

## II 細胞機能とサイトカイン

### 3. 胸腺内での T 細胞分化とサイトカイン\*

原田陽介\*\*  
久保允人\*\*

**Key Words** : thymus, IL-7, selection

#### はじめに

T細胞分化における運命決定は胸腺の微小環境から受け取るさまざまなシグナルによって制御される。特にT細胞レセプター(TCR)とサイトカインレセプターを介するシグナルはそれぞれのステージに特異的な遺伝子発現を制御することでT細胞分化を厳密にコントロールしている。本稿では、胸腺分化におけるサイトカインの役割をIL-7の機能を中心に解説していきたい。

#### T細胞初期分化とサイトカイン

リンパ球前駆細胞は胸腺内に入るとCD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>ダブルネガティブ(DN)未熟胸腺細胞からCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>ダブルポジティブ(DP)胸腺細胞への分化を開始する。DN胸腺細胞はCD25とCD44の発現をもとにDN1(CD25<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>)、DN2(CD25<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>)、DN3(CD25<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>)、DN4(CD25<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>)の4つのサブセットに分けられる(図1)。DN1の時点ではまだT細胞系列へのコミットメントは完全にはなされておらず、ナチュラルキラー細胞(NK)や樹状細胞(DC)、ミエロイド系列への

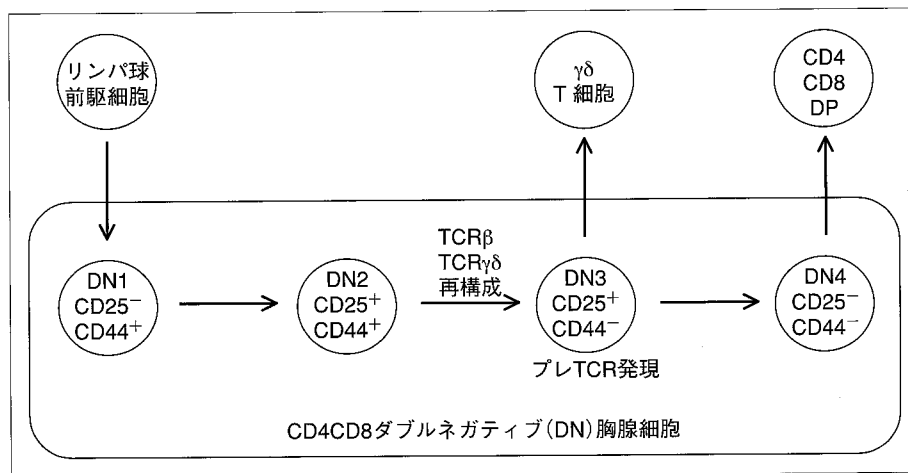


図1 DN胸腺細胞の分化(本文参照)

\* The role of cytokines in thymocyte development.

\*\* Yohsuke HARADA, Ph.D. & Masato KUBO, Ph.D.: 東京理科大学生命科学研究分子病態学研究部門[☎278-0022 野田市山崎2669]; Division of Molecular Pathology, Research Institute for Biological Sciences, Tokyo University of Science, Noda 278-0022, JAPAN

- 20) Yanagihara Y. Regulatory mechanisms of immunoglobulin E synthesis by human B cells. *Clin Exp Allergy Rev* 2006 ; 6 : 101.
- 21) Suto A, Nakajima H, Hirose K, et al. Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C $\epsilon$  transcription of IL-4-stimulated B cells. *Blood* 2002 ; 100 : 4565.
- 22) Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol* 2003 ; 3 : 721.
- 23) Sugai M, Gonda H, Kusunoki T, et al. Essential role of Id2 in negative regulation of IgE class switching. *Nat Immunol* 2003 ; 4 : 25.
- 24) Kishida T, Hiromura Y, Shin-Ya M, et al. IL-21 induces inhibitor of differentiation 2 and leads to complete abrogation of anaphylaxis in mice. *J Immunol* 2007 ; 179 : 8554.
- 25) Avery DT, Bryant VL, Ma CS, et al. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *J Immunol* 2008 ; 181 : 1767.
- 26) Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, et al. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol* 2004 ; 173 : 5361.
- 27) Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J Immunol* 2005 ; 175 : 7867.
- 28) Harada M, Magara-Koyanagi K, Watarai H, et al. IL-21-induced B $\epsilon$  cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses. *J Exp Med* 2006 ; 203 : 2929.
- 29) Ettinger R, Sims GP, Robbins R, et al. IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells. *J Immunol* 2007 ; 178 : 2872.
- 30) Konforte D, Simard N, Paige CJ, et al. IL-21 : an executor of B cell fate. *J Immunol* 2009 ; 182 : 1781.

\* \* \*

分化能を有する前駆細胞を含んでいる。T細胞系列にコミットされたDN2はDN3へと移行する間にTCR $\beta$ とTCR $\gamma\delta$ の再構成を起し、一部は $\gamma\delta$ T細胞へと分化する。再構成に成功した $\beta$ 鎖はpT $\alpha$ 鎖、CD3とプレTCR複合体を形成し細胞表面に発現する。プレTCRはリガンドによる刺激を受けずに細胞表面に発現するだけで細胞内にシグナルを伝達し、このシグナルがDN4への移行とその後のCD4、CD8の発現およびTCR $\alpha$ 鎖の再構成を誘導する。

さまざまなサイトカインが胸腺上皮細胞から作られるが、その多くがリダグダントな機能を持っていると考えられている。そのなかでもIL-7は胸腺内のT細胞の初期分化に決定的な役割を担っていることがIL-7およびIL-7レセプターの欠損マウスの研究から明らかにされてきた。IL-7レセプターはIL-7R $\alpha$ 鎖とcommon  $\gamma$ 鎖( $\gamma$ C)からなり、 $\gamma$ CはIL-2、IL-4、IL-9、IL-15、IL-21レセプターによって共有されている(図2)。IL-7レセプターのシグナルはJakキナーゼファミリーのJak1とJak3、およびSTATファミリーのSTAT5との組み合わせにより伝達される。IL-7<sup>1)</sup>、IL-7レセプター $\alpha$ 鎖<sup>2)</sup>、 $\gamma$ C<sup>4)~6)</sup>およびJak1<sup>7)</sup>、Jak3<sup>8)~10)</sup>のそれぞれの欠損マウスで著しい胸腺細胞数の減少が観察される。

IL-7レセプターからのシグナルは胸腺細胞の増殖と生存の両方にかかわっている。IL-7欠損マウスではDN1における細胞増殖は野生型マウスと変わらないが、DN2以降のサブセットにおける増殖が低下していた<sup>11)</sup>。このことはDN1からDN2への移行の際に胸腺細胞の増殖はIL-7依存性になることを示している。IL-7のもう一つの役割として、Bcl-2の発現上昇を介する未熟胸腺細胞の細胞死の抑制が示唆されている。IL-7は*in vitro*においてDN2の生存因子として働くこと<sup>12)</sup>、また、IL-7欠損マウスではDN胸腺細胞でアポトーシスを起こしている細胞が増加していることが観察されている<sup>11)</sup>。このIL-7欠損によって起こる細胞死はFasやp53の欠損マウスでもみられることから、この細胞死にはFasやp53は関与しないと考えられ<sup>13)</sup>、IL-7やJak3の欠損マウス由来のDN胸腺細胞ではBcl-2の発現低下が観察されている<sup>11)14)</sup>。また、IL-7欠損マウスの胸腺細胞におけるBcl-2の発現はDN1では野生型と変わらず、DN2以降のサブセットで低下している<sup>11)</sup>。このIL-7欠損マ

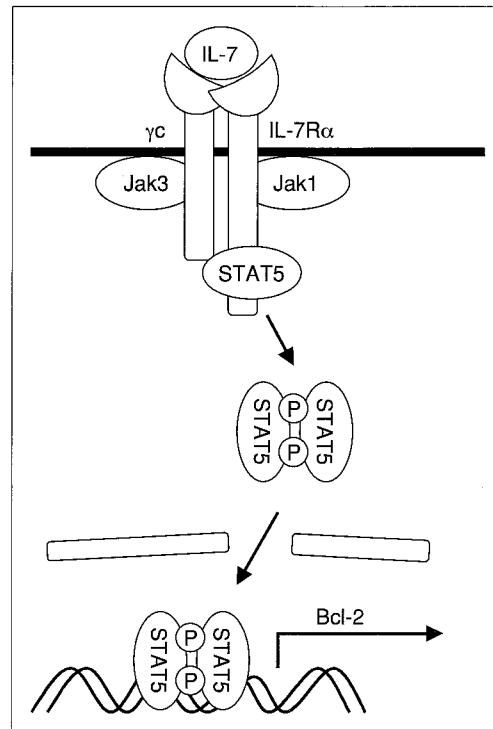


図2 IL-7レセプターと細胞内シグナル

IL-7レセプターはIL-7R $\alpha$ 鎖とcommon  $\gamma$ 鎖( $\gamma$ C)のヘテロ2量体からなっている。IL-7R $\alpha$ 鎖の細胞内領域にはJak1が、 $\gamma$ C鎖にはJak3が結合している。IL-7がIL-7レセプターに結合するとJak1とJak3が活性化され、IL-7R $\alpha$ 鎖のチロシン残基がリン酸化される。STAT5はこのリン酸化されたチロシンに結合し、さらにSTAT5自身がJak3によってリン酸化される。リン酸化されたSTAT5はホモ2量体を形成し、Bcl-2を含む標的遺伝子を転写活性化する。

ウス由来のDN胸腺細胞をIL-7の存在下で培養するとBcl-2の発現が誘導されることから、IL-7はDN2のステージにおける胸腺細胞の生存維持とBcl-2発現調節の両方を制御していることが示唆される。Bcl-2のトランスジェニックマウスとIL-7レセプター $\alpha$ 鎖の欠損マウスを掛け合わせると胸腺細胞の分化と増加がある程度回復することも、Bcl-2の制御がIL-7の重要な役割の一つであることを示している<sup>15)16)</sup>。しかし、このマウスの胸腺細胞数は野生型マウスと同じレベルには回復しないことから、IL-7レセプターの下流ではほかのアポトーシス関連因子も関与していることが考えられる。Bcl-2欠損マウスでは胎児期のT細胞分化は正常に起こることからもBcl-2の

発現調節はIL-7による細胞死抑制機構の一部であることが示唆されている<sup>17)</sup>.

### CD4/CD8 T細胞の運命決定とサイトカイン

CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>DPになった胸腺細胞はTCRからのシグナルを受け取ることによってポジティブセレクションを受け、さらにCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞またはCD8<sup>+</sup>細胞障害性T細胞へと分化する。しかしながら、ほとんどのDP胸腺細胞はTCRシグナルを受け取れず死んでいく。TCRシグナルを受け取る前にはDP胸腺細胞はIL-7などのサイトカインに対して反応しなくなっている。TCRシグナルを受け取る前のDP胸腺細胞はIL-7レセプターα鎖を発現していない<sup>18)19)</sup>。これがIL-7に対する反応性を失わせる原因として考えられるが、たとえIL-7レセプターを強制発現させてもIL-7に対する反応性を回復することはできない。また、IL-4レセプターはこれらの細胞で発現しているにもかかわらず、IL-4に対する反応性も有していない<sup>19)</sup>。これらの原因としてはSOCS1分子による抑制機構が考えられている。SOCS1分子はDP胸腺細胞で高発現しているが、TCRを介するポジティブセレクションシグナルを受け取ると発現が減少する<sup>19)20)</sup>。SOCS1分子はγcを使用するすべてのサイトカインシグナルを抑制する。そのため、たとえIL-4レセプターを発現していてもDP胸腺細胞はIL-4に対して反応しない。実際SOCS1欠損マウス由来のDP胸腺細胞はIL-4に対して反応するようになる<sup>19)</sup>。これらの結果はポジティブセレクションを受ける前のDP胸腺細胞は、SOCS1分子などを発現することでサイトカインシグナルを受け取ることを抑制されていることを示している。この機構によって、適切なTCRを発現できないためTCRからのシグナルを受け取ることができなかったDP胸腺細胞は、適正なサイトカインシグナルを受け取ることなく死んでいき、適切なTCR特異性を持つDP胸腺細胞のみが生存することができ、成熟T細胞へと分化することができると考えられてきた。

TCRシグナルを受け取ったDP胸腺細胞が、CD4またはCD8 T細胞へ分化するためにはサイトカインに対して反応することが必要とされる。DP

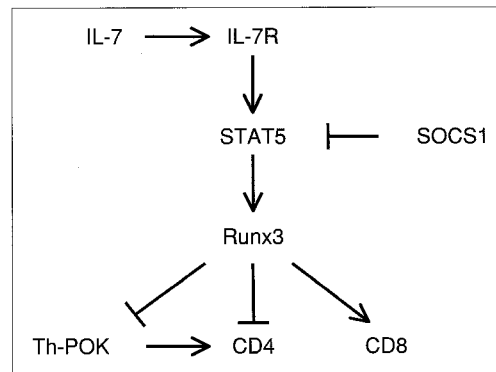


図3 IL-7シグナルによるCD4/CD8分子の発現調節メカニズム

IL-7がIL-7レセプターに結合するとSTAT5が活性化され、STAT5はRunx3の発現を誘導する。Runx3はCD4遺伝子のサイレンサー領域に結合し、CD4遺伝子の転写を抑制する。また、Th-POKの発現を抑制することでCD4 T細胞への分化を阻害する。一方、Runx3はCD8のエンハンサー領域に結合することでCD8遺伝子の転写を活性化する。SOCS1分子はSTAT5の活性化を阻害することでCD8 T細胞への分化を抑制する。

胸腺細胞がCD4シングルポジティブT細胞(CD4SP)へ移行するためには転写因子であるTh-POKとGATA3<sup>21)~23)</sup>が必要とされ、一方、CD8シングルポジティブT細胞(CD8SP)への移行にはCD4サイレンサーとして働くRunx3の存在が必要とされている<sup>24)~26)</sup>。Th-POKとRunx3は互いにその発現を抑制することで、それぞれのT細胞への分化を増強する。最近、SingerらのグループはTCRシグナルではなくIL-7シグナルがRunx3の発現誘導を介してCD8系列への運命決定をひき起こすことを遺伝学的な手法を用いて示した<sup>27)</sup>。彼らはまずSTAT5欠損マウスおよびSTAT5のインヒビターであるSOCS1のトランスジェニックマウスにおいて、CD4SPへの分化はほとんど影響されないがCD8SPへの分化が著しく阻害されることを見出し、γcサイトカインのシグナルがCD8SPへの分化に必要なことを示した。さらに、彼らはZAP-70とSOCS1のダブルノックアウトマウスにIL-7レセプターを強制発現させたマウスを作製した。このマウスのDP胸腺細胞はZAP-70がないためにTCRシグナルは受け取ることができないが、IL-7レセプターを発現し、SOCS1は発現していないためT細胞はIL-7シグナルを受け取ることができる状態にある。In vitroでこ

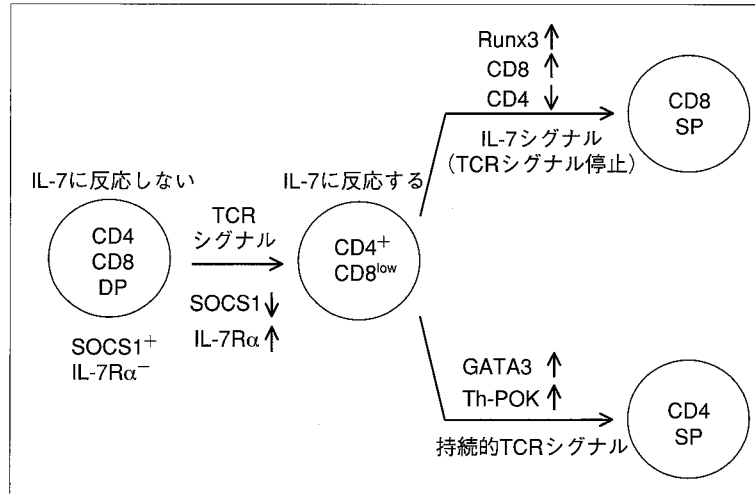


図4 CD4/CD8 T細胞の系列選択

TCRシグナルを受け取る前のDP胸腺細胞はIL-7Rα鎖を発現せず、SOCS1分子を発現しているためにIL-7をはじめとするサイトカインのシグナルを受け取ることができない。TCRシグナルを受け取ったDP胸腺細胞はIL-7Rα鎖を発現すると同時にSOCS1分子の発現を低下させ、IL-7に反応できるようになる。また、TCRシグナルを受け取ったDP胸腺細胞はCD8の発現が低下する。MHCクラスII拘束性のTCRを発現する胸腺細胞はCD4からの補助刺激を受け取り、TCRシグナルは持続する。持続的なTCRシグナルはTh-POKの発現を誘導し、胸腺細胞はCD4 T細胞に分化する。一方、MHCクラスI拘束性のTCRを発現する胸腺細胞はCD8の発現が低いために十分な補助刺激が得られず、TCRシグナルは持続しない。このときIL-7シグナルを受け取るとRunx3の発現が誘導され、CD8の発現上昇とCD4の発現低下が起こり、胸腺細胞はCD8 T細胞に分化する。

のDP胸腺細胞をIL-7存在下で培養すると、Runx3の発現上昇とともにCD8SPに分化する。また、IL-4にもIL-7に比べ弱いながらも同様の効果が認められた。しかしながら、これらのDP胸腺細胞はin vivoではCD8SPに分化しない。これはDP胸腺細胞が存在する胸腺皮質領域にはIL-7産生細胞が少ないためだと考えられる。そこで、彼らはIL-7を浸透圧ポンプまたは遺伝子導入することで供給したところ、どちらのマウスでもCD8SPがTCRシグナルの非存在下で分化してくることが認められた。

以上の結果とこれまでの知見から、IL-7シグナルは次のようなメカニズムによりCD8 T細胞への分化を促進すると考えられる(図3)。IL-7シグナルによって活性化されたSTAT5はRunx3の発現を誘導する。Runx3はCD4遺伝子に対してはそのサイレンサー領域に結合し発現を抑制する一方、CD8遺伝子に対してはエンハンサー領域に結合して転写活性化する<sup>28)</sup>。Runx3は同時にTh-POK

の発現を抑制することによってもCD4 T細胞への分化を阻害する。このように、CD8 T細胞への分化はIL-7R—STAT5—Runx3経路によって促進的に制御されている。それに対してDP細胞におけるSOCS1の発現は、STAT5を阻害することでこの経路を遮断し、CD8 T細胞の分化を抑制している<sup>20)29)</sup>。

CD4 T細胞とCD8 T細胞系列の選択に関してはいくつかのモデルが提唱されているが、上記の結果はカイネティックシグナリングモデルによく合致する(図4)<sup>28)</sup>。このモデルでは、まずDP胸腺細胞がTCRシグナルを受け取るとCD8の発現が減少する。もしTCRがMHCクラスI拘束性であった場合、CD8による補助刺激が得られずシグナルは持続せずにストップする。しかし、TCRがMHCクラスII拘束性であった場合は、CD4が発現しているために十分な補助刺激が得られ、シグナルは持続する。持続的なTCRシグナルはTh-POKを誘導し、CD4 T細胞系列への選択が行

われる<sup>30)</sup>。TCRシグナルのストップした細胞はRunx3を発現し、CD8 T細胞系列に選択される。Singerらの結果は、TCRシグナルのストップしたMHCクラスI拘束性のTCRを持つ胸腺細胞がIL-7シグナルを受け取ることでRunx3を発現し、CD8SPに分化することを示している。DP胸腺細胞ではTCRシグナルによってIL-7レセプターの発現とSOCS1分子の減少が誘導され、サイトカインに対する反応性を獲得する。しかし、その後のCD8 T細胞系列への選択には、TCRシグナルよりはむしろIL-7を中心としたサイトカインシグナルが主な役割を果たしていると考えられる。

### おわりに

このように、IL-7はダブルネガティブ(DN)胸腺細胞の増殖と生存、ダブルポジティブ(DP)胸腺細胞からCD8 SP T細胞への選択など、さまざまな場面でT細胞分化の運命決定を担っていることがわかってきた。しかしながら、胸腺内のIL-7産生細胞の分布およびその局所におけるIL-7の役割にはまだ不明な点が多い。また、なぜIL-7がCD4シングルポジティブT細胞(CD4SP)にコミットされる細胞では働かず、CD8シングルポジティブT細胞(CD8SP)にコミットされる細胞のみで働くのかは疑問として残る。胸腺細胞は胸腺内を移動しつつ、適切な場所とタイミングでさまざまなシグナルを受け取ることで、その分化が厳密にコントロールされている。今後はサイトカインを産生しているストローマ細胞と胸腺細胞のコミュニケーションがどこで起こり、その際になされる運命決定の違いがどのようなメカニズムによって生み出されていくのかをさらに詳細に検討していく必要があるだろう。

### 文 献

- 1) Von Freeden-Jeffrey U, Vieira P, Lucian LA, et al. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 1995 ; 181 : 1519.
- 2) Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 1994 ; 180 : 1955.
- 3) Maki K, Sunaga S, Komagata Y, et al. 1996. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack  $\gamma\delta$  T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 ; 93 : 7172.
- 4) DiSanto JP, Muller W, Guy-Grand D, et al. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor  $\gamma$  chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 ; 92 : 377.
- 5) Ohbo K, Suda T, Hashiyama M, et al. Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor  $\gamma$  chain. *Blood* 1996 ; 87 : 956.
- 6) Cao X, Shores EW, Hu-Li J, et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor  $\gamma$  chain. *Immunity* 1995 ; 2 : 223.
- 7) Park SY, Saijo K, Takahashi T, et al. Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase deficient mice. *Immunity* 1995 ; 3 : 771.
- 8) Thomis DC, Gurniak CB, Tivol E, et al. Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3. *Science* 1995 ; 270 : 794.
- 9) Nosaka T, Van Deursen JM, Tripp RA, et al. Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science* 1995 ; 270 : 800.
- 10) Rodig SJ, Meraz MA, White JM, et al. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 1998 ; 93 : 373.
- 11) Von Freeden-Jeffrey U, Solvason N, Howard M, et al. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* 1997 ; 7 : 147.
- 12) Godfrey DI, Kennedy J, Suda T, et al. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 1993 ; 150 : 4244.
- 13) Kim K, Lee CK, Sayers TJ, et al. The trophic action of IL-7 on pro-T cells : inhibition of apoptosis of pro-T1, T2, and T3 cells correlates with Bcl-2 and Bax levels and is independent of Fas and p53 pathways. *J Immunol* 1998 ; 160 : 5735.

- 14) Eynon EE, Livak F, Kuida K, et al. Distinct effects of JAK3 signaling on  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  thymocyte development. *J Immunol* 1999 ; 162 : 1448.
- 15) Akashi K, Kondo M, Von Freeden-Jeffrey U, et al. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* 1997 ; 89 : 1033.
- 16) Maraskovsky E, O'Reilly LA, Teepe M, et al. Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1<sup>-/-</sup> mice. *Cell* 1997 ; 89 : 1011.
- 17) Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, et al. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993 ; 75 : 229.
- 18) Van De Wiele CJ, Marino JH, Murray BW, et al. Thymocytes between the  $\beta$ -selection and positive selection checkpoints are nonresponsive to IL-7 as assessed by STAT-5 phosphorylation. *J Immunol* 2004 ; 172 : 4235.
- 19) Yu Q, Park JH, Doan LL, et al. Cytokine signal transduction is suppressed in preselection double-positive thymocytes and restored by positive selection. *J Exp Med* 2006 ; 203 : 165.
- 20) Chong MM, Cornish AL, Darwiche R, et al. Suppressor of cytokine signaling-1 is a critical regulator of interleukin-7-dependent CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *Immunity* 2003 ; 18 : 475.
- 21) He X, He X, Dave VP, et al. The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature* 2005 ; 433 : 826.
- 22) Sun G, Liu X, Mercado P, et al. The zinc finger protein cKrox directs CD4 lineage differentiation during intrathymic T cell positive selection. *Nat Immunol* 2005 ; 6 : 373.
- 23) Wang L, Wildt KF, Zhu J, et al. Distinct functions for the transcription factors GATA-3 and ThPOK during intrathymic differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* 2008 ; 9 : 1122.
- 24) Egawa T, Tillman RE, Naoe Y, et al. The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 1945.
- 25) Setoguchi R, Tachibana M, Naoe Y, et al. Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development. *Science* 2008 ; 319 : 822.
- 26) Sato T, Ohno S, Hayashi T, et al. Dual functions of Runx proteins for reactivating CD8 and silencing CD4 at the commitment process into CD8 thymocytes. *Immunity* 2005 ; 22 : 317.
- 27) Park JH, Adoro S, Guinter T, et al. Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat Immunol* 2010 ; 11 : 257.
- 28) Singer A, Adoro S, Park JH. Lineage fate and intense debate : myths, models and mechanisms of CD4<sup>-</sup> versus CD8<sup>-</sup> lineage choice. *Nat Rev Immunol* 2008 ; 8 : 788.
- 29) Catlett IM, Hedrick SM. Suppressor of cytokine signaling 1 is required for the differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* 2005 ; 6 : 715.
- 30) He X, Park K, Wang H, et al. CD4-CD8 lineage commitment is regulated by a silencer element at the ThPOK transcription-factor locus. *Immunity* 2008 ; 28 : 346.

\* \* \*