

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSES

LABORATORY OF BIOLOGICAL PROTECTION

Our laboratory has made two major achievements. First, we have found that fetal and adult hematopoietic stem cells have different developmental potential to differentiate into lymphocytes. Second, we have demonstrated that interleukin-7 (IL-7) controls DNA recombination of lymphocyte antigen receptor genes by changing chromatin structure. Both of them are related with fundamental questions in medicine and biology.

Based on these findings, we are now pursuing research on development and regulation of the immune system, focusing on the following questions: (1) control mechanism of lymphocyte antigen receptor genes by IL-7; (2) regulation of immune response by IL-7 receptor (IL-7R) expression; and (3) control and function of IL-7 produced by various stromal cells.

1) Regulation of TCR γ enhancer by STAT5: S. TANI-ICHI and K. IKUTA

The IL-7R controls the local accessibility of J γ gene segments at the TCR γ locus by recruiting STAT5 and transcriptional coactivators to the J γ germline promoters and inducing histone acetylation and germline transcription. Because STAT consensus motifs are conserved not only in the J γ promoters but also in the control elements, E γ and HsA, it is possible that STAT5 regulates locus-wide accessibility of the TCR γ locus through interacting with these elements. To test this hypothesis, we addressed the question whether STAT5 activates E γ and HsA. We first showed that E γ and HsA elements are substantially histone-acetylated regardless of cytokine stimulation in cell lines and RAG-2 knockout thymocytes and that STAT5 has potential to elevate histone acetylation at these elements. Next, we demonstrated that STAT5 is recruited to the STAT consensus motifs in E γ and HsA elements after cytokine stimulation and that transcription factors Runx and c-Myb are constitutively recruited to E γ . Furthermore, we showed that STAT5 synergistically augments the enhancer activity of E γ in cooperation with Runx and c-Myb. Although we found that Runx is also recruited to HsA, STAT5 and Runx are not sufficient to induce HsA activity. These results suggest that STAT5 is recruited to the consensus motifs in E γ and HsA elements by cytokine stimulation and augments E γ activity in collaboration with Runx and c-Myb. Therefore, this study supports the model that STAT5 controls locus-wide accessibility of the TCR γ locus by activating E γ and HsA elements.

2) Accessibility control of the TCR γ locus by a chromatin remodeling factor BRG1: C. SUMI, S. TANI-ICHI and K. IKUTA

The IL-7R plays an essential role in $\gamma\delta$ T cell development by inducing V-J recombination

in the TCR γ locus. We previously showed that Stat5 activated by IL-7R signaling recruits transcription coactivators to J γ promoters and controls the accessibility of the TCR γ locus by histone acetylation. It is generally accepted that histone acetylation is followed by chromatin remodeling which makes a chromatin region completely accessible for transcriptional and recombinational enzymes. However, little is known on which chromatin remodeling factor is involved in accessibility of the TCR γ locus. We hypothesized that BRG1, the ATPase subunit of SWI/SNF chromatin remodeling complex, is recruited to the J γ promoters by STAT5 and enhances germline transcription and V-J recombination by triggering chromatin remodeling. To address this question, we first tested whether BRG1 is recruited to the J γ promoters by ChIP assay. We found that BRG1 was bound to the J γ promoters by cytokine stimulation in Ba/F3 cells and RAG-2 knockout thymocytes. Next, we tested whether BRG1 enhances germline transcription by reporter assay. We introduced a J γ 1 promoter reporter vector into Ba/F3 cells and HEK293T cells with or without a constitutively active Stat5 expression vector. We found that the J γ promoter activity is activated by Stat5 and cytokine stimulation and that BRG1 expression further augments the transcriptional activity. Therefore, these results support the hypothesis that BRG1 is recruited to the J γ promoters by STAT5 and enhances germline transcription by triggering chromatin remodeling.

3) Production of IL-7 by lymphocyte-stromal cell interaction: M. SEKAI and K. IKUTA

The interaction between lymphocytes and stromal cells plays important roles in development of the immune system. IL-7 is an essential cytokine for early lymphocyte development produced by mesenchymal stromal and epithelial cells in the thymus and bone marrow. Although it has been reported that the transcription of IL-7 is induced by interaction of pre-B cells and bone marrow-derived stromal cells, its molecular mechanism is still unknown. To answer this question, we employed co-culture system with an IL-7-dependent pre-B cell line, DW34, and a thymic stromal cell line, TSt-4. Co-culture with DW34 cells enhanced the levels of IL-7 transcripts in TSt-4 cells. Interestingly, the co-culture also induced transcripts of interferon (IFN)- α and IFN- β . In addition, exogenous IFN- β increased the levels of IL-7 transcripts in TSt-4 cells. Next, to elucidate the molecular mechanism of IL-7 induction, we analyzed the activity of IL-7 promoter by reporter assay. The IL-7 promoter showed specific transcriptional activity in TSt-4 cells. An interferon-stimulated response element (ISRE) in the IL-7 promoter was essential for the induction of IL-7 transcription by both co-culture and IFN- β stimulation. Finally, overexpression of wild-type and dominant negative forms of interferon regulatory factors (IRFs) activated and repressed, respectively, the IL-7 promoter in TSt-4 cells. Collectively, these results suggested that IRFs activated by lymphocyte adhesion induce the transcription of IL-7 gene through ISRE in stromal cells and that IFN- β production may be involved in the activation of IRFs. Thus, this study implied a physiological function of the IFN/IRF signal in lymphocyte development in the thymus and bone

marrow.

4) Analysis of IL-7 Conditional Knockout Mouse: T. HARA and K. IKUTA

IL-7 is produced by epidermal, intestinal and thymic epithelial cells, bone marrow and thymic mesenchymal stromal cells, and fibroblastic reticular cells in spleen and lymphnodes. Little is known about the local function of IL-7 produced by each cell type. To address this question, we established IL-7 floxed mice with the fourth exon flanked at each side by a loxP sequence. We crossed the IL-7 floxed mice with keratin 5 (K5)-Cre transgenic (Tg) mice to obtain the conditional knockout (cKO) mice deficient in IL-7 production only in thymic and epidermal epithelial cells. K5-Cre Tg⁺ IL-7 cKO mice showed slightly reduced numbers of thymocytes and $\gamma\delta$ T cells compared with IL-7 floxed mice. In contrast, the numbers of NKT cells were slightly increased in the K5-Cre Tg⁺ IL-7 cKO thymus. These results suggest the possibility that the IL-7 from both epithelial and mesenchymal components of thymic stromal cells plays a role in survival and expansion of thymocytes.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Biological Responses

Laboratory of Biological Protection

- Masui, N., Tani-ichi, S., Maki, K., and Ikuta, K. (2008). Transcriptional activation of mouse TCR J γ 4 germline promoter by Stat5. *Mol. Immunol.*, 45:849-855.
- Toda, T., Wada, H., Ogawa, S., Tani-ichi, S., and Ikuta, K. (2008). An efficient reporter assay for Stat5-dependent promoters. *Anal. Biochem.*, 372:250-252.
- Ogawa, S., Satake, M., and Ikuta, K. (2008). Physical and functional interactions between STAT5 and Runx transcriptional factors. *J. Biochem. (Tokyo)*, 143:695-709.
- Maki, K. and Ikuta, K. (2008). MEK1/2 induces STAT5-mediated germline transcription of the TCR γ locus in response to IL-7R signaling. *J. Immunol.*, 181:494-502.
- Hamada, S., Umemura, M., Shiono, T., Tanaka, K., Yahagi, A., Begum, M. D., Oshiro, K., Okamoto, Y., Watanabe, H., Kawakami, K., Roark, C., Born, W. K., O'Brien, R., Ikuta, K., Ishikawa, H., Nakae, S., Iwakura, Y., Ohta, T., and Matsuzaki, G. (2008). IL-17A produced by $\gamma\delta$ T cells plays a critical role in innate immunity against *Listeria monocytogenes* infection in the liver. *J. Immunol.*, 181:3456-3463.
- Lee, H.-C., Headley, M. B., Iseki, M., Ikuta, K., and Ziegler, S. F. (2008). Inhibition of NF- κ B-mediated TSLP expression by retinoid X receptor. *J. Immunol.*, 181:5189-5193.

Fujii, H., Sakai, R., Masatsugu, A., Ohta, M., Matsumoto, T., Doi, T., Ueda, M., and Horiguchi, Y. (2008). Case of premenstrual syndrome including monthly episode of vesiculobullous eruptions on the face. *J. Dermatol.* 35:246-247.

Takao, Y., Fujiwara, H., Yoshioka, S., Fujii, S., and Ueda, M. (2008). Monoamine oxidase A is highly expressed by the human corpus luteum of pregnancy. *Reprod.* 136:367-375.

Sekai, M., Kina, T., and Ikuta, K.: Production of IL-7 by lymphocyte-stromal cell interaction. The 6th International Student Seminar, Kyoto, March 6, 2008.

谷一靖江、佐竹正延、生田宏一：Stat5 による TCR γ エンハンサーの制御. 第 18 回 Kyoto T Cell Conference、京都、6 月 13 日、2008.

谷一靖江、佐竹正延、生田宏一：Stat5 による TCR γ 遺伝子座エンハンサー領域の制御. 第 38 回日本免疫学会学術集会、京都、12 月 2 日、2008.

角知代、谷一靖江、生田宏一：Brg1 による TCR γ 遺伝子座の accessibility の制御. 第 38 回日本免疫学会学術集会、京都、12 月 2 日、2008.

角知代、谷一靖江、生田宏一：Brg1 による TCR γ 遺伝子座の制御. 第 5 回京都大学ウイルス研究所学術交流会、京都、12 月 22 日、2008.

今年は 2008 年 3 月に講師の真木一茂と技術補佐員の岸田麻由が退職し、生命科学研究科修士課程 2 年の瀬海美穂が新たな道を歩み始めた。4 月には、原崇裕が助教として着任した。また、教務補佐員として今井久美子が参加した。さらに、研究生として梁冰霏と白潔が加わった。このような推移で、生体防御研究分野は現在、教授 1 名、助教 3 名、大学院生 5 名、研究生 2 名、技術職員 1 名、教務補佐員 1 名、秘書 1 名の総勢 14 名となっている。

本分野では、造血幹細胞からの免疫系細胞の細胞系列決定と初期分化の分子機構、および免疫応答の制御機構を解明することを通じ、細胞分化の普遍的な原理を明らかにすることを目指している。特に、インターロイキン 7 (IL-7) とそのレセプター (IL-7R) を切り口に、転写制御やクロマチン構造変換など、エピジェネティクスの観点から解析している。

(1) STAT5 による TCR γ エンハンサーの制御

これまで我々は、IL-7 によって活性化された STAT5 が J γ プロモーターに結合し、ヒストンアセチル化を誘導することで J γ 遺伝子の accessibility を上昇させることを報告してきた。一方、IL-7R 欠損マウスでは、J γ 遺伝子だけでなく、V γ 遺伝子の germline 転写が低下している。また、TCR γ 遺伝子座では、STAT5 の結合モチーフが、J γ プロモーターのみならず 3' エンハンサー (E γ) や V γ 領域中の制御領域 HsA にも保存されている。以上のことから、STAT5 が E γ や HsA と結合してその活性を制御している可能性が示唆されるが、詳しいことは解析されていない。まず、RAG-2 ノックアウト (KO) マウス胸腺細胞では、E γ と HsA のヒストンアセチル化のレベルが高かった。また、RAG-2 KO マウス胸腺細胞やプレ T 細胞株 Scid.adh を IL-7 で刺激すると、STAT5 が E γ と HsA にリクルートされた。これまでに、転写因子 Runx と c-Myb が in vitro で E γ に結合し、そのエンハンサー活性に必須であることが報告されていた。今回クロマチン免疫沈降法にて解析したところ、RAG2 KO 胸腺細胞や Scid.adh 細胞において、Runx が E γ と HsA に、c-Myb が E γ にリクルートされていた。また、この Runx や c-Myb のリクルートは、サイトカイン刺激で変化しなかった。さらに、STAT5 は、Scid.adh 細胞において Runx や c-Myb と協調して E γ のエンハンサー活性を上昇させた。以上の結果から、TCR γ 遺伝子座のエンハンサーには、まず Runx や c-Myb が、続いて STAT5 が結合し、段階的に活性化することが明らかとなった。また、STAT5 は J γ プロモーターだけでなく E γ や HsA にも結合し、TCR γ 遺伝子座の germline 転写と accessibility を制御していることが示唆された。(谷一靖江、生田宏一)

(2) クロマチンリモデリング因子 BRG1 による TCR γ 遺伝子座の accessibility の制御

IL-7R はリンパ球の増殖・分化・維持に重要な働きをしている。IL-7R が転写因子 STAT5 を活性化すると、STAT5 は TCR J γ 遺伝子プロモーターに結合し、転写共役因子のリクルートとヒストンアセチル化によりクロマチンを開くことで、TCR γ 鎖遺伝子座の転写と V-J 組換えを制御している。しかし、これまでヒストンアセチル化に続いておこるクロマチンリモデリングを担う因子については明らかではなかった。そこで本研究では、J γ 1 プロモーターの制御にクロマチンリモデリング因子複合体 SWI/SNF のコアサブユニットである BRG1 が関与しているかどうか検証した。まず、サイトカイン刺激により STAT5 が活性化される BaF3-pim1 細胞を用いて、BRG1 の J γ 1 領域への結合をクロマチン免疫沈降法 (ChIP) により調べたところ、サイトカイン刺激後に BRG1 の J γ 1 プロモーターへの結合が増強した。また、BRG1 は STAT5 と同じ J γ 1 プロモーターに結合することが ChIP-reimmunoprecipitation 法により明らかとなった。また、RAG-2 ノックアウトマウスの胸腺細胞では、BRG1 が J γ 1 プロモーターを含む種々の TCR γ 鎖遺伝子座調節領域に結合していた。さらに、BRG1 が STAT5 依存的に J γ 1 プロモーターの転写活性を増幅すること、ATPase 活性を欠失した BRG1 を発現させると J γ 1 プロモーターの転写活性が低下することがレポーター法により明らかとなった。以上の結果から、IL-7R により活性化された STAT5 が J γ 1 プロモーターに結合することで BRG1 がリクルートされ、J γ 1 領域のクロマチンリモデリングがおこり、転写と組換えが誘導される可能性が示唆された。(角知代、谷一靖江、生田宏一)

(3) リンパ球とストローマ細胞の相互作用による IL-7 の産生誘導機構

免疫系の発達にはリンパ球とストローマ細胞の相互作用が重要である。IL-7 は胸腺や骨髄のストローマ細胞や上皮細胞が産生するサイトカインであり、リンパ球の増殖・生存・分化・成熟に不可欠である。実際、IL-7 や IL-7R のノックアウトマウスでは末梢リンパ球が顕著に減少する。一方、IL-7 の産生機構はいまだ十分には解明されていない。そこで我々は、ストローマ細胞とリンパ球の相互作用に着目し、ストローマ細胞における IL-7 産生機構を解析した。胸腺ストローマ細胞株 TSt-4 とブレ B 細胞株 DW34 を共培養したところ、TSt-4 からの IL-7 の発現が上昇した。興味深いことに、この共培養により炎症性サイトカインである type I Interferon (IFN- α , β) の発現も上昇した。そこで、IFN- β により TSt-4 を刺激すると、IL-7 の発現が上昇した。さらに、IL-7 プロモーターに存在する Interferon Regulatory Factor Element (IRF-E) が共培養や IFN- β 刺激での IL-7 誘導に必須であることがレポーター法により明らかとなった。この IRF-E に結合する転写因子 IRF を発現させると IL-7 プロモーターの活性が上昇し、逆に dominant negative 型 IRF を発現させるとその活性が抑制された。以上の結果から、リンパ球とストローマ細胞の相互作用により IFN-IRF シグナル伝達系が動員され、IL-7 の発現が誘導される可能性が示唆された。(瀬海美穂、生田宏一)

（４）IL-7 コンディショナルノックアウトマウスの解析

IL-7 は皮膚・腸管・胸腺の上皮細胞、骨髄・胸腺の間葉系ストローマ細胞、そして脾臓とリンパ節の細網細胞によって産生される。しかし、それぞれの細胞が産生する IL-7 の局所における役割についてはほとんどわかっていない。この問題を明らかにするために、我々は第 4 エクソンの両側に loxP 配列を挿入した IL-7 floxed マウスを作製した。このマウスを keratin 5-Cre トランスジェニックマウスと交配し、胸腺と皮膚の上皮細胞でのみ IL-7 を欠損したコンディショナルノックアウトマウスを得た。コンディショナルノックアウトマウスはコントロールマウスと比較して胸腺の全細胞数と $\gamma\delta$ T 細胞数が若干減少し、逆に胸腺の NKT 細胞数は若干増加した。これらの結果から、胸腺の上皮細胞と間葉系ストローマ細胞の両方に由来する IL-7 が胸腺細胞の生存と増幅に関与していることが示唆された。（原崇裕、生田宏一）