative (DN)細胞を Notch-1 リガンドである DLL4(delta-like 4)を発現するストロマ細胞株 (TSt4-DLL4) を用いて *in vitro* 培養系で解析した。その結果、DN2 から分化した $\gamma\delta$ 型 T 細胞は IFN- γ と IL-17A 産生型とともに分化できるが、DN3 から分化できるのは IFN- γ 産生型だけであった。さらに BCL11bKO マウスでの DN2a までしか分化できない胸腺の $\gamma\delta$ 型 T 細胞は IFN- γ 産生型であり、IL-17A 産生型には分化できないことがわかった。IFN- γ 産生型には DN2a から直接分化する $\gamma\delta$ 型 T 細胞と DN3 から分化する $\gamma\delta$ 型 T 細胞の 2 種類が存在し、IL-17A 産生 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は DN2b のステージから BCL11b 依存性に直接分化するということが



わかった。(図 1)

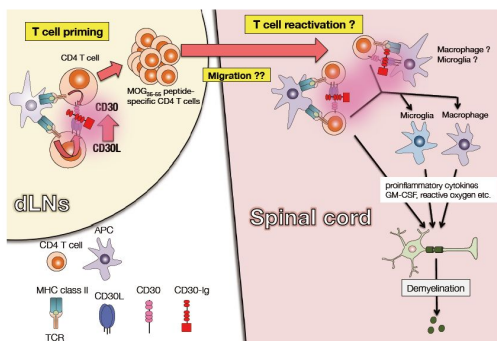
IL-17A 産生 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の生体恒常性における Notch/IL-7R α /CD30L 経路の関与を調べるために、Notch 標的遺伝子の網羅的遺伝子解析を ICN1(intracellular Notch1)に対する抗体を用いた ChIP-seq を行った。その結果、Hes1、TCF1、CD25、BCL11b、Nr4a1 に加えて IL-7R α の新規プロモーター部位を同定できた。一方、CD30L は ICN が結合しないことがわかった。恒常的な Notch シグナルは、試験管内だけでなく生体内においても $\gamma\delta$ 型 T 細胞上の IL-7R α 発現を誘導する潜在能力を有した。一方で RBP-J κ の条件付き遺伝子破

壊は、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞による IL-7R α 発現を抑制したが Hes1 発現を抑制せず、末梢組織での IL-7R α high IL-17A 産生 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の貯蔵量を選択的に減少させた。成体マウスでは、IL-7R α を介したシグナルの欠如によって IL-17A 産生 $\gamma\delta$ 型 T 細胞はほとんど維持されなかった。試験管内で外因性の IL-7 を加えると、選択的に IL-17A 産生 $\gamma\delta$ 型 T 細胞が増殖した。以上、我々の結果は、Hes1 とは独立した Notch-RBP-J κ -IL-7R α 経路の、IL-17A 産生 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の生体恒常性に対する新たな役割を明らかにした。

(2)CD30L/CD30 遺伝子欠損マウスを用いて、IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の末梢組織での維持機構、さらに感染防御機構における CD30L/CD30 シグナルの役割について検討を行った。CD30L または CD30 KO マウスの末梢組織での V γ 1-V γ 4- $\gamma\delta$ 型 T 細胞数が有意に低下しており、逆に V γ 1+T 細胞と V γ 4+T 細胞は増加していた。RT-PCR の解析では V γ 1-V γ 4- $\gamma\delta$ 型 T 細胞は V γ 6 と V δ 1 遺伝子を発現しており、CD30L または CD30 KO マウスで V γ 6 と V δ 1 mRNA が消失していた。細胞内サイトカイン解析では IL-17A 産生 V γ 1-V γ 4- $\gamma\delta$ 型 T 細胞が認められたが CD30L または CD30 KO マウスで有意に減少した。一方、IFN- γ 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の割合は変わらなかった。CD30L KO マウスにリステリアまたは BCG を腹腔内接種したところ、CD30LKO マウスでは感染後早期 (リステリアでは 3 日目、BCG では 7 日目) の腹腔内での菌排除能が有意に低下していた CD30L 欠損マウスでは、感染早期の腹腔内の IL-17 の低下が見られ、IL-17 産生 V γ 1-V γ 6- $\gamma\delta$ 型 T 細胞が有意に減少していた。抗 CD30 アゴニスト抗体投与により CD30L 欠損マウスの感染早期で低下していた菌排除能が回復した。一方で、野生型マウスに可溶性 CD30-免疫グロブリン融合蛋白 (CD30-Ig) を投与して CD30L/CD30 シグナルを阻害すると感染早期の菌排除能が低下した。以上より V γ 6 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の末梢の維持と活性化に CD30L/CD30 シグナルが重要であることがわかった。

CD30L/CD30KO マウスを用いて、IL-17A 産生 $\alpha\beta$ T 細胞の末梢組織で機能分化における CD30L/CD30 シグナルの役割について、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) の系で検討を行った。CD30L または CD30 KO マウスの末梢組織で抗原特異的 IL-17A 産生 CD4T 細胞の産生が有意に減少し、EAE も軽減した。CD30-Ig の EAE 誘導期に投与のみならず、発症期に投与しても EAE の程度を抑制することができた。骨髄キメラマウスの解析によると、骨髄由来細胞の CD30L が特に重要であり、CD4 T 細胞の CD30L 逆方向性シグナルは Th17 細胞分化に必要ではなかった。以上より、CD30L/CD30 シグナルは、抗原特異的 CD4 Th17 細胞応答に関わっていることが明らかとなり、この CD30L/CD30 シグナルが

Th17 細胞関与する炎症性疾患の新たな治療標的となる可能性が示された (図 2)。



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 8 件)

1. Shinoda K., Sun X., Oyamada A., Yamada H., Muta H., Podack E.R., Kira J., and Yoshikai Y.
CD30 ligand is a new therapeutic target for central nervous system autoimmunity. *J.Autoimmunity* 57:14-23. 2015
doi:10.1016/j.jaut.2014.11.005.
2. Nakamura M, Shibata K, Hatano S, Sato T, Ohkawa Y, Yamada H, Ikuta K, and Yoshikai Y.
A genome-wide analysis identifies a notch-RBP-J κ -IL-7R α axis that controls IL-17-producing $\gamma\delta$ T cell homeostasis in mice. *J.Immunol.* 194:243-51, 2015
doi:10.4049/jimmunol.1401619.
3. Hashiguchi T., Oyamada A., Sakuraba K., Iwamoto Y., Yoshikai, Y. and Yamada H. Tyk2-dependent bystander activation of conventional and non-conventional Th1 cell subsets contributes to innate host defense against *Listeria monocytogenes* infection. *J.Immunol.* 192:4739-47. 2014. doi: 10.4049/jimmunol.1303067.
4. Shibata K., Yamada H., Nakamura M., Katsuragi Y., Kominami R. and Yoshikai Y.
IFN- γ -producing and IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells differentiate at distinct developmental stages in murine fetal thymus. *J.Immunol.* 192:2210-2218, 2014. doi:10.4049/jimmunol.1302145.
5. Guo Y., Sun X., Shibata K., Yamada H., Muta H., Podack, ER and Yoshikai Y.
CD30 is required for activation of a unique subset of IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells in innate immunity against *Mycobacterium*

bovis Bacillus Calmette-Guérin infection. *Infect. Immun.* 81:3923-34. 2013.

doi:10.1128/IAI.00887-13.

6. Yamada, H., Shibata, K., Sakuraba, K., Fujimura K., and Yoshikai Y.
Positive selection of self antigen-specific CD8 T cells by hematopoietic cells in mice. *Eur. J. Immunol.* 43:2033-42. 2013.
doi:10.1002/eji.201242957.
7. Sun X., Shibata K., Yamada H., Guo Y., Muta H., Podack E.R. and Yoshikai Y.
CD30L/CD30 is critical for maintenance of IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells bearing V γ 6 in mucosa-associated tissues in mice. *Mucosal Immunol.* 6:1191-201. 2013.
doi:10.1038/mi.2013.18.
8. Miyake Y., Toyonaga K., Mori D., Kakuta S., Hoshino Y., Oyamada A., amada H., Ono K., Suyama M., Iwakura Y., Yoshikai Y. and Yamasaki.S. C-type lectin MCL is an FcR-coupled receptor that mediates the adjuvanticity of mycobacterial cord factor. *Immunity.* 38:1050-62. 2013.
doi:10.1016/j.immuni.2013.03.010.

[学会発表] (計 8 件)

1. Koji Shinoda, Xun Sun, Akiko Oyamada, Hisakata Yamada, Hiromi Muta, Jun-ichi Kira, Yasunobu Yoshikai. CD30 ligand is a target for a novel biological therapy against EAE. 第 55 回日本神経学会学術集会, (2014, 5.21-5.24)福岡市.
2. Koji Shinoda, Xun Sun, Akiko Oyamada, Hisakata Yamada, Hiromi Muta, Eckhard R Podack. Jun-ichi Kira, Yasunobu Yoshikai. CD30 Ligand is a New Therapeutic Target for Central Nervous System Autoimmunity. the 7th Congress of the Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (PACTRIMS), (2014.11.6-11.8) Taipei.(中华民国)
3. Shinya Hatano, Kensuke Shibata, Hisakata Yamada, Yasunobu Yoshikai.
IFN- γ -producing and IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells differentiate at distinct developmental stages in murine fetal thymus. 第 43 回日本免疫学会学術集会, (2014.12.10-12)京都市
4. 村上哲晋, 畑野晋也, 柴田健輔, 山田久方, 吉開泰信. IL-17A+ $\gamma\delta$ cells are required for the protection against *Klebsiella pneumoniae* at infant stage 第 88

回日本細菌学会総会, (2015.3.26-28)
岐阜市

5. 畑野晋也, 柴田健輔, 山田久方, 大原直也, 田村敏生, 吉開泰. Development of a recombinant BCG expressing murine IL-7 as a novel vaccine against tuberculosis. 第 88 回日本細菌学会総会, (2015.3.26-28)岐阜市
6. Kensuke Shibata, Hisakata Yamada, Masataka Nakamura, Yasunobu Yoshikai. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells develop directly from double-negative 2 cells in murine fetal thymus in Bcl11b-dependent manner. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会, (2013.12.11-13)千葉市
7. Masataka Nakamura, Kensuke Shibata, Hisakata Yamada, Koichi Ikuta, Yasunobu Yoshikai. Notch-RBP-Jk-IL-7R α pathway plays a pivotal role in the maintenance of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会, (2013.12.11-13)千葉市
8. Ying Guo, Xun Sun, Kensuke Shibata, Hisakata Yamada, Hiromi Muta, Eckhard R.Podack, Yasunobu Yoshikai. A novel role of CD30L/CD30 signaling by naturally occurring IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells in response against Mycobacterium bovis BCG. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会, (2013.12.11-13)千葉市

〔 図 書 〕 (計 3 件)

1. 吉開 泰信. 臨床免疫 アレルギー 科 「 $\gamma\delta$ 型 T 細胞からの IL-17 産生」 2014,61(3) 241-247.
2. 吉開 泰信. 標準免疫学 第 3 版「第 II 部 免疫システムの基本メカニズム 第 2 章 誘導的メカニズム【外来性抗原排除のメカニズム】A 細菌感染に対する反応」 2013, 270-280.
3. 吉開 泰信. 丸善出版「リップンコット イラストレイテッド免疫学 原書 2 版」 自然免疫を構成する細胞群 2013, 37-44 (編集 矢田純一, 高橋秀美)

〔 産業財産権 〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :

権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔 その他 〕
ホームページ等
<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/kansenseigyo/home0.html>

6 . 研究組織
(1)研究代表者

吉開泰信 (Yoshikai Yasunobu)
九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号 : 90158402

(2)研究分担者
()

研究者番号 :

(3)連携研究者
()

研究者番号 :