

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460572

研究課題名(和文) T細胞の末梢でのホメオスタシスにおけるTCRシグナル要求性

研究課題名(英文) Requirement of TCR signal for the maintenance of gamma/delta T cells in peripheral tissue

研究代表者

谷一 靖江 (Tani-ichi, Shizue)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50432331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ナイーブ T細胞の末梢でのホメオスタシスには、TCRとIL-7レセプターからの2つのシグナルが必要である。一方、T細胞のホメオスタシスにはIL-15とIL-7のシグナルが必要であることは分かっているが、TCRシグナルの要求性は分かっていない。マウス TCRのリガンドはほとんど分かっていないため、今回は TCRの発現を低下させることでTCRシグナルを弱めることを試みた。その結果、末梢のCD27+CD45RB<sup>high</sup>のIFN $\gamma$ 産生型 T細胞のみ特異的に減少した。この結果は、少なくとも一部の T細胞サブセットはそのホメオスタシスにTCRシグナルを必要としていることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Homeostasis of T cells in peripheral tissue requires both TCR and IL-7 receptor signal. Although it is known that T cells require IL-15 and IL-7 signal, it remains unknown whether T cells require TCR signal for their homeostasis. Because the ligands for murine TCR remain unclear, we tried to attenuate TCR signal by down-regulating TCR expression. To do this, we generated mice lacking one of the enhancers in the TCR locus. In this knockout mice, CD27+CD45RB<sup>high</sup> IFN $\gamma$ -producing T cell subsets in the peripheral lymphoid tissue were specifically reduced. Maintenance of this subset transferred to Rag2KO mice was impaired in enhancer knockout mice. These data suggest that at least CD27+CD45RB<sup>high</sup> IFN $\gamma$ -producing T cells require TCR signal for their homeostasis in peripheral tissue.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 TCR ホメオスタシス

# 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ナイーブ $\alpha\beta$  T 細胞の末梢リンパ組織でのホメオスタシスには、T 細胞抗原受容体(T cell receptor; TCR)とサイトカイン IL-7 受容体(IL-7 receptor; IL-7R)からの2つのシグナルが必須である。一方、 $\gamma\delta$  T 細胞のホメオスタシスには、IL-15とIL-7のシグナルが必要であることは知られているが、TCRからのシグナルが必要かどうかは分かっていない。

IL-7はリンパ球の初期分化において生存と増殖をサポートするサイトカインである。そのため、IL-7欠損マウスでは胸腺で $\alpha\beta$  T 細胞が激減する。また、 $\gamma\delta$  T 細胞のTCR $\gamma$ 鎖V-J組換えにはIL-7シグナルが必須であるため、IL-7欠損マウスでは $\gamma\delta$  T 細胞が胸腺で完全に欠失する。このように、サイトカイン欠損マウスではT細胞の分化に障害が生じてしまうが、末梢のT細胞のホメオスタシスにサイトカインが必要かどうかは、野生型(WT)マウスから単離したT細胞をサイトカイン欠損マウスへ移植することで調べることができる。 $\alpha\beta$  T 細胞と $\gamma\delta$  T 細胞のホメオスタシスにサイトカインIL-7やIL-15が必要かどうかは、サイトカイン欠損マウスへ、WTマウスのT細胞を移植することによって確認することができる。

$\alpha\beta$ TCRからのシグナルがナイーブ $\alpha\beta$  T 細胞のホメオスタシスに必要なかどうかは、MHC欠損(TCRへの抗原提示ができない)マウスへ移植したWTマウス由来のナイーブ $\alpha\beta$  T 細胞が生存できないことから明らかにされた。ところが、 $\alpha\beta$  T 細胞と同じように、 $\gamma\delta$  T 細胞のホメオスタシスにとって $\gamma\delta$ TCRからのシグナルが必要かどうかを調べることは非常に難しい。なぜなら、 $\gamma\delta$  T 細胞のTCRに対するリガンドは、ヒトでは近年になっていくつか明らかになったものの、マウスにおいてはほとんど分かっておらず、また、 $\alpha\beta$ TCRに対する抗原提示がMHCを介して行われるのに対し、 $\gamma\delta$ TCRへの抗原提示が何らかの分子を介して行われるのかも明確になっていないからである。マウスで唯一分かっている $\gamma\delta$ TCRのリガンドに、non-classical MHC class IのT10/T22がある。T10/T22を欠損させても脾臓の $\gamma\delta$  T 細胞は減少しないことから、 $\gamma\delta$  T 細胞のホメオスタシスにはTCRシグナルは必要ないと結論付けている論文も存在する。しかし、ex vivoの実験では、 $\gamma\delta$ TCRはpre-TCRと同じように、リガンドがなくてもレセプターのダイマー形成によってシグナルを伝達することができる」と報告されていることから、リガンド欠損=TCRシグナルが入らない、とは言えず、 $\gamma\delta$  T 細胞のホメオスタシスにTCRシグナルが必要かどうかは未だに明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

$\gamma\delta$  T 細胞のホメオスタシスが、 $\alpha\beta$  T 細胞と同じようにTCRからのシグナルに依存しているのかどうかを調べる。

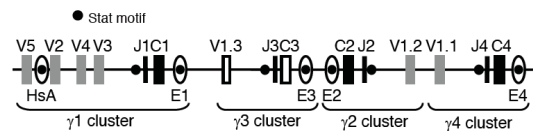
## 3. 研究の方法

TCRシグナル伝達分子(例えば、LATなど)を欠損させると、胸腺での $\gamma\delta$  T 細胞が障害されることから、 $\gamma\delta$  T 細胞のホメオスタシスにTCRシグナルが必須であること明確である。しかし、現在のところ、末梢組織特異的、かつ $\gamma\delta$  T 細胞特異的なCreトランスジェニックマウスは存在しない。そこで我々は、 $\gamma\delta$ TCRの発現を低下させることで $\gamma\delta$ TCRからのシグナルを減弱させられないかと考えた。我々は、TCR $\gamma$ 遺伝子の転写制御についての研究を行っており、過去にTCR $\gamma$ 遺伝子座のエンハンサーが転写因子Stat5とRunxによって活性化することを報告している。そこで、エンハンサー欠損マウスを作製し、TCR $\gamma$ 鎖の発現量の低下→細胞表面の $\gamma\delta$ TCR低下→ $\gamma\delta$ TCRシグナル減弱ができるかを試み、このエンハンサー欠損マウスの $\gamma\delta$  T 細胞の胸腺と末梢での表現系を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) E $\gamma$ 4欠損マウスの胸腺 $\gamma\delta$ T 細胞の分化

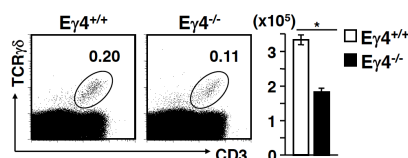
下図のように、TCR $\gamma$ 遺伝子座はホモロジーの高い4つのクラスターから形成されている。



(V $\gamma$ 1.3はpsuedo gene)

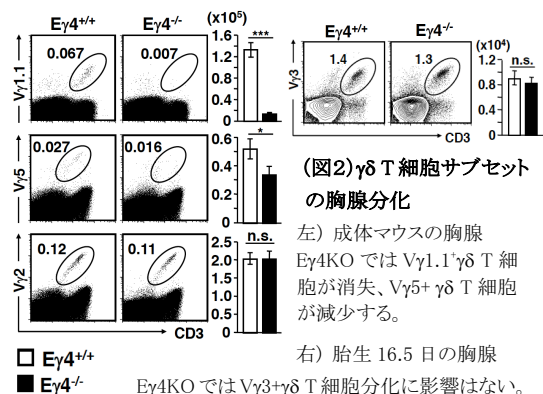
過去にエンハンサーE $\gamma$ 1の欠損マウスは報告されており、 $\gamma\delta$  T 細胞の分化には影響がないことが報告されている。本研究では、最も3'側に存在するエンハンサーE $\gamma$ 4の欠損(E $\gamma$ 4KO)マウスを作製した。

まず、E $\gamma$ 4KOマウスの胸腺 $\gamma\delta$  T 細胞分化を解析したところ、E $\gamma$ 4KOマウスでは、胸腺の $\gamma\delta$  T 細胞が約1/2に減少していた(図1)。



(図1) E $\gamma$ 4KOマウスでは胸腺 $\gamma\delta$  T 細胞が半減する。

次に、E $\gamma$ 4KOマウスの胸腺 $\gamma\delta$  T 細胞をサブセットごとに観察した(図2)。



(図2)  $\gamma\delta$  T 細胞サブセットの胸腺分化

左) 成体マウスの胸腺  
E $\gamma$ 4KOではV $\gamma$ 1.1 $^+$  $\gamma\delta$  T 細胞が消失、V $\gamma$ 5 $^+$   $\gamma\delta$  T 細胞が減少する。

右) 胎生16.5日の胸腺

E $\gamma$ 4KOではV $\gamma$ 3 $^+$  $\gamma\delta$  T 細胞分化に影響はない。

Ey4KO マウスでは、Ey4 に最も近い V $\gamma$ 遺伝子である V $\gamma$ 1.1 陽性の  $\gamma\delta$  T 細胞がほぼ完全に消失していた。また、Ey4 から最も遠位に存在する V $\gamma$ 5 陽性の  $\gamma\delta$  T 細胞も減少していた。しかし、V $\gamma$ 2, V $\gamma$ 3 陽性の  $\gamma\delta$  T 細胞の分化には影響がなかった(図2)。抗 V $\gamma$ 4 抗体、抗 V $\gamma$ 1.2 抗体は存在しないので直接解析することはできないが、他の抗体との組み合わせから、胎児胸腺の V $\gamma$ 4<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞は減少しておらず、V $\gamma$ 1.2<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞は胎児・成体マウスのいずれの胸腺でも減少していることがわかった(not shown)。

## (2) Ey4KO マウスの胸腺 $\gamma\delta$ T 細胞の V-J 組換えと転写

TCR や BCR 遺伝子座に存在するエンハンサーは転写だけではなく、V-J 組換えを促進することがある。そこで、Ey4KO マウスの胸腺で一部の  $\gamma\delta$  T 細胞サブセットが減少している原因が V-J 組換えによるものか、転写の低下によるものかを調べた。成体マウスの CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>細胞、胎生 16.5 日マウスの胸腺細胞の V-J 組換えをリアルタイム PCR で測定した。その結果、Ey4KO マウスではエンハンサーに最も近い V $\gamma$ 1.1-J $\gamma$ 4 の V-J 組換えが著しく障害されており、検出感度以下になっていた。また、Ey4 の隣のクラスターの V $\gamma$ 1.2-J $\gamma$ 2 の組換えが 1/10 以下に低下していた。一方、Ey4 から離れたクラスターにある V $\gamma$ 5, 2, 4, 3-J $\gamma$ 1 の V-J 組換えには WT マウスと Ey4KO マウスの間で差はなかった(図3)。

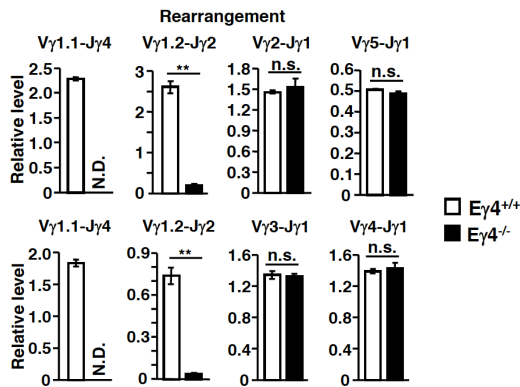


図3) Ey4KO マウスの胸腺 V-J 組換え

上段) 成体マウスの胸腺 V-J 組換え

下段) 胎生 16.5 日の胸腺 V-J 組換え

次に、組換え後の V-J 遺伝子の転写量をリアルタイム PCR で測定した。その結果、Ey4 に近い V $\gamma$ 1.1-J $\gamma$ 4, V $\gamma$ 1.2-J $\gamma$ 2 の転写が激減しているだけでなく、離れたクラスターの V $\gamma$ 5, 2, 4, 3-J $\gamma$ 1 の転写も約 1/2~1/3 に減少していることが判明した(図4)。

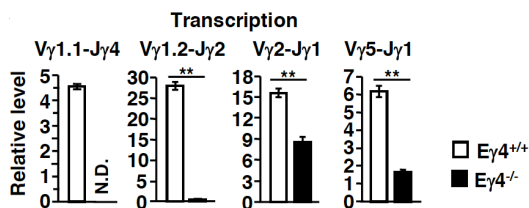


図4) Ey4KO マウスの胸腺 V-J 転写

上) 成体マウスの胸腺 V-J 転写(組換えで補整後)

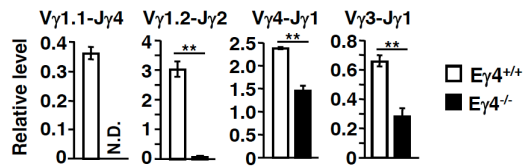


図4つづき) Ey4KO マウスの胸腺 V-J 転写

上) 胎生 16.5 日の胸腺 V-J 転写(組換えで補整後)

これらの結果から、Ey4KO マウスでの V $\gamma$ 1.1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞の欠損は V-J 組換えの障害に起因し、V $\gamma$ 5<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞の減少は転写の低下によるものだと考えられた。

## (3) Ey4KO マウスの末梢 $\gamma\delta$ T 細胞

まず、胎児胸腺で分化し、皮膚上皮層へ移行する V $\gamma$ 3<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞を調べたが、WT と Ey4KO マウスで細胞数に差はなかった(not shown)。

リンパ節や脾臓の  $\gamma\delta$  T 細胞の大部分は V $\gamma$ 1.1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞と V $\gamma$ 2<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞が占める。Ey4KO マウスのリンパ節と脾臓の V $\gamma$ 1.1<sup>+</sup> と V $\gamma$ 2<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞を調べたところ、Ey4KO マウスの胸腺では正常に分化していた V $\gamma$ 2<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞がリンパ節と脾臓では減少していた(図5)。

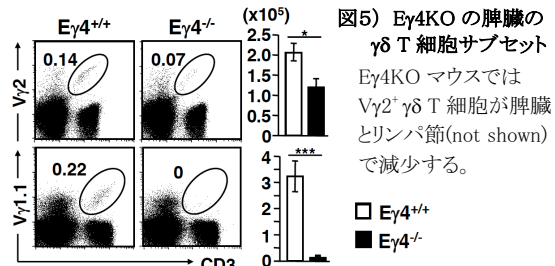


図5) Ey4KO の脾臓の  $\gamma\delta$  T 細胞サブセット

Ey4KO マウスでは V $\gamma$ 2<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞が脾臓とリンパ節(not shown)で減少する。

$\gamma\delta$  T 細胞は、機能的に2つのサブセットに分けることができる。CD27<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>の集団は IFN $\gamma$ 産生型、CD27<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>の集団は IL-17 産生型であることが知られる。そこで、Ey4KO マウスで減少している V $\gamma$ 2<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞を IFN $\gamma$ 型と IL-17 型に分けて観察した。その結果、Ey4KO マウスでは CD27<sup>+</sup>の IFN $\gamma$ 産生型のみ減少していることがわかった(図6)。さらに、近年報告されたマーカーを組み合わせると観察したところ、Ey4KO マウスでは CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞の数には変化がなく、CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞だけが特異的に減少していることがわかった(not shown)。

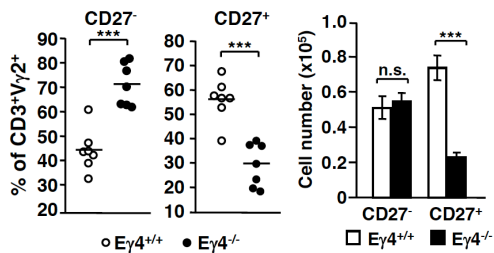


図6) Ey4KO マウスにおける V $\gamma$ 2<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞の IFN $\gamma$ 産生型と IL-17 産生型

左) 脾臓の V $\gamma$ 2<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞の CD27<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>の割合

右) 脾臓の V $\gamma$ 2<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 細胞の CD27<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>の細胞数

また、E $\gamma$ 4KO マウスでは末梢の CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞において、V $\gamma$ 2 TCRの転写量が低下しており、細胞表面の V $\gamma$ 2 TCR の発現レベルも低下していた(図7)。

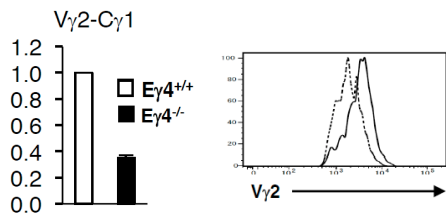


図7) CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞の TCR 転写量と細胞表面発現

左) 脾臓とリンパ節から単離した CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞の TCR V $\gamma$ 2 鎖の転写量をリアルタイム PCR で定量した。右)リンパ節の CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞 TCR V $\gamma$ 2 鎖の細胞表面発現。実線 = WT, 点線 = E $\gamma$ 4KO

しかし、TCR シグナルの強さの指標である CD5 の発現は WT と E $\gamma$ 4KO マウスの CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞において差はみとめられなかった(not shown)。そこで、CD5 以外に TCR シグナルの強度の指標として使われる Egr3 と Nr4a1(Nur77)の発現を調べたところ、E $\gamma$ 4KO マウスでこれらの発現量が低下していることが確認できた(図8)。

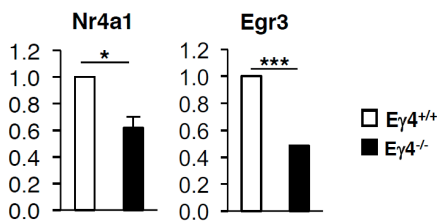


図8) CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞の TCR シグナル強度

脾臓とリンパ節から単離した CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞の Nr4a1 と Egr3 の mRNA をリアルタイム PCR で定量した

以上の結果から、少なくとも CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> の V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞は TCR シグナルが弱まると、末梢リンパ組織での数が減少することが明らかになった。

(4) E $\gamma$ 4KO マウス由来 CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞の末梢でのホメオスタシス

胸腺の V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞は主に CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> であり、CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞はほとんど検出されない(not shown)。また、CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup>  $\gamma$  $\delta$  T 細胞を lymphopenic マウスに移植すると、増殖に伴い CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> へと変化することがすでに報告されていることから、V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞は末梢組織で CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> から CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> へと分化すると考えられる。したがって、E $\gamma$ 4KO マウスで観察される CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞の末梢リンパ組織での減少には、以下の2つの原因が可能性として挙げられる。

1) CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> から CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> への分化が障害されている

2) CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> の集団のホメオスタシスが障害されている

この2つの可能性を検証するため、WT(CD45.1) と E $\gamma$ 4KO マウス(CD45.2)の脾臓とリンパ節から CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞を単離し、1:1 で混合して Rag2KO マウスに移植、1ヶ月後に移植した細胞の CD45.1 と CD45.2 の割合を調べた。その結果、E $\gamma$ 4KO マウス由来の V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞は、WT マウスに比べて、常に維持されている割合が少ないことがわかった(図9)。

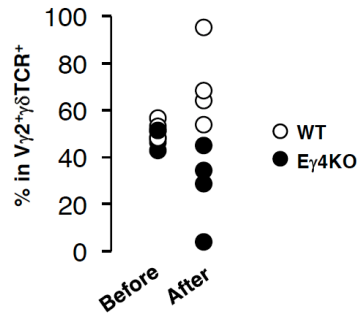


図9) Rag2KO マウス移植後の生存維持

WT(CD45.1) と E $\gamma$ 4KO マウス(CD45.2)の脾臓とリンパ節から CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞を単離し、1:1 で混合して (Before)、Rag2KO マウスに移植1ヶ月後(After)のリンパ節における WT と E $\gamma$ 4KO の割合。脾臓でも同様のデータが得られている(not shown)。

この結果は、すでに CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> へ分化した V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞のホメオスタシスが E $\gamma$ 4KO マウス由来の細胞では低下していることを示している。

$\gamma$  $\delta$  T 細胞のホメオスタシスには、IL-15 と IL-7 が重要である。もし、E $\gamma$ 4KO マウスの V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞において、IL-7R と IL-15R の発現が低下していると、TCR シグナル減弱によるホメオスタシスの低下を論じることができない。そこで、E $\gamma$ 4KO マウスの CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞の IL-7R と CD122(IL-15R $\beta$ 鎖)の発現をフローサイトメトリーで調べたが、いずれの発現も WT と E $\gamma$ 4KO マウスの間で差は認められなかった(not shown)。

以上の結果から、少なくとも CD27<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> V $\gamma$ 2<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$  T 細胞の末梢リンパ組織でのホメオスタシスには TCR シグナルが必要である可能性が示唆された。

### 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2件)

- ① 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, Nakao M, Kimura H, Ikuta K. (\*equal contribution) STAT5 orchestrates local epigenetic

changes for chromatin accessibility and rearrangements by direct binding to the TCR $\gamma$  locus.

*The Journal of Immunology.*, 査読有、195(4)、2015、1804-1814.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26195811>

DOI:10.4049/jimmunol.1302456.

- ② Abe A, Tani-ichi S, Shitara S, Cui G, Yamada H, Miyachi H, Kitano S, Hara T, Abe R, Yoshikai Y, Ikuta K.

An enhancer of the IL-7 receptor  $\alpha$ -chain locus controls IL-7 receptor expression and maintenance of peripheral T cells.

*The Journal of Immunology.*, 査読有、195(7)、2015、3129-3138.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26336149>

DOI: 10.4049/jimmunol.1302447.

〔学会発表〕（計3件）

- ① 谷一靖江、生田宏一：末梢組織でのガンマデルタT細胞維持におけるTCRシグナルの必要性：第24回Kyoto T Cell Conference、2014年5月17日、京都

- ② Tani-ichi S. and Ikuta K.: Role of TCR $\gamma$  enhancer 'E $\gamma$ 4' for the development and function of  $\gamma\delta$  T cells: International Congress of Immunology、2016年8月22日、メルボルン

- ③ Cui G., Shimba A., Tani-ichi S. Hara T. and Ikuta K.: Competitive signaling between STAT5 and PI3K of the IL-7R modulates T cell development and homeostasis in vivo: International Congress of Immunology、2016年8月23日、メルボルン

〔図書〕（計0件）

〔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/Lab/Ikuta-Lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷一 靖江 (TANI-ICHI, Shizue)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号： 50432331

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし