

胸腺上皮細胞が産生する **IL-7** は
胸腺細胞の分化と **TCR $\gamma\delta$ ⁺**腸上皮内
リンパ球の分化に重要である

設樂 宗一郎

目次

要旨	1
略称一覧	2
序論	4
材料と方法	7
結果	11
考察	31
総括	35
発表論文目録	36
謝辞	37
引用文献	38

要旨

サイトカイン IL-7 は T 細胞の分化と生存に重要である。しかし、胸腺上皮細胞や腸上皮細胞が産生する IL-7 の局所的な機能に関しては明らかにされていない。そこで、私はまず IL-7-flox マウスと胸腺上皮細胞で Cre を発現する FoxN1-Cre マウスを交配することで、胸腺上皮細胞で IL-7 の発現を欠損した IL-7 コンディショナルノックアウトマウスを樹立した。このマウスの胸腺では $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞が劇的に減少していたが、成熟シングルポジティブ胸腺細胞の割合は増加しており、 $CD4^+$ シングルポジティブ胸腺細胞の胸腺外への移出が減少していた。また、リンパ節や脾臓では胸腺と比較して細胞数の減少率が小さくなっていたことから、末梢組織で恒常性維持のための T 細胞の増殖が起きていることが示唆された。さらに、胎児胸腺では $\gamma\delta$ T 細胞が欠失しているとともに、胎児胸腺型の $\gamma\delta$ T 細胞が分布する皮膚上皮において $\gamma\delta$ T 細胞が欠失していた。また、これまで胸腺外分化の可能性が示唆されてきた小腸上皮内の $\gamma\delta$ T 細胞が顕著に減少していた。次に、IL-7-flox マウスと腸上皮細胞で Cre を発現する villin-Cre マウスを交配することで、腸上皮細胞で IL-7 の発現を欠損した IL-7 コンディショナルノックアウトマウスを樹立した。このマウスの小腸では $TCR\alpha\beta^+$ 腸上皮内リンパ球 と $TCR\gamma\delta^+$ 腸上皮内リンパ球に変化は無かった。

以上の結果は、胸腺上皮細胞が産生する IL-7 が胸腺細胞の増殖、生存、成熟、移出に重要であること、特に $\gamma\delta$ T 細胞の分化に必須であることを示している。また、胸腺上皮細胞が産生する局所的な IL-7 が $TCR\gamma\delta^+$ 腸上皮内リンパ球の分化に必須であることから、 $TCR\gamma\delta^+$ 腸上皮内リンパ球の分化が胸腺で起こることを示唆している。

略称一覧

AIRE, autoimmune regulator

APC, allophycocyanin

BSA, bovine serum albumin

BSS, balanced salt solution

CD, cluster of differentiation

DN, double negative

DP, double positive

EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid

ETP, early thymic progenitor

FACS, fluorescence activated cell sorter

FBS, fetal bovine serum

FITC, fluorescein isothiocyanate

FoxN1-Cre, FoxN1 promoter-driven Cre

HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase

HSA, heat stable antigen

IL-7, interleukin 7

IL-7R α , IL-7 receptor α -chain

K5, keratin 5

MFI, mean fluorescent intensity

MHC II, MHC class II

NK, natural killer

NKT, natural killer T

PBS, phosphate-buffered saline

PE, phycoerythrin

PI, propidium iodide

rIL-2, recombinant interleukin 2

SP, single positive

SPF, specific pathogen free

STAT5, signal transducers and activators of transcription 5

S1P, sphingosine 1-phosphate

S1P1, sphingosine 1-phosphate receptor 1

TCR, T cell receptor

Tg, transgenic

UEA1, ulex europaeus agglutinin-1

Vil-Cre, villin promoter-driven Cre

序論

IL-7 の機能

IL-7 はリンパ球の分化と生存に重要なサイトカインとして知られている。またその受容体である IL-7R は共通 γ 鎖 と固有の IL-7R α 鎖で構成される。IL-7 や IL-7R α の遺伝子欠損マウスは T 細胞と B 細胞が劇的に減少する (1, 2)。また、IL-7 は胸腺や骨髄において早期リンパ球の増殖と生存を制御しており、胸腺における CD8 T 細胞の分化にも重要である (3, 4)。さらに、IL-7R とそのシグナル分子である STAT5 は IgH 遺伝子座と TCR γ 遺伝子座の V(D)J 組換えを制御している (5-7)。また、末梢組織では、IL-7 はナイーブ T 細胞と記憶 T 細胞の生存と増殖を制御している (8)。

IL-7 の局在

IL-7 は骨髄、胸腺、リンパ節、皮膚、腸管、肝臓などで産生される。IL-7 mRNA は、胸腺では胸腺上皮細胞と間葉系ストローマ細胞で (9, 10)、骨髄では間葉系ストローマ細胞で検出されている (11)。末梢組織において、IL-7 mRNA はリンパ節 T 細胞領域の細網線維芽細胞、表皮の上皮細胞、腸管の上皮細胞などで検出されている (12-14)。近年、IL-7 レポーターマウスによって、胸腺、骨髄、末梢のリンパ器官で IL-7 産生細胞の局在が確認された (15-18)。しかしながら、各々の細胞が産生する IL-7 の局所における機能は不明であった。

腸上皮内リンパ球の分化

TCR $\alpha\beta$ ⁺集団と TCR $\gamma\delta$ ⁺集団から成る腸上皮内リンパ球の分化には共通 γ 鎖のサイトカインが重要である。IL-7 遺伝子欠損マウスで $\gamma\delta$ T 細胞が胸腺と腸管で欠失していることから、IL-7 が TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球の分化に必須であることが示唆される (19)。また、細胞系譜マッピング実験によって、TCR $\alpha\beta$ ⁺腸上皮内リンパ球は胸腺で分化し、腸管に移動した細胞集団である

ことが示されている (20)。一方、 $\text{TCR}\gamma\delta^+$ 腸上皮内リンパ球は、正常な胸腺を持たないヌードマウスで減少するものの存在していることから (21)、胸腺で分化するという説と胸腺外で分化するという説があり、未解決の問題である。

IL-7 の局所機能と $\text{TCR}\gamma\delta^+$ 腸上皮内リンパ球の起源

私は IL-7 の局所的機能と $\text{TCR}\gamma\delta^+$ 腸上皮内リンパ球の起源を明らかにするために、IL-7-flox マウスと FoxN1-Cre マウスまたは Vil-Cre マウスを交配し、胸腺上皮細胞または腸上皮細胞で IL-7 遺伝子を欠損したマウスを作製し、解析を行った (図 1)。その結果、胸腺上皮細胞で IL-7 遺伝子を欠損したマウスにおいて、胸腺細胞の細胞数の顕著な減少とシングルポジティブ胸腺細胞の集団に変化が生じることから、胸腺上皮細胞が産生する IL-7 が正常な T 細胞分化に重要であることを明らかにした。また、胸腺上皮細胞で IL-7 遺伝子を欠損したマウスでは $\text{TCR}\gamma\delta^+$ 腸上皮内リンパ球が劇的に減少する一方、腸上皮細胞で IL-7 遺伝子を欠損したマウスでは $\text{TCR}\gamma\delta^+$ 腸上皮内リンパ球に変化が無かったことから、胸腺上皮細胞が産生する IL-7 が $\text{TCR}\gamma\delta^+$ 腸上皮内リンパ球の分化に必須であることを明らかにした。これらの結果から、これまで未解明であった $\text{TCR}\gamma\delta^+$ 腸上皮内リンパ球の起源が胸腺であることが示唆された。

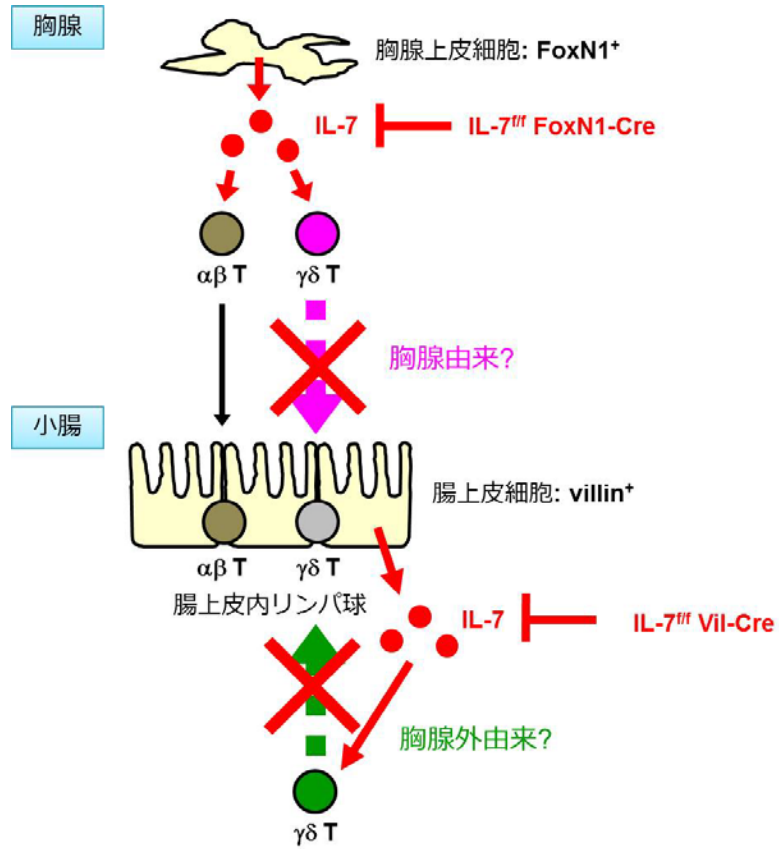


図1. 本研究の構想図

TCR $\gamma\delta^+$ 腸上皮内リンパ球の起源を明らかにするために、IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスと IL-7^{fl/fl} Vill-Cre マウスの2種類のコンディショナルノックアウトマウスを使用した。胸腺または腸管に存在すると考えられている TCR $\gamma\delta^+$ 腸上皮内リンパ球の前駆細胞が IL-7 のシグナルを受けとることができず、 $\gamma\delta$ T 細胞に分化できない条件下で、小腸の TCR $\gamma\delta^+$ 腸上皮内リンパ球が存在しているかどうかを確かめた。

材料と方法

マウス

IL-7-flox マウスは当研究室で作製されたマウスを使用した (22)。FoxN1-Cre Tg マウスは河本宏博士 (理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター) から入手した (23)。Vil-Cre Tg マウスは Jackson 研究所より入手した (24)。これらのマウスは京都大学ウイルス研究所 南部総合研究実験棟の SPF 環境下で飼育した。なお、全ての動物実験は「京都大学動物実験に関する指針」に基づいて行なわれた。

フローサイトメトリー解析

既報の方法に基づき (25)、各細胞 (1×10^6 個) に抗体溶液を 50 μ L 加え、暗所の氷上で 20 分間静置した。抗体反応後、1 mL の 1 x PBS (-) - 0.1% BSA (FACS 溶液) で洗浄し、PI (Sigma) を 1 μ g/mL に調整した FACS 溶液に懸濁した後、ナイロンメッシュに通した。染色した細胞は、FACSCalibur または FACSCantoII フローサイトメーター (Becton Dickinson) と、ソフトウェア FlowJo (Tree Star) を用いて解析した。死細胞ならびに赤血球は、PI、前方散乱光、側方散乱光によって取り除いた。

抗体

フローサイトメトリーによる解析には以下の蛍光色素ないしはビオチン標識抗体を使用した。CD3 (145-2C11)、CD4 (GK1.5)、CD8 α (53-6.7)、TCR β (H57-597)、TCR $\gamma\delta$ (GL3)、CD11b (M1/70)、CD19 (17-0191)、B220 (6B2)、CD25 (PC61)、CD27 (LG3A10)、CD29 (Ha2/5)、CD44 (IM7)、L-selectin (CD62L) (MEL-14)、CD69 (H1.2F3)、c-Kit (2B8)、Gr-1 (RB6-8C5)、TER119、MHC class II (MHC II) (M5/114.15.2)、Qa-2 (69H1-9-9)、NK1.1 (PK136)、HSA (M1/69)、IL-7R α (A7R34)、rat IgG2a isotype control (eBR2a)、S1P1 (713421)。これらの抗体

は eBioscience (San Diego)、BioLegend (San Diego)、Vector Laboratories (Burlingame)、R&D Systems (Minneapolis) から購入した。PE-streptavidin 抗体は eBioscience から購入した。

細胞単離

胸腺上皮細胞は既報の方法に従い単離した (26)。3 週齢のマウスから摘出した胸腺をハサミで細かく切り刻み、collagenase/RPMI 溶液 (0.125% (w/v) collagenase D (Roche) 、0.1% (w/v) DNase I (Roche)) で消化処理した。消化処理後、抗 CD45 抗体マイクロビーズを用いて細胞懸濁液から血液細胞を除去した。非血球系細胞を濃縮した後、APC-Cy7 標識抗 CD45 抗体、FITC 標識抗 MHC II 抗体、Alexa Fluor 647 標識抗 Ly51 抗体、ビオチン化抗 UEA1 抗体を用いて細胞を染色した。その後、PE 標識ストレプトアビジンでさらに染色を行った。

腸上皮内リンパ球と腸上皮細胞は既報の方法に従い単離した (27, 28)。ポリエチレンチューブでマウスの小腸の内外側を反転した。その後、4 等分し、各々の両側を手術糸で縛った。縛った小腸断片を 5% FBS/Hanks 液 (5% FBS, 1 x Hanks' BSS, 10 mM Hepes (pH 7.4)) 中で、37°C、150 rpm、45 分の条件下で振盪した。振盪後、腸内容物と付着系細胞を除去するために、細胞懸濁液をナイロンメッシュとガラスウールカラムに通し、30% Percoll と 40%/70% Percoll による遠心分離によって腸上皮内リンパ球と腸上皮細胞とを分離し、それぞれ回収した。

表皮リンパ球の単離は既報の方法に従い単離した (29)。耳から回収した表皮層を 0.05% トリプシン/EDTA 溶液で 37°C、60 分間消化した。消化反応後、表皮層を 10%FBS/RPMI1640 溶液 (10% FBS, 2 mM L-グルタミン、50 μ M 2-メルカプトエタノール、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン) 中で激しくボルテックスし、表皮からリンパ球を遊離した。遊離後、Lympholyte-M (CEDARLANE) を用いた遠心分離により、表皮上皮細胞を除去した。

免疫蛍光染色

単離した胸腺を OCT compound (Sakura) に包埋し、冷ヘキサンで凍結した。凍結後、クリ

オスタットを用いて厚さ 10 μm の凍結切片を作製し、冷アセトンで固定した。固定後、5% マウス血清/PBS 液 (5% マウス血清、1 x PBS、0.05% Tween 20、1% BSA) でブロッキングした。ブロッキング後、抗 K5 抗体 (Progen Biotechnik) と抗 AIRE 抗体 (松本満博士 (徳島大学) より分与) を用いて、1 次染色を行った。1 次染色後、Alexa Fluor 546 標識抗ラット IgG 抗体と Alexa Fluor 488 標識抗モルモット IgG 抗体を用いて 2 次染色を行った。2 次染色後、PermaFluor (Shandon) で封入し、共焦点レーザーキャニング顕微鏡 (TSC-SP2; Leica) で標本の観察を行った。

表皮層の免疫蛍光染色は既報の方法に従って行った (29)。マウスの耳介を 20 mM EDTA/PBS 溶液中で 37°C、60 分間インキュベートした。その後、表皮層を剥離し、スライドガラス上で冷アセトンを用いて固定した。固定後 FITC 標識抗 MHC II 抗体と PE 標識抗 TCT $\gamma\delta$ 抗体を用いて染色を行った。

逆転写とリアルタイム PCR

RNA 抽出は TRIzol (Invitrogen) を用いて行い、逆転写反応は ReverTra Ace (TOYOBO) と oligo(dT)₁₂₋₁₈ プライマーを用いて行った。リアルタイム PCR は QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) と ROX reference dye (Invitrogen) を用いて増幅を行い、ABI 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems) を用いて検出した。PCR は、まず 95°C 15 秒を 1 回、続いて 95°C 20 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分のサイクルを 45 回行い、最後に反応の特異性を確認するために溶解曲線解析を行った。胸腺細胞 cDNA にて検量線を作製し、PCR 効率を標準化した。各サンプルの転写量は HPRT mRNA で標準化した。使用したプライマーは下記の通りである。IL-7 は 5'-TCCTCCACTGATCCTTGTTTC-3' と 5'-CTTCAACTTGCGAGCAGCAC-3' である。HPRT は 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3' と 5'-GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC-3' である。

血管内胸腺細胞染色

生体内での CD4⁺または CD8⁺シングルポジティブ胸腺細胞の染色は既報の方法に従い(30)、PE 標識抗体を用いて行った。1 μg の PE 標識抗 CD4 抗体または PE 標識抗 CD8 抗体を静脈に投与し、5 分後に胸腺を摘出した。摘出後、胸腺細胞を APC 標識抗 CD4 抗体または APC 標識抗 CD8 抗体で染色した。フローサイトメトリー解析により、PE 標識抗体で染色される血管内に存在する胸腺細胞と APC 標識抗体で染色される胸腺実質部分に存在する胸腺細胞との比率を測定した。

統計処理

得られた結果の有意差は Student *t* 検定により検討した。

結果

胸腺上皮細胞が産生するIL-7はIL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスで顕著に減少する

胸腺上皮細胞が産生する IL-7 の機能を調べるために、IL-7-flox (IL-7^{fl/fl}) マウスと FoxN1-Cre Tg マウスを交配し、胸腺上皮細胞で IL-7 遺伝子の発現を欠損した IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスを得た。まず IL-7 遺伝子の欠失効率を調べるために、IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスからそれぞれ CD45-MHCII⁺Ly51⁺の皮質胸腺上皮細胞と CD45-MHCII⁺UEA1⁺の髄質胸腺上皮細胞を単離し、ゲノム DNA に対する定量的 PCR を行った。その結果、IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの髄質胸腺上皮細胞で IL-7 遺伝子の欠失が確認された (図 2A)。一方、皮質胸腺上皮細胞では IL-7 遺伝子の欠失は部分的であった。この結果は、皮質胸腺上皮細胞が胸腺細胞を包み込む構造を形成するために (31)、胸腺皮質上皮細胞のゲノム DNA に胸腺細胞のゲノム DNA が混入してしまったためであると考えられる。次に IL-7 遺伝子の発現を調べるために、胸腺から全 mRNA を抽出し、逆転写して得た cDNA に対する定量的 PCR を行った。その結果、IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの胸腺で IL-7 mRNA の顕著な減少が見られたことから、胸腺での IL-7 の産生は主に胸腺上皮細胞が担っていることが明らかになった (図 2B)。リンパ節と肝臓でも IL-7 mRNA の軽度な減少が見られたが、これは IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスのリンパ節で T 細胞領域が縮小するのに伴い、IL-7 を産生する細網線維芽細胞が減少したためであると考えられる (32)。また他の臓器では IL-7 mRNA の有意な差は検出されなかった。さらに IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの組織学的解析も行った。IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの胸腺は縮小していたが、皮質と髄質の構造は維持されており (図 2C)、髄質上皮細胞の成熟マーカーである Aire の発現も検出された (図 2D)。これらの結果から、IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスでは胸腺上皮細胞での IL-7 遺伝子発現が欠失しているが、胸腺の構造には変化が無いことが示された。

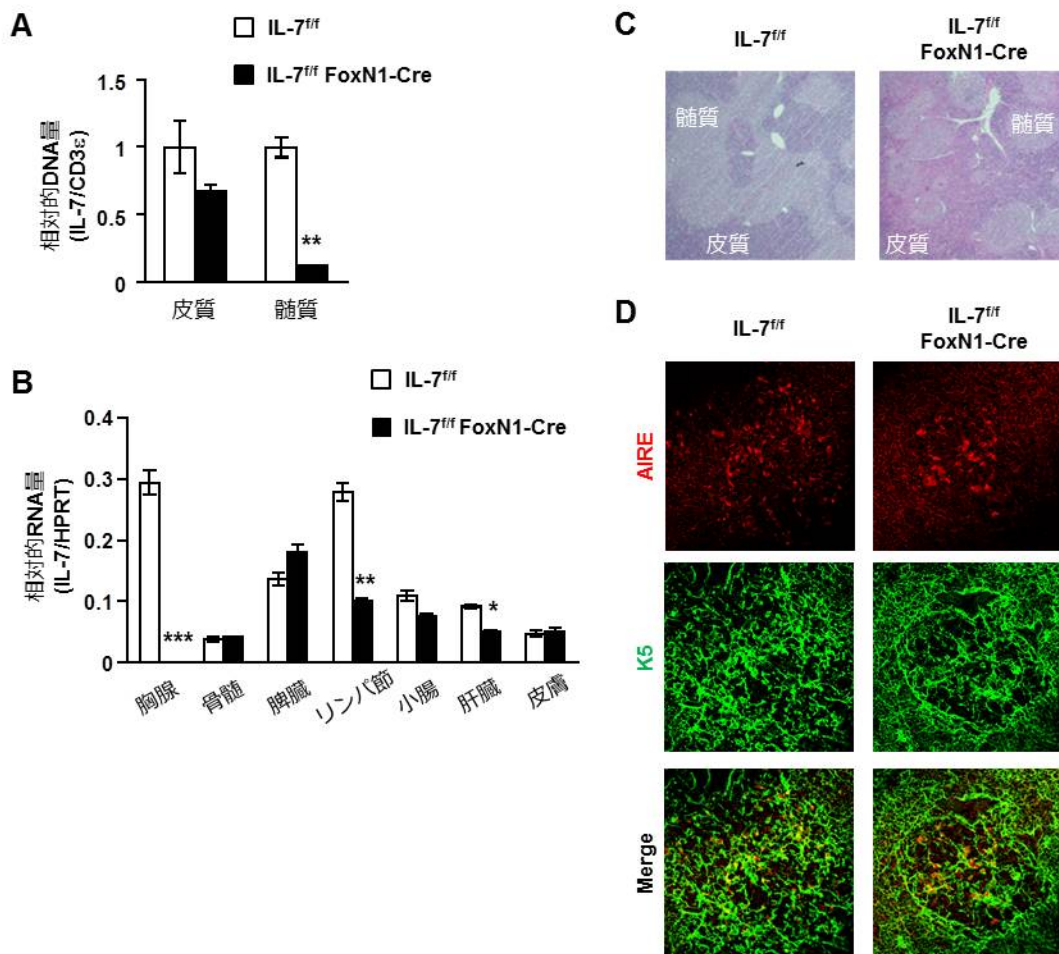


図2. IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの IL-7 発現と胸腺の構造

(A) ゲノム DNA に対する定量的 PCR による IL-7 遺伝子欠損効率の評価。4 週齢の IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの CD45⁻MHCII⁺Ly51⁺UEA1⁻の皮質上皮細胞 (皮質) と CD45⁻MHCII⁺Ly51⁺UEA1⁺の髄質上皮細胞 (髄質) から DNA を回収した。(B) 4 週齢の IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの各臓器における IL-7 mRNA の定量的 PCR。(C) 胸腺のヘマトキシリン・エオジン染色。(D) 胸腺の免疫蛍光染色。抗 Aire 抗体 (赤) と抗 K5 抗体 (緑) を用いた。倍率は 40 倍である。すべての実験は異なるサンプルで 3 回以上行い、再現性を確認した。各グラフ中の*は *p* 値 0.05 未満、**は *p* 値 0.01 未満、***は *p* 値 0.001 未満を示している。

胸腺細胞が IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスで顕著に減少する

これまでに IL-7 ノックアウトマウスで胸腺細胞が 90-95% 以上減少することが報告されているが (2)、胸腺上皮細胞が産生する IL-7 がどのような機能を担っているのかについては不明である。この問題を明らかにするために、IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの胸腺細胞をフローサイトメトリーで解析した。CD4⁺CD8⁺ダブルポジティブ (DP) 胸腺細胞の割合は減少していたが、CD4⁻CD8⁻ダブルネガティブ (DN) 胸腺細胞、CD4⁺CD8⁻シングルポジティブ (CD4 SP) 胸腺細胞、CD4⁻CD8⁺シングルポジティブ (CD8 SP) 胸腺細胞、CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ ($\alpha\beta$ T) 胸腺細胞、CD3⁻NK1.1⁺ (NK) 胸腺細胞、CD3⁺NK1.1⁺ (NKT) 胸腺細胞の割合は変化が無いか、もしくはわずかに上昇していた (図 3A)。一方、CD3⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ ($\gamma\delta$ T) 胸腺細胞の割合は顕著に減少していた。次に細胞数の比較を行った。全胸腺細胞、DN 細胞、DP 細胞、CD4 SP 細胞、CD8 SP 細胞、 $\alpha\beta$ T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞は 1/36、1/13、1/40、1/23、1/23、1/24、1/7、1/11 にそれぞれ減少していた。(図 3B)。特に $\gamma\delta$ T 細胞は 1/180 と顕著に減少していた。これらの結果から、胸腺上皮細胞が産生する IL-7 が T 細胞の分化に重要であること、ならびに $\gamma\delta$ T 細胞の分化に必須であることが示された。

胸腺細胞は IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスで ETP の段階から減少する

胸腺において T 細胞分化は初期胸腺前駆細胞 (ETP) から始まり、DN2a、DN2b、DN3a、DN3b、DN4 と進む (33-35)。胸腺上皮細胞が産生する IL-7 が初期の T 細胞分化にどのような機能を果たしているのか明らかにするために、フローサイトメトリー解析を行った。IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスでは Lineage⁻CD25⁻CD44⁺c-kit^{high} の ETP は 1/580、CD25⁺CD44⁺c-kit⁺⁺⁺ の DN2a は 1/1700 と顕著に減少していた (図 4A、4B)。この減少率は CD25⁺CD44⁺c-kit⁺⁺ の DN2b では 1/39、CD25⁺CD44⁻前方散乱光^{low} の DN3a は 1/94 とわずかに回復している。さらに分化が進んだ CD25⁺CD44⁻前方散乱光^{high} の DN3b は 1/540、CD25⁻CD44⁻の DN4 は 440 分の 1 と再び顕著な減少が認められた。これまでに ETP は IL-7R α を発現するという報告

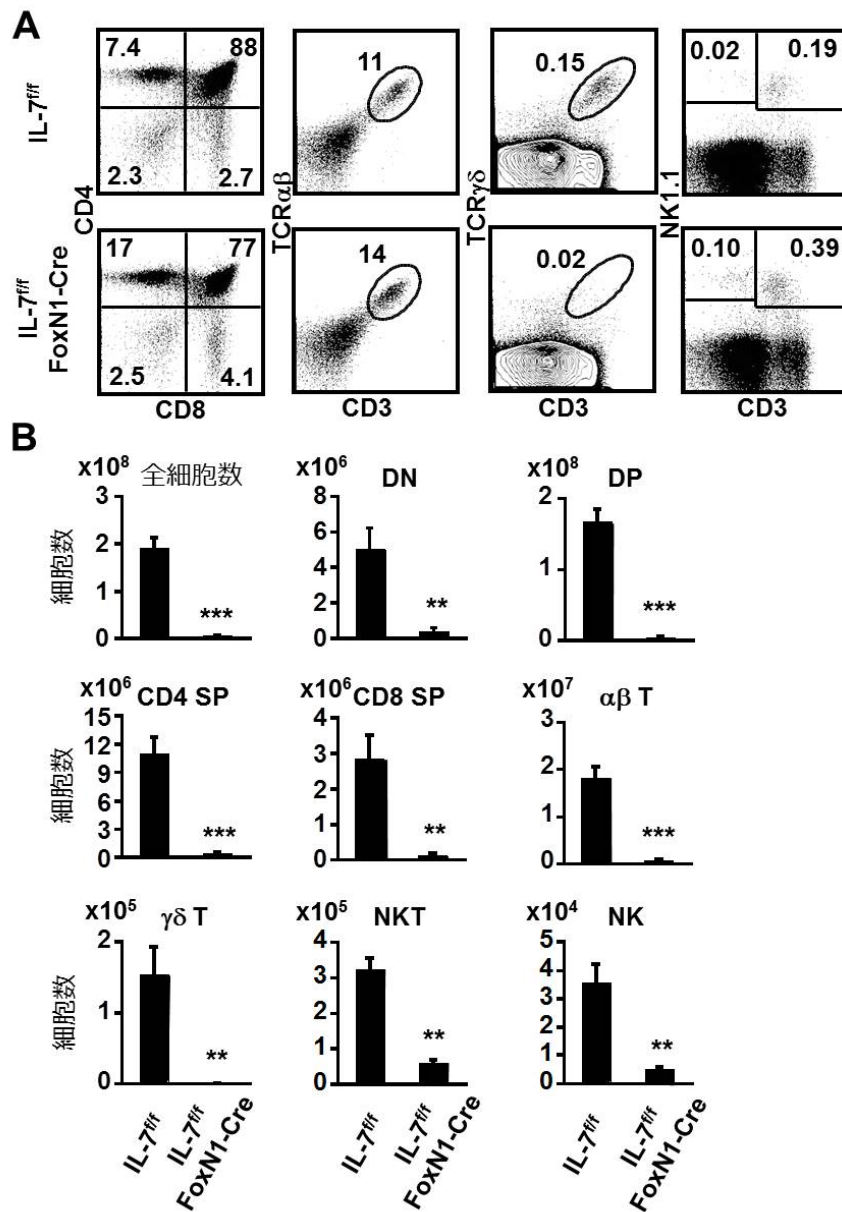


図3. T細胞分化が IL-7^{fl/fl/flx} FoxN1-Cre マウスの胸腺で顕著に阻害される

(A) 4週齢の IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの胸腺細胞のフローサイトメトリー解析。数字は各分画の%を示す。すべての実験は異なるサンプルで4~8回行い、再現性を確認した。(B) 各細胞の絶対数。グラフ中の結果は4~8サンプルの平均値および標準偏差を示す。各グラフ中の**は *p* 値 0.01 未満、***は *p* 値 0.001 未満を示している。

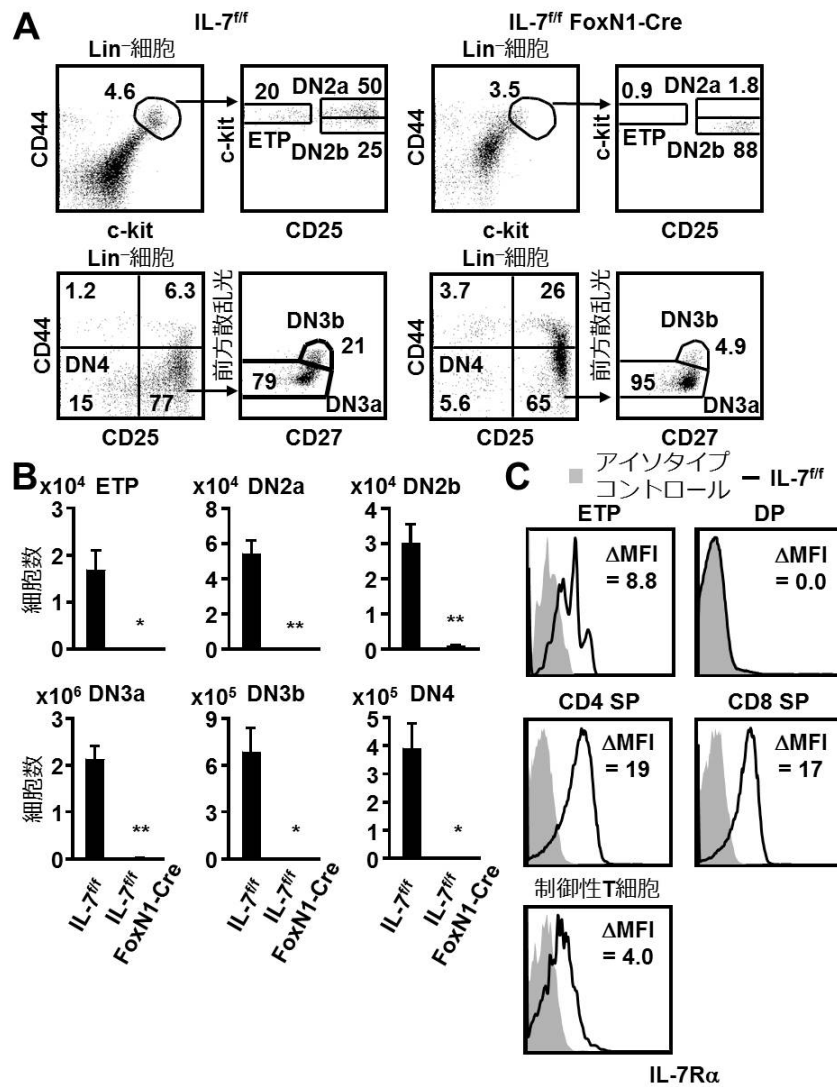


図4. 初期 T 細胞分化は IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの胸腺で顕著に阻害される

(A) 4 週齢の IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの胸腺細胞のフローサイトメリー解析。数字は各分画における%を示し、ETP は CD25⁺CD44⁺c-Kit^{high}、DN2a は CD25⁺CD44⁺c-Kit⁺⁺⁺、DN2b は CD25⁺CD44⁺c-Kit⁺⁺、DN3a は CD25⁺CD44⁻FSC^{low}CD27⁻、DN3b は CD25⁺CD44⁻FSC^{high}CD27⁺、DN4 は CD25⁻CD44⁻胸腺細胞を示す。(B) 各細胞分画の絶対数。(C) ETP、DP 細胞、CD4 SP (CD3⁺CD4⁺CD25⁻NK1.1⁻) 細胞、CD8 SP (CD3⁺CD8⁺) 細胞、制御性 T 細胞 (Treg) (CD3⁺CD4⁺CD25⁺NK1.1⁻) の IL-7Rα の発現検討。ΔMFI は各細胞分画における IL-7Rα とアイソタイプコントロールとの蛍光強度の差を示す。グラフ中の結果は 3 サンプルの平均

値および標準偏差である。各グラフ中の*は p 値 0.05 未満、**は p 値 0.01 未満、***は p 値 0.001 未満を示している。

と発現しないという報告がある (36, 37)。IL-7^{ff} FoxN1-Cre マウスでの ETP の減少が IL-7 シグナルによるものなのかどうかを明らかにするために、ETP における IL-7R α の発現をフローサイトメトリーで解析した。その結果、ETP は CD4 SP 細胞や CD8 SP 細胞と比較すると弱いものの、CD3⁺CD4⁺CD25⁺NK1.1⁻ の制御性 T 細胞と比較すると強い IL-7R α の発現が確認された (図 4C)。これらの結果から胸腺上皮細胞が産生する IL-7 が初期の T 細胞分化に重要であることが明らかになった。

胸腺細胞の成熟が IL-7^{ff} FoxN1-Cre マウスで変化する

IL-7^{ff} FoxN1-Cre マウスで CD4 SP 細胞と CD8 SP 細胞の割合が増加していたことから、胸腺上皮細胞の産生する IL-7 が胸腺細胞の成熟に関与する可能性が示唆された。胸腺細胞は正の選択を受けた後、CD69^{high}HSA^{high}Qa-2^{low}CD62L^{low} の未熟胸腺細胞から CD69^{low}HSA^{low}Qa-2^{high}CD62L^{high} の成熟胸腺細胞に分化が進む (38)。これらの成熟マーカーの発現が IL-7^{ff} FoxN1-Cre マウスで変化するのかを調べるために、CD3^{high} CD4 SP 細胞と CD3^{high} CD8 SP 細胞をフローサイトメトリー解析した。その結果、HSA^{low}Qa-2^{high} の成熟胸腺細胞の集団が増加していた (図 5A, 5B)。この結果から、IL-7^{ff} FoxN1-Cre マウスにおいて成熟胸腺細胞が集積している可能性が示唆された。

IL-7^{ff} FoxN1-Cre マウスで成熟胸腺細胞が集積する理由として、成熟胸腺細胞の胸腺からの移出が滞っている可能性が考えられる。そこで、シングルポジティブ胸腺細胞の成熟過程の最終段階で発現し、胸腺からの移出に関連する S1P1 の発現を調べた (39)。IL-7^{ff} FoxN1-Cre マウスでは CD4 SP 細胞中の S1P1⁺ 集団の割合は変化していなかった (図 5C, 5D)。これ

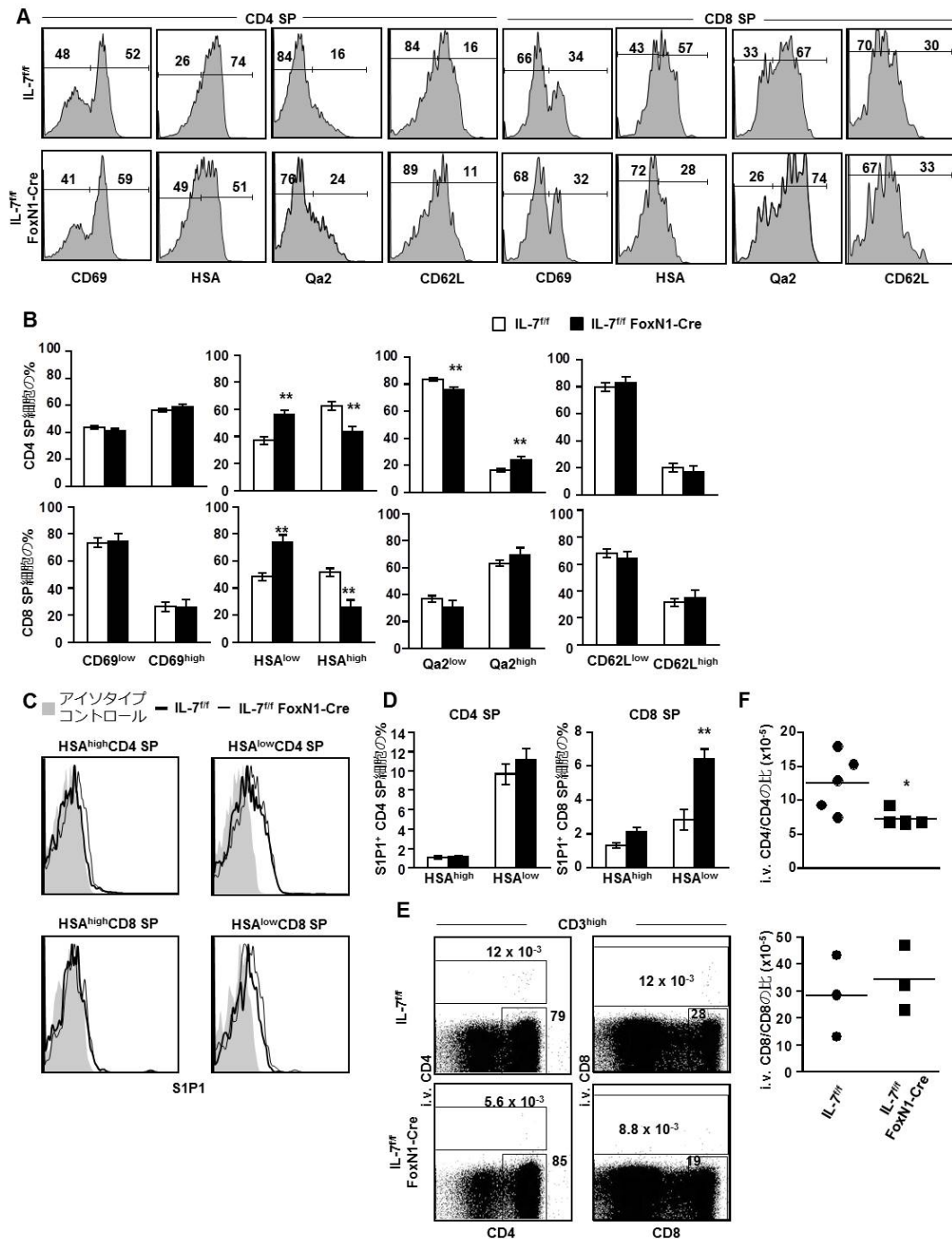


図5. IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの胸腺で成熟 T 細胞の割合が増加する

(A) 4 週齢の IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの CD4 SP 細胞と CD8 SP 細胞のフローサイトメトリー解析。数字は各分画の%を示す。この実験は異なるサンプルで 6 回行い、再現性を確認した。(B) 各細胞画分の%を示す。グラフ中の結果は 6 サンプルの平均値および標準偏差である。(C) CD4 SP 細胞と CD8 SP 細胞の S1P1 の発現を示す。この実験は異なるサンプルで 4 回行い、

再現性を確認した。(D) S1P1⁺ CD4 SP 細胞と CD8 SP 細胞の%を示す。グラフ中の結果は4サンプルの平均値および標準偏差である。(E) 胸腺から移出する細胞の変化を検討するための血管内 CD4-PE 標識 (i.v. CD4) と CD8-PE 標識 (i.v. CD8) SP 細胞のフローサイトメトリーによる検出。数字は各細胞分画における%を示す。この実験は異なるサンプルで 5 回行い、再現性を確認した。(F) 実質部分に存在する APC 標識された SP 細胞に対する血管内に存在する PE 標識された SP 細胞の割合。グラフ中の結果は異なる 5 サンプルの値 (黒丸または黒四角) および平均値 (水平線) である。各グラフ中の*は p 値 0.05 未満、**は p 値 0.01 未満、***は p 値 0.001 未満を示している。

までに短時間の PE 標識抗 CD4 抗体の静脈投与によって、胸腺から移出した直後の細胞を標識する方法が知られている (30)。この血管内細胞標識法によって、IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの CD4 SP で PE 標識された集団がわずかに減少していた (図 5E)。また、APC 標識された胸腺実質部分に存在する CD4 SP 細胞に対する PE 標識された血管内の CD4 SP 細胞の割合が 1/2 程度に減少していた (図 5F)。一方、CD8 SP は胸腺からの移出に変化がなかった。これらの結果から、胸腺上皮細胞が産生する IL-7 が CD4 SP 細胞の胸腺からの移出に関与する可能性が示唆された。

胸腺細胞のインテグリン β 1 の発現が IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスで低下する

これまでの報告で、IL-7 が胸腺細胞の VLA-4 (インテグリン α 4 β 1) の活性化や末梢組織に存在する胸腺から移動してきた T 細胞の VLA-4 の発現を誘導することが知られる (40, 41)。そこで胸腺上皮細胞が産生する IL-7 が胸腺細胞のインテグリンの発現に関与するのかを明らかにするために、IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの胸腺細胞で CD29 (インテグリン β 1) の発現をフローサイトメトリーで解析した。その結果、IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの DN 細胞、DP 細胞、HSA^{high} 未熟 CD4 SP 細胞、HSA^{low} 成熟 CD4 SP 細胞、HSA^{high} 未熟 CD8 SP 細胞、HSA^{low} 成熟

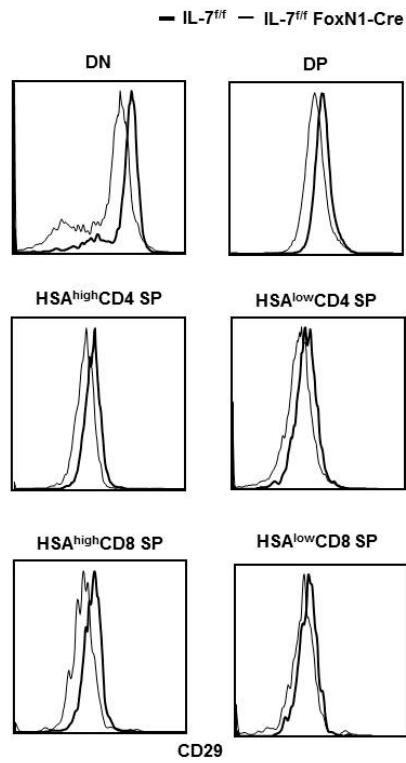


図6. 胸腺細胞のインテグリンβ1 発現が IL-7^{flx/flx} FoxN1-Cre マウスの胸腺で低下する

4 週齢の IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスのインテグリンβ1 (CD29) のフローサイトメトリー解析。この実験は異なるサンプルで 5 回行い、再現性を確認した。

CD8 SP 細胞で CD29 の発現低下が確認された (図 6)。以上の結果から胸腺上皮細胞が産生する IL-7 が T 細胞分化の各ステージにおけるインテグリンの発現を正に制御していることが示唆された。

胎児期の T 細胞分化が IL-7^{ff} FoxN1-Cre マウスで停滞する

これまでに $\gamma\delta$ T 細胞の分化が IL-7R ノックアウトマウスで顕著に障害を受けることが知られている (1)。胎児期の胸腺上皮細胞が産生する IL-7 の機能を明らかにするために、IL-7^{ff} FoxN1-Cre マウスの胎生 17.5 日の胸腺細胞をフローサイトメトリーで解析した。その結果、DP 胸腺細胞の割合が 1/2 になっているのに対して、DN 胸腺細胞の割合は 2 倍になっていた (図 7A)。細胞数は、全胸腺細胞が 1/24、DN 細胞が 1/11、DP 細胞が 1/41 になっていた (図 7B)。さらに、 $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞は欠失していた (図 7A、7B)。これらの結果から、胸腺上皮細胞が産生する IL-7 が胎児期における T 細胞分化にとって非常に重要な役割を担うことが示された。

T 細胞が IL-7^{ff} FoxN1-Cre マウスのリンパ節や脾臓で一部回復する

IL-7 は末梢組織の T 細胞の生存も制御しているが (8)、胸腺上皮細胞で IL-7 を欠損した際に、末梢組織で T 細胞の生存にどのような影響が出るのかは分かっていない。この問題を明らかにするために、まず、IL-7^{ff} FoxN1-Cre マウスのリンパ節をフローサイトメトリーで解析した。その結果、CD3⁺の T 細胞の割合が 1/2 に減少していた (図 8A)。細胞数は全細胞数が 1/2、CD4 T 細胞が 1/6、CD8 T 細胞が 1/3、 $\alpha\beta$ T 細胞が 1/4、 $\gamma\delta$ T 細胞が 1/200、NKT 細胞が 1/2 に減少していた (図 8B)。また B 細胞と NK 細胞は有意な差は認められないものの細胞数の増加傾向が認められた。さらに、CD29 の発現も解析したところ、CD4 T 細胞と CD8 T 細胞で一部発現の上昇が認められた (図 8C)。次に、生存している T 細胞に変化があるのかを調べるために、CD44⁺CD62L⁺ナイーブ T 細胞、CD44⁺CD62L⁺記憶 T 細胞、CD44⁺CD62L⁻活性化 T

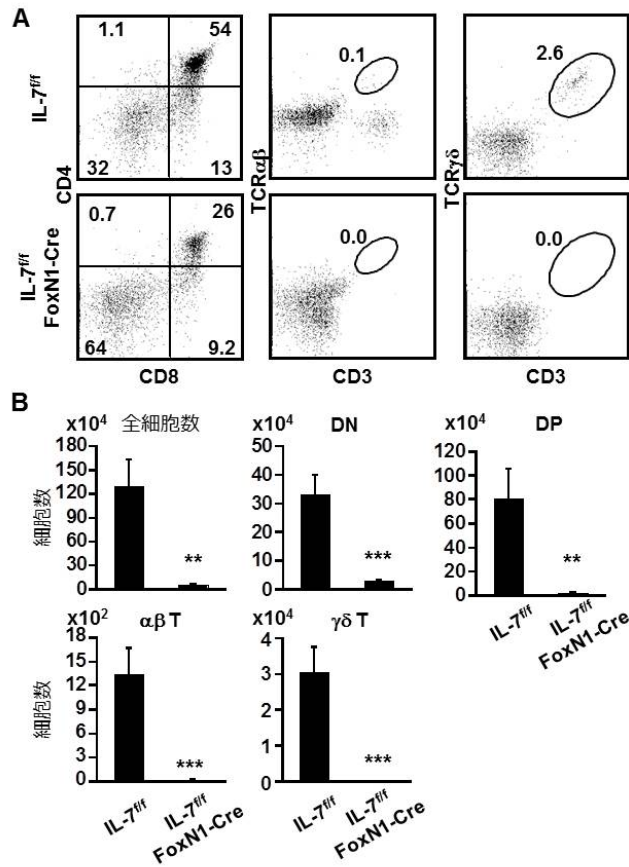


図7. T細胞分化が IL-7^{lox/lox} FoxN1-Cre マウスの胎児胸腺で障害を受ける

(A) 胎生 17.5 日の IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの胸腺細胞のフローサイトメトリー解析。数字は各細胞分画における%を示す。(B) 各細胞の絶対数。グラフ中の結果は 3~5 サンプルの平均値および標準偏差である。各グラフ中の**は p 値 0.01 未満、***は p 値 0.001 未満を示している。

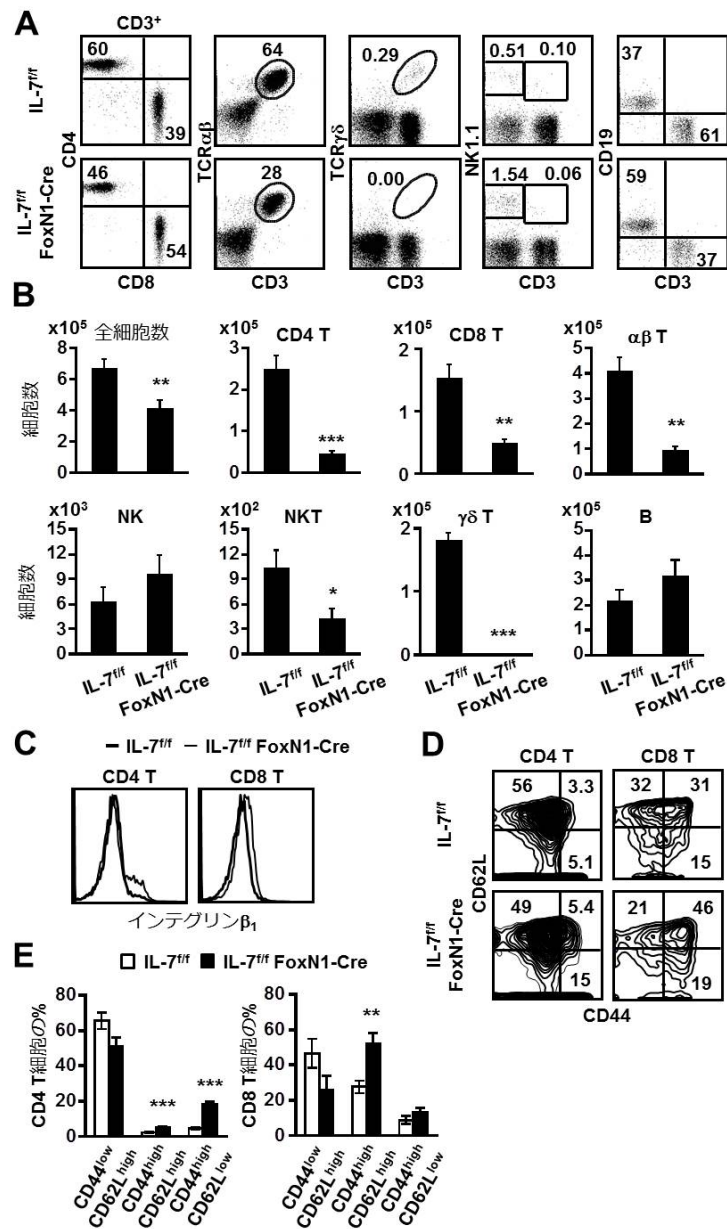


図8. T細胞が IL-7^{lox/lox} FoxN1-Cre マウスのリンパ節で一部回復する

(A) 4週齢の IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスのリンパ節のフローサイトメトリー解析。数字は各細胞分画の%を示す。この実験は異なるサンプルで 7 回行い、再現性を確認した。(B) 各細胞の細胞数を示す。グラフ中の結果は 7 サンプルの平均値および標準偏差である。(C) CD4 T細胞と CD8 T細胞のインテグリン β 1 の発現。この実験は異なるサンプルで 5 回行い、再現性を確認した。(D) CD4 T細胞と CD8 T細胞の CD44 と CD62L の発現。この実験は異なるサンプルで 5 回

行い、再現性を確認した。(E) CD44⁺CD62L⁺ナイーブ T 細胞、CD44⁺CD62L⁺記憶 T 細胞、CD44⁺CD62L⁻活性化 T 細胞の%を示す。グラフ中の結果は異なる 5 サンプルの平均値および標準偏差である。各グラフ中の*は *p* 値 0.05 未満、**は *p* 値 0.01 未満、***は *p* 値 0.001 未満を示している。

細胞をフローサイトメトリーで解析した。IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスのリンパ節では記憶 CD4 T 細胞、活性化 CD4 T 細胞、記憶 CD8 T 細胞の比率が上昇していた。(図 8D、8E)。

次に、IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの脾臓の解析をフローサイトメトリーで行った。細胞数は、CD4 T 細胞が 1/4、CD8 T 細胞が 1/5、 $\alpha\beta$ T 細胞が 1/4、 $\gamma\delta$ T 細胞が 1/16、NKT 細胞が 1/3 に減少していた(図 9A、9B)。また NK 細胞は 2 倍に増加しており、B 細胞は有意な差は認められなかった。さらに、CD29 の発現を解析したところ、CD4 T 細胞と CD8 T 細胞で発現上昇が認められた(図 9C)。また、記憶 CD4 T 細胞、活性化 CD4 T 細胞、記憶 CD8 T 細胞、活性化 CD8 T 細胞の比率が上昇していた。(図 9D、9E)。IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの末梢組織で胸腺と比較して T 細胞数が一部回復したことから、胸腺で IL-7 を欠損した場合でも末梢組織では恒常性維持のための細胞増殖が正常に起こることが示唆された。

$\gamma\delta$ T 細胞が IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの表皮で欠失する

これまでに、表皮の $\gamma\delta$ T 細胞の分化が胎児胸腺で起こり (25, 42)、IL-7R α ノックアウトマウスで表皮 $\gamma\delta$ T 細胞が欠失することが報告されている (1)。そこで、胸腺上皮細胞が産生する IL-7 が欠失することで、表皮の $\gamma\delta$ T 細胞がどのような影響を受けるのかどうかを、まずフローサイトメトリーで調べた。その結果、IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの表皮では $\gamma\delta$ T 細胞の割合と細胞数が顕著に減少していた(図 10A、10B)。次に免疫蛍光染色でも解析を行ったところ、フローサイトメトリーの解析結果と同様に $\gamma\delta$ T 細胞が顕著に減少していた(図 10C、10D)。これらの結果から、

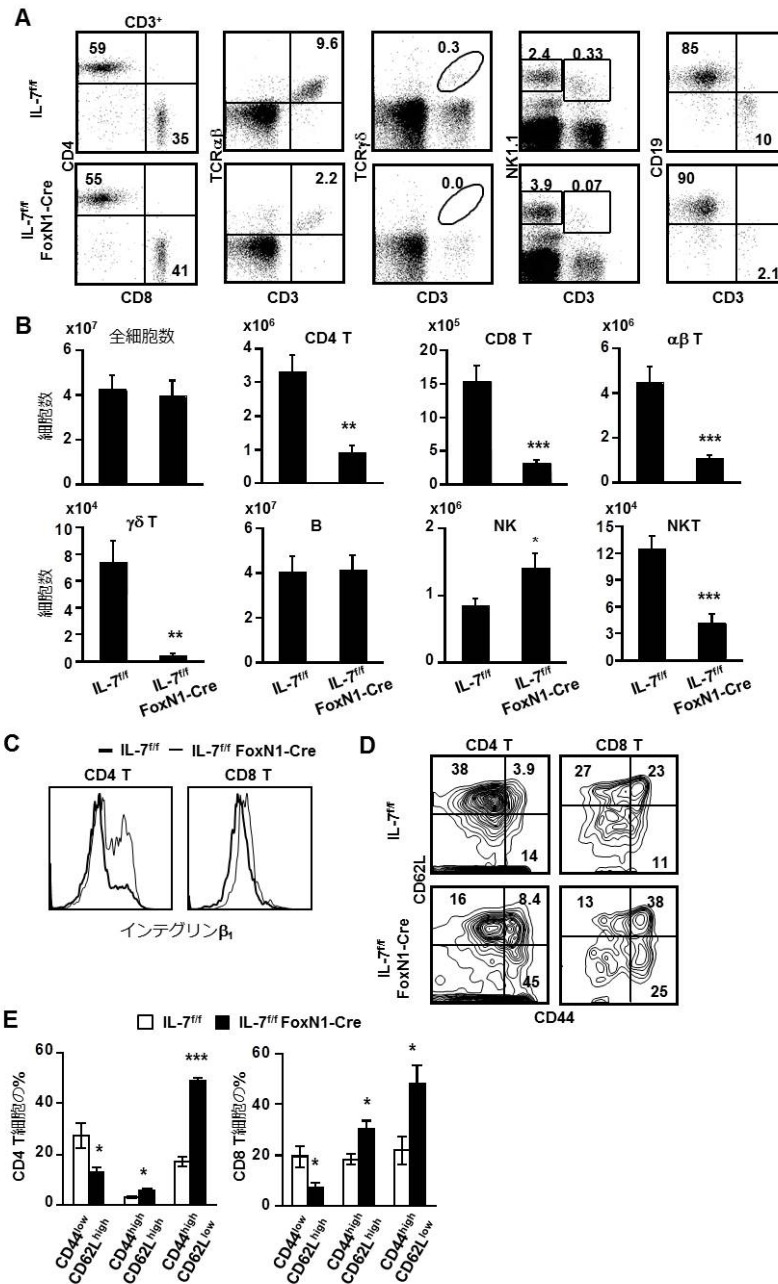


図9. T細胞が IL-7^{lox/lox} FoxN1-Cre マウスの脾臓で一部回復する

(A) 4週齢の IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの脾臓のフローサイトメトリー解析。プロファイル中の数字は各細胞分画の%を示す。この実験は異なるサンプルで 4~7 回行い、再現性を確認した。(B) 各細胞の細胞数を示す。グラフ中の結果は 4~7 サンプルの平均値および標準偏差である。(C) CD4 T細胞と CD8 T細胞のインテグリン β_1 の発現。この実験は異なるサンプルで 5 回行い、再現性を確認した。(D) CD4 T細胞と CD8 T細胞の CD44 と CD62L の発現。この実験は異なる

サンプルで 4 回行い、再現性を確認した。(E) CD44⁺CD62L⁺ナイーブ T 細胞、CD44⁺CD62L⁺記憶 T 細胞、CD44⁺CD62L⁻活性化 T 細胞の%を示す。グラフ中の結果は異なる 4 サンプルの平均値および標準偏差である。各グラフ中の*は *p* 値 0.05 未満、**は *p* 値 0.01 未満、***は *p* 値 0.001 未満を示している。

IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの胎児胸腺で $\gamma\delta$ T 細胞が欠失したために、表皮の $\gamma\delta$ T 細胞も欠失したと考えられた。

TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球はIL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスで顕著に減少する

TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球の起源を明らかにするために、まず IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの小腸から腸上皮内リンパ球を回収し、フローサイトメトリーで解析した。その結果、TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球の比率が顕著に減少していた (図 11A)。細胞数は、4 週齢のマウスでは TCR $\alpha\beta$ ⁺腸上皮内リンパ球は 1/9 に減少しており、TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球は 1/120 と顕著に減少していた (図 11B)。さらに 8 週齢と 12 週齢のマウスでは、TCR $\alpha\beta$ ⁺腸上皮内リンパ球の細胞数の減少が顕著に小さくなり、コントロールマウスとの間に差がなくなるのに対して、TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球の細胞数の減少は続いた。これらの結果から、胸腺上皮細胞によって産生される IL-7 が TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球の分化に必須であることが明らかになった。

腸上皮内リンパ球はIL-7^{fl/fl} Vil-Cre マウスで変化しない

次に IL-7^{fl/fl} マウスと Vil-Cre マウスを交配し、腸上皮細胞で IL-7 の発現を欠損したマウスを得た (図 12A)。4 週齢と 8 週齢のマウスの小腸から腸上皮内リンパ球を回収し、フローサイトメトリーで解析したところ、いずれの週齢においても TCR $\alpha\beta$ ⁺腸上皮内リンパ球と TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球に変化は無かった (図 12B、12C)。これらの結果から、腸上皮細胞によって産生される IL-7 は TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球の分化に必要なことが明らかになった。また、以上の

結果から、TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球の起源は胸腺であることが示唆された (図 13)。

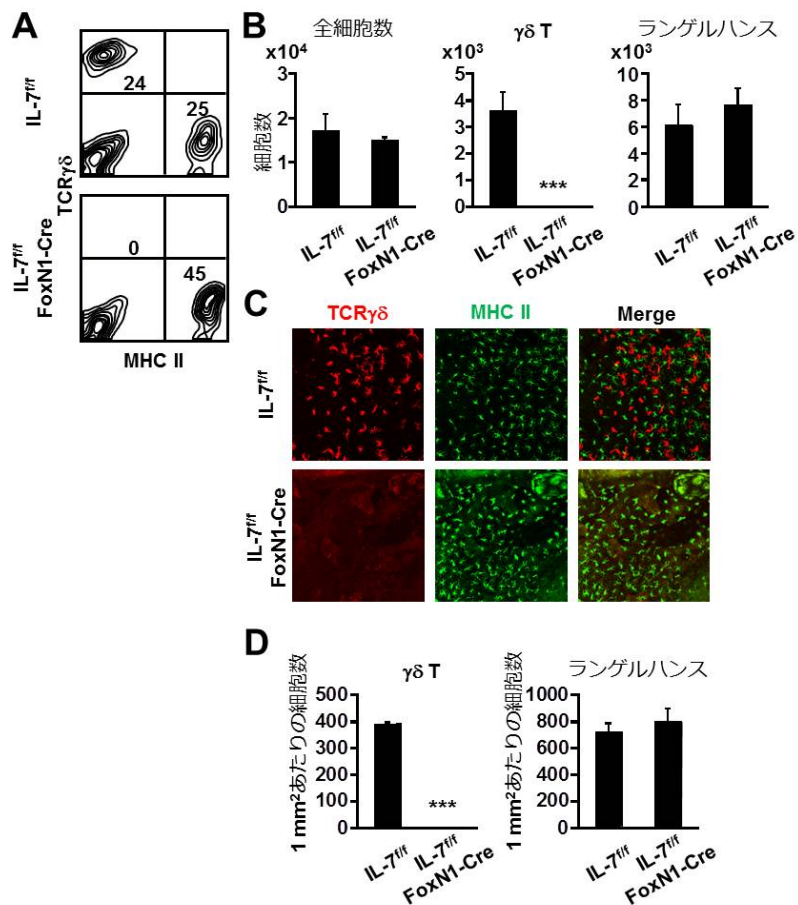


図10. $\gamma\delta$ T 細胞が IL-7^{lox/lox} FoxN1-Cre マウスの表皮で欠失する

(A) 4 週齢の IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの表皮のフローサイトメリー解析。rIL-2 で 24 時間培養したのち、フローサイトメリー解析を行った。数字は各細胞分画の%を示す。この実験は異なるサンプルで 3 回行い、再現性を確認した。(B) 各細胞の細胞数を示す。グラフ中の結果は 3 サンプルの平均値および標準偏差である。(C) 6 週齢の IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの表皮の免疫蛍光染色。抗 TCR $\gamma\delta$ 抗体 (赤) と抗 MHC II 抗体 (緑) を用いた。倍率は 40 倍である。この実験は異なるサンプルで 2 回行い、再現性を確認した。(D) 6 週齢の IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの表皮 1mm²あたりの細胞数。細胞数は(C) の免疫蛍光染色の結果より算出した。グラフ中の結果は 2 サンプルからデータを得たときの平均値および標準偏差である。グラフ中の ***は p 値 0.001 未満を示している。

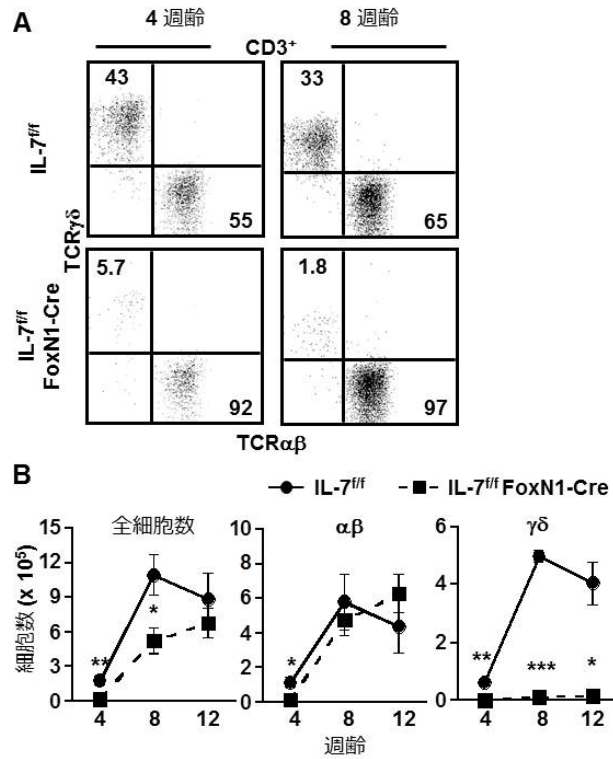


図11. TCR $\gamma\delta$ +腸上皮内リンパ球の分化が IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスで顕著に障害される

(A) 4 週齢と 8 週齢の IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの小腸から腸上皮内リンパ球を回収し、フローサイトメトリー解析を行った。数字は各細胞分画における%を示す。この実験は違うサンプルで 4 回行い、再現性を確認した。(B) 4 週齢、8 週齢、12 週齢の全細胞数、TCR $\alpha\beta$ +腸上皮内リンパ球 ($\alpha\beta$)、TCR $\gamma\delta$ +腸上皮内リンパ球 ($\gamma\delta$) の細胞数の変化を示す。グラフ中の結果は 4 サンプルの平均値および標準偏差である。各グラフ中の*は p 値 0.05 未満、**は p 値 0.01 未満、***は p 値 0.001 未満を示している

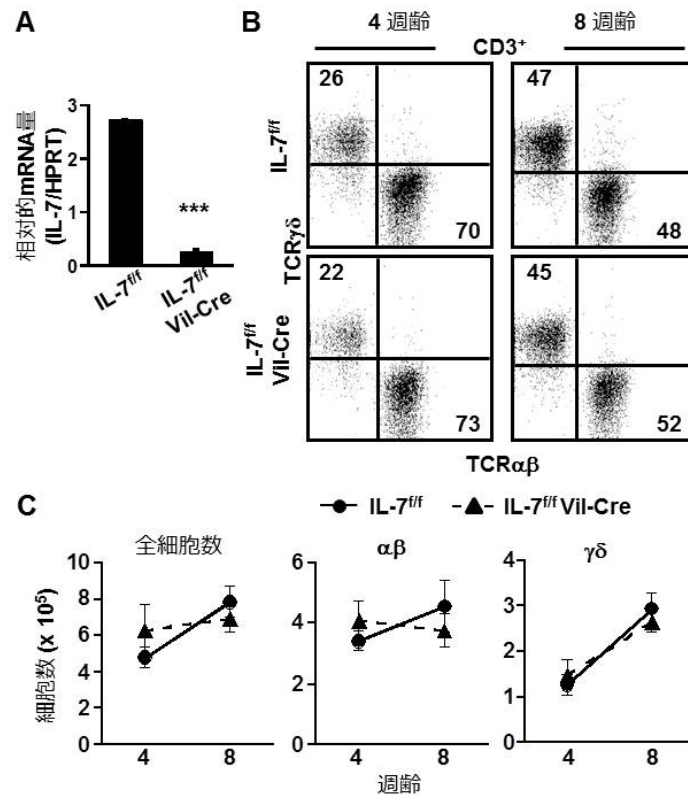


図12. TCR $\gamma\delta$ +腸上皮内リンパ球の分化が IL-7^{flox/flox} Vil-Cre マウスでは障害されない

(A) 6 週齢の IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} Vil-Cre マウスの腸上皮細胞の IL-7 mRNA 発現検討のための定量的 PCR。この実験は異なるサンプルで 2 回行い、再現性を確認した。(B) 4 週齢と 8 週齢の IL-7^{fl/fl} マウスと IL-7^{fl/fl} Vil-Cre マウスの小腸から腸上皮内リンパ球を回収し、フローサイトメリー解析を行った。数字は各細胞分画の%を示す。この実験は異なるサンプルで 3 回行い、再現性を確認している。(C) 4 週齢と 8 週齢の全細胞数、TCR $\alpha\beta$ +腸上皮内リンパ球 ($\alpha\beta$)、TCR $\gamma\delta$ +腸上皮内リンパ球 ($\gamma\delta$) の細胞数の変化を示す。グラフ中の結果は 3 サンプルの平均値および標準偏差である。

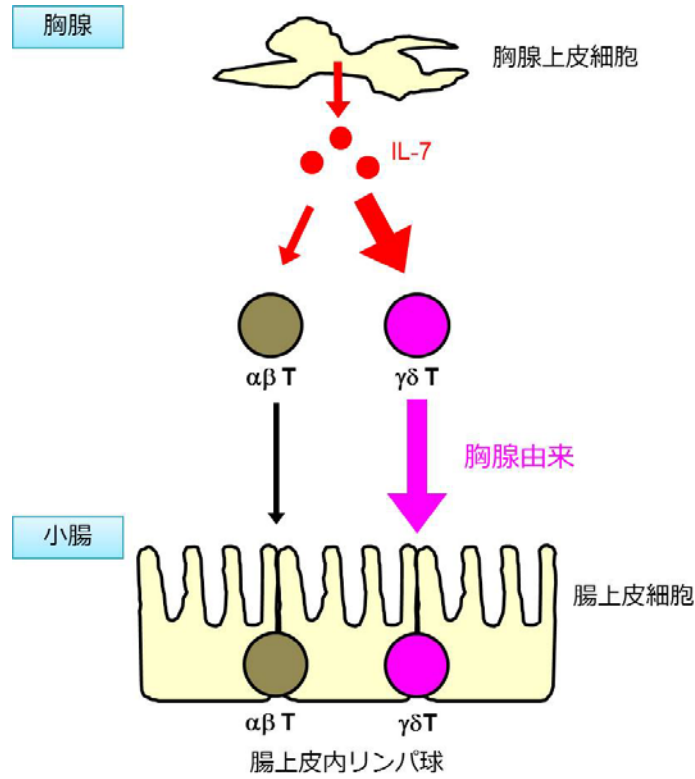


図13. TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球の起源は胸腺である

TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球の起源が胸腺であることが示唆された。胸腺上皮細胞が産生した IL-7 を受け取り分化した $\gamma\delta$ T 細胞が腸管に移動し、TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球になると考えられる。

考察

本研究によって、胸腺上皮細胞が産生する IL-7 の機能と TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球の起源について新規の発見を行った。以下、これらの点に関して考察を述べる。

胸腺上皮細胞が産生するIL-7のT細胞分化への寄与

胸腺細胞が IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスで顕著に減少していたが (図 3)、既報の IL-7 ノックアウトマウスと比較すると、減少率は小さいものであった (2)。これは 2 つの可能性が考えられた。第一の可能性は、胸腺での IL-7 産生細胞は胸腺上皮細胞だけではなく、間葉系ストローマ細胞も IL-7 を産生しており、この IL-7 が胸腺細胞の分化を促したことが考えられる (9, 17)。第二の可能性としては IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの胸腺上皮細胞で IL-7 遺伝子が完全には欠損できていないことが考えられる。これらのことを踏まえると、胸腺で胸腺上皮細胞が IL-7 の主な産生源として重要な役割を担うとともに、間葉系細胞も IL-7 の産生源として一定の寄与をしていることが示唆された。

胸腺上皮細胞が産生するIL-7のT細胞初期分化との関係

ETP を含む DN の各段階において IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスで細胞数の顕著な減少が認められたが、ETP、DN2a、DN3b、DN4 と比較して DN2b、DN3a では減少率が小さかった (図 4)。まず、ETP で IL-7R α の発現が認められたことから、ETP の IL-7 依存性は大きいことが示唆された。次に DN2a と比較して DN2b で減少率が小さくなる結果については、IL-7 のシグナルが欠損することで、DN2a から DN2b への分化が促進されるためであると考えた。具体的には、IL-7 シグナルの減少によって発現誘導される転写因子 Bcl11b が関与していると考えられる。既に報告されているように Bcl11b は DN2a から DN2b への分化を促進する (43)。つまり、IL-7 が減少し、Bcl11b が発現誘導された結果、DN2b の減少率が縮小することになったと考えられ

る。また、DN3aと比較してDN3bで減少率が大きくなる結果についてはIL-7のシグナルが欠損することで、DN3aからDN3bへの分化の途中で起こる β 選択による細胞増殖が障害されるためであると考えられる(44)。これらのことから、胸腺上皮細胞が産生するIL-7がT細胞の初期の分化に必須であることが示唆された。

胸腺上皮細胞が産生するIL-7が成熟T細胞の胸腺からの移出を制御する可能性

本研究によって、成熟胸腺細胞が胸腺から末梢組織へ移出する際に、胸腺上皮細胞から産生されるIL-7によって制御を受けている可能性が示唆された(図5)。既に報告されているように、周皮細胞が産生するS1PがS1P1を発現する成熟胸腺細胞の移出を誘導する(30)。しかしながら、本研究ではIL-7^{fl/fl} FoxN1-Creマウスの成熟CD4⁺ SP細胞の移出が減少する一方、S1P1⁺成熟CD4⁺ SP細胞の比率に変化は無かった(図5C-F)。周皮細胞のS1Pの発現を欠損するマウスで、成熟胸腺細胞の移出の減少は2分の1であることから、S1P-S1P1非依存性経路が存在する可能性が考えられる。従って、IL-7^{fl/fl} FoxN1-Creマウスの成熟CD4⁺ SP細胞の移出の減少は、未知のIL-7依存性S1P-S1P1非依存性経路の存在の可能性を示唆している。

細胞間の接着や細胞の移動にはインテグリンが重要である(45-48)。また、IL-7はインテグリン β 1の発現誘導と活性化に関与することが知られる(40, 41)。IL-7^{fl/fl} FoxN1-Creマウスでは各胸腺細胞分画でインテグリン β 1の発現が減少していたことから(図6)、胸腺上皮細胞が産生するIL-7が胸腺細胞と胸腺上皮細胞や細胞外基質との接着に重要な役割を担う可能性が示唆された。

胸腺上皮細胞が産生するIL-7と表皮 $\gamma\delta$ T細胞の分化

IL-7Rノックアウトマウスの胎児胸腺で $\gamma\delta$ T細胞が欠失していることから、IL-7は胎児期の $\gamma\delta$ T細胞の分化に必須である(1)。また、胎児期に分化する $\gamma\delta$ T細胞はインバリアントV γ 3/V δ 1T細胞受容体を発現し、成獣期では表皮に局在する(49)。胎児期のIL-7^{fl/fl} FoxN1-Creマウスの

胸腺では $\gamma\delta$ T 細胞が顕著に減少しており (図 7)、成獣期の IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの表皮では $\gamma\delta$ T 細胞が欠損していた (図 10)。表皮の $\gamma\delta$ T 細胞は強い細胞増殖能をもつことから (50)、IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスの胎児胸腺では V γ 3⁺ T 細胞の分化が完全に阻害されていると考えられる。従って、胸腺上皮細胞が産生する IL-7 は胎児胸腺の $\gamma\delta$ T 細胞分化に必須であることが示唆された。

胸腺上皮細胞が産生する IL-7 と末梢組織の T 細胞の維持

IL-7 は、ナイーブ T 細胞の生存と増殖に必須であることから (8, 51)、末梢組織に存在する T 細胞の恒常性に重要な働きをしている。また、IL-7 は自発的な早い T 細胞増殖に関与しないが、恒常性維持のための遅い増殖には重要であることも知られている (52)。IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスのリンパ節と脾臓で、胸腺と比較して T 細胞数の減少率が小さくなっており、また、記憶 T 細胞や活性化 T 細胞の割合が増加していた (図 8 および図 9)。リンパ節においては T 細胞領域の細網線維芽細胞が IL-7 の産生源として考えられていることから (13)、末梢における恒常性維持のためには、細網線維芽細胞が産生する IL-7 が関与していると考えられる。また、胸腺が産生する IL-7 による正常な T 細胞分化が末梢における正常な T 細胞集団の維持に重要であることも示唆された。

胸腺上皮細胞が産生する IL-7 と TCR $\gamma\delta$ ⁺ 腸上皮内リンパ球の起源

TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球の起源は胸腺であるという説と胸腺外であるという説があり、これまで未解決の問題であった。IL-7R ノックアウトマウスで TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球が完全に欠失することから (1)、IL-7 が TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球の分化に必須である。4 週齢の IL-7^{fl/fl} FoxN1-Cre マウスで、TCR $\alpha\beta$ ⁺腸上皮内リンパ球の細胞数が減少していたが、8 週齢と 12 週齢では細胞数に変化は無かった (図 11)。一方、TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球は 4 週齢ではわずかにしか存在しておらず、8 週齢と 12 週齢でも顕著に減少していた。この結果は、幼少期のマ

ウスの小腸で腸上皮内リンパ球のニッチが $\alpha\beta$ T 細胞によって占拠されることで、 $\gamma\delta$ T 細胞が増殖できないという可能性を示唆している。また腸上皮細胞で IL-7 の発現を欠損する IL-7^{fl} Vil-Cre マウスでは TCR $\alpha\beta$ ⁺腸上皮内リンパ球と TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球の細胞の比率と細胞数に変化が無かった (図 12)。多くの TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球が IL-7R を発現していないことから、腸上皮細胞が産生する IL-7 は TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球の分化に関与しないことが示唆された。以上の結果から、TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球が胸腺で分化した $\gamma\delta$ T 細胞に由来することが示唆された。

総括

本研究において筆者は、IL-7-flox マウスと FoxN1-Cre マウスまたは villin-Cre マウスを交配し、胸腺上皮細胞または腸上皮細胞で IL-7 遺伝子を欠損したマウスを作製し、解析を行うことで、以下の新しい知見を得た。

- 1) 胸腺上皮細胞が産生する IL-7 は T 細胞分化の初期段階から重要な役割を担う
- 2) 胸腺上皮細胞が産生する IL-7 は TCR $\gamma\delta$ ⁺腸上皮内リンパ球の分化に必須である
- 3) 腸上皮細胞が産生する IL-7 は腸上皮内リンパ球の維持に重要ではない

発表論文目録

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

共著者名

Soichiro Shitara, Takahiro Hara, Bingfei Liang, Keisuke Wagatsuma, Saulius Zuklys, Georg A. Holländer, Hiroshi Nakase, Tsutomu Chiba, Shizue Tani-ichi and Koichi Ikuta

論文題目

IL-7 produced by thymic epithelial cells plays a major role in the development of thymocytes and TCR $\gamma\delta^+$ intraepithelial lymphocytes

雑誌名

The Journal of Immunology (190 巻、12 号、6173~6179 ページ、2013 年)

謝辞

本研究に際しまして、多岐に渡りご指導とご鞭撻を承りました京都大学ウイルス研究所生田宏一教授、原崇裕助教、谷一靖江助教に謹んで感謝の意を表します。また本研究を進めるにあたってモデルマウスの提供等でご協力をいただいた京都大学再生研究所河本宏教授、徳島大学疾患酵素学研究センター松本満教授にも深く感謝します。

また奨学金および特別研究員給付金といった形で財政的に支援してくださったりバネス研究費（2012年）、日本学生支援機構（2013~2014年）、日本学術振興会（2014~2015年）に深く御礼申し上げます。

さらに、研究室の同僚として共に研究生活を過ごさせていただきました梁冰霏さん、我妻慶祐さん、阿部昌史さん、崔広為さん、榛葉旭恒さん、神岡茂子さんに心から感謝致します。

最後になりましたが、私を陰ながら支えてくださいました、両親、家族、友人、先生方にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Maki, K., S. Sunaga, Y. Komagata, Y. Kodaira, A. Mabuchi, H. Karasuyama, K. Yokomuro, J. I. Miyazaki, and K. Ikuta. 1996. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack $\gamma\delta$ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7172-7177.
2. von Freeden-Jeffry, U., P. Vieira, L. A. Lucian, T. McNeil, S. E. Burdach, and R. Murray. 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med.* 181: 1519-1526.
3. Park, J.-H., S. Adoro, T. Guintier, B. Erman, A. S. Alag, M. Catalfamo, M. Y. Kimura, Y. Cui, P. J. Lucas, R. E. Gress, M. Kubo, L. Hennighausen, L. Feigenbaum, and A. Singer. 2010. Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat. Immunol.* 11: 257-264.
4. Park, J.-H., S. Adoro, P. J. Lucas, S. D. Sarafova, A. S. Alag, L. L. Doan, B. Erman, X. Liu, W. Ellmeier, R. Bosselut, L. Feigenbaum, and A. Singer. 2007. 'Coreceptor tuning': cytokine signals transcriptionally tailor CD8 coreceptor expression to the self-specificity of the TCR. *Nat. Immunol.* 8: 1049-1059.
5. Corcoran, A. E., A. Riddell, D. Krooshoop, and A. R. Venkitaraman. 1998. Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor. *Nature* 391: 904-907.
6. Ye, S.-K., Y. Agata, H.-C. Lee, H. Kurooka, T. Kitamura, A. Shimizu, T. Honjo, and K. Ikuta. 2001. The IL-7 receptor controls the accessibility of the TCR γ locus by Stat5 and histone acetylation. *Immunity* 15: 813-823.
7. Ye, S.-K., K. Maki, T. Kitamura, S. Sunaga, K. Akashi, J. Domen, I. L. Weissman, T. Honjo, and K. Ikuta. 1999. Induction of germline transcription in the TCR γ locus by Stat5: implications for accessibility control by the IL-7 receptor. *Immunity* 11: 213-223.
8. Surh, C. D., and J. Sprent. 2008. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity*

- 29: 848-862.
9. Watanabe, Y., O. Mazda, Y.-I. Aiba, K. Iwai, J.-I. Gyotoku, S. Ideyama, J. Miyazaki, and Y. Katsura. 1992. A murine thymic stromal cell line which may support the differentiation of CD4⁻8⁻ thymocytes into CD4⁺8⁻ αβ T cell receptor positive T cells. *Cell. Immunol.* 142: 385-397.
 10. Zamisch, M., B. Moore-Scott, D.-m. Su, P. J. Lucas, N. Manley, and E. R. Richie. 2005. Ontogeny and regulation of IL-7-expressing thymic epithelial cells. *J. Immunol.* 174: 60-67.
 11. Sudo, T., M. Ito, Y. Ogawa, M. Iizuka, H. Kodama, T. Kunisada, S. Hayashi, M. Ogawa, K. Sakai, and S. Nishikawa. 1989. Interleukin 7 production and function in stromal cell-dependent B cell development. *J. Exp. Med.* 170: 333-338.
 12. Heufler, C., G. Topar, A. Grasseger, U. Stanzl, F. Koch, N. Romani, A. E. Namen, and G. Schuler. 1993. Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J. Exp. Med.* 178: 1109-1114.
 13. Link, A., T. K. Vogt, S. Favre, M. R. Britschgi, H. Acha-Orbea, B. Hinz, J. G. Cyster, and S. A. Luther. 2007. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat. Immunol.* 8: 1255-1265.
 14. Watanabe, M., Y. Ueno, T. Yajima, Y. Iwao, M. Tsuchiya, H. Ishikawa, S. Aiso, T. Hibi, and H. Ishii. 1995. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 95: 2945-2953.
 15. Alves, N. L., O. R.-L. Goff, N. D. Huntington, A. P. Sousa, V. S. G. Ribeiro, A. Bordack, F. L. Vives, L. Peduto, A. Chidgey, A. Cumano, R. Boyd, G. Eberl, and J. P. Di Santo. 2009. Characterization of the thymic IL-7 niche in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 1512-1517.
 16. Alves, N. L., N. D. Huntington, J.-J. Mention, O. Richard-Le Goff, and J. P. Di Santo. 2010. A thymocyte-thymic epithelial cell cross-talk dynamically regulates intrathymic

- IL-7 expression in vivo. *J. Immunol.* 184: 5949-5953.
17. Hara, T., S. Shitara, K. Imai, H. Miyachi, S. Kitano, H. Yao, S. Tani-ichi, and K. Ikuta. 2012. Identification of IL-7-producing cells in primary and secondary lymphoid organs using IL-7-GFP knock-in mice. *J. Immunol.* 189: 1577-1584.
 18. Mazzucchelli, R. I., S. Warming, S. M. Lawrence, M. Ishii, M. Abshari, A. V. Washington, L. Feigenbaum, A. C. Warner, D. J. Sims, W. Q. Li, J. A. Hixon, D. H. D. Gray, B. E. Rich, M. Morrow, M. R. Anver, J. Cherry, D. Naf, L. R. Sternberg, D. W. McVicar, A. G. Farr, R. N. Germain, K. Rogers, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and S. K. Durum. 2009. Visualization and identification of IL-7 producing cells in reporter mice. *PLoS ONE* 4: e7637.
 19. Moore, T. A., U. von Freeden-Jeffry, R. Murray, and A. Zlotnik. 1996. Inhibition of $\gamma\delta$ T cell development and early thymocyte maturation in IL-7 $-/-$ mice. *J. Immunol.* 157: 2366-2373.
 20. Eberl, G., and D. R. Littman. 2004. Thymic origin of intestinal $\alpha\beta$ T cells revealed by fate mapping of ROR γ ⁺ cells. *Science* 305: 248-251.
 21. Bandeira, A., S. Itohara, M. Bonneville, O. Burlen-Defranoux, T. Mota-Santos, A. Coutinho, and S. Tonegawa. 1991. Extrathymic origin of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing T-cell antigen receptor $\gamma\delta$. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 43-47.
 22. Liang, B., T. Hara, K. Wagatsuma, J. Zhang, K. Maki, H. Miyachi, S. Kitano, C. Yabe-Nishimura, S. Tani-ichi, and K. Ikuta. 2012. Role of hepatocyte-derived IL-7 in maintenance of intrahepatic NKT cells and T cells and development of B cells in fetal liver. *J. Immunol.* 189: 4444-4450.
 23. Zuklys, S., J. Gill, M. P. Keller, M. Hauri-Hohl, S. Zhanybekova, G. Balciunaite, K.-J. Na, L. T. Jeker, K. Hafen, N. Tsukamoto, T. Amagai, M. M. Taketo, W. Krenger, and G. A. Holländer. 2009. Stabilized β -catenin in thymic epithelial cells blocks thymus development and function. *J. Immunol.* 182: 2997-3007.
 24. el Marjou, F., K.-P. Janssen, B. Hung-Junn Chang, M. Li, V. Hindie, L. Chan, D.

- Louvard, P. Chambon, D. Metzger, and S. Robine. 2004. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* 39: 186-193.
25. Ikuta, K., T. Kina, I. MacNeil, N. Uchida, B. Peault, Y.-h. Chien, and I. L. Weissman. 1990. A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell* 62: 863-874.
26. Gray, D. H. D., A. P. Chidgey, and R. L. Boyd. 2002. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 260: 15-28.
27. Ishikawa, H., Y. Li, A. Abeliovich, S. Yamamoto, S. H. Kaufmann, and S. Tonegawa. 1993. Cytotoxic and interferon γ -producing activities of $\gamma\delta$ T cells in the mouse intestinal epithelium are strain dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8204-8208.
28. Suzuki, K., B. Meek, Y. Doi, M. Muramatsu, T. Chiba, T. Honjo, and S. Fagarasan. 2004. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1981-1986.
29. Kawai, K., K. Kishihara, T. J. Molina, V. A. Wallace, T. W. Mak, and P. S. Ohashi. 1995. Impaired development of V γ 3 dendritic epidermal T cells in p56lck protein tyrosine kinase-deficient and CD45 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *J. Exp. Med.* 181: 345-349.
30. Zachariah, M. A., and J. G. Cyster. 2010. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science* 328: 1129-1135.
31. Wekerle, H., U.-P. Ketelsen, and M. Ernst. 1980. Thymic nurse cells. Lymphoepithelial cell complexes in murine thymuses: morphological and serological characterization. *J. Exp. Med.* 151: 925-944.
32. Kataru, R. P., H. Kim, C. Jang, D. K. Choi, B. I. Koh, M. Kim, S. Gollamudi, Y.-K. Kim, S.-H. Lee, and G. Y. Koh. 2011. T lymphocytes negatively regulate lymph node lymphatic vessel formation. *Immunity* 34: 96-107.
33. Porritt, H. E., L. L. Rumfelt, S. Tabrizifard, T. M. Schmitt, J. C. Zúñiga-Pflücker, and H. T. Petrie. 2004. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors

- with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity* 20: 735-745.
34. Saba, I., C. Kosan, L. Vassen, L. Klein-Hitpass, and T. Möröy. 2011. Miz-1 is required to coordinate the expression of TCR β and p53 effector genes at the pre-TCR “ β -selection” checkpoint. *J. Immunol.* 187: 2982-2992.
 35. Yui, M. A., N. Feng, and E. V. Rothenberg. 2010. Fine-scale staging of T cell lineage commitment in adult mouse thymus. *J. Immunol.* 185: 284-293.
 36. Allman, D., A. Sambandam, S. Kim, J. P. Miller, A. Pagan, D. Well, A. Meraz, and A. Bhandoola. 2003. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat. Immunol.* 4: 168-174.
 37. Luc, S., T. C. Luis, H. Boukarabila, I. C. Macaulay, N. Buza-Vidas, T. Bouriez-Jones, M. Lutteropp, P. S. Woll, S. J. Loughran, A. J. Mead, A. Hultquist, J. Brown, T. Mizukami, S. Matsuoka, H. Ferry, K. Anderson, S. Duarte, D. Atkinson, S. Soneji, A. Domanski, A. Farley, A. Sanjuan-Pla, C. Carella, R. Patient, M. de Bruijn, T. Enver, C. Nerlov, C. Blackburn, I. Godin, and S. E. W. Jacobsen. 2012. The earliest thymic T cell progenitors sustain B cell and myeloid lineage potential. *Nat. Immunol.* 13: 412-419.
 38. Weinreich, M. A., and K. A. Hogquist. 2008. Thymic emigration: when and how T cells leave home. *J. Immunol.* 181: 2265-2270.
 39. Teng, F., Y. Zhou, R. Jin, Y. Chen, X. Pei, Y. Liu, J. Dong, W. Wang, X. Pang, X. Qian, W.-F. Chen, Y. Zhang, and Q. Ge. 2011. The molecular signature underlying the thymic migration and maturation of TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD8⁻ thymocytes. *PLoS ONE* 6: e25567.
 40. Kitazawa, H., K. Muegge, R. Badolato, J. M. Wang, W. E. Fogler, D. K. Ferris, C. K. Lee, S. Candéias, M. R. Smith, J. J. Oppenheim, and S. K. Durum. 1997. IL-7 activates $\alpha 4\beta 1$ integrin in murine thymocytes. *J. Immunol.* 159: 2259-2264.
 41. Swainson, L., S. Kinet, C. Mongellaz, M. Sourisseau, T. Henriques, and N. Taylor. 2007. IL-7-induced proliferation of recent thymic emigrants requires activation of the PI3K pathway. *Blood* 109: 1034-1042

42. Allison, J. P., and W. L. Havran. 1991. The immunobiology of T cells with invariant $\gamma\delta$ antigen receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 679-705.
43. Ikawa, T., S. Hirose, K. Masuda, K. Kakugawa, R. Satoh, A. Shibano-Satoh, R. Kominami, Y. Katsura, and H. Kawamoto. 2010. An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science* 329: 93-96.
44. Taghon, T., M. A. Yui, R. Pant, R. A. Diamond, and E. V. Rothenberg. 2006. Developmental and molecular characterization of emerging β - and $\gamma\delta$ -selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* 24: 53-64.
45. Hogg, N., M. Laschinger, K. Giles, and A. McDowall. 2003. T-cell integrins: more than just sticking points. *J. Cell Sci.* 116: 4695-4705.
46. Kellermann, S.-A., C. L. Dell, S. W. Hunt, and Y. Shimizu. 2002. Genetic analysis of integrin activation in T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 186: 172-188.
47. Montoya, M. C., D. Sancho, M. Vicente-Manzanares, and F. Sánchez-Madrid. 2002. Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol. Rev.* 186: 68-82.
48. Sims, T. N., and M. L. Dustin. 2002. The immunological synapse: integrins take the stage. *Immunol. Rev.* 186: 100-117.
49. Carding, S. R., and P. J. Egan. 2002. $\gamma\delta$ T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 336-345.
50. Payer, E., A. Elbe, and G. Stingl. 1991. Circulating CD3⁺/T cell receptor V γ 3⁺ fetal murine thymocytes home to the skin and give rise to proliferating dendritic epidermal T cells. *J. Immunol.* 146: 2536-2543.
51. Tan, J. T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K. I. Weinberg, and C. D. Surh. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naïve T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8732-8737.
52. Min, B., H. Yamane, J. Hu-Li, and W. E. Paul. 2005. Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. *J. Immunol.* 174: 6039-6044.

