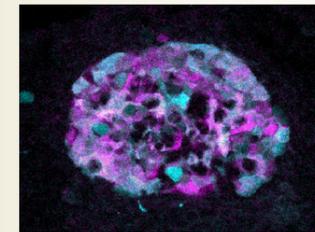


Analysis and Synthesis of Multidimensional Immune Organ Network

科学研究費助成事業新学術領域研究 免疫四次元空間ダイナミクス 平成24年度～平成28年度

新学術領域研究 研究成果報告書

領域番号: 3401



領域略称名: 免疫四次元空間

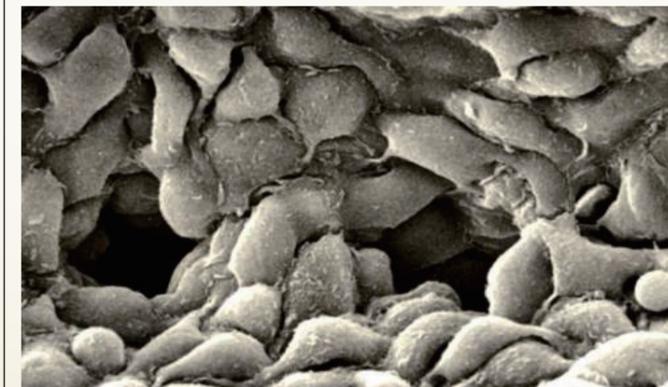
The development and function of immune cells depend on the systemic network of specialized microenvironments in immune organs, including the bone marrow, thymus, lymph nodes, and spleen. Although immune cells are of hematopoietic origin, the microenvironments of the immune organs are primarily formed from highly heterogeneous stromal cells of nonhematopoietic origins. Thus, to understand the immune system, it is essential to elucidate how the stromal cells and their network develop and function normally and deviate during aging and in diseases. In this project, we focus on the studies of immune organ microenvironments by multidisciplinary approaches, including synthetic biology, towards the understanding of multidimensional characteristics of stromal cells and their coordinated network.

This project consists of three research aspects as follows. In the first aspect of the study, we seek to understand the molecular mechanisms underlying the development and function of the bone marrow niches, thymic microenvironments, and stromal cells in secondary lymphoid organs. In the second aspect, we seek to clarify the dynamic regulation of the immune organ network through structural analysis and

intravital imaging of immune molecules and stromal cells. In the third aspect, we seek to understand the deviations of immune organs caused by ageing and diseases and to reconstruct immune functions through synthetic approaches.

This study is expected to contribute to comprehensive understanding of the multidimensional nature of the dynamic immune system, functional interfaces of the immune system with the endocrine and nervous systems, and the nature of the “context” detected in various biological systems. Advances in the understanding of immune deviations and reconstruction of immune organ functions should be useful for devising novel approaches to the treatment and management of various intractable diseases.

The thymus represents an epithelial-mesenchymal tissue that is anatomically structured into discrete cortical and medullary regions. Each region contains phenotypically and functionally distinct stromal cells, as well as thymocytes at defined stages of maturation. Many studies support the idea that the stepwise process of thymocyte development and selection requires serial migration through anatomically distinct

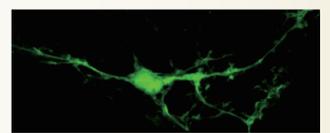


thymic regions of the thymus, where interactions with specialised cortical and medullary thymic epithelial (cTEC and mTEC) subsets can take place. Recent progresses in cellular and molecular biology of TEC subsets have shed lights on previously overlooked mechanisms of T cell development and selection. Here we provide a summary of current knowledge on the development and function of the thymic microenvironment, paying particular attention to the cortical and medullary epithelial compartments.

Thymic epithelial cells: essential regulators of T-cell development and selection

As an exclusive site for the production of T-cells bearing the $\alpha\beta$ T-cell receptor, the thymus represents a critical component of the adaptive immune system. Migrant lymphoid progenitors that colonise the thymus are triggered to undergo a complex differentiation process that includes phases of proliferation, differentiation and lineage choice. Critically, developing thymocytes are screened for their ability to recognise peptides in the context of

major histocompatibility complex (MHC) molecules. Such intrathymic positive and negative selection events therefore aid the ability of the thymus in its generation of a self-tolerant and non self-reactive T-cell pool. Importantly, T-cell development and selection are not cell autonomous processes, with developing T-cell precursors requiring constant input from cells that make of thymic microenvironments. Of these cells, thymic epithelial cells (TEC) are known to represent a key cell type. In recent years, many studies have focussed on gaining a better understanding of the processes that shape the development of epithelial progenitors that characterise the embryonic thymic anlage towards phenotypically and functionally distinct cortical and medullary epithelial cells that are responsible for the well known anatomical organisation of the adult thymus. Here, we summarise current knowledge regarding the events that lead to the formation of cortical and medullary TEC microenvironments. Specifically, we focus



領域代表者: 高濱 洋介
徳島大学先端酵素学研究所 教授

attention on studies that have addressed the specialisation of the cortex for the positive selection of CD4+8+ thymocytes, and the generation of Aire- expressing medullary environments and its role in self/non-self discrimination, all of which underlines the distinct roles played by cortical and medullary epithelial cells during thymocyte development. Thus, while T-cell responses are widely acknowledged as being central to effective immunity, we aim to reinforce the key, perhaps often unappreciated, supporting role that thymic epithelial environments as a whole play in the effective functioning of the adaptive immune system.

目次

| | |
|----------------------|-----|
| はしがき | 02 |
| 研究領域の目的及び概要 | 03 |
| 研究組織 | 04 |
| 交付決定額(配分額) | 07 |
| 各研究項目の連携状況 | 08 |
| 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度 | 10 |
| 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況 | 11 |
| 総括班評価者による評価 | 12 |
| 最終評価書 | 13 |
| 最終研究成果報告 | |
| 総括班 | 16 |
| A01計画班 | 22 |
| A02計画班 | 34 |
| A03計画班 | 42 |
| 通期公募班 | 48 |
| 第一期公募班 | 58 |
| 第二期公募班 | 94 |
| オンラインニュースレター | 127 |

Meetings

| | |
|----------------------------|-----|
| 第1回総括班会議 | 21 |
| 第1回班会議 | 29 |
| 第1回国際シンポジウム | 41 |
| 第2回班会議・第3回総括班会議 | 61 |
| 第1回サマースクール | 67 |
| 第2回国際シンポジウム | 71 |
| 配偶子産生制御・免疫四次元空間 二班合同シンポジウム | 74 |
| 第3回徳島大学国際免疫学シンポジウム(共催) | 75 |
| 第3回班会議・第5回総括班会議・第2回サマースクール | 83 |
| 第4回徳島大学国際免疫学シンポジウム(共催) | 97 |
| 第6回総括班会議 | 104 |
| 第4回班会議・第7回総括班会議・第3回サマースクール | 105 |
| 第5回徳島大学国際免疫学シンポジウム(共催) | 113 |
| 第5回班会議・第8回総括班会議・第4回サマースクール | 126 |
| 最終年度国際シンポジウム | 126 |

はしがき

この小冊子は、新学術領域「免疫四次元空間ダイナミクス」の活動をまとめたものです。研究領域の活動は、公式には5年間でした。しかし実際には、同志とその候補者が集まっては考えを練ることを繰り返した熱い時間を含む準備期間の約2年間、また、主たる5年間を終えた後にも総括に至るべく静かな考察を重ねた1年間を含めると、丸8年間にまたがる活動でありました。個人的に言えば私の50代はほぼ、本研究領域とともにあったといえましょう。

新学術領域「免疫四次元空間ダイナミクス」は、従来、ともしれば血液系細胞ばかりに視点を置いた研究に終始していた免疫学の潮流に対して、「いや、そうではない」と、非血液系細胞による「場」にじゅうぶんな視座を広げることの必要性と重要性を説いた研究班でした。少々おかげさえば、免疫学に臨む姿勢の変更を迫る研究組織でした。その意味で、自身にも班員にも周辺にも学術、殊に免疫学、に臨む姿勢の真摯さを要求する研究班でありました。

私自身、この意図に共鳴し志を同じくする友を得た研究班でありました。こうして心血を注いできた本研究領域「免疫四次元空間ダイナミクス」に対して、文部科学省におかれた科学技術・学術審議会学術分科会科学研究費補助金審査部会において「期待以上の成果があった」と「A+」との事後評価が与えられたことは、研究班を共に担ってくださった同志同僚とともに素直に喜び、大いに胸を張りたいと思っております。

本邦の科学技術の停滞が懸念される昨今です。新学術領域「免疫四次元空間ダイナミクス」は少なくとも、最高品質の学術を真剣に考え討議し発信してきた研究グループでありました。本研究班をご支援くださった文部科学省と関係の諸氏に心より感謝いたします。また、本研究班に関わった研究者各位の今後の更なるご活躍を楽しみに祈念しております。

最後に、この小冊子にも表れていますが、本研究班のウェブサイトでは、私自身の人生に臨む気骨形成の基盤になった、ジョンレノンとオノヨーコの作品「Some Time in New York City」に敬意を込めて装丁いたしました。装丁を具現化するにあたっては株式会社トライスと渡辺勇生氏に工夫いただきました。この「場」にて心を込めて感謝申し上げます。

更なる冒険の渡航を目前に
徳島の自宅にて

2018年3月

高濱 洋介



研究領域の目的及び概要

研究領域の目的概要

免疫細胞の分化と免疫応答は、全身に配置された多様なリンパ器官を主な「場」とし、これらの場が血液系細胞等を介した高次の機能的ネットワークを形成することではじめて成立するダイナミックな事象である。本研究は、免疫学に加え、発生生物学、構造生物学、血液学など多様な背景で成果を挙げてきた研究者が結集し、従来の免疫学研究では未解明であった「場」を含めた「免疫空間」の四次元的な形成・連携・攪乱の機構解明と再構築をめざした。本研究の推進により、血液系細胞を主な対象とする従来の免疫学研究に、「免疫の場」を構築するストローマ細胞を主な研究対象とする新しい取り組みが加わることで、免疫システムの四次元で動的な本質の解明が大きく前進すると目された。また、免疫空間の人工的再構築による疾患制御の技術基盤が整備され、更に、免疫系と内分泌系や神経系など高次制御システム間の動的な統合による全身恒常性調節機構の解明につながる事が期待された。

研究の学術的背景

免疫学研究は、生化学、分子生物学、ゲノム科学、発生工学、臨床医学などの進歩を積極的に取り入れ、急速に進展してきた。特に、リンパ球をはじめとする血液系細胞の分化とそれらが協調的に担う免疫応答の機構に関する分子生物学的解明において、医学生物学を牽引する優れた成果を挙げってきた。一方、免疫現象は、骨髄・胸腺・二次リンパ組織(リンパ節・脾臓)といったリンパ器官を主たる「場」として逐次的に引き起こされる四次元時空間事象である。血液系細胞は異なるリンパ器官を巡って産生・選別・活性化・維持されるため、リンパ器官が全身性のネットワークを形成し互いに連携することは、免疫システムの統御に不可欠である。それゆえ、免疫システムの全容解明と縦横な制御には、血液系細胞を対象とした研究のみならず、リンパ器官を主とする「免疫の場」とそれらのネットワークからなる「免疫空間」の本態解明もまた重要である。しかし、血液系細胞に関する分子細胞理解が高度に成熟してきたのに対して、免疫空間の本態解明に向けた研究は、リンパ器官を構築するストローマ(間質)細胞(上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、細網細胞など)の同定・分類・精製の技術的困難さなどから、進展が遅れていた。

とはいえ応募時までの知見から、リンパ器官を構築するストローマ細胞には、血液系細胞とならんで、免疫システムにとって根幹的な重要機能が担われていることが明らかにされてきた。具体的には、胸腺の深部に局在する髄質上皮細胞は、全身各臓器に固有の遺伝子を微量ずつ発現する無差別遺伝子発現という特徴をもち、自己寛容の確立と自己免疫疾患の発症制御に必須である。一方、胸腺皮質上皮細胞は固有の「胸腺プロテアソーム」を発現することで特殊な自己抗原を提示し、生体防御に有用なT細胞レパトアを形成する。これらの発見から、自己を守り非自己を攻撃する免疫システムの本質というべき性状の確立には、胸腺を構築する上皮細胞亜集団に固有の分子機能が必要であることが示された。また、骨髄には、造血幹細胞の維持とB細胞の産生を担う「ニッチ」が形成されていることや、リンパ節の線維芽細網細胞はT細胞と樹状細胞の「相互作用の場」を提供することも明らかにされてきた即ち、「免疫の場」を構築するストローマ細胞に視点を広げた研

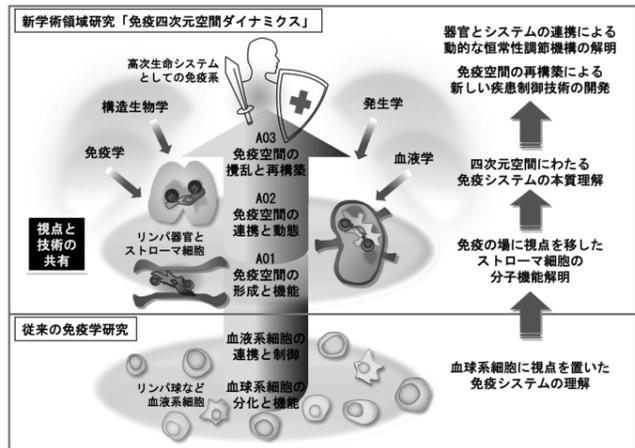
究は、免疫システムの本質解明に迫る重要知見の宝庫というべき未開拓学術領域と考えられた。

また、骨髄での造血抑制が髄外組織に造血微小環境の形成を促すことや、自己免疫疾患で異所性に三次リンパ組織が形成されるといった、免疫の場の「連携」は古くから知られているが、その機構は殆ど明らかではなかった。応募時前後に、免疫応答にて産生される炎症性分子が血流を経て骨髄ニッチ細胞に作用し骨髄から単球を動員することが示され、動的な場の連携の分子機序が明らかにされつつあった。即ち、免疫の「場と場の連携」は、免疫システムの恒常性維持や病的変容と関連しており、その研究は全身に亘る恒常性を調節するダイナミックで可塑的な高次生命システムの本質解明に有用と考えられた。

更に、成人では胸腺が退縮し、加齢やがんなどによってリンパ組織が変容するが、その機構も未解明である。一方、リンパ器官の再構築とそれによる免疫システムの理解と制御を目指すシンセティックな器官機能研究が始められており、がんの新しい免疫制御法などの応用に向けて注目を集めつつある。即ち、免疫の場の「攪乱の機構解明と再構築」に向けた研究は、多くの難治性疾患の克服に貢献し得る社会的重要性を持つと考えられた。

本研究が「我が国の学術水準の向上・強化につながる新たな研究領域」である点

上記の通り、「免疫の場」に関する研究は、免疫システムの本質に新たに切り込む学術的重要性と、それに基づく応用可能性をもつ新たな学術領域と位置づけられた。同時に、免疫の場に関する研究では、我が国の貢献が極めて大きいことは特筆に値する。上記の胸腺プロテアソームの発見を含めT細胞の選択を支持する胸腺微小環境に関する研究、造血幹細胞の維持とB細胞の産生を司る骨髄ニッチに関する研究、免疫応答と記憶形成を担うリンパ節ストローマ細胞の性状解明と人工的再構築法に関する研究においては、いずれも日本から発信される成果は世界を牽引してきた。また、細胞運動の制御分子の同定とイメージング技術の応用に基づく免疫動態と器官連携の研究、老化T細胞の性状解明に基づくリンパ器官の老化と攪乱の研究は、いずれも「免疫の場」に視点を据えた新機軸の免疫システム研究として国際的に注目を集めてきた。更に、リンパ器官と血液系細胞のインター



フェースを担う分子群の構造生物学的研究、リンパ器官の形成を司る発生生物学的研究は、世界をリードする本邦発「免疫の場」研究である。加えて、リンパ器官を含むヒト免疫システムをマウス体内で再構築しその機能を解析する発生工学的技術開発において我が国の独創的研究の貢献は大きい。

このように、血液系細胞から「免疫の場」に視点を広げた研究は、従来の血液系細胞を対象にした研究と並んで高次生命システムの本質に迫る学術的重要性とそれに基づく応用の可能性をもつ、新規の学術領域研究と位置づけられた。また、「免疫の場」に関する学術領域では、免疫学のみならず、血液学、構造生物学、発生生物学といった多様な分野から多くの優れた成果が本邦から発信されており、この新たな学術領域の研究を束ね先導する新しい研究体制を我が国に構築すべき機は熟していた。よって、本研究計画は、我が国の学術水準の向上・強化につながる新たな研究領域であると考えられた。

研究組織

| 研究項目 | 課題番号／研究課題名 | 研究期間 | 代表者氏名 | 所属機関／部局／職 | 構成員数 |
|-----------|--|-----------------------|-------|--------------------------|------|
| X00 総括 | 24111001 免疫四次元空間ダイナミクス | 平成24年度 ～ 平成28年度 | 高瀧 洋介 | 徳島大学・先端酵素学研究所・教授 | 15 |
| A01 計画 | 24111002 リンパ器官形成の分子機構と制御 | 平成24年度 ～ 平成28年度 | 高田 慎治 | 自然科学研究機構・基礎生物学研究所・教授 | 3 |
| A01 計画 | 24111003 骨髄ニッチによる免疫担当細胞の維持機構 | 平成24年度 ～ 平成28年度 | 長澤 丘司 | 大阪大学・生命機能研究科・教授 | 1 |
| A01 計画 | 24111004 胸腺微小環境の機能解明と構築 | 平成24年度 ～ 平成28年度 | 高瀧 洋介 | 徳島大学・先端酵素学研究所・教授 | 1 |
| A01 計画 | 24111005 二次リンパ組織ストローマ細胞の性状と機能 | 平成24年度 ～ 平成28年度 | 宮坂 昌之 | 大阪大学・その他部局等・名誉教授 | 4 |
| A02 計画 | 24111006 免疫神経インターフェースにおけるシグナル授受の構造的基盤 | 平成24年度 ～ 平成28年度 | 高木 淳一 | 大阪大学・蛋白質研究所・教授 | 3 |
| A02 計画 | 24111007 リンパ器官の連携を担う免疫動態の解明 | 平成24年度 ～ 平成28年度 | 福井 宣規 | 九州大学・生体防御医学研究所・教授 | 2 |
| A03 計画 | 24111008 老化と病態によるリンパ器官の攪乱と免疫応答性の変容 | 平成24年度 ～ 平成28年度 | 湊 長博 | 京都大学・医学研究科・特命教授 | 1 |
| A03 計画 | 24111009 免疫組織の新規構築による疾患制御のための技術開発 | 平成24年度 ～ 平成28年度 | 渡邊 武 | 京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・客員研究員 | 3 |

統括・支援・計画研究 計9件

研究項目と研究組織

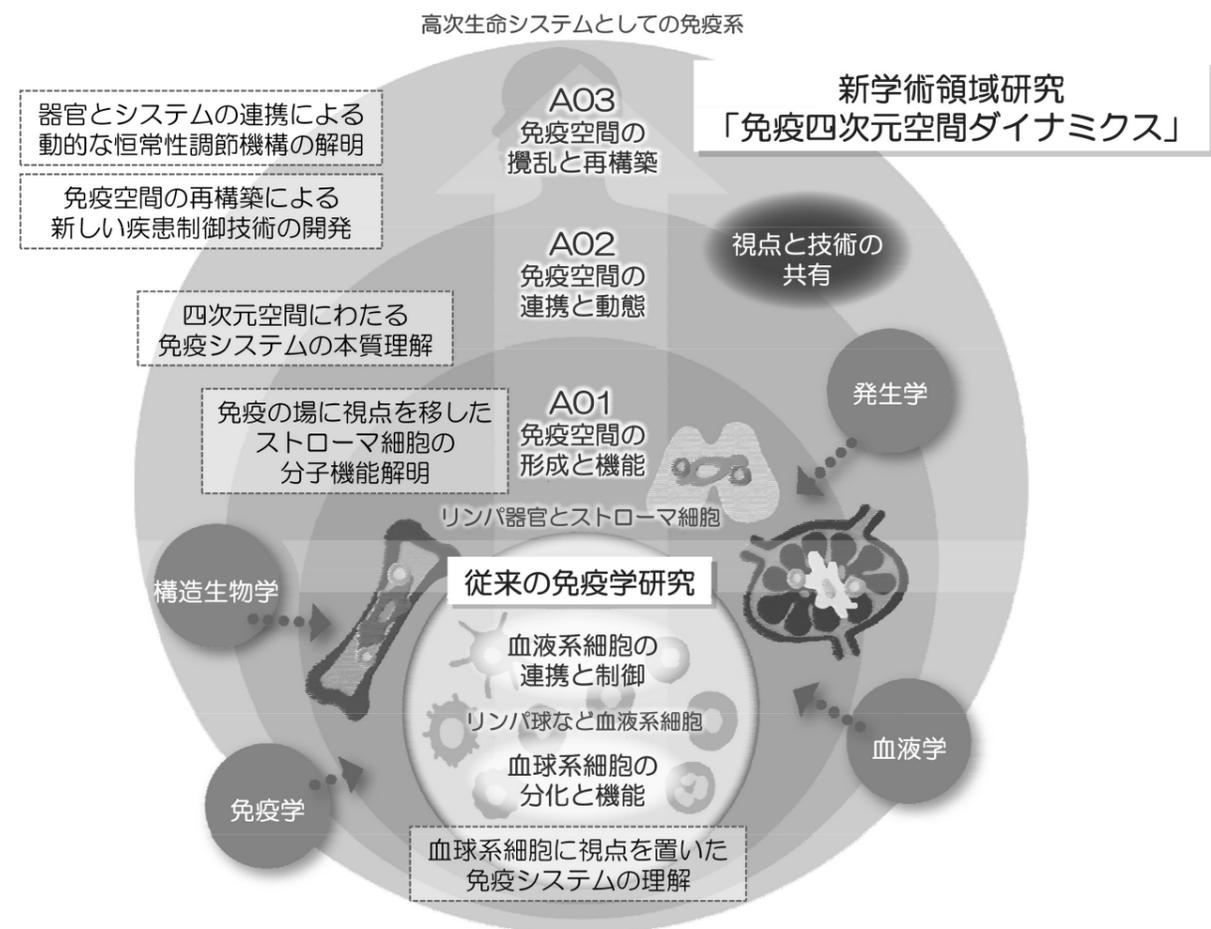
本提案領域では、血液系細胞に「免疫の場」を加えた「免疫空間」の本態解明を大目標に、骨髄・胸腺・二次リンパ組織を主とするリンパ器官の形成・連携・攪乱の機能解明をめざすとともに、解明された素材を組み合わせることで免疫空間の機能的再構築をめざした。この目的で、免疫学に加え、発生生物学、構造生物学、血液学など多様な背景の研究者による新たな視点と手法の共有による研究の飛躍的推進を図ることで、学術の新たな展開を図った。同時に、領域研究の主体が個々の独立した研究者による研究活動であることを十分に認識し、本領域の研究課題に直接関係した領域で独創的で国際的に高い水準の研究を推進してきている研究者が、連携を図りつつ各々独自のアプローチにて研究を推進することを基本とした。この基本に鑑みて本領域研究では、次の3項目による研究を設定し推進した。

- (A01) 免疫空間の形成と機能
- (A02) 免疫空間の連携と動態
- (A03) 免疫空間の攪乱と再構築

| 研究項目 | 課題番号／研究課題名 | 研究期間 | 代表者氏名 | 所属機関／部局／職 | 構成員数 |
|-----------|--|-----------------------|--------|---|------|
| A01 公募 | 25111503 2次リンパ組織形成におけるマスター制御因子の同定 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 澤 新一郎 | 北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授 | 1 |
| A01 公募 | 25111504 サイトカイン産生性免疫微小環境の可視化と機能解析 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 生田 宏一 | 京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授 | 4 |
| A01 公募 | 25111505 免疫老化、自己免疫疾患発症における胸腺髄質上皮細胞の変容とその意義 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 濱崎 洋子 | 京都大学・iPS細胞研究所・教授 | 1 |
| A01 公募 | 25111507 リンパ節血管周囲細胞の免疫記憶維持における役割 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 高田 健介 | 北海道大学・獣医学研究院・准教授 | 1 |
| A01 公募 | 25111508 胸腺上皮細胞の分化・形成に重要な核内酵素の同定とその機能解析 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 田中 芳彦 | 福岡歯科大学・歯学部・教授 | 1 |
| A01 公募 | 25111512 二次リンパ組織において記憶B細胞の時空間的制御を担う支持細胞の同定 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 北村 大介 | 東京理科大学・生命医科学研究所・教授 | 3 |
| A01 公募 | 25111513 免疫・造血ニッチとしての脾臓微小環境の形成ならびに再生の制御機構 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 後飯塚 僚 | 東京理科大学・生命医科学研究所・教授 | 1 |
| A01 公募 | 25111516 胸腺皮質微小環境の形成と機能の解明 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 新田 剛 | 東京大学・医学系研究科・准教授 | 2 |
| A01 公募 | 15H01150 自己免疫寛容に必要な胸腺上皮細胞の特性を決定する分子機構の解明 | 平成27年度 ～ 平成28年度 | 秋山 泰身 | 東京大学・医科学研究所・准教授 | 2 |
| A01 公募 | 15H01153 サイトカイン産生性免疫微小環境の機能解析 | 平成27年度 ～ 平成28年度 | 生田 宏一 | 京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授 | 4 |
| A01 公募 | 15H01154 胸腺上皮幹細胞の活性制御機構の解明とその応用 | 平成27年度 ～ 平成28年度 | 濱崎 洋子 | 京都大学・iPS細胞研究所・教授 | 1 |
| A01 公募 | 15H01156 免疫の『場』を形成する新たなストローマ細胞としての破骨細胞の機能解明 | 平成27年度 ～ 平成27年度 | 竹ヶ原 宜子 | University of Pennsylvania・School of Medicine・Senior Research Investigator [平成28年度は米国の上記職に転職したため交付を辞退した] | 1 |
| A01 公募 | 15H01161 免疫四次元空間におけるNotchリガンドの役割解明 | 平成27年度 ～ 平成28年度 | 穂積 勝人 | 東海大学・医学部・教授 | 2 |
| A01 公募 | 15H01162 時計遺伝子NFIL3によるリンパ組織形成メカニズムの解明 | 平成27年度 ～ 平成28年度 | 久保 允人 | 東京理科大学・生命医科学研究所・教授 | 3 |
| A01 公募 | 15H01163 転写因子によるリプログラミングを軸とした脾臓微小環境形成機構の解明 | 平成27年度 ～ 平成28年度 | 後飯塚 僚 | 東京理科大学・生命医科学研究所・教授 | 1 |
| A02 公募 | 25111506 腸内細菌による全身免疫組織でのB細胞刺激とIgE産生制御メカニズムの解明 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 鈴木 敬一郎 | 理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員 | 2 |
| A02 公募 | 25111509 免疫応答における接着制御分子の役割 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 片桐 晃子 | 北里大学・理学部・教授 | 1 |
| A02 公募 | 25111510 脳梗塞における炎症の鎮静化と組織修復メカニズムの解析 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 七田 崇 | 東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・プロジェクトリーダー | 1 |

| 研究項目 | 課題番号/研究課題名 | 研究期間 | 代表者氏名 | 所属機関/部局/職 | 構成員数 |
|-----------|---|-----------------------|--------|----------------------------------|------|
| A02 公募 | 25111514 免疫空間における腸型樹状細胞の誘導とその攪乱 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 岩田 誠 | 早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・ 客員上級研究員 | 4 |
| A02 公募 | 25111515 胸腺Tregニッチ仮説に基づいた成熟Treg“卒業証書分子”の探索 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 深澤 太郎 | 東京大学・理学系研究科・助教 | 1 |
| A02 公募 | 15H01155 皮膚を場とした血管と免疫システム間のインターフェイスの理解 | 平成27年度 ～ 平成28年度 | 梶島 健治 | 京都大学・医学研究科・教授 | 2 |
| A02 公募 | 15H01157 リンパ組織ストローマとしての交感神経の機能 | 平成27年度 ～ 平成28年度 | 鈴木 一博 | 大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・ 教授 | 1 |
| A02 公募 | 15H01158 蛍光生体イメージング技術による免疫細胞の骨吸収制御機構の解明 | 平成27年度 ～ 平成28年度 | 菊田 順一 | 大阪大学・医学系研究科・助教 | 1 |
| A02 公募 | 15H01165 パイエル板濾胞随伴上皮(FAE)の機能制御を行う微小環境の解明 | 平成27年度 ～ 平成28年度 | 金谷 高史 | 理化学研究所・統合生命医科学研究センター・ 研究員 | 1 |
| A02 公募 | 15H01166 Fat-associated lymphoid clusterの発生と機能解析 | 平成27年度 ～ 平成28年度 | 茂呂 和世 | 理化学研究所・統合生命医科学研究センター・ チームリーダー | 2 |
| A03 公募 | 25111501 T細胞レパートリー形成におけるプロテアソームの役割 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 笠原 正典 | 北海道大学・医学研究科・教授 | 2 |
| A03 公募 | 25111502 多能性幹細胞を用いた新時代移植医療における新しい免疫寛容誘導法の開発 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 和田 はるか | 北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師 | 2 |
| A03 公募 | 25111511 脱落膜リンパ球とトロフォブラストが構築する妊娠免疫系の再構築 | 平成25年度 ～ 平成26年度 | 亀谷 美恵 | 東海大学・医学部・准教授 | 3 |
| A03 公募 | 15H01149 腸管神経による免疫系・上皮系バリアおよび腸内フローラ制御機構解析 | 平成27年度 ～ 平成28年度 | 幡野 雅彦 | 千葉大学・医学研究院・教授 | 3 |
| A03 公募 | 15H01159 加齢に伴う二次リンパ組織内細胞間相互作用の変容による疾患発症の分子機構解明 | 平成27年度 ～ 平成28年度 | 門松 毅 | 熊本大学・生命科学研究部・助教 | 2 |
| A03 公募 | 15H01160 内臓脂肪組織内の免疫空間ニッチの攪乱とT細胞老化 | 平成27年度 ～ 平成28年度 | 佐野 元昭 | 慶應義塾大学・医学部・准教授 | 1 |
| A03 公募 | 15H01164 mTORC1シグナルを介した胸腺環境維持機構の解明 | 平成27年度 ～ 平成28年度 | 松田 達志 | 関西医科大学・生命医学研究所・准教授 | 3 |

公募研究 計32件



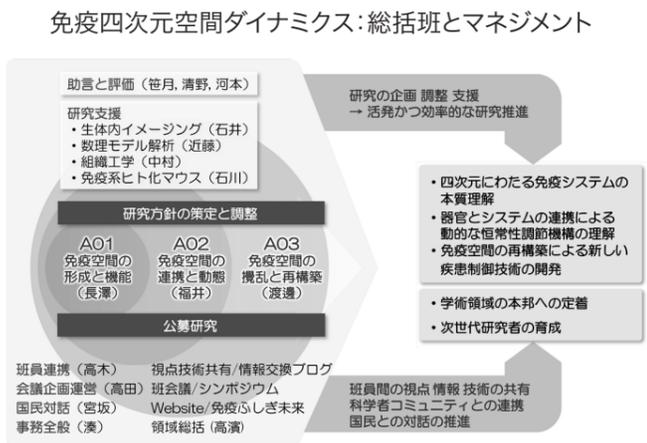
交付決定額(配分額)

(金額単位:円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------------|---------------|-------------|---------------|
| 平成24年度 | 216,000,000 | 64,800,000 | 280,800,000 |
| 平成25年度 | 227,700,000 | 68,310,000 | 296,010,000 |
| 平成26年度 | 228,700,000 | 68,610,000 | 297,310,000 |
| 平成27年度 | 223,700,000 | 67,110,000 | 290,810,000 |
| 平成28年度 | 227,000,000 | 68,100,000 | 295,100,000 |
| 平成29年度(取りまとめ) | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |
| 総計 | 1,126,100,000 | 337,830,000 | 1,463,930,000 |

各研究項目の連携状況

研究連携に関する取り組み



本研究では、免疫学、発生生物学、構造生物学、血液学といった多様な学術背景の研究者が新たに「免疫の場」に確たる視点を据えた研究班を形成し、多様な研究概念と技術の積極的な共有と緊密な共同研究の促進を図った。また、電子顕微鏡イメージング、体内イメージング、数理モデル化解析、組織工学、ヒト免疫器官の解析、に関する技術共有支援を含め、班員間および関連研究領域との緊密な連携を促進する総括班を活用した研究を推進の促進を図った。更に、公募研究を募り、学術領域の我が国への定着と次世代の研究者育成を図った。異なるリンパ器官に横断的な「免疫空間」の解明には、多様な分野にまたがる研究者による連携研究体制が極めて重要と考え、3つの研究項目による研究を有機的で緊密に連携させ、個々の研究者による個別研究を遙かに凌駕する質と量にて「免疫空間」を主眼にした全身性生体制御の研究を統合的に発展させることを目した。

このため、計画研究と公募研究を担うすべての研究者は一年一度以上の頻度で定期的集まり、新たに得られた成果と関連情報の交換、材料と技術の共有と講習、研究班として共同で取り組む研究視点の共有と確認を進めるとともに、総括班による評価と助言に基づいて共同研究の立案と推進を含む研究方針の調整を積極的に進めた。

更に、次の5点に関する新しい研究技術の支援について、それぞれ少なくとも一度は講習会を開催するなど研究班としての共有を進めた。

- 免疫空間の電子顕微鏡による高精細イメージング（高木 総括・計画研究班員）
- 免疫空間の生体内イメージング(石井優 総括班員)
- 免疫空間の数理モデル解析(近藤滋 総括班員)
- 免疫空間再構築のための組織工学技術(中村真人 総括班員)
- 免疫系ヒト化マウスによるヒト免疫空間の解析（石川 総括・計画研究班員）

加えて、国際シンポジウムを合計4回(国際T細胞ワークショップ2回、Synthetic Immunology Workshop1回、次世代国際シンポジウム1回)開催した。次世代国際シンポジウムはとりわけ、若手班員の自主企画であり、若手による若手のための議論の場として本研究領域の次世代への継承と定着のために資することを目した。また、日本免疫学会・日本発生生物学会・日

本細胞生物学会にてシンポジウムを共催するとともに、新学術領域「配偶子産生制御」班との二班合同ワークショップ「ニッチの謎を議論する」を開催した。本学術領域の周辺領域への展開と相互情報交換の場をさまざまなかたちで提供することで、更なる研究連携と研究展開の促進を図った。

研究連携による成果状況

研究領域運営を通じた班員間の緊密な研究連携が実施され、少なくとも次の共同研究19件が新規に始動され実施された。

- A01. 胸腺上皮細胞特異的Wnt遺伝子改変マウスの作製と解析（高田と高濱）
- A01&03. 髄質上皮細胞特異的試薬C-CPEを用いた胸腺上皮前駆細胞の解析(高濱と湊と濱崎)
- A01&02.Tリンパ球選択リガンドとしてのペプチド MHC 複合体の構造解析(高濱と高木)
- A01. 胸腺上皮細胞におけるJmjd6の機能解析(福井と田中)
- A01. リンパ節ストローマ細胞のCCL21a遺伝子改変マウスを用いた解析(片貝と高濱)
- A01. 二次リンパ組織におけるRANKL陽性間葉系細胞の解析(片貝と澤)
- A01. 免疫組織形成におけるILC3細胞とCLNKの機能について(澤と後飯塚)
- A01. 免疫組織におけるIL-15産生細胞の生体内可視化解析(生田と石井)
- A02&01. 新規タグによるタンパク質標識と1分子イメージング(高木と高田)
- A02. プレキシシン阻害ペプチドの共同開発(高木と石井)
- A02. 樹状細胞の移動と病態関与におけるDOCK8の役割(福井と戸村)
- A02&01. 胎生期リンパ組織と成体腸管におけるILC3細胞の生体内追跡(戸村と澤)
- A02&03. 腸管の免疫細胞と微小環境の相互作用とその制御の解明(岩田と片貝と渡邊)
- A03&02. 高齢マウスリンパ節におけるリンパ球動態の解析(湊と戸村と濱崎)
- A03. ヒト免疫組織の人工的構築(渡邊と石川)
- A03. 3Dプリンターを用いた二次リンパ組織の構築(渡邊と中村)
- A03&01. 免疫細胞ヒト化マウスにおける胸腺微小環境の解析(石川と高濱)
- A03&01. ヒト免疫微小環境を有する新規免疫不全マウスの開発(石川と渡邊と宮坂)
- A03&01. 免疫細胞ヒト化マウスにおけるBリンパ球分化の解析(亀谷と北村)

これらの共同研究は、本領域研究が組織されたことで初めて実現した研究であり、本領域研究の実施によって従来の目標を上回る新発見の発信をもたらすものである。実際、現時点までに成果報告に至った共同研究には、次の論文が含まれる(いずれも班員が責任著者)。

- Kozai M, Kubo Y, Katakai T, Kondo H, Kiyonari H, Schaeuble K, Luther SA, Ishimaru N, *Ohigashi I, *Takahama Y. Essential role of CCL21 in establishment of central self-tolerance in T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 214: 1925-1935 (2017) [A01.領域代表高濱と計画研究片貝の共同研究成果]
- Ohigashi I, Zuklys S, Sakata M, Mayer C, Hamazaki Y, Minato N, Hollander GA, *Takahama Y. Adult thymic medullary epithelium is maintained and regenerated by lineage-restricted cells rather than bipotent progenitors. *Cell Reports*. 13:1432-1443 (2015) [A01&03.領域代表高濱と計画研究湊と公募研究濱崎の共同研究成果]
- Takada K, Van Laethem F, Xing Y, Akane K, Suzuki H, Murata S, Tanaka K, Jameson SC, Singer A, *Takahama Y. TCR affinity for thymoproteasome-dependent positively selecting peptides conditions antigen responsiveness in CD8+ T cells. *Nature Immunology*. 16:1069-1076 (2015) [A01.領域代表高濱と公募研究高田(健)の共同研究成果]
- Takeda A, Kobayashi D, Aoi K, Sasaki N, Sugiura Y, Igarashi H, Tohya K, Inoue A, Hata E, Akahoshi N, Hayasaka H, Kikuta J, Scandella E, Ludewig B, Ishii S, Aoki J, Suematsu M, Ishii M, Takeda K, Jalkanen S, *Miyasaka M, *Umemoto E. Fibroblastic reticular cell-derived lysophosphatidic acid regulates confined intranodal T-cell motility. *eLife*. 5:e10561 (2016) [A01&02.計画研究梅本、計画研究宮坂、計画研究早坂、公募研究菊田の共同研究成果]
- Miyauchi K, Sugimoto-Ishige A, Harada Y, Adachi Y, Usami Y, Kaji T, Inoue K, Hasegawa H, Watanabe T, Hijikata A, Fukuyama S, Maemura T, Okada-Hatakeyama M, Ohara O, Kawaoka Y, Takahashi Y, Takemori T, *Kubo M. Protective neutralizing influenza antibody response in the absence of T follicular helper cells. *Nature Immunology*. 17:1447-1458 (2016) [A01&03.公募研究久保と計画研究渡邊の共同研究成果]

- Yanagihara T, Sanematsu F, Sato T, Uruno T, Duan X, Tomino T, Harada Y, Watanabe M, Wang Y, Tanaka Y, Nakanishi Y, Suyama M, *Fukui Y. Intronic regulation of Aire expression by Jmjd6 for self-tolerance induction in the thymus. *Nature Communications*. 6:8820 (2015) [A02.計画研究福井と公募研究田中の共同研究成果]
- Ogawa K, Tanaka Y, Uruno T, Duan X, Harada Y, Sanematsu F, Yamamura K, Terasawa M, Nishikimi A, Côté J, *Fukui Y. DOCK5 functions as a key signaling adaptor that links FcεRI signals to microtubule dynamics during mast cell degranulation. *Journal of Experimental Medicine*. 211:1407-1419 (2014) [A02.計画研究福井と公募研究田中の共同研究成果]
- Ishihara S, Nishikimi A, Umemoto E, Miyasaka M, Saegusa M, *Katagiri K. Dual functions of Rap1 are crucial for T-cell homeostasis and prevention of spontaneous colitis. *Nature Communications*. 6:8982 (2015) [A02&01.公募研究片桐と計画研究宮坂と計画研究梅本の共同研究成果]
- Shirakawa K, Sekai M, Hamazaki Y, Fukuda K, Minato N, *Sano M. Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*. 126:4626-4639 (2016) [A03.公募研究の佐野と濱崎と計画研究湊の共同研究成果]
- Sekai M, *Hamazaki Y, *Minato N. Medullary thymic epithelial stem cells maintain a functional thymus to ensure lifelong central T cell tolerance. *Immunity*. 41:753-761 (2014) [A03.計画研究湊と公募研究濱崎の共同研究成果]

当該学問分野及び関連学問分野への貢献度

1. 当該学問分野と関連学問分野への波及効果

本研究領域では、「免疫の場」を構築するストローマ細胞に光をあて、免疫細胞とその場による「免疫空間」の四次元(三次元空間と時間)的な形成・連携・攪乱の機構解明と再構築をめざした。得られた成果には、免疫学の概念に大きな変革を要求する知見や、免疫分野にとどまらず広く生命科学にインパクトを与える知見が数多く含まれた。

具体的には、骨髄ニッチの実体を担うCAR細胞の生成と骨髄ニッチ機能に必須の転写因子Foxc1の発見は、幹細胞ニッチに特化した細胞系列の存在をはじめて分子レベルで実証し、広範な生命科学分野から注目を集める成果である。また、胸腺皮質上皮細胞に発現されるb5t依存性の「正の選択」はCD8陽性キラーT細胞の抗原応答性を調整するとの発見は、「正の選択」の従来概念を覆した。更に、リンパ節ストローマ細胞の産生するリゾホスファチジン酸によるリンパ球動態制御の発見は、異なるストローマ細胞によって産生される異なるリン脂質が異なる免疫細胞動態制御を示すとの新概念構築をもたらした。加えて、免疫-神経インターフェースで働く蛋白質の探索過程で見出したニューロン特異的受容体蛋白質sorLAがアルツハイマー病発症から脳を守ることの発見は、アルツハイマー病の病因解明につながる重要知見であり、DOCK8-EPAS1-IL31経路がヒトのアトピー性皮膚炎に関与することの発見は、アトピー性皮膚炎の治療戦略に新機軸を加える知見である。また、加齢に伴って発生し増加するユニークなTリンパ球亜集団とその炎症原性の発見、および、胸腺髄質上皮細胞に系列特化した幹細胞の同定と老化による変容の発見は、社会的に重要性を増す加齢関連疾患のコントロールに向けて新しい道を開く知見であり、交感神経によるリンパ球動態制御が免疫応答の日内変動に寄与しているとの発見は、免疫系と神経系のインターフェースの理解に大きな前進を示す知見である。免疫細胞の生体内トレーシング法を改良することにより、生体内の「場と場」を行き巡る免疫細胞の動態を直接捉えることにも成功した。

以上のように、「免疫の場」を構築する非血液系細胞に主眼を置いた本領域研究を推進することにより、これまでは不明であった免疫システムの動的で四次元的な本質の理解に新たな光が与えられた。また、免疫系と神経系など高次生体システム間インターフェースの理解や、発生や形態形成など種々の生命現象でみられる「場・ニッチ」に関する普遍的理解の増進に貢献した。

2. 実務・社会への波及効果

本研究領域による上記新知見は、これまで実現しなかった難治性疾患制御法の開発に展望を開く知見を含む。例えば、sorLAを標的にしたアルツハイマー病の治療薬の開発、DOCK8-EPAS1-IL31経路を対象にしたアトピー性皮膚炎治療法の開発、また、加齢に伴って発生し増加するユニークなTリンパ球亜集団とその炎症原性サイトカインを対象にした癌や加齢関連疾患の治療法の開発などは、現代社会の希求する医療応用への展開が期待される。

本研究領域はまた、組織工学技術を用いた免疫器官の人工的な再構築さらにそれによる免疫空間の機能的ネットワークの解明をめざした。その成果として、無細胞材料からの人工リンパ節作製法が開発され、免疫組織の人工的再構築による慢性疾患制御のための技術開発に大きな進展が得られた。

また、ヒト免疫細胞再構築マウスの改良によるヒト抗がんキラーT細胞のマウス生体内での産生技術の開発に成功した。ヒトにおけるがん免疫療法至適化の開発・改良に有用な実験モデルとして期待される。

更に、免疫不全マウスへのヒト血液系悪性腫瘍細胞再構築技術を活用することで発見したチロシンキナーゼHCKの新規阻害剤RK-20499は、ヒト急性骨髄性白血病の治療薬として有効性が期待される。

研究計画に参画した若手研究者の成長の状況

若手研究者育成の姿勢

本研究領域およびその設定する研究項目はいずれも、今後大きな進展が期待され研究の加速が必要となる挑戦的な先端的学術領域であり、独創性の高い萌芽的研究の位置づけは非常に高い。この観点から、また、優れた次世代研究者を本領域にリクルートを図る観点から、そして、本学術領域を本邦に定着させるとの目的から、若手研究者の育成は本領域研究の極めて重要なミッションであると位置づけ、具体的に以下の取り組みを実施した。

若手研究者育成の取り組み

(1) 若手研究者の公募研究参入

公募研究は本領域の研究推進に大きな貢献が期待され、次世代の本邦の中核的研究者の輩出に重要な役割を果たす。厳公なる選考に基づいて、第1期16名のうち10名、第2期16名のうち12名、それぞれ若手研究者の参加を得た。

(2) 若手研究者向け研修会

若手研究者の育成を目的に、公募班員の参入のあった平成25年度以降4年間にわたって毎年夏期に合宿形式の若手研究者研修会(サマースクール)を開催した。深く考察と論議を重ねる研究発表、若手研究者が自ら選んだ研究者による講演、緊密で自由な情報交換など、相互に切磋琢磨する場として、いずれもたいへん好評であった。

(3) 若手研究者シンポジウム

若手研究者の育成を目的に、総括班員かつ計画研究分担者の石川(自身も若手)を中心に、若手研究者による若手研究者のための「次世代国際シンポジウム」を開催した。約100名参加を得、参加者からたいへんな好評を得た。

(4) プロモーション支援事業

新たに他機関でのPIに就き、研究室をスタートアップした若手班員を対象に、班研究に有効活用される実験動物の移動に必要な経費を支援する「プロモーション支援事業」を公募に基づいて開設し、2件を実施した。

若手研究者の昇進・就職状況

以上の取組の成果として、班員のなかから新任教授を7名と研究所PIを2名輩出、准教授への昇任4名をはじめ、研究領域内の若手研究者から多数の昇進・就職が実現した。具体的には次の通りである。

- 片貝智哉(計画研究分担者):教授←講師 [平成29年6月時点←研究開始時 以下同様]
- 戸村道夫(計画研究分担者):教授←特准准教授
- 濱崎洋子(第1期&第2期公募研究者):教授←准教授
- 田中芳彦(第1期公募研究者):教授←准教授
- 椛島健治(第2期公募研究者):教授←准教授
- 穂積勝人(第2期公募研究者):教授←准教授
- 鈴木一博(第2期公募研究者):教授←特任准教授
- 茂呂和世(第2期公募研究者):チームリーダー(理研PI)←上級研究員
- 七田 崇(第1期公募研究者):プロジェクトリーダー(都医学研PI)←助教
- 澤新一郎(第1期公募研究者):准教授(PI)←助教
- 高田健介(第1期公募研究者):准教授←講師
- 亀谷美恵(第1期公募研究者):准教授←講師
- 新田 剛(第1期公募研究者):准教授←室長
- 深澤太郎(第1期公募研究者):助教←特別研究員

ほかにも、研究協力者や大学院生の昇進・就職も多数実現した。具体的には例えば、領域代表者の研究協力者(大東いずみ)は特任助教から准教授へと昇進し、計画研究代表者の研究協力者(藤森さゆ美)は研究員から他大学の助教へと就職した。

総括班評価者による評価

笹月 健彦（九州大学・高等研究院・特別主幹教授）

新学術領域研究「免疫四次元時空間ダイナミクス」は免疫学研究の激しい国際競争の中で、免疫システムを「免疫関連血液細胞」と「免疫関連臓器（組織）」のダイナミックな相互作用として捉え、5年の期間中に分子・細胞・構造生物学的解析を通して着実に新知見を蓄積した。

すなわち、造血幹細胞の維持とBリンパ球の産生に必須の骨髄ニッチのCAR細胞に特異的に発現し、ニッチの形成と機能発現に必須の転写因子Foxclを発見した。一方、T リンパの産生と選択を担う胸腺皮質上皮細胞と胸腺髄質上皮細胞の共通前駆細胞を同定、また、髄質上皮細胞に特化した幹細胞や前駆細胞の同定などを進めるとともに、胸腺髄質上皮細胞のRNAスプライシング制御が、Tリンパ球の自己寛容確立に必須であることを明らかにし、さらに、免疫－神経インターフェイスでのシグナル伝達の構造解析からalpha5 beta1インテグリンによる免疫細胞と微小環境の相互作用を明らかにした。sorLAがアルツハイマー病発症を抑えることを発見し、アミロイドペプチドとの複合体の構造解析にも成功した。また、免疫細胞の運動と形態制御に重要なDOCK2、5、8の機能が夫々明らかになり免疫関連疾患治療法確立への道を拓いた。免疫システムの時間軸からの解析結果、老化関連T細胞（SA-T 細胞）が強い炎症原性を有する細胞であり、全身性エリテマトーデスの発症に関わり、かつ内臓脂肪炎症とインスリン抵抗性増加にも重要な役割を演じていることを明らかにした。一方、無細胞材料から人工リンパ節の作製や機能的脾臓の再構築に成功し、ヒト疾患制御技術開発への道を拓いた。

このように本研究では免疫システムにとって最重要な場である骨髄と胸腺に関して、組織、細胞、分子レベルで国際的にも質の高い優れた研究成果を挙げ、研究初期に目指した研究課題の推進に寄与している。若手研究者の育成、および女性研究者の活躍とプロモーションにも成功しており、5年間の研究活動から国際化も格段に進展している。全体として本課題が目指した目標を十分に果たし、今後のさらなる発展が期待される。

清野 宏（東京大学・医科学研究所・教授）

新学術領域研究「免疫四次元空間ダイナミクス」は、血液系細胞を主な対象とする従来の免疫学研究に、免疫の場を構築するストローマ細胞を主な研究対象とする新機軸を加えることで、免疫システムの四次元で動的且つ生命現象としての本質的解明を目指した研究班である。極めて優れた研究成果を当初の計画を上回る質と量で数多く挙げ、5年の研究期間を満了したことは、本研究班を組織したそのことが、免疫学はもとより、医科学、生命科学、生物学など自然科学全般に対して学術的な貢献をし、大きな成功であることが示された。特筆すべきは、それらの成果が、研究において最優先事項である研究者個人それぞれの知的好奇心と興味に基づく優れた研究でありながら、きちんと研究班としての目的に合致するものとして、班員相互の多数の緊密な共同研究成果を含めて発信されたことである。これは、領域研究代表者と計画班員の緻密な研究計画とその実施を反映している。優れた研究成果が、免疫システムに限定されず、神経システムに波及して発信されたことも、高次システム間の連携に視点を広げた本研究班ならではのというべき成果で

ある。また、新学術領域2班合同会議といった新しい取り組み、魅力的なウェブсайт発信を含む学術領域の定着や若手研究者の育成に向けた班としての活動は、班員から新任教授を7名と研究所P1を2名輩出するなど当初計画を大きく超えた成果を実現させている。これは、領域代表者の強力なリーダーシップの下で各テーマ研究推進、研究者間情報交換、共同研究推進などの研究環境が構築され、各班員の研究内容の発展はもとより、独立研究者としての自立が着実に進んだ功績といえよう。また、公募研究者のひとりが班研究期間中に海外へ巣立っていったことも、科研費制度上の問題点として捉えるより、むしろ若手研究者の育成における研究班の成果として評価される事例とみなすべきである。本研究班を牽引した計画研究者各位と、支援され育成された公募研究者各位が、本研究班に基づく研究を牽引し発展させていくことで、今後更に目覚ましい学術成果が発信されていくことを期待する。

河本 宏（京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授）

本領域は免疫細胞自体ではなく、その分化や機能を制御する「環境」側に焦点をあてた研究を推進してきた。ストローマ細胞を軸に骨髄-胸腺-リンパ組織を縦断的に取りまとめるという構想は、新しい分野の開拓であり、まさに新学術領域研究に相応しい構成であった。さらにそれぞれの分野で最高の研究者を集めた計画研究の布陣もすばらしく、また公募研究についても、competitiveな状況の中で選ばれたハイレベルなラインアップだった。筆者は総括班員として領域会議に参加してきた。キーワードとして用いられている「場」は、そもそも古い概念であるが、本領域は「四次元空間」という新しい視点で場の「ダイナミクス」を見ようとしている。総じた評価として、本領域では構成要員によるすばらしい相乗効果が得られたと思われた。領域会議では、分子構造-細胞-組織というスケールの階層性、細胞の分化/増殖過程、細胞の移動などの要素を、統合的な理解を目指した議論ができていたと感じられた。参加者全員が「新しい学問の創成」という興奮を共有できていたと思う。

その成果は論文発表として現われている。領域代表の高浜のグループは、A01項目（免疫空間の形成と機能）の中で、公募研究の高田との共同研究という形で、胸腺で起こる胸腺細胞の「正の選択」の理解を大きく進展させるという成果をあげた(*Nature Immunol*, 2016)。

「正の選択」は、免疫学における最も重要な事象のひとつであり、1970年代にすでに「MHC拘束性」という概念で理解はされていたが、その本質は奥が深く、その後も多くの研究者がその実体解明に挑んできた。そのような中で高浜らは、胸腺皮質細胞に提示される抗原の質と量を調べるというアプローチで、正の選択は単にある反応性のレンジ内の細胞を選んでだけでなく、同時に選ばれたT細胞の機能の制御、すなわち「T細胞の抗原応答性を調節する」という役割りを果たしていることを明らかにした。これは環境側の細胞の機能が免疫システム全体に作用するという顕著な例であり、本領域を代表する成果であるといえよう。また、同じく A01項目の計画班員である長澤による骨髄ストローマ細胞についての研究成果も特筆に値する(*Nature*, 2014)。骨髄中の造血環境を形成するストローマ細胞の実体は不確定であったが、特定の転写因子によって規定される系列の細胞がその主体であることを明らかにし、骨髄ニッチの研究に分子基盤を与えた。

科学技術・学術審議会学術分科会科学研究費補助金審査部会による最終評価書

研究成果の概要

本研究の成果として、骨髄ニッチの実体を担う細胞の生成と機能に必須の転写因子Foxc1の発見、胸腺皮質上皮細胞に発現されるb5t依存性「正の選択」がキラーT細胞の抗原応答性を調整することの発見、胸腺髄質上皮細胞に系列特化した幹細胞の同定、リンパ節ストローマ細胞亜集団の産生するリゾホスファチジン酸によるリンパ球動態制御の発見、ニューロン特異的受容体sorLAがアルツハイマー病発症から脳を守ることの発見、DOCK8-EPAS1-IL31経路がヒトのアトピー性皮膚炎に関与することの発見、加齢に伴って発生し増加するTリンパ球亜集団とその炎症原性の発見、交感神経によるリンパ球動態制御が免疫応答の日内変動に寄与することの発見、などを挙げるることができる。また、組織工学技術を用いた免疫器官の人工的再構築に向けて無細胞材料からの人工リンパ節作製に成功し、免疫系ヒト化マウスの改良によってヒト急性骨髄性白血病に有効な新規チロシンキナーゼ阻害剤を発見した。これまで不明であった免疫システムの動的で四次元的な本質の理解に新たな光が与えられ、免疫系と神経系など高次生体システム間インターフェースの理解や、発生や形態形成など種々の生命現象でみられる「場・ニッチ」に関する普遍的理解の増進に貢献した。以上、得られた成果には、免疫学の概念に大きな変革を要求する知見や、免疫学分野に留まらず広く生命科学に影響を及ぼす知見が数多く含まれた。また、社会的に重要性を増す疾患の制御に向けて様々の新しい道が開かれた。

この領域の成果は他にも枚挙にいとまがないが、特に今後の大きな発展性を感じさせる共同研究の成果として、A03項目（免疫空間の形成と機能）の計画班員湊と公募班員佐野の、老化 T 細胞と肥満の関係を明らかにした共同研究(*J Clin Invest*, 2016)を挙げるができる。この研究により、肥満によって老化 T 細胞が増加することが明らかとなり、これが老化に伴う諸臓器の変性の一因である可能性が示された。A02項目（免疫空間の連携と動態）の中でも、計画班員の福井と公募の田中による DOCK8欠損によるアトピー性皮膚炎発症メカニズムの研究(*Nature Commun*, 2017)や、公募久保と公募渡邊によるウイルス感染における濾胞ヘルパーT細胞の役割り解明の研究(*Nature Immunol*, 2016)など、重要な知見が得られている。

このように、A01-A03の各項目で大きな成果があがっており、それらは国際的にみてもそれぞれ分野を牽引するような研究である。そしてそれらの中には、領域の中で育まれた共同研究が多数含まれており、それは本領域がよく機能していたことの顕われと考えられる。この枠組みを構成し統括した領域長のリーダーシップは高く評価されてよい。

科学研究費補助金審査部会における所見

A+（研究領域の設定目的に照らして、期待以上の成果があった）

本研究領域は、従来の免疫研究にリンパ器官とストローマ細胞により形成される免疫の場を含めた免疫空間という新たなコンセプトを提唱し、血液学や構造生物学との融合研究を行うことにより多面的な高次免疫制御システムの解明を目指した画期的・意欲的な研究である。領域代表者の強力なリーダーシップの下で有機的な連携研究が積極的に推進され、骨髄ニッチによる免疫細胞の維持機構においては、世界的な論争に決着をもたらす極めて顕著な貢献が認められた。更に胸腺微小環境の機能解明などにおいてもレベルの高い論文が多数発表されている。論文数は350編を超えており、研究計画を超えた成果として評価できるのみならず、免疫学、医科学および発生学など幅広い領域の研究にインパクトを与えうる。中間評価で指摘された有機的連携の更なる強化や、研究推進に必要な技術や実験材料の提供に関する具体的な計画の提示といった課題には、研究技術講習会の開催や実験材料の共有、関連学会でのシンポジウム共催や若手主体のシンポジウム開催による考察と議論の場の提供などの適切な対応がなされ、研究の活性化がなされている。また、研究期間内に多くの若手研究者が昇進し独立した点についても高く評価できる。今回の研究成果の中には新しい学術の創生をもたらす可能性のある成果も見られることから、今後も他分野の研究者と連携を推進し本研究領域を更に発展させることに期待したい。

この領域の成果は他にも枚挙にいとまがないが、特に今後の大きな発展性を感じさせる共同研究の成果として、A03項目（免疫空間の形成と機能）の計画班員湊と公募班員佐野の、老化 T 細胞と肥満の関係を明らかにした共同研究(*J Clin Invest*, 2016)を挙げるができる。この研究により、肥満によって老化 T 細胞が増加することが明らかとなり、これが老化に伴う諸臓器の変性の一因である可能性が示された。A02項目（免疫空間の連携と動態）の中でも、計画班員の福井と公募の田中による DOCK8欠損によるアトピー性皮膚炎発症メカニズムの研究(*Nature Commun*, 2017)や、公募久保と公募渡邊によるウイルス感染における濾胞ヘルパーT細胞の役割り解明の研究(*Nature Immunol*, 2016)など、重要な知見が得られている。

このように、A01-A03の各項目で大きな成果があがっており、それらは国際的にみてもそれぞれ分野を牽引するような研究である。そしてそれらの中には、領域の中で育まれた共同研究が多数含まれており、それは本領域がよく機能していたことの顕われと考えられる。この枠組みを構成し統括した領域長のリーダーシップは高く評価されてよい。

免疫学はこれからも発展が大いに期待される学問分野であり、本領域の成功に引き続いて、また異なるコンセプトで領域を形成し学問を推進するような機会が、是非とも存続してほしいものである。

最終研究成果報告書

免疫四次元空間ダイナミクス

(平成24年度～平成28年度) Analysis and synthesis of multidimensional immune organ network

領域代表 高濱 洋介 徳島大学先端酵素学研究所

研究代表者

TAKAHAMA, Yousuke

徳島大学・先端酵素学研究所・教授

20183858



計画研究

研究開始当初の背景

免疫学研究は、生化学、分子生物学、ゲノム科学、発生工学、臨床医学などの進歩を積極的に取り入れ、急速に進展してきた。特に、リンパ球をはじめとする血液系細胞の分化とそれらが協調的に担う免疫応答の機構に関する分子生物学的解明において、医学生物学を牽引する優れた成果を挙げてきた。一方、免疫現象は、骨髄・胸腺・二次リンパ組織(リンパ節・脾臓)といったリンパ器官を主たる「場」として逐次的に引き起こされる四次元時空間事象である。血液系細胞は異なるリンパ器官を巡って産生・選別・活性化・維持されるため、リンパ器官が全身性のネットワークを形成し互いに連携することは、免疫システムの統御に不可欠である。それゆえ、免疫システムの全容解明と縦横な制御には、血液系細胞を対象とした研究のみならず、リンパ器官を主とする「免疫の場」とそれらのネットワークからなる「免疫空間」の本態解明もまた重要である。しかし、血液系細胞に関する分子細胞理解が高度に成熟してきたのに対して、免疫空間の本態解明に向けた研究は、リンパ器官を構築するストローマ(間質)細胞(上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、細網細胞など)の同定・分類・精製の技術的困難さなどから、進展が遅れていた。

研究の目的

免疫細胞の分化と免疫応答は、全身に配置された多様なリンパ器官を主な「場」とし、これらの場が血液系細胞等を介した高次の機能的ネットワークを形成することではじめて成立するダイナミックな事象である。本研究は、免疫学に加え、発生生物学、構造生物学、血液学など多様な背景から際立った成果を挙げてきた研究者が結集し、血液系細胞に注目していた従来の免疫学研究では未解明であった「場」に視点をひろげ、免疫の場を含めた「免疫空間」の四次元的な形成・連携・攪乱の機構解明と再構築をめざした。また、そのため、(A01) 免疫空間の形成と機能、(A02) 免疫空間の連携と動態、(A03) 免疫空間の攪乱と再構築、の3項目による研究を設定した。

研究の方法

新学術領域「免疫四次元空間ダイナミクス」の総括班は、領域全体の研究活動が活発かつ効率的に進むように研究の視点共有を図り、研究方針を企画・調整するとともに、必要な関連技術や実験材料を共有できるように研究支援し、班全体の活動について助言と評価を行った。また、班会議とシンポジウムの企画運営とインターネットブログの利用などを通して班員間の情報交換、視点共有と科学者コミュニティとの連携強化を図り、研究技術講習会を開催した。更に、ウェブサイトや各種科学コミュニケーション活動への参加を通して、研究領域の社会への定着と次世代研究者の育成を図った。

研究成果

(1) 班会議での議論

研究の主体は、個々の独立した研究者による自由で闊達な研究活動である。この認識を共有したうえで班会議を年一度以上の頻度で開催し、率直で建設的な議論を大いに交わすことで、研究班としての視点共有を図りつつ班員相互の情報交換を行い、とりわけ若手研究者の研究推進を支援した。また、必要に応じて研究方針の修正支援を図った。

(2) 研究技術・材料の共有

領域研究をともに推進する班員とりわけ若手研究者の研究活動を研究技術面でも支援すべく、必要な関連技術共有を進めた。具体的には、電子顕微鏡イメージング、生体内イメージング、数理モデル解析、組織再構築工学、免疫系ヒト化マウス、に関する技術講習会を、それぞれの専門家の総括班員を講師として順次開催した。また、研究班で新たに独自に作製した遺伝子改変マウスや抗体など実験材料について班会議等で共有を奨励し、多くの共同研究を産み出した。

(3) 考察と議論の「場」の提供

班会議に加えて、国際シンポジウムを合計4回(国際T細胞ワークショップ2回、

Synthetic Immunology Workshop1回、次世代国際シンポジウム1回)開催した。いずれのシンポジウムも極めて盛況であった。次世代国際シンポジウムはとりわけ、若手班員の自主企画であり、若手による若手のための議論の場として本研究領域の次世代への継承と定着のために資するものであったと考える。また、日本免疫学会・日本発生生物学会・日本細胞生物学会にて、それぞれシンポジウムを共催し、新学術領域「配偶子産生制御」班との二班合同ワークショップ「ニッチの謎を議論する」を開催した。本学術領域の周辺領域への展開と相互情報交換の場をさまざまなかたちで提供することで、更なる研究連携と研究展開の促進を図った。

(4) 若手研究者育成

若手研究者の育成を目的に、公募班員の参入のあった平成25年度から4年間にわたって毎年夏期に合宿形式の若手研究者研修会(サマースクール)を開催した。深く考察と議論を重ねる研究発表、若手研究者が自ら選んだ研究者による講演、緊密で自由な情報交換など、相互に切磋琢磨する場として、いずれもたいへん好評であった。また、若手研究者の育成を目的に、総括班員かつ計画研究分担者の石川(自身も若手)を中心に、若手研究者による若手研究者のための「次世代国際シンポジウム」を開催した。約100名参加を得、参加者からたいへんな好評を得た。更に、新たに他機関で研究室をスタートアップした班員を対象に、班研究に有効活用される実験動物の移動に必要な経費を支援する「プロモーション支援事業」を2件実施した。以上の取組の成果として、班員から新任教授7名と研究所PI2名を輩出、准教授への昇任4名など、多数の若手研究者の昇進・就職が実現した。

(5) 当初予期されなかった問題への対応

平成28年4月に発生した熊本地震によって、本研究の研究者のうち公募研究の門松毅が被災した。研究活動に必須の多くの研究機器が使用不能な状態となり、研究の遂行に必要な試薬類の多くが失われた。そこで総括班として、被災によって失われた本研究

の遂行に必要な試薬や材料の購入費用を支援した。その結果、当初計画に沿って、アンジオボエチン様分子ANGPTL2を介した免疫細胞とストローマ細胞との細胞間相互作用に関する研究が推進された。また、平成27年度から2年間の計画で開始された第2期公募研究課題のひとつを担う竹ヶ原が、平成28年度から米国ペンシルバニア大学にSenior Research Investigatorとして異動し、領域研究最終年度の平成28年度における研究費交付を辞退した。そこで領域代表者は連絡を継続し研究の視点共有を図った。その結果、破骨細胞に発現される新規膜分子IgSF11が細胞間接着分子であること、細胞内領域を介してインテグリンシグナルを制御することが明らかにされ、本領域研究に即した研究が進展された。

(6) 中間評価に伴う審査への対応

計画研究の「リンパ器官形成の分子機構と制御」と「免疫組織の新規構築による疾患制御のための技術開発」について、「研究経費に相応しい成果の発表に関してこの段階では十分とは言えないが、本領域全体における当該研究計画の重要性及び研究の進展は認められるため、論文としての研究成果の発表に向け、今後2年間で着実な成果を上げることを期待したい。」との指摘を受けた。いずれの計画研究についても、最終年度までには研究に大きな進展が得られ、論文としての研究成果発表も活発に実施し、最終的には、当初期待された以上の成果をあげることができた。

まとめ

免疫細胞の分化と免疫応答は、全身に配置された多様なリンパ器官を主な「場」とし、これらの場が血液系細胞等を介した高次の機能的ネットワークを形成することではじめて成立するダイナミックな事象である。本研究は、免疫学に加え、発生生物学、構造生物学、血液学など多様な背景から際立った成果を挙げてきた研究者が結集し、血液系細胞に注目していた従来の免疫学研究では未解明であった「場」に視点をひろげ、免疫の場を含めた「免疫空間」の四次元的な形成・連携・攪乱の機構解明と再構築をめざした。また、そのため、総括班は、領域全体の研究活動が活発かつ効率的に進むように研究の視点共有を図り、研究方針を企画・調整するとともに、必要な関連技術や実験材料を共有できるように研究支援し、班全体の活動について助言と評価を行った。また、班会議とシンポジウムの企画運営とインターネットブログの利用などを通して班員間の情報交換、視点共有と科学者コミュニティとの連携強化を図り、研究技術講習会を開催した。更に、ウェブサイトや各種科学コミュニケーション活動への参加を通して、研究領域の社会への定着と次世代研究者の育成を図った。

研究組織

研究分担者

高田 慎治(TAKADA, Shinji)
自然科学研究機構・基礎生物学研究所・教授
研究者番号:60206753

長澤 丘司(NAGASAWA, Takashi)
大阪大学・生命機能研究科・教授
研究者番号:80281690

宮坂 昌之(MIYASAKA, Masayuki)
大阪大学・未来戦略機構・名誉教授
研究者番号:50064613

高木 淳一(TAKAGI, Junichi)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号:90212000

福井 宣規(FUKUI, Yoshinori)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号:60243961

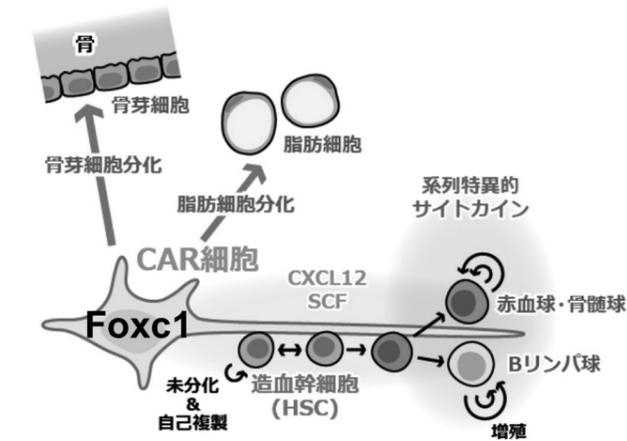
湊 長博(MINATO, Nagahiro)
京都大学・医学研究科・特命教授
研究者番号:40137716

渡邊 武(WATANABE, Takeshi)
公益財団法人田附興風会・医学研究所・特任研究指導者
研究者番号:40028684

(A01) 免疫空間の形成と機能

計画: 骨髄ニッチの形成を担う分子機構:

骨髄は造血幹細胞を維持しBリンパ球の産生に必須の微小環境であり、この微小環境は骨髄ニッチと呼ばれる。計画研究の長澤は、骨髄ニッチの実体を担う「CAR細胞(CXCL12-Abundant Reticular細胞;ケモカインCXCL12を高発現し突起を持つ細網細胞)」を同定してきた実績をもつ。本研究では、CAR細胞に特異的に発現される遺伝子を探索することで、フォークヘッドファミリーに属する転写因子Foxc1がCAR細胞の生成と骨髄ニッチ機能に必須であることを発見した。この成果は、これまで不明であった骨髄ニッチの形成を担う機構にはじめて分子基盤を与えるものである。また、幹細胞ニッチに特化した細胞系列が存在することをはじめて分子レベルで実証した画期的な発見である(Nature 2014)。長澤は更に、CXCL12が骨髄ニッチ機能に寄与することの発見(Nature 2013)や骨髄ニッチが体内時計の制御をうけることの発見に寄与し(Cell 2013)、骨髄ニッチは恒常的には「空き」があることを発見するなど(Blood 2017)、質の高い研究発信を継続した。他にも、四肢皮膚血管形成における末梢神経由来CXCL12の発見(Dev Cell 2013)、精原幹細胞ニッチの再構築研究(Cell Stem Cell 2012)、形質細胞様樹状細胞の脾臓白脾髄への移動を担うケモカインの同定(J Immunol 2012; A01宮坂と分担梅本との共同研究)に参画し、生体高次制御システムに共通する幹細胞ニッチの解明とそれによる疾患制御の基盤整備に貢献した。



計画: 胸腺微小環境の形成を担う分子機構:

Tリンパ球の産生と選択を担う胸腺微小環境のなかで、髄質を構築する髄質上皮細胞は、Tリンパ球の自己寛容確立に必須の微小環境を提供する。領域代表の高瀨は、髄質と皮質の胸腺上皮細胞両方へ分化する前駆細胞の性状を解析し、皮髄共通前駆細胞には皮質上皮細胞特異的分子b5tが発現されていることを見出し(PNAS 2013)、成体期の髄質上皮細胞の維持には成体期でなく新生仔期のb5t発現前駆細胞が寄与することを解明した(Cell Rep 2015; A01公募濱崎とA03湊との共同研究)。皮質髄質共通前駆細胞の実体解明に大きな進展を与えた(高瀨ら Nature Rev Immunol 2017)。また、皮質上皮細胞に発現されるb5t依存性の「正の選択」はCD8陽性キラーT細胞の抗原応答性を調整することを見いだすとともに(Nature Immunol 2015; A01公募高田(健)との共同研究)、ケモカイン分子種CCL21Serを産生する髄質上皮細胞亜集団がTリンパ球の自己寛容確立に不可欠であることを明らかにした(J Exp Med 2017; A01

分担片貝との共同研究)。更に、胸腺上皮細胞の分化に必須のフォークヘッドファミリー転写因子Foxn1の直接的作用点をb5t転写制御配列として初めて明らかにし(Nature Commun 2017)、古典的に存在知られていたが機能不明であった「胸腺ナース細胞」が皮質上皮細胞の亜集団であり、正の選択を至適化する微小環境を提供することを解明した(PNAS 2012)ほか、髄質上皮細胞の分化誘導に $\gamma\delta$ 型T細胞が重要であることの発見に貢献し(Immunity 2012)、胸腺微小環境の形成と機能の解明に大きく寄与した。

計画: 二次リンパ組織ストローマ細胞の性状と機能:

リンパ節における免疫細胞動態を研究してきた宮坂は、リンパ節ストローマ細胞の産生するリゾホスファチジン酸がリンパ節の高内皮細静脈細胞に発現されるリゾホスホリパーゼATXとその産物リゾホスファチジン酸がリンパ球動態の制御因子であることを発見した(J Immunol 2013; A01分担梅本との共同研究)。また、分担者の梅本は、リンパ節内のATX陽性ストローマ細胞が細網線維芽細胞であり、細網線維芽細胞由来のリゾホスファチジン酸がリンパ節内でのTリンパ球運動性制御の分子実体であることを明らかにした(eLife 2016; A01宮坂と分担早坂とA02公募菊田との共同研究)。更に、分担者の片貝は、リンパ節ストローマ細胞由来のATXが傍皮質におけるTリンパ球の運動を制御すること(J Immunol 2014)、樹状細胞がリンパ節内のTリンパ球運動を制御することを見出した(J Immunol 2013)。リンパ節ストローマ細胞の産生するリンパ球動態制御リン脂質としては、これまでリンパ管内皮細胞の産生するスフィンゴシン1リン酸が知られていたが、本研究によって、異なる細胞によって産生される異なるリン脂質がそれぞれ異なる機能を示すことを見出され、免疫細胞動態制御に新しい重層的機構の概念が構築された。

計画: 免疫器官形成の分子機構:

胸腺を含む咽頭弓形成に必須の転写調節因子Ripply3を発見し研究を進めてきた高田(慎)は、Ripply3発現を規定する転写制御因子としてInsm1を同定するとともに(Development 2014; A01分担久保との共同研究)、Ripply分子群による体軸パターン形成は脊椎間の体節パターン形成とは独立した事象であること(Dev Biol 2013)、Ripply3は舌の味蕾形成にも必須であること(Dev Dyn 2015; A01分担久保との共同研究)を明らかにした。また、免疫システムの形成をはじめ様々な発生現象の制御に関わるWntシグナルに着目し、脂質付加酵素PorcupineによるWntタンパク質の修飾が原腸陥入を制御すること(J Cell Sci 2012)、Wntタンパク質は上皮細胞の極性に依りて異なる種類のエクソソームを介して分泌されることを明らかにした(Sci Rep 2016)。免疫器官形成における「シグナルの場」の理解に大きな進展が得られた。

公募研究:

A01の公募研究には、第1期8名と第2期7名(うち若手研究者7名)が参画し、活発に領域研究に取り組んだ。そのうち、生田は、二次リンパ組織ストローマ細胞が産生し免疫細胞の維持に重要なサイトカインIL-15を発現する細胞を可視化し生体内分布を明らかにするとともに(PNAS 2014; 総括班技術支援石井との共同研究)、サイトカイン IL-7 の受容体が胸腺細胞後期分化を制御することを見出した(PNAS 2013)。秋山は、自己免疫疾患を制御する胸腺髄質上皮細胞に分化しうる胎生期前駆細胞を同定した(J Exp Med 2016)。また久保は、濾胞性ヘルパーT細胞の不在下でもインフルエンザウイルス感染に対して生体防御を担う中和抗体が産生されることを見いだした(Nature Immunol 2016; A03 渡邊との共同研究)。

(A02) 免疫空間の連携と動態

計画: 免疫-神経インターフェースにおけるシグナル授受の構造的基盤:

構造生物学と免疫現象研究の融合研究を進める高木は、免疫細胞接着因子alpha5 beta1インテグリンの細胞外ドメイン結晶構造決定に成功し、免疫細胞と相互作用する微小環境の解明に大きく寄与した(J Cell Biol 2012)。また、免疫-神経インターフェースで働く蛋白質を探索する過程で見出したニューロン特異的受容体蛋白質sorLAについて構造機能解析を行い、sorLAがアミロイドペプチドを結合してリソソーム分解系へ運ぶことにより、アルツハイマー病発症から脳を守る動きをする分子であることを発見し(Science Transl Med 2014)、sorLAとアミロイドペプチドの複合体の結晶構造解析に成功した(Nature Struct Mol Biol 2015; 右図)これらの成果はアルツハイマー病の病因解明につながる大きな発見であり、報道各社からも注目を得た。更に、免疫システムは生命システム制御に関わるWntタンパク質を活性保持したままでの精製に成功するとともに(eLife 2016)、Wnt補助受容体LRP6の細胞外ドメインの電子顕微鏡による可視化に成功し、LRP6の構造とWntシグナルがLRP6の糖鎖修飾によって制御されることを明らかにした(Cell Rep 2017)。



計画: リンパ器官の連携を担う免疫動態の解明:

免疫細胞の運動と形態の制御に重要なDOCKファミリー分子を発見し解析を進めてきた福井は、DOCK5が肥満細胞の脱顆粒反応に不可欠であること(J Exp Med 2014; A01公募田中との共同研究)、DOCK2がNK細胞による細胞障害活性を制御することを見出した(Blood 2013)。また、DOCK8が三次元微小環境下での樹状細胞の遊走に重要であることを明らかにし(Blood 2012; A01分担片貝との共同研究)、DOCK8欠損がヒトでアトピー性皮膚炎をひきおこす機構として転写因子EPAS1を介したサイトカインIL-31産生経路を解明した(Nature Commun 2017; A01公募田中との共同研究)。更に、Jmjd6によるRNAプライミング制御が胸腺髄質上皮細胞における核内因子Aireのタンパク質発現と無差別遺伝子発現を介したTリンパ球の自己寛容確立に必須であることを発見した(Nature Commun 2015)。分担者の戸村は、免疫細胞の生体内トレーシングと単細胞遺伝子発現解析技術を活用することで、皮膚における免疫応答を調節する制御性T細胞の稀少亜集団を同定するとともに(Sci Rep 2016; A03渡邊との共同研究)、腫瘍内浸潤単球の由来解明(PNAS 2014)、破骨細胞の骨動員の生体内可視化(J Immunol 2013)に貢献した。

公募研究:

A02の公募研究には、第1期5名と第2期5名(うち若手研究者7名)が参画し、活発に領域研究に取り組んだ。例えば、鈴木(一)は、交感神経によるリンパ球動態制御が免疫応答の日内変動に寄与していることを明らかにし(J Exp Med 2016)、茂呂は、2型自然リンパ球の機能を制御するサイトカインシグナルを解明した(Nature Immunol 2016)。また、片桐は、低分子量Gタンパク質Rap1がTリンパ球の恒常性維持と大腸炎予防に重要であることを明らかにした(Nature Commun 2015; A01宮坂と分担梅本との共同研究)。

(A03) 免疫空間の攪乱と再構築

計画: リンパ器官の老化および病的攪乱と免疫応答の変容:

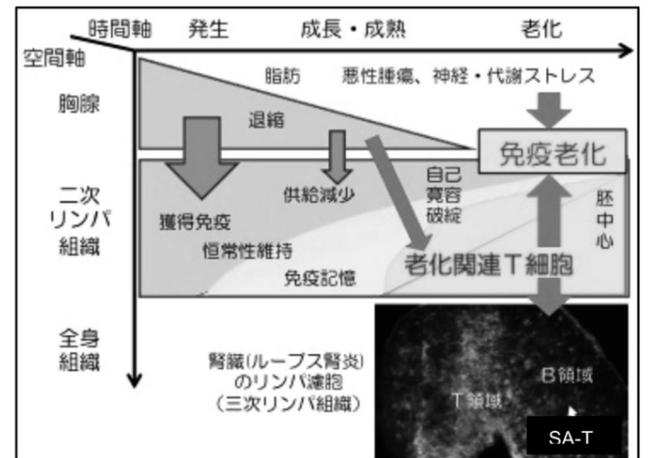
加齢に伴って発生し増加するユニークなTリンパ球亜集団(老化関連T細胞;SA-T)を同定してきた湊は、SA-T細胞が炎症性サイトカインを過剰産生する細胞であり、全身性エリテマトーデスの発症に深く関与することを見出しSA-Tた(J Immunol 2015; A01公募濱崎との共同研究)。Tリンパ球の老化に伴う機能変容が個体老化に関連する全身恒常性維持破綻の要因になるとの重要な可能性が示唆された。また、Tリンパ球の自己寛容確立を担う胸腺髄質上皮細胞の幹細胞を発見するとともに(Immunity 2014; A01公募濱崎との共同研究)、老化に伴う胸腺の退縮がSA-T細胞の増加に関与すること(J Immunol 2017; A01 公募濱崎との共同研究)を明らかにし、T系列急性リンパ芽球性白血病の悪性度が低分子量Gタンパク質Rap分子群の活性によって規定されていることを見いだした(Sci Rep 2015)。

計画: 免疫組織の新規構築による疾患制御のための技術開発:

世界をリードして人工リンパ節作製法を開発してきた渡邊は、足場となるゲルと複数のケモカインを用いることで無細胞の材料から人工リンパ節を作製することに成功した(Frontier Immunol 2016)。また、脾臓皮膜ストローマ細胞を用いることで機能的な脾臓を再構築できることを示し(J Immunol 2014)、脾臓を再構築しうる皮膜ストローマ細胞亜集団とその性状を同定した(Sci Rep 2017)。平成24年度から平成25年度に連携研究者として参画した石川は、免疫不全マウスへのヒト血液系悪性腫瘍細胞再構築技術を活用して、ヒト急性骨髄性白血病の治療薬として有効性が期待されるチロシンキナーゼHCKの新規阻害剤RK-20499を発見した(Science Transl Med 2013)。その後、石川は平成26年度から平成28年度まで計画研究分担者として、免疫不全NSGマウスにヒトクラスI HLAをトランスジーンしたマウスを作製しヒト造血幹細胞を移植することで、機能的なヒト抗がんキラーT細胞をマウス生体内で産生する技術を開発した(Blood 2016)。ヒトにおけるがん免疫療法最適化の開発・改良に有用なモデルとして期待される。

公募研究:

A03の公募研究には、第1期3名と第2期4名(うち若手研究者3名)が参画し、活発に領域研究に取り組んだ。佐野は、高脂肪食負荷に伴う内臓脂肪織炎等慢性疾患の発症にSA-T細胞が関与することを明らかにした(J Clin Invest 2016; A03湊と公募濱崎の共同研究)。



主な発表論文等

(雑誌論文) (計419件)

A01免疫空間の形成と機能

1) Kozai M, Kubo Y, Katakai T, Kondo H, Kiyonari H, Schaeuble K, Luther SA, Ishimaru N, Ohigashi I, Takahama Y. Essential role of CCL21 in establishment of central self-tolerance in T cells. *Journal of Experimental Medicine*. In press (2017) 査読有

2) Shimoto M, Sugiyama T, Nagasawa T. Numerous niches for hematopoietic stem cells remain empty during homeostasis. *Blood*. 129:2124-2131 (2017) 査読有 DOI: 10.1182/blood-2016-09-740563

3) Uddin MM, Ohigashi I, Mototsugi R, Nakayama T, Sakata M, Hamazaki J, Nishito Y, Rode I, Tanaka K, Takemoto T, Murata S, Takahama Y. Foxn1-beta5t transcriptional axis controls CD8+ T cell production in the thymus. *Nature Communications*. 8:14419 (2017) 査読有 DOI: 10.1038/ncomms14419

4) Takeda A, Kobayashi D, Aoi K, Sasaki N, Sugiura Y, Igarashi H, Tohya K, Inoue A, Hata E, Akahoshi N, Hayasaka H, Kikuta J, Scandella E, Ludewig B, Ishii S, Aoki J, Suematsu M, Ishii M, Takeda K, Jalkanen S, Miyasaka M, Umemoto E. Fibroblastic reticular cell-derived lysophosphatidic acid regulates confined intranodal T-cell motility. *eLife*. 5:e10561 (2016) 査読有 DOI: 10.7554/eLife.10561

5) Chen Q, Takada R, Noda C, Kobayashi S, Takada S. Different populations of Wnt-containing vesicles are individually released from polarized epithelial cells. *Scientific Reports*. 6:35562 (2016) 査読有 DOI: 10.1038/srep35562

6) Takada K, Van Laethem F, Xing Y, Akane K, Suzuki H, Murata S, Tanaka K, Jameson SC, Singer A, Takahama Y. TCR affinity for thymoproteasome-dependent positively selecting peptides conditions antigen responsiveness in CD8+ T cells. *Nature Immunology*. 16:1069-1076 (2015) 査読有 DOI: 10.1038/ni.3237

7) Okubo T, Takada S. Pharyngeal arch deficiencies affect taste bud development in the circumvallate papilla with aberrant glossopharyngeal nerve formation. *Developmental Dynamics*. 244:874-887 (2015) 査読有 DOI: 10.1002/dvdy.24289

8) Ohigashi I, Zuklys S, Sakata M, Mayer C, Hamazaki Y, Minato N, Hollander GA, Takahama Y. Adult thymic medullary epithelium is maintained and regenerated by lineage-restricted cells rather than bipotent progenitors. *Cell Reports*. 13:1432-1443 (2015) 査読有

DOI: 10.1016/j.celrep.2015.10.012

9) Omatsu Y, Seike M, Sugiyama T, Kume T, Nagasawa T. Foxc1 is a critical regulator of haematopoietic stem/progenitor cell niche formation. *Nature*. 508:536-540 (2014) 査読有 DOI: 10.1038/nature13071

10) Ohigashi I, Zuklys S, Sakata M, Mayer C, Zhanybekova S, Murata S, Tanaka K, Hollander GA, Takahama Y. Aire-expressing thymic medullary epithelial cells originate from beta5t-expressing progenitor cells. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 110:9885-9890 (2013) 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1301799110

11) Nakagawa Y, Ohigashi I, Nitta T, Sakata M, Tanaka K, Murata S, Kanagawa O, Takahama Y. Thymic nurse cells provide microenvironment for secondary TCR α rearrangement in cortical thymocytes. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 109:20572-20577 (2012) 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1213069109

A02免疫空間の連携と動態

1) Matoba K, Mihara E, Tamura-Kawakami K, Miyazaki N, Maeda S, Hirai H, Thompson S, Iwasaki K, Takagi J. Conformational freedom of the LRP6 ectodomain is regulated by N-glycosylation and the binding of the Wnt antagonist Dkk1. *Cell Reports*. 18:32-40 (2017) 査読有 DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.017

2) Yamamura K, Uruno T, Shiraishi A, Tanaka Y, Ushijima M, Nakahara T, Watanabe M, Kido-Nakahara M, Tsuge I, Furue M, Fukui Y. The transcription factor EPAS1 links DOCK8 deficiency to atopic skin inflammation via IL-31 induction. *Nature Communications*. 8:13946 (2017) 査読有 DOI: 10.1038/ncomms13946

3) Mihara E, Hirai H, Yamamoto H, Tamura-Kawakami K, Matano M, Kikuchi A, Sato T, Takagi J. Active and water-soluble form of lipidated Wnt protein is maintained by a serum glycoprotein afamin/ α -albumin. *eLife*. 5:e11621 (2016) 査読有 DOI: 10.7554/eLife.11621

4) Ikebuchi R, Teraguchi S, Vandenbon A, Honda T, Shand FH, Nakanishi Y, Watanabe T, Tomura M. A rare subset of skin-tropic regulatory T cells expressing Il10/Gzmb inhibits the cutaneous immune response. *Scientific Reports*. 6:35002 (2016) 査読有 DOI: 10.1038/srep35002

5) Yanagihara T, Sanematsu F, Sato T, Uruno T, Duan X, Tomino T, Harada Y, Watanabe M, Wang Y, Tanaka Y, Nakanishi Y, Suyama M, Fukui Y. Intronic regulation of Aire expression by Jmjd6 for self-tolerance induction in the thymus. *Nature Communications*. 6:8820 (2015) 査読有

DOI: 10.1038/ncomms9820

6) Kitago Y, Nagae M, Nakata Z, Yagi-Utsumi M, Takagi-Niidome S, Mihara E, Nogi T, Kato K, Takagi J. Structural basis for amyloidogenic peptide recognition by sorLA. *Nature Structural and Molecular Biology*. 22:199-206 (2015) 査読有 DOI: 10.1038/nsmb.2954

7) Ogawa K, Tanaka Y, Uruno T, Duan X, Harada Y, Sanematsu F, Yamamura K, Terasawa M, Nishikimi A, Côté JF, Fukui Y. DOCK5 functions as a key signaling adaptor that links Fc ϵ RI signals to microtubule dynamics during mast cell degranulation. *Journal of Experimental Medicine*. 211:1407-1419 (2014) 査読有 DOI: 10.1084/jem.20131926

8) Caglayan S, Takagi-Niidome S, Liao F, Carlo A-S, Schmidt V, Burgert T, Kitago Y, Füchtbauer E-M, Füchtbauer A, Holtzman DM, Takagi J, Wilnow TE. Lysosomal sorting of amyloid- β by the SORLA receptor is impaired by a familial Alzheimer's disease mutation. *Science Translational Medicine*. 6:223ra20 (2014) 査読有 DOI: 10.1126/scitranslmed.3007747

9) Harada Y, Tanaka Y, Terasawa M, Pieczyk M, Habiro K, Katakai T, Hanawa-Suetsugu K, Kukimoto-Niino M, Nishizaki T, Shirouzu M, Duan X, Uruno T, Nishikimi A, Sanematsu F, Yokoyama S, Stein JV, Kinashi T, Fukui Y. DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. *Blood*. 119: 4451-4461 (2012) 査読有 DOI: 10.1182/blood-2012-01-407098

A03免疫空間の攪乱と再構築

1) Tan JK, Watanabe T. Stromal cell subsets directing neonatal spleen regeneration. *Scientific Reports*. 7:40401 (2017) 査読有 DOI: 10.1038/srep40401

2) Najima Y, Tomizawa-Murasawa M, Saito Y, Watanabe T, Ono R, Ochi T, Suzuki N, Fujiwara H, Ohara O, Shultz LD, Yasukawa M, Ishikawa F. Induction of WT1-specific human CD8+ T cells from human HSCs in HLA class I Tg NSG mice. *Blood*. 127:722-734 (2016) 査読有 DOI: 10.1182/blood-2014-10-604777

3) Kobayashi Y, Watanabe T. Gel-trapped lymphorganogenic chemokines trigger artificial tertiary lymphoid organs and mount adaptive immune responses in vivo. *Frontiers in Immunology*. 7:316 (2016) 査読有 DOI: 10.3389/fimmu.2016.00316

4) Doi K, Imai T, Kressler C, Yagita H, Agata Y, Vooijs M, Hamazaki Y, Inoue J, Minato N. Crucial role of the Rap G protein signal in Notch activation and leukemogenicity of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Scientific Reports*. 5:7978 (2015) 査

読有 DOI: 10.1038/srep07978

5) Tahir S, Fukushima Y, Sakamoto K, Sato K, Fujita H, Inoue J, Uede T, Hamazaki Y, Hattori M, Minato N. A CD153+CD4+ T follicular cell population with cell-senescence features plays a crucial role in lupus pathogenesis via osteopontin production. *Journal of Immunology*. 2015 Jun 15;194(12):5725-5735 (2015) 査読有 DOI: 10.4049/jimmunol.1500319

6) Sekai M, Hamazaki Y, Minato N. Medullary thymic epithelial stem cells maintain a functional thymus to ensure lifelong central T cell tolerance. *Immunity*. 41:753-761 (2014) 査読有 DOI: 10.1016/j.immuni.2014.10.011

7) Tan J, Watanabe T. Murine spleen tissue regeneration from neonatal spleen capsule requires lymphotoxin priming of stromal cells. *Journal of Immunology*. 193:1194-1203 (2014) 査読有 DOI: 10.4049/jimmunol.1302115

8) Saito Y, Yuki H, Kuratani M, Hashizume Y, Takagi S, Honma T, Tanaka A, Shirouzu M, Mikuni J, Handa N, Ogahara I, Sone A, Najima Y, Tomabechi Y, Wakiyama M, Uchida N, Tomizawa-Murasawa M, Kaneko A, Tanaka S, Suzuki N, Kajita H, Aoki Y, Ohara O, Shultz LD, Fukami T, Goto T, Taniguchi S, Yokoyama S, Ishikawa F. A pyrrolo-pyrimidine derivative targets human primary AML stem cells in vivo. *Science Translational Medicine*. 5:181ra52 1-15 (2013) 査読有 DOI: 10.1126/scitranslmed.3004387

9) Takagi S, Saito Y, Hijikata A, Tanaka S, Watanabe T, Hasegawa T, Mochizuki S, Kunisawa J, Kiyono H, Koseki H, Ohara O, Saito T, Taniguchi S, Shultz LD, Ishikawa F. Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. *Blood*. 119:2768-2777 (2012) 査読有 DOI: 10.1182/blood-2011-05-353201

(学会発表)
(招待講演と基調講演のみで121件)

1) Junichi Takagi Resolution, dynamics, and heterogeneity -In what detail do we need to know protein structures for answering biological questions? Gordon Research Conference on X-ray Science (国際学会)2013年8月7日 Stonehill Colledge (アメリカ) [招待講演]

2) Yousuke Takahama Thymus-dependent positive selection of T cells. NCI Symposium on Frontiers in Basic Immunology (国際学会)2015年10月8日 National Institutes of Health (アメリカ) [招待講演]

(図書) (計5件)

1) Synthetic Immunology. [200 pages] Springer ISBN 9784-43-156025-8 (2016) Editors: Watanabe T, Takahama Y. (渡邊と高濱による編集)

2) Encyclopedia of Immunobiology. [3126 pages] Elsevir ISBN 9780-12-374279-7 (2016) Editors: Ratcliffe M. and 16 editors including Miyasaka M. [宮坂らによる編集]

3) Chronic Inflammation. [702 pages] Springer ISBN 9784-43-156068-5 (2016) Editors: Miyasaka M, Takatsu K. [宮坂らによる編集]

4) Thymic development and selection of T lymphocytes. [132 pages] Springer ISBN 9783-64-240252-4 (2014) Editors: Boehm T, Takahama Y. [高濱らによる編集]

する報道
2015年08月29日 毎日新聞:2015年08月26日 NHKニュース
・ アミロイドベータ結合タンパク質の構造決定(高木)に関する報道
2015年02月03日 日経新聞・日刊工業新聞・NHKニュース
・ 自己免疫疾患防く胸腺上皮幹細胞の同定(湊)に関する報道
2014年11月14日 朝日新聞・毎日新聞・読売新聞・産経新聞・日本経済新聞・日刊工業新聞
・ DOCK5によるアレルギー制御機構解明(福井)に関する報道
2014年6月27日 科学新聞:2014年6月11日 日刊工業新聞:2014年6月10日 毎日新聞・NHKニュース
・ 骨髄ニッチを形成するFoxc1同定(長瀬)に関する報道
2014年3月3日 読売新聞・毎日新聞・日刊工業新聞

・ アルツハイマー病原因物質の蓄積防御機構発見(高木)に関する報道
2014年2月14日 毎日新聞:2014年2月13日 朝日新聞・読売新聞・産経新聞・NHKニュース
○科学コミュニケーション活動(講演会)
・ 国立大学共同利用共同研究拠点協議会主催 一般向け講演会「知の拠点セミナー」講演(高濱)
2016年9月17日(京都大学東京オフィス)参加者約60名
(イベント)
・ 日本免疫学会主催 一般向けイベント「免疫ふしぎ未来」講演・展示(高濱)
2015年8月9日・2014年8月10日・2013年8月11日・2012年8月19日(日本科学未来館)参加者各約2000名
・ 日本分子生物学会主催 一般向けイベント

「2050年シンポジウム」出演(高濱)
2013年12月6日(神戸ポートピアホール)参加者約1000名; 2014年1月12日& 19日(BスフジガリレオX)放送
(テレビ番組)
・ NHKスペシャル「人体 ミクロの大冒険」取材協力(高濱、湊)
2014年4月6日放送
○ウェブサイト
・ 「免疫四次元空間ダイナミクス」
http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/ion/index.html
・ オンラインニュースレター
http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/ion/newsletter/index.html
・ 班員ブログ
http://asmion-blog.org

Meetings

第1回総括班会議

日時 平成24年8月29日(水)17:00~
場所 京都大学芝蘭会館別館 2階研修室1



リンパ器官形成の分子機構と制御

(平成24年度～平成28年度)

高田 慎治 自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター

研究開始当初の背景

免疫を司る血液系細胞の分化には、リンパ器官という「場」からの作用が不可欠である。そのような「場」の作用を理解する上では、リンパ器官を構成するストローマ(間質)細胞の役割を明らかにすると同時に、場の作用を担う分子的実体である各種分泌性シグナル因子の機能を解明することが必要である。実際、胸腺等のリンパ器官においては、多様なストローマ細胞の実態が解明されつつあると同時に、血液系細胞の分化や増殖を促すシグナル因子が数多く同定され、それらの機能について多くの研究が進められていた。

一方、リンパ器官は組織化された三次元的な組織であり、ストローマ細胞の配置や分泌性のシグナル因子の拡散範囲も空間的に制御されているものと考えられる。したがって、リンパ器官におけるストローマ細胞の作用機作を理解するためには、多様なストローマ細胞がリンパ器官の中でどのように分布し、また分泌性シグナル因子の拡散により規定されるシグナルの到達範囲、言い換えれば「シグナルの場」、がどのように制御されるのかを明らかにすることが重要であると考えられた。

研究代表者は、発生生物学の観点から分泌性シグナル因子、中でもWntに特に着目して、その機能や分泌後の空間分布、さらにそれらに深く関わる翻訳後修飾や高次構造を研究してきた(Takada, et al. *Genes Dev.* 1994, Ikeya, et al. *Nature.* 1997, Muroyama, et al. *Genes Dev.* 2002, Takada, et al. *Dev. Cell.* 2006他)。WntやFGF, TGFなどの代表的なシグナルが動物の発生において重要な働きをすることは、すでに膨大な研究により明らかにされているが、これらシグナル因子の拡散により規定される「シグナルの場」の形成機構とその制御については、問題の重要性にもかかわらず十分には解明されていない。

このような問題と同時に、胸腺の発生機構は重要な問題である。発生学的には、胸腺は咽頭嚢と呼ばれる内胚葉と神経堤細胞に由来する。これらにより形成される細胞塊である胸腺原基は、発生に従い咽頭嚢からくびれ切れ、心臓付近まで移動する。そして、血管の進入に伴って未分化なT細胞が入り込み、次第に成熟した胸腺へと発達していく。すなわち、胸腺は起源を異にする複数種の細胞が相互作用しながら形成される器官であり、しかもその発生過程においては胸腺

原基の細胞塊のくびれ切れや位置の移動という他の器官の発生にはあまり見られない特徴をもつ。成熟胸腺の構造の構築に、このような胸腺特有の発生過程がどのように反映されるかは興味深い問題であるが、この問題に対する解答はほとんど得られていなかった。一方、DiGeorge症候群の原因遺伝子であるTbx1は、咽頭嚢および胸腺原基の形成に必須であることがすでに明らかにされており、さらに研究代表者らが同定したRipply3は、咽頭内胚葉においてTbx1と協調して咽頭嚢の発生に必須な役割をはたすことが示されて来たが、その詳細な作用機能は分かっていなかった。

研究の目的

本研究では、胸腺内におけるストローマ細胞の空間配置と「シグナルの場」の空間的制御に関して、(1)および(2)の目的を掲げると同時に、胸腺構造の構築に関わるしくみの理解に向け、(3)の目的を掲げた。

- (1) 胸腺内でWntを産生する細胞の特定と、そこから分泌されるWntシグナルの活性化領域を詳細に解析し、胸腺におけるWntの機能とシグナルの空間制御の関係を明らかにすることを目指した。
- (2) (1)と平行して、Wntの拡散様式を規定する分子基盤についての解析を進めることとした。ここでは、拡散様式を規定する要因がWntタンパク質の特性と細胞外分子との相互作用の2点にあることを念頭におき、Wntの高次構造の解明とその多様性の検証、物理化学的方法を駆使したWntの挙動の追跡、細胞外分子との相互作用の解明の3点を具体的に目指した。
- (3) Ripply3が咽頭嚢において発現し、胸腺原基の発生に不可欠であることに基づき、Ripply3及び関連して機能するような遺伝子の同定と機能解析により、胸腺原基の形成に関わる分子機構を明らかにすることを目指した。

研究の方法

- (1) さまざまな発生段階の胸腺組織切片を用いて、各Wnt遺伝子の発現細胞をin situ hybridizationにより特定するとともに、Wntシグナルを受容した細胞をレポーターマウスを用いて特定した。さらに細胞特異的にWntの分泌およびシグナル伝達を阻害できる変異体マウスを用い、Wntシグナルの役割を明らかにした。また、Wntシグナルが活性化された細胞の細胞系譜を追跡することにより、Wntの機能についての詳細な解析を進めた。
- (2) Wntの拡散様式を規定する分子基盤についての研究は、以下のように進めた。
 - ① 拡散様式の規定に深く関わるWntの高次構造およびその多様性については、生化学的方法に、分析超遠心、単粒子解析を加えて解析した。
 - ② 蛍光相関解析、蛍光相互相関解析等の物理化学的方法を駆使して生体内でのWntの動態の追跡を行った。
 - ③ Wntの拡散の制御を、複数種のヘパラン硫酸に着目して、アフリカツメガエル胚にて解析した。
- (3) 咽頭嚢における胸腺原基の発生機構を理解するために、Ripply3と関連して機能する候補遺伝子の探索と機能解析を以下のような方法により進めた。
 - ① 酵母ツーハイブリッド法によりRipply3関連因子の探索を行った。
 - ② ①において同定した因子の機能解析を細胞培養系や変異体の解析により進めた。
 - ③ 小型魚類を用いて咽頭嚢の発生に関わる因子の特定と機能解析を行った。

研究成果

- (1) 胸腺におけるWntシグナルの空間分布と機能胎生15日ならびに生後直後の胸腺において複数のWnt遺伝子をプローブにしたin situ hybridizationにより、Wnt4, Wnt5aを含むいくつかのWntが胸腺上皮に発現することを確認した。一方、胸腺内においてWntシグナル伝達が活性化している細胞を同定するため、共同研究者である京都産

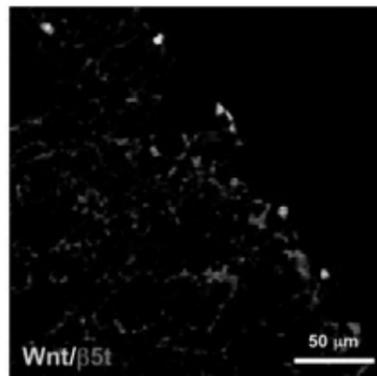


図1 胸腺上皮におけるWntシグナルの活性化: Wntシグナル(緑)の活性化は未分化な細胞で強く、分化した胸腺皮質上皮細胞($\beta 5t$ 陽性:赤)ではあまり認められない。

業大学近藤寿人教授と徳島大学竹本龍也博士が開発したEGFPを用いたWntレポーターマウスを用いて、FACSならびに免疫組織染色による検討を行った。その結果、Wntシグナルは免疫細胞では全く活性化されておらず、胸腺上皮細胞においてのみ活性化が認められた。胸腺上皮細胞において特異的にWntシグナルの分泌を阻害したマウスを作成したところ、Wntシグナルの活性化は完全に阻害されたことから、胸腺上皮細胞は自らが分泌したWntタンパク質を受容し細胞内でシグナル伝達を活性化しているものと考えられた。

詳細な免疫組織学的解析から、Wntシグナルは胸腺上皮細胞の一部でのみ活性化されていることが見いだされた。細胞の形態から、Wntシグナルの活性化は比較的未分化な胸腺皮質上皮細胞において起きていることが示唆された(図1)。そこで、この仮説を検証するため、Wntシグナルが一旦活性化すると継続的にマーカー遺伝子(tdTomato)を発現するようにデザインしたマウスを用いて、Wntシグナルが活性化された細胞の追跡を行ったところ、それらの細胞は時間経過とともにより成熟した皮質上皮細胞へ分化していくことが確かめられた。

一方、コンディショナルノックアウトマウスを用いて胸腺上皮細胞で特異的にWntシグナルを阻害したところ、胸腺の大きさならびに細胞数が低下した。以上の結果から、胸腺においては、未分化な上皮細胞が自己が分泌したWntの働きにより、増殖を活性化させるものと推察された。さらに、Wntシグナルの

活性化は胸腺内の特定の場所に多く認められたことから、胸腺上皮細胞の分化に関して、これまでに明らかにされていなかった空間的な制御機構が存在することが強く示唆された。

- (2) Wntの拡散様式を規定する分子基盤についての研究
 - ① Wntの高次構造の決定とその多様性についての検証
まず、分泌されたWntの分子的形態を複数の培養細胞と複数種のWntにおいて系統的に解析した。Wntは(A)リポ蛋白質複合体と(B)エクソソームという2つの異なる運搬体に乗って細胞外を移動するというモデルが異なる研究グループから提唱されているが、この両者がWntの運搬や拡散において主要な役割をはたすのか否かについては明確な結論が未だに得られていない(図2)。研究代表者は、繊維芽細胞(L細胞)、上皮細胞(MDCK細胞)など複数種の培養細胞を用いて分泌されたWntを密度勾配遠心法等を駆使して系統的に解析し、以下のことを明らかにした。(A)リポ蛋白質複合体フォームのWntは特定の細胞種のみから分泌される、(B)エクソソーム様フォームのWntはMDCK細胞の基底側やL細胞から分泌されるが、その量はわずか(全分泌量の1%以下)である、(C)分泌されるWntの大部分は脂質成分を含まず多量体を形成する(図2)、

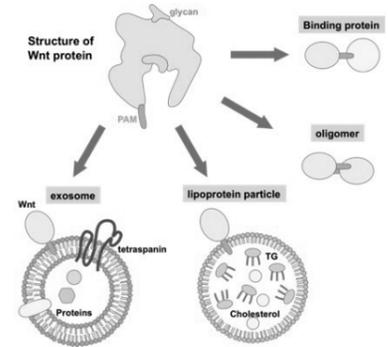


図2 Wntタンパク質の構造の多様性: Wntはリポ蛋白質複合体やエクソソームといった運搬体により細胞外輸送されると考えられてきたが、培養細胞にて分泌されるWntタンパク質の多くは、他の結合因子との複合体、もしくはWnt同士からなる複合体を形成して分泌されることがわかった。また、上皮細胞の頂端側から分泌されるWntの一部はエクソソームとは異なる運搬体に取り込まれていることも明らかになった。

(D) MDCK細胞の頂端側からは未知の新たなフォームのWntが分泌される。この結果は、従来のWntタンパク質の細胞外運搬に関するモデルに修正が必要であることを示すと同時に、新たな運搬様式が存在を示唆している。

このうち、(C)で述べた多量体について、分析超遠心法により多量体の沈降係数ならびに他のタンパク質との結合について検討を加えた。その結果、Wnt多量体の大きさが明らかになるとともに、受容体であるFrizzledや分泌性のWnt結合タンパク質であるsFRPとの相互作用によりWnt多量体が容易に解離することも示された。化学架橋剤を用いた解析ならびに、電子顕微鏡像をもとにした単粒子解析により、Wnt多量体の高次構造も突き止められた。

- ② 生体内でのWntの動態の追跡
 - ①の結果を受け、生体内ではWntがどのような高次構造をとって細胞外に分泌され、またどのように挙動するのかについて、検討を進めた。そのために、細胞が比較的大きくかつ

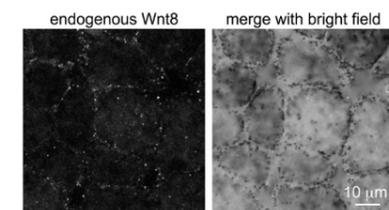


図3 Wntタンパク質の局在化: アフリカツメガエル胚において内在性Wntタンパク質は細胞の周囲に不均一に集積することを発見した。さらに、この集積は、Wntと強く結合する硫酸基に富むヘパラン硫酸鎖が細胞膜上で局所的にクラスター化していることによることを明らかにした。

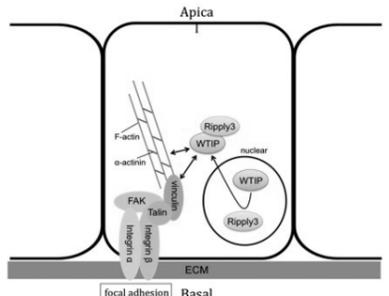


図4 上皮細胞におけるRipply3とWtipの作用機構: Ripply3はWtipと結合して細胞内での局在性を変化させる。細胞膜付近においては、Wtipとともに細胞接着装置と細胞骨格の制御に関わるものと推察される。

計測がしやすいアフリカツメガエル初期胚の外胚葉をモデル系に選び、細胞間の空間に分泌されたWntの解析を行った。まず、FCCS (蛍光相互相関分光法) による解析により、胚体内においてもWntは多量体を形成し細胞外を移動していることが突き止められた。さらに、分泌されたWntの挙動を FCS (蛍光相関分光法) により詳細に解析したところ、Wnt多量体の多くは移動性が比較的低いことが明らかになった。

③Wntの拡散の制御機構

Wnt多量体の移動度が低いこと理由の一つに、細胞外基質等との相互作用による影響が考えられる。研究代表者らは東京大学大学院理学系研究科の平良准教授らとの共同研究により、Wntが硫酸基修飾に富むヘパラン硫酸(N-sulfoHS)に特異的に結合すること、硫酸基修飾に富むヘパラン硫酸は細胞膜上でクラスター化しておりそこに結合するWntも細胞膜上に局所的に集合していること、さらに硫酸化酵素であるNDST1によりこの結合が制御されWntのシグナル伝達が影響を受けることを明らかにした。これによりWntの細胞外空間分布を制御する分子機構の一端が明らかになった(図3)。

(3) 咽頭嚢における胸腺原基の発生機構の解析

①Ripply3関連因子の探索方法を検討した結果、マウス胚より作成したライブラリーを用いて行った酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより良好な結果が得られた。そこで、この方法にて得られた4つの遺伝子に着目して研究を進めた。

②これらのうち、まずLIMドメインタンパク質をコードするWTIPに着目した。WTIPは核内および細胞膜周辺に存在することが知られているが、培養細胞を用いてRipply3と共発

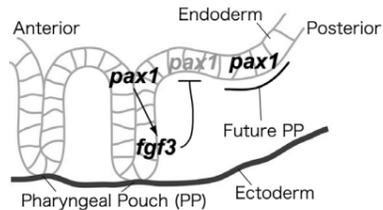


図5 小型魚類の咽頭嚢形成機構:ゼブラフィッシュなどの小型魚類においては、Ripply3ではなくPax1が重要な役割を担っており、FGFシグナルとの相互作用により、咽頭嚢の携帯形成が進むことが明らかになった。

現させたところ、興味深いことに細胞膜直下の接着装置(接着斑)周辺に局在することがわかった。LIMドメインタンパク質はインテグリンとアクチン骨格を繋げる上で重要であることが知られていることから、咽頭内胚葉においてはRipply3の局所的な発現によりWTIPを介した細胞骨格系の再編がおき、それが咽頭嚢特有の屈曲構造や胸腺原基の発生に関わることが推察された(図4)。そこで、Ripply3変異体を詳細に解析し、咽頭嚢形成過程における咽頭上皮細胞の屈曲にRipply3が必須であることを明らかにした。さらに、WTIPの変異体マウスならびにWTIPと構造的に類似のAjubaの変異体マウスを作成し、咽頭嚢ならびに胸腺原基の発生を観察した。単独の変異体では大きな異常が認められなかったため、これらの2重変異体による解析を継続中である。

Ripply3は咽頭嚢にて発現する転写因子であるTbx1の作用を制御することから、Ripply3とTbx1の制御関係についても詳細に解析した。具体的には、咽頭嚢でのRipply3の発現に必要なシスエレメントを特定し、トランスジェニックマウスを作成することにより検証した。さらに、Tbx1変異体においては、このトランスジーンからの遺伝子発現パターンが乱れることから、生体内におけるRipply3の発現パターンの形成にはTbx1の発現が必要であることを明らかにした。また、咽頭嚢の形成にはレチノイン酸シグナルが重要であるが、Ripply3の発現にレチノイン酸シグナルが重要であることも明らかにした。

③マウスとともに分子遺伝学的研究によく用いられるゼブラフィッシュを用いてRipply3の機能を解析するため、ゲノム編集により変異体を作成した。しかしながら、大きな異常は観察されず、咽頭嚢発生の分子機構には動物種により違いがあることが明らかになった。一方、転写因子であるPax1a,Pax1bの2重変異体がマウスのRipply3変異体とよく似た異常を呈することを見だし、その解析を進めた。その結果、PaxとFGFシグナル、さらにレチノイン酸シグナルの相互作用が咽頭嚢形成の上で重要であることが明らかになった。同時に、内胚葉がGFPにより可視化されるゼブラフィッシュを用いて、咽頭嚢の形成過程を詳細に調べた結果、第二咽頭嚢を境にして全く異なるメカニズムにより咽頭嚢形

成が起きていることを明らかにした(図5)。

研究組織

研究分担者

大久保 直(Okubo, Tadashi)
北里大学医学部・准教授
研究者番号:10450719



連携研究者

三井 優輔(Mii, Yusuke)
自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎
統合バイオサイエンスセンター・助教
研究者番号:70634129

矢部 泰二郎(YABE, Taijiro)
自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎
統合バイオサイエンスセンター・助教
研究者番号:30470074

藤森 さゆ美(FUJIMORI, Sayumi)
自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎
統合バイオサイエンスセンター・研究員
研究者番号:20589717

陳 秋紅(CHEN, Quihong)
自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎
統合バイオサイエンスセンター・研究員

高田 律子(TAKADA, Ritsuko)
自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎
統合バイオサイエンスセンター・研究員

岡田 和訓(OKADA, Kazunori)
自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎
統合バイオサイエンスセンター・NIBBリサーチ
フェロー
研究者番号:703328

研究協力者

篠塚 琢磨(SHINOZUKA, Takuma)
総合研究大学院大学・大学院生

土屋 凱寛(TSUCHIYA, Akihiro)
総合研究大学院大学・大学院生

主な発表論文等

(雑誌論文)(計23件)

- Mii, Y., Yamamoto, T., Takada, R., Mizumoto, S., Matsuyama, M., Yamada, S., Takada, S. *, & Taira, M. * "Co-corresponding authors (2017) Roles of two types of heparan sulphate clusters in Wnt8 distribution and signalling in Xenopus. *Nature Commun.* 8, 1973. doi: 10.1038/s41467-017-02076-0.
- Chen, Q., Takada, R., Noda, C., Kobayashi, S., & Takada, S.* (2016) Different populations of Wnt-containing vesicles are individually released from polarized epithelial cells *Sci. Rep.* 6, 35562; doi: 10.1038/srep35562
- Okada K.*, Inohaya K., Mise T., Kudo A., Takada, S.*, & Wada H.* "Co-corresponding authors (2016) Reiterative expression of pax1 directs pharyngeal pouch segmentation in medaka. *Development* 143, 1800-1810. doi: 10.1242/dev.130039. PMID: 27034424
- Okubo T. *, & Takada, S. (2015) Pharyngeal arch deficiencies affect

taste bud development in the circumvallate papilla with aberrant glossopharyngeal nerve formation *Dev. Dyn.* 244, 874-887. doi: 10.1002/dvdy.24289.

(学会発表)(計33件)

- Sayumi Fujimori, Izumi Ohigashi, Tatsuya Takemoto, Yousuke Takahama, & Shinji Takada "Activation of Wnt/b-catenin signaling in thymic epithelial progenitors" (口頭発表): Kyoto T Cell Conference (京都府京都市 京都大学、2017年3月13日-3月17日),
- Shinji Takada, Ritusko Takada, Yusuke Mii, Chan-Gi Pack, Yasushi Sako, & Susumu Uchiyama "Analytical Ultracentrifugation revealed heterogeneity of secreted Wnt proteins in the extracellular space" (口頭発表): Wnt meeting 2016, EMBO Conference (Brno(チェコ)、2016年9月14日-9月17日),
- Shinji Takada "Spatial localization of Wnt proteins in vertebrate development"

(招待講演):Finish-Japanese Joint Symposium on Morphogenesis and Signaling (Helsinki (フィンランド)、2014年3月4日、5日)

4) Yusuke Mii, Kei Nakayama, Takuma Shinozuka, & Shinji Takada "Visualization of Wnt proteins reveals their local accumulation in developing tissues" (招待講演):第47回日本発生生物学会(愛知県名古屋市 ウィンク愛知 2014年5月27日~30日)

5) 高田慎治、陳秋紅、高田律子 「Wntタンパク質の脂肪酸修飾の機構と生理的意義」(招待講演):第85回日本生化学会、(福岡県福岡市 福岡国際会議場 2112年12月14日~16日)

(図書)(計2件)

Tadashi Okubo "Tbx1/Ripply3/Retinoic Acid Network that Regulates Pharyngeal Arch Development" in *New Principles in Developmental Processes* eds. Hisato Kondoh & Atsushi Kuroiwa, pp97-108, Springer 2014

(その他)

ホームページ
http://www.nibb.ac.jp/cib2/
http://www.oib.orion.ac.jp/Lab?Biodesign/takada.html
http://zf.in.org/ZDB_LAB_050728_1

メディア報道
日刊工業新聞 平成28年5月26日「生物学研と筑波大、魚のえら形成の仕組みを解明-関与遺伝子を特定」

骨髄ニッチによる免疫担当細胞の維持機構

(平成24年度～平成28年度) Molecular mechanisms by which microenvironmental niches regulate production of immune cells.

長澤 丘司 大阪大学・大学院生命機能研究科

研究代表者

NAGASAWA, Takashi

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

80281690



計
画
研
究

研究開始当初の背景

成体では、免疫担当細胞を含む10種類以上の血液細胞のすべては、骨髄で造血幹細胞より造血前駆細胞を経て産生され続け、胸腺やリンパ節等の免疫組織を含む全身の末梢組織に供給される。産生される血液細胞の種類や数は、健康時に加えて感染症や外傷等の侵襲時、必要に応じて全身性の機序で適切に調節されるがその機構はほとんど明らかになっていない。その理由として、骨髄での造血幹細胞・前駆細胞の産生に中心的な役割を担う「場」であるニッチ(niche)と呼ばれる特別な微小環境の実体や機能が長年明らかでなかったことがある。私たちは、ケモカインという細胞運動の調節で知られるサイトカインファミリーのメンバーであるCXCL12とその受容体CXCR4が造血幹細胞の骨髄へのホーミングや維持、B細胞・形質細胞様樹状細胞・NK細胞などの免疫担当細胞の産生に必須であることを明らかにした後、成体骨髄において“CXCL12を高発現する突起を持った細網細胞(CAR細胞)”を同定し、造血幹細胞やB細胞・形質細胞様樹状細胞・NK細胞の大部分がCAR細胞の突起と接着していることを見出した。更に、CAR細胞がCXCL12に加えてSCFの主たる産生細胞であり、造血幹細胞の増殖と未分化性の維持、B細胞と赤血球の前駆細胞の増殖に必須のニッチを構成する細胞であることを証明した。

研究の目的

そこで、本研究では、骨髄の造血のニッチ細胞であるCAR細胞が、造血幹細胞や免疫担当細胞前駆細胞の増殖や分化を調節する分子機構を明らかにすることにより、免疫システムの中で免疫担当細胞の細胞数が適切に維持されるしくみについての理解を大きく進めることを目的とする。

研究の方法

(1) 健常時と免疫担当細胞の再生過程でCAR細胞での発現が変化する遺伝子の同定と機能解析。健常時と、血液細胞を枯渇させたあ

と造血幹細胞数の回復期と回復が終了した時期でCAR細胞を分離し、遺伝子発現量を比較し、差が大きい遺伝子をサイトカインや転写因子に注目して検索する。更に、上記のマウスのCAR細胞やその他の細網細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞等の骨髄の非血液細胞を分離し、mRNA発現量を解析する。免疫担当細胞の細胞数の維持に重要である候補遺伝子に関しては、その生体での機能を明らかにするため、CAR細胞特異的遺伝子欠損マウスを作製する。

(2) 造血幹細胞・前駆細胞と免疫担当細胞とCAR細胞との相互作用の解析。CAR細胞は、複数種類の造血幹細胞・前駆細胞と免疫担当細胞と接着し、ニッチを提供する。その作用機構を細胞生物学的に解析するために、単離したCAR細胞と血液細胞の相互作用を試験管内で観察できる培養系を樹立する。

研究成果

CAR細胞の免疫担当細胞産生のニッチとしての機能を維持・調節する分子機構を明らかにするために、私たちは、健常時と免疫担当細胞の再生過程でCAR細胞で高発現する遺伝子を検索した結果、フォークヘッドファミリーに属する転写因子で先天性水頭症の原因遺伝子として知られていたFoxc1がCAR細胞特異的に発現することが明らかになった。そこで、CAR細胞特異的遺伝子欠損マウスと成体で遺伝子欠損を誘導するマウスを作製したところ、造血幹細胞と免疫担当細胞前駆細胞の細胞数が著減し、CAR細胞でのCXCL12とSCFの発現が低下しており、Foxc1は、CAR細胞において造血幹細胞と免疫担当細胞の細胞数を維持するニッチの形成と維持に必須であることが明らかになった。また、CAR細胞の試験管内での培養法を樹立し、Foxc1がCXCL12とSCFの発現を亢進することを確認した。

特異的細胞欠損マウスと細胞特異的遺伝子欠損マウスを用いた解析が可能となり、CAR細胞は、哺乳類で組織幹細胞ニッチを構成することがはじめて証明された細胞種となった。したがって、Foxc1がCAR細胞特異的に発現し、造血幹

細胞と免疫担当細胞産生のニッチの形成に必須であることの発見は、幹細胞ニッチ構成細胞の発生の分子基盤をはじめて同定したことになり、免疫学、幹細胞生物学において、世界をリードする画期的な成果である。今後は、Foxc1の発現や活性を調節する機構や、作用の分子機構を含めたCAR細胞の機能調節の分子機構が明らかになることが期待され、免疫担当細胞の産生機構の理解が大きく進むと考えられる。一方、血液細胞を枯渇させたあと造血幹細胞数の回復期と回復が終了する時期でのCAR細胞で発現量が変化する遺伝子について、CAR細胞特異的遺伝子欠損マウスを作製したが、予想に反して、免疫担当細胞の産生における有意な異常を観察できなかった。CAR細胞特異的に高発現する遺伝子の検索の中から、免疫担当細胞産生のニッチとしての機能を維持・調節する分子が明らかになった。

主な発表論文等

(雑誌論文)(計25件)

- Shimoto, M., Sugiyama, T., and *Nagasawa, T. Numerous niches for hematopoietic stem cells remain empty during homeostasis. *Blood* 129(15); 2124-2131,2017. 査読有 DOI: 10.1182/blood-2016-09-740563.
- Cordeiro, Gomes, A., *Hara, T., Lim, V.Y., Herndler-Brandstetter, D., Nevius, E., Sugiyama, T., Tani-Ichi, S., Schlenner, S., Richie, E., Rodewald, H.R., Flavell, R.A., Nagasawa, T., Ikuta, K., and *Pereira, J.P. Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation. *Immunity* 45(6); 1219-1231,2016. 査読有 DOI: 10.1016/j.immuni.2016.11.004.
- Rodda, L.B., Bannard, O., Ludewig, B., Nagasawa, T., and *Cyster, J.G. Phenotypic and morphological properties of germinal center dark zone Cxcl12-ExpressingReticular Cells. *J. Immunol.* 195(10); 4781-4791, 2015. 査読有 DOI: 10.4049/jimmunol.1501191.
- Sugiyama, T., and *Nagasawa, T. CXCL12 catches T-ALL at the entrance of the bone marrow. *Trends Immunol.* 36(9); 504-506, 2015. 査読無 DOI:10.1016/j.it.2015.08.001.
- Omatsu, Y., and *Nagasawa, T. The critical and specific transcriptional regulator of the microenvironmental niche for hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr. Opin. Hematol.* 22(4); 330-336, 2015. 査読有 DOI: 10.1097/MOH.0000000000000153.
- *Nagasawa, T. CXCL12/SDF-1 and CXCR4. *Front. Immunol.* 6; 301,2015. 査読有 DOI: 10.3389/fimmu.2015.00301.
- Day, R.B., Bhattacharya, D., Nagasawa, T., and *Link, D.C. Granulocyte colony-stimulating factor reprograms bone marrow stromal cells to actively suppress B lymphopoiesis in mice. *Blood* 125 (20); 3114-3117, 2015. 査読有 DOI: 10.1182/blood-2015-02-629444.
- Sugiyama, T., and *Nagasawa, T. Myeloid cells stimulate their progenitors in an emergency. *Immunity* 42(1); 13-14, 2015. 査読無 DOI: 10.1016/j.immuni.2015.01.002.
- Ono, N., Ono, W., Nagasawa, T., and *Kronenberg, H.M. A subset of chondrogenic cells provides early mesenchymal progenitors in growing bones. *Nat. Cell Biol.* 16(12); 1157-1167, 2014. 査読有 DOI: 10.1038/ncb3067.
- Ono, N., Ono, W., Mizoguchi, T., Nagasawa, T.,Frenette, P.S., and *Kronenberg, H.M. Vasculature-associated cells expressing nestin in developing bones encompass early cells in the osteoblast and endothelial lineage. *Dev. Cell* 29(3); 330-339, 2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.devcel.2014.03.014.
- Vogt, D., Hunt, R.F., Mandal, S., Sandberg, M., Silberberg, S.N., Nagasawa, T., Yang, Z., Baraban, S.C., and *Rubenstein, J.L. Lhx6 Directly Regulates Arx and CXCR7 to Determine Cortical Interneuron Fate and Laminar Position. *Neuron* 82(2); 350-364, 2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.neuron.2014.02.030.
- Omatsu, Y., Seike, M., Sugiyama, T., Kume, T., and *Nagasawa, T. Foxc1 is a critical regulator of haematopoietic stem/progenitor cell niche formation. *Nature* 508; 536-540, 2014. 査読有 DOI: 10.1038/nature13071.
- Bannard, O., Horton, R.M., Allen, C.D., An, J., Nagasawa, T., and *Cyster, J.G. Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity* 39(5); 912-924, 2013. 査読有 DOI: 10.1016/j.immuni.2013.08.038.
- Aronovich, A., Nur, Y., Shezen, E., Rosen, C., Zlotnikov Klionsky, Y., Milman, I., Yarimi, L., Hagin, D., Rechavi, G., Martinowitz, U., Nagasawa, T., Frenette, P.S., Tchorsh-Yutsis, D., and *Reisner, Y. A novel role for factor VIII and thrombin/PAR1 in regulating hematopoiesis and its interplay with the bone structure *Blood* 122; 2562-2571, 2013. 査読有 DOI: 10.1182/blood-2012-08-447458.
- Devi, S., Wang, Y., Chew, W.K., Lima, R., A-González, N., Mattar, C.N., Chong, S.Z., Schlitzer, A., Bakocevic, N., Chew, S., Keeble, J.L., Goh, C.C., Li, J.L., Evrard, M., Malleret, B., Larbi, A., Renia, L., Haniffa, M., Tan, S.M., Chan, J.K., Balabanian, K., Nagasawa, T., Bachelierie, F., Hidalgo, A., Ginhoux, F., Kubes, P., and *Ng, L.G. Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *J. Exp. Med.* 210(11); 2321-2336, 2013. 査読有 DOI: 10.1084/jem.20130056.
- Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L.A., Nombela-Arrieta, C., Chèvre, R., A-González, N., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L.E., Weber, C., Nagasawa, T., Frenette, P.S., Castrillo, A., and *Hidalgo, A. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* 153(5); 1025-1035, 2013. 査読有 DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.040.
- Greenbaum, A., Hsu, Y.M., Day, R.B., Schuettpeiz, L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., and *Link, D.C. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495(7440); 227-230, 2013. 査読有 DOI: 10.1038/nature11926.
- Li, W., Kohara, H., Uchida, Y., James, J.M., Soneji, K., Cronshaw, D.G., Zou, Y.R., Nagasawa, T., and *Mukouyama, Y.S. Peripheral nerve-derived CXCL12 and VEGF-A regulate the patterning of arterial vessel branching in developing limb skin. *Dev. Cell* 24(4); 359-371, 2013. 査読有 DOI: 10.1016/j.devcel.2013.01.009.
- *Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Takashima, S., Takehashi, M., Ogonuki, N., Morimoto, H., Nagasawa, T., Ogura, A., and Shinohara, T. Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture. *Cell Stem Cell* 11; 567-578, 2012. 査読有 DOI: 10.1016/j.stem.2012.06.011.
- Sasaki, I., Hoshino, K., Sugiyama, T., Yamazaki, C., Yano, T., Iizuka, A., Hemmi, H., Tanaka, T., Saito, M., Sugiyama, M., Fukuda, Y., Ohta, T., Sato, K., Aina, A., Suzuki, T., Hasegawa, H., Toyama-Sorimachi, N., Kohara, H., Nagasawa, T., and Kaisho, T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development *Blood* 120; 4733-4743, 2012. 査読有 DOI: 10.1182/blood-2012-06-436527.
- Nishiyama, C., Uesaka, T., Manabe, T., Yonekura, Y., Nagasawa, T., Newgreen, D.F., Young, H.M., and *Enomoto, H. Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. *Nat. Neurosci.* 15(9); 1211-1218, 2012. 査読有 DOI: 10.1038/nn.3184.
- Sudo, T., *Yokota, T., Oritani, K., Satoh, Y., Sugiyama, T., Ishida, T., Shibayama, H., Ezoe, S., Fujita, N., Tanaka, H., Maeda, T., Nagasawa, T., and Kanakura, Y. The Endothelial Antigen ESAM Monitors Hematopoietic Stem Cell Status between Quiescence and Self-Renewal. *J. Immunol.* 189(1); 200-210, 2012. 査読有 DOI: 10.4049/jimmunol.1200056.
- Umemoto, E., Otani, K., Ikeno, T., Verjan Garcia, N., Hayasaka, H., Bai, Z., Jang, M.H., Tanaka, T., Nagasawa, T., Ueda, K., and *Miyasaka, M. Constitutive Plasmacytoid Dendritic Cell Migration to the Splenic White Pulp Is Cooperatively Regulated by CCR7- and CXCR4-Mediated Signaling. *J. Immunol.* 189(1); 191-199, 2012. 査読有 DOI: 10.4049/jimmunol.1200802.
- Nakamura-Ishizu, A., Okuno, Y., Omatsu, Y., Okabe, K., Morimoto, J., Uede, T., Nagasawa, T., *Suda, T., and *Kubota, Y. Extracellular matrix protein tenascin-C is required in the bone marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration. *Blood* 119(23); 5429-5437, 2012. 査読有 DOI: 10.1182/blood-2011-11-393645.
- Sugiyama, T., and *Nagasawa, T. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 11(3); 201-206,2012. 査読有 DOI: 2174/187152812800392689

(学会発表)(計27件)

- 長澤 丘司 第45回日本免疫学会学術集会 "Lympho-hematopoiesis" (2016.12.7 ラグナガーデンホテル 宜野湾市, 沖縄県)
- 長澤 丘司 第34回日本骨代謝学会学術集会 "骨髄の造血幹細胞ニッチを構成する脂肪・骨芽細胞前駆細胞" (2016.7.21 大阪府立国際会議場, 大阪)

市大阪府)
3) Nagasawa, T.
International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2016 Annual Meeting
"The microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in the bone marrow"
(2016.6.23 San Francisco California, USA)
4) 長澤 丘司
第68回日本細胞生物学会
"造血幹細胞・免疫担当細胞を維持する骨髄の微小環境(ニッチ)"
(2016.6.16 京都テルサ, 京都市, 京都府)
5) 長澤 丘司
第64回日本輸血細胞治療学会
"造血幹細胞・前駆細胞を維持する骨髄の微小環境(ニッチ)"
(2016.4.30 国立京都国際会館, 京都市, 京都府)
6) Nagasawa, T.
The 77th Annual meeting of the Japan society of Hematology.
"The microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow"
(2015.10.17 金沢市アートホール, 金沢市, 石川県)
7) Nagasawa, T.
44th Annual Scientific Meeting of the ISEH-International Society for Experimental Hematology.
"The microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow"
(2015.9.17 国立京都国際会館, 京都市, 京都府)
8) 長澤 丘司
ERATO高柳オステオネットワークプロジェクト成果発表会 特別講演
"造血幹細胞・前駆細胞を維持する骨髄の微小環境(ニッチ)"
(2015.3.6 東京大学医学部講堂, 文京区, 東京)
9) Nagasawa, T.
第43回日本免疫学会学術集会 シンポジウム
microenvironments for stem and immune cells.
"The microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow"
(2014.12.11 国立京都国際会館, 京都市, 京都府)
10) 長澤 丘司
2014年度武田科学振興財団研究助成金奨励金贈呈式 記念講演
"造血幹細胞と血液・免疫細胞の産生を調節する微小環境(ニッチ)の解明"
(2014.11.12 シェラトン都ホテル東京, 港区, 東京都)
11) Nagasawa, T.
The 24th Hot Spring Harbor International Symposium
"The microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow"
(2014.11.7 九州大学, 福岡市, 福岡県)
12) Nagasawa, T.
Stowers Institute for Medical Research, Wednesday Lectures.
"The microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow"
(2014.9.17 Kansas, USA)
13) Nagasawa, T., Omatu, Y., and Sugiyama, T.
Cold Spring Harbor Conferences in Health and Diseases.
"The microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow"
(2014.9.4 Suzhou, China)
14) Nagasawa, T.
第35回 日本炎症・再生医学学会 JSIR-JCO joint Symposium
"The microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow"
(2014.7.3 万国津梁館, 名護市, 沖縄)
15) 長澤 丘司
第13回日本再生医療学会総会 特別講演
"ケモカインと造血幹細胞ニッチ"
(2014.3.4 国立京都国際会館, 京都市, 京都府)
16) Nagasawa, T., Omatu, Y., and Sugiyama, T.
第42回日本免疫学会学術集会 シンポジウム Osteoimmunology
"The microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow"
(2013.12.13 幕張メッセ, 千葉市, 千葉県)
17) Nagasawa, T.
Swiss-Kyoto Symposium.
"Microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow"
(2013.11.22 Zurich, Switzerland)
18) Nagasawa, T.
International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Symposium: Stem cell niche and cell therapy. "The Adipo-osteogenic progenitor CXCL12-abundant reticular (CAR) cells function as niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow"
(2013.10.9 Seoul, Korea)
19) 長澤 丘司
第23回日本サイトメトリー学会 学術集会 シンポジウム4
"骨髄の造血幹細胞・前駆細胞ニッチ"
(2013.6.22 日本医科大学, 文京区, 東京)
20) Nagasawa, T.
The 6th International workshop of Kyoto T cell conference.
"The adipo-osteogenic progenitors function as niches for hematopoietic stem and progenitor cells in the marrow"
(2013.6.7 京都大学, 京都市, 京都府)
21) Nagasawa, T.
YM-Kyoto Symposia.
"Microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow-The adipo-osteogenic progenitors, CXCL12-abundant reticular (CAR) cells-"
(2013.4.5 Taipei, Taiwan)
22) 長澤 丘司
第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム 骨髄幹細胞ニッチと神経-免疫-内分泌クロストーク
"骨髄の造血幹細胞ニッチと脂肪・骨前駆細胞CAR細胞"
(2013.3.28 サポートホール高松・かがわ国際会議場, 高松市, 香川県)
23) Nagasawa, T.
第41回日本免疫学会学術集会 シンポジウム
"The adipo-osteogenic progenitors with long processes function as niches for hematopoietic stem and progenitor cells"
(2012.12.5 神戸国際会議場, 神戸市, 兵庫県)
24) 長澤 丘司
第41回日本免疫学会学術集会 レビュートーク
"免疫担当細胞の産生と造血幹細胞・前駆細胞ニッチ"
(2012.12.5 神戸国際会議場, 神戸市, 兵庫県)
25) Nagasawa, T.
The 9th Nikko International Symposium 2012, Understanding complex network systems in disease biology.
"Adipo-osteogenic progenitors function as niches for hematopoietic stem and progenitor cells in the marrow"
(2012.10.12 Jich Medical University, Shimotsuke, Tochigi)
26) 長澤 丘司
第30回日本骨代謝学会学術集会 カレントコンセプト1 骨髄とがん細胞
"骨髄の脂肪・骨前駆細胞CAR細胞と造血幹細胞ニッチ"
(2012.7.19 京王プラザホテル, 新宿区, 東京)
27) 長澤 丘司
第33回日本炎症・再生医学学会 シンポジウム 炎症と骨・骨髄
"骨髄の造血幹細胞・造血ニッチ"
(2012.7.5 ホテル日航福岡, 福岡市, 福岡県)

【図書】(計7件)

1) 長澤 丘司, 尾松 芳樹, 杉山 立樹
実験医学 Vol. 32 No 16; 総ページ (2543-2550), 2014. (羊土社)
2) 長澤 丘司
実験医学 Vol. 32 No 16; 総ページ (2540-2542), 2014. (羊土社)
3) 長澤 丘司
腎と透析 Vol. 75; 総ページ(807-815), 2013. (東京医学社)
4) 長澤 丘司
The Bone Vol. 27; 総ページ(41-47), 2013. (メディカルレビュー社)
5) 長澤 丘司
癌と骨 松本 俊夫, 米田 俊之編; 総ページ (59-67), 2013. (メディカルレビュー社)
6) 長澤 丘司
血液フロンティア Vol.23; 総ページ(41-49), 2013. (医学ジャーナル社)
7) 長澤 丘司
医学のあゆみ「骨免疫学」(別冊); 総ページ (67-73), 2013. (医歯薬出版)

Meetings

第1回班会議

日時 平成24年11月16日(金)～17日(土)
場所 六甲山ホテル

11月16日(金)

13:00 開会の辞: 高浜洋介

A01研究代表者 座長: 長澤丘司

13:15-13:45 高田慎治 (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター)

13:45-14:15 長澤丘司 (京都大学再生医科学研究所)

14:15-14:45 高浜洋介 (徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター)

14:45-15:15 宮坂昌之 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

休憩(コーヒー)

A02-03研究代表者 座長: 福井宣規

15:45-16:15 高木淳一 (大阪大学蛋白質研究所)

16:15-16:45 福井宣規 (九州大学生体防御医学研究所)

16:45-17:15 湊 長博 (京都大学大学院医学研究科)

17:15-17:45 渡邊 武 (京都大学大学院医学研究科)

休憩(コーヒー)

支援班研究者 座長: 高木淳一

18:00-18:20 石井 優 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

18:20-18:40 石川文彦 (理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター)

18:40-19:00 中村真人 (富山大学大学院理工学研究所)

19:00 懇談会

11月17日(土)

研究分担者 座長: 渡邊 武

10:00-10:15 大久保直 (北里大学医学部)

10:15-10:30 梅本英司 (大阪大学医学系研究科)

10:30-10:45 片貝智哉 (関西医科大学医学部)

10:45-11:00 戸村道夫 (京都大学大学院医学研究科)

休憩(コーヒー)

総括班研究者 座長: 湊 長博

11:15-11:45 河本 宏 (京都大学再生医科学研究所)

総括班会議

12:00-13:00 第2回総括班会議

13:00- 自由討論



胸腺微小環境の機能解明と構築

(平成24年度～平成28年度) Development and function of thymic microenvironments

領域代表 高濱 洋介 徳島大学先端酵素学研究所

研究開始当初の背景

胸腺は、獲得免疫システムの司令塔として自己と非自己の識別を担うTリンパ球を分化させるとともに、産生するTリンパ球の抗原認識特異性が自己生体に有用でしかも寛容であるように選択する免疫器官である。Tリンパ球の分化と選択を担う胸腺微小環境は主に皮質と髄質から構成されるが、それぞれを特徴づける皮質上皮細胞と髄質上皮細胞の分化と機能、またそれらを裏打ちする分子機構は明確ではない。私たちは、皮質上皮細胞に特異的に発現され、CD8陽性キラーT細胞の正の選択に必要な胸腺プロテアソームとその構成鎖beta5tを同定するとともに、髄質上皮細胞に高く発現されT細胞の自己寛容確立に必須のケモカインCCL21とサイトカイン受容体RANKを見出し、胸腺微小環境の機能を担う分子機構の解析に先鞭をつけてきた。そこで本研究では、これらの分子群をてがかりに胸腺微小環境の機能を特徴づける分子の同定と機能の研究を推進することを目的とした。

研究の目的

胸腺微小環境の機能解明と構築を目指した研究を進めるため、まず、皮質上皮細胞に特異的に発現される胸腺プロテアソームに依存する正の選択を担う分子機構解析を進め、負の選択に比較して十分に理解されていない「正の選択とは何か」に解を与えることを目的とした。また、すでに作製を進めているbeta5t-CreノックインマウスやCCL21a-Tomatoノックインマウスなど新規のレポーター動物を用いることで従来まったく明らかにされていない皮質上皮細胞と髄質上皮細胞の系譜分岐機構の理解を進めることを目的とした。更に、髄質上皮細胞のもつ自己寛容誘導能に注目し、その機能を体内で構築する技術の開発をめざした。

研究の方法

胸腺上皮細胞亜集団を含む胸腺ストローマ細胞集団を定量的かつ定性的に再現性高く分離精製する手法の確立を行った。また、それによって精製した胸腺上皮細胞亜集団を対象にした遺伝子発現解析を実施した。また、ノックアウトマウスやノックインマウスの作製と解析を進めることで、胸腺微小環境の機能解明と構築を目指した研究を実施した。

研究成果

- 胸腺ナース細胞がbeta5t発現皮質上皮細胞の亜集団であり、幼若Tリンパ球の抗原受容体alpha鎖遺伝子の二次的再構成を支持することで、正の選択を至適化する細胞であることを明らかにした。(Proc Natl Acad Sci USA. 2012)
- 髄質上皮細胞がAire発現とCCL21発現を指標に少なくとも4つの異なる亜集団によって構成される多様性を有することを明らかにした。(J Immunol. 2013)
- beta5t遺伝子座にCreをノックインしたマウスを作製しEGFPレポーターマウスと交配して解析することにより、髄質上皮細胞は皮質上皮細胞の固有機能を特徴づけるbeta5tを発現する前駆細胞に由来することを明らかにした。(Proc Natl Acad Sci USA. 2013)
- 胸腺皮質上皮細胞に発現されるbeta5t含有胸腺プロテアソームは、MHC会合ペプチドの構造を特徴づけ、TCRと相互作用する親和性を規定することで正の選択を担うことを明らかにした。(Nature Commun. 2015)
- beta5t欠損RAG1欠損TCRトランスジェニックマウスを作製しモノクローナルT細胞の分化と機能の解析を完遂することで、胸腺上皮細胞依存性の正の選択とは、T細胞の抗原特異性レパトアを選択するだけでなく、T細胞の機能を至適化させる「教育」プロセスでもあることを明らかにした。胸腺における「正の選択」とは何かに関する全く新しいコンセプトを提示した。(Nature Immunol. 2015)
- beta5t遺伝子座にrtTAをノックインしたマウスをtetO-Cre依存的EGFPレポーターマウスと交配して時期限定doxycycline投与によるEGFP発現細胞を解析することで、成体期の髄質上皮細胞は形成・維持・再生のいずれの局面においても、胎生期から新生仔期までのbeta5t発現皮質髄質共通前駆細胞に由来すること、成体期のbeta5t発現皮質髄質共通前駆細胞は髄質上皮細胞の生成・維持・退縮からの回復に殆ど寄与しないことを明らかにした。退縮胸腺の回復技術の開発を図るうえで重要で有用な知見が得られた。(Cell Rep. 2015)
- beta5tの遺伝子発現制御機構に関して、beta5t発現が転写因子Foxn1の欠損マウスで著明に減少することから、beta5t遺伝子座近傍に存在するFoxn1結合配列を同

定した。そのうえで、当該配列を変異させたマウスを作製して形質解析を行うことで、当該配列へのFoxn1結合が実際にbeta5tの至適発現に必須であることを見いだした。転写因子Foxn1による胸腺上皮細胞機能の直接的な制御機構が初めて明らかにされ、胸腺上皮細胞の機能分子beta5tの転写制御機構の一端が初めて示された。(Nature Commun. 2017)

- CCR7ケモカインの一分子種CCL21Serを特異的に欠損するマウスを作製することで、CCL21Serが胸腺上皮細胞による胸腺細胞の誘引と自己寛容確立に必要な不可欠なケモカインであることを明らかにした。(J Exp Med. 2017)

まとめ

本研究では、胸腺微小環境を特徴づける胸腺上皮細胞亜集団の分化と機能に関与する分子の同定と機能解析を進め、Tリンパ球の産生と有用性確立を担う胸腺皮質上皮細胞と自己寛容確立に必須の微小環境を提供する胸腺髄質上皮細胞の共通前駆細胞を同定し、転写因子Foxn1の直接制御にてbeta5tを発現する皮質上皮細胞様分子発現細胞であることを明らかにした。また、成体期の髄質上皮細胞の維持には成体期でなく新生仔期のbeta5t発現前駆細胞が寄与することを見出した。更に、皮質上皮細胞依存性のTリンパ球選別過程「正の選択」がTリンパ球の抗原応答性を調整する分化制御過程でもあること、ケモカイン分子種CCL21Serを産生する髄質上皮細胞亜集団がTリンパ球の自己寛容確立に不可欠であることを明らかにした。

主な発表論文等

(雑誌論文)(計26件)

- Kozai M, Kubo Y, Katakai T, Kondo H, Kiyonari H, Schaeuble K, Luther SA, Ishimaru N, Ohigashi I, *Takahama Y. [*corresponding author] Essential role of CCL21 in establishment of central self-tolerance in T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 査読有 214, 1925-1935, 2017 DOI: 10.1084/jem.20161864
- *Takahama Y, Ohigashi I, Baik S, Anderson G. [*corresponding author] Generation of diversity in thymic epithelial cells. *Nature Reviews Immunology*. 査読有 17, 295-305, 2017 DOI: 10.1038/nri.2017.12
- Uddin MM, Ohigashi I, Motosugi R, Nakayama T, Sakata M, Hamazaki J, Nishito Y, Rode I, Tanaka K, Takemoto T, Murata S, *Takahama Y. [*corresponding author] Foxn1-beta5t transcriptional axis controls CD8+ T cell production in the thymus. *Nature Communications*. 査読有 8, 14419, 2017 DOI: 10.1038/ncomms14419
- Ohigashi I, Zuklys S, Sakata M, Mayer CE, Hamazaki Y, Minato N, Hollander GA, *Takahama Y. [*corresponding author] Adult thymic medullary epithelium is maintained and regenerated by lineage-restricted cells rather than bipotent progenitors. *Cell Reports*. 査読有 13, 1432-1443, 2015 DOI: 10.1016/j.celrep.2015.10.012
- Takada K, Van Laethem F, Xing Y, Akane K, Suzuki H, Murata S, Tanaka K, Jameson SC, Singer A, *Takahama Y. [*corresponding author] TCR affinity for thymoproteasome-dependent positively selecting peptides conditions antigen responsiveness in CD8+ T cells. *Nature Immunology*. 査読有 16, 1069-1076, 2015 DOI: 10.1038/ni.3237
- Sasaki K, Takada K, Ohte Y, Kondo H, Sorimachi H, Tanaka K, *Takahama Y, *Murata S. [co-corresponding authors] Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8+ T cells. *Nature Communications*. 査読有 6, 7484, 2015 DOI: 10.1038/ncomms8484
- Ohigashi I, Zuklys S, Sakata M, Mayer CE, Zharybekova S, Murata S, Tanaka K, Hollander GA, *Takahama Y. [*corresponding author] Aire-expressing thymic medullary epithelial cells originate from beta5t-expressing progenitor cells. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 査読有 110, 9885-9890, 2013 DOI: 10.1073/pnas.1301799110
- Lkhagvasuren E, Sakata M, Ohigashi I, *Takahama Y. [*corresponding author] Lymphotoxin beta receptor regulates the development of postnatal medullary thymic epithelial cells. *Journal of Immunology*. 査読有 190, 5110-5117, 2013 DOI: 10.4049/jimmunol.1203203
- Nakagawa Y, Ohigashi I, Nitta T, Sakata M, Tanaka K, Murata S, Kanagawa O, *Takahama Y. [*corresponding author] Thymic nurse cells provide microenvironment for secondary TCR α rearrangement in cortical thymocytes. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 査読有 109, 20572-20577, 2012 DOI: 10.1073/pnas.1213069109

(学会発表)(計88件)

- Takahama Y. How the thymic medulla attracts thymocytes for the establishment of self-tolerance. 2016 NCI Thymus Symposium (国際学会) 2016年12月9日 National Institutes of Health(ア

- リカ)[招待講演] 2016年10月8日 National Institutes of Health(アメリカ)[招待講演]
- Takahama Y. T-cell development and selection. 13th FIMSA Advanced Immunology Course(国際学会) 2016年3月18日 Chandigarh(インド)[招待講演]
- Takahama Y. Thymus-dependent positive selection of T cells. NCI Symposium on Frontiers in Basic Immunology(国際学会) 2015年10月8日 National Institutes of Health(アメリカ)[招待講演]
- Takahama Y. Thymus epithelium conditions antigen responsiveness in CD8+ T cells. Venice Thymus Conference(国際学会) 2015年4月10日 San Servolo Island (イタリア)[招待講演]
- Takahama Y. mTECs derived from embryonic and postnatal beta5t+ progenitors. ThymOz VII International Workshop on T Lymphocytes(国際学会) 2014年4月3日 Heron Island (オーストラリア)[招待講演]
- Takahama Y. The thymic microenvironments that shape T cell repertoire. 15th International Congress of Immunology(国際学会) 2013年8月24日 Milano(イタリア)[招待講演]
- Takahama Y. Attacking the endocrine system: what is Aire doing? Society for Endocrinology BES 2013(国際学会) 2013年3月20日 Harrogate (イギリス)[招待講演]
- Takahama Y. Aire+ thymic medullary epithelial cells originate from beta 5t+ progenitor cells. ThymUS International Conference 2012(国際学会) 2012年11月4日 Florida(アメリカ)[招待講演]

(図書)(計3件)

- Watanabe T, Takahama Y. Synthetic Immunology. 書籍編集 200ページ Springer 2016 ISBN: 9784431560272
- Ohigashi I, Takahama Y. Thymocyte-mTEC cross talk for self-tolerance in T cells. Encyclopedia of Immunobiology. 1st Edition. 章執筆5ページ Elsevir 2016 ISBN: 9780123742797

- Kasai M, Nakagawa Y, Kondo K, Takahama Y. Thymus. Reference Module in Biomedical Sciences. 3rd Edition. 章執筆9ページ Elsevir 2014 ISBN: 9780128012383

(その他)

- 報道
- 徳島新聞「自己免疫疾患 治療法に光」2015年12月4日
- 毎日新聞「胸腺の酵素、免疫への関与解明」2015年10月6日
- 徳島新聞「がん殺すキラーT細胞、胸腺の酵素で威力増大」2015年9月3日
- 毎日新聞「免疫機能に酵素が関与、謎解明に道」2015年8月29日
- NHKニュース(徳島放送局)「免疫系細胞作られる仕組み一部解明」2015年8月26日
- 徳島新聞「99%の失敗も、難病解明の道」2014年7月20日
- 徳島新聞「病気の予防の免疫システム解明へ」2012年7月26日

- 科学コミュニケーション活動
- 知の拠点セミナー「生体防御のかなめ「胸腺」の形成と機能」2016年9月17日(京都大学・東京オフィス)
- 免疫ふしぎ未来2014 2014年8月10日(日本科学未来館)
- BSフジ テレビ番組 ガリレオX「日本分子生物学会2050年シンポジウム」2014年1月12日
- 免疫ふしぎ未来2013 2013年8月11日(日本科学未来館)
- 第35回日本分子生物学会年会フォーラム「いかに惹きつけ納得させるか? 研究領域スーパープレゼン」2012年12月12日(福岡国際会議場)
- 免疫ふしぎ未来2012 2012年8月19日(日本科学未来館)

- ウェブサイト
- 免疫四次元空間ダイナミクス」http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/ion/index.html
- 「徳島大学 高浜胸腺研究室」http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dei/



研究代表者

TAKAHAMA, Yousuke

徳島大学・先端酵素学研究所・教授

20183858

二次リンパ組織ストローマ細胞の性状と機能

(平成24年度～平成28年度) Characteristics and functions of stromal cells in secondary lymphoid tissues

宮坂 昌之 大阪大学・その他部局等

研究開始当初の背景

(1) これまで免疫系に関して行われてきた研究では、白血球を主体とした免疫細胞に対する分子レベル、遺伝子レベルな解析に大きな力点が置かれてきた。しかし、最近の研究結果から、免疫細胞の機能は、免疫組織を構築するストローマ細胞(線維芽細胞、細網細胞、内皮細胞、血管外膜細胞など)によりダイナミックな制御を受けていることが明らかになり、これらのストローマ細胞の理解無しには免疫系の本質的な理解は困難であることが明らかになってきた。

(2) 本申請の研究代表者である宮坂と研究分担者の片貝は、免疫細胞とストローマ細胞の相互作用の解析においてこれまでの独創的な研究成果により、国際的に高い評価を受けている。本研究では、宮坂はリンパ節への免疫細胞動員を制御するストローマ細胞の同定とその機能解明を試みる。片貝はリンパ節ストローマ細胞の多様性とその動態について分子レベルで解明することを試みる。

研究の目的

免疫系の根源的な理解には、これまで行われてきた免疫細胞を対象とした研究のみならず、免疫組織(リンパ器官)を主とする「免疫の場」とそれらのネットワークからなる「免疫空間」に関する分子レベルでの理解が重要であり、その四次元的ダイナミクスを明らかにすることが必須である。本研究では、この「免疫の場」を分子レベル、遺伝子レベルで理解できるようにするために、免疫組織という「場」を構築するストローマ細胞の多様性とその機能を時空間的に明らかにすることを目的とする。

研究の方法

(1) 研究代表者である宮坂は、研究分担者の梅本、早坂とともに、リンパ節へのリンパ行性の免疫細胞の入り口であるリンパ節被膜を構成するストローマ細胞の機能、特に免疫細胞動員を制御する機能について分子レベルで明らかにすることを試みる。また、予備的解析により明らかになってきたリゾリン脂質産生ストローマ細胞と免疫細胞(樹状細胞と活性化T細胞)の相互作用に主眼を置き、リ

ゾリン脂質を介した新たな免疫細胞動員機構を明らかにするとともに、ライブイメージングを用いてその時空間的なダイナミズムについても明らかにすることを試みる。

(2) 研究分担者の片貝は、リンパ節ストローマ細胞を単離して、その発現分子の解析から、これらの細胞の多様性、機能、動態について総合的に明らかにすることを試みる。

研究成果

(1) 研究代表者の宮坂は、分担研究者の梅本、早坂とともに、リゾリン脂質LPA(lysophosphatidic acid)産生酵素であるautotaxinがリンパ節の高内皮細静脈(HEV)内皮細胞により多量に産生されることを見出した。そして、autotaxinはHEV周囲で体液中のリゾリン脂質LPC(lysophosphatidyl-choline)をLPAに変換し、そのLPAがHEV内皮細胞にオートクラインの働いて、HEV内皮細胞の運動性を亢進させ、その結果、血中のリンパ球がHEV内皮細胞間隙からリンパ節実質へと移行することを明らかにした(*J. Immunol.* 2013)。しかし、この時点では関与するLPA受容体の詳細は不明であった。

(2) 研究分担者の片貝は、上述のautotaxinがリンパ節のT細胞領域に存在するCCL21+ストローマ細胞によっても産生され、LPA受容体阻害剤を用いることにより、LPAがCCL21と共同してT細胞のRhoA活性を亢進させ、ROCK-myosin II依存性にT細胞の動態を制御することを示唆した(*J. Immunol.* 2014)。しかし、この時点ではLPAの局所産生は示されず、関与するLPA受容体の詳細も不明だった。

(3) その後、研究代表者の宮坂、研究分担者の梅本、早坂は、フィンランドTurku大学の竹田彰博士と共同で、リンパ節T細胞領域のリンパ節線維芽様細網細胞(fibroblastic reticular cell; FRC)が産生するautotaxinが体液中のLPCに働いて局所的にLPAを産生することをimaging mass spectrometryにより世界に先駆けて可視化した(慶応大学の杉浦悠毅、末松誠博士との共同;*eLife* 2016)。さらに、産生されたLPAがリンパ球上のLPA受容体LPA2に働いてRho-ROCK-myosin II依存的にリンパ節内の隘路におけるTリンパ球移動を正に制御

することを明らかにした(*eLife*, 2016)。(4) 研究代表者の宮坂、研究分担者の梅本は、フィンランドTurku大学のSirpa Jalkanen, Marko Salmi両博士と共同で、リンパ節被膜下洞からリンパ節実質に続く物質通過路conduitの入口がリンパ管内皮細胞層に開口するPV-1陽性のcaveolaであり、PV-1分子がcaveolaの口径を制御することを世界で初めて明らかにした(*Nat. Immunol.*, 2015)。リンパ節のconduitはその周囲は線維芽細網細胞で包まれ、これまで一定サイズ以下の物質のみを通過させることが知られていたが、その選択輸送性の分子機構は不明であった。今回の研究により、conduitは複数種のストローマ細胞により形成され、その機能はリンパ管内皮細胞というストローマ細胞の一種の細胞膜上に発現するPV-1という分子によって規定されることが明らかになった。

(5) 研究代表者の宮坂と分担研究者の梅本、早坂は、HEV周囲で産生されたLPAはLPA4, LPA6という2種類のLPA受容体を介してHEV内皮細胞に選択的に働き、内皮細胞の運動性を亢進させることにより、内皮細胞層のリンパ球通過を促進することを明らかにした(*Int. Immunol.* 2016)。

(6) 研究代表者の宮坂は、分担研究者の梅本、早坂とともに、リンパ節内のT細胞領域には、これまでDAMP (danger-associated molecular pattern)で催炎症性と考えられていたATP (adenosine triphosphate)が、恒常的に細胞間隙に発現していることを明らかにした。ATPの存在はT細胞トラフィッキングおよび樹状細胞に依存的であり、この領域にT細胞あるいは樹状細胞が居ないとその発現はきわめて低下する。ATPは樹状細胞に働いてその遊走性を亢進する働きを持つことから、T細胞領域に恒常的に発現することにより、免疫反応を起こしやすくするnatural adjuvantとしての機能があることが推測される(投稿準備中)。

(7) 研究分担者の早坂は、研究代表者の宮坂と共同して、CCL21ケモカインが誘導する細胞遊走の調節に、レセプターであるCCR7のhomo重合化と別のケモカインレセプターであるCXCR4とCCR7のhetero重合化が関与することを明らかにした。CCR7のhomo重合体は、リガンド結合とともに細胞内へのシグナル伝達を促進することから、機能的に重要な過渡的複合体であることが明らかになった(*Sci. Rep.* 2017)。

(8) 研究分担者の片貝は、理研の齋藤隆博士らと共同で、class I-restricted T cell-associated molecule (CRTAM)という分子を発現するT細胞が腸管に移動してCD4+細胞傷害性細胞(CTL)として機能することを示した(*J Exp Med*, 2016)。

(9) 研究分担者の片貝は、計画研究班員の高濱との共同研究により、CCL21aがT細胞の胸腺選択や二次リンパ組織へのホーミング・局在に非冗長的な役割を担っていることを明らかにした(*J Exp Med*, 2017)。

(10)研究分担者の片貝は、計画研究班員の長澤および高濱との共同研究により、種々の分子マーカーや発現レポーターマウスシステムを用いて、リンパ節内において組織区画を規定する性質の異なるストローマ細胞が少なくとも6種類存在することを明らかにした。また、リン

パ節の髄質領域近傍においてこれまで知られていなかった組織構造と新規ストローマ細胞サブセットを発見して、その機能的な特徴を明らかにした。特に、髄索のストローマ細胞はleptin受容体を高発現する特徴的な細胞であることを明らかにした(投稿中)。

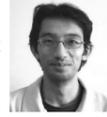
研究組織

研究分担者

片貝 智哉(Katakai, Tomoya)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号:00324682



梅本 英司(Umemoto, Eiji)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号:90452440



of functional CCR7. *PLOS One* 10:e0117454, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0117454. 査読有り. 被引用回数: 5.

4) Rantakari, P, Auvinen, K, Jäppinen, N., Kapraali, M., Valtonen, J., Karikoski, M., Gerke, H., Iftakhar-E-Khuda, I., Keuschnigg, J., Umemoto, E., Tohya, K., Miyasaka, M., Elimä, K., Jalkanen, S. & *Salmi, M. The endothelial protein Pivap in lymphatics controls the entry of lymphocytes and antigens into lymph nodes. *Nat. Immunol.* 16:386-396, 2015. DOI: 10.1038/nri.3101. 査読有り. 被引用回数: 31.

5) *Bai, Z., *Cai, L., **Umemoto, E., *Takeda, A., Tohya, K., Komai, Y., Veeraveedu, P.T., Hata, E., Sugiura, Y., Kubo, A., Suematsu, M., Hayasaka, H., Okudaira, S., Aoki, J., Tanaka, T., Albers, H.M.H.G., Ovaa, H. & *Miyasaka, M. (*equal contribution, **equal correspondence) Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the ATX/LPA axis. *J. Immunol.* 190:2036-2048, 2013. DOI: 10.4049/jimmunol.1202025. 査読有り. 被引用回数: 45.

(学会発表)(計60件)

1) Takeda, A. & Miyasaka, M. Thymocytes in Lyve1-CRE/S1pr1^{fl} mice accumulate in the thymus due to cell-intrinsic loss of sphingosine-1-phosphate receptor expression. 7th

International Workshop of Kyoto T Cell Conference (KTCC2017). Oral presentation. Mar. 13-17, 2017. Shiran Kaikan, Kyoto University, Kyoto.

2) Miyasaka, M. Emerging approaches in leukocyte trafficking. The Scandinavian Society for Immunology 2016 Summer School "Recent breakthroughs in immunology - emerging new concepts, approaches and methods". Invited talk. May 10, 2016. Turku, Finland.

3) Miyasaka, M. A locally generated motogenic lysophospholipid, LPA, regulates trans-HEV and also interstitial migration of lymphocytes in lymph nodes. Ringberg Symposium, Molecular Mechanisms in Leukocyte Traffic. Invited talk. Sep.13-17, 2015. Tegernsee, Germany.

4) Miyasaka, M. The autotaxn/LPA axis is a novel regulator of lymphocyte extravasation at high endothelial venules. Invited talk. Biomedicum Helsinki Lecture. Oct. 29, 2014. Helsinki, Finland.

5) Miyasaka, M. The autotaxin/lysophospholipid axis regulates constitutive lymphocyte transmigration across high endothelial venules in lymph nodes. Invited talk. Seminar at Karolinska Institute. Sep. 8, 2014. Stockholm, Sweden.

(図書)(計3件)

1) Miyasaka, M., Takeda, A., Hata, E., Sasaki, N., Umemoto, E. & Jalkanen,

S. The role of lysophospholipids in immune cell trafficking and inflammation. In: Chronic Inflammation: Mechanisms and Regulation. Editors: Miyasaka, M. & Takatsu, K. Chapter 35, Springer Japan, 1st ed.:459-471, 2016. 総ページ数: 702

2) Miyasaka, M., Hata, E., Tohya, K. & Hayasaka, H. Lymphocyte recirculation. In: Encyclopedia of Immunobiology. Editors: Michael Ratcliffe et al. Chapter 7: Anatomy and Microanatomy of Immune Tissues, Elsevier. Vol. 3:486-492, 2016. 総ページ数: 3126

3) Miyasaka, M., Takeda, A., Hata, E., Sasaki, N. & Umemoto, E. S1P and LPA: Regulators of immune cell egress and ingress in lymphoid tissues. In: Encyclopedia of Immunobiology. Editors: Michael Ratcliffe et al. Chapter 7: Anatomy and Microanatomy of Immune Tissues, Elsevier. Vol. 3:533-536, 2016. 総ページ数: 3126

(その他)

メディア報道:
産経新聞web版「世界初!リンパ球が狭いリンパ節(峯)でスムーズに動くしくみを解明」
-免疫細胞のバトロール機構には脂質が重要-
http://www.sankei.com/west/print/160130/wst1601300008-c.html
「本研究成果は、英国の生命科学雑誌「eLife」誌電子版に2016年2月2日に公開された。」

研究代表者

MIYASAKA, Masayuki

大阪大学・その他部局等・名誉教授

50064613



早坂 晴子(Hayasaka, Haruko)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号:70379246



研究協力者

竹田 彰(Takeda, Akira)

フィンランド・Turku大学・博士研究員

Sirpa Jalkanen

フィンランド・Turku大学・教授

Malko Salmi

フィンランド・Turku大学・教授

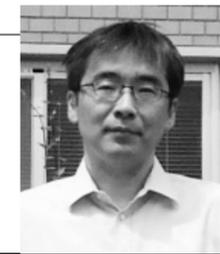
免疫神経インターフェースにおけるシグナル 授受の構造的基盤

(平成24年度～平成28年度) Structural basis for the cell-cell communication at the neuro-immune interface

高木 淳一 大阪大学・蛋白質研究所

研究代表者

TAKAGI, Junichi
大阪大学・蛋白質研究所・教授
90212000



計画研究

研究開始当初の背景

免疫細胞は「旅する細胞」である。しかもその移動は血流にのった受動的なものではなく、運動能を自ら制御しながらとどまるべきところを知り、そこから脱出するタイミングを知り、環境に影響を受けながら同時に影響を与えられ、それぞれの特定の機能を時空間的に正しく発揮することが出来るものである。この能力を保証するのが免疫器官への細胞の繫留と脱離、それに伴うシグナルの授受である。よって、細胞の物理的接着機構と、接着によるシグナル伝達機構の解明は、広く細胞生物学一般の重要課題であると同時に免疫現象のダイナミックな制御を知る上で極めて重要な要件となっている。しかも、動く細胞の挙動を考える上では長期的な遺伝子発現の変化などではなく、細胞が外部環境(ストローマ細胞やマトリックス)に触れたまさにそのときの素反応が重要であるため、分子間相互作用に還元される接着、接触現象を直接に理解する必要がある。構造生物学はそれらの素反応の実体を原子、分子レベルで記述することで、個々の素反応の役割について曖昧さのない基盤を与えるものであり、我々はこれまでそのような考えに基づいた研究を続けてきた。本新学術領域において免疫学研究者と緊密な連携をとる機会に恵まれたことで、構造生物学と高次免疫現象研究の融合研究をすすめる条件が整った。

研究の目的

免疫応答とは免疫細胞が免疫器官という「場」あるいは「コンテキスト」を理解して自らの挙動を変えていくプロセスであり、両者の出会いインターフェースで起こるダイナミックな反応がその後のネットワーク形成・制御を左右する。本提案の新学術領域では、血球系細胞という「移動する細胞」が、全身に配置されたストローマ細胞や細胞外マトリックスを主成分とするリンパ器官をめぐりながら旅をすることで精緻な免疫システムを構築していることに注目し、その全体像にせまべく分子レベルから個体レベルまでの様々な研究を重層的に行う計画を立案した。そのうち本課題では、構造生物学的手法を用いて、細胞が免疫器官との間で直接的な接着を介してシグナルを授受するメカニズムを明らかにする研究を担当する。本研究領域のカバーする幅広い研究スペクトラムの中でも最も下層原理に近い、原子・分子分解能の三次元立体構造について曖昧

さのない情報を得ることによって、他の計画研究によって明らかにされる高次の免疫現象に分子基盤を与え、さらにはシステムの総合的理解に不可欠な個別反応についての検証可能な分子メカニズムを提唱する。

研究の方法

(1) 接着受容体の解析: 代表者はインテグリンをはじめとする細胞接着分子の動的立体構造をX線結晶学および電子顕微鏡イメージングにより解明してきたが、免疫インターフェースで重要な役割を果たす $\beta 1$ インテグリンの立体構造解明に成功した(Nagae et al. *J. Cell Biol.*, 2012)。 $\beta 1$ インテグリンは血液細胞がストローマ細胞上の接着分子やマトリックス成分を認識する際に主要な役割を果たすと考えられているが、多くの研究者の試みにもかかわらずこれまでその原子分解能の立体構造は解明できていなかった。我々が初めて明らかにした構造によって、 $\beta 1$ インテグリンがリガンドを認識する際の特異性と親和性を左右する構造上の特徴が明らかになり、特定の機能を変える様な変異体のデザインが可能になった。また、得られた構造は $\beta 1$ インテグリンの蛋白質部分だけではなく、糖鎖部分がその機能に重要な役割を担っている可能性を示唆し、さらにはこれまで鍵と鍵穴のように考えられてきた分子認識機構に分子の「柔軟さ」という概念を入れることの必要性を提起するものであった。そこで本研究では、(1) X線結晶構造解析という静的な構造情報に加え、(2) 多様な構造アンサンブルを捉えることが可能な単粒子解析と、(3) *in situ* (現場での) 構造情報を得るための細胞・組織電子顕微鏡イメージングを駆使して、インテグリンおよびそれを包含する接着マシナリーのダイナミックな特徴を捉えることをめざした。

(2) シグナリング受容体の解析: セマフォリン(Sema)・プレキシン(Plex)系は免疫系や神経系における細胞移動のkey regulatorである。代表者らは、膜結合型リガンドであるSema6Aと、その受容体PlexA2について、それら単独(つまりシグナル伝達以前)および複合体(すなわちシグナル伝達時)の結晶構造解明に成功し、その構造に基づいてこれまでの常識に反する全く新しいシグナル伝達メカニズムを提唱している(*Nature* 2010)。そ

れは、細胞膜上での単純な受容体のクラスターリングではなく、受容体分子の細胞膜に対する相対的な角度(傾き)が細胞内のGAP活性を制御するという考え方であり、可溶性因子によるシグナルと違ってセマフォリンシグナルが細胞同士の直接接触によって引き起こされることに呼応するのではないかと予想した。しかしこれはまだ仮説の段階であり、その検証のためにはさらなる構造解析と細胞を用いた変異体の解析が必要である。本研究の期間内に、免疫細胞の運動制御により深く関わるセマフォリンサブクラス、およびその受容体に関する原子分解能構造解析をすすめ、さらには細胞上あるいはリソソーム表面に提示した分子を用いて生化学的手法と電子顕微鏡イメージングを駆使してその構造変化メカニズムを明らかにする。

研究成果

【平成24年度】

研究1(インテグリン受容体系): まずは未だに構造情報がまったく無いラミニン結合性 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンについて、 $\alpha 6$ および $\beta 1$ サブユニットのそれぞれN末端領域からなる「頭部フラグメント」を動物細胞発現系を用いて作成した。CHO-lec3.2.8.1細胞を用いて安定発現株を取得し、組み替えフラグメントの大量精製を行った結果、微結晶を得るに至った。ただしこの結晶は構造解析に耐えるものでは無かったため、結晶化シャペロンとしての利用を念頭に、 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリン特異的な結合能をもつ環状ペプチドの探索を行い、7種類のペプチドを単離した。

研究2(セマフォリンシグナル系): セマフォリン・プレキシン系を中心とした細胞間シグナル授受メカニズムの解明に関しては、異なるサブタイプや樹状細胞ナビゲーションに関わる分子群に対して構造解析を行った。具体的には、シグナリング機構の解明において重要であるプレキシンの「ストーク領域」の構造を明らかにするため、ヒトおよびマウスプレキシンA1とA2の細胞外ドメイン蛋白質について、HEK細胞を用いての細胞外領域全長を含む断片を発現する細胞を樹立し、同フラグメントを単離精製して負染色電子顕微鏡イメージングに供した。

【平成25年度】

この年度の途中から、サブテーマとしてインテグリン系とセマフォリン系に加え、(3)神経細胞や

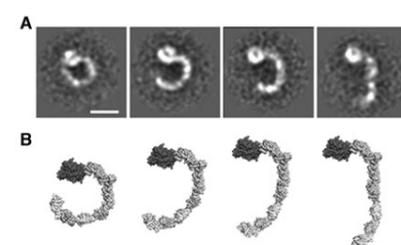


図1 PlexinA1細胞外領域の電顕構造(A)とその構造モデル(B)

ニッチ細胞の恒常性維持に働く蛋白質の構造機能解析も行った。

研究1(インテグリン受容体系): ラミニン結合性 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンについては、結晶化を目指してコンストラクトの改良と、構造安定化のための抗 $\alpha 6$ 抗体フラグメントの作成を行った。また、フィロネクチン受容体である $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンをヒト胎盤から精製する方法を確立し、これを脂質二重膜(ナノディスク)に活性のある状態で組み込み、電子顕微鏡イメージングに供することが出来る品質の試料調製に成功した。

研究2(セマフォリンシグナル系): Sema受容体のPlexinの2つのサブタイプ(A1およびD1)について、その細胞外領域蛋白質を作成して電顕イメージングによりその全体構造の可視化に世界で初めて成功した。両受容体は予想外にもC字型にカーブした形状をもち(図1)、細胞上に存在する時にはSema結合部位である頭部が下を向いてしまう。この形状が本当に生理的なものを捉えているのか、もしそうならどのようなシグナル伝達メカニズムが想定されるのかという疑問が深まり、次年度以降の研究方針を変更することにした。また、神経系および免疫系で働くSema3Aについて、その受容体結合に必須の構造モチーフを同定することに成功した。

研究3(神経、ニッチ細胞系): ドイツMDC研究所のWilnow博士と共同研究により、ニューロン特異的受容体蛋白質sorLAについて、それがアミロイドペプチドを結合してリソソーム分解系へ運ぶことにより、アルツハイマー病発症から脳を守る働きをしていることを発見した。この成果はScience Translational Medicine誌に掲載され、新聞などでメディアで紹介された。

【平成26年度】

研究1(インテグリン受容体系): $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンについては、構造安定性に関するこれまでの検討結果を元にデザインした組み換え蛋白質

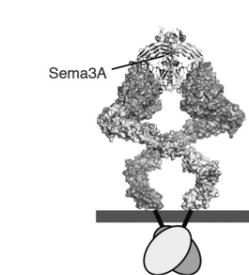


図2 PlexinA1の2量体化による活性化モデル



図3 sorLA Vps10pドメインの結晶構造

を大量に精製して結晶化を開始したが年度内に良好な結晶は得られなかった。しかし、関口清俊博士と共同でリガンドであるラミニン断片の結晶化を試み、ついにそれに成功した。 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンについては脂質二重膜(ナノディスク)に組み込み、ネガティブ染色による電子顕微鏡を用いて一分子イメージングに成功した。

研究2(セマフォリンシグナル系): 昨年度の成果を受けて、Sema3A受容体のPlexin A1について、企業との共同研究を開始し、アゴニスト活性をもつ抗体の取得に成功するとともに、そのエピトープ同定および複合体の電顕イメージングも達成した。この結果、Plexinは細胞膜上である特定の配向で2量体化したときのみシグナル伝達を引き起こすことがわかった(図2)。これとは別に、骨形成シグナルに関わるSema4Dシグナルを受容するPlexin B1について、その活性を阻害する能力をもつ環状ペプチドを東京大学の菅裕明教授と共同で探索し、発見した。このペプチドは骨粗鬆症の治療薬の開発につながる可能性を秘めている。その作用メカニズムを探るために、ペプチドとPlexinB1の複合体の構造解析を進め、結晶化に成功した。また、神経系および免疫系で働くSema3Aについて、マウスとヒト両方の蛋白質を認識する活性阻害抗体の開発にも成功した。ネイティブなSema3Aを認識する抗体の樹立は極めて珍しい。

研究3(神経、ニッチ細胞系): 昨年に引き続き

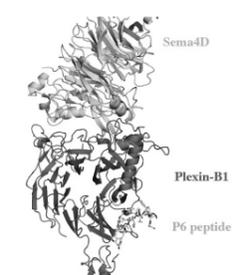


図4 PlexinB1とアロステリック阻害ペプチド複合体の結晶構造

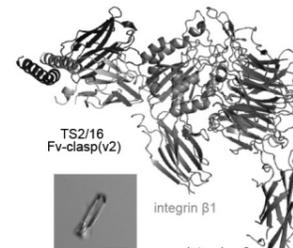


図5 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンの結晶構造

てニューロン特異的受容体蛋白質sorLAについての構造生物学的研究をおこない、アミロイドペプチドを結合して居る状態で複合体の結晶構造解析に成功し(図3)、その成果が論文(*Nature Struct Mol Biol*誌)になるとともに各種メディアにも取り上げられた。また、ニッチ細胞から産生され幹細胞の維持や分化に必須なWnt蛋白質について、活性を保ったままの精製に成功した。

【平成27年度】

研究1(インテグリン受容体系): $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンについては、いわゆる「結晶化シャペロン」法を採用し、複数の抗インテグリン抗体(抗 $\alpha 6$ 抗体GoH3、抗 $\beta 1$ 抗体TS2/16など)のscFvあるいはFab断片を網羅的に生産し始めた。これらは不成功に終わったが、本研究室で最近開発した新規デザイン抗体フラグメントであるFv-claspに変換したバージョンを試みた結果、TS2/16において良好な結晶を得ることに初めて成功した。放射光施設において3.37Å分解能の回折データ取得も果たし、構造解析の可能性が大きく高まった。 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンのナノディスク再構成とそのイメージングについては、ヒト胎盤からの精製に代えて培養細胞株(K562)からの精製プロトコルを確立し、より簡便で安全な試料調製を可能にした。

研究2(セマフォリンシグナル系): Sema3A受容体のPlexin A1について、アゴニスト活性をも

Neuroigin, 第35回日本分子生物学大会 シンポジウム、2012年12月13日、福岡国際会議場、招待講演
12) Junichi Takagi, Multi-faceted approach to analyze structure and function of integrins., Gordon Research Conference (Fibronectin, Integrins, & Related molecules), 2013年2月14日、Ventura, USA、招待講演

【産業財産権】

○**出願状況(計4件)**

名称:フレキシンの結合調節剤
発明者: 菅裕明、バシルティン・ナセル、高木淳一、松永幸子
権利者: 大阪大学、東京大学
種類: 特許
番号: 特願2016-120226
出願年月日: 平成28年6月16日
国内外の別: 国内
○**取得状況(計3件)**
名称: タグペプチド及びその利用
発明者: 高木淳一
権利者: 大阪大学
種類: 特許
番号: 05257997号
取得年月日: 平成25年5月2日
国内外の別: 国内

【その他】

ホームページ:
http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/synthesis/
メディア報道
1) 「アルツハイマー病の原因物質「掃除」するタンパク質の立体構造を解明」NHKニュース、日本経済新聞、読売新聞、日刊工業新聞、神戸新聞、2015年2月3日、sorLAとアミロイドβペプチド複合体の立体構造決定について紹介
2) アルツハイマー病から脳を守るタンパク質を発見」NHKニュース。朝日新聞、読売新聞、毎日新聞、産経新聞、日本経済新聞、2014年2月13日、sorLAによるアミロイドβペプチドの除去効果について紹介
3) 光学・電子顕微鏡を連動」北海道新聞、2012年10月1日、CLEM法を用いた神経シナプスの相関構造解析の紹介
アウトリーチ活動
第31回西宮市ライフサイエンスセミナー「脳をめぐるライフサイエンス:タンパク質の立体構造からその機能を知る-アルツハイマー病関連因子を中心に」、2015.10.30、西宮市

講演
3) 高木淳一、Revisiting the structure-activity relationship of semaphorin 3A, 第89回日本薬理学会年会シンポジウム「創薬ターゲットとしてのセマフォリン」、2016年3月9日、バシフィコ横浜、招待講演
4) Junichi Takagi, A versatile protein tagging system for recombinant protein production, isolation, and detection in mammalian cells., HUPO 2015 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Industry Seminar, 2015年9月29日、Vancouver, Canada、招待講演
5) 高木淳一、Immunological tools to aid recombinant protein production and analysis, 第43回日本免疫学会学術集会テクニカルセミナー、2014年12月10日、京都国際会館、招待講演
6) Junichi Takagi, Use of custom-made epitope tagging system to facilitate receptor structural biology. , Cold Spring Harbor Asia Conference (Mechanism of Transmembrane Signaling)., 2014年10月28日、Suzhou, China、招待講演
7) Junichi Takagi, Resolution, dynamics, and heterogeneity -In what detail do we need to know protein structures for answering biological questions?, Gordon Research Conference (X-ray Science), 2013年8月7日、Stonehill Colledge, USA、招待講演
8) Junichi Takagi, Analyzing higher-order architecture of synaptic adhesion machinery: Correlation technologies to fill the gap between different imaging methods, 11th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation, 2013年9月11日、Humberg, Germany、招待講演
9) 高木淳一、アミロイドクリアランス受容体 sorLAの構造、千里ライフサイエンスセミナー、2013年10月16日、千里ライフサイエンスセンター、招待講演
10) 高木淳一、“構造神経科学”のすすめ-立体構造情報を使いこなすクールなニューロサイエンティストになるう-、第35回日本神経科学会大会 教育講演、2012年9月21日、名古屋国際会議場、招待講演
11) Junichi Takagi, Higher-order Architecture of Cell Adhesion Mediated by Polymorphic Synaptic Adhesion Molecules Neurexin and

afamin/α-albumin. *eLife*:5:e11621. doi:10.7554/elife.11621. (査読有り)
【代表論文、引用7回】
7) Kitago Y, Nagae M, Nakata Z, Yagi-Utsumi M, Takagi-Niidome S, Mihara E, Nogi T, Kato K, *Takagi J. (2015) Structural basis for amyloidogenic peptide recognition by sorLA. *Nature Struct. Mol. Biol.* 22, 199-206. doi: 10.1038/nsmb.2954. (査読有り)
8) Fujii, Y., Kaneko, M., Neyazaki, M., Nogi, T., Kato, Y. and *Takagi, J. (2014) PA tag: a versatile protein tagging system using a super high affinity antibody against a dodecapeptide derived from human podoplanin. *Protein Exp. Purif.* 95, 240-247. doi: 10.1016/j.pep.2014.01.009. (査読有り)
9) Caglayan S, Takagi-Niidome S, Liao F, Carlo A-S, Schmidt V, Burgert T, Kitago Y, Füchtbauer E-M, Füchtbauer A, Holtzman DM, *Takagi J, and *Wilnow TE. (2014) Lysosomal sorting of amyloid-β by the SORLA receptor is impaired by a familial Alzheimer’s disease mutation. *Science Transl. Med.*, 6, 223ra20. doi: 10.1126/scitranslmed.3007747. (査読有り)
10) Tanaka, H., Miyazaki, N., Matoba, K., Nogi, T., Iwasaki, K., and *Takagi, J. (2012) Higher-order architecture of cell adhesion mediated by polymorphic synaptic adhesion molecules neurexin and neuroigin. *Cell Reports*, 2(1), 101-110. doi: 10.1016/j.celrep.2012.06.009. (査読有り)

【学会発表】(計119件)

1) 高木淳一、Understanding the signal transduction mechanism of single-pass membrane receptors via structural analysis, 第89回日本生化学会大会シンポジウム、2016年9月27日、仙台国際会議場、招待講演
2) Junichi Takagi, The “PA-tag toolbox”: Purification, detection, and biophysical manipulation of high-value target proteins., The Bioprocessing Summit "Advances in Purification Technologies", 2016年8月17日、Westin Boston Waterfront, Boston, USA、招待

主な発表論文等

【雑誌論文】(計35件)

- Matoba K, Mihara E, Tamura-Kawakami K, Miyazaki N, Maeda S, Hirai H, Thompson S, Iwasaki K, and *Takagi J. (2017) Conformational freedom of the LRP6 ectodomain is regulated by N-glycosylation and the binding of the Wnt antagonist Dkk1. *Cell Reports* 18, 32-40. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.017. (査読有り)
- Matsunaga Y, Bashiruddin NK, Kitago Y, *Takagi J, and *Suga H. (2016) Allosteric inhibition of a semaphorin 4D receptor plexin B1 by a high-affinity macrocyclic peptide. *Cell Chem. Biol.* 23, 1341-1350. doi: 10.1016/j.chembiol.2016.09.015. (査読有り)
- Urimitsu M, Sakai K, Ogasawara S, Kaneko M, Asaki R, Tamura-Kawakami K, Kato Y, Matsumoto K, and *Takagi J. (2016) Probing conformational and functional states of human hepatocyte growth factor by a panel of monoclonal antibodies. *Scientific Rep.* 9 (6), 33149. doi: 10.1038/srep33149. (査読有り)
- Suzuki K, Tsunoda H, Omiya R, Matoba K, Baba T, Suzuki S, Segawa H, Kumanogoh A, Iwasaki K, Hattori K, *Takagi J. (2016) Structure of the plexin ectodomain bound by semaphorin-mimicking antibodies. *PLoS One*, 11 (6): e0156719. doi:10.1371/journal.pone.0156719. (査読有り)
- Fujii Y, Matsunaga Y, Arimori T, Kitago Y, Ogasawara S, Kaneko M, Kato Y, and *Takagi J. (2016) Tailored placement of a turn-forming PA tag into the structured domain of a protein to probe its conformational state. *J. Cell Science*, 129:1512-1522. doi:10.1242/jcs.176685 (査読有り)
- Mihara E, Hirai H, Yamamoto H, Tamura-Kawakami K, Matano M, Kikuchi A, Sato T, and *Takagi J. (2016) Active and water-soluble form of lipidated Wnt protein is maintained by a serum glycoprotein

を保有する特許を有する。

プチドであることからPlexin作動薬としての応用が期待できる。

研究3 (神経、ニッチ細胞系) :ニューロン特異的受容体蛋白質sorLAについては、抗体のFv-claspフラグメントとの共結晶化によりこれまでより高い分解能 (2.9Å)でのペプチドリガンド包接型構造を決定することに成功した。Wnt蛋白質については、その補助受容体であるLRP6の細胞外ドメインの電子顕微鏡による可視化に成功した。この研究では、電子顕微鏡イメージングによって蛋白質に結合した糖鎖の可視化を初めて達成しただけで無く、糖鎖が結合することでLRP6の構造が制御され、ひいてはWntシグナルが影響を受けることを明らかにした点で極めてユニークである。本成果は2017年1月にCell Reports誌に掲載された。

研究組織

研究分担者

北郷 悠 (KITAGO, Yu)
大阪大学・蛋白質研究所・助教
研究者番号： 60507185

連携研究者

岩崎 憲治 (IWASAKI, Kenji)
大阪大学・蛋白質研究所・准教授
研究者番号： 20342751

つ抗体のエピトープ同定と複合体の電顕イメージングの論文を発表した。また、Sema4Dシグナルを阻害する環状ペプチドとPlexin B1の複合体を構造決定した結果、驚いたことにペプチドはリガンドであるSema4Dの結合部位とは遠く離れたところに結合しており、阻害モードがアロステリックなものであることがわかった (図4)。PlexinB1はもちろん、すべてのPlexinファミリーにおいてこれまで阻害物質は一つも知られて居らず、本環状ペプチドは中分子として極めて有用なりード化合物であるだけでなく、Plexinの作用をアロステリックに阻害することが可能であることを発見したことは意義深い。

研究3 (神経、ニッチ細胞系) :ニューロン特異的受容体蛋白質sorLAについては、企業との共同研究により親和性の高い抗体を得、それとの複合体の構造解析を達成した。ニッチ細胞から産生され幹細胞の維持や分化に必須な難水溶性Wnt蛋白質について、血液タンパク質であるアフアミンがそのキャリアータンパク質として機能することを発見し、幹細胞増殖活性を維持するWntタンパク質の大量精製に成功し、これを論文として報告した。水溶性で高活性のWnt蛋白質は幹細胞の培養に革新をもたらすため、上記報告の後世界中の幹細胞研究者から共同研究や試料提供の依頼を受けている。

【平成28年度】

研究1 (インテグリン受容体系) : α6β1インテグリンについては、抗β1抗体TS2/16のFv-claspとの複合体の結晶をもちい、まずは3.37Å分解能で、続いて年度末には2.9Å分解能での回折データ取得に成功し、ついにその結晶構造決定を果たした (図5)。本課題で一貫して取り組んできた目標に、最終年度になってやっと到達することができた。現在論文執筆中である。また、これと同時にα6β1インテグリンの生理的リガンドであるラミニンについて、その構造解析を関口清俊博士と共同でおこない、こちらも1.9Å分解能で構造決定に成功し、論文投稿中である。

研究2 (セマフォリンシグナル系) :環状ペプチドとPlexin B1との複合体の構造決定について論文をCell Chem. Biol.誌に発表した。当該ペプチドはヒトPlexinB1に特異的だが、動物実験のためにはマウスPlexinに結合するペプチドを探索する必要がある。そこで上記ペプチドをもとにマウスPlexinB1にも結合できるように改変したペプチドを探索、その単離に成功した。さらに、別の環状ペプチドが阻害剤ではなくアゴニストとして働くことを見だし、培養細胞を用いたアッセイ系を用いてその構造最適化を進めた。このペプチドは化学架橋によって2量体化しており、100nM以下の濃度でPlexinB1を高発現する細胞にSmea4Dと同様な形態変化を誘導した。これは、製薬企業と共同でおこなったPlexinA1とそのアゴニスト抗体の例と同じであり、しかもペ

リンパ器官の連携を担う免疫動態の解明

(平成24年度～平成28年度) **Molecular mechanism controlling leukocyte trafficking and its role in adaptive immune responses**

福井 宣規 九州大学生体防御医学研究所



研究開始当初の背景

免疫細胞の分化と免疫応答は、骨髄・胸腺・リンパ節・脾臓といったリンパ器官を主たる「場」として逐次的に引き起こされる四次元時空間事象である。免疫細胞は異なるリンパ器官を巡って産生・選別・活性化・維持されるため、免疫細胞が「動く」ということが、免疫システムの統御に不可欠であることは言うまでもない。例えばリンパ球は、骨髄・胸腺で分化・成熟した後、血行性にリンパ節などの二次リンパ組織へ移動する。ここで抗原に出会うとナイーブリンパ球は活性化されエフェクター細胞やメモリー細胞へと分化するが、抗原刺激を受けなかったリンパ球は輸出リンパ管を経てリンパ組織を離れ循環を繰り返す。一方、末梢組織に存在する樹状細胞は、抗原に暴露されると輸入リンパ管を介してリンパ節に移動し、T細胞に抗原を提示することで免疫応答を惹起する。抗原特異的T細胞の頻度が極めて低いことを考えると、免疫系はリンパ節という「場」を利用して、樹状細胞とT細胞の出会いを最大限に高めていると推察されるが、その動態制御機構の詳細は依然として不明である。例えば樹状細胞は、三次元微小環境下では、二次元環境と異なり、インテグリン非依存的に細胞外マトリックスの隙間を形を変えながら進んでいくことが報告されているが(*Nature* 453: 51-55, 2008)、このアメーバ様運動を制御するシグナル伝達機構やスペースを感知するメカニズムは明らかではない。また、リンパ球は免疫の場である器官内微小環境から分化・生存などのシグナルを受け動的平衡状態を維持しているため、リンパ器官の連携を理解する上で、リンパ球の状態変化と器官間移動を関連づけて定量的に解析することが重要であるが、技術的な困難さもあって、この分野の研究は進んでいない。

免疫細胞はケモカインや脂質メディエーターの濃度勾配を感知して移動するが、このためにはRac、Rap1、Cdc42、Rhoといった低分子量Gタンパク質が協調して機能することが不可欠である。これらの分子はいずれも、グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)と称される分子群によって、GDPを結合した不活性化型からGTPを結合した活性化型へ変換されることで、その機能を発現する。従来GEFはDbp1ホモロジー(DH)ドメインとpleckstrinホモロジー(PH)ドメインをタンデムにコードする分子として特徴づけられてきたが、近年このような構造を持たない新しいタイプのGEFとしてDOCKファミリーと呼ばれる分子群が同定され、その機能やシグナル伝達機構は国際的にも大きな関心を集めている。DOCK8もその一つであり、その欠損はヒトにおいて重篤なア

トピー性皮膚炎を伴う複合型免疫不全症を惹起するが、DOCK8の機能や作用機序の詳細は不明であった。

研究の目的

本研究では、免疫の場の重要な機能として免疫応答を捉え、(1) DOCK8やその関連分子の機能解析やシグナル解析を通じて、免疫細胞の動態とその制御機構を解明すると同時に、(2) 新たなマルチラベリング臓器間細胞動態評価系を開発し、器官内微小環境におけるリンパ球の状態変化と器官間移動の四次元数量的解析を行うことを目的とした。

研究の方法

(1) 免疫細胞動態制御におけるDOCK8の役割
各種免疫細胞サブセットを対象に、タキシスキャンやコラーゲンゲルを用いた細胞レベルのアッセイから、2光子共焦点レーザー顕微鏡を用いた組織あるいは個体レベルの解析まで、多階層に及ぶ多面的な解析を実施した。

(2) DOCK8の動作原理の解明
DOCK8会合分子の網羅的探索を行い、免疫細胞の動態制御に重要なシグナルネットワークの同定・解析を行った。また、DOCK8の細胞内局在を制御する分子機構についても検討を加えた。

(3) DOCK8欠損症の病態解明
抗原特異的TCRを発現するトランスジェニックマウスを用いて、T細胞の発生・分化・移動におけるDOCK8の役割を解析した。

(4) マルチラベリング臓器間細胞動態評価系の開発
光変換蛍光タンパク質KikGRを発現するマウスを作成することで、マルチラベリング臓器間細胞動態評価系を開発し、単一細胞レベルの遺伝子発現評価系と組み合わせ、定常状態や炎症モデルにおける免疫細胞の動態と性状を解析した。

研究成果

(1) 免疫細胞動態制御におけるDOCK8の役割
ノックアウトマウスを作成することで、

DOCK8を欠損した樹状細胞では、リンパ節実質への集積が障害されており、その結果T細胞を活性化できないことを見出した。DOCK8欠損樹状細胞は、障害物のない二次元環境下では正常に動くことができるが、コラーゲンファイバー間隙での遊走応答が顕著に障害されていた。また、2光子共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析から、DOCK8欠損樹状細胞では、subcapsular sinus floorの通過が障害されていることを見いだした。以上より、DOCK8が間質組織での樹状細胞の運動に重要な分子であることが明らかとなった。一方、DOCK8欠損マクロファージでは、nucleokinesis (核の移動)が障害され、その結果、三次元のみならず、二次元環境下での遊走も障害されていた。このように、DOCK8欠損の影響は、樹状細胞とマクロファージで異なっていたが、これは恐らく細胞接着性の違いに起因するものと推察された。

(2) DOCK8の動作原理の解明

DOCK8が制御する低分子量Gタンパク質を探索した結果、Cdc42特異的なGEFとして機能することを明らかにし、その複合体の構造を決定した。DOCK8を欠損した樹状細胞やマクロファージにおいて、ケモカイン刺激で誘導される活性化型Cdc42の総量は変わらなかった。しかしながら、DOCK8欠損マクロファージに野生型のDOCK8を発現させると、遊走応答が回復するのに対して、GEF活性のないDOCK8変異体を発現させても、回復しなかった。このことから、DOCK8はCdc42の活性化を介して、免疫細胞の運動を制御している事が明らかとなった。LRAP35aは、Cdc42のエフェクター分子であるMRCKに会合するアダプター分子である。DOCK8の会合分子を解析する過程で、DOCK8がLRAP35aと会合し、myosin II regulatory light chain (MLC2) のリン酸化を制御することを見いだした。野生型の樹状細胞やマクロファージにおいて、DOCK8とLRAP35aの相互作用をブロックすると、DOCK8欠損細胞の場合と同様に、遊走応答が障害された。以上の結果から、DCCK8がLRAP35aとの会合を介して、Cdc42の活性化をアクトミオシンのダイナミクスにリンクさせ、免疫細胞の動態を制御していることが明らかとなった。

(3) DOCK8欠損症の病態解明

DOCK8を欠損したCD4+ T細胞ではIL-31の産生が著しく亢進することを見いだした。

そのメカニズムを詳細に解析したところ、DOCK8の下流でEPAS1が作動し、IL-31産生を誘導していることを発見した。EPAS1はARNTという分子と協調して低酸素応答を制御することが知られているが、EPAS1によるIL-31の産生誘導にARNTは必要ではなく、別のSP1という分子が関与していた。一方、EPAS1は細胞質から核に移行して機能するが、DOCK8はMST1という分子を介して、EPAS1の核への移行を抑制していることを突き止めた。このことから、DOCK8の下流でEPAS1が作動し、EPAS1がIL-31産生に重要な役割を演じることが明らかとなった。

主な発表論文等

(雑誌論文) (計48件)

- 1) Yamamura K, Uruno T, Shiraiishi A, Tanaka Y, Ushijima M, Nakahara T, Watanabe M, Kido-Nakahara M, Tsuge I, Furue M, Fukui Y: The transcription factor EPAS1 links DOCK8 deficiency to atopic skin inflammation via IL-31 induction. *Nature Commun.* 査読有. 8:13946. 2017. DOI: 10.1038/ncmms13946
- 2) Shiraiishi A, Uruno T, Sanematsu F, Ushijima M, Sakata D, Hara T, Fukui Y: DOCK8 Protein Regulates Macrophage Migration through Cdc42 Activation and LRAP35a Interaction. *J. Biol. Chem.* 査読有. 292:2191-2202. 2017. DOI: 10.1074/jbc.M116.736306
- 3) Ikebuchi R, Teraguchi S, Vandenberg A, Honda T, Shand FH, Nakanishi Y, Watanabe T, Tomura M: A rare subset of skin-tropic regulatory T cells expressing *Il10/Gzmb* inhibits the cutaneous immune response. *Sci. Rep.* 査読有. 6:35002. 2016. DOI: 10.1038/srep35002.
- 4) Yanagihara T, Sanematsu F, Sato T, Uruno T, Duan X, Tomino T, Harada Y, Watnabe M, Wang Y, Tanaka Y, Nakanishi Y, Suyama M, Fukui Y: Intronic regulation of Aire expression by Jmjd6 for self-tolerance induction in the thymus. *Nature Commun.* 査読有. 6:8820. 2015. DOI: 10.1038/ncmms9820.
- 5) Futamura K, Sekino M, Hata A, Ikebuchi R, Nakanishi Y, Egawa G, Kabashima K, Watanabe T, Furuki M, Tomura M: Novel full-spectral flow cytometry with multiple spectrally-adjacent fluorescent proteins and fluorochromes and visualization of in vivo cellular movement. *Cytometry A.* 査読有. 87:830-42. 2015. DOI: 10.1002/cyto.a.22725.
- 6) Moalli F, Cupovic J, Thelen F, Halbherr P, Fukui Y, Narumiya S, Ludewig B, Stein JV: Thromboxane A2 acts as tonic immunoregulator by preferential disruption of low-avidity CD4+ T cell-dendritic cell interactions. *J. Exp. Med.* 査読有. 211:2507-2517. 2014. DOI: 10.1084/jem.20140137
- 7) Sreeramkumar V, Adrover JM, Ballesteros I, Cuartero MI, Rossaint J, Bilbao I, N cher M, Pitaval C, Radovanovic I, Fukui Y, McEver RP, Filippi M-D, Lizasoain I, Ruiz-Cabello J, Zarbock A, Moro MA, Hidalgo A: Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* 346:1234-1238. 2014. DOI: 10.1126/science.1256478
- 8) Watanabe M, Terasawa M, Miyano K, Yanagihara T, Uruno T, Sanematsu F, Nishikimi A, Côté JF, Sumimoto H, Fukui Y: DOCK2 and DOCK5 act additively in neutrophils to regulate chemotaxis, superoxide production, and extracellular trap formation. *J. Immunol.* 査読有.193:5660-5667. 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1400885
- 9) Ogawa K, Tanaka Y, Uruno T, Duan X, Harada Y, Sanematsu F, Yamamura K, Terasawa M, Nishikimi A, Côté JF, Fukui Y: DOCK5 functions as a key signaling adaptor that links Fc RI signals to microtubule dynamics during mast cell degranulation. *J. Exp. Med.* 査読有. 211: 1407-1419. 2014. DOI: 10.1084/jem.20131926
- 10) Tomura M, Hata A, Matsuoka S, Shand FH, Nakanishi Y, Ikebuchi R, Ueha S, Tsutsui H, Inaba K, Matsushima K, Miyawaki A, Kabashima K, Watanabe T, Kanagawa O: Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci. Rep.* 査読有. 4: e6030. 2014. DOI: 10.1038/srep06030.
- 11) Le Floc'h A, Tanaka Y, Bantilan NS,

(4) マルチラベリング臓器間細胞動態評価系の開発
皮膚炎症時に誘導されるTregにおいて、免疫抑制関連遺伝子の発現は階層的であり、IL-10を発現しているTregは稀でTh1様細胞にバイアスしていること、およびTregの機能発現に、炎症部位への集積と複数の免疫抑制関連遺伝子の発現が関わっていることを明らかにした。また、定常状態におけるエフェクターT細胞の末梢リンパ組織への移動を定量解析すると共に、大腸炎発症時に、IL-10/CTLA-4を高発現するTregが誘導され、大腸から所属リンパ節に移行することを示した。

研究代表者

FUKUI, Yoshinori

九州大学生体防御医学研究所

60243961



研究組織

研究分担者

戸村 道夫(TOMURA, Michio)

研究者番号:30314321



- S, Fukui Y: Dimerization of DOCK2 is essential for DOCK2-mediated Rac activation and lymphocyte migration. *PLoS ONE* 査読有. 7:e46277. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0046277
- 18) Harada Y, Tanaka Y, Terasawa M, Pieczyk M, Habiro K, Katakai T, Hanawa-Suetsugu K, Kukimoto-Niino M, Nishizaki T, Shirouzu M, Duan X, Uruno T, Nishikimi A, Sanematsu F, Yokoyama S, Stein JV, Kinashi T, Fukui Y: DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. *Blood.* 査読有. 119: 4451-4461. 2012. DOI: 10.1182/blood-2012-01-407098
- 19) Nishikimi A, Uruno T, Duan X, Cao Q, Okamura Y, Saitoh T, Saito N, Sakaoka S, Du Y, Suenaga A, Kukimoto-Niino M, Miyano K, Gotoh K, Okabe T, Sanematsu F, Tanaka Y, Sumimoto H, Honma T, Yokoyama S, Nagano T, Kohda D, Kanai M, Fukui Y: Blockade of inflammatory responses by a small-molecule inhibitor of the Rac activator DOCK2. *Chem. Biol.* 査読有. 19: 488-497. 2012. DOI: 10.1016/j.chembiol.2012.03.008

(学会発表) (計91件)

- 1) 福井宣規: 生体防御システムにおけるDOCKファミリー分子の機能とその制御機構. 生体防御学会シンポジウム、2016年7月7日-9日、九州大学コラボレーション(福岡)、招待講演
- 2) 福井宣規: 免疫システムにおけるDOCKファミリー分子の機能とその制御機構. 第68回日本細胞生物学会大会、2016年6月15日-17日、京都テルサ(京都)、招待講演
- 3) 福井 宣規: マスト細胞の脱顆粒反応におけるDOCK5の役割とその制御機構. 第64回日本アレルギー学会学術大会、2015年5月26日-28日、クラッドプリンスホテル新高輪(東京)、招待講演
- 4) Michio Tomura: Visualization of trafficking and presentation of tumor antigen by dendritic cells. Multi-dimensional Fluorescence Live

Imaging of Cellular Function and Molecular Activities, 2015年1月26日-28日、京都国際会議場(京都)シンポジウム

- 5) Fukui Y: A novel mechanism controlling Aire protein expression in the thymus. The Fourth BIZAN Immunology Symposium, 2015年1月29日-1月30日、藤井節郎記念医学センター多目的ホール(徳島)、招待講演
- 6) Fukui Y: Critical roles of DOCK family proteins in migration and activation of leukocytes. Keystone Symposium, 2015年1月13日-1月18日、Vancouver (Canada)、招待講演
- 7) Fukui Y: Critical roles of DOCK family proteins in migration and activation of leukocytes. The 24th Hot Spring Harbor International Symposium, 2014年11月7日-11月8日、九州大学コラポステーション(福岡)、講演
- 8) 戸村道夫: 腸管免疫系における腸管間免疫細胞動態. 第38回阿蘇シンポジウム, 2014年7月25日-26日、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル(熊本)、教育講演
- 9) 戸村道夫: 皮膚免疫制御機構における皮膚由来制御性T細胞の役割. 第38回日本リンパ学会総会, 2014年6月20日-22日、北里大学白金キャンパス薬学部コンベンションホール(東京)、教育講演
- 9) Michio Tomura: Visualization of immune response by observing cell-cycle, movement and death. New Advances in Optical Imaging of Live

Cells and Organisms, COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES, 2013年8月20日-23日、蘇州市(中国)、教育講演

- 10) Fukui Y: Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease. Post-GCOE Symposium and Retreat in Singapore, 2013年3月4日-5日、Singapore (Singapore)、招待講演
- 11) Fukui Y: Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease. Centennial Hashimoto Disease International Symposium, 2012年12月2日-4日、ホテル日航福岡(福岡)、招待講演

【図書】(計4件)

- 1) Suan D, Hampton HR, Tomura M, Kanagawa O, Chtanova T, Phan TG: Optimizing fluorescence excitation and detection for intravital two-photon microscopy. *Methods Cell Biol* (Edited by P. Michael Conn) ELSEVIER, 113: 311-323. (2013) DOI: 10.1016/B978-0-12-407239-8.00014-8.
- 2) Tomura M, Kabashima K: Analysis of cell movement between skin and other anatomical sites in vivo using photoconvertible fluorescent protein "Kaede"-transgenic mice. *Molecular Dermatology, Methods Mol Biol* (Edited by Cristina Has and Cassian

Sitaru), Springer, 961: 279-286 (2013) DOI: 10.1007/978-1-62703-227-8_18.

- 3) 戸村道夫: 蛍光色素の基本、選び方からマルチカラー解析まで、直伝! フローサイトメトリー 面白いほど使いこなせる!、実験医学別(中内啓光/監、清田純/編)、羊土社、22-33 (2013)
- 4) 戸村道夫: 細胞機能を可視化する次世代のレポーターマウスのつくり方、*in vivo*イメージング実験プロトコル(石井優 編)、実験医学別冊、羊土社、212-223 (2012)

【産業財産権】

○出願状況(計4件)

- 名称: ピリジジン化合物及びその用途
 発明者: 福井宣規、宇留野武人、金井求、松永茂樹、白井孝宏、横山茂之、本間光貴、新野睦子、高谷大輔
 権利者: 九州大学
 種類: 特許
 番号: 特願2015-39071
 出願年月日: 2015年2月27日
 国内外の別: 国内
 名称: ピリジジン化合物及びその用途
 発明者: 福井宣規、宇留野武人、金井求、松永茂樹、白井孝宏、横山茂之、本間光貴、新野睦子、高谷大輔
 権利者: 九州大学
 種類: 特許
 番号: PCT/JP2016/055927
 出願年月日: 2016年2月26日
 国内外の別: 国外
 名称: アトピー性皮膚炎モデル非ヒト動物及びその用途
 発明者: 福井宣規、山村和彦、宇留野武人、古江増隆、
 権利者: 九州大学
 種類: 特許
 番号: PCT/JP2017/007198
 出願年月日: 2017年2月24日
 国内外の別: 国外

(その他)
 ホームページ
<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/iden/>
 メディア報道
 DOCK8とアトピー性皮膚炎に関して
 新聞: 朝日、毎日、読売、日本経済、産経、日刊工業、西日本等
 テレビ: NHKその他
 DOCK5とアレルギーに関して
 新聞: 毎日、日刊工業、西日本等
 テレビ: NHKその他
 アウトリーチ活動
 プレス発表 3件
 受賞、等
 平成25年度 文部科学大臣表彰 科学技術賞(研究部門)受賞

Meetings

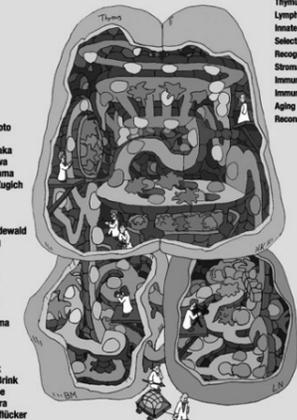
第1回国際シンポジウム

国際T細胞ワークショップ KTCC2013(共催)

日時 平成25年6月3日(月)~7日(金)

場所 京都大学芝蘭会館

The 1st Symposium for MEXT Grant-in-Aid for Scientific Research on
**Analysis and Synthesis of
 Multidimensional Immune Organ Network**
 3-7 June 2013
 Shiran-Kaikin, Kyoto University, Kyoto, Japan



Keynote Speakers
 Ellis Reinherz
 Shimon Sakaguchi
 Alfred Singer

Speakers/attendees confirmed as of March 8
 Bruno Kyewski
 Juan Lafaille
 Ming Li
 Paul Love
 Nancy Manley
 Mitsuru Matsumoto
 Nagahiro Minato
 Masayuki Miyasaka
 Takashi Nagasawa
 Yoshihiro Nakayama
 Janko Nikolic-Zuglich
 Pärt Peterson
 Howard Peirie
 Ellen Richie
 Hans-Reimer Rodewald
 Ellen Rothenberg
 Takashi Sato
 Takahito Sato
 Shinichiro Sawa
 Roland Soczka-Guth
 Sylvie Sauter
 Jonathan Sprent
 Charles Surh
 Georg Hollender
 Ichiro Taniguchi
 Naomichi Taylor
 Kiki Tessehar
 Willem van Ewijk
 Marcel van den Brink
 Takashi Watanabe
 Akhiko Yoshimura
 Juan C Zúñiga-Pflücker

Tentative topics
 Thymus microenvironments
 Lymphoid progenitors
 Innate cells and T cell subsets
 Selection and differentiation
 Recognition and activation
 Stromal cells for immune functions
 Immune response and memory
 Immune regulation and disease
 Aging of immune system
 Reconstruction of immune system

KTCC2013 Organizers
 Masami Hui
 Hirotaka Kawamoto
 Shigeo Koyasu (chair)
 Takashi Nakayama
 Takahito Sato
 Yusuke Takahama (honorary general)
 Ichiro Taniguchi

Global Thymus Network Organizers
 KTCC
 Masami Hui
 Hirotaka Kawamoto
 Yusuke Takahama
 Thymus
 Richard Beyl
 Ann Collins
 EUThymus
 Stefan Anderson
 Georg Hollender
 Naomichi Taylor
 Ross Lenz
 Thymus4
 Janko Nikolic-Zuglich
 Howard Peirie

Abstract deadline: 31 March 2013
 Selection for oral and poster presentation will be made by the organizers.

- Travel bursary of 100K JPY (approx 1000 USD) per abstract application is available for 20 postdocs and graduate students from outside of Japan.
- Registration fee: 5000 JPY
- For more information, visit our website: <http://ktcc.umin.jp>

Co-organized with The 6th International Workshop of
Kyoto T Cell Conference

文部科学省科学研究費新学術領域研究「免疫四次元空間ダイナミクス」平成24年度~平成28年度
 第1回国際シンポジウム(照会先: 領域代表者 高濱洋介 takahama@genome.tokushima-u.ac.jp)



老化と病態によるリンパ器官の攪乱と免疫応答性の変容

(平成24年度～平成28年度) Alterations of lymphoid organs and immune function with age and diseases

湊 長博 京都大学・大学院医学研究科

研究代表者

MINATO Nagahiro

京都大学・大学院医学研究科・特命教授

40137716



計画研究

研究開始当初の背景

先進国における高齢化の進行に伴い、加齢に伴う多様な慢性疾患の増加は国民の健康維持の上で大きな社会的問題となっている。加齢関連病態において、獲得免疫応答性低下と炎症性素因や自己免疫リスクの増大によって特徴付けられる免疫老化は重要な基盤的要因となっており、その対応は重要な医学的課題である。

研究の目的

免疫系の老化を免疫系恒常性維持機構と応答性の変容という系統的観点から特に免疫系機能の中核にあるT細胞系に焦点を当てて解析し、それが個体の恒常性維持と病態発生に与える影響を明らかにすることを目的とする。

研究の方法

免疫系の老化を個体発生の中で全体的に理解するために、免疫系組織および全身のT細胞の動態と恒常性維持の観点から解析し、そのコンテキストの中でT細胞の細胞および分子・遺伝子レベルでの変容に迫る。

研究成果

私達が発見報告した加齢に伴い発生し増加するユニークなT細胞集団 (Senescence-associated T cells, SA-T) について詳細な細胞学的解析を進め、これらが典型的な細胞老化の特性を示すことを明らかにした。さらにSA-T細胞は、加齢に伴う生理的胸腺退縮とそれに伴う代償性の末梢T細胞の持続性の恒常性増殖

反応に伴って発生することを明らかにした。SA-T細胞は自己反応性を有し、またその老化関連分泌形質(SASP)により オステオポンチン(OPN)やケモカインを大量に産生することによって強い炎症原性機能を有する。多様な病態モデルを用いた解析によって、SA-T細胞はルーブス(全身性自己免疫病)素因における自己抗体の産生と免疫複合体性腎炎や、高脂肪食負荷に伴う内臓脂肪織炎とインスリン抵抗性の増加などの慢性疾患の発症に重要な役割を果たすことも明らかになった。SA-T細胞は極めて特異的な形質(PD-1⁺ CD153⁺)を示すので、これを標的としたSA-T細胞の制御により、重要な加齢関連疾患のコントロールに向けて新しい道が開かれた。

Abl-Expressing Leukemia Cells. *PLoS One* 10, e0134026 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0134026.

- Noma, N., Asagiri, M., Takeiri, M., Ohmae, S., Takemoto, K., Iwasako, K., Minato N., Maeda-Yamamoto, M., Simizu, S. & Umezawa, K. Inhibition of MMP-2-Mediated Mast Cell Invasion by NF-kappaB Inhibitor DHMEQ in Mast Cells. *Int Arch Allergy Immunol* 166, 84-90 (2015). doi:10.1159/000371419.
- Doi K, Imai T, Kressler C, Yagita H, Agata Y, Vooijs M, Hamazaki Y, Inoue J, Minato N. Crucial role of the Rap G protein signal in Notch activation and leukemogenicity of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep*. 2015 Jan 23;5:7978. doi: 10.1038/srep07978.

- Wu, Y.L., Ding, Y.P., Tanaka, Y., Shen, L.W., Wei, C.H., Minato N. & Zhang, W. gammadelta T cells and their potential for immunotherapy. *Int J Biol Sci* 10, 119-35 (2014). doi:10.7150/ijbs.7823.

- Sumi, E., Sugie, T., Yoshimura, K., Tada, H, Ikeda, T, Suzuki, E, Tanaka, Y, Teramukai, S, Shimizu, A, Toi, T and Minato, N. Effects of zoledronic acid and the association between its efficacy and gamma delta T cells in postmenopausal women with breast cancer treated with preoperative hormonal therapy: a study protocol. *J. Transl. Med.* 25;12(1):310, 2014. doi: 10.1186/s12967-014-0310-2.

- Sekai M, Hamazaki Y, Minato N. Medullary thymic epithelial stem cells maintain a functional thymus and promotes invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 34, 1451-62 (2015). doi:10.1038/onc.2014.36.
- Ohigashi I, Zuklys S, Sakata M, Mayer CE, Hamazaki Y, Minato N, Hollander GA, Takahama Y. Adult thymic medullary epithelium is maintained and regenerated by lineage-restricted cells rather than bipotent progenitors *Cell Rep*. 2015 Nov 17;13(7):1432-43. doi: 10.1016/j.celrep.2015.10.012.

- Tahir S, Fukushima Y, Sakamoto K, Sato K, Fujita H, Inoue J, Uede T, Hamazaki Y, Hattori M, Minato N. A CD153-CD4+ T Follicular Cell Population with Cell-Senescence Features Plays a Crucial Role in Lupus Pathogenesis via Osteopontin Production. *J Immunol*. 2015 Jun 15;194(12):5725-35. doi: 10.4049/jimmunol.1500319.

- Sugie T, Murata-Hirai K, Iwasaki M, Morita, C.T., Li, W., Okamura, H., Minato N, Toi, M. & Tanaka, Y. Zoledronic acid-induced expansion of

gammadelta T cells from early-stage breast cancer patients: effect of IL-18 on helper NK cells. *Cancer Immunol Immunother* 62, 677-87 (2013). doi:10.1007/s00262-012-1368-4.

- Minato N. Rap G protein signal in normal and disordered lymphohematopoiesis. *Exp Cell Res* 319, 2323-8 (2013). doi:10.1016/j.yexcr.2013.04.009.

- Idrees, A.S., Sugie, T., Inoue, C., Murata-Hirai, K., Okamura, H., Morita, C.T., Minato N, Toi, M. & Tanaka, Y. Comparison of gammadelta T cell responses and farnesyl diphosphate synthase inhibition in tumor cells pretreated with zoledronic acid. *Cancer Sci* 104, 536-42 (2013).

- Sakamoto, S., Wakae, K., Anzai, Y., Murai, K., Tamaki, N., Miyazaki, M., Miyazaki, K., Romanow, W.J., Ikawa, T., Kitamura, D., Yanagihara, I., Minato N., Murre, C. & Agata, Y. E2A and CBP/p300 act in synergy to promote chromatin accessibility of the immunoglobulin kappa locus. *J Immunol* 188, 5547-60 (2012). doi:10.4049/jimmunol.1002346.

- Fujita, H., Hamazaki, Y., Noda, Y., Oshima, M. & Minato N. Claudin-4 deficiency results in urothelial hyperplasia and lethal hydronephrosis. *PLoS One* 7, e52272 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0052272.

(学会発表)(計19件)

(招待講演のみ記す)

- Nagahiro Minato, Aging of Immunity and Immunity in Aging. KTCC International Symposium. 2017 Mar .13-16, Kyoto
- Nagahiro Minato, Checkpoint Cancer Immunotherapy 1st NTNU Symposium on Current and Future Clinical Biomarkers of Cancer 2016 June.16-17, Trondheim, Norway
- Nagahiro Minato, History of PD-1 and perspectives of PD-1 checkpoint blockade cancer Immunotherapy 12th JSH Single Topic Conference 2016 Sept.22-23, Kanazawa
- Nagahiro Minato, Aging of Immunity and Immunity in Aging. Cellular Senescence and Aging in Cancer and Diseases France-Japan Collaborative Seminar 2016 Oct.31-11.2, Kyoto

Japan ¥

- Nagahiro Minato, PD-1 blockade cancer Immunotherapy St Lukes-MDA Cancer Symposium 2016, Tokyo 2016 May 4

- Nagahiro Minato. Checkpoint blockade cancer immunotherapy. CLS Bohring Seminar. Kyoto, 2015, April 23,

- Nagahiro Minato. New aspect of cancer immunotherapy. Avison Biomedical Symposium. Seoul, 2015 Aug 21, Seoul

- Nagahiro Minato. Immunosenescence and autoimmunity. IFOM-Kyoto Joint Symposium. Kyoto Japan 2015, Oct 6,

- Nagahiro Minato. Immunosenescence and autoimmunity. International Symposium of Japan Immunology Society Kyoto, Japan Dec 11, 2014

- Nagahiro Minato. Immunosurveillance and cancer immunity WRll international Symposium. Seoul, Oct. 8, 2014

- Nagahiro Minato. Recent advances in immunology. Symposium of Japan Medical Society, July 7, 2014.

- Nagahiro Minato. Immunosenescence and systemic autoimmunity Uehara Memorial Symposium, Tokyo, June 16, 2014.

- Nagahiro Minato. Immunosenescence and systemic autoimmunity. International Symposium of Japanese Allergy Society Kyoto, May 10, 2014.

- Nagahiro Minato. Immunosenescence and cancer, Taiwan-Kyoto International Symposium Dec.18-19, Taipei University (Taipei, Taiwan), 2013.

- Nagahiro Minato. Immunosenescence and autoimmunity, Japan-Germany Immunology Conference Dec. 11-13, Shizuoka, Japan, 2013.

- Nagahiro Minato. Gamma-delta T cells and cancer immunotherapy, International Conference on Cell Therapy Oct. 23-25, Seoul, Korea, 2013.

- Nagahiro Minato. Immunosenescence and immune surveillance, KTCC International Symposium June 3-6, Kyoto, Japan, 2013.

- Nagahiro Minato. Immunosenescence and autoimmunity, International Conference of Autoimmune Diseases Apr .17-18, Tokyo, Japan, 2012.

- Nagahiro Minato. Rap G protein signaling in hematopoietic malignancy, Mechanisms of Cell Transformation and Metastasis IFPM-Kyoto University Joint Symposium Oct.25-27, Milan, Italy, 2012.

(図書)(計3件)

- Minato, N. T-cell senescence and autoimmunity. In "Innovative Medicine" ed. Nakao, K., Minato, N., and Uemoto, S. Springer Press, pp.,119-130, (2015). Doi:10.1007/978-4-431-55651-0_10
- Minato, N. Rap1 and Sip1. In "Cancer encyclopedia Vol. II". Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2016). Doi: 10.1007/978-3-540-47648-1_4948
- Minato, N. and Honjo, T. Cancer immunotherapy by checkpoint blockade. *The Vaccine Book*, ed. B.R. Bloom and P.-H. Lambert, Academic Press, Chapter 29 pp561-580, (2016). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802174-3.00029-1>

(その他)

ホームページ

メディア報道

- 2014年11月14日
 - 朝日新聞(30面)自己免疫疾患防く幹細胞 京大グループ マウスから発見
 - 京都新聞(27面)自己攻撃抑える幹細胞 京大グループ 予防や治療に期待
 - 産経新聞(26面)自己免疫疾患抑える細胞 京大発見 マウスで治療効果
 - 中日新聞(33面)「悪玉」排除の幹細胞を特定
 - 日刊工業新聞(19面)胸腺の幹細胞発見 マウス免疫疾患回避に成功
 - 日本経済新聞(42面)悪玉の免疫細胞死滅 幹細胞を特定 京大、治療法開発に道
 - 毎日新聞(2面)免疫疾患抑制の幹細胞 胸腺で特定 京大グループ
 - 読売新聞(夕刊 13面)自己免疫疾患防ぐ細胞 京大、マウスで確認
 - 徳島新聞(4面)「悪玉」排除する幹細胞 京大チーム特定 免疫機能正常化
 - KBS京都 ニュース

アウトリーチ活動

受賞、等

- 第13回佐川特別賞(SGH特別賞) 研究テーマ:ガンに対する免疫応答機構の解明とガン免疫療法の開発

主な発表論文等

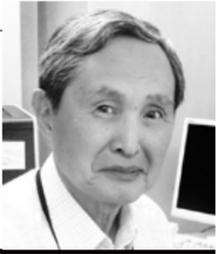
(雑誌論文)(計25件)

- Ito K, Nakajima A, Fukushima Y, Suzuki K, Sakamoto K, Hamazaki Y, Ogasawara K, Minato N, Hattori M. The potential role of Osteopontin in the maintenance of commensal bacteria homeostasis in the intestine. *PLoS One*. 2017 Mar 15;12(3):e0173629. doi: 10.1371/journal.pone.0173629. eCollection 2017.
- Shirakawa K, Yan X, Shinmura K, Endo J, Kataoka M, Katsumata Y, Yamamoto T, Anzai A, Isobe S, Yoshida N, Itoh H, Manabe I, Sekai M, Hamazaki Y, Fukuda K, Minato N, and Sano M. Obesity accelerates T-cell senescence in visceral adipose tissue *J Clin Invest*. 2016 Dec 1;126(12):4626-4639. doi: 10.1172/JCI88606.
- Sato Y, Mii A, Hamazaki Y, Fujita H, Nakata H, Masuda K, Nishiyama S, Shibuya S, Haga H, Ogawa O, Shimizu A, Narumiya S, Kaisho T, Arita M, Yanagisawa M, Miyasaka M, Sharma K, Minato N, Kawamoto H, and Yanagita M. Heterogeneous fibroblasts underlie age-dependent tertiary lymphoid tissues in the kidney *JCI Insight*. 2016 Jul

- 21;1(11):e87680. doi: 10.1172/jci.insight.87680
- Sakamoto, K., Fukushima, Y., Ito, K., Matsuda, M., Nagata, S., Minato N. & Hattori, M. Osteopontin in Spontaneous Germinal Centers Inhibits Apoptotic Cell Engulfment and Promotes Anti-Nuclear Antibody Production in Lupus-Prone Mice. *J Immunol* 2016 197, 2177-86. doi:10.4049/jimmunol.1600987.
- Robles, A.I., Olsen, K.S., Tsui, D.W., Georgoulas, V., Creaney, J., Dobra, K., Vyberg, M., Minato N., Anders, R.A., Borresen-Dale, A.L., Zhou, J., Saetrom, P., Nielsen, B.S., Kirschner, M.B., Krokan, H.E., Papadimitrakopoulou, V., Tsamardinos, I. & Roe, O.D. Excerpts from the 1st international NTNU symposium on current and future clinical biomarkers of cancer: innovation and implementation, June 16th and 17th 2016, Trondheim, Norway. *J Transl Med* 2016 14, 295. doi:10.1186/s12967-016-1059-6.
- Nonaka, T., Toda, Y., Hiai, H., Uemura, M., Nakamura, M., Yamamoto, N., Asato, R., Hattori, Y., Bessho, K., Minato N. & Kinoshita, K. Involvement of activation-induced cytidine deaminase in skin cancer development. *J Clin Invest* 2016 126, 1367-82. doi:10.1172/JCI81522.
- Matsumoto, K., Hayashi, K., Murata-Hirai, K., Iwasaki, M., Okamura, H.,

- Minato N., Morita, C.T. & Tanaka, Y. Targeting Cancer Cells with a Bisphosphonate Prodrug. *ChemMedChem* 2016 11, 2656-2663 (2016). doi:10.1002/cmdc.201600465.
- Kataoka, K., Shiraiishi, Y., Takeda, Y., Sakata, S., Matsumoto, M., Nagano, S., Maeda, T., Nagata, Y., Kitanaka, A., Mizuno, S., Tanaka, H., Chiba, K., Ito, S., Watatani, Y., Kakiuchi, N., Suzuki, H., Yoshizato, T., Yoshida, K., Sanada, M., Itonaga, H., Imaizumi, Y., Totoki, Y., Munakata, W., Nakamura, H., Hama, N., Shide, K., Kubuki, Y., Hidaka, T., Kameda, T., Masuda, K., Minato N., Kashiwase, K., Izutsu, K., Takaori-Kondo, A., Miyazaki, Y., Takahashi, S., Shibata, T., Kawamoto, H., Akatsuka, Y., Shimoda, K., Takeuchi, K., Seya, T., Miyano, S. & Ogawa, S. Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. *Nature* 2016 534, 402-6. doi:10.1038/nature18294.
- Hamazaki Y, Sekai M, Minato N. Medullary thymic epithelial stem cells: role in thymic epithelial cell maintenance and thymic involution *Immuntal Rev*. 2016 May;27(1):38-55. doi: 10.1111/imir.12412.
- Zhang, Z., Zhang, W., Huang, S., Sun, Q., Wang, Y., Hu, Y., Sun, N., Zhang, Y., Jiang, Z., Minato N., Pin, J.P., Su, L. & Liu, J. GABAB receptor promotes its own surface expression by recruiting

- a Rap1-dependent signaling cascade. *J Cell Sci* 128, 2302-13 (2015). doi:10.1242/jcs.167056.
- Zhang, Y., Gong, Y., Hu, D., Zhu, P., Wang, N., Zhang, Q., Wang, M., Aldeewan, A., Xia, H., Qu, X., Ring, B.Z., Minato N. & Su, L. Nuclear SIPA1 activates integrin beta1 promoter and promotes invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 34, 1451-62 (2015). doi:10.1038/onc.2014.36.
- Ohigashi I, Zuklys S, Sakata M, Mayer CE, Hamazaki Y, Minato N, Hollander GA, Takahama Y. Adult thymic medullary epithelium is maintained and regenerated by lineage-restricted cells rather than bipotent progenitors *Cell Rep*. 2015 Nov 17;13(7):1432-43. doi: 10.1016/j.celrep.2015.10.012.
- Tahir S, Fukushima Y, Sakamoto K, Sato K, Fujita H, Inoue J, Uede T, Hamazaki Y, Hattori M, Minato N. A CD153-CD4+ T Follicular Cell Population with Cell-Senescence Features Plays a Crucial Role in Lupus Pathogenesis via Osteopontin Production. *J Immunol*. 2015 Jun 15;194(12):5725-35. doi: 10.4049/jimmunol.1500319.
- Supper, E., Tahir, S., Imai, T., Inoue, J. & Minato N. Modification of Gene Expression, Proliferation, and Function of OP9 Stroma Cells by Bcr-



研究代表者

WATANABE, Takeshi

公益財団法人田附興風会・医学研究所・

特任研究指導者

+0028684

免疫組織の新規構築による疾患制御のための技術開発

(平成24年度～平成28年度) Regeneration and Synthesis of Functioning Lymphoid Tissues/Organs Composed of Mouse or Human Lymphoid Cells.

渡邊 武 公益財団法人田附興風会・医学研究所

研究開始当初の背景

免疫系は生体の恒常性を維持／調節するダイナミックで可塑性に富んだ高次システムであるが、成人における胸腺などの一次免疫組織の機能低下と退縮、加齢やがん、重症感染症などによる二次リンパ組織の変容、破綻が不可逆的に引き起こされ、そのために生命の維持が危機に曝されることがしばしば生じる。これを克服する手段は殆どないのが現状である。そこで、免疫組織の再構築の技術を確立して、加齢、がんの進行等による低下した免疫機能の回復、重症感染症、がん、自己免疫病など難治性疾患の治療に有用な免疫デバイスをあらかじめ準備できればこれらの問題の解決の有力な手段になることが期待される。我々は、これまでにマウスのリンパ組織ストローマ細胞とその組織構築を支えるscaffoldとしてコラーゲンスポンジを用いてマウス体内で末梢リンパ節と類似した3次元組織を人工的に構築することに成功し、この人工的に構築したリンパ組織内に抗原特異的高親和性抗体を産生する免疫反応を誘導出来ることを報告してきた。また、体内でその3次元構造が長期間安定に維持されること、免疫不全マウスに移植すると免疫不全状態の個体において免疫能の著明な改善がもたらされることを示してきた。近年、各種臓器のorganoidsの構築など臓器組織の再構築と応用に向けた取り組みが盛んであるが、免疫研究においてもその必要性が求められる。我々は世界に先駆けて免疫組織、臓器の再構築の研究に取り組んできた。しかし我々以外にも国内でも国際的にも研究が未だ殆ど行われていないのが現状である。本研究では我々の国際的にもユニークな免疫系organoidsの構築の研究をさらに推進し、有用なヒト型免疫組織を構築して癌、自己免疫病などの疾患の解析、治療に貢献することを目標とする。

研究の目的

本研究ではこれまでの我々の成果を踏まえて、抗原特異的免疫反応誘導能を有し、かつ体内において長期間安定な「ヒト」二次リンパ節様組織の人工的構築法を確立し、その感染防御能、抗腫瘍免疫誘導能、抗原特異的高親和性ヒト抗体産生細胞の樹立などを証明し、さらには自己免疫疾患の免疫細胞を用いて免疫不全マウスに人工リンパ節組織を構築して「ヒト自己免疫病モデルマウス」を作製して、人工リンパ節様組織構築研究の有用性、必要性を示す。さらに、ヒト型人工二次リンパ節組織による抗腫瘍免疫治療法の

効果の定量化および抗がん剤の免疫系への影響を測定出来る新たなモニター法を確立する。また、「ヒト自己免疫病マウスモデル」を確立することにより、ヒト自己免疫病の解析、治療法開発のためのデバイスの開発を目指す。

これらの目的を達成するために以下の研究を実施する。

- (1) 二次免疫組織(リンパ節、脾臓、粘膜免疫組織など)の人工的再構築に必要な「ヒト型リンパ組織特異的ストローマ細胞」の作製を行う。さらには、作成したヒト免疫系ストローマ細胞の機能に関わる液性因子の解明、同定を行い、「人工リンパ組織特異的ストローマ」を構築してストローマ細胞を用いない液性因子のみによるヒト型人工リンパ節の構築法」の確立を行う。
- (2) 人工ヒト免疫組織の形成と維持に適した生体適合高分子基材の改良、開発を行う。
- (3) 生体適合性高分子基材内への抗体産生細胞、キラーT細胞、記憶T/B細胞、制御性T細胞など機能の異なる細胞集団の集積を促し、異なった免疫調節機能を発揮させる免疫デバイスの開発を試みる。
- (4) 構築したヒト型人工免疫組織の臨床応用に向けた基礎的研究を免疫不全マウス、ヒト化マウスなどを用いて行う。
- (5) 抗腫瘍免疫治療法の効果判定及び抗がん剤の免疫系への影響を測定しうる新たなモニター法を確立する。
- (6) 自己免疫疾患患者リンパ球を用いてヒト型リンパ組織を構築して免疫不全マウスに移植して「ヒト自己免疫病マウスモデル」の構築を目指す。
- (7) ヒト免疫系における4次元免疫空間での免疫反応の解析を人工的に作成した免疫組織で行う。

研究の方法

- (1) ヒト間葉系幹細胞より誘導したリンパ組織ストローマ細胞の樹立を行う。ヒト間葉系幹細胞株化細胞からリンフォトキシン(LT α 1 β 2)、Retinoic Acid (RA)などとの共培養によりヒトリンパ組織ストローマ様細胞を分化誘導する。
- (2) リコンビナントヒトtype Iコラーゲンペプチドポリマーを作製し(1)で確立したヒトリンパ組織ストローマ細胞に加えて培養してストローマ細胞のスフェロイドを形成する。ついでストローマ細胞スフェロイドとヒト末梢血液リンパ球を混合してコラーゲンスポンジに

吸着させて、重度免疫不全(NOG)マウス腎臓被膜下へ移植することによりヒト型人工リンパ節組織を構築する。

- (3) ヒトリンパ組織ストローマ様細胞が発現するケモカイン、サイトカイン、増殖因子などの液性因子、接着因子を同定し、それらを安定して含有し徐々に放出できる新規徐放性ゲルを作成する。それら徐放性ゲルを支持体(scaffold)であるコラーゲンスポンジに結合させてリンパ組織特異的「人工ストローマ」を作製する。次に作製した「人工ストローマ」とヒト末梢血リンパ球とを混合して重度免疫不全(NOG)マウス腎臓被膜下へ移植する。
- (4) 上記2、3のいずれの場合も2–3週間後に構築されてくる人工ヒトリンパ節組織を回収し①組織構造を免疫組織染色で解析する、②人工リンパ節組織を移植された重度免疫不全(NOG)マウスを抗原で免疫して人工ヒトリンパ組織における免疫反応(抗体産生、サイトカイン産生、キラーT細胞活性、免疫抑制活性)などについて検討する。③一方、がん患者から外科的に摘除されたがん組織の組織片を免疫不全マウスで継代移植してPDX (patient-derived xenograft) マウスを確立する。摘除がん組織の供給者である同じ患者から末梢血リンパ球を調整して上記の(2)または(3)の方法で人工リンパ節組織を構築して、その人工リンパ組織を同一患者由来のPDXマウスに移植してその抗腫瘍活性を測定にする。④上記の系を用いて、抗PD-1抗体などチェックポイント抗体の投与による抗腫瘍活性の亢進の有無、さらに抗がん剤の効果と免疫組織への影響を測定出来る測定系を確立する。
- (5) ヒト造血幹細胞導入により作製されたヒト化マウスをさらに改良し「新規免疫ヒト化マウス」を創出する。HLA、サイトカインを含むヒト遺伝子をヒト化マウスに導入して抗原特異的免疫反応が誘導出来るヒト化マウスの確立を目指す。NOD/SCIDマウスまたはNOD/SCID/Il2rgKO(NSG)マウスからは、直接ES細胞を用いた遺伝子組換えができない事から、一旦、BALB/c/バックグラウンドでの遺伝子組換えの上、NSGへのバッククロスを行う。このヒト遺伝子組み換え新規免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移入して「新規免疫ヒト化マウス」を作成し、これを用いてヒト免疫細胞の分化・成熟・免疫機能に関する研究を実施する。この新規免疫ヒト化マウスに、上記のスフェロイド化したヒトリンパ組

織ストローマ細胞または「人工ストローマ」を移入することによりヒト型人工リンパ節の構築を試みる。

研究成果

- (1) リンパ組織特異的ストローマ細胞を用いたヒトリンパ節組織の構築。
ヒト間葉系幹細胞株より今回新たに確立したヒトストローマ細胞クローンはlymphotoxin- β 受容体(LT β R)及びリンパ組織特異的ケモカイン(CCL19, CCL21, CXCL12, CXCL13, CCL6など)、接着因子分子群(VCAM-1, ICAM-1など)を発現していた。確立したヒトストローマ細胞とリコンビナントヒト型コラーゲンペプチド(細胞接着部位のタンデムリピートから構成されている)とを混合培養してヒトストローマ細胞のスフェロイドを構築した。
このヒト型ストローマ細胞スフェロイドとヒト末梢血リンパ球を混合しLT β R受容体に対するリガンド LT α 1 β 2を加えて培養し、免疫系を完全に欠損した免疫不全マウス(NSG, NOG)の腎臓被膜下に移植する。2–3週間後に「100%の頻度」で数ミリ大のヒトリンパ球のみの細胞塊の形成が得られた。作製した人工免疫組織は以下のような特性を有する。①ヒトT細胞、B細胞、樹状細胞クラスターから構成されている、②T細胞領域とB細胞濾胞領域が明確な区別が見られた。③B細胞領域にはストローマ細胞由来の濾胞樹状細胞(FDC)が認められ、胚中心が形成され抗原刺激でB細胞の活発な増殖が誘導された、④後述するように抗原刺激により抗原特異的高親和性抗体産生細胞が人工リンパ節内に多数出現した、⑤高内皮細静脈(HEV)が形成され、毛細血管網、機能的な毛細リンパ管が形成されていた、⑥人工リンパ節組織のT細胞領域に精緻に張り巡らされたストローマ細胞由来の線維芽様細胞網細胞(FRC)ネットワークが構築されていた。⑦ヒト人工リンパ節組織の構造は免疫不全マウス体内で長期間安定である、⑧人工リンパ節組織は容易に摘出及び他の個体への再移植が容易である、⑨人工リンパ組織は皮質、髄質構造、リンパ組織の外側の皮膜構造を持たないことから我々が構築した組織は三次リンパ組織と考えられる。

- (2) 液性因子のみで作製した「人工ストローマ」で二次リンパ組織を構築する方法の開発。
ストローマ細胞を常に準備することは必ずしも容易でない場合も考えられることからストローマ細胞を用いない方法も確立した。体内各所に存在すると思われるリンパ組織オルガナイザー(リンパ組織ストローマ細胞)を刺激するために①LT α 1 β 2, sRANKL,およびLIGHTタンパク、TNF α 、②免疫細胞増殖維持のためにIL-4, GM-CSFなどのサイトカイン、③免疫細胞の遊走促進のためにCCL19, CCL20, CXCL12, CXCL13などのケモカイン、のそれぞれのタンパクを別個に徐放性ゲル(Medgel)に含有させる。調整された徐放性ゲルを全て混合して、VCAM-1を結合させたコラーゲンスポンジ上に添加した後正常マウスまたはヒト化マウスの腎臓皮膜下に移植した。その結果、再現性良く、移植片内にはT細胞、B細胞クラスターから構成されるリンパ組織が再現よく形成された(Y. Kobayashi, T. Watanabe. 2016)。T細胞クラスター内にはストローマ細胞follicular reticular cell (FRC) のネットワークの形成と多数の樹状細胞の分布、B細胞クラスター内にfollicular dendritic cell (FDC)ネットワークの局在を認めた。抗原刺激によりIgGクラスのhigh affinity antibodyの産生が誘導された。

- (3) ヒト型人工リンパ節組織での免疫反応誘導能。
ワクチン(水痘、インフルエンザ、肝炎ウイルスなど)接種を受けた正常人の末梢血リンパ球を用いて構築したヒト型人工リンパ組織をナイーブ免疫不全マウスに移植しワクチンウイルス抗原で免疫した。その結果、効率よくIgGクラス抗ウイルス抗体及びT細胞からのIFN γ の産生が誘導された。一方、人工リンパ節組織内およびその移植個体において自己抗体の産生は全く惹起されない以上から、我々が構築したヒト型リンパ組織は二次リンパ組織とほぼ同等の構造をもつヒト型三次リンパ組織であり、抗原刺激により抗原特異的に強い免疫反応を惹起する機能を有することが示された。現在、以下の(5)において記述するようにヒトがん細胞に対するキラーT細胞誘導能などについての検討、ヒト自己免疫病モデルマウスの作製に向けた研究を開始している。

- (4) 生体での脾臓の再生に関わるストローマ細胞の同定と脾臓の再構築。
脾臓の白脾髄はリンパ節と同様に重要な二次免疫組織である。また赤脾髄には大量のマ

クロファージが存在し循環血液中を流れる病原体を排除する役割を果たすと共に老化赤血球を処理する。従って、脾臓も二次リンパ組織として生命維持にとって重要な臓器である。脾臓は再生能力の高い臓器と考えられているが成人での脾臓の再生を制御しているストローマ細胞については全く不明であり、さらに成人における脾臓の再生について研究はこれまで皆無であった。我々は本研究において、そのストローマを同定、分離し、そのストローマ細胞を用いて成体において脾臓を再構築することに成功した。我々はまず、マウスの系において生後からadultまでのマウスの非造血系の脾臓間質細胞の中に少量であるが成人での脾臓の再生を誘導できる細胞が存在することを見出した。ついでその分離同定、単離を行なった。生後3日からadultのマウス脾臓中の非造血血細胞(CD45-)の間質細胞を調整し、細胞表面マーカーを指標にその脾臓再生能力を検討した結果、CD45-,CD31+,CD201+,CD105+,PDGFR α などの表面マーカーをもつ細胞(脾臓間質細胞の0.02%)を精製単離した。その細胞をマウス腎皮膜下に移植すると完全な構造の脾臓(白脾髄、赤脾髄)が再構築された。抗原刺激により強い二次免疫反応が誘導された。以上の結果から、生後—成人の脾臓よりストローマ細胞を精製することにより二次リンパ組織である脾臓組織organoidsを構築し、整体に移植することにより抗原特異的免疫反応を誘導できる可能性が示された。

(5) 現在進行中の取り組み。

- ①がん患者の外科摘除がん組織を免疫不全マウス(NOGまたはNSGマウス)に移植して継代することによりPDX (patient-derived xenograft) マウスを確立する。同時に同じ患者の末梢血リンパ球を用いて、研究成果(1)の方法で人工ヒトリンパ節組織を構築する。(A)その人工ヒトリンパ組織を同一患者由来のPDXマウスに移植して人工ヒトリンパ節組織の抗腫瘍活性を測定にする。これにより、個々の患者の腫瘍免疫能力をより正確に把握することができる。また、腫瘍免疫研究のための疾患モデルとなる。(B)抗PD-1抗体などチェックポイント受容体に対する抗体の投与あるいは種々の免疫賦活化療法での抗腫瘍活性の亢進の程度を検定する系として有用になると期待される。(C)抗がん剤の腫瘍に対する効果と同時に抗がん剤の免疫組織への影響の程度を測定出来る系であることから、がん治療の有効性と副作用を同時に検定出来る新たな方法と

なる。
②ヒト免疫細胞による自己抗体あるいは自己抗原反応性T細胞を発現するモデルマウスの作製。全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ(RA)などの自己免疫疾患患者末梢血リンパ球から人工リンパ節組織を免疫不全マウス(NOGまたはNSGマウス)に構築し、さらにそのマウスに標的となるヒト組織、臓器片を移植して「ヒト自己免疫病モデル」を構築する。

研究組織

研究分担者

石川 文彦 (ISHIKAWA, Fumihiko)
国立研究開発法人理化学研究所・
統合生命医科学研究センター・
グループディレクター
研究者番号: 30403918



主な発表論文等

(雑誌論文) (計30件)

- 1) J.K.H. Tan and T. Watanabe. Stromal cell subsets directing neonatal spleen regeneration. *Scientific Reports*. 査読あり7:40401 (2017) doi: 10.1038/srep40401
- 2) Y. Kobayashi, T. Watanabe. Gel-trapped lymphorganogenic chemokines trigger artificial tertiary lymphoid organs and mount adaptive immune responses in vivo. *Frontiers in Immunology* 査読あり7:316,(2016). doi:10.3389/fimmu.2016.00316
- 3) R. Ikebuchi, S. Teraguchi, A. Vandenbon, T. Honda, FHW Shand, Y. Nakanishi, T. Watanabe, M. Tomura. A rare subset of skin-tropic regulatory T cells expressing Il10/Gzmb inhibits the cutaneous immune response. *Scientific Reports* 査読あり6:35002, (2016). doi: 10.1038/srep35002.
- 4) K. Kadono, Y. Uchida, H. Hirao, T. Miyauchi, T. Watanabe, T. Iida, S. Ueda, A. Kanazawa, A. Mori, H. Okajima, H. Terajima, S. Uemoto. Thrombomodulin attenuates inflammatory damage due to liver ischemia and reperfusion injury in mice in Toll-like Receptor 4-dependent manner. *American J. of Transplantation* 査読あり17(1) 69-80 (2017) doi:10.1111/ajt.13991
- 5) Y. Kobayashi, K. Kato, M. Nakamura, T. Watanabe. Synthesis of functional tertiary lymphoid organs. p151-170, (2016). In "Synthetic Immunology" Springer Nature, (2016). doi: 10.1007/978-4-431-56027-2-7
- 6) M. Nakamura, K.Arai, T.Mimura, K. Kato, J.Tagawa, H.Yoshida, T.Nakaji-Hirabayashi, Y.Kobayashi, T.Watanabe. Engineering of artificial lymph node. p181-200, (2016). Synthetic Immunology. Springer Nature, doi: 10.1007/978-4-431-56027-2-7
- 7) R. Parmentier, Y. Zhao, M. Perier,

- H. Akaoka, M. Lintunen, Y. Hou, P. Panula, T. Watanabe, P. Franco, J-S. Lin. Role of histamine H1-receptor on behavioral states and wake maintenance during deficiency of a brain activating system: A study using a knockout mouse model. *Neuropharmacology* 査読あり106:20-34, (2016) doi:10.1016/j.neuropharm.2015.12.014
- 8) Y. Najima, M. Tomizawa-Murasawa, Y. Saito, T. Watanabe, R. Ono, T. Ochi, Suzuki N, H. Fujiwara, O. Ohara, LD. Shultz, M. Yasukawa, F. Ishikawa. Induction of WT1-specific human CD8+ T cells from human HSCs in HLA class I Tg NOD/SCID/IL2rgKO mice. *Blood* 査読あり127: 722-734 (2016) doi: 10.1182/blood-2014-10-604777
- 9) S. Kobayashi, T. Watanabe, R. Suzuki, M. Furu, H. Ito, J. Ito, S. Matsuda, H. Yoshitomi. TGF-β induces the differentiation of human CXCL13-producing CD4+ T cells. *European J. Immunol.* 査読あり46(2):360-371, (2015) doi: 10.1002/eji.201546043
- 10) M. Hara-Chikuma, H. Satooka, Y. Miyachi, T. Watanabe, AS. Verkman. Aquaporin-3 mediated hydrogen peroxide transport required for NF-kB signaling in epidermal keratinocytes and development of psoriasis. *Nature Communication* 査読あり6:7454. (2015) doi: 10.1038/ncomms8454
- 11) H. Hirao, Y. Uchida, K. Kadono, H. Tanaka, T. Niki, A. Yamauchi, K. Hata, T. Watanabe, H. Terajima, S. Uemoto. The protective function of galectin-9 in liver ischemia and reperfusion injury in mice. *Liver Transplantation* 査読あり21(7): 969-81. (2015) doi: 10.1002/lt.24159
- 12) Y. Aoki, T. Watanabe, Y. Saito, Y. Kurok, A. Hijikata, M. Takagi, D. Tomizawa, M. Eguchi, M. Eguchi-Ishimae, A. Kaneko, R. Ono, K. Sato, N. Suzuki, S. Fujiki, K. Koh, E. Ishii, LD. Shultz, O. Ohara, S.

- Mizutani, F. Ishikawa. Identification of CD34+ and CD34- leukemia -initiating cells in MLL-rearranged human acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 査読あり 125:967 (2015) doi: 10.1182/blood-2014-03-563304
- 13) M. Tomura, A. Hata, S. Matsuoka, F.H.W. Shand, Y. Nakanishi, R. Iiebuchi, S. Ueda, H. Tsutsui, K. Inaba, K. Matsushima, A. Miyawaki, K. Kabashima, T. Watanabe, O. Kanagawa. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Scientific Reports*. 査読あり 4: 6030, (2014) doi: 10.1038/srep06030
- 14) J.K.H. Tan and T. Watanabe. Murine spleen tissue regeneration from neonatal spleen capsule requires lymphotoxin priming of stromal cells. *The Journal of Immunology*. 査読あり 193:1194- 1203, (2014) doi:10.449/jimmunol.1302115
- 15) T. Hirayama, Y. Asano, H. Iida, T. Watanabe, T. Nakamura, R. Goitsuka. Meis1 is required for the maintenance of postnatal thymic epithelial cells. *PLoS One*. 査読あり 9(3):e89885, (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0089885
- 16) H. Shiheido, C. Chen, M. Hikida, T. Watanabe, and J. Shimizu. Modulation of the human T cell response by a novel non-mitogenic anti-CD3 antibody. *PLoS One* 査読あり 9(4): e94324. (2014). doi:10.1371/journal.pone.0094324
- 17) H. Shiheido, K. Kitagori, C. Sasaki, S. Kobayashi, T. Aoyama, K. Urata, T. Oku, Y. Hirayama, H. Yoshitomi, M. Hikida, H. Yoshifuji, T. Mimori, T. Watanabe, and J. Shimizu. Human T cells expressing BEND3 on their surface represent a novel subpopulation that preferentially produces IL-6 and IL-8. *Immunity, Inflammation and Diseases*. 査読あり 2(1): 35-43, (2014) doi:10.1002/iid3.17
- 18) H. Shiheido, T. Aoyama, H. Takahashi, K. Hanaoka, T. Abe, E. Nishida, C.

- Chen, O. Koga, M. Hikida, Y. Shibagaki, A. Morita, T. Nikawa, S. Hattori, T. Watanabe, and J. Shimizu. A novel CD3-specific antibody induces immunosuppression via impaired phosphorylation of LAT and PLCγ1 following T-cell stimulation. *Europ. J. Immunol.* 査読あり 44: 1770-1780, (2014) doi: 10.1002/eji.201344146
- 19) LD Shultz, Goodwin N, Ishikawa F, Hosur V, Lyons BL, Greiner DL. Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models. *Cold Spring Harb Protocol*. 査読あり 694 (2014)doi: 10.1101/pdb.top073585
- 20) Nomachi A., M.Yoshinaga, J.Liu, K.Tohyama, P.Kanchanawong, D.Thumkeo, T.Watanabe, S.Narumiya, T.Hirata. Moesin controls clathrin-mediated S1PR1 internalization in T cells. *PLoS One*. 査読あり8 (12):e82590, (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0082590
- 21) S. Kobayashi, K. Miura, H. Shibuya, M. Morita, M. Ishikawa, M. Furu, H. Ito, S. Matsuda, T. Watanabe, H. Yoshitomi. A distinct human CD4+ T cell subset that secretes CXCL13 in rheumatoid synovitis. *Arthritis and Rheumatism*. 査読あり65:3063-3072, (2013) doi: 10.1002/art.38173
- 22) A. Otsuka, S. Nakajima, M. Kubo, G. Egawa, T. Honda, A. Kitoh, T. Nomura, S.Hanakawa, C. Moniaga, B. Kim, S Matsuoka, T. Watanabe, Y. Miyachi, K.Kabashima. Basophils are required for the induction of Th2 immunity to haptens and peptide antigens. *Nature Comm*. 査読あり4:1739, (2013). doi: 10.1038/ncomms2740.
- 23) R. Frei, R. Ferstl, P. Konieczna, M. Ziegler, T.Simon, TM Rugeles, S. Mailand, T. Watanabe, R. Lauener, C. Akdis, L. O'Mahony. Histamine receptor 2 modifies dendritic cell responses to microbial ligands. *J Allergy and Clinical Immunology* 査読あり132:194-204, (2013) doi:org: 10.1016/j.jaci.2013.01.013
- 24) F. Ishikawa. Modeling normal and malignant human hematopoiesis in vivo through newborn NSG

- xenotransplantation. *Int J Hematol*. 査読あり 98: 634 (2013) doi: 10.1007/s12185-013-1467-9
- 25) T. Mashimo, A. Takizawa, J Kobayashi, Y. Kunihiro, K Yoshimi, Sa Ishida, K Tanabe, A.Yanagi, A Tachibana, J Hirose, J Yomoda, S Morimoto, T Kuramoto, B Voigt, T Watanabe, H Hiai, C Tateno, K Komatsu, T Serikawa.. Generation and Characterization of Severe Combined Immunodeficiency Rats. *Cell Reports* 査読あり 2:685-694, (2012). doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.009
- 26) Y. Saito, Yuki H, Kuratani M, Hashizume Y, Takagi S, Honma T, Tanaka A, Shirouzu M, Mikuni J, Handa N, Ogahara I, Sone A, Najima Y, Tomabechi Y, Wakiyama M, Uchida N, Tomizawa-Murasawa M, Kaneko A, Tanaka S, Suzuki N, Kajita H, Aoki Y, Ohara O, Shultz LD, Fukami T, Goto T, Taniguchi S, Yokoyama S, Ishikawa F. A pyrrolo-pyrimidine derivative targets human primary AML stem cells in vivo. *Sci Transl Med*. 査読あり 5:181ra52. (2013) doi: 10.1126/scitranslmed.3004387

- 27) Takagi S, Saito Y, Hijikata A, Tanaka S, Watanabe T, Hasegawa T, Mochizuki S, Kunisawa J, Kiyono H, Koseki H, Ohara O, Saito S, Taniguchi S, Shulz LD, Ishikawa F. Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. *Blood* 査読あり119:2768-2777, (2012) doi:10.1182/blood-2011-05-353201
- 28) T. Hirata, A. Nomachi, K. Tohya, M. Miyasaka, S. Tsukita, T. Watanabe, S. Narumiya. Moesin-deficient mice reveal a non-redundant role for moesin in lymphocyte homeostasis. *Int. Immunol.* 査読あり 24: 705-717, (2012) doi:10.1093/intimm/dxs077

(学会発表) (計9件)

- 1) 小林由佳、渡邊 武：“Trial of the generation of artificial lymph nodes by a cell-free method” シンポジウム“Environment Controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems” 2016年3月2日。理化学研究所、横浜市。
- 2) 小林由佳、渡邊 武：“The generation of human-type artificial lymphoid tissues (aLTs)”第45回日本免疫学会学術

- 集会2016年12月5日。沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市。
- 3) 小野林太郎、石川文彦:Understanding the role of IL-6 in human immunity 国際免疫学会、2016年8月24日、メルボルン、オーストラリア
- 4) 小野林太郎、石川文彦:Understanding the role of IL-6 in human immunity 第45回日本免疫学会学術集会2016年12月5日。沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市。
- 5) 渡邊 武「京都大学産学連携プロジェクト:創薬医学融合拠点AKプロジェクトの取り組み」人工リンパ節組織の構築とその免疫機能」北海道大学産学連携拠点形成シンポジウム。2013年1月23日。札幌市。
- 6) 渡邊 武:「高い免疫誘導能を発揮するリンパ節組織の人工的構築」日本アレルギー学会春季臨床大会教育講演。2012年5月12日。大阪国際会議場、大阪市。
- 7) T. Watanabe: "Construction of artificial lymphoid tissues". 招待講演、於Institute for Immunology, Medizinische Hochschule, 2012年10月4日。ドイツ国、ハノーバー市。
- 8) 小林由佳、渡邊 武：“Trial of the generation of artificial lymph nodes by a cell-free method” 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5日。神戸

- 国際会議場、神戸市。
- 9) 渡邊 武、高浜洋介:Workshop on Synthetic Immunology 主催、講演。2012年5月18, 19日及び2013年11月15, 16日、芝蘭会館、京都市。

(図書) (計1件)

"Synthetic Immunology"
編集及び執筆: Takeshi Watanabe, Yosuke Takahama. Springer Nature社 (2016) 200ページ doi: 10.1007/978-4-431-56027-2

(産業財産権)

○取得状況(計1件)
名称: Artificial Lymph Node for Treating Cancer (癌治療用人工リンパ節)
発明者: Takeshi Watanabe, Kouji Tanaka
権利者: Takeshi Watanabe
種類: United States Patent
番号: US8,101,195 B2 (米国)
特許5526441号 (国内)
取得年月日: Jan 24, 2012
国内外の別: 米国、国内

サイトカイン産生性免疫微小環境の可視化と機能解析

(平成25年度～平成26年度) **Visualization and function of cytokine-producing immune microenviron- ment**

サイトカイン産生性免疫微小環境の機能解析

(平成27年度～平成28年度) **Function of cytokine-producing immune microenvironment**

生田 宏一 京都大学・ウイルス・再生医科学研究所



研究開始当初の背景

免疫微小環境はリンパ球の分化・維持・応答に重要な働きをしているが、機能的なマーカーが少ないためその実態は十分にはわかっていない。免疫微小環境において特に重要なサイトカインとしてIL-7とIL-15が知られている。IL-7は、骨髄の間葉系ストローマ細胞、胸腺上皮細胞、末梢リンパ節の細網線維芽細胞、皮膚や消化管の上皮細胞などから産生され、初期リンパ球の増殖・分化、CD8 T細胞の正の選択、成熟T細胞の維持などに関与している。近年、IL-7産生細胞を可視化するためにいくつかのIL-7-YFP/CFP BAC トランスジェニックマウスが作られたが、骨髄と胸腺以外ではIL-7の発現が検出されなかった。

一方、IL-15もNK細胞の増殖・分化や成熟T細胞の維持など免疫系において重要な働きをしている。IL-15は骨髄では間葉系ストローマ細胞から産生され、NK細胞の増殖・分化に必須である。また、リンパ節でのT細胞の維持、皮膚や消化管の上皮でのγδ T細胞の維持、肝臓でのNKT細胞の維持に関与している。さらに、樹状細胞が産生するIL-15は炎症反応の誘導に密接に関係している。しかしながら、IL-15産生細胞の生体内における分布と局所における機能については詳細が不明である。

研究代表者らは、IL-7産生細胞の生体内分布を調べるためにIL-7-GFPノックインマウスを独自に作製して解析した。その結果、骨髄や胸腺のみならず末梢のリンパ節や腸管上皮においても初めてIL-7産生細胞を検出し、ノックイン法の有用性を示した(Hara et al, *J Immunol*, 189:1577, 2012)。また、組織特異的IL-7遺伝子破壊マウスを作製し、肝細胞が産生するIL-7が肝臓内のT細胞とNKT細胞の維持に重要な働きをすること(Liang et al, *J Immunol*, 189:4444, 2012)を明らかにした。本研究では、組織特異的IL-7遺伝子破壊マウスを用いて、骨髄・胸腺・腸管などの組織におけるIL-7の機能について研究を進める。

一方、免疫微小環境の全体像を解明するためには、IL-7とともに重要なサイトカインである

IL-15についても調べる必要がある。そこで、研究代表者は、IL-15-CFPノックインマウスと組織特異的IL-15遺伝子破壊マウスという新たな実験系を構築し、IL-15の産生能を手がかりにして免疫微小環境を詳細に解析することを着想した。そのために、IL-15-CFPノックインマウスを独自に作製した。さらに、組織特異的IL-15遺伝子破壊マウスの作製をほぼ終えている。本研究では、このIL-15産生細胞の分布に関する詳細な解析を進めるとともに、組織特異的IL-15遺伝子破壊マウスを用いて、各組織における機能についても研究を進展させる。

研究の目的

本研究は、研究代表者らが独自に作製したIL-15-CFPノックインマウスと組織特異的IL-7、IL-15遺伝子破壊マウスを用いて、IL-15産生細胞の生体内分布とIL-7とIL-15の局所における機能を明らかにする。

A. IL-15産生細胞の生体内分布

IL-15遺伝子座にCFP遺伝子をノックインしたIL-15-CFPノックインマウスを用いて、骨髄、胸腺、リンパ節、脾臓、皮膚・腸管上皮、肝臓におけるCFPの発現を解析することで、IL-15産生細胞の生体内分布を明らかにする。

B. IL-7産生細胞の局所における機能

組織特異的IL-7遺伝子破壊マウスを用いて、骨髄ストローマ細胞、腸管上皮細胞、リンパ管内皮細胞などにおいてIL-7遺伝子を特異的に破壊し、T細胞の分化・成熟・維持とリンパ組織の形成に対する影響を解析することで、各IL-7産生細胞の局所における機能を明らかにする。

C. IL-15産生細胞の局所における機能

組織特異的IL-15遺伝子破壊マウスを用いて、胸腺上皮細胞、樹状細胞、皮膚上皮細胞、腸管上皮細胞、肝細胞などにおいてIL-15遺伝子を破壊し、T細胞とNK細胞の分化・成熟・維持に対する影響を解析することで、IL-15産生細胞の局所における機能を明らかにする。

研究の方法

A. IL-15産生細胞の生体内分布

IL-15-CFPマウスの骨髄、胸腺、脾臓、リンパ節、皮膚、消化管などの組織切片を作製し、CFP陽性のIL-15産生細胞の分布を共焦点顕微鏡にて観察する。骨髄についてはCFP陽性細胞と血管内皮細胞、NK細胞、CXCL12産生細胞との相対的な位置関係を解析する。また、胸腺においては間葉系ストローマ細胞と皮質と髄質の胸腺上皮細胞における発現強度を比較する。さらに、リンパ節では細網線維芽細胞や樹状細胞と分布が一致するかどうかを確認する。他のリンパ組織についてもCFP陽性細胞の分布を詳細に解析する。

IL-15-CFPマウスの骨髄から単細胞浮遊液を調整し、CFP陽性細胞の表面マーカーの発現をFACSにて解析する。また、IL-15-CFPマウスの胸腺からコラゲナーゼ処理により単細胞浮遊液を調整し、CFP陽性細胞の表面マーカーの発現をMHCクラスIIやLy51等の標識抗体とFACSにて解析する。胸腺上皮細胞と間葉系ストローマ細胞の間で、また皮質上皮細胞と髄質上皮細胞の間で、CFPの発現強度を比較する。さらに、さまざまな組織において樹状細胞でのCFPの発現をFACSにて解析する。

B. IL-7産生細胞の局所における機能

Prx1-Cre、Col2,3-Cre、Lepr-Cre、Tie2-CreとIL-7-floxマウスを交配したIL-7cKOマウスの骨髄細胞をFACSにて解析し、造血幹細胞、リンパ系前駆細胞、B細胞系列(Hardyのfraction A-F)の各分化段階の細胞数を計測する。また、CXCL12-GFPマウスの骨髄からCAR細胞を単離し、定量的RT-PCRにてIL-7の発現レベルを他の細胞集団と比較する。

Vil-Cre IL-7cKOマウスにおいて、粘膜下固有層リンパ球(LPL)のサイトカイン産生能や上皮細胞が産生するサイトカインなどを解析する。また、Vil-Cre IL-7cKOマウスでは、DSSまたはTCRα KOマウスによる慢性大腸炎の発症が減弱するが、LPLをFACSにて解析し、腸管上皮細胞が産生するIL-7が大腸炎の発症にどのように影響を及ぼすかを明らかにする。

Tie2-Cre IL-7cKOマウスにおいて、骨髄、胸腺、末梢血、脾臓、リンパ節におけるT細胞、NKT

細胞、NK細胞、B細胞をFACSにて解析する。また、これらの細胞におけるBcl-2の発現レベルをFACSにて比較する。次に、正常T細胞をCFSEでラベルし、上記マウスに移入後にリンパ節に分布する細胞数をFACSにて調べる。

C. IL-15産生細胞の局所における機能

胸腺上皮細胞でIL-15遺伝子が破壊されたFoxn1-Cre IL-15cKOマウスにおいて、特に胸腺におけるCD8細胞、NKT細胞、制御性T細胞の分化をFACSにて解析する。表皮細胞でIL-15遺伝子が破壊されたKeratin 5-Cre IL-15cKOマウスにおいて、皮膚上皮においてγδ T細胞の維持が障害されているかどうかをFACSおよび蛍光組織染色法にて解析する。消化管上皮細胞でIL-15遺伝子が破壊されたVillin-Cre IL-15cKOマウスにおいて、小腸上皮内リンパ球におけるγδ T細胞の割合と細胞数をFACSにて解析する。肝細胞でIL-15遺伝子が破壊されたAlb-Cre IL-15cKOマウスにおいて、肝臓内リンパ球におけるT細胞、NKT細胞、NK細胞の維持をFACSにて解析する。

血管内皮細胞でIL-15遺伝子が破壊されたTie2-Cre IL-15cKOマウスにおいて、骨髄、胸腺、脾臓、リンパ節、小腸における、T細胞、NKT細胞、NK細胞の分化・維持の状態をFACSにて解析する。また、蛍光標識した正常T細胞を移入後にリンパ節に分布する細胞数を解析し、ホーミングに障害がないかどうかを解析する。

研究成果

A. IL-15産生細胞の生体内分布

IL-15-CFPマウスの骨髄、胸腺、リンパ節、脾臓などの組織切片を作製し、CFP陽性のIL-15産生細胞の分布を共焦点顕微鏡にて観察した。胸腺ではIL-15は髄質に強く発現しており、MHCクラスII強陽性の成熟した髄質胸腺上皮細胞が主な産生細胞であった。骨髄ではIL-15は主に血管周囲に存在するVCAM-1陽性 PDGFRβ陽性CD31陰性Sca-1陰性ストローマ細胞に発現していた。リンパ節ではIL-15は主にT細胞領域と髄質に発現しており、線維芽細胞様細網細胞の一部で発現していた。さらに、高内皮性小静脈をふくむ血管内皮細胞でIL-15が強く発現していたが、リンパ管内皮細胞では発現していなかった。

脾臓ではVCAM-1陽性のストローマ細胞で発現しており、その数は加齢とともに増加した。また、LPSを投与して炎症を惹起すると、血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞のIL-15産生が亢進することを見出した。以上の結果から、免疫組織におけるIL-15産生細胞の分布を初めて明らかにし、IL-7とIL-15の発現パターンが一部の細胞で異なることを示した(Cui et al, *Proc Natl Acad Sci USA*, 111:1915, 2014)。

B. IL-7産生細胞の局所における機能

胸腺上皮細胞が産生するIL-7の局所における機能はよくわかっていない。この問題を解明するために、胸腺上皮細胞でCreを発現するFoxN1-Cre マウスとIL-7-floxedマウスを交配して、胸腺上皮細胞でIL-7遺伝子が破壊されたFoxN1-Cre IL-7 cKOマウスを作製し解析した。FoxN1-Cre IL-7 cKOマウスの胸腺では、αβ T細胞が減少していたが、γδ T細胞はさらに顕著に減少していた。このマウスの小腸上皮内のαβ T細胞が減少傾向を示すものかなり残っていたが、γδ T細胞はごくわずかしが存在しなかった。一方、腸管上皮細胞でCreを発現するVillin-Creマウスと交配したVillin-Cre IL-7 cKOマウスでは、小腸上皮内のαβ T細胞とγδ T細胞に変化はなかった。以上の結果から、胸腺上皮細胞が産生するIL-7が胸腺細胞の増殖と生存に重要な働きをしていることが明らかとなった。さらに、小腸上皮内のγδ T細胞が胸腺で分化するものに由来することが示された(Shitara et al, *J Immunol*, 190:6173-6179, 2013)。

骨髄において多能性前駆細胞(MPP)からリンパ球までの分化を支持する特異的なニッチが存在するのか解析した。CXCL12の受容体であるCXCR4をMPPから欠損させたマウスでは、共通リンパ系前駆細胞(CLP)への分化が抑制され、リンパ球造血能が低下した。また、B細胞分化に必須なサイトカインIL-7を産生するストローマ細胞に対して、CLPはCXCR4依存的に近接していた。さらに、IL-7産生性ストローマ細胞が、間葉系前駆細胞の約60%および少数の内皮細胞から成ることを見出した。間葉系前駆細胞(CAR細胞)からIL-7を欠損させたLepr-Cre IL-7cKOマウスでは、B細胞の初期前駆細胞が減少し、内皮細胞からIL-7を欠損させたTie2-Cre IL-7cKOマウスでは、プロB細胞およびプレB細胞が減少

していた。また、IL-7産生性ストローマ細胞からCXCL12やサイトカインSCFを欠損させたマウスでは、造血幹細胞とMPPの細胞数が減少していた。以上の結果から、造血幹細胞ニッチを構成するストローマ細胞の中に、分化方向を決定するサイトカインを産生する亜集団が存在し、これがMPP以降の分化を支持する特異的なニッチを形成していることが示された(Gomes AC, Hara T, et al. *Immunity*, 45:1219-1231, 2016)。さらに、骨髄の自然リンパ球(ILC)についても同様に解析した結果、Col2,3-Cre IL-7cKOマウスでILC前駆細胞が減少していた。したがって、B細胞と自然リンパ球では、そのIL-7ニッチが異なる可能性が示唆された(発表準備中)。

C. IL-15産生細胞の局所における機能

Foxn1-Cre IL-15cKOマウスの胸腺では、NKT細胞とγδ T細胞が減少していた。特に、NKT細胞についてはより成熟したCD244陽性段階のものの減少が大きかった。これらの結果はIL-15欠損マウスの表現型とよく一致しており、胸腺の中では胸腺上皮細胞が産生するIL-15が主要な働きをしていることが示された。また、肺においてもCD244陽性NKT細胞が著減していた。メラノーマB16F10細胞株をFoxn1-Cre IL-15cKOマウスに静脈注射すると、肺への転移巣が増加した。以上の結果から、胸腺上皮細胞が産生するIL-15に依存して分化するCD244陽性NKT細胞が、末梢での抗腫瘍免疫応答に重要な働きをしていることが明らかになった。一方、血管内皮細胞由来のIL-15がCD8 T細胞とiNKT細胞の胸腺外移出を制御している可能性を示した(発表準備中)。

骨髄のCAR細胞、血管内皮細胞、血液細胞においてIL-15遺伝子が破壊されるLepr-Cre、Tie2-Cre、Vav-Cre IL-15cKOマウスを解析し、血液細胞由来のIL-15がNK細胞、NKT細胞、メモリーCD8 T細胞の分化、成熟、維持に、血管内皮細胞由来のIL-15がNK細胞の成熟に関与していることを明らかにした。

リンパ節およびパイエル板において、細網線維芽細胞と血管内皮細胞でIL-15遺伝子が破壊されるCCL19-Cre、Tie2-Cre IL-15cKOマウスを解析し、細網線維芽細胞由来のIL-15が1型自



研究代表者

IKUTA, Koichi

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

90193177

然リンパ球の維持に必須であることを明らかにした(Gil-Cruz et al, *Nat Immunol*, 17:1388, 2016)。

肝臓において、肝細胞でIL-15遺伝子が破壊されるAlb-Cre IL-15cKOマウスを解析し、T細胞、NK細胞、NKT細胞の維持に関与していることを明らかにした。

腸管において、腸管上皮細胞でIL-15遺伝子が破壊されるVil-Cre IL-15cKOマウスを解析し、腸管上皮内リンパ球の内でCD8αα陽性 αβ T細胞とγδ T細胞が減少していること、これらの細胞においてBcl-2の発現が低下していることを明らかにした。

まとめ

IL-15-CFPマウスを解析することで、免疫組織におけるIL-15産生細胞の分布を初めて明らかにし、IL-7とIL-15の発現パターンが一部の細胞で異なることを示した。また、FoxN1-Cre IL-7cKOマウスを解析することで、胸腺上皮細胞が産生するIL-7が胸腺細胞の増殖と生存に重要であることを明らかにした。さらに、IL-7cKOマウスを用いて、間葉系前駆細胞(CAR細胞)と内皮細胞が、初期B細胞のニッチを形成することを示した。

研究組織

連携研究者

谷一 靖江(TANI-ICHI, Shizue)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号:50432331

原 崇裕(HARA, Takahiro)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教
研究者番号:90512301

石井 優(ISHII, Masaru)
大阪大学・医学研究科・教授
研究者番号:10324758

10.1016/j.molimm.2013.01.002.(査読有)

- Shitara S, Hara T, Liang B, Wagatsuma K, Zuklys S, Holländer GA, Nakase H, Chiba T, Tani-ichi S, and Ikuta K: Interleukin-7 produced by thymic epithelial cells plays a major role in the development of thymocytes and TCRγδ+ intraepithelial lymphocytes. *J Immunol*, 190:6173-6179, 2013. doi:10.4049/jimmunol.1202573.(査読有)
- Lee JK, Won C, Yi EH, Seok SH, Kim MH, Kim SJ, Chung MH, Lee HG, Ikuta K, and Ye SK: Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) contributes to T-cell homeostasis by regulating pro-survival Bcl-2 family genes. *Immunol*, 140:288-300, 2013. doi:10.1111/imm.12133.(査読有)
- Hanazawa A, Hayashizaki K, Shinoda K, Yagita H, Okumura K, Löhning M, Hara T, Tani-ichi S, Ikuta K, Eckes B, Radbruch A, Tokoyoda K, and Nakayama T: CD49b-dependent establishment of T helper cell memory. *Immunol Cell Biol*, 91:524-531, 2013. doi:10.1038/icb.2013.36.(査読有)

- Tsuneto M, Tokoyoda K, Kajikhina E, Hauser AE, Hara T, Tani-ichi S, Ikuta K, and Melchers F: B cell progenitors and precursors change their microenvironment in fetal liver during early development. *Stem Cells*, 31:2800-2812, 2013. doi:10.1002/stem.1421.(査読有)

(学会発表)(計11件)

- Ikuta K, Cui G, Shitara S, Liang B, Tani-ichi S, and Hara T. Visualization of the immune microenvironment by reporter mice.The 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2013,2013年6月7日、芝蘭会館、一般講演
- Hara T, Cui G, Shitara S, Tani-ichi S, and Ikuta K. Visualization and characterization of IL-7- and IL-15-expressing cells in vivo.The 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2013,2013年6月4-5日、芝蘭会館、ポスター
- 原崇裕、崔広為、設楽宗一郎、生田宏一: Distribution and function of IL-7-expressing cells in intestines,第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月11日、幕張メッセ、一般講演
- 原崇裕、崔広為、生田宏一: Distribution and function of IL-7- and IL-15-

expressing cells in intestines,第43回日本免疫学会学術集会、2014年12月12日、国立京都国際会館、ポスター

- Cui G, Hara T, Simmons S, Ishii M, Tani-ichi S, Ikuta K.: Characterization of the IL-15 niche in vivo. The 6th FIMSA Congress, 2015年7月1日、Sands Expo and Convention Centre at Singapore, ポスター

- 原崇裕、生田宏一: Identification and characterization of IL-7 niche in gut-associated lymphoid tissue,第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月19日、札幌コンベンションセンター、ポスター
- 阿部真也、原崇裕、生田宏一: 腸管関連リンパ組織におけるIL-7ニッチの同定と特徴、BMB2015, 2015年12月1日、神戸国際会議場、ポスター
- 原崇裕、生田宏一: 骨髄におけるリンパ球分化を制御するIL-7産生ストローマ細胞の同定、第26回Kyoto T Cell Conference, 2016年5月20日、延暦寺会館、一般講演
- 崔広為、榎葉旭恒、阿部真也、朱媛博、向平妃沙、谷一靖江、原崇裕、生田宏一: Local function of the IL-15 niche in thymus,第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月7日、沖繩コンベンションセンター、一般講演
- 阿部真也、原崇裕、崔広為、生田宏一:

Identification of IL-15 niche for NK cells in bone marrow,第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月7日、沖繩コンベンションセンター、ポスター

- 寺島明日香、岡本一男、審良静男、生田宏一、高柳広: Immunodeficiency caused by sepsis-induced osteoblast ablation,第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月7日、沖繩コンベンションセンター、一般講演

(その他)

ホームページ:

- 胸腺上皮細胞に由来するIL-7は胸腺細胞および腸管上皮内γδ T細胞分化に重要である
<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/about/recent.html>
 - 生体内リンパ器官におけるインターロイキン15ニッチの解明
<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/about/y2014/ikuta20140326.html>
- メディア報道:
- 日刊工業新聞2014年1月21日25面
 - 京都新聞2014年1月25日9面

主な発表論文等

(雑誌論文)(計22件)

- Shimba A, Cui G, Tani-ichi S, Ogawa M, Abe S, Okazaki F, Kitano S, Miyachi H, Yamada H, Hara T, Yoshikai Y, Nagasawa T, Schütz G, and Ikuta K. Glucocorticoids drive diurnal oscillations in T cell distribution and responses by inducing interleukin-7 receptor and CXCR4. *Immunity, in press*. 2018. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.004.(査読有)
- Nakamizo S, Honda T, Adachi A, Nagatake T, Kunisawa J, Kitoh A, Otsuka A, Dainichi T, Nomura T, Ginhoux F, Ikuta K, Egawa G, and Kabashima K. High fat diet exacerbates murine psoriatic dermatitis by increasing the number of IL-17-producing γδ T cells. *Sci Rep*, 7: 14076, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-14292-1.(査読有)
- *Gomes AC, *Hara T, Lim VY, Herndler-Brandstetter D, Nevius E, Sugiyama T, Tani-ichi S, Schlenner S, Richie E, Rodewald H, Flavell RA, Nagasawa T, Ikuta K, Pereira JP. Hematopoietic stem cell niches produce lineage-instructive signals to control multipotent progenitor differentiation. *Immunity*. 45:1219-1231, 2016. doi: 10.1016/j.immuni.2016.11.004. *equal first.(査読有)
- Gil-Cruz C, Perez-Shibayama C, Onder L, Chai Q, Cupovic J, Cheng H, Novkovic M, Lang PA, Geuking MB, McCoy KD, Abe S, Cui G, Ikuta K, Scandella E, and Ludewig B. Fibroblastic reticular cells regulate intestinal inflammation through IL-

15-mediated control of group 1 innate lymphoid cells. *Nat Immunol*, 17:1388-1396, 2016. doi: 10.1038/ni.3566.(査読有)

- Shinoda K, Hirahara K, linuma T, Ichikawa T, Suzuki AS, Sugaya K, Tumes DJ, Yamamoto H, Hara T, Tani-ichi S, Ikuta K, Okamoto Y, and Nakayama T. Thy-1^{hi}IL-7⁺ lymphatic endothelial cells in iBALT provide a survival niche for memory T-helper cells in allergic airway inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113 (20): E2842-2851, 2016. doi: 10.1073/pnas.1512600113.(査読有)
- Terashima A, Okamoto K, Nakashima T, Akira S, Ikuta K, and Takayanagi, H. Sepsis-induced osteoblast ablation causes immunodeficiency. *Immunity*, 44: 1434-1443, 2016. doi:10.1016/j.immuni.2016.05.012.(査読有)
- Huang Y, Getahun A, Heiser RA, Detanico TO, Kirchenbaum GA, Casper TL, Huang C, Aydintug MK, Carding SR, Ikuta K, Huang H, Wysocki LJ, Cambier JC, O'Brien RL, and Born WK: γδ T cells shape pre-immune peripheral B cell populations. *J Immunol*, 196: 217-231, 2015. doi: 10.4049/jimmunol.1501064.(査読有)
- Nishijima H, Kitano S, Miyachi H, Morimoto J, Kawano H, Hirota F, Morita R, Mouri Y, Masuda K, Imoto I, Ikuta K, and Matsumoto M: Ectopic Aire expression in the thymic cortex reveals inherent properties of Aire as a tolerogenic factor within the medulla. *J Immunol*, 195: 4641-4649, 2015. doi: 10.4049/jimmunol.1501026.(査読有)
- Adachi T, Kobayashi T, Sugihara E, Yamada T, Ikuta K, Pittaluga S, Saya H, Amagai M, and Nagao K:

Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident memory T cell homeostasis and lymphoma. *Nat Med*, 21: 1272-1279, 2015. doi: 10.1038/nm.3962.(査読有)

- Abe A, Tani-ichi S, Shitara S, Cui G, Yamada H, Miyachi H, Kitano S, Hara T, Abe R, Yoshikai Y, and Ikuta K: An enhancer of the IL-7 receptor α-chain locus controls IL-7 receptor expression and maintenance of peripheral T cells. *J Immunol*, 195: 3129-3138, 2015. doi: 10.4049/jimmunol.1302447.(査読有)
- 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, Nakano M, Kimura H, and Ikuta K: STAT5 orchestrates local epigenetic changes for chromatin accessibility and rearrangements by direct binding to the TCRγ locus. *J Immunol*, 195: 1804-1814, 2015. doi: 10.4049/jimmunol.1302456.(査読有)
- Alp ÖS, Durlanik S, Schulz D, McGrath M, Grün JR, Bardua M, Ikuta K, Sgouroudis E, Riedel R, Zehentmeier S, Hauser AE, Tsuneto M, Melchers F, Tokoyoda K, Chang HD, Thiel A, and Radbruch A: Memory CD8⁺ T cells colocalize with IL-7⁺ stromal cells in bone marrow and rest in terms of proliferation and transcription. *Eur J Immunol*, 45: 975-987, 2015. doi: 10.1002/eji.201445295.(査読有)
- Huang Y, Heiser RA, Detanico TO, Getahun A, Kirchenbaum GA, Aydintug MK, Smith CW, Carding SR, Ikuta K, Huang H, Wysocki LJ, Cambier JC, O'Brien RL, and Born WK: γδ T cells affect IL-4 production and B cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*,

112(1):E39-48, 2015. doi: 10.1073/pnas.1415107111.(査読有)

- 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-Jκ-IL-7Rα axis that controls IL-17-producing γδ T cell homeostasis in mice. *J Immunol*, 194: 243-251, 2015. doi: 10.4049/jimmunol.1401619.(査読有)
- Cui G, Hara T, Simmons S, Wagatsuma K, Abe A, Miyachi H, Kitano S, Ishii M, Tani-ichi S, and Ikuta K: Characterization of the interleukin-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111:1915-1920, 2014. doi:10.1073/pnas.1318281111.(査読有)
- Tsuneto M, Kajikhina E, Seiler K, Reimer A, Tornack J, Bouquet C, Simmons S, Knoll M, Wolf I, Tokoyoda K, Hauser A, Hara T, Tani-ichi S, Ikuta K, Grün JR, Grützkau A, Engels N, Wienands J, Yanagisawa Y, Ohnishi K, and Melchers F: Environments of B cell development. *Immunol Lett*, 157:60-63, 2014. doi: 10.1016/j.imlet.2013.11.011.(査読無)
- Tani-ichi S, Shimba A, Wagatsuma K, Miyachi H, Kitano S, Imai K, Hara T, and Ikuta K: The interleukin-7 receptor controls development and maturation of late stages of thymocyte subpopulations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110:612-617, 2013. doi:10.1073/pnas.1219242110.(査読有)
- Sekai M, Tani-ichi S, Yoneyama M, Fujita T, Kina T, and Ikuta K: Lymphocyte-stromal cell interaction induces IL-7 expression by interferon regulatory factors. *Mol Immunol*, 54:378-385, 2013. doi:

免疫老化、自己免疫疾患発症における胸腺髄質上皮細胞の変容 とその意義

(平成25年度～平成26年度) **Dysregulation of medullary thymic epithelial cells in immunosenescence and autoimmunity**

胸腺上皮幹細胞の活性制御機構の解明とその応用

(平成27年度～平成28年度) **Regulatory mechanisms of thymic epithelial stem cell activity**

濱崎 洋子 京都大学大学院・医学研究科

研究開始当初の背景

胸腺は、獲得免疫応答の司令塔となるT細胞の産生と自己寛容の確立を司る中枢免疫器官であり、近年その主要なストロマである胸腺上皮細胞の発生や性状解析が分子・細胞レベルで急速に進んでいる。特に自己寛容の成立を担う髄質上皮細胞の発生過程に関する理解は近年急速に進んだ。しかしながら、その維持機構はよく分かっていない。また髄質上皮細胞の分化・性状の異常が様々な自己免疫疾患発症に随伴あるいは先行して認められることも明らかになってきた。このような背景の中、我々はこれまでに、胸腺髄質上皮細胞の発生機構の解明とその前駆細胞の同定を独自の研究により行ってきた。

研究の目的

本研究では、1)我々が以前に同定した胸腺髄質上皮前駆細胞分画に含まれると想定される「胸腺髄質上皮幹細胞」を同定してその活性制御のメカニズムを明らかにするとともに、2)自己免疫疾患モデルマウスに認められる髄質上皮細胞の分化異常の原因とその意義を明らかにすることを目的とした。以上により、胸腺の維持機構、および胸腺退縮の主たる要因である上皮細胞の加齢変化の原因の解明を目指すと共に、胸腺髄質上皮細胞の早期退縮や何らかの異常が、胸腺髄質上皮幹細胞の活性低下や異常と関連性する可能性について検証した。

研究の方法

- 胸腺髄質上皮前駆細胞分画の移植実験により、胸腺髄質上皮細胞のターンオーバーを長期維持できる細胞分画を同定する試みを行った。また、胸腺上皮コロニーアッセイ法を確立し、幹細胞の定義である自己複製能を検証した。
- 各種遺伝子欠損マウス胸腺のコロニー形成能を比較検討することで、胸腺髄質上皮幹細胞活性がどのような分子によって影響を受けるかを検討した。
- 幹細胞活性が低下した正常成獣マウスの髄質上皮幹細胞と、成獣でも高い活性を維持しているRAG2KO髄質上皮幹細胞の間で、遺伝子発現、細胞老化、酸化ストレスの程度などを比較解析し、T細胞産生により髄質上皮幹細胞活性の低下が誘導される原因を同定する試みを行った。
- 胸腺髄質上皮細胞の数や分化に異常を示す自己免疫疾患自然発症モデルマウスの髄質上皮幹細胞の性質を分子・細胞レベルで詳細に解析した。さらに、②で検討した方法を含め異常の原因を取り除くことにより疾患の発症頻度や症状が改善するか否かを検討した。

研究成果

- 胸腺髄質上皮細胞を個体の生涯異にわたり維持できる上皮幹細胞を同定した。また、そ

の活性が加齢に伴い低下すること、その一方で血球側の要因によりT細胞産生に欠陥のあるマウス(Rag2KOマウス)では成獣でも幹細胞活性が高く保たれていることを見出した。

- 胸腺髄質上皮幹細胞を同定するために用いた胸腺上皮コロニーアッセイ法は、成獣マウス胸腺を用いた場合にはコロニーの定量が困難であった。そこでアッセイ法の感度を上げるため、培養条件の再検討を行った。その結果、EGFとLIFを添加するタイミングを変えることで、成獣マウスでもvisibleなコロニーを形成可能な条件を設定することができた。
- 新たな胸腺上皮コロニーアッセイ法を用いて、TCRaノックアウトマウス、uMTノックアウトマウスなどの胸腺を用いてコロニーアッセイを行った。その結果、主にdouble positive細胞の有無が大きくコロニー形成能の低下に寄与することが明らかになった。
- 胸腺髄質上皮細胞の異常を伴う自己免疫疾患モデルマウス(SLEモデル NZW マウス)のコロニー形成能について検討を行ったところ、新生児期のコロニー形成能が極めて低いことが分かった。また、このマウスでは胸腺髄質上皮が最終分化し角化した構造体(ハッサル小体)が過形成を起こしていることが明らかになった。以上の結果は、胸腺髄質上皮幹細胞の活性低下と髄質上皮の発生・分化異常、さらに自己免疫疾患発症との関連性を示唆するものである。

of RANK+ medullary epithelial progenitors. *Eur J Immunol.* 2016 Apr;46(4):857-62. doi: 10.1002/eji.201546253.

8) Hamazaki Y. Adult thymic epithelial cell (TEC) progenitors and TEC stem cells – Models and mechanisms for the development and maintenance of thymic epithelial cells *Eur J Immunol.* 2015 Nov;45(11):2985-93. †Correspondence doi: 10.1016/j.ej.201545844.

9) Ohigashi I, Zuklys S, Sakata M, Mayer CE, Hamazaki Y, Minato N, Hollander GA, Takahama Y. Adult thymic medullary epithelium is maintained and regenerated by lineage-restricted cells rather than bipotent progenitors *Cell Rep.* 2015 Nov 17;13(7):1432-43. doi: 10.1016/j.celrep.2015.10.012.

10) Tahir S, Fukushima Y, Sakamoto K, Sato K, Fujita H, Inoue J, Uede T, Hamazaki Y, Hattori M, Minato N. A CD153+CD4+ T Follicular Cell Population with Cell-Senescence Features Plays a Crucial Role in Lupus Pathogenesis via Osteopontin Production. *J Immunol.* 2015 Jun 15;194(12):5725-35. doi: 10.1049/jimmunol.1500319.

11) Doi K, Imai T, Kressler C, Yagita H, Agata Y, Vooijs M, Hamazaki Y, Inoue J, Minato N. Crucial role of the Rap G protein signal in Notch activation and leukemogenicity of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep.* 2015 Jan 23:5:7978. doi: 10.1038/srep07978.

12) Sekai M, Hamazaki Y,† Minato N. Medullary thymic epithelial stem cells maintain a functional thymus 4to ensure lifelong central T cell tolerance. *Immunity.* 2014 Nov 14: 41(5), 753–761. †Correspondence doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.011.

13) Mizuno R, Kamioka Y, Kabashima K, Imajo M, Sumiyama K, Nakasho E, Ito T, Hamazaki Y, Okuchi Y, Sakai Y, Kiyokawa E, Matsuda M. In vivo imaging reveals PKA regulation of ERK activity during neutrophil recruitment to inflamed intestines. *J Exp Med.* 2014 Jun 2;211(6):1123-36. doi: 10.1084/jem.20132112

14) Nagatake T, Fujita H, Minato N, Hamazaki Y.† Enteroendocrine cells are specifically marked by cell surface expression of claudin-4 in mouse small intestine. *PLoS One.* 2014 Mar 6;9(3):e90638. †Correspondence doi: 10.1371/journal.pone.0090638.

Their Potential for Controlling Autoimmunity **京都大学iPS細胞研究所(CiRA) (京都)** 2015.9.25

7) 濱崎 洋子 CREATE 2015(Cardio-Renal Interaction and Translational Research Enhancement) 胸腺における中枢性自己寛容の成立と胸腺退縮に伴うT細胞の加齢変化 ロイヤルパークホテル (東京) 2015.7.31

8) 濱崎 洋子 日本薬学会 第135年会 シンポジウム「上皮を標的とした創薬研究の新展開」 免疫系・内分泌系細胞に発現するクローディングとその意義 神戸学院大学(神戸) 2015.3.27

9) 濱崎 洋子 日本抗加齢医学会 専門医・指導士認定委員会主催講習会 レクチャー 免疫老化 大阪国際会議場(大阪) 2015.3.22

10) 濱崎洋子 第34回 日本胸腺研究会 ミニシンポジウム「胸腺の形成と維持 最近の話題」 中枢性免疫寛容を担う胸腺髄質上皮細胞の発生とその維持 相模原市立市民・大学交流センター ニコムプラザさがみはら(相模原) 2015.2.7

11) Yoko Hamazaki 第43回日本免疫学会学術集会 国際シンポジウム Thymic microenvironments for T cell development and repertoire formation Identification of medullary thymic epithelial stem cells ensuring lifelong central T-cell tolerance 国立京都国際会館(京都) 2014.12.10

12) 濱崎 洋子 第43回日本免疫学会学術集会 オーバーヴュートーク Thymic microenvironments: Basics, Progress and Future 国立京都国際会館(京都) 2014.12.10

13) Yoko Hamazaki The 24th Hot Spring Harbor International Symposium†Recent Advance in Immunology and Inflammation」 Thymic Medullary Epithelial Stem Cells Ensuring Lifelong Central T cell Tolerance 理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター(RCAI)(横浜) 2016. 3.2

6) Yoko Hamazaki CiRAセミナー Identification of Medullary Thymic Epithelial Stem Cells and

生とその維持 六本木アカデミーヒルズ(東京) 2014.7.19

15) 濱崎 洋子 第51回日本消化器免疫学会総会 教育講演 中枢性免疫寛容を担う胸腺上皮細胞の発生とその維持 京都大学医学部・芝蘭会館(京都) 2013.12.11.

16) Yoko Hamazaki 第42回日本免疫学会学術集会 国際シンポジウム Medullary thymic epithelial stem cells ensuring lifelong central T-cell tolerance 幕張メッセ(千葉) 2014.7.10

(**その他**) メディア報道 2014年11月14日

・朝日新聞(30面)自己免疫疾患防く幹細胞 京大グループ マウスから発見

・京都新聞(27面)自己攻撃抑える幹細胞 京大グループ 予防や治療に期待

・産経新聞(26面)自己免疫疾患抑える細胞 京大発見 マウスで治療効果

・中日新聞(33面)「悪玉」排除の幹細胞を特定

・日刊工業新聞(19面)胸腺の幹細胞発見 マウス免疫疾患回避に成功

・日本経済新聞(42面)悪玉の免疫細胞死滅 幹細胞を特定 京大、治療法開発に道

・毎日新聞(2面)免疫疾患抑制の幹細胞 胸腺で特定 京大グループ

・読売新聞(夕刊 13面)自己免疫疾患防く細胞 京大、マウスで確認

・徳島新聞(4面)「悪玉」排除する幹細胞 京大チーム特定 免疫機能正常化

・KBS京都 ニュース アウトリーチ活動 1) 2014年4月6日 NHKスペシャル 人体ミクロの大冒険 第3回 あなたを守る!細胞が老いと戦うスタジオ出演 2) 2016年11月17日 岡山県立岡山操山中学校 未来航科学習 中学生訪問受け入れ 3) 2017年3月4日 岡山県倉敷天城中学校・高等学校 天城スプリング・サイエンスフェスタ ステージ・ポスター発表の審査・指導・助言 4) 2014年 科研費News 2014 vol.4寄稿 5) 2016年11月9日 Nobel Prize Inspiration Initiative in Japan フランソワーズ・バレンシヌ博士 「From HIV’s discovery to global health challenges of the 21th Century」 My science career ～多様なステップで拓くサイエンスキャリア～ パネルディスカッション パネリスト 受賞、等 平成28年度花王科学賞(内定)

研究代表者 **HAMAZAKI, Yoko** 京都大学大学院・医学研究科・准教授 **10362477**



免疫・造血ニッチとしての脾臓微小環境の形成 ならびに再生の制御機構

(平成25年度～平成26年度) Formation and regeneration of the splenic microenvironment as an immune and hematopoietic niche

後飯塚 僚 東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所

研究代表者

GOITSUKA, Ryo

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

50301552



研究開始当初の背景

脾臓の微小環境は血行性抗原に対する免疫応答の場として機能する白脾髄および辺縁帯、老化赤血球の破壊や貧血時の髄外造血の場としても重要な機能をもつ赤脾髄、脾臓微小環境の再生に関与する間葉系幹細胞の存在が示唆されている脾膜・脾柱という形態学的にも機能的にも異なる領域から構成されている。脾臓の形成や機能については、造血系・リンパ系細胞側からの解析が進む一方で、これら骨髄由来細胞の機能や分化を支持する脾臓ストローマ・間葉系細胞側からの解析は少なく、未解明な部分が多く残されている。

研究の目的

本研究では、脾臓Tlx1発現細胞が白脾髄や赤脾髄を含む全ての脾臓微小環境形成において幹細胞として機能している可能性について、発生・再生過程ならびに免疫応答時の脾臓微小環境におけるTlx1発現細胞ならびにそれに由来する細胞の分化・性状・機能について解析を行い、脾臓免疫・造血ニッチ形成機構を明らかにする。さらに、以上の結果に基づいて、脾臓間葉系細胞を用いた免疫・造血ニッチの人工的構築法の開発応用を目指す。

研究の方法

脾臓間葉系細胞特異的に遺伝子欠損を誘導可能で、同時にTlx1発現細胞の局在や細胞運命追跡が可能な新規レポーターマウスを用いて解析を行った。

研究成果

作製した*Tlx1^{CreER-Venus}*マウスは、*Tlx1* 遺伝子座にタモキシフェン誘導性に活性化するCre組換え酵素をコードする*CreER*遺伝子と緑色蛍光蛋白をコードする*Venus*遺伝子をノックインした変異アレルを有するマウスであり、本マウスとCre組換え酵素の活性化によっ

て赤色蛍光蛋白であるtdTomatoを発現する*Rosa26-tdTomato*レポーターマウスを交配した*Tlx1^{CreER-Venus}; Rosa26-tdTomato*マウスを用いることにより、*Tlx1* 遺伝子を発現している細胞をVenusの蛍光で検出し、過去に*Tlx1* 遺伝子を発現したことがある細胞をCreERの活性化によるtdTomatoの蛍光で追跡可能である。そこで、まず、脾臓の器官形成が始まった直後の胎齢12.5日の脾臓原基でVenusの蛍光が観察されたので、この時期にタモキシフェンを投与することで胎仔脾臓間葉系細胞をtdTomatoで標識し、生後4週齢の時点で、成体間葉系細胞への分化様式について免疫組織化学的に解析を行った。その結果、tdTomatoの発現が一部の濾胞樹状細胞、線維性細網細胞、辺縁帯細網細胞ならびに赤脾髄線維芽細胞に検出されることから、胎仔期にTlx1を発現した間葉系細胞は成体の全ての脾臓間葉系細胞の前駆細胞であることが判明した。また、生後5日齢の新生仔脾臓ならびに4週齢の成体脾臓に認められるTlx1発現細胞をtdTomatoで標識した場合も、5週後には濾胞樹状細胞、線維性細網細胞、辺縁帯細網細胞および赤脾髄線維芽細胞の一部に分化することが明らかになったが、その寄与の程度は胎仔期、新生仔期、成体期の順で減少する傾向にあった。さらに、胎齢18.5日の脾臓被膜を腎臓被膜下に移植することで脾臓再生におけるTlx1発現細胞の分化について解析を行ったが、この場合もTlx1発現細胞は全ての脾臓間葉系細胞に分化する能力を有することが明らかになった。

次に、Venus陽性細胞の表面抗原の発現について解析した結果、Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) α^+ 、CD105⁺、Sca-1^{low}の間葉系細胞であり、骨髄間葉系ストローマ細胞と類似した表面マーカーを発現することが判明した。そこで、本細胞の*in vitro*での間葉由来3系統の細胞への分化能を、骨髄PDGFR α^+ Sca-1⁺の間葉系ストローマ細胞であるP α S細胞を対照として検討したところ、P α S細胞に比べると弱いながらも、脂肪細胞、骨芽細胞ならびに軟骨芽細胞への分化能を示し、脾臓Tlx1発現細胞は間葉系ストローマ細胞の性状ならびに機能を有する細胞であることが明らかになった。次に、造血ニッチとの関連を明らかにするため、造血制御因子の遺伝子発現について解析し

た結果、Tlx1発現細胞は造血幹細胞の局在ならびに維持に関与するCXCL12およびStem cell factor (SCF)をTlx1非発現間葉系細胞の約10倍および5倍発現しており、骨髄造血ニッチを構成する間葉系細胞であるレプチン受容体発現細胞やCXCL12-abundant reticular (CAR)細胞と類似した造血制御因子の発現様式を示すことが明らかになった。

主な発表論文等

(雑誌論文)(計4件)

- 1) Ariki, R., Morikawa, S., Mabuchi, Y., Suzuki, S., Nakatake, M., Yoshioka, K., Hidano, S., Nakauchi, H., Matsuzaki, Y., Nakamura, T. and Goitsuka, R.: Homeodomain transcription factor Meis1 is a critical regulator of adult bone marrow hematopoiesis. *PLOS ONE*, 2014, 9 (2): e87646.
- 2) Hirayama T., Asano, Y., Iida, H., Watanabe, T., Nakamura, T. and Goitsuka, R.: Meis1 is required for the maintenance of postnatal thymic epithelial cells. *PLOS ONE*, 2014, 9 (3) (DOI: 10.1371/journal.pone.0089885)
- 3) Nakahara, R., Kawai, Y., Oda, A., Nishimura, M., Murakami, A., Azuma, T., Kaifu, T. and Goitsuka, R.: Generation of a Tlx1^{CreER-Venus} knock-in mouse strain for the study of spleen development. *Genesis*, 2014, 52(11):916-923
- 4) Okumura, K., Saito, M., Aoto, Y., Hachiya, T., Sakakibara, Y., Katsuragi, Y., Hirose, S., Kominami, R., Goitsuka, R., Nakamura, T. and Wakabayashi, Y.: Meis1 regulates epidermal stem cells and is required for skin tumorigenesis. *PLOS ONE*, 2014, 9(7):e102111.

(学会発表)(計14件)

- 1) Nakahara, R., Kawai, Y., Hirayama,

T., Iwakura, Y. and Goitsuka, R.: Homeodomain transcription factor Tlx1 marks a unique population of postnatal spleen mesenchymal cells. International Workshop on T Lymphocytes, Kyoto, June 3-7, 2013

- 2) Goitsuka, R.: A new mouse line for dissecting the lineage relationship and functions of mesenchymal cell components consisting of the spleen microenvironment. International Workshop on T Lymphocytes, Kyoto, June 3-7, 2013

- 3) Goitsuka, R., Nakahara, R., Oda, A. and Notsu, C.: Differentiation potentials of mesenchymal cells expressing the homeodomain transcription factor Tlx1 in embryonic and postnatal spleen. 4th Workshop of Synthetic Immunology, Kyoto, November 15-16, 2013

- 4) Nakahara, R., Oda, A. and Notsu, C., and Goitsuka, R.: Perivascular mural cells in the postnatal spleen express homeodomain transcription factor Tlx1. 第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月3-6日

- 5) Notsu, C., Oda, A., Nakahara, R. and Goitsuka, R.: Mesenchymal progenitor-like cells in the neonatal spleen identified by homeodomain transcription factor Tlx1. 第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月3-6日

- 6) Oda, A., Notsu, C., Nakahara, R.

and Goitsuka, R.: Developmental regulation of the splenic microenvironment by mesenchymal cells expressing homeodomain transcription factor Tlx1. 第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月3-6日

- 7) Nakahara, R., Oda, A. and Notsu, C., and Goitsuka, R.: Homeodomain transcription factor Tlx1 marks a unique population of postnatal spleen mesenchymal cells.第42回日本免疫学会学術集会、幕張、2013年12月11-13日.

- 8) 小田朗永、野津智尋、中原亮、後飯塚僚：成体脾臓微小環境の維持におけるTlx1発現間葉系細胞の役割. 第24回学術集会Kyoto T cell conference (KTCC), Kyoto, May 16-17, 2014

- 9) 後飯塚僚：脾臓の微小環境を構成する間葉系細胞の起源と機能.第157回日本獣医学会学術集会、札幌、2014年9月9-12日

- 10) Ryo Nakahara, Chihiro Notsu, Akihisa Oda, and Ryo Goitsuka: Contribution of Tlx1-expresssing mesenchymal cells to splenic microenvironment formation during organogenesis and regeneration. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月25-27日

- 11) Yuichi Wakabayashi, Kazuhiro Okumura, Megumi Saito, Yoshimasa Aoto, Yasubumi Sakakibara, Ryo Kominami, Ryo Goitsuka, Takuro Nakamura, and Eriko Isogai: Meis1 is a crucial regulator of epidermal stem cell maintenance and skin

carcinogenesis. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月25-27日

- 12) Tomoo Owa, Shinichiro Taya, Tomoki Nishioka, Takuro Nakamura, Ryo Goitsuka, Kozo Kaibuchi, Mikio Hoshino: Role of Meis1 in the cerebellar development. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月25-27日

- 13) Akihisa Oda, Ryo Nakahara, Chihiro Notsu, Toru Kasahara, and Ryo Goitsuka: The role of postnatal mesenchymal cell population retaining a potential to give rise to various types of mature stromal cells in the spleen. 第43回日本免疫学会学術集会、京都、2014年12月10-12日

- 14) Yasuyuki Tashiro, Ryo Goitsuka and Takachika Azuma: Isotype-specific regulation of antibody secretion and affinity maturation during immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl; NP) hapten. 第43回日本免疫学会学術集会、京都、2014年12月10-12日

(その他)

ホームページ
東京理科大学生命科学研究所時間生物学専攻分野

http://www.ribs.tus.ac.jp/index.php/

course/labforstu/goitsukalab/

東京理科大学生命医科学研究所発生及び老化研究部門

http://www.ribs.tus.ac.jp/index.php/

institute/labforres/goitsukalab/

転写因子によるリプログラミングを軸とした脾臓微小環境形成機構の解明

(平成27年度～平成28年度) Transcriptional reprogramming in the structural formation of the splenic microenvironment

後飯塚 僚 東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所

研究開始当初の背景

脾臓は血行性抗原に対する主要な免疫応答の場ということもあり、リンパ節に存在する典型的な輸入・輸出リンパ管ならびに高内皮静脈などの構造がなく、辺縁洞とよばれる間葉系細胞から構成される血管洞様構造を介してリンパ球が組織に流入する特殊性を有する。一方、脾臓の器官形成に関与するNkxファミリー転写因子などの特殊要素ならびにリンパ節形成にも関わるリンホトキシン受容体シグナルなどの共通要素の異常により、脾臓において辺縁洞が消失し、赤脾髄に高内皮静脈やリンパ管シストが形成されることから、脾臓はリンパ節へ部分的にリプログラミング可能な微小環境であることも示されている。

研究の目的

本研究では、脾臓のリプログラミングに関与する転写因子に焦点をあて、辺縁帯細網細胞の分化過程におけるリプログラミング要素の相互作用、間葉系細胞におけるリプログラミング要素の欠損・過剰発現ならびに異所性発現(リンパ節原基など)の微小環境形成・維持に及ぼす影響について解析することにより、二次リンパ組織としての脾臓微小環境形成機構の特殊性と共通性を解明する。

研究の方法

Nkxファミリー転写因子の一つであるTlx1発現細胞の細胞運命追跡や遺伝子操作が可能なマウス、Nkxファミリー転写因子の上流で機能するTALEファミリー転写因子であるMeis1を脾臓特異的に欠損可能なマウスならびにTlx1を過剰発現するマウスを用いて研究を行った。

研究成果

ヒトの先天性免疫不全症のひとつである脾臓形成不全に関連する転写因子Tlx1に焦点をあて、脾臓の器官形成について解析を行った。まず、Tlx1欠損マウス胎仔では脾臓は形成されず、本来なら脾臓になるべき細胞が背側脾臓に観察され、それら細胞は脾外分泌、内分泌および腺上皮細胞ではなく、デスミンおよびビメンチン陽性の間葉系細胞であった。発生初期のTlx1欠損の影響を検討するために、胎齢12.5日の脾臓原基細胞の細胞運動について解析を行い、野生型では方向性のある細胞移動が認められるのに対し、Tlx1欠損胎仔ではそれがランダムな傾向にあることが判明した。マイクロアレイによる遺伝子発現解析でTlx1欠損脾臓原基では脈管新生に関与する遺伝子群が低下していることから、Tlx1は脾臓原基細胞の細胞移動ならびにその後の脾臓原基への脈管新生を制御することによって、脾臓の器官形成に関与することが示唆された。

第二に、Tlx1遺伝子のプロモーターに結合し、その発現を制御することが明らかになっているTALEファミリー転写因子であるMeis1ならびにPrep1をTlx1発現細胞で欠損させた場合の脾臓微小環境の変化について解析を行った。その結果、Prep1欠損では影響が認められなかったが、Meis1を欠損させた場合は白脾髄におけるTならびにB細胞の有意な減少が観察された。免疫組織化学的およびフローサイトメトリー解析により、白脾髄を構成する濾胞樹状細胞、線維性細網細胞および辺縁帯細網細胞数の減少を伴う白脾髄領域サイズの減少が明らかになった。一方、赤脾髄の構造ならびそこに局在する赤芽細胞およびマクロファージ数には変化が認められなかった。Tlx1発現細胞は赤脾髄に局在することから、Tlx1発現細胞におけるMeis1欠損の白脾髄に与える影響は間接的であることが示唆された。

第三に、成体脾臓のTlx1発現細胞にTlx1を過剰発現することにより、通常は赤脾髄に散在しているTlx1発現細胞が白脾髄の存在する濾胞辺縁部へ有意に集積することが空間統計学的解析により判明した。それらTlx1発現細胞はBrdUの取り込みが亢進しており、増殖していることが示された。さらに、Tlx1発現細胞と造血前駆細胞との位置関係を解析すると、濾胞周辺部で近接しており、お互いの距離を計測した結果、造血前駆細胞のほとんどが、Tlx1発現細胞の5μM以内に局在することから、直接的に接触しているものと考えられた。そこで、この濾胞辺縁部へのTlx1発現細胞の集積の分子機構について解析した。Tlx1発現細胞と濾胞辺縁部に局在する成熟ストローマ細胞であるMAdCAM-1陽性辺帯細網細胞にはVEGF(vascular endothelial growth factor)ならびにVEGF受容体がそれぞれの細胞で選択的に高発現していることから、VEGFの特異的阻害剤を用いて検討したところ、Tlx1過剰発現細胞の濾胞辺縁部への集積が有意に阻害された。以上の結果から、VEGF依存的なTlx1発現細胞の濾胞辺縁部への集積が脾臓の造血前駆細胞ニッチ形成に関与している可能性が示唆された。

主な発表論文等

【雑誌論文】(計5件)

- 1) Yoshioka, K., Kawai, Y., Oda, A., Notsu, C. Mabuchi, Y., Suzuki, S., Matsuzaki, Y., and Goitsuka, R.: Loss of Homeodomain Transcription Factor Prep1 Perturbs Adult Hematopoiesis in The Bone Marrow. *PLoS One*, 2015, 10, e0136107.
- 2) Seki, Y., Kikuchi, Y., Yoshimoto, R., Aburai, K., Kanai, Y., Ruike, T., Iwabata, K., Goitsuka, R., Sugawara, F., Abe, M., and Sakaguchi, K.: Promotion of crystalline cellulose degradation by expansins from *Oryza sativa*. *Planta*, 2015, 241 (1):83-93.
- 3) Tashiro, Y., Murakami, A., Goitsuka, R., Shimizu, T., Kishimoto, H., and Azuma, T.: An asymmetric antibody repertoire is shaped between plasmablasts and plasma cells after secondary immunization with (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl chicken gamma-globulin. *Int. Immunol.*, 2015, 27 (12):609-620.
- 4) Yokoyama, T., Nakatake, M., Kuwata, T., Couzinet, A., Goitsuka, R., Tsutsumi, S., Aburatani, H., Valk, P. J. M., Delwel, R. and Nakamura, T.: Meis1-mediated tranactivation of synaptotagmin like 1 promotes CXCL12/CXCR4 signaling and leukemogenesis. *J. Clin. Invest.*, 2016, 126:1664-1678
- 5) 後飯塚僚:間葉系ストローマ細胞による造血制御とその応用. *家畜感染症学会誌* 第5巻2号、69-74, 2016

【学会発表】(計21件)

- 1) Akihisa Oda, Ryo Nakahara, Chihiro Notsu, Toru Kasahara, and Ryo Goitsuka: Contribution of Tlx1-expressing mesenchymal cells to splenic microenvironment formation during organogenesis and regeneration. Venice Thymus Meeting 2015, Venice International University, Italy, 2015年4月9-13日
- 2) 笠原透、中原亮、野津智尋、小田朗永、後

飯塚僚: ホメオドメイン転写因子Tlx1は脾臓原基間葉系細胞の分化運命を規定する. 第25回学術集会Kyoto T cell conference (KTCC)、京都大学芝蘭会館、京都、2015年5月15-16日、2015

- 3) 小田朗永、笠原透、野津智尋、後飯塚僚: ホメオドメイン転写因子Tlx1は赤脾髄における赤芽球・マクロファージの維持に関与する. 第25回学術集会Kyoto T cell conference (KTCC)、京都大学芝蘭会館、京都、2015年5月15-16日、2015
- 4) Kasahara, T., Oda, A., and Goitsuka, R.: Cell fate mapping of embryonic spleen primordium cells expressing the transcription factor Tlx1. 第24回日本バイオイメージング学会学術集会、東京理科大学葛飾キャンパス、東京、2015年9月26-28日
- 5) Katsumoto, T., Yamagata, K., Ogawara, Y., Nakamura, T., Goitsuka, R., and Kitabayashi, I.: Endogenous MOZ was essential for MOZ-TIF2-induced Meis1 upregulation and AML development. 第77回日本血液学会学術集会、日航ホテル金沢、金沢、2015年10月16-18日
- 6) Akihisa Oda, Chihiro Notsu, and Ryo Goitsuka: Overexpression of Tlx1 *in situ* causes extramedullary hematopoiesis in the adult spleen. 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター、札幌、2015年11月18-20日
- 7) Toru Kasahara, Akihisa Oda, and Ryo Goitsuka: Transcription factor Tlx1 regulates cell migration of the spleno-pancreatic mesenchyme in spleen organogenesis. 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター、札幌、2016年9月28日
- 8) Chihiro Notsu, Akihisa Oda, and Ryo Goitsuka: Maintenance of the white pulp architecture in the postnatal spleen requires Meis1 expression in mesenchymal progenitor cells. 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター、札幌、2015年11月18-20日
- 9) Yasuyuki Tashiro, Akikazu Murakami, Ryo Goitsuka, Takeyuki Shimizu, Hidehiro Kishimoto and Takachika Azuma: An asymmetric antibody

repertoire is shaped between plasmablasts and plasma cells after secondary immunization with (4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl; NP) hapten. 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター、札幌、2015年11月18-20日

- 10) 後飯塚僚: 髓外造血ニッチとしての脾臓微小環境の形成機構、福岡大学医学部再生医学研究所セミナー、福岡、2016年2月24日
- 11) 小田朗永、野津智尋、後飯塚僚: 脾臓における髓外造血の間葉系ストローマ細胞とマクロファージによる制御. 第26回学術集会Kyoto T cell conference (KTCC)、延暦寺会館、滋賀、2016年5月20-21日
- 12) 後飯塚僚: 間葉系ストローマ細胞による造血制御とその応用. 第6回家畜感染症学会シンポジウム「基礎と臨床を結ぶ」～基礎研究の最前線で活躍する獣医師から学ぶ～、国立科学博物館、東京、2016年6月3日
- 13) Ryo Goitsuka: Extramedullary hematopoietic niche in the spleen. International Symposium of the Center for Animal Disease Models 2016, "Metabolic Diseases and Aging" Tokyo Garden Place, Tokyo, 2016年7月16日
- 14) Akihisa Oda, Toru Kasahara, and Ryo Goitsuka: Mesenchymal cells expressing Tlx1 serve as an extramedullary niche in the spleen. International Congress of Immunology 2016, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia, 2016年8月21-26日
- 15) 後飯塚僚: 脾臓間葉系細胞による髓外造血の制御. 京都大学ウイルス研究所セミナー・共同利用・共同研究拠点セミナー、京都大学ウイルス研究所、京都、2016年9月28日
- 16) 大輪智雄、田谷真一郎、宮下聡、西岡朋生、中村卓郎、後飯塚僚、貝淵弘三、星野幹雄: Meis1の小脳顆粒細胞における多段階発生制御. 第39回日本分子生物学学会年会、パシフィコ横浜、神奈川、2016年11月30日-12月2日
- 17) Akihisa Oda, Toshiaki Tezuka, Toru Kasahara, Yuta Ueno, Chiharu Nishiyama, and Ryo Goitsuka:

Interdependent roles of Tlx1-expressing mesenchymal cells and macrophages in extramedullary hematopoiesis in the spleen. 第45回日本免疫学会学術集会、沖縄コンベンションセンター、沖縄、2016年12月5-7日

- 18) Toru Kasahara, Akihisa Oda, Toshiaki Tezuka and Ryo Goitsuka: The splenic marginal sinus consists of two distinct cell populations expressing MAdCAM-1. 第45回日本免疫学会学術集会、沖縄コンベンションセンター、沖縄、2016年12月5-7日
- 19) Toshiaki Tezuka, Toru Kasahara, Yuta Ueno, Chiharu Nishiyama, Akihisa Oda and Ryo Goitsuka: Transcription factor Tlx1 regulates the ability of spleen mesenchymal stromal cells to support the survival of hematopoietic progenitor cells *in vitro*. 第45回日本免疫学会学術集会、沖縄コンベンションセンター、沖縄、2016年12月5-7日
- 20) 笠原透、後飯塚僚: 脾臓微小環境形成における血管構造の役割に関する解析. 第2回イメージングフロンティア研究センターシンポジウム、東京理科大学野田キャンパス講義棟、千葉、2016年12月10日
- 21) Akihisa Oda, and Ryo Goitsuka: The cell components of perfollicular hematopoietic niche in the spleen. 7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference, 京都大学芝蘭会館、京都、2017年3月13-17日

【図書】(計 件)

1. 後飯塚僚(共著分担): 「獣医臨床のための免疫学」、学窓社、2016年7月27日

【その他】

ホームページ
東京理科大学生命科学研究所時間生物学専攻分野
<http://www.ribs.tus.ac.jp/index.php/course/labforstu/goitsukalab/>
東京理科大学生命科学研究所発生及び老化研究部門
<http://www.ribs.tus.ac.jp/index.php/institute/labforres/goitsukalab/>
メディア報道
日刊工業新聞2016年4月4日(添付)

研究代表者

GOITSUKA, Ryo

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

50301552



リンパ組織形成におけるマスター制御因子の 同定

(平成25年度～平成26年度) Identification of the master regulator for lymphoid tissue organogenesis.

澤 新一郎 北海道大学・遺伝子病制御研究所

研究開始当初の背景

末梢組織において哺乳類獲得免疫の中心的な「場」として機能するリンパ節は胎児期において形成過程が遺伝的にプログラムされている。リンパ節原基の形成にはリンパ組織オーガナイザー(LTo)細胞と呼ばれる非血球系細胞群と、リンパ組織誘導細胞(LTi)細胞と呼ばれるリンパ球系細胞の協調的作用が不可欠である。過去の研究によりLTi細胞膜上に発現するLymphotoxinがエフェクター分子として必須であること、転写因子ROR γ tがLTi細胞分化に必須であることなど、リンパ節形成におけるLTi細胞の役割について知識が蓄積されていた。一方、LTo細胞がリンパ節原基に存在し、LTi細胞依存的に活性化されること、LTo細胞が成熟リンパ節を構成する間葉系細胞(ストローマ細胞)の前駆細胞として機能する可能性があるなど、リンパ節初期発生や成熟過程におけるLTo細胞の重要性が予想されていたものの、リンパ節原基の解剖学的位置を決定する初期段階においてLTo細胞が予め存在するか、LTo細胞の起源は何に由来するか、LTo細胞の性質を規定する遺伝子発現は何か、といったLTo細胞に関する基本的な情報が欠如していた。また、既知分子群についても、リンパ節形成における発現細胞や作用機序は詳細には解明されていない。RANKLはTNFファミリーサイトカインであり、RANKLおよびその受容体RANKのnullマウスは全身リンパ節を欠損することが知られているが、リンパ節形成において重要な役割を果たすRANKL発現細胞や機能的意義については十分解明されてこなかった¹⁾。

研究の目的

本研究ではリンパ節原基においてLTi-LTo細胞の双方向性活性化プロセスにRANKL-RANKシステムが重要な役割を果たすとの仮説をたて、リンパ節形成をRANKシグナルの観点から解明することを目的とした。具体的には(1)リンパ節原基におけるRANKLおよびRANK発現細胞の組織学的に同定、(2)リンパ節形成に必要なRANKLおよびRANKを発現する細胞の遺伝学的に同定、(3)リンパ節形成におけるRANKシグナルの意義を分子生物学的に解明することを目的とする。

研究の方法

(1)RANKLおよびRANKの発現細胞を同定するため、①RANKLレポーターマウス(RANKL-CreP2A-Kusabira Orange ノックインマウス=RANKL-CreP2AKuO KI)および②RANKレポーターマウス(RANK-Cre-IRES-EGFP BAC Tgマウス=RANK-CIGマウス)を新規樹立し、リンパ節原基におけるRANKLおよびRANK発現細胞を可視化する。(2-1)リンパ節形成に必要なRANKLの発現細胞を同定するため、以下の方法により細胞系列特異的なRANKL欠損マウスを作製する。RANKL floxマウスを①Vav1Creマウスと交配し、血球系細胞特異的RANKL欠損マウス(RANKL^{ΔHem})、②VE-Cadherin Creマウスと交配し、血管内皮細胞特異的RANKL欠損マウス(RANKL^{ΔEnd})、③Twist2-CreやPrrx1Creマウスと交配し、間葉系細胞特異的RANKL欠損マウス(RANKL^{ΔMes})を作製し、リンパ節形成を評価する。(2-2) リンパ節形成に必要なRANKの発現細胞を同定するため、細胞系列特異的なRANK欠損マウスを作製する。具体的には、RANK floxマウスを①Vav1Creマウスと交配し、血球系細胞特異的RANK欠損マウス(RANK^{ΔHem})、②VE-CadherinCreマウスと交配し、血管内皮細胞特異的RANK欠損マウス(RANK^{ΔEnd})、③Prrx1Creマウスと交配し、間葉系細胞特異的RANK欠損マウス(RANK^{ΔMes})を作製し、リンパ節形成を評価する。(3)上記(1),(2-1)で同定したリンパ節形成に必要なRANK発現細胞をフローサイトメーターで単離後、試験管内において可溶性RANKLを添加して刺激した場合の遺伝子発現を網羅的に検索する。リンパ節形成に関与する既報分子の発現変動とのRANKシグナルの関連性を見出し、リンパ節形成におけるRANKシグナルの意義を明らかにする。

研究成果

(1-1) リンパ節原基においてRANKLはLTi細胞と間葉系細胞に発現する。CRISPR/Cas9法により新規作成したRANKL-CreP2AKuO KIマウスの胎仔リンパ節原基において、CD45⁺ ROR γ t⁺のLTi細胞およびCD45⁻ICAM1⁺VCAM1⁺の間葉系細胞にRANKLが発現していることが確認できた。

(1-2) リンパ節原基においてRANKはLTi細胞とリンパ管内皮細胞に発現する。BAC-Tg法により作製したRANK-CIG マ

ウスの胎仔リンパ節原基において、CD45⁺ ROR γ t⁺のLTi細胞およびLyve1⁺gp38⁺のリンパ管内皮細胞にRANKが発現していることが確認できた。

(2-1) リンパ節形成には間葉系ストローマ細胞に発現するRANKLが重要な役割を果たす。RANKL^{flox}マウスを細胞系列特異的なCre発現マウスと交配し、作製したRANKL^{ΔHem}、RANKL^{ΔEnd}、RANKL^{ΔMes}マウスの全身リンパ節形成を観察すると、RANKL^{ΔMes}マウスにおいてPrrx1発現部位に一致してリンパ節形成が阻害されていた。RANKL^{ΔHem}では鼠径部リンパ節のみ形成が阻害されていたが、その他リンパ節形成には異常がなかった。

(2-2) リンパ節形成にはLTi細胞およびリンパ管内皮に発現するRANKが重要な役割を果たす。RANK^{flox}マウスを細胞系列特異的なCre発現マウスと交配し、作製したRANK^{ΔHem}、RANK^{ΔEnd}、RANK^{ΔMes}マウスの全身リンパ節形成を観察すると、RANK^{ΔHem}マウスにおいて全リンパ節形成が阻害されていた。一方、RANK^{ΔMes}マウスでは全リンパ節形成が正常であった。また、RANK^{ΔEnd}マウスでは40-50%のリンパ節が消失し、残存したリンパ節も低形成であった。この結果をふまえ、RANK floxマウスとLyve-1Creマウスを交配し、リンパ管内皮細胞特異的にRANKを欠損するマウス(RANK^{ΔLEC}マウス)を作製したところ、RANK^{ΔEnd}マウスと同様に40-50%のリンパ節が消失し、残存したリンパ節も低形成であったことから、リンパ管内皮におけるRANKシグナルもリンパ節形成に重要な役をはたすことが明らかになった。

(3-1) LTi細胞へのRANKLシグナルはLTi細胞の機能的成熟を促進させる。胎性14.5日のROR γ t-EGFPレポーターマウス胎仔表在リンパ節原基からLTi細胞をフローサイトメーターで単離し、試験管内でリコンビナントIL-7(20ng/ml)、SCF(20ng/ml)存在下の培養液で20ng/mlの可溶性RANKL (sRANKL)を添加した条件下で7日間培養し、発現が上昇する分子群をタンパクおよびRNAレベルで検討した。その結果、sRANKL刺激によりLTi細胞におけるLta、Ltb遺伝子および、ケモカイン受容体CCR6発現の上昇が認められた。RANK欠損マウスにおけるLTi細胞では野生型マウスと比較し、Lta、Ltbの発現が低いこと、CCR6陽性細胞の割合が低いことから、生体にお

いてもRANKLがリンパ節形成に必要なLymphotoxin (LT) α ₁ β ₂発現のトリガーであること、LTi細胞の遊走に関わるCCR6発現を誘導することが示唆された。

(3-1) リンパ節原基のRANKLはリンパ管内皮細胞に作用し、ケモカイン発現を誘導する。(2-2)の結果を踏まえ、リンパ管内皮細胞に対するRANKLシグナルの重要性を明らかにするために、リンパ管内皮細胞特異的にRANKを欠損するRANK^{ΔLEC}マウスで残存したリンパ節からLECを採取し、RNAシーケンスで網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、ケモカインCCL20の発現がRANK欠損マウスで顕著に低下していることが明らかになった。以上から、リンパ節原基において間葉系細胞が主要なRANKL発現細胞でありLTo細胞として機能すること、LTo細胞が(i) LTi細胞へRANKLシグナルを供給することでLTi細胞の成熟を促進させる、(ii)リンパ管内皮細胞に作用しケモカインCCL20発現を誘導することで、リンパ節原基へのLTi細胞を加速させると考えられた。(論文投稿中)

(4) 派生的な研究成果
パイエル板は腸管のリンパ組織である。管

腔側の腸管上皮細胞の一種、Microfold細胞(M細胞)から抗原を取込むことで抗原特異的な免疫応答を誘導する。M細胞分化にはRANKLが必要であること、RANKL欠損マウスのパイエル板は低形成であることが報告されていたが、パイエル板におけるRANKL発現細胞やパイエル板低形成のメカニズムは明らかでなかった²⁾。本研究で作製した間葉系細胞特異的RANKL欠損マウスのパイエル板を解析したところ、RANKL^{ΔMes}ではM細胞が欠損し、パイエル板のB細胞領域も低形成であることが明らかになった。興味深いことに、RANKL^{ΔMes}マウスや上皮細胞特異的なRANK欠損マウスでは、パイエル板上皮におけるケモカインCCL20の発現が低い事も明らかになった³⁾。間葉系細胞由来のRANKLが外来抗原の採取に必要な経路であるリンパ管内皮や腸管上皮細胞に働きかけ、Bリンパ球集簇に必要なCCL20発現誘導を促進するという現象はリンパ節とパイエル板に共通する事例であり、RANKL-RANKシステムは抗原取込み装置という観点からリンパ組織形成を司るマスター制御の1つであることが明らかになった。このように、RANKL-RANKシステムに注目し、リンパ節とパイエル板の発生過程を比較することで、リンパ組織の形成機構を包括的

に理解し、生物進化の過程と免疫器官形成の謎を紐解く上で興味深い成果を得る事ができた。

<引用文献>

1. Kong et al, *Nature*. 1999 Jan 28;397(6717):315-23.
2. Knoop et al, *J Immunol*. 2009 Nov 1;183(9):5738-47
3. Nagashima K, Sawa S, et al. Identification of subepithelial mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota. *Nat Immunol.*, 18(6), 675-682 (2017)

まとめ

リンパ節原基内の間葉系細胞はRANKLを発現し、原基内に遊走したLTi細胞の最終分化を促進する。また、リンパ節原基のリンパ管内皮はRANKLシグナルを受容し、CCL20を発現することでLTi細胞の集簇を促進する。以上からRANKLはリンパ節形成において複数種の細胞に多段階的に作用し、リンパ節の高次構造構築に寄与することが明らかになった。

主な発表論文等

(雑誌論文)(計4件)

- 1) Kazuki Nagashima, Shinichiro Sawa, Takeshi Nitta, Masanori Tsutsumi, Tadashi Okamura, Josef M. Peninger, Tomoki Nakashima and Hiroshi Takayanagi. Identification of subepithelial mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota. *Nat Immunol.*, in press, doi: 10.1038/ni.3732
- 2) Lynett Danks, Noriko Komatsu, Matteo M Guerrini, Shinichiro Sawa, Marietta Armaka, George Kollias, Tomoki Nakashima and Hiroshi Takayanagi. RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. *Ann Rheum Dis*. 75(6): 1187-95. (2016) doi:10.1136/annrheumdis-2014-207137
- 3) Matteo M. Guerrini M., Kazuo Okamoto, Noriko Komatsu,

Shinichiro Sawa, Lynett Danks, Josef M. Penninger, Tomoki Nakashima, Hiroshi Takayanagi,

Inhibition of the TNF family cytokine RANKL prevents autoimmune

inflammation in the central nervous

system. *Immunity*, 43, 6: 1174–

1185 (2015)

doi: 10.1016/j.immuni.2015.10.017

4) Noriko Komatsu, Kazuo Okamoto,

Shinichiro Sawa, Tomoki Nakashima,

Masatsugu Oh-Hora, Tatsuhiko

Kodama, Sakae Tanaka, J.A.

Bluestone and Hiroshi Takayanagi,

Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T

cells into TH17 cells in autoimmune

arthritis. *Nat. Med.* 20: 62-68

(2014)

doi: 10.1038/nm.3432

(学会発表)(計14件)

- 1) Shinichiro Sawa. Mesenchymal organizer cell-derived RANKL induces terminal differentiation of LTi cell. 7th InternationalWorkshop of Kyoto T cell Conference. 2017年3月13日～2017年3月17日, 芝蘭会館

研究代表者

SAWA, Shinichiro

北海道大学・遺伝子病制御研究所・

准教授

80611756



(京都市左京区)(一般講演)

2) Shinichiro Sawa. Microenvironment

for the lymph node organogenesis,

11th International Symposium of

The Institute Network "Frontiers in

Biomedical Sciences", 2017年2月26

日～2017年2月27日, 徳島大学藤井記

念ホール(徳島市)(一般講演)

3) Shinichiro Sawa. Mesenchymal

organizer cell-derived RANKL

induces terminal differentiation of

LTi cell, EMBO Conference Innate

lymphoid cells-2016(国際学会)

2016年11月30日～2016年12月02日,

Kalkscheune(ドイツ・ベルリン)(ポス

ター発表).

4) Shinichiro Sawa, Tomoki

Nakashima and Hiroshi Takayanagi.

Mesenchymal organizer cell-

derived RANKL induces terminal

differentiation of LTi cell, 45th

Annual Meeting of Japanese

Society for Immunology, 2016年12

月05日～2016年12月07日, 沖繩コン

ンションセンター(宜野湾市) (一般講

演)

ROR γ t陽性リンパ球サブセットの機能評

価」第40回日本リンパ学会総会 シンポ

ジウム 2016年6月24日 伊藤国際学

術研究センター(東京都文京区)(招待講

演)

6) 澤新一郎, 高柳広「リンパ節形成に必要

な間葉系ストローマ細胞」第26回KTCC,

2016年5月20日-21日 延暦寺会館(大

津市)(一般講演)

7) Shinichiro Sawa, Tomoki Nakashima

and Hiroshi Takayanagi , Revisiting

role of LTi cells on lymph node

organogenesis. 44th Annual

Meeting of Japanese Society for

Immunology, 2015年11月18日～

2015年11月20日, 札幌コンベンションセ

ンター(北広島市) (ポスター発表)

8) 澤新一郎,「リンパ節形成における

RANKL-RANKシグナルの役割」第25回

KTCC, 2015年5月15日-16日 芝蘭会

館(京都市左京区)(一般講演)

9) 澤新一郎「自然リンパ球とは？」

第39回日本リンパ学会総会 シンポジ

ウム 2015年3月27日 東京(招待講演)

10) Shinichiro Sawa, Kazuki

Nagashima, Hiroshi Takayanagi

"Intestinal homeostasis regulated

- by mesenchymal stroma cells” 第43 回日本免疫学会学術集会京都国際会議場 (京都市) (招待講演)
- 11) Shinichiro Sawa, Tomoki Nakashima, Gerard Eberl and Hiroshi Takayanagi, Roles of RANKL in Lymph node organogenesis. 43th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, 2014年12月10日~2014年12月12日, 京都国際会議場 (京都市) (ポスター発表)
- 12) Shinichiro Sawa, Kazuki Nagashima, Tomoki Nakashima and Hiroshi Takayanagi “Roles of mesenchymal cell derived RANKL on the development of gut immune system” The 1st International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine Development 2014, Oct. 20, 2014, 伊藤国際学術研究センター (東京都文京区) (一般講演)
13. Shinichiro Sawa “Chasing fates of intestinal innate lymphocytes” New Perspectives in Basic and Applied Immunology Symposium, 30th September, 2013, German Cancer Research Center (DKFZドイツ癌研究センター), Heidelberg, Germany, (招待講演)
- 14) Shinichiro Sawa, Gerard Eberl and Hiroshi Takayanagi. Kyoto T cell Conference. “Do RORgt+ innate lymphoid cells play critical role in the intestinal immunity”, June 3-7, 2013 Kyoto University 京大芝蘭会館 (京都市左京区) Kyoto, Japan, (招待講演)
- (図書) (計6件)**
- 1) 澤新一郎 「新種の免疫細胞 自然リンパ球」炎症と免疫 (先端医学社) Vol.23 no.4, 2015
- 2) 澤新一郎 「自然リンパ球 (ILC, innate lymphoid cell) の役割」化学と生物 (日本農芸化学会誌) Vol.53 78-81・2015年
- 3) 澤新一郎 「3型自然リンパ球とは？」医学のあゆみ (医歯薬出版) Vol 251, No.6 p.504-506・2014年
- 4) 澤新一郎 「自然リンパ球研究Up to Date」実験医学 (羊土社) Vol.32 No.13 (8月号) 2153-3059・2014年
- 5) 澤新一郎 「自然リンパ球と腸管免疫」皮膚アレルギーフロンティア (メディカルレビュー社) Vol.11 No.2, 50-51, 2013
- 6) 澤新一郎 「マウスおよびヒト粘膜組織における RORγt 陽性自然リンパ球の意義」日本臨床免疫学会誌 ; 36 (1): 11-6, 2013
- (その他)**
- 1) Shinichiro Sawa. Mesenchymal organizer cell-derived RANKL induces terminal differentiation of LT α cell, EMBO Conference Innate lymphoid cells-2016.優秀ポスター賞受賞
- 2) Shinichiro Sawa, Kazuki Nagashima, Tomoki Nakashima and Hiroshi Takayanagi “Roles of mesenchymal cell derived RANKL on the development of gut immune system” The 1st International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine Development 2014, Tokyo, Oct. 20, 2014, Nature Immunology, Young Investigator Award (最優秀演題賞) 受賞

Meetings

第2回班会議・第3回総括班会議

日時 平成25年7月10日(水)~11日(木)

場所 京都大学芝蘭会館



リンパ節血管周囲細胞の免疫記憶維持における役割

(平成25年度～平成26年度) Developmental mechanism of lymphoid organs

高田 健介 徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター

研究開始当初の背景

全身に張り巡らされたリンパ節は、免疫反応の場を提供するのみならず、定常状態においてはリンパ球の維持組織として機能する。リンパ球の恒常性維持を担う因子の概要がほぼ明らかになった現在、それを制御する場の解明が重要な課題として残されている。

リンパ節の内部構造は、各領域に存在するストローマ細胞の独自の機能に基づいて区画化されている。複雑なリンパ節の内部構造が多様なストローマ細胞によって形成されるという認識が広まる一方、リンパ節ストローマ細胞の詳細な分類は進んでおらず、未知の亜集団が多数残されている可能性が高い。

リンパ節のT細胞領域はgp38+CD31-細胞網線維芽細胞 (fibroblastic reticular cell, FRC) によって特徴づけられ、CCR7を発現するナイーブT細胞が、FRC によって産生されるケモカイン依存的にT細胞領域に集積する。さらにFRCは、T細胞の生存に必須とされるIL-7を産生することでナイーブT細胞の維持に重要な役割を果たす (Linkら、2007 Nat Immunol)。一方、メモリーCD8T細胞の維持はIL-15 に依存する。リンパ節はナイーブT細胞のみならず、CCR7とCD62Lを発現するセントラルメモリーCD8T細胞の貯蔵組織としても重要であるが (Sallustoら、Nature 1999; Yangら、2011 Blood)、メモリーCD8T細胞の維持を司る場は未だ明らかにされていない。

研究の目的

メモリーCD8T細胞がリンパ節においてT細胞領域辺縁部に多く認められるという予備的知見に基づき、本研究では、メモリーCD8T細胞の恒常性維持を担うT細胞領域辺縁部の微小環境の解明を目的とした。特に、T細胞領域辺縁部に豊富に存在し、分離技術が確立されていないために詳細な機能的解析の進んでいない血管周囲細胞に注目した。

研究の方法

血管周囲細胞の分子マーカーとして一般的に知られているsmooth muscle actin α (α SMA) のGFPレポーターマウスを用い、リンパ節の組織学的解析を行った。メモリーCD8T細胞については、養子移入したOT-I TCR発現CD8T細胞 (CD45.1+) を卵白アルブミンとリポポリサッ

カライドアジュバントを用いて生体内で活性化させ、誘導した。CD45.1+メモリーCD8T細胞とGFP+血管周囲細胞との相互作用を免疫蛍光染色により検討した。

メモリーT細胞のリンパ節内局在に関与する因子を検索する目的で、ナイーブCD8T細胞とメモリーCD8T細胞におけるケモカイン受容体遺伝子の発現を定量的RT-PCRにより網羅的に検討した。

コラゲナーゼ処理したリンパ節細胞から磁気ビーズ法により血球系細胞を除去することでストローマ細胞を濃縮した。蛍光標識抗体で染色後にスローサイトメトリー解析により、各種分子マーカーの発現を比較した。また、ソーティングによって各ストローマ細胞集団の単離を行った。

ソーティングにより得られたストローマ細胞からRNAを抽出し、血管周囲細胞に特徴的な分子、およびリンパ球の局在に影響し得るケモカインや接着分子の遺伝子発現を定量的RT-PCRにより解析した。

研究成果

T細胞領域辺縁部の高内皮細胞静脈を取り囲む血管周囲細胞に α SMA-GFPの非常に強い発現が確認された。一方で、当初の予想に反し、 α SMA-GFPの発現は血管周囲細胞にとどまらず、リンパ節ストローマ細胞に広く認められた (図1、2)。また、本研究の仮説と異なりメモリーCD8T細胞と血管周囲細胞との明らかな相互作用は認められなかった。そこで、従来からリンパ節ストローマ細胞の分類に用いられているgp38 (podoplanin) やCD31といったマーカーと α SMA-GFPを併用することで、ストローマ細胞の詳細な分類を行った。 α SMA発

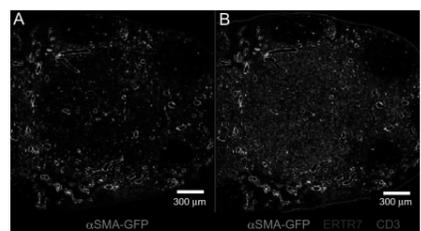


図1 α SMA-GFPトランスジェニックマウスを用いたリンパ節ストローマ細胞の解析 (弱拡大)。

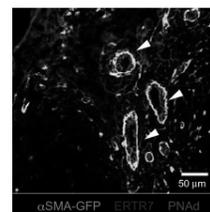


図2 α SMA-GFPトランスジェニックマウスを用いたリンパ節ストローマ細胞の解析。T細胞領域辺縁部の強拡大像。高内皮細胞静脈を矢頭で示す。

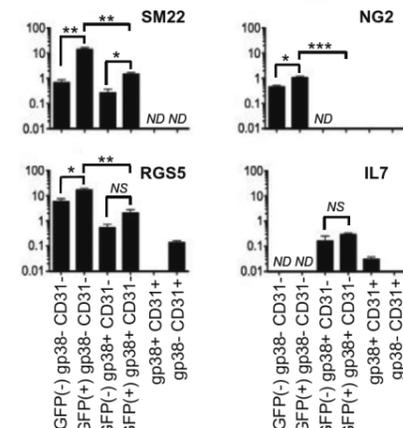


図3 α SMA-GFPトランスジェニックマウスを用いたリンパ節ストローマ細胞の解析。コラゲナーゼ処理したリンパ節から各細胞集団を分離し、定量的RT-PCRにより遺伝子発現を比較した。それぞれの亜集団で血管周囲細胞マーカーの発現が大きく異なる。

現に基づき、gp38-CD31-ストローマ細胞は各種のケモカインや接着分子、血管周囲細胞マーカー (SM22、RGS5、NG2) の発現において異なるふたつの細胞集団に分類された。とくに α SMA+gp38-CD31-細胞は、すべての血管周囲細胞マーカーを非常に高いレベルで発現し、典型的な血管周囲細胞の特徴を有していた (図3)。また、従来よりFRCとして知られてきたgp38+CD31-分画も α SMAの発現により細別され、とくに α SMA+ gp38+CD31-細胞は他の亜集団と比べ恒常性ケモカインCCL19およびCCL21を高いレベルで発現していたことからナイーブT細胞のリンパ節内分布に重要な役割を果たすと考えられた。以上の研究成果は専門誌に発表された (Togooら、2014 Biochemical and Biophysical Research Communications)。

一方、当初、メモリーCD8T細胞とナイーブCD8T細胞のリンパ節内局在を規定する因子を検索する目的で行われたケモカイン受容体の網羅的発現解析から、CCR9が特徴的な発現パターンを示すことに着目した。多くのケモカイン受容体が、ナイーブT細胞とメモリーT細胞に共通に発現されるか、あるいはメモリーT細胞で高い発現を示したのに対し、CCR9は唯一、ナイーブCD8T細胞に特異的であった。興味深いことに、ナイーブCD8T細胞におけるCCR9の発現は各種のTCRトランスジェニックT細胞で大きく異なっていた。そこで、CCR9発現の高いインフルエンザウイルス抗原特異的F5 TCRトランスジェニックマウスとCCR9欠損マウスを交配したところ、成熟胸腺細胞の過剰な胸腺外移出を示唆す

る所見が得られた (図4-6)。CCR9欠損F5トランスジェニックマウスでは、さらに末梢の成熟CD8T細胞の抗原応答に異常が認められた (図7)。これらの知見から、胸腺細胞がCCR9を介して一定期間、胸腺内に滞留することが、機能的な成熟に重要である可能性が考えられた。CD8T細胞の分化を司る新たな制御機構として、現在さらなる解析を進めている。

研究組織

研究協力者

高浜 洋介 (Yousuke Takahama)
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・教授

Khongorzul Togoo
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・大学院生 (博士課程後期)

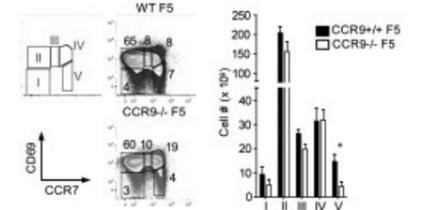


図4 CCR9欠損F5トランスジェニックマウスにおける胸腺細胞の解析。CCR9欠損群では分化の進んだ第V分画 (CD69^{low}CCR7^{hi}) において細胞数の減少が顕著である。* $P<0.05$

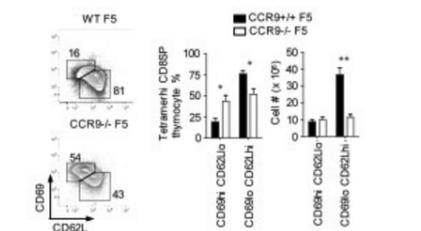


図5 CCR9欠損F5トランスジェニックマウスにおける胸腺細胞の解析。CCR9欠損群ではCD4-CD8+(CD8SP)胸腺細胞のうち、より成熟度の高いCD69^{lo}CD62L^{hi}細胞の減少が認められる。* $P<0.05$; ** $P<0.01$

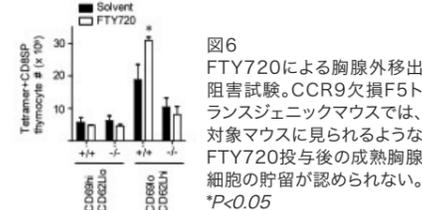


図6 FTY720による胸腺外移出阻害試験。CCR9欠損F5トランスジェニックマウスでは、対象マウスに見られるようなFTY720投与後の成熟胸腺細胞の貯留が認められない。* $P<0.05$

図7 ナイーブCD8T細胞に対し、MHCテトラマーを用いてTCR刺激を加えた。CCR9欠損群で、活性化の障害が顕著に認められる。

主な発表論文等

(雑誌論文) (計3件)

- 1) Togoo K, Takahama Y, Takada K. Alpha-smooth muscle actin expression identifies subpopulations of lymph node non-hematopoietic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 449: 241-247 (2014) 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.05.023.
- 2) Yano K, Carter C, Yoshida N, Abe T, Yamada A, Nitta T, Ishimaru N, Takada K, Butcher GW, Takahama Y. Gimap3 and Gimap5 cooperate to maintain T-cell numbers in mice. *European Journal of Immunology* 44: 561-572 (2014) 査読有 DOI: 10.1002/eji.201343750.
- 3) Takada K, Ohigashi I, Kasai M, Nakase H, Takahama Y. Development and function of cortical thymic epithelial cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 373: 1-17 (2014) 査

読有 DOI: 10.1007/82_2013_322.

(学会発表) (計10件)

- 1) Takada K, Takahama Y. Thymoproteasome-dependent positive selection conditions antigen responsiveness of CD8 T cells. 第43回 日本免疫学会学術集会 2014.12.11 国立京都国際会館 (京都府京都市)
- 2) Takada K, Takahama Y. Thymoproteasome-dependent MHC class I-associated peptide motifs contribute to positive selection of CD8 T cells. The 24th Hot spring Harbor International Symposium 2014.11.7九州大学 (福岡県福岡市)
- 3) 高田健介、高浜洋介「正の選択を介して決定されるCD8T細胞の抗原応答性」第157回 日本獣医学会学術集会 2014.9.10 北海道大学 (北海道札幌市)
- 4) 高田健介、Le Ngoc Nhi、佐々木克博、村田茂穂、高浜洋介「胸腺プロテアソーム依存的に産生される自己ペプチドの正の選択における特性」第24回 Kyoto T Cell Conference 2014.5.16 京都平安ホテル (京都府京都市)
- 5) Takada K, Takahama Y. Positive selection conditions antigen responsiveness of CD8 T cells. The 7th ThymOZ International Conference 2014.4.4 Gladstone (Australia)
- 6) Takada K, Takahama, Y. What is the positive selection for? The 3rd Bizan Immunology Symposium. 2014.2.2 徳島大学 (徳島県徳島市)
- 7) Takada K, Takahama Y. Functional conditioning of CD8 T cells by thymoproteasome-dependent positive selection. 第42回 日本免疫学会学術集会 2013.12.11 幕張メッセ (千葉県幕張市)
- 8) Takada K, Takahama Y. Functional conditioning of CD8 T cells by thymoproteasome-dependent positive selection. The 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference. 2013. 7. 5 京都大学 (京都府京都市)
- 9) Togoo K, Takahama Y, Takada K. How do the lymph nodes maintain memory CD8 T cells? 第12回 四国免疫フォーラム, 2013.6.22 愛媛大学

(愛媛県東温市)

- 10) Takada K, Takahama Y. Functional conditioning of CD8 T cells by thymoproteasome-dependent positive selection. The 100th American Association of Immunologists Annual Meeting. 2013.5.5 Honolulu (USA)

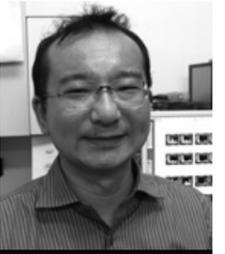
胸腺上皮細胞の分化・形成に重要な核内酵素 の同定とその機能解析

(平成25年度～平成26年度) Identification and characterization of an important intranuclear enzyme for differentiation and function of thymic epithelial cells.

田中 芳彦 福岡歯科大学・歯学部

研究代表者

TANAKA, Yoshihiko
福岡歯科大学・歯学部・教授
00398083



研究開始当初の背景

胸腺におけるT細胞の分化は、教育の「場」を構築する胸腺上皮細胞によって担われており、自己寛容とT細胞レパトア形成に必須の役割をしている。例えば、胸腺髄質上皮細胞は胸腺細胞の自己反応性T細胞の除去を担っており、組織特異的抗原の発現は核内因子Aireによって制御されている。しかしながら、胸腺髄質上皮細胞の形成過程において、Aireの発現にTRAF6やNF-κBの関与が報告されているが、その詳細なメカニズムについては明らかにされていない。

研究の目的

本研究では、胸腺髄質上皮細胞と胸腺皮質上皮細胞を対象にして、これらストローマ細胞の分化・形成におけるリジン水酸化核内酵素であるJmjd6の役割を明らかにし、Jmjd6が制御するAire遺伝子発現の分子機構を含むシグナル経路を解明することで、免疫空間の四次元的な形成機構を理解することを目的とする。

研究の方法

- 野生型マウスおよびJmjd6欠損マウスの胎生期胸腺を採取し、胸腺上皮細胞を染色して分化と形成を解析した。
- 野生型マウスおよびJmjd6欠損マウスの胎生15.5日の胸腺を、胎仔胸腺器官培養法を用いて2-deoxyguanosine処理にてT細胞を除去しながらRANKL存在下に培養し、この胸腺をT細胞が欠損しているヌードマウスの腎臓皮膜下に移植することで、胸腺髄質上皮細胞による免疫寛容におけるJmjd6の役割を検証した。
- 胸腺皮質上皮細胞の分化と形成におけるJmjd6の役割を明らかにするために、胎仔胸腺器官培養したJmjd6欠損ならびに野生型胸腺を、OT-II Tgマウスなどの腎臓皮膜下に移植することで、胸腺皮質上皮細胞によるポジティブセレクションにおけるJmjd6の役割を検証した。

- リジン水酸化酵素Jmjd6が制御するターゲット分子の網羅的解析、ならびにそのシグナル経路の解析を行った。

研究成果

- 胎生期胸腺の胸腺上皮細胞を染色して分化と形成を解析した結果、胸腺髄質上皮細胞においてJmjd6がAireの発現レベルに重要な役割を演じることを明らかにした。
- 胸腺髄質上皮細胞による免疫寛容におけるJmjd6の役割を検証した結果、Jmjd6欠損胸腺で分化したT細胞では免疫寛容が正しく誘導されないことを見いだした。
- 胎仔胸腺器官培養した胸腺を、腎臓皮膜下に移植することで、胸腺皮質上皮細胞によるポジティブセレクションにおけるJmjd6の役割を検証したところ、Jmjd6欠損においてポジティブセレクションに影響を及ぼさないことを見いだした。
- リジン水酸化酵素Jmjd6が制御するターゲット分子の網羅的解析、ならびにそのシグナル経路の解析結果から、Jmjd6がいくつかの分子の発現を制御しており、胸腺上皮細胞の分化・形成に関与している可能性が示唆された。また、リジン水酸化酵素活性に依存したものが検証したところ、その重要性を見いだした。

まとめ

胸腺における組織特異的抗原の発現は核内因子Aireによって制御されているが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多い。胸腺髄質ならびに皮質上皮細胞を対象にして、これらストローマ細胞の分化・形成におけるリジン水酸化核内酵素であるJmjd6の役割を解析したところ、リジン水酸化酵素活性に依存してAireの発現レベルに重要な役割を演じており、Jmjd6欠損胸腺で分化したT細胞では免疫寛容が正しく誘導されないことを見いだした。

主な発表論文等

(雑誌論文)(計5件)

- Yanagihara, T., Sanematsu, F., Sato, T., Uruno, T., Duan, X., Tomino, T., Harada, Y., Watanabe, M., Wang, Y., Tanaka, Y., Nakanishi, Y., Suyama, M., and Fukui, Y. Intronic regulation of Aire expression by Jmjd6 for self-tolerance induction in the thymus. *Nat. Commun.* 6: 8820, 12 pages, 2015. DOI: 10.1038/ncomms9820.
- Ogawa, K., Tanaka, Y., Uruno, T., Duan, X., Harada, Y., Sanematsu, F., Yamamura, K., Terasawa, M., Nishikimi, A., Côté, J.F. and Fukui, Y. DOCK5 functions as a key signaling adaptor that links FcεRI signals to microtubule dynamics during mast cell degranulation. *J. Exp. Med.* 211: 1407-1419, 2014. DOI: 10.1084/jem.20131926.
- Le Floc'h, A., Tanaka, Y., Bantian,

N.S., Voisinne, G., Altan-Bonnet, G., Fukui, Y. and Huse, M. Annular PIP3 accumulation controls actin architecture and modulates cytotoxicity at the immunological synapse. *J. Exp. Med.* 210: 2721-2737, 2013. DOI: 10.1084/jem.20131324.

- Sakai, Y., Tanaka, Y., Yanagihara, T., Watanabe, M., Duan, X., Terasawa, M., Nishikimi, A., Sanematsu, F. and Fukui, Y. The Rac activator DOCK2 regulates natural killer cell-mediated cytotoxicity in mice through the lytic synapse formation. *Blood* 122: 386-393, 2013. DOI: 10.1182/blood-2012-12-475897.
- 田中芳彦. グアニヌクレオチド交換因子からみたT細胞のシグナル伝達. *福岡歯科大学学会雑誌*39: 213-218, 2014.

(学会発表)(計8件)

- 橋本麻利江, 永尾潤一, 田崎園子, 今吉理

恵子, 長 環, 湯浅賢治, 田中芳彦. アレルギー反応に関連した新しいシグナル分子の同定とその機能解析. 第56回歯科基礎医学学会学術大会・総会, 福岡, 2014.

- 田崎園子, 長 環, 橋本麻利江, 今吉理恵子, 永尾潤一, 小島 寛, 田中芳彦. Mild heat stress 下で発現する*Candida albicans*の表層抗原探索. 第56回歯科基礎医学学会学術大会・総会, 福岡, 2014.
- 永尾潤一, 長 環, 今吉理恵子, 橋本麻利江, 田崎園子, 田中芳彦. 病原真菌*Candida glabrata*のHsp70タンパク質Sse1の機能解析. 第56回歯科基礎医学学会学術大会・総会, 福岡, 2014.
- 長 環, 永尾潤一, 今吉理恵子, 橋本麻利江, 田崎園子, 田中芳彦. サケ由来プロタミン派生ペプチドの抗真菌活性に関する評価. 第56回歯科基礎医学学会学術大会・総会, 福岡, 2014.
- 今吉理恵子, 田崎園子, 橋本麻利江, 永尾潤一, 長 環, 田中芳彦. 免疫応答を誘導する歯周病原細菌の抗原決定基の探索. 第56回歯科基礎医学学会学術大会・総会, 福岡, 2014.
- 田崎園子, 長 環, 橋本麻利江, 今吉理恵子,

永尾潤一, 小島 寛, 田中芳彦. Mild heat stress 下の*Candida albicans*バイオフィルム形成時に発現する遺伝子群の解析. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会, 横浜, 2014.

- 橋本麻利江, 長 環, 永尾潤一, 今吉理恵子, 田崎園子, 田中芳彦, 庵原啓司, 御手洗 誠, 阿部 茂, 羽山和美. プロタミンペプチドの濃度依存的抗真菌活性について. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会, 横浜, 2014.
- Ogawa, K., Tanaka, Y., and Fukui, Y. Identification of a molecule critical for degranulation of mast cells and anaphylactic reaction. Annual meeting of the Japanese Society for Immunology, Chiba, 2013.

(その他)

ホームページ
<http://www.fdcnet.ac.jp/col/info/teacher/kouza/kinou.html#kansen>

二次リンパ組織において記憶B細胞の時空間的制御を担う支持細胞の同定

(平成25年度～平成26年度) Elucidation of microenvironment for spatiotemporal regulation of memory B cells in the secondary lymphoid tissues.

北村 大介 東京理科大学・生命医科学研究所

研究代表者

KITAMURA, Daisuke
東京理科大学・生命医科学研究所・教授
70204914



研究開始当初の背景

記憶B細胞は主に胚中心において親和性成熟を経たB細胞から分化し、体内で長期に生存し、再び抗原と出会うと速やかに形質細胞に分化して高親和性抗体を産生する。記憶B細胞には特有のマーカーがなく、その数も僅少であるため組織染色により特定することは困難であった。よって、記憶B細胞の時空間的な動態については未だに謎である。また、記憶B細胞の分化、長期生存、免疫応答に関わる因子や、微小環境についても不明である。

研究の目的

記憶B細胞の分化、遊走・局在、生存、応答の制御に関わる分子を同定し、それらのリガンドを発現する支持細胞を同定することにより、記憶B細胞の時空間的動態を制御する微小環境の実体を明らかにすることを目的とした。

研究の方法

私たちが構築した培養系で、ナイーブB細胞から増殖させたIgG1+/IgE+の胚中心様B細胞(iGB細胞)をマウスに移入するとIgG1+の記憶B細胞(iMB細胞)に分化し、脾臓では辺縁洞付近に局在し、長期に生存する。マイクロアレイデータからiMB細胞に選択的に発現する細胞表面蛋白の遺伝子を選び、その中から記憶B細胞に選択的に発現するものを候補として、それらのノックアウトマウスの解析を中心に研究を行った。

研究成果

上記の方法で選んだ遺伝子gp49B(Lilrb4)は記憶B細胞に加えて辺縁帯B細胞にも発現していた。gp49B欠損マウスでは各血球系細胞の数に異常はなく、免疫後に形成される記憶B細胞の数も正常であったが、一次免疫後のIgM抗体および二次免疫後のIgMおよびIgG1抗体産生が亢進していた。また、In vitroの解析から、

gp49Bはインテグリン $\alpha v \beta 3$ と結合することによりCD40からErkを介したシグナルによる形質細胞分化を抑制することが分かった。以上より、記憶B細胞の微小環境は、gp49Bを介して記憶B細胞の形質細胞分化を負に制御していて、抗体産生反応の閾値を高めていると考えられた。

まとめ

記憶B細胞と辺縁帯B細胞に選択的に発現しているgp49B(Lilrb4)が一次免疫後のIgM抗体および二次免疫後のIgMおよびIgG1抗体の産生を抑制していることを明らかにした。gp49Bはインテグリン $\alpha v \beta 3$ と結合することにより、CD40シグナルによる形質細胞分化を抑制した。記憶B細胞や辺縁帯B細胞は内因性に形質細胞に分化しやすいが、gp49Bがそれを制御することにより、非特異的応答が抑制されていると考えられる。

研究組織

連携研究者

高塚 翔吾 (TAKATSUKA Shogo)
東京理科大学・生命医科学研究所・助教
研究者番号: 90609398

堀内 周 (HORIUCHI Shu)
東京理科大学・生命医科学研究所・助教
研究者番号: 40609400

主な発表論文等

(雑誌論文)(計8件)

- 1) Wu, L., Parekh, V.V., Hsiao, J., Kitamura, D. and Van Kaer, L. Spleen supports a pool of innate-like B cells in white adipose tissue that protects against obesity-associated insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 (2014), E4638-E4647. 査読有、doi: 10.1073/pnas.1324052111.
- 2) Fukao, S., Haniuda, K., Nojima, T., Takai, T. and Kitamura, D. Gp49B-mediated negative regulation of antibody production by memory and marginal zone B cells. *J. Immunol.* 193 (2014), 635-644. 査読有、doi: 10.4049/jimmunol.1302772.
- 3) Moutai, T., Yamana, H., Nojima, T. and Kitamura, D. A novel and effective cancer immunotherapy mouse model using antigen-specific B cells

selected in vitro. *PLoS One* 9 (2014), e92732. 査読有、doi: 10.1371/journal.pone.0092732.

- 4) Caganova, M., Carrisi, C., Varano, G., Mainoldi, F., Zanardi, F., Germain, P.L., George, L., Alberghini, F., Ferrarini, L., Talukder, A.K., Ponzoni, M., Testa, G., Nojima, T., Doglioni, C., Kitamura, D., Toellner, K.M., Su, I.H., Casola, S. Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *J. Clin. Invest.* 123 (2013), 5009-5022. 査読有、doi: 10.1172/JCI70626.

(学会発表)(計20件)

- 1) Daisuke Kitamura: Molecular mechanisms for the development of B-cell memory. The 2nd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum. August 25-26, 2014. La Jolla, USA.
- 2) Takuya Koike, Shu Horiuchi, Daisuke

Kitamura: CD40 signaling quantity may determine the fate of germinal center B cells. 第43回日本免疫学会学術集会, 2014年12月10日, 京都国際会館.

- 3) Hiroshi Saruwatari, Shogo Takatsuka, Daisuke Kitamura: A role of IL-9 receptor on B cells in the T-dependent immune responses. 第43回日本免疫学会学術集会, 2014年12月11日, 京都国際会館.
- 4) Daisuke Kitamura, Kei Haniuda, Saori Fukao, Mika Inada, Shu Horiuchi, Shogo Takatsuka, Tatsuya Moutai, Takuya Nojima. Molecular mechanisms for memory B-cell development and function. 15th International Congress of Immunology. August 22-27, 2013. Milan, Italy.
- 5) Daisuke Kitamura: Molecular requirements for memory B-cell development. 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年12月13日. 幕張メッセ.

(その他)
ホームページ:
<http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~ribsjm/kitamuralab/indexj.html>
メディア報道:
日経産業新聞 2014年9月12日「有用な免疫細胞選び培養 がん治療に応用」
アウトリーチ活動:
1) 東京理科大学公開講座 2014年9月7日「免疫学入門 ～どうしてワクチンは感染症を予防できるのか～」
2) 東京理科大学公開講座 2013年6月8日「免疫学入門 ～ワクチンが感染症を予防する仕組み～」

Meetings

第1回サマースクール

日時 平成25年7月11日(木)～13日(土)

場所 徳島県穴喰温泉



胸腺皮質微小環境の形成と機能の解明

(平成25年度～平成26年度) Development and function of thymic cortical microenvironment

新田 剛 東京大学大学院医学系研究科

研究開始当初の背景

胸腺はT細胞の分化の場であり、特異な三次元ネットワーク構造をなす微小環境を有している。胸腺内の空間は大まかに外側の皮質と内側の髓質に分けられ、それぞれの微小環境は主に、機能の異なる胸腺上皮細胞(皮質上皮細胞と髓質上皮細胞)によって形成されている。これら胸腺上皮細胞は骨髓由来のT前駆細胞に様々な運命決定シグナルを提供し、主として皮質における正の選択と、それに続く髓質における負の選択によって、多様性と自己/非自己の識別能をもつT細胞レパトアをつくりだす(Abramson & Anderson, *Annu Rev Immunol* 2016)。

これまでの胸腺微小環境の研究は、髓質の機能解明を中心に大きく進展してきた。髓質上皮細胞(mTEC)は、末梢組織特異的抗原の発現(Anderson et al, *Science* 2002)、ケモカイン産生による胸腺細胞と樹状細胞の髓質内への誘引(Ueno et al, *J Exp Med* 2004; Lei et al, *J Exp Med* 2011)、および抗原分子の樹状細胞への伝搬(Koble & Kyewski, *J Exp Med* 2009)を介して、自己反応性T細胞の排除や制御性T細胞の生成を制御する。mTECを欠損するモデル動物は自己免疫病態を呈することから、髓質はT細胞の自己寛容を確立する「場」であると広く認識されるようになった。また、mTEC欠損動物の研究から、mTECの分化を制御する細胞内外のシグナル伝達機構も解明された(Akiyama et al, *Front Immunol* 2012)。一方、皮質については、皮質上皮細胞(cTEC)がユニークなタンパク質分解系を備えることでT細胞の正の選択に寄与することがわかっているが(Takahama et al, *Semin Immunol* 2010)、cTECや皮質そのものを特異的に欠損するモデル動物は報告されていない。そのため皮質の機能の理解は充分とはいえず、cTECの分化や維持を制御する分子メカニズムも不明であった。

申請者は、野生型C57BL/6マウスの自家交配コロニーから、ナイーブT細胞の減少を示す自然変異系統を見出し、*TN* (*T-lymphopenia of naïve population*)と名付けた。*TN*マウスでは、個体発生や繁殖に異常はみられないが、血液や

リンパ組織におけるナイーブT細胞が著しく少ない。また、胸腺細胞数が顕著に少なく、特にCD4 single positive (SP) およびCD8SP細胞が減少していることから、胸腺T細胞分化が障害され新生T細胞の供給が低下していると考えられた。骨髓キメラマウスの解析から、*TN*マウスのT細胞分化障害の原因は胸腺微小環境側にあることがわかった。さらに、*TN*マウス胸腺にはmTECは存在するもののcTECはほとんど検出されず、胸腺皮質微小環境の形成が大きく障害されていた。これらの表現型は単一遺伝子による常染色体優性遺伝であり、原因遺伝子は不明であった。

上記の研究背景および予備実験結果から、*TN*マウスはcTECを特異的に欠損しており、cTECの分化制御機構と生理的意義を研究するうえで有用なモデル動物と考えられた。

研究の目的

本研究では、cTECを欠損する*TN*マウスをモデル動物とし、その原因遺伝子の同定と表現型解析を目的とした。

- (1) *TN*マウスの原因変異を同定し、cTECの分化が阻害されるメカニズムを明らかにする。その過程で、共通前駆細胞からcTEC / mTECへ分化する機構の詳細を明らかにし、胸腺皮質微小環境の形成のしくみを理解する。
- (2) cTECが存在しない胸腺環境におけるT細胞の正負選択や機能成熟への影響を解析することで、T細胞免疫システムにおける胸腺皮質微小環境の役割を明らかにする。特に、これまでに研究が進んでいない非典型的T細胞も含めて解析を行い、胸腺皮質の新規の機能を理解することをめざす。

研究の方法

- (1) *TN*マウスの原因変異の同定
*TN*マウスの遺伝様式は単一遺伝子による常染色体優性遺伝である。*TN*マウスはC57BL/6系統に由来するため、BALB/c系統との交雑とマイクロサテライトマーカー

を用いた連鎖解析を行い、ゲノム上の候補領域を特定した。当該領域の塩基配列を次世代シーケンスによって決定し、原因変異を同定した。さらに、同定された塩基置換が*TN*マウスの原因であることを証明するため、CRISPR/Cas9ゲノム編集法を用いて、変異アレルの破壊および野生型への置換を行った。

また、同定された変異が遺伝子機能に及ぼす影響を調べるため、マウス線維芽細胞への遺伝子導入や、タンパク質性状を調べるための生化学的実験を行った。

(2) cTECの生理的意義の解明

TECの分化や機能を詳細に解析するため、フローサイトメーターを用いたTECの定量的解析、および胸腺組織切片の免疫染色を行った。特に、胎仔期から成体期までのマウスを対象とし、cTECの分化、成熟、増殖、細胞死を対象として解析した。また、胸腺の切断切片を作製し、走査型電子顕微鏡にて胸腺ストロマの微細構造を解析した。

*TN*マウスの胸腺および末梢のT細胞を対象として、細胞表面マーカーの発現、TCR V α /V β 鎖の頻度、TCR刺激やサイトカインへの反応性を調べた。さらに、*TN*マウスをTCRトランスジェニックマウス(OT-I, OT-II)と交配し、正負選択への影響を解析した。さらに、胸腺で分化する非典型T細胞であるiNKT細胞、 γ δ T細胞の分化と機能成熟について調べた。

研究成果

(1) *TN*マウスの原因変異の同定

*TN*マウスの原因遺伝子を同定するため、連鎖解析によって特定された候補領域(14番染色体上の約11 Mb)中の全塩基配列を次世代シーケンサーによって解析した。その結果、*Psmb11*遺伝子のコーディング領域にアミノ酸置換(G220R)をもたらす塩基置換を発見した。この単一変異によって*TN*マウスの表現型が引き起こされているか特定するため、CRISPR/cas9システムによって*TN*ヘテロマウスの変異アレルを特異的に破

壊したマウス、および変異アレルを野生型に置換したマウスを作製したところ、胸腺形成やcTECの分化が完全に回復した。従って、当該変異が*TN*マウスの原因変異であることが明らかになった。

*Psmb11*はcTECに特異的に発現されるプロテアソーム触媒サブユニット β 5tをコードしている。*Psmb11*欠損マウスのプロテアソームには β 5tの代わりに β 5iが組み込まれることから*TN*マウスと同様の表現系は認められない。*TN*マウスではヘテロ個体でも顕著なT細胞分化異常が観察されたことから、*TN*変異型*Psmb11*はドミナントネガティブ体としてcTECの分化を阻害する可能性が示唆された。そこで培養細胞へのレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入により*Psmb11*を過剰発現させたところ、野生型*Psmb11*はプロテアソームに組み込まれるのに対し、*TN*変異型*Psmb11*は正常なプロテアソーム形成を阻害し、顕著な細胞死を誘導することが明らかになった。同様のプロテアソーム形成阻害と細胞死の亢進は*TN*マウスのcTECにおいても観察されたことから、*TN*マウスにおけるcTECの欠損は、*Psmb11* G220R変異による細胞死によるものであると結論づけられた。

(2) cTECの生理的意義の解明

*TN*マウスでは顕著な胸腺低形成が認められ、また、胎仔期から成体期まで一貫して成熟cTECはほとんど検出されなかった。一方、mTECの頻度は有意に減少していたものの、mTECの機能分子であるAireやCCL21の発現は検出された。*Psmb11*の発現はcTEC/mTEC前駆細胞およびcTECに特異的であるため、これらの表現型は*Psmb11* G220R変異によるcTEC系列特異的な細胞死によって説明できた。*TN*マウスの胸腺では、CD4/8 double positive (DP) 胸腺細胞の分化はみられるものの、CD4SPおよびCD8SP胸腺細胞の頻度が有意に低下していた。OT-IおよびOT-II TCRトランスジェニックマウスとの交配により、*TN*マウスではDP胸腺細胞の正の選択が著しく低下していることが示された。また、末梢T細胞のTCR V α 鎖およびV β 鎖の頻

度が顕著に変化していたことから、T細胞のレパトア選択が大きく影響を受けていることがわかった。しかしながら、内在性スーパー抗原の実験系においては α β T細胞の負の選択は障害を受けておらず、制御性T細胞および腸管上皮間リンパ球(IEL)の産生も正常にみられた。従って、cTEC非存在下の胸腺では、 α β T細胞の正の選択が顕著に阻害される一方、負の選択や、制御性T細胞とIELの分化は影響を受けないことが明らかになった。一方、*TN*マウスでは、胸腺内のiNKT細胞が減少し、末梢iNKT細胞数も激減していた。DP細胞におけるCD1dの発現やTCR V α 14-J α 18の再編成には異常がみられず、iNKT細胞の分化ステージにも大きな変化がみられないことから、*TN*マウス胸腺ではiNKT細胞の正の選択が阻害されていることが示唆された。

さらに興味深いことに、*TN*マウス胸腺では、IL17産生型 γ δ T細胞が増加していた。 γ δ Tの胸腺内分化は成長段階に応じて厳密に制御されており、IL17型 γ δ T細胞は胎仔期と新生仔期にのみ分化する。 γ δ T細胞のレパトアを詳細に調べたところ、*TN*マウス胸腺では胎仔期に分化するV γ 6 $^{+}$ γ δ T細胞が出生後も著しく増加し、対照的に新生仔期に分化するV γ 4 $^{+}$ γ δ T細胞は減少することがわかった。これらの γ δ T細胞のレパトア変化と符合して、*TN*マウスではV γ 6 $^{+}$ γ δ T依存的な肺の炎症が増悪し、V γ 4 $^{+}$ γ δ T依存的な皮膚炎は抑制されていた。従って、*TN*マウス胸腺ではcTECの分化阻害に伴ってIL17型 γ δ T細胞のレパトアが変化し、成体期の炎症応答が著しく変容していることが明らかになった。

以上の結果より、cTECの生理的意義について、次のことが明らかになった。

- cTECは胸腺のサイズの制御に重要である。
- cTECは α β T細胞の正の選択に必須である。
- cTECは α β T細胞の負の選択、および制御性T細胞とIELのアグニスト選択には必要ではない。

(iv) cTECはiNKT細胞の正の選択に必須である。

(v) cTECはIL17産生型 γ δ T細胞のレパトア形成に重要である。胎仔型のV γ 6 $^{+}$ からV γ 4への転換を制御する可能性が示唆される。

本研究では、当初の目的であった*TN*マウスの原因変異とcTEC分化障害のメカニズムを明らかにし、cTECの生理的意義の理解を大きく進展させることができた(Nitta et al, *EMBO Rep* 2015)。特に、cTECによるIL17産生型 γ δ T細胞レパトアと炎症応答の制御は、これまでにない新しい知見であり、想定以上の大きな進展といえる。

まとめ

本研究では、胸腺の皮質上皮細胞(cTEC)の機能を明らかにするため、cTECを欠損する自然変異マウスに着目した。当該マウスの原因変異は*Psmb11*遺伝子のミスセンス変異であり、この変異はcTEC特異的な細胞死を誘導することを明らかにした。また、このマウスでは通常の α β 型T細胞の分化が阻害されていた。興味深いことに、炎症誘導作用をもつ γ δ 型T細胞の機能にも変化がみられ、微生物成分に対する炎症応答が変容していた。これらの結果から、cTECは α β 型T細胞だけでなく炎症性 γ δ 型T細胞の分化制御に寄与することが明らかになった。

研究組織

連携研究者

鈴木 春巳(SUZUKI Harumi)
国立国際医療研究センター研究所・部長
研究者番号: 70235985

研究協力者

室 龍之介(MURO Ryunosuke)
研究者番号: 80761262



研究代表者

NITTA, Takeshi
東京大学大学院医学系研究科・准教授
30373343

主な発表論文等

(雑誌論文) (計8件)

- Nagashima K, Sawa S, Nitta T, Tsutsumi M, Okamura T, Penninger JM, Nakashima T, *Takayanagi H. Identification of subepithelial mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota. *Nat Immunol*, in press. DOI:10.1038/ni.3732.
- Tsukasaki M, Hamada K, Okamoto K, Nagashima K, Terashima A, Komatsu N, Win S, Okamura T, Nitta T, Yasuda H, Penninger JM, *Takayanagi H. LOX Fails to Substitute for RANKL in Osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*. 32, 434-439, 2017. DOI: 10.1002/jbmr.2990.
- *Nitta T, *Suzuki H. Thymic stromal cell subsets for T cell development. *Cell Mol Life Sci*, 73, 1021-1037, 2016. DOI 10.1007/s00018-015-2107-8
- Ono T, Okamoto K, Nakashima T, Nitta T, Hori S, Iwakura Y, *Takayanagi H. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells enhance bone regeneration. *Nat Commun*, 7, 10928, 2016. DOI 10.1038/ncomms10928.
- Takaba H, Morishita Y, Tomofuji Y, Danks L, Nitta T, Komatsu N, Kodama T, *Takayanagi H. Fezf2 orchestrates the thymic program of self-antigen expression for immune tolerance. *Cell*, 163, 975-987, 2015. DOI http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.013
- Nitta T, Muro R, Shimizu Y, Nitta S, Oda H, Ohte Y, Goto M, Yanobu R, Narita T, Takayanagi H, Yasuda H, Okamura T, Murata S, *Suzuki H. The thymic cortical epithelium determines the TCR repertoire of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. *EMBO Rep*, 16, 638-653, 2015. DOI 10.15252/embr.201540096.
- Muro R, Nitta T, Okada T, Ideta H, Tsubata T, *Suzuki H. The Ras GTPase-activating protein Rasal3 supports survival of naïve T cells. *PLoS One*, 10, e0119898, 2015. DOI 10.1371/journal.pone.0119898.
- Okada T, Nitta T, Kaji K, Takashima A, Oda H, Tamehiro N, Goto M, Okamura T, Patrick MS, *Suzuki H. Differential function of Themis CABIT domains during T cell

development. *PLoS One*, 9, e89115, 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0089115.

(学会発表) (計22件)

- Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Harumi Suzuki, Hiroshi Takayanagi, *Thymoproteasome mutations impact CD8 T cell development”, The 7th International Kyoto T Cell Conference 2017, 2017年3月13-17日、京都大学芝蘭会館(京都府京都市)、ポスター
- 新田 剛、高柳 広「胸腺線維芽細胞サブセットの同定と機能解析」第36回日本胸腺研究会、2017年2月4日、京都大学芝蘭会館(京都府京都市)、一般講演
- Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Harumi Suzuki, Hiroshi Takayanagi 「Thymoproteasome mutations impact CD8 T cell immunity」第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月5-7日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)、一般講演・ポスター
- 新田 剛、室龍之介、高柳 広「プロテアソーム遺伝子変異によるCD8 T細胞のレバトA変容」日本リウマチ学会ベシックリサーチカンファレンス、2016年10月14-15日、ステーションコンファレンス東京(東京都千代田区)、ポスター
- Takeshi Nitta, Takehito Ono, Kazuo Okamoto, Hiroshi Takayanagi, “IL-17-producing V γ 6+ $\gamma\delta$ T cells enhance bone fracture healing”, Gamma/Delta T Cell Conference, 2016年6月16-19日、King’s College London (London, UK)、ポスター
- Takeshi Nitta, Masanori Tsutsumi, Shinichiro Sawa, Hiroshi Takayanagi, “Deciphering RANKL-RANK signal in mTEC development”, 2016 ThymUS International Conference, 2016年6月6日、Wailea Beach Marriott Resort and Spa (Hawaii, USA), 2016年6月6日、一般講演
- 新田 剛、新田 幸子、堤 雅紀、澤 新一郎、高柳 広「胸腺髄質に存在する細網線維芽細胞の機能」第25回 Kyoto T cell conference, 2016年5月20-21日、延暦寺会館(京都府京都市)、一般講演・ポスター
- Harumi Suzuki, Norimasa Tamehiro, Ryunosuke Muro, Hiroyo Oda, Takeshi Nitta, Akihiro Kimura, “Differential roles of TCR-proximal signaling adaptors in T cell development” 第44回日本免疫学会総会・学術集会、2015年11月18日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)、招待講演
- Ryunosuke Muro, Takeshi Nitta,

Norimasa Tamehiro, Hiroyo Oda, Harumi Suzuki, “RhoH is essential for development of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells” 第44回日本免疫学会総会・学術集会、2015年11月19日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)、一般講演・ポスター

- 成田知也、室龍之介、鈴木春巳、高柳 広、新田 剛「 $\gamma\delta$ T細胞の分化を制御する胸腺環境因子の解析」第25回 Kyoto T cell Conference, 2015年5月15-16日、京都大学芝蘭会館(京都府京都市)、一般講演・ポスター
- 新田 剛、室龍之介、鈴木春巳「胸腺皮質上皮細胞の欠損を示すbeta5t変異マウスの発見」第34回日本胸腺研究会、2015年2月7日、相模原市立市民・大学交流センター(神奈川県相模原市)、一般講演
- Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Hiroshi Takayanagi, Harumi Suzuki 「Thymic cortical epithelium controls development of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells」第43回日本免疫学会学術集会、2014年12月10日、国立京都国際会館(京都府京都市)、一般講演・ポスター
- 新田 剛、室龍之介、高梨理絵子、高柳広、岡村匡史、鈴木春巳「CRISPR/Cas9ゲノム編集による自然変異マウス原因遺伝子の同定」第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、ポスター
- 新田 剛「免疫システムを形づくる胸腺微小環境」第5回関東甲越免疫不全症研究会 特別講演、2014年9月21日、ステーションコンファレンス東京(東京都千代田区)、招待講演
- 新田 剛「胸腺微小環境の新機能」沖縄感染免疫シンポジウム2014、2014年7月3日、琉球大学(沖縄県那覇市)、招待講演
- 岡村匡史、高梨理絵子、後藤元人、清水有紀子、鈴木春巳、新田 剛「CRISPR/Casシステムを利用したナイーブT細胞減少(TN)マウスの原因遺伝子の同定」第61回日本実験動物学会総会、2014年5月15-17日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)、一般講演
- 新田 剛、室龍之介、新田 幸子、小田 浩代、鈴木 春巳「胸腺皮質上皮細胞による $\gamma\delta$ T細胞の分化制御」第24回 Kyoto T Cell Conference, 2014年5月16-17日、京都平安ホテル(京都府京都市)、一般講演・ポスター
- Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Sachiko Nitta, Hiroyo Oda, Harumi Suzuki, “Thymic cortical epithelium determines the TCR repertoire of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells” *ThymOz International Conference*,

Heron Island (Queensland, Australia)、2014年4月5日、一般講演

- 新田 剛「胸腺皮質上皮細胞による $\gamma\delta$ T細胞のレバトA制御」第23回東京免疫フォーラム、2014年2月24日、東京大学医学科学研究所(東京都港区)、招待講演
- Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Hiroyo Oda, Shigeo Murata, Harumi Suzuki, “Cortical thymic epithelial cells control conventional and innate T cell development” 第42回日本免疫学会総会・学術集会、幕張メッセ(千葉県千葉市)、2013年12月11日、招待講演
- Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Sachiko Nitta, Shigeo Murata, Harumi Suzuki, “A missense mutation in Psmb11 impairs thymoproteasome assembly and T cell development”, The 35th Naito Conference “The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles”, シヤトレーゼガトーキングダム(北海道札幌市)、2013年7月9-12日、一般講演・ポスター
- Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Sachiko Nitta, Shigeo Murata, Harumi Suzuki, “Novel mutant mice lacking cortical thymic epithelial cells”, The 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2013、京都大学芝蘭会館(京都府京都市)、2013年7月3-7日、一般講演

(その他)

ホームページ

- 東京大学大学院医学系研究科免疫学 高柳研究室HP (<http://osteoimmunology.com/>)
- 国立国際医療研究センター研究所HP・注目の論文 (<http://www.rincgm.jp/research/publish.php>)

アウトリーチ活動

「免疫ふしぎ未来」実行委員(平成25～28年度)、Facebook管理者(平成25～28年度) (<https://www.facebook.com/MennekiFushigi>)、Twitter管理者(平成25～28年度) (<https://twitter.com/fushigimirai>)

Meetings

第2回国際シンポジウム

国際Synthetic Immunologyワークショップ SIW4 (共催)

日時 平成25年11月15日(金)～16日(土)

場所 京都大学楽友会館

Workshop Programs

The 4th Synthetic Immunology Workshop
Date: November 15 (Friday) – November 16 (Saturday), 2013
Place: Rakuyu Kaikan, Kyoto University

November 15 (Friday)

13:00 – 13:10 Welcome remarks by Takeshi Watanabe

Session 1. Rebuilding the immune cells (chaired by Yousuke Takahama)

- 13:15 – 13:45 Hiroshi Kawamoto (Kyoto)
Regeneration of antigen specific T cells using the iPSC technology: A novel strategy for cancer immunotherapy
- 13:45 – 14:15 Ken-ichiro Seino (Hokkaido)
Induction of M2 macrophage-like immunosuppressive cells from mouse ES cells

Session 2. Rebuilding the thymus (chaired by Yoko Hamazaki)

- 14:15 – 14:45 Louise Markert (Duke)
Thymus transplantation: Use in complete DiGeorge anomaly and future applications
- 14:45 – 15:15 Yousuke Takahama (Tokushima)
Serial development of cortical and medullary thymic epithelia

COFFEE

Session 3. Rebuilding the SLOs (chaired by Tomoya Katakai and Sergio Lira)

- 15:45 – 16:15 Ryo Goitsuka (Tokyo)
Differentiation potentials of mesenchymal cells expressing Tlx1 in embryonic and postnatal spleen
- 16:15 – 16:45 Takeshi Watanabe (Kyoto)
Identification of organizer responsible for spleen re-generation from neonatal spleen
- 16:45 – 17:15 Sergio Lira (New York)
TNF α -dependent development of lymphoid tissue in the absence of ROR γ t+ cells
- 17:15 – 17:45 Eric Lagasse (Pittsburgh)
Growing a surrogate organ in lymph node: from an experimental approach to potential clinical applications
- 17:45 – 18:00 Miyuki Kinebuchi (Aichi)
To set the cancer stem cell-catching artificial lymph nodes- the preliminary report
- 18:00 – 18:15 Rimpei Morita (Tokyo)
ETV2 directly converts human fibroblasts into functional endothelial cells

Keynote lecture (chaired by Takeshi Watanabe)

- 18:15 – 19:00 Michael Reth (Freiburg)
Rebuilding approaches in immunology

MIXER

November 16 (Saturday)

Session 4. Rebuilding the immune signals (chaired by Hiroshi Kawamoto)

- 9:00 – 9:30 Ichiro Taniuchi (Yokohama)
Reconstitution approach to understand regulatory mechanisms of Zbtb7b and Cd8 gene expression
- 9:30 – 10:00 Akihiko Yoshimura (Tokyo)
Generation of regulatory T cells (Tregs) by TGF-beta and NR4a

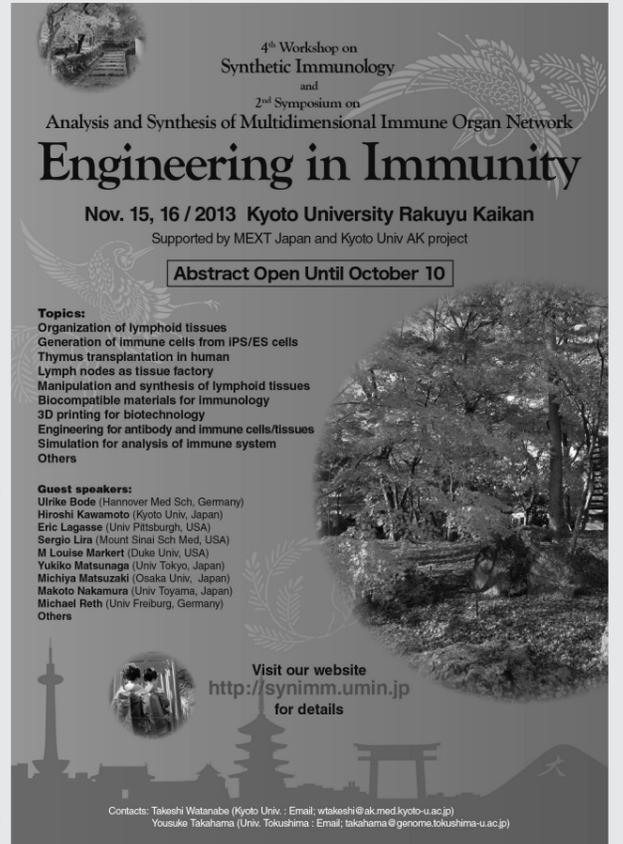
Session 5. 3D tissue engineering (chaired by Makoto Nakamura)

- 10:00 – 10:30 Michiya Matsusaki (Osaka)
3D-vascularized human tissue models constructed by cell surface control using nano-meter sized ECM films
- 10:30 – 11:00 Yukiko Matsunaga (Tokyo)
In vitro 3D microvasculature model chip for biological study
- 11:00 – 11:30 Makoto Nakamura (Toyama)
Development of a custom-made 3D bioprinter: Towards the production of a designed 3D artificial lymph node

LUNCH

Session 6. Novel aspects of SLO functions (chaired by Ryo Goitsuka and Masayuki Miyasaka)

- 13:00 – 13:30 Manuela Buettner (Hannover)
Stromal cells as trend-setters for cells migrating into the lymph node
- 13:30 – 13:50 Tomoya Katakai (Kansai)
Dynamic cell interactions in the lymph node paracortex
- 13:50 – 14:10 Haruko Hayasaka (Osaka)
Involvement of Dachshund1 in the development of the high endothelial venules
- 14:10 – 14:30 Michio Tomura (Kyoto)
Elicitation of a large number of DC migration and their rapid replacement in the draining LN during immune response
- 14:30 – 14:45 Koichi Ikuta (Kyoto)
Distribution and function of IL-7-expressing cells in large intestine
- 15:00 – 15:10 Closing remarks By Michael Reth



腸内細菌による全身免疫組織でのB細胞刺激とIgE 産生制御メカニズムの解明

(平成25年度～平成26年度) Mechanisms for the regulation of B cell activation and IgE generation via gut microbiota.

鈴木 敬一郎 理化学研究所 統合生命医科学研究センター 粘膜免疫研究チーム

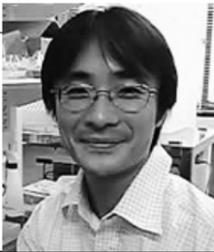
研究代表者

SUZUKI, Keiichiro

理化学研究所 統合生命医科学研究センター

粘膜免疫研究チーム・上級研究員

90391995



研究開始当初の背景

- 腸内細菌は、腸管粘膜組織に存在するリンパ濾胞を刺激してIgA+細胞の産生を刺激する。パイエル板(PP)は腸管で最大のリンパ組織であり、その胚中心(GC)ではIgM+からIgA+へのクラス組換えが優先的に行われる。我々は、過去の研究において、そのメカニズムの解明を進めてきた。本研究の開始当初には、GCの組織的骨格を形成する間質細胞である濾胞樹状細胞(FDC)がIgA誘導に重要な役割を果たしている事を明らかにしていた。FDCは細胞表面に免疫複合体の形で抗原を保持する事が知られている。そこで、腸内細菌の抗原がPPの内部でB細胞などの免疫細胞と接触し、免疫機能の調節に関与するのではないかと考えた。
- 腸内細菌が宿主恒常性に寄与するメカニズムは複雑であり、不明の点が多い。無菌動物や抗生物質の内服によって腸内細菌の欠損が生じた場合には、IgE+細胞の誘導とアレルギ一疾患の発症が促進される。従って、腸内細菌がPPなどの腸管免疫組織内で免疫細胞に直接刺激を与える事によってIgE産生を制御している可能性が考えられる。腸内細菌やアレルゲン、さらにはそれらと接触する免疫細胞を可視化する事によって腸内細菌による免疫細胞制御の時空間的なメカニズム解析が可能になるのではないかと考えた。

研究の目的

本研究の目的は、腸内細菌がどのようにして宿主恒常性の維持に寄与するのかを解明する事である。腸管内には常在細菌や食物因子など多量の抗原が存在しており、これらの外来因子は腸管内腔に分泌されたIgA抗体と結合して体外に排出される。また、IgA抗体と結合した抗原はPP内に積極的に取り込まれて免疫細胞を刺激する事によって免疫機能を調節すると考えられている。しかし、IgA抗体がどのようにして体外排出と組織内取り込みの相反する作用を發揮するのかは不明である。

本研究では、腸内細菌や食物アレルゲンの体外排出と組織内取り込みを腸管IgAが調節する事によってIgE産生制御に重要な役割を果たしているのではないかと、という仮説を立てて検証を開始した。この過程において、腸管内に分泌されたIgA抗体が細菌の抗原分子とは無関係に糖鎖を介して腸内細菌と非特異的に結合する、という事を見出した。この現象は、IgAと腸内細菌の結合

が抗原抗体反応とは異なる経路によって生じる事を示している。我々は、この結合に必要な細菌因子が生体恒常性の維持において鍵分子となるのではないかと、という仮説を新たに設定して検証を進める事とした。その結果、IgE産生制御とは異なる側面において腸内細菌-宿主間の相互作用に必須となる細菌因子を同定する事となった(後述)。当初の方向性から多少の修正が生じたが、全期間を通して腸内細菌と宿主の恒常性維持機構について解明する事を目的として本研究を遂行した。

研究の方法

- IgE産生モデルマウスの検討。**
食物に反応するIgE産生を誘導する目的で、抗原としてovalbumin(OVA)を選択した。明確なT細胞反応を誘導する為に、T細胞を欠損するCD3e欠損マウスにOVA特異的に反応するOTII-Tg CD4+T細胞を移入し、経口的にOVAを投与した。
- OVAの生体内での可視化。**
経口アレルゲンであるOVAの生体内分布を追跡する目的で、上記のOTII CD4+T細胞移入CD3e欠損マウスの免疫細胞を用いて抗OVA抗体の作製を行った。移入マウスの腸管組織の単細胞浮遊液を作製し、ミエローマ細胞株であるP3U1と細胞融合する事によってハイブリドーマを作製した。IgA産生クローン(7-6)とIgG産生クローン(76-3)を単離した。
- IgA糖鎖に結合する細菌因子の同定と変異株の作製。**
ヒトの代表的な腸内細菌であるBacteroides thetaiotaomicron (*B. theta*)の遺伝子にランダム変異を挿入するトランスポゾンを利用した。50万を超える*B. theta*変異株ライブラリーを作成し、7-6IgAの糖鎖に対する結合性が低下した変異体をフローサイトメトリーにより単離した。同定された*B. theta*の遺伝子について、相同組換えによって欠損させる手法を用いて遺伝子欠損細菌株を作成した。
- 腸内細菌のin vivoにおける可視化。**
腸内細菌のin vivoにおける分布を可視化する目的で、*B. theta*に特異的に反応するプローブを作成し、Fluorescence in situ hybridization(FISH)を用いて腸管内に定着させた*B. theta*の可視化を行った。
- ノトバイオートマウスの作製。**
無菌マウスに*B. theta*を単体、あるいは他の様々な細菌株と混合して定着させる事に

- よってノトバイオートマウスの作製を行った。無菌マウス作製は、三共ラボ、理化学研究所・統合生命医科学研究センター、Johns Hopkins大学の3カ所で行った。
- 腸内細菌のトランスクリプトーム解析。**
マウス盲腸内容物からTotalRNAを抽出し、その後mRNAを精製し、Illumina HiSeqを用いて塩基配列の解読を行った。得られた配列データは、1253種の細菌、97種の古細菌、326種の真核生物、1420種のウイルスのゲノム配列に加えてマウスの全ゲノム配列を結合したレファレンス配列上にマッピングを行った。*B. theta*遺伝子(coding sequence)上にマッピングされた遺伝子をHTSeq-countを用いてカウントし、その後DESeq2を用いて統計解析を行った。
 - DSS誘導腸炎モデルの作製。**
3-4%のデキストラン硫酸をマウス飲料水として7日間投与後、通常水に切り替えた。腸炎誘導後、大腸組織を摘出しホルマリン固定後パラフィン包埋し切片の薄切を行った。切片はヘマトキシリン-エオジンを用いて染色(HE染色)し、病理医による盲検判定を実施した。

研究成果

- 糖鎖を介するIgA-腸内細菌結合の発見。**
IgE産生のマウスモデルとして、CD3e欠損マウスにOTII-Tg CD4+T細胞を移入してOVAの経口投与を行った。血清中のIgE抗体は野生型のC57BL6マウスと比較して移入マウスにおいて有意に上昇している事が確認された。そこで、アレルゲンであるOVAの生体内分布を確認する目的で、移入マウスの腸管組織を抗OVA-IgG抗体(76-3)で染色した。その結果、大部分のOVA蛋白は腸内細菌の表面を被覆するように分布する事が明らかとなった。通常の野生型マウスにOVAを経口投与してもOVAが腸内細菌を被覆するという現象は認められなかった。次に、移入マウスの腸管IgAを測定してみた所、抗OVA-IgA抗体が多量に分泌されている事が明らかとなった。これらの観察により、移入マウスの腸管内ではOVAと腸管IgAの免疫複合体が腸内細菌の表面を被覆しているものと考えられた。この現象をさらに詳細に調べる目的で、ハイブリドーマから精製した抗OVA-IgA(7-6)抗体と抗OVA-IgG(76-3)抗体を用いて培養細菌株との結合の有無についてフローサイトメトリーで解析した。7-6IgAは解析した全ての細菌種に非特異

的に結合し、76-3IgGは結合が認められない事が明らかとなった。なお、7-6の抗原結合部位をOVAでブロックしても細菌株との結合性に変化は認められなかった。7-6IgAと76-3IgGの相違について比較した所、7-6IgAでは強い糖鎖修飾が存在する事が明らかになった。糖鎖修飾の弱い精製IgA抗体を入手して細菌株との結合を比較した所、非特異的な結合性が認められない事が明らかになった。以上より、腸管IgAは糖鎖を介して腸内細菌と非特異的に結合する事が明らかになった。OVAの主要局在部位が腸内細菌の表面であった事から、糖鎖を介するIgAと腸内細菌の非特異的結合がアレルゲンに対する宿主反応性に影響を与えている可能性が考えられた。糖鎖結合に必要な細菌因子がIgE産生制御などの生体恒常性維持において重要な鍵を握っているのではないかと、という仮説を立て、以後の研究を遂行した。

- 糖鎖結合に関わる細菌因子の同定。**
多数の細菌株の中で7-6IgAに最も強い結合性を示したのが*B. theta*であった。糖鎖結合に関与する細菌因子を同定する目的で、トランスポゾンを用いて*B. theta*遺伝子にランダム変異を挿入した。50万以上の変異株を作製し、7-6IgAとの結合性が低い変異株をフローサイトメトリーにより濃縮した。この作業を16回繰り返し、最後の変異株集団についてHiSeqを用いてトランスポゾン導入部位の解析を行った。その結果、3つの遺伝子変異が大幅に濃縮されていた。これらの細菌遺伝子について、7-6IgAとの相互作用によって発現が変動するのを検討した。7-6IgA産生ハイブリドーマをRag欠損マウスの皮下に移植する事により7-6IgAを唯一の抗体分子として腸管内に分泌させると、濃縮された3つの遺伝子の中で1つの遺伝子の発現が有為に上昇する事が明らかになった。このIgA誘導因子の詳細は未知であったが、データベース上におけるホモロジー検索を行った所、*B. theta*のみではなく、Bacteroidetes門に属する細菌に広く共有される遺伝子である事が明らかとなった。
- B. theta*の可視化によるIgA誘導因子の機能解析。**
同定したIgA誘導因子の機能を明らかにする目的で、*B. theta*における当該遺伝子の欠損株(KO株)を作製した。SPF環境で飼育したC57BL6マウスを抗生物質で処理した後野生型の*B. theta*とKO株を定着させた。

このマウスの大腸における*B. theta*の分布についてFISHを用いて可視化した。野生株、KO株ともに大腸粘液内に分布し、組織内への侵入は確認できなかった。しかし、IgA誘導因子の欠損株においては菌体の大きさが1/2程度となっている事が明らかとなった。この現象を確認する為に無菌マウスに*B. theta*とKO株を単一定着させて同様の実験を行った。すると、単一定着モデルにおいてはどちらの株もSPFマウスにおけるKO株と同程度の小さい形態を示す事が明らかとなった。この事より、IgA誘導因子はSPFマウスに存在していた他の細菌種との相互作用の際に機能を發揮すると考えられた。また、代謝活動が活発な細菌は大きな形態を示す事が知られており、これらの観察はIgA誘導因子が腸内細菌の代謝活性化に関与している事を示唆していると考えられた。

- 腸内細菌のトランスクリプトームによるIgA誘導因子の機能解析。**
上記の形態変化が他の細菌種との相互作用による代謝活性化に起因するのかを明らかにする目的で細菌のRNA-Seqを施行した。まず、無菌マウスに*B. theta*の野生株あるいはKO株を単一定着させ、盲腸内容物を回収した。次に、単一定着させたマウスにさらに別の種類の細菌を3段階に分けて追加定着させた。まず、*Clostridium*属の培養可能株を4種混合して追加、次に*Lactobacillus*属の培養可能株3種を混合して追加、最後にSPFマウスの糞便を追加し、これらのマウスから盲腸内容物を回収した。盲腸内容物の細菌からRNAを抽出してRNA-Seqを施行した。*B. theta*の遺伝子発現について解析した所、SPFマウスの糞便を追加した場合のみ野生型*B. theta*とKO株の遺伝子発現の違いが明確になる事が明らかになった。特に、食事由来の炭水化物分解に関わる酵素の発現がKO株で著しく低下する事が明らかとなり、他の細菌種との相互作用下においてIgA誘導因子が*B. theta*の代謝活動に深く関わっている事が明らかとなった。
- IgA誘導因子の宿主に対する影響。**
糖鎖を介するIgAと腸内細菌の結合がIgE産生に関与する可能性を考えて研究を進めていたが、野生型とKO株を定着させたマウスにおける血清IgEレベルに明確な違いを認める事はできなかった。そこで、IgA誘導因子が大腸の恒常性維持に関与している可能性を考えて*B. theta*とKO株を定着させたSPFマウスにおいてDSS誘導腸炎を適用した。その

結果、野生株の*B. theta*定着によってDSS腸炎に対する抵抗性が獲得されるのに対して、IgA誘導因子の欠損株では腸炎抵抗性が全く獲得されず、*B. theta*の代わりにPBSを投与したコントロール群と全く違いを認めない事が明らかとなった。これらの結果より、IgA誘導因子は*B. theta*の代謝活性化を調節して宿主の大腸恒常性を維持する為に必須の役割を担っている腸内細菌因子である事が明らかとなった。

以上の研究成果は、糖鎖との結合に関わる新規の腸内細菌因子が生体恒常性の維持に重要な役割を果たしている事を明らかにしたものであり、この内容をまとめた論文は現在投稿中である。

まとめ

本研究を遂行する事により、腸管の恒常性維持において必須の役割を果たす腸内細菌因子を発見した。この因子はBacteroidetes門で広く共有される分子であり、その欠損によって大腸恒常性が著しく損なわれる事が明らかとなった。これは、本因子が腸内細菌の代謝活性化を調節する為であり、Bacteroidetes門に属する細菌のみならず、全ての腸内細菌の活動を制御する重要な因子である事が明らかとなった。

研究組織

連携研究者

戸村 道夫(TOMURA, Michio)
大阪大谷大学 免疫学講座 教授
研究者番号: 30314321

主な発表論文等

(雑誌論文) (計4件)

- 1) Ito K, Nakajima A, Fukushima Y, Suzuki K, Sakamoto K, Hamazaki Y, Ogasawara K, Minato N, Hattori M. (2017) The potential role of Osteopontin in the maintenance of commensal bacteria homeostasis in the intestine. *PLoS One*. 12(3): e0173629.
- 2) Sutherland D*, Suzuki K*, and Fagarasan S. (2016) Fostering of advanced mutualism with gut microbiota by the Immunoglobulin (Ig) A. *Immunological reviews*. 270(1):20-31 (* co-first author)

- 3) Suzuki K, and Nakajima A. (2014) New aspects of IgA synthesis in the gut. *International immunology*. 26(9):489-94.
- 4) Obata Y, Kimura S, Nakato G, Iizuka K, Miyagawa Y, Nakamura Y, Furusawa Y, Sugiyama M, Suzuki K, Ebisawa M, Fujimura Y, Yoshida H, Iwanaga T, Hase K, and Ohno H. (2014) Epithelial-stromal interaction via Notch signaling is essential for the full maturation of gut-associated lymphoid tissues. *EMBO reports*. 15(12):1297-304.

(学会発表) (計5件)

- 1) Nakajima A, Murata M, Son A, Maruya M, Suzuki K: Antigen-

independent interaction with IgA regulates functional activity of gut microbiota. 第45回日本免疫学会学術集会 2016.12.5.

2) Suzuki K: Intestinal IgA as a factor of symbiosis. Joint Workshop of 2nd JST-SICORP Workshop and 6th Investigate Commission of ORTHO-Organogenesis 2016.12.7-12.9.

3) Suzuki K: Identification of a key factor for the function of gut microbiota via IgA-glycans. Cold spring harbor conferences Asia, Frontiers of Immunology in Health & Diseases. 2016.10.3-10.6.

- 4) 鈴木敬一郎: 腸管IgAの産生メカニズムとその機能. 獣医アトピー・アレルギー・免疫学会 2014.1.19.

5) Nakajima A, Suzuki K: Mechanism and function of non-specific binding of intestinal IgA to commensal microbiota. 第42回日本免疫学会学術集会 2013.12.11-12.13.

(図書) (計1件)

- 1) Suzuki K and Fagarasan S. (2016) Structure and Function of IgA. *Encyclopedia of Immunobiology*. Vol2. 23-30.

Meetings

配偶子産生制御・免疫四次元空間 二班合同シンポジウム

ニッチの謎を議論する: 免疫器官と生殖器官から見た微小環境の実態、制御、生理的意義

日時 平成26年6月18日(水)~19日(木)

場所 国際高等研究所(京都府木津川市)



Meetings

第3回徳島大学国際免疫学シンポジウム(共催)

日時 平成26年2月13日(木)~14日(金)

場所 徳島大学藤井記念ホール

Thursday 13 February

- 13:00 - 13:10 Opening remarks by Yousuke Takahama
- Session 1: Immune system development** (Chaired by Y Takahama & M Matsumoto)
- 13:10 - 13:45 Alfred Singer (Bethesda) Basis for CD4 T cell fate determination in the thymus
- 13:45 - 14:05 Kensuke Takada (Tokushima) What is the positive selection for?
- 14:05 - 14:25 Mitsuru Matsumoto (Tokushima) Aire-dependent organization of thymic microenvironment for the establishment of self-tolerance
- 14:25 - 15:00 Shigeo Koyasu (Yokohama) Allergic inflammation and natural helper cell, a member of ILC2s

Group photo & coffee

Session 2: Immune mechanisms (Chaired by K Yasutomo & T Yamazaki)

- 15:30 - 16:05 Shizuo Akira (Osaka) The role of Regnase-1 in the control of immune response
- 16:05 - 16:40 Shohei Hori (Yokohama) Genetic control of regulatory T cell homeostasis in non-lymphoid tissues
- 16:40 - 17:05 Masakatsu Yamashita (Ehime) The role of Menin in CD4 T cell senescence and homeostasis
- 17:05 - 17:40 Dinah Singer (Bethesda) The two faces of BRD4

Session 3: Short talks I (Chaired by I Okazaki & C Ishifune)

- 17:40 - 17:50 Izumi Ohigashi (Tokushima) Development and developmental potential of $\beta 5t$ -expressing thymic epithelial cells
- 17:50 - 18:00 Motoko Kimura (Chiba) Strong TCR signaling prolongs lineage uncertainty but then accelerates lineage commitment during MHC-I specific positive selection in the thymus
- 18:00 - 18:10 Hitoshi Nishijima (Tokushima) Ectopic Aire expression in thymic cortex reveals inherent properties of Aire as a stromal factor within medullary microenvironment
- 18:10 - 18:20 Chieko Ishifune (Tokushima) Requirement of Notch signaling for the development of intestinal intraepithelial T cells
- 18:20 - 18:30 Kyoko Masuda (Kyoto) Regeneration of antigen specific T cells using the iPS cell technology: A novel strategy of cancer immunotherapy

Dinner at Isuien, hosted by Susumu Kagawa, President, University of Tokushima

MC by N Ishimaru & R Arakaki

Friday 14 February 2014

Session 4: Immune system deviation (Chaired by Y Minegishi & N Ishimaru)

- 9:30 - 10:05 Hajime Karasuyama (Tokyo) Emerging roles for basophils in health and disease
- 10:05 - 10:25 Yoshiyuki Minegishi (Tokushima) Molecular pathogenesis of hyper IgE syndrome
- 10:25 - 10:45 Naozumi Ishimaru (Tokushima) Controlling autoimmunity by adipose tissue-associated macrophages

Coffee

Session 5: Short talks II (Chaired by Y Kudo & Y Nishikawa)

- 11:00 - 11:10 Yohko Kitagawa (Osaka) Divergent roles of the genome organizer Satb1 in the development of thymic and peripheral regulatory T cells
- 11:10 - 11:20 Takaaki Tsunematsu (Tokushima) The novel function of geminin via the escape from ubiquitin proteasome-mediated proteolysis in DNA replication and cell differentiation
- 11:20 - 11:30 Takeshi Wada (Tokushima) Enhanced mast cell activation in mouse model of hyper-IgE syndrome
- 11:30 - 11:40 Daisuke Sugiura (Tokushima) Molecular analyses of an inhibitory co-receptor, LAG-3
- 11:40 - 11:50 Saradee Warit (Pathumthani) Candidate protein markers to determine infected Tuberculosis stages in humans
- 11:50 - 12:00 Beata Shiratori (Sendai) Attempt to distinguish between LTBI and active TB by latency-related antigens and biomarkers

Lunch with students, managed by K Takada & I Ohigashi

Session 6: Immune system regulation (Chaired by T Okazaki & T Sakai)

- 14:00 - 14:35 Vijay Kuchroo (Boston) Transcriptional network controlling the development of Tregs and Th17 cells
- 14:35 - 15:10 Akihiko Yoshimura (Tokyo) Regulation of Treg development by TGF-beta and NR4a
- 15:10 - 15:30 Taku Okazaki (Tokushima) Regulation of autoimmunity by immuno-inhibitory receptors

Closing remarks by Sumihare Noji, Director of Research, University of Tokushima

The Third Bizan Immunology Symposium at The University of Tokushima

Immune System Development, Deviation, and Regulation

February 13th (Thu) - 14th (Fri), 2014
Fujii Memorial Hall, Kuramoto Campus, The University of Tokushima

Invited speakers
Alfred Singer (Bethesda)
Shigeo Koyasu (Yokohama)
Dinah Singer (Bethesda)
Shohei Hori (Yokohama)
Shizuo Akira (Osaka)
Christoph Klein (Munich)
Hajime Karasuyama (Tokyo)
Vijay Kuchroo (Boston)
Akihiko Yoshimura (Tokyo)

Abstracts for oral or poster presentation are open for submission. The deadline is December 16th, 2013. Travel allowance of up to 50,000 JPY per abstract application is available for up to 10 young researchers including graduate students. Please specify travel expenses at the time of abstract submission. Successful applicants will be notified by the end of December 2013.

登録申込費 2013年12月16日
10名以上とする若手研究者にのみ対象とする旅費支援を実施します
登録申込の際に旅費支援申請を併せてください
発表結果は12月末までに通知します

Free Entry For All
入場 無料 来聴 歓迎

Contact:
Immunology Program at The University of Tokushima (IPUT)
3-15-15 Kuramoto, Tokushima 770-8503, Japan
Phone: +81-88-833-9452 E-mail: takahama@immunol.tokushima-u.ac.jp

主催: 徳島大学革新的特色プロジェクト「免疫自己システム研究プログラム」
共催: 新学術領域研究「免疫四次元空間ダイナミクス」/ 共同利用共同研究拠点「免疫学研究拠点」
医科学教育部・免疫学教育部の大学院特別講義および徳島免疫学セミナーを兼ねています



免疫応答における接着制御分子の役割

(平成25年度～平成26年度) **Regulatory mechanisms of adhesion critical for immune responses.**

片桐 晃子 北里大学・理学部・生物科学科

研究代表者

KATAGIRI, koko

北里大学・理学部・生物科学科・教授

00322157



研究開始当初の背景

免疫システムは、免疫細胞が活発に生体内を移動することを基盤としており、適切な時に、適切な場所へ移動することで、生体防御機能を発揮することができる。従って免疫動態は時間的・空間的に厳密に制御されている。免疫応答が開始する場であるリンパ節は全身に散在している。直接病原体の侵入を見張っている樹状細胞は皮膚や粘膜などに存在し、外敵を捉えると、組織内での拘束を逃れ、リンパ管を通過してリンパ節へ移動し、リンパ球へ外敵侵入の情報を伝える。リンパ球は血流を介して常に全身を移動しているが、リンパ節に到達すると、高内皮細静脈(HEV)上で停止し、これを通り抜けリンパ節内に入る。リンパ球はリンパ節に入った後もストローマ細胞ネットワーク上を活発に遊走し、自分の抗原受容体が認識する特異抗原を提示する樹状細胞に出会うと停止し活性化・分化の方向へ向かう。このように、免疫システムは、免疫細胞の活発な移動と適切な場での停止の交互のダイナミックな調和によって成り立っている。

この動的監視システムの基盤となっているのが、インテグリンを介する接着と遊走である。リンパ球上に発現するインテグリンは、血管内では接着できないようにブロックされており、適切な場で提示された遊走因子によって、秒単位で活性化され速やかに接着性を上昇させる。これによりリンパ球はHEV上で停止し、リンパ節内に入ることができる。また、インテグリンは、リンパ球が特異抗原を探してリンパ節内のストローマ細胞ネットワーク上を遊走し、樹状細胞上を走査する際の足場として、免疫応答の始動に寄与している。さらにリンパ球はインテグリンを介して樹状細胞に強固に接着することで、抗原情報を受け取り活性化・分化する。従ってインテグリンを介する接着・遊走の分子機構を明らかにすることは、免疫細胞の移動と場の拘束の仕組みを理解することにつながる。

低分子量Gタンパク質Rap1、その下流標的分子RAPL・Mst1は、リンパ球の極性形成を誘導し、leading edgeにインテグリンを集め、接着・遊走を促進し、免疫動態に重要な役割を果たすことを申請者は明らかにして来た。Mst1はRap1が活性化されRAPLと会合すると、リン酸化酵素活性が上昇し、その局在が核周辺領域からleading

edgeへ秒単位で移動することや、Mst1-RAPLはスクロース密度勾配遠心法によって、同じ小胞分画に濃縮されること、免疫電顕法で小胞の細胞質側に局在することから、Rap1/RAPL/Mst1シグナルはおそらくインテグリンを含む小胞の極性輸送に関与すると推測された。

研究の目的

インテグリンの接着活性の上昇に関与する極性輸送の分子機構を明らかにするために、小胞輸送に関与する約60種類のRab family GTPasesについて、yeast two-hybrid法によりMst1とin vitroで会合し、またCOS細胞での一過性発現系で共局在を示す分子としてRab13をスクリーニングした。Rab13を免疫動態における役割とその分子機構を解明する。

研究の方法

- (1) In vitroにおけるケモカイン刺激によるRab13活性化の定量は、proB cell line, BAF細胞とCXCL12、及びMICAL-L2RBDとGST融合タンパク質を用いたpull-down assayによって行った。
- (2) リン酸化はPhosphotagを用いて検討した。Rab13, LFA-1, Lifeact, VASP分子の細胞内動態は、GFP, Venus, mCherryの蛍光tagを融合させ、Zeiss510共焦点顕微鏡を用いて撮影した。
- (3) Rab13 conditional knockout miceは、exon1をcre-loxシステムで目的の細胞でのみ欠損させた。免疫組織は凍結切片を作製し免疫染色した。
- (4) 精製ICAM-1上での接着・遊走を測定し、metamorph softwareを用いて定量・解析した。

研究成果

- (1) COS細胞を用いた過剰発現系で、Mst1がRab13GEFであるDENND1Cと会合しリン酸化することでRab13が活性化される

ことが示唆されたので、ケモカインによるRab13活性化への関与を調べた。図1に示すように、DENND1CはCXCL12刺激によりリン酸化レベルが上昇するが、Mst1をノックダウンした細胞では上昇が認められないことから、ケモカイン刺激でMst1依存性にDENND1Cがリン酸化されることが判明した。DENND1Cのノックダウンによってケモカイン刺激によるRab13活性化が生じなくなることから、Mst1によるDENND1Cのリン酸化はケモカインによるRab13活性化に重要であることが示唆された。

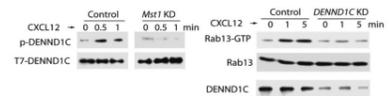


図1 ケモカインによるDENND1Cのリン酸化(左)とRab13活性化(右)

- (2) ケモカインによって活性化されたRab13は、LFA-1と会合し、極性形成した細胞の先端部においてLFA-1クラスターと共局在することがわかった(図2)。

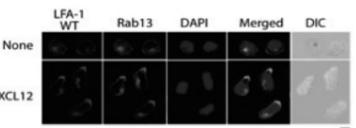


図2 LFA-1クラスターとRab13の局在の一致

- (3) Rab13はアクチン繊維にそって前方へ移動することがわかった(図3)。

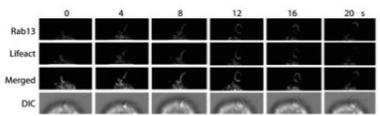


図3 Rab13が線上にlifeactで示されたアクチンケーブルにそって先端膜へ移動する。

このケモカイン刺激によるアクチンケーブルの発達に、アクチン進展因子VASPが関与するかどうか調べたところ、VASPはアクチン繊維の先端部への局在することがわかった(図4)。また、重要な157番目のリン酸化がMst1欠損によって低下することが判明した(図5)。

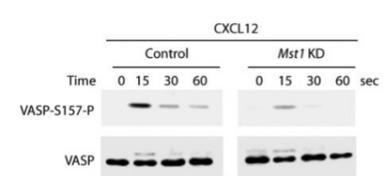


図4 CXCL12によるVASP157番目のセリン残基のリン酸化はMst1ノックダウンで低下する。

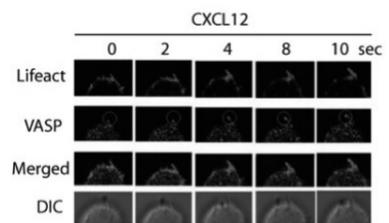


図5 VASPは伸展するアクチンケーブルの先端部に局在する。

- (4) Rab13を動かなくしたリンパ球では、細胞表面でLFA-1が集まらず、細胞の接着活性や運動能が低下した(図4)。また、Rab13をもたないマウスを作製したところ、リンパ節などへのリンパ球の移動ができず、これらの臓器が低形成にあることが示された(図5)。

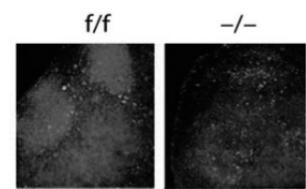
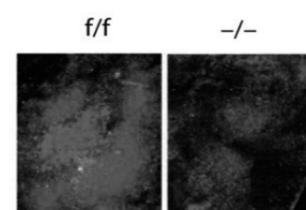


図6 Rab13欠損マウスのリンパ組織の細胞数は減少する。

これらのことから、Rab13が機能することにより、LFA-1が細胞内を輸送されて、細胞膜の局所に集積すること、また、その機能が破綻することにより、リンパ球の接着や移動ができなくなり、免疫機能が損なわれることが明らかになった。

まとめ

リンパ球がインテグリンを介して免疫の場を構成する細胞や基質に接着することは、リンパ球の分化、抗原応答の制御、自己寛容の誘導に重要な役割を果たしている。特に、リンパ球ではLFA-1/ICAM-1を介する接着が主要な役割を果たしている。LFA-1の極性輸送に関与する分子として、Rab family 低分子量Gタンパク質のRab13を同定するとともに、Mst1リン酸化酵素の下流標的基質を解明し、Mst1とRab13が協調してLFA-1の接着活性を上昇させる機構を明らかにした。

主な発表論文等

(雑誌論文)(計4件)

- 1) Ishihara S, Nishikimi A, Umemoto E, Miyasaka M, Saegusa M, Katagiri K. Dual functions of Rap1 are crucial for T-cell homeostasis and prevention of spontaneous colitis. *Nat. Commun.* 6: 8982, 2015. 査読有
- 2) Yamamoto H, Lu J, Oba S, Kawamata T, Yoshimi A, Kurosaki N, Yokoyama K, Matsushita H, Kurokawa M, Tojo A, Ando K, Morishita K, Katagiri K, Kotani A. miR-133 regulates Evi1 expression in AML cells as a potential therapeutic target. *Sci. Rep.* 6:19204, 2015 査読有
- 3) Nishikimi A, Ishihara S, Ozawa M, Etoh K, Fukuda M, Kinashi T, Katagiri K. Rab13 is a downstream effector of Mst1 to mediate LFA-1 activation critical for lymphocyte trafficking. *Science Signaling* 7(336):ra72, 2014 (査読有)
- 4) Yamamoto-Taguchi N, Satou Y, Miyazato P, Ohshima K, Nakagawa M, Katagiri K, Kinashi T, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP Factor Induces Inflammation through Labile Foxp3 Expression. *PLoS Pathogens*, 9(9):e1003630, 2013 (査読有)

(学会発表)(計5件).

- 1) Nishikimi A, Ishihara S, Ozawa M, Kinashi T, Katagiri K. Rab13 is a downstream effector of Mst1 to

mediate LFA-1 activation crucial for lymphocyte trafficking. 第43回日本免疫学会学術集会、京都、国立京都国際会館 2014年12月10日。
2) Tanno S, Nishikimi A, Ishihara S, Katagiri K. Molecular mechanisms of Rab13-dependent transport of LFA-1 during lymphocyte chemotaxis. 第43回日本免疫学会学術集会、京都、国立京都国際会館、2014年12月10日。
3) 石塚大地、錦見昭彦、石原沙耶花、片桐晃子 ケモカインに反応したリンパ球の遊走におけるRab13を介したLFA-1輸送機構の解明 第37回日本分子生物学会年会、横浜、パシフィコ横浜、2014年11月26日。
4) 大内裕太郎、錦見昭彦、石原沙耶花、小沢まどか、福田光則、木梨達雄、片桐晃子 Rab13はMst1の下流分子であり、LFA-1の局在制御を介してリンパ球の遊走を制御している 第37回日本分子生物学会年会、

横浜、パシフィコ横浜、2014年11月26日。
5) 勝又美菜子、錦見昭彦、石原沙耶花、三枝信、片桐晃子 生殖器の上皮および腺組織の細胞増殖におけるRab13の役割 第37回日本分子生物学会年会、横浜、パシフィコ横浜、2014年11月27日。

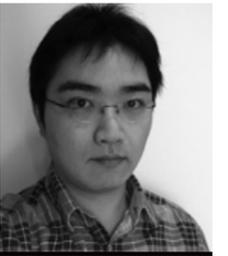
脳梗塞における炎症の沈静化と組織修復メカニズムの解析

(平成25年度～平成26年度) The clarification of the molecular mechanisms underlying resolution of cerebral post-ischemic inflammation

七田 崇 慶應義塾大学医学部

研究代表者

SHICHITA, Takashi
慶應義塾大学・医学部・講師
00598443



研究開始当初の背景

脳梗塞は、脳血流の途絶によって脳組織が虚血壊死に陥る病態である。脳組織の壊死に伴って脳内では炎症が惹き起こされる。脳虚血後炎症は病態の悪化、組織の修復に密接に関連していると考えられ、脳梗塞患者の予後に大きな影響を与えることが判明している。しかしながら、脳梗塞における炎症のメカニズムはまだ十分に明らかになっていない。特に、脳梗塞後の炎症がどのように鎮静化して、組織修復へと至るのか、そのメカニズムについてはほぼ未解明のままである。

研究の目的

脳虚血によって虚血壊死に陥った脳組織で、虚血後炎症が鎮静化し、組織修復に至るメカニズムを明らかにする。脳内における組織修復の機能をもつ細胞集団を同定し、その組織修復の機能を規定する転写因子(マスター遺伝子)を決定する。さらにこのような細胞集団を分化誘導する内因性組織因子(脳内因子)を同定することによって、脳虚血後の一連の組織修復メカニズムを解明する。

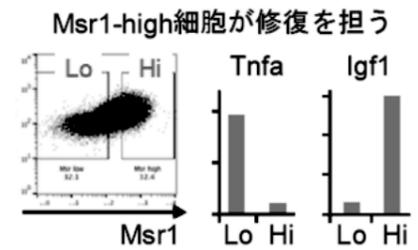
以上によって脳虚血という病態によって惹き起こされる組織環境の変化において免疫応答がどのように変化するのか、時間軸を含めた4次元解析を行う。脳虚血後炎症の鎮静化と組織修復のメカニズムを明らかにし、脳梗塞患者の生活予後を改善するような画期的な新規治療法を開発するための土台を作り上げることを目的とする。

研究の方法

脳虚血モデルにおける組織修復のメカニズムを解明するために、本研究では脳梗塞発症後6日目(脳内の炎症が鎮静化する時期であると知られている)の時期に着目する。脳梗塞発症後6日目の虚血脳から、脳細胞(ミクログリアなど)、脳内に浸潤した炎症細胞(マクロファージやT細胞など)をPercollによって抽出し、表面マーカーの違いによってセルソーターを用いて単離し、組織修復因子や神経栄養因子(IGF-1やBDNFなど)を産生する集団を同定する。このような炎症を収束

に導く細胞集団の同定と誘導メカニズムの解明から、脳虚血後炎症の鎮静化・組織修復メカニズムを明らかにする。

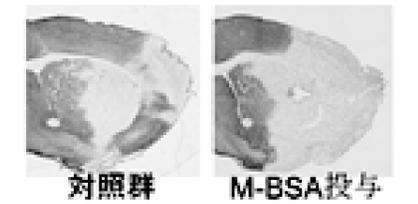
研究成果



脳虚血モデルマウスを作製し、発症6日目の炎症細胞を解析した。特にミクログリアや脳内に浸潤したマクロファージはIGF-1を主とした神経栄養因子を産生する修復担当細胞であることが明らかとなった。これらのマクロファージやミクログリアを用いたマイクロアレイ解析からIGF-1の発現と相関する因子を検索したところ、スカベンジャー受容体MSR1がIGF1の発現と正の相関を示すことが判明した。脳梗塞巣に浸潤したマクロファージやミクログリアは発症後経時的にMSR1を強く発現するようになり、特にMSR1を高発現するマクロファージやミクログリアはIGF-1を強く産生する細胞集団であることを発見した。また、MSR1を高発現する細胞はTNF α などの炎症性因子を産生しないことから、明確に炎症細胞と区別できる集団であると考えられた。

MSR1は炎症惹起因子(DAMPs: Damage associated molecular patterns)を排除する受容体であることから、DAMPsとして知られるHMGB1タンパクやPRX(ペルオキシレドキシン)タンパクを蛍光標識して、培養マクロファージに添加したところ、MSR1依存的にこれらの蛍光標

M-BSA投与による梗塞巣拡大



識されたDAMPsを細胞内に取り込み排除することが明らかとなった。脳梗塞内におけるMSR1を高発現するマクロファージやミクログリアは、効率的にHMGB1やPRXなどのDAMPsを排除できることが明らかとなった。

MSR1の阻害剤として知られるマレイル化牛血清アルブミン(M-BSA: malaylated bovine serum albumin)を脳虚血マウスに投与すると、脳梗塞内におけるDAMPsの排除が遅れることによって炎症が遷延化して神経傷害が悪化することが判明した。

まとめ

脳梗塞の炎症収束期には、マクロファージやミクログリアにおいてスカベンジャー受容体MSR1の発現が上昇する。MSR1を高発現する細胞が脳内の炎症惹起因子を効率的に排除して、さらに神経栄養因子を産生することにより、脳梗塞の炎症を収束させることを発見した。MSR1の阻害剤を用いた脳虚血モデルマウスの解析から、MSR1の機能が脳梗塞後の炎症の収束に重要な役割を持つことが明らかとなった。

主な発表論文等

(雑誌論文)(計10件)

- 1) Sekiya T, Kondo T, Shichita T, Morita R, Ichinose H, Yoshimura A. Suppression of Th2 and Tfh immune reactions by Nr4a receptors in mature T reg cells. *J Exp Med.* 212(10):1623-1640 (2015) 査読あり
- 2) Suzuki M, Morita R, Hirata Y, Shichita T, Yoshimura A. Spred1, a Suppressor of the Ras-ERK Pathway, Negatively Regulates Expansion and Function of Group 2 Innate Lymphoid Cells. *J Immunol.* 査読有 195(3):1273-1281 (2015)
- 3) Kashiwagi I, Morita R, Shichita T, Komai K, Saeki K, Matsumoto M, Takeda K, Nomura M, Hayashi A, Kanai T, Yoshimura A. Smad2 and Smad3 Inversely Regulate TGF- β Autoinduction in Clostridium butyricum-Activated Dendritic Cells. *Immunity.* 査読有 43(1):65-79 (2015)
- 4) Ito M, Shichita T, Okada M, Komine R, Noguchi Y, Yoshimura A, and Morita R. Bruton's tyrosine kinase (BTK) is an essential component for NLRP3 inflammasome activation and a potential therapeutic target for inflammation after ischemic brain injury. *Nat Commun.* 査読有 6: 7360 (2015)
- 5) Morita R, Suzuki M, Kasahara H, Shimizu N, Shichita T, Sekiya T, Kimura A, Sasaki K, Yasukawa H, Yoshimura A.

- ETS transcription factor ETV2 directly converts human fibroblasts into functional endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有 112(1): 160-165 (2015)
- 6) Takasato F, Morita R, Shichita T, Sekiya T, Morikawa Y, Kuroda T, Niimi M, Yoshimura A. Prevention of allogeneic cardiac graft rejection by transfer of ex vivo expanded antigen-specific regulatory T-cells. *PLoS One.* 査読有 9(2): e87722 (2014)
 - 7) Abe H, Kimura A, Tsuruta S, Fukaya T, Sakaguchi R, Morita R, Sekiya T, Shichita T, Chayama K, Fujii-Kuriyama Y, Yoshimura A. Aryl hydrocarbon receptor plays protective roles in ConA-induced hepatic injury by both suppressing IFN- γ expression and inducing IL-22. *Int Immunol.* 査読有 26(3): 129-137 (2013)
 - 8) Nishimoto S, Kotani H, Tsuruta S, Shimizu N, Ito M, Shichita T, Morita R, Takahashi H, Amagai M, Yoshimura A. Th17 cells carrying TCR recognizing epidermal autoantigen induce psoriasis-like skin inflammation. *J Immunol.* 査読有 191(6): 3065-3072 (2013)
 - 9) Tamiya T, Ichiyama K, Kotani H, Fukaya T, Sekiya T, Shichita T, Honma K, Yui K, Matsuyama T, Nakao T, Fukuyama S, Inoue H, Nomura M, Yoshimura A. Smad2/3 and IRF4 play a cooperative role in IL-9-producing T cell induction. *J Immunol.* 査読有 191(5): 2360-2371 (2013)

- 10) Hasegawa E, Sonoda KH, Shichita T, Morita R, Sekiya T, Kimura A, Oshima Y, Takeda A, Yoshimura A. IL-23-independent induction of IL-17 from gdT cells and innate lymphoid cells promotes experimental intraocular neovascularization. *J Immunol.* 査読有 190(4):1778-1787 (2013)

(学会発表)(計9件)

- 1) 七田 崇, 吉村昭彦 DAMPsによる脳虚血後炎症の制御 第3回Neurovascular Unit研究会 慶應義塾大学医学部(東京都新宿区) 2015年1月31日 口頭発表 [招待講演]
- 2) 七田 崇 脳梗塞と炎症～炎症は敵か?味方か?～ 第6回Stroke Science Academy ホテル日航福岡(福岡県福岡市) 2014年11月28日 口頭発表 [招待講演]
- 3) 七田 崇, 大星博明, 吉村昭彦 DAMPsによる脳梗塞後の炎症とその終焉 第26回脳循環代謝学会 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市) 2014年11月22日 口頭発表 [招待講演]
- 4) 七田 崇, 大星博明, 吉村昭彦 NVUとdamage-associated molecular patterns (DAMPs) 第24回脳血管シンポジウム 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市) 2014年9月13日 口頭発表 [招待講演]
- 5) Shichita T, Yoshimura A Regulation of post-ischemic inflammation by DAMPs and immune cells. 第37回日本神経科学大会 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014年9月11日
- 6) 七田 崇, 吉村昭彦 脳梗塞後の炎症と自然免疫 第30回臨床フリーラジカル会議 里山の休日 京都・畑河(京都府亀岡市) 2013年12月13日 口頭発表 [招待講演]

(その他)

慶應義塾大学医学部プレスリリース「脳梗塞後の炎症が悪化するメカニズムを解明」平成27年6月10日
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20150610/index.html>

免疫空間における腸型樹状細胞の誘導とその攪乱

(平成25年度～平成26年度) Development of retinoic acid-producing dendritic cells in the gut environment and its disturbance

岩田 誠 徳島文理大学・香川薬学部

研究代表者

IWATA, Makoto

徳島文理大学・香川薬学部・教授

50160122



研究開始当初の背景

腸管は、広い表面積で外界と接しており、多数の免疫細胞の配備を必要とする。レチノイン酸はT細胞に小腸ホーミング特異性をインプリントする生理的因子であり、腸関連リンパ系組織にはビタミンA(レチノール)からレチノイン酸を産生する能力を持つ樹状細胞(DC)が存在する(Iwata et al, *Immunity* 21:527, 2004)。レチノイン酸はB細胞にも小腸ホーミング特異性をインプリントし、さらにIgA抗体産生を促進する(Mora, Iwata et al, *Science* 314: 1157, 2006; Tezuka et al, *Nature* 448:929, 2007 & *Immunity* 34:247, 2011)。国際連合児童基金(ユニセフ)のビタミンA補給プログラムによる乳幼児死亡率の低下には特に腸感染症の抑制が重要であり、我々の発見した上記の原理が関与すると思われる。

これらの発見を契機に、腸管免疫におけるレチノイン酸の役割についての研究が急速に広がった(特集号 *Semin Immunol* 21(1), 2009, Ed. by Iwata)。腸では、病原体と非病原性の異物である食物や共生細菌などに対して、免疫反応と免疫寛容を適切に制御する必要がある。そのためには抗原特異的なT細胞機能分化の制御が特に重要である。レチノイン酸はTh1分化を抑制し、Th2分化を条件によって促進または抑制する(Iwata et al, *Int Immunol* 15:1017, 2003)。2007年には新たに、レチノイン酸が好炎症性Th17の分化を抑制し、Foxp3⁺ 誘導型制御性T細胞の分化を促進することが報告された(Mucida et al, *Science* 317:256, 2007など多数)。これらに基づき、レチノイン酸が、T細胞機能分化の調節を通じて、経口免疫寛容の誘導と炎症反応の制御に重要な役割を担うことが示唆された。これは、ヒトや動物で、多様な炎症性疾患がレチノイン酸レベルの低下を伴うことも符合する。

我々は、腸間膜リンパ節(MLN)やパイエル板(PP)などのDCが産生するレチノイン酸レベルの調節が、経口抗原に対する免疫反応の制御に重要だと考え、DCにレチノイン酸合成酵素RALDH2(*Aldh1a2*)によりコードされる)を発現誘導する因子を解析した。主要因子としてGM-CSFを、必須補助因子としてレチノイン酸自体を同定し、さらにToll様受容体(TLR)刺激などによる発現増強効果も示した(Yokota et al, *Int Immunol* 21:361, 2009)。しかし、これらの刺激で得られたDCは、MLNに存在するRALDH2⁺ DCのサイトカイン発現やCD103発現などと必ずしも一致せず、生理的RALDH2⁺ MLN-DC

の誘導機序には不明の点が残されていた。

さらに、我々は、ビタミンA欠乏下では、経口免疫寛容を誘導できないだけでなく、経口抗原に対するIL-13依存性の著しく強い抗体産生反応が誘導されうることを見出した。ビタミンA欠乏マウスのMLN-DCがTh17細胞に加え、IL-13とTNF- α を高産生する炎症性Th2細胞を分化誘導すること、そして、レチノイン酸がその誘導を阻害することも見出した。また、我々は以前、ビタミンA欠乏下では、MLN-DCのRALDH2発現が抑制されることを見出した(Yokota et al, 2009, *ibid.*)。正常マウスのMLNでは、RALDH2⁺ DCサブセットがレチノイン酸を産生して、炎症性T細胞の分化誘導を抑制している可能性が考えられた。つまり、MLN-DCまたはそのサブセットの性質が、その周囲の環境によって著しく変化し、免疫反応の著しい変化をもたらすと考えられた。

研究の目的

定常状態の正常マウスに存在する生理的RALDH2^{high}CD103⁺ MLN-DC(ここでは仮に「腸型DC」と名付けた)は成熟型のconventional DCであり、その分化成熟誘導機序を解明する。そのために、このDCの分化に伴う腸組織内での時間的・空間的動態を考慮するとともに、粘膜上皮細胞や腸関連組織ストローマ細胞とDCとの相互作用および種々の腸組織内因子のDCへの作用を解析する。それに基づき、未熟DCからin vitroで腸型DCの分化誘導を再現し、翻ってその生理的妥当性と意義を検証する。

研究の方法

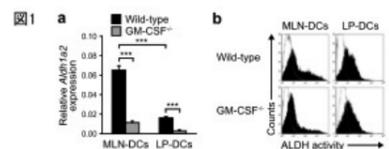
- (1) 我々は以前、DCにRALDH2発現を誘導する主要因子としてGM-CSFを同定した。その際に利用したGM-CSF受容体欠損マウスは同時にIL-5受容体と一部のIL-3受容体も欠くことから、今回はGM-CSFの関与を明確化するためにGM-CSF欠損マウスについても解析した。RALDH2発現は、mRNA発現とAldefluorを用いた細胞内aldehyde dehydrogenase (ALDH)活性測定法(Yokota et al, 2009, *ibid.*)を組み合わせ用いた。
- (2) 定常状態の正常マウスに見られるRALDH2^{high} MLN-DCの特徴、つまり、CD103⁺B220⁻成熟型で炎症性サイトカ

イン産生能が低いという性質を持つDCをin vitroで誘導する条件を探索した。Fms-related tyrosine kinase 3 (Flt3) リガンドを用いて、骨髄(BM)からin vitroで分化誘導した未熟DC (BM-DC) に対し、GM-CSFとRALDH2発現の必須補助因子レチノイン酸等を組み合わせて、種々の時間、刺激した後、さらにDC成熟化を誘導する刺激を種々のタイミングで加えて、RALDH2活性と表面マーカー、サイトカインなどの発現を検定した。表面マーカーは蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリーで検定し、サイトカイン産生は細胞内染色またはELISA法にて検定した。

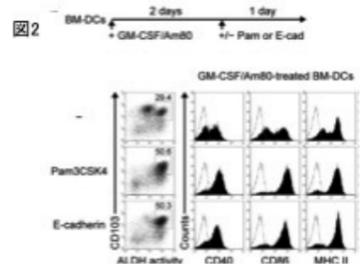
- (3) 「腸型DC」は、小腸粘膜固有層(LP)内で未熟DC細胞から微小環境因子の作用を受けてRALDH2発現を開始し、MLNへの移行過程で、または移動後に、成熟化とRALDH2発現増強が起こると考えられる。この作用をもたらす因子を探索し、その因子がDCとどのように相互作用するのか解析した。表面分子との相互作用については、中和抗体あるいは活性化誘導抗体などを利用した。
- (4) RALDH2発現誘導の破綻が、レチノイン酸シグナルの欠如とMLN-DCの性質変化を招き、炎症を促進する可能性を検証した。特に経口抗原特異的な炎症性Th2細胞の誘導を介してIL-13依存性の炎症性・アレルギー性疾患が誘導される可能性を見出したので解析した。さらに、in vitroで分化誘導した「腸型DC」を、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導炎症性腸疾患モデル動物に移入することによって、その病態への影響を検証した。

研究成果

- (1) GM-CSF欠損マウスでも、MLN-DCの *Aldh1a2*発現およびは著しく低下していた。また、小腸LPのDCでは、野生型マウスでも *Aldh1a2*発現がMLN-DCより低いが、GM-CSF欠損マウスでは、その発現がさらに低下していた。また、小腸におけるT細胞の分布も低下していた(図1)。

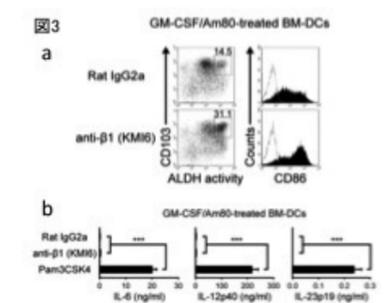


- (2) Flt3リガンドで骨髄細胞から分化誘導したBM-DCを、GM-CSFとTLRリガンドで同時に刺激すると、RALDH2^{high}成熟型DCとなった。しかし、そのCD103発現は低かった。しかも、炎症性サイトカインを産生した。そこで、RALDH2発現に必須なレチノイン酸受容体 (RAR)刺激とGM-CSFによる刺激を組合せ、さらに成熟誘導刺激を加えるタイミングを変えることを試みた。まず、Flt3リガンドで分化誘導したBM-DCを、レチノイン酸またはAm80(RAR α , β アゴニスト)とGM-CSFの組合せで一定期間(48h)刺激すると、CD103⁺ RALDH2^{intermediate} DCへと分化させることができた。このDCを、さらにTLRリガンドなどで24 h刺激したところ、成熟型CD103⁺RALDH2^{high} DCへと分化誘導させることができた。しかし、これらのDCはやはりIL-6、IL-12p40、IL-23p19などの炎症性サイトカインまたはそのサブユニットを産生した。しかも、ナイーブCD4⁺ T細胞をこれらのDCで抗原提示すると、腸指向性でIFN- γ またはIL-17を産生する能力を持つT細胞を分化誘導できることが判明した。
- (3) そこで次に、TLRリガンドなどに代わる成熟誘導刺激として、腸内微小環境中に存在する因子のうち、CD103への結合能を有し、小腸粘膜上皮細胞に発現するE-cadherinに着目した。E-cadherinの細胞外ドメインとヒトIgG1-Fcのキメラタンパク質をコートしたプレート上で、Am80/GM-CSF処理したDCを24 h刺激したところ、炎症性サイトカインを産生しない成熟型CD103⁺ RALDH2^{high} DCへと分化誘導することができた(図2)。

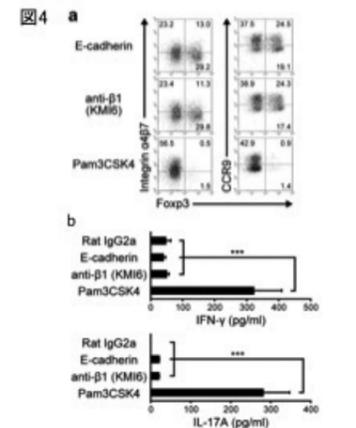


但し、種々の中和抗体を用いた解析結果から、E-cadherinは当初想定したCD103ではなく、主にインテグリン β 1を介して作用していることが示唆された。実際、E-cadherin-IgG1-Fcの代わりに、 β 1と結合するSemaphorin 7AやVCAM-1とIgG1-Fcのキメラタンパク質、さらには抗 β 1抗体を固相化して用いても同様なDCを誘導

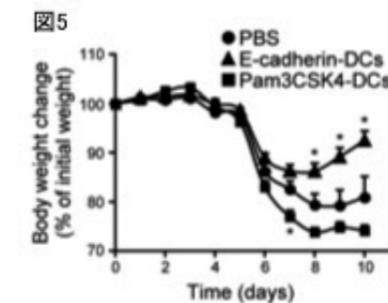
することができた(図3)。



このDCは、TGF- β の存在下で、腸指向性のFoxp3⁺ 制御性T細胞を分化誘導し、「腸型DC」の性質と合致していた(図4)。つまり、DC成熟化誘導刺激がインテグリン β 1などから加わるかTLR刺激などから加わるかによって、腸指向性の制御性T細胞またはTh1/Th17の誘導が決定されることが示唆された。TLRなどを刺激する病原体の侵入の有無により、腸管に配備されるT細胞の性質が変化する機序となっている可能性が考えられる(Yokota-Nakatsuma et al, *Sci Rep* 6:37914, 2016)。



- (4) In vitroで分化誘導した「腸型DC」の投与は、DSSによって誘導される実験的炎症性腸炎の寛解を促進した(図5)。



他方、RAシグナル欠乏下では、一部のMLN-DCサブセットが、その性質を著しく変化させ、IL-13高産生性の新規炎症性ヘルパーT細胞を分化誘導し、経口抗原特異的IgG1およびIgE抗体産生に寄与することが示唆された(*Mucosal Immunol* 7:786-801, 2014)。

まとめ

In vitroで骨髄細胞から分化誘導した未熟樹状細胞を、腸組織の微小環境因子で2段階の刺激を加えることによって、腸間膜リンパ節に存在するレチノイン酸高産生性樹状細胞と同様の細胞の分化誘導に成功した。その分化の最終段階を誘導する第2刺激として、Toll様受容体刺激を用いると、炎症性サイトカインを産生して腸腸炎性Th1やTh17を分化誘導したが、インテグリン β 1媒介刺激を用いると、炎症性サイトカインを産生せずに腸腸炎性制御性T細胞を分化誘導した。

研究組織

連携研究者

大岡 嘉治(OHOKA, Yoshiharu)
徳島文理大学・香川薬学部・准教授
研究者番号:60303971

竹内 一(TAKEUCHI, Hajime)
徳島文理大学・香川薬学部・准教授
研究者番号:00421298

中妻 彩(YOKOTA-NAKATSUMA, Aya)
徳島文理大学・香川薬学部・助教
研究者番号:30446075

主な発表論文等

(雑誌論文) (計9件)

- 1) Yokota-Nakatsuma A, Ohoka Y, Takeuchi H, Song S-Y, and *Iwata M.: Beta 1-integrin ligation and TLR ligation enhance GM-CSF-induced ALDH1A2 expression in dendritic cells, but differentially regulate their anti-inflammatory properties. *Sci Rep* (査読有) 6:37914, (2016). doi: 10.1038/srep37914.
- 2) *Ohoka Y, Yokota-Nakatsuma A, Maeda N, Takeuchi H, and *Iwata M.: Retinoic acid and GM-CSF coordinately induce retinal dehydrogenase 2 (RALDH2) expression through cooperation between the RAR/RXR complex and Sp1 in dendritic cells. *PLoS One* (査読有) 9(5): e96512 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0096512.
- 3) Yokota-Nakatsuma A, Takeuchi H, Ohoka Y, Kato C, Song S-Y, Hoshino T, Yagita H, Ohteki T, and *Iwata M.: Retinoic acid prevents mesenteric lymph node dendritic cells from inducing IL-13-producing inflammatory Th2 cells. *Mucosal Immunol* (査読有) 7(4):786-801 (2014). doi: 10.1155/2016/4874809.
- 4) Takeuchi H, Yokota-Nakatsuma A, Ohoka Y, Kagechika H, Kato C, Song S-Y, and *Iwata M.: Retinoid X receptor agonists modulate Foxp3⁺ regulatory T cell and Th17 cell differentiation with differential dependence on retinoic acid receptor activation. *J Immunol* (査読有) 191(7): 3725-3733 (2013). doi: 10.4049/jimmunol.1300032.
- 5) Sato T, Kitawaki T, Fujita H, Iwata M, Iyoda T, Inaba K, Ohteki T, Hasegawa S, Kawada K, Sakai Y, Ikeuchi H, Nakase H, Niwa A,

- Takaori-Kondo A, and *Kadowaki N.: Human CD1c⁺ myeloid dendritic cells acquire a high level of retinoic acid-producing capacity in response to vitamin D3. *J Immunol* (査読有) 191(6):3152-3160 (2013). doi: 10.4049/jimmunol.1203517.
- 6) 岩田 誠、レチノイン酸によるTregの分化と機能の制御、*医学のあゆみ* (査読無) 246:857-853 (2013).
 - 7) 中妻 彩、岩田 誠、ビタミンAによる炎症誘導性樹状細胞の制御、*炎症と免疫* (査読無) 22(4): 295-299 (2014).
 - 8) 岩田 誠、免疫を健全に保つビタミンAの働き、*香川県薬剤師会誌* *かがやく* (査読無) 153: 49-50 (2014).
 - 9) 岩田 誠、レチノイン酸産生樹状細胞とその機能、*臨床免疫・アレルギー科* (査読無) 62(6): 588-592 (2014).

(学会発表) (計16件)

- 1) 岩田 誠、レチノイン酸産生樹状細胞による免疫反応の制御、第9回金沢大学消化器外科カンファレンス、2013年4月22日、金沢大学、招待講演
- 2) 岩田 誠、腸と免疫、第43回日本薬学会図書館協議会 近畿・中四国・九州地区協議会、2013年5月17日、徳島文理大学(香川)、招待講演
- 3) 岩田 誠、ビタミンAによる食品免疫制御とその破綻、第6回食品免疫学会シンポジウム、2013年6月21日、東京大学弥生講堂、招待講演
- 4) 岩田 誠、ビタミンAが左右する免疫、第9回日本食品免疫学会学術大会、2013年10月18日、東京大学伊藤謝恩ホール、日本食品免疫学会賞受賞講演
- 5) 中妻 彩、近藤弘子、茅田 光、竹内 一、大岡嘉治、加藤千恵子、宋 時榮、岩田 誠、ビタミンA欠乏マウスの腸間膜リンパ節によるIL-13高産生炎症性T細胞の分化誘導メカニズムの検討、第12回四国免疫フォーラム、2013年6月22日、徳島文理大学(香川)、一般講演
- 6) 竹内 一、中妻 彩、大岡嘉治、影近弘之、宋 時榮、岩田 誠、制御性T細胞分化におけるRXRシグナルの影響、2013年8月30日、星薬科大学、一般講演

- 7) 中妻 彩、岩田 誠、ビタミンA欠乏マウスの腸間膜リンパ節樹状細胞によるIL-13高産生炎症性T細胞の分化誘導と経口免疫寛容誘導の検討、第9回日本食品免疫学会、2013年10月17日、東京大学、一般講演&ポスター発表(ポスター賞受賞)
- 8) Yokota-Nakatsuma A, Takeuchi H, Ohoka Y, Ohteki T, and Iwata M. Vitamin A prevents mesenteric lymph node dendritic cells from inducing IL-13-producing inflammatory Th2 cells. 第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月12日、幕張メッセ.
- 9) Takeuchi H, Yokota-Nakatsuma A, Ohoka Y, Kagechika H, Song S-Y, and Iwata M. Characterization of the role of retinoid X receptor signaling in the differentiation of Th17. 第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月12日、幕張メッセ.
- 10) Ohoka Y, Yokota-Nakatsuma A, Takeuchi H, and Iwata M. Involvement of the transcription factors Sp1, RAR α /RXR α , and c-Rel in the regulation of RALDH2 expression in dendritic cells. 第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月12日、幕張メッセ.
- 11) 中妻 彩、岩田 誠、ビタミンA欠乏はIL-13産生炎症性T細胞を誘導することにより食物抗原に対するアレルギー反応のリスクを増加させる、日本薬学会第134年会、2014年3月28日、熊本県、一般講演.
- 12) 大岡嘉治、中妻 彩、竹内 一、岩田 誠、樹状細胞におけるレチノイン酸合成酵素RALDH2の遺伝子発現誘導機構の解析、第13回四国免疫フォーラム、2014年6月21日、徳島県、一般講演
- 13) 中妻 彩、岩田 誠、レチノイン酸産生能を有し腸管指向性制御性T細胞を誘導するCD103陽性樹状細胞の分化誘導系の構築、日本食品免疫学会 第10回学術大会、2014年10月17日、東京大学、一般講演

&ポスター

- 14) Ohoka Y, Yokota-Nakatsuma A, Takeuchi H, and Iwata M.: Cooperation between Sp1 and the RAR α /RXR α complex is involved in the regulation of RALDH2 expression in dendritic cells 第87回日本生化学会大会、2014年10月16日、国立京都国際会館、一般演題
- 15) Yokota-Nakatsuma A, Takeuchi H, Ohoka Y, and Iwata M.: E-cadherin enhances the expression of retinal dehydrogenase 2 in dendritic cells and confers the ability to induce gut-tropic regulatory T cells 第43回日本免疫学会学術集会、京都府、12月12日、2014年12月12日、国立京都国際会館、一般演題
- 16) 岩田 誠、レチノイドシグナルによる免疫・炎症反応の制御、日本薬学会第135年会、2015年3月26日、神戸学院大学、シンポジウム講演
- 17) 中妻 彩、亀井進太郎、松山盛和、岩澤春奈、玉井里奈、竹内 一、大岡嘉治、岩田 誠、E-cadherinは腸管指向性制御性T細胞の誘導能を有する抗炎症性樹状細胞の分化を促進する、日本薬学会第135年会、2015年3月28日、デザイン・クリエイティブセンター神戸、一般演題

(図書) (計1件)

- 1) Mora JR, and Iwata M., Wiley-Blackwell, *The Retinoids: Biology, Biochemistry and Disease*. 2015, 608 pages, p.465-483.

(その他)

ホームページ:
<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph05/gyoseki.html>
 受賞:
 岩田 誠、平成25年度 日本食品免疫学会賞受賞

Meetings

第3回班会議・第5回総括班会議・第2回サマースクール

日時 平成26年7月16日(水)~19日(土)

場所 岩手県花巻温泉・陸中宮古



胸腺Tregニッチ仮説に基づいた成熟Treg“卒業証書分子”の探索

(平成25年度～平成26年度) A "Treg niche" hypothesis-based approach for identifying the "Graduation Certificate Factor" of thymic mature Treg cells

深澤 太郎 理化学研究所バイオリソースセンター／高知大学教育研究部・医学学系

研究代表者

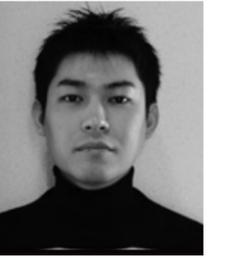
FUKAZAWA, Taro

理化学研究所バイオリソースセンター・

特別研究員／高知大学教育研究部・

医学学系・助教

10565774



研究開始当初の背景

免疫応答において重要な役割をもつシグナル伝達系の一つに、転写因子Nuclear Factor- κ B (NF- κ B)を介した経路がある。我々はNF- κ Bの機能解析を目的として、NF- κ Bのサブユニットの一つであるRelAをノックアウトしたマウスを作成したところ、胎生致死となることがわかった。このとき、胎児肝においてアポトーシスを起こしている細胞を多数認めた。そこでアポトーシス誘導因子であるTumor Necrosis Factor- α (TNF- α)をさらにノックアウト (TNF- α /RelAダブルノックアウト (TA-KO) マウス) したところ、この胎生致死性が回避され、出生するようになった。このTA-KOマウスは出生後、同腹子と比べ発育が悪く、様々な組織で炎症性細胞浸潤といった自己免疫様病態を呈し、生後3週までに致死となった。

自己の組織に対する免疫寛容を成立させるシステムの一つに、制御性T細胞 (Treg) による末梢での自己免疫抑制がある。Tregは胸腺を主な分化の場とし、分化成熟のち末梢へと流出していく。

TA-KOマウスは自己免疫様病態を示すことから、このマウスにおける末梢でのTregの頻度を解析してみると、脾臓・末梢血中でのTreg頻度は対照マウス (野生型マウス・TNF α 単独KOマウス: いずれも自己免疫を発症しない) と比べ著しく低かった。一方で、胸腺においては対照マウスと同頻度のTregを認めた。この末梢でのTreg不在の原因として、(1) 胸腺Tregが末梢へ流出しない、(2) Tregが末梢へ流出後に細胞死やFoxp3発現消失などのより失われている、という2つの可能性が考えられた。そこでこれを検討するために、TA-KOマウス胸腺Tregを別個体のTA-KOマウスへ移植した。もし前述(2)が起こっているとすれば、この移植はTA-KOマウスの致死性をレスキューしないはずである。結果、この移植は、TNF- α 単独KOマウス胸腺TregをTA-KOマウスへ移植した場合と同程度の延命効果を示した。このことから、TA-KOマウスの胸腺Tregは機能的であり、(人為的に) 末梢へ移行できさえすれば抑制能を示すことがわかった。これより、前述(2)の可能性は否定され、TA-KOマウスの自己免疫様病態は、胸腺Tregが胸腺から流出せず末梢において不在となることに因ると考えられた。

次に、TA-KOマウス胸腺よりTregが流出しな

い際、どの分化段階でアレストされているのかを調べた。まずTA-KOマウス胸腺Treg分画における成熟マーカーCD24、CD62L、CD69の発現を調べたところ、CD24発現は対照マウスTreg分画と差がみられず、CD62L・CD69についてはTA-KO Treg分画において成熟型の表現型を示すTreg頻度がやや高い傾向がみられた。より詳しく調べるために、次にTreg分画におけるゲノムfoxp3領域の特定CpGモチーフの脱メチル化程度を指標にこの分画の成熟度を解析した。結果、対照マウス胸腺Treg分画は成熟Treg・未成熟Tregが混在していたが、TA-KOマウスのTreg分画は成熟Tregで占められていた。このことより我々は、成熟Tregが流出しないと新たな(未成熟)Tregの分化が起こらないと考え、胸腺が同時にメンテナンスできるTregの数に上限があるのではないかという着想に至った。このTreg分化成熟のための微小環境 (Treg niche) があるのではないかという作業仮説をもとに、成熟Tregの流出機構の解析を行っている。

ここで、TA-KOマウスにおいてみられる胸腺Tregの流出不全が、TregでRelAを欠く為であるのか、Tregをとりまく胸腺環境側でRelAを欠く為であるのかを検討する目的で、TA-KO胎児肝を放射線照射した別個体 (B6/Ly5.1) へ移植し血球系キメラマウスを作成した。結果、このキメラマウスにおいて胸腺Treg流出不全は観察されなかった。よって、TA-KOマウスでの流出不全はTreg側ではなく胸腺環境側の細胞でRelAを欠くためであると考えられた。そこで、本研究では、この胸腺環境側によるTreg流出の制御機構について解析を行った。

研究の目的

胸腺環境における、成熟Tregの流出制御機構の解析。

研究の方法

- (1) TA-KOマウス胸腺Tregが実際にSphingosine-1-phosphateに対し走化性を示すか検討
- (2) 胸腺環境側細胞におけるケモカイン・その他

遺伝子発現プロファイルの解析

- (3) (2)により見出された、TA-KOマウス胸腺における形質細胞様樹状細胞 (pDC) の欠失に関連した解析

研究成果

- (1) 我々の先行研究で、胸腺からのT細胞の流出に必要であるSphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) はTA-KOマウス胸腺Tregにおいて対照と同程度に発現していることを確認していた。そこで、TA-KO胸腺Tregは実際にリガンドであるS1Pに対し走化性を示すか、トランスウェルを用い検討した。その結果、TA-KO胸腺Tregは対照のTNF- α /RelA $^{+/+}$ Tregと同様のS1Pへの走化性の傾向を示した (図1)。これより、TA-KO胸腺Tregにおける流出不全はS1P-S1PR1軸の機能不全に因らないことが考えられた。

- (2) 我々の先行研究で、TA-KOマウスとTNF α KOマウス胸腺Treg分画をそれぞれ単離し、マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルを作成した。また本研究期間平成25年度において、T細胞を除いた胸腺ストロマ細胞について、CD45-EpCAM $^{+}$ 分画 (胸腺上皮) とCD45 $^{+}$ EpCAM $^{-}$ 分画 (濃縮された血球系胸腺ストロマ細胞) とをそれぞれ単離し、遺伝子発現プロファイルを作成した (科学研究費補助金・若手研究B「制御性T細胞を分化成熟させる胸腺内Tregニッチの実証とそのクロストーク分子機構」平成24-25年度)。TA-KO Treg分画において、*cxcr3*の発現上昇が検出された。これはTA-KO胸腺における成熟Tregの蓄積を反映するものと考えられる。対応するケモカイン (*cxcl9*, *10*, *11*) の発現を胸腺上皮、血球系胸腺ストロマ細胞とで比較したところ、*cxcl9*, *10*についてはTA-KO胸腺上皮・血球系胸腺ストロマ共に対照より低い発現量を示した。*cxcl11*については、TA-KO胸腺上皮において発現上昇が見られたが、TA-KOマウスのベースとなったC57BL/6系統は元来*cxcl11*に塩基欠損

があり機能的なペプチドをコードしていないため、これらのケモカインによる胸腺への誘因は流出不全の原因とは考えにくい。

- (3) 本研究期間平成25年度において、デオキシグアノシン処理TA-KO胎児胸腺の、ヌードマウス腎皮膜下への移植を行ったところ、このマウスでは、Tregの流出不全は再現されなかった (前述若手B) ことから、Tregの流出に際してRelAを必要とするのは、胸腺ストロマ細胞のうち胸腺上皮以外の細胞種であることがわかった。この結果を受け、血球系胸腺ストロマ細胞での遺伝子発現プロファイルを解析したところ、TA-KOにおいて形質細胞様樹状細胞 (pDC) に特徴的な遺伝子群の発現低下が見られた (図2)。そこでフローサイトメトリーにより胸腺pDC分画 (CD11c $^{+}$ B220 $^{+}$ PDCA1 $^{+}$) 頻度を検討したところ、TA-KO胸腺においてpDC頻度の著しい減少が確認された (図3)。一方、

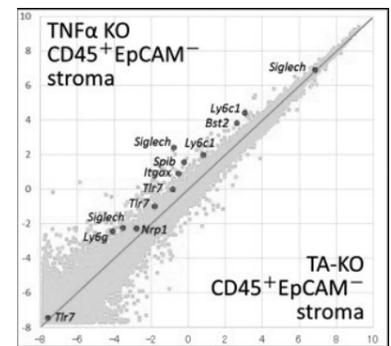


図2 血球系胸腺ストロマ細胞での遺伝子発現プロファイル比較。pDCに特徴的な遺伝子群の発現量を赤点で示す。

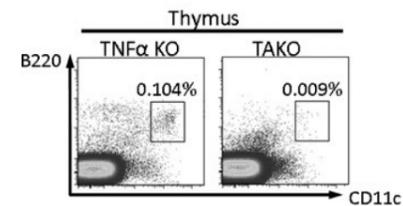


図3 TNF α KO・TA-KO胸腺におけるpDC分画頻度。

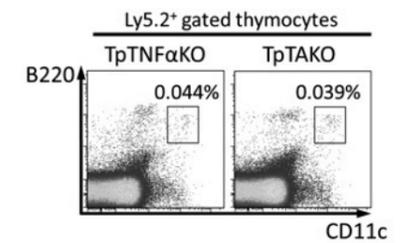


図4 TNF α KO・TA-KO胎児肝移植マウス胸腺におけるドナー由来pDC分画頻度。

TA-KOマウス脾臓においてはpDC頻度の上昇、末梢血中では減少が観察された。このことから、TA-KO胸腺pDC減少はpDCの分化異常ではなく局在異常に因るものと考えられた。

次に、この局在異常が細胞自律的RelA欠損によるものかを検討するために、TA-KO胎児肝を放射線照射した別個体 (B6/Ly5.1) へ移植し血球系キメラマウスを作成し、このキメラマウス胸腺でのTA-KO由来pDCの頻度を解析した。その結果、TA-KO胎児肝移植マウスにおいて、対照マウスと同程度のドナー由来胸腺pDC分画を認めた (図4)。脾臓・末梢血でのドナー由来pDC頻度も対照

と有意差を認めなかった。このことから、TA-KOマウスのpDC局在異常は細胞非自律的なRelA欠損によるものと考えられた。pDCの胸腺への移動にはpDCにおいて発現するCCL25と主に胸腺上皮において発現するCCL25とが関わる。TA-KOマウス脾臓・末梢血中のpDC分画でのCCR9発現をフローサイトメトリーにより解析したところ、両者とも対照と同程度にCCR9を発現していた。また、前述の胸腺上皮での遺伝子発現プロファイルにおいては、TA-KOでの*ccl25*発現量はむしろ上昇している傾向が見られた。pDCの局在異常についてもCCR9-CCL25軸に因らない他の機構が考えられる。TA-KO胎児肝移植マウスにおいてはTregの流出不全は観察されないことから、現時点では胸腺Tregの流出不全と胸腺pDC不在は関連していることになる。胸腺pDCは末梢より胸腺へ移動してくる細胞であり、この際末梢の抗原を胸腺へもちこむとされている。我々は、胸腺環境における成熟Treg流出制御の意義として、Treg流出とは自己反応性の高い細胞を末梢へ送り出す過程であり、Tregへの分化が完了するまで流出させないようにする品質管理機構の存在を意味するものと考えている。末梢の自己抗原をもちこむpDCがこの機構の一端を担う可能性を考え、今後はpDC不在とTreg流出不全の間に因果関係があるか検討を行いたい。

主な発表論文等

(雑誌論文) (計1件)

- 1) Taro Fukazawa, Noriko Hiraiwa, Takeshi Umemura, Setsuko Mise-Omata, Yuichi Obata, and Takahiro Doi, Egress of Mature Murine Regulatory T Cells from the

Thymus Requires RelA, *The Journal of Immunology*, 査読有, vol. 194, 2015, 3020-3028. DOI: 10.4049/jimmunol.1302756

(学会発表) (計2件)

- 1) 深澤太郎、三瀬節子、小幡裕一 Egress of mature murine regulatory T cells from the thymus requires

RelA 第43回日本免疫学会学術集会 2014年12月12日 国立京都国際会館 (京都府京都市) 2) 深澤太郎、三瀬節子、小幡裕一、土井貴裕 Analysis of RelA-dependency of thymic Treg efflux 第42回日本免疫学会学術集会

2013年12月13日 幕張メッセ (千葉県千葉市)

T細胞レパートリー形成におけるプロテアソームの役割

(平成25年度～平成26年度) **Role of proteasomes in T cell repertoire formation**

笠原 正典 北海道大学・大学院医学研究院

研究開始当初の背景

巨大な分子複合体であるプロテアソームはMHCクラスI 分子に結合するペプチドの産生酵素である。最近まで、多くの組織において発現される構成型プロテアソームと、免疫応答に際して誘導され、MHCクラスI 分子による抗原提示に促進的に働く免疫プロテアソームの2種が知られていた。その後、胸腺皮質のみに存在する胸腺プロテアソームが発見され、大きな注目を集めている(*Science* 316: 1349, 2007)。胸腺プロテアソームは触媒サブユニットとしてβ1i、β2iサブユニットの他に、皮質上皮細胞(cTEC)に特異的に発現するβ5tサブユニットを有し、CD8⁺ T 細胞の正の選択に関わっていると考えられる(*Immunity* 32: 29, 2010)。一方、免疫プロテアソームは、胸腺では主に髄質上皮細胞(mTEC)に局在し負の選択に関与しており、さらには免疫系臓器に広く発現している。しかし、CD8⁺ T細胞レパートリー形成・維持におけるプロテアソームの役割に関して詳細は不明であり、今後の研究の進展が期待されている領域である。我々は胸腺プロテアソームに関する研究を推進し、以下の成果を挙げた。

- ヒト胸腺プロテアソームの生化学的、免疫組織化学的解析を行い、ヒトにおいてもマウスと同様の構造と機能を有する胸腺プロテアソームが存在することを示した(*Blood*, 2009)。
- β5t サブユニットを全身性に高発現するトランスジェニックマウスでは顕著な成長遅延、老化症状、内臓脂肪増大等が認められることを示した(*Am J Pathol*, 2012)。
- 胸腺上皮細胞より発生する胸腺腫にはさまざまな組織型が存在するが、β5t サブユニットの発現はcTECへの分化を示す腫瘍細胞に限定して認められることを示した(*Am J Surg Pathol*, 2011; *J Clin Pathol*, 2014)。

研究の目的

本研究計画では、これらの実績を踏まえて、CD8⁺ T細胞分化・レパートリー形成におけるプロテアソームの役割を解明する。

研究の方法

β5tを全身性に高発現する遺伝子改変マウスなど、免疫空間(胸腺と末梢リンパ組織)の攪乱を伴った遺伝子改変マウスで認められる免疫異常を解析する。

- 胸腺皮質と髄質におけるβ5-familyサブユニットの重複とCD8⁺ T細胞の形成異常:胸腺細胞の分画解析および分化段階における胸腺細胞をソートし、正の選択や負の選択に関連した機能分子の発現解析を行う。
- 胸腺皮質と末梢におけるβ5-familyサブユニットの重複とCD8⁺ T細胞のレパートリー、表現型の変化:脾細胞を用い、レパートリー解析(胸腺細胞との比較を含む)、CD8⁺ T細胞のナイーブ・メモリー表現型の解析を行う。

研究成果

- 数種類のβ5-familyサブユニットの遺伝子改変マウスの解析を進めた結果、cTECとmTECで発現するβ5-familyサブユニットが重複する際にCD8⁺ T細胞の分化異常やレパートリーの偏位が認められることが判明した。また胸腺細胞のアポトーシスに関連する分子の発現変化を認めた。
- cTECと末梢リンパ組織で発現するβ5-familyサブユニットが重複する際にCD8⁺ T細胞のうち、ナイーブ細胞が減少し、メモリー細胞が増加した。以上の結果より、免疫空間におけるプロテアソームの生理的局在はCD8⁺ T細胞の恒常性維持に重要であることが明らかとなった。

まとめ

プロテアソームβ5-family遺伝子改変マウスを用いてCD8⁺ T細胞レパートリー形成におけるプロテアソームの役割を検討した。その結果、胸腺皮質と髄質で発現するサブユニットが重複するマウスではCD8⁺ T細胞の分化異常やレパートリーの偏位を認めた。また、胸腺と末梢リンパ組織でサブユニットが重複するマウスではCD8⁺ T細胞のナイーブ細胞が減少し、メモリー細胞が増加した。以上より、免疫空間におけるプロテアソームの生理的局在はCD8⁺ T細胞の恒常性維

持に重要であることが明らかとなった。

研究組織

連携研究者

外丸 詩野(TOMARU UTANO)

北海道大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号:20360901

主な発表論文等

(雑誌論文)(計23件)

- Tomaru, U., Tsuji, T., Kiuchi, S., Ishizu, A., Otsuka, N., Ito, T., Ikeda, H., Fukasawa, Y. and Kasahara, M. Decreased expression of a thymus-specific proteasome subunit β5t in Down syndrome patients. *Histopathology* 67(2) 2015. doi: 10.1111/his.12642. (査読有)
- Yamada, Y., Tomaru, U., Ishizu, A., Ito, T., Kiuchi, T., Ono, A., Miyajima, S., Nagai, K., Higashi, T., Matsuno, Y., Dosaka-Akita, H., Nishimura, M., Miwa, S. and Kasahara, M. Decreased proteasomal function accelerates cigarette smoke-induced pulmonary emphysema. *Lab. Invest.* 95: 2015. 625-634. doi: 10.1038/labinvest.2015.43. (査読有)
- Ikeshita, S., Kiuchi, S., Miyatake, Y. and Kasahara, M. Pancreatic cancer cells express CD44 variant 9 and multidrug resistance protein 1 during mitosis. *Mol. Exp. Pathol.* 98: 2015. 41-46. doi: 10. 1016/ j.yexmp.2014.12.001. (査読有)
- Miyatake, Y., Sheefy, N., Ikeshita, S., Hall, W. W. and Kasahara, M. Anchorage- dependent multicellular aggregate formation induces CD44 high cancer stem cell-like ATL cells in an NF-κB- and vimentin-dependent manner. *Cancer Lett.* 357: 2015. 355-363. doi: 10.1016/ j.canlet. 2014.11.055. (査読有)
- Iinuma, C., Waki, M., Kawakami, A., Yamaguchi, M., Tomaru, U., Sasaki, N., Masuda, S., Mtasui, Y., Iwasaki, S., Baba, T., Kasahara, M., Yoshiki, T. Paletta, D., Herrmann, T., and Ishizu, A. Establishment of a vascular endothelial cell-reactive type II NKT cell clone from a rat model of autoimmune vasculitis. *Int. Immunol.* 27: 2015. 105-114. doi: 10.1093/ intimm/dxu088. (査読有)
- Fujita, H., Hatanaka, Y., Sutoh, Y., Suzuki, Y., Oba, K., Kubota, K. C., Otsuka, N., Fugo, K., Mitsuhashi, T., Kasahara, M. and Matsuno, Y. Immunohistochemical validation and expression profiling of NKG2D ligands in a wide spectrum of human epithelial neoplasms. *J. Histochem. Cytochem.* 63: 2015. 217-227. doi: 10.1369/ 0022155414563800. (査読有)
- Mohamed, R. H., Sutoh, Y., Itoh, Y., Miyatake, Y., Otsuka, N., Ogasawara, K. and Kasahara, M. The *SKINT1-like* gene is inactivated in hominoids but not in all primate species: implications for the origin of dendritic epidermal T cells. *PLoS ONE* 10: 2015. e0123258. doi: 10.1371/ journal.pone.0123258. (査読有)
- Tsuchisaka, A., Kaneko, S., Imaoka, K., Ota, M., Kishimoto, K., Tomaru, U., Kasahara, M., Ohata, C., Furumura, M., Takamori, S., Morita, E. and Hashimoto, T. Presence of autoimmune regulator and absence of desmoglein 1 in thymoma associated with a pemphigus foliaceus patient. *Br. J. Dermatol.* 19: 2014. doi: 10.1111/bjd.13617. (査読有)
- Venkatesh, B., Lee, A. P., Ravi, V., Maurya, A. K., Lian, M. M., Swann, J. B., Ohta, Y., Flajnik, M. F., Sutoh, Y., Kasahara, M., Hoon, S., Gangu, V., Roy, S. W., Irimia, M., Korzh, V., Kondrychyn, I., Lim, Z. W., Tay, B.-H., Tohari, S., Kong, K. W., Ho, S., Lorente-Galdos, B., Quilez, J., Marques- Bonet, T., Raney, B. J., Ingham, P. W., Tay, A., Hillier, L. W., Minx, P., Boehm, T., Wilson, R. K., Brenner, S. and Warren, W. C. The elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. *Nature* 505: 2014. 174-179. doi: 10.1038 /nature12826. (査読有)
- Ibusuki, A., Kawai, K., Yoshida, S., Uchida, Y., Nitahara-Takeuchi, A., Kuroki, K., Kajikawa, M., Ose, T., Maenaka, K., Kasahara, M. and Kanekura, T. NKG2D triggers cytotoxicity in murine epidermal gd T cells via PI3K-dependent, Syk/ ZAP70- independent signaling pathway. *J. Invest. Dermatol.* 134: 2014. 396-404. doi: 10.1038 / jid.2013.353. (査読有)
- Ströbel, P., Hartmann, E., Rosenwald, A., Kalla, J., Ott, G., Schalke, B., Kasahara, M., Tomaru, U. and Marx, A. Corticomedullary differentiation and maturational arrest in thymomas. *Histopathology* 64: 2014. 557-566. doi: 10.1111/ his.12279. (査読有)
- Kanda, R., Sutoh, Y., Kasamatsu, J., Maenaka, K., Kasahara, M. and Ose, T. Crystal structure of the lamprey variable lymphocyte receptor C reveals an unusual feature in its N-terminal capping module. *PLoS ONE* 9: 2014. e85875. doi: 10.1371/ journal.pone.0085875. (査読有)
- Kasahara, M. and Sutoh, Y. Two forms of adaptive immunity in vertebrates: similarities and differences. *Adv. Immunol.* 122: 2014. 59-90. doi: 10.1016/B978-0-12-800267-4.00002-X. (査読有)
- Yamada, Y., Tomaru, U., Ishizu, A., Kiuchi, T., Kasahara, M. and Matsuno, Y. Expression of thymoproteasome subunit β5t in type AB thymoma. *J. Clin. Pathol.* 67: 2014. 276-278. doi: 10.1136/jclinpath- 2013-201930. (査読有)
- Sutoh, Y. and Kasahara, M. Copy number and sequence variation of leucine-rich repeat modules suggests distinct functional constraints operating on variable lymphocyte receptors expressed by T-cell-like and B-cell-like lymphocytes. *Immunogenetics* 66: 2014. 403-409. doi: 10.1007/ s00251-014-0773-6. (査読有)
- Ikeshita, S., Miyatake, Y., Otsuka, N. and Kasahara, M. MICA/B expression in macrophage foam cells infiltrating atheromatous plaques. *Exp. Mol. Pathol.* 97: 2014. 171-175. doi: 10.1016/j.yexmp. 2014.07.002. (査読有)
- Venkatesh, B., Lee, A. P., Swann, J. B., Ohta, Y., Flajnik, M. F., Kasahara, M., Boehm, T. and Warren, W. C. Venkatesh et al. reply. *Nature* 511: 2014. E9-E10. doi: 10.1038/ nature13447. (査読有)
- Ando, R., Noda, K., Tomaru, U., Kamoshita, M., Ozawa, Y., Notomi, S., Hisatomi, T., Noda, M., Kanda, A., Ishibashi, T., Kasahara, M. and Ishida, S. Decreased proteasomal activity causes photoreceptor degeneration in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55: 2014. 4682-4690. doi: 10.1167 /iovs.13-13272. (査読有)
- Fukaya, S., Matsui, Y., Tomaru, U., Kawakami, A., Sogo, S., Bohgaki, T., Atsumi, T., Koike, T., Kasahara, M. and Ishizu, A. Overexpression of TNF-α- converting enzyme in fibroblasts augments dermal fibrosis after inflammation. *Lab. Invest.* 93: 2013. 72-80. doi: 10.1038/ labinvest.2012.153. (査読有)
- Kasahara, M. Impact of whole-

研究代表者

KASAHARA, Masanori

北海道大学・大学院医学研究院・教授

30241318



genome duplication on vertebrate development and evolution. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24: 2013. 81-82. doi: 10.1016/j.semcdb.2013.01.010. (査読有)

Miyatake, Y., Oliveira, A. L. A., Jarboui, M. A., Ota, S., Tomaru, U., Teshima, T., Hall, W. W. and Kasahara, M. Protective roles of epithelial cells in the survival of adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Am. J. Pathol.* 182: 2013. 1832-1842. doi: 10.1016/ j.ajpath.2013.01.015. (査読有)

Tomaru, U. and Kasahara, M. Thymoproteasome: role in thymic selection and clinical significance as a diagnostic marker for thymic epithelial tumors. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 61: 2013. 357-365. doi: 10.1007/s00005-013-0234-1. (査読有)

Kasahara, M. *Déjà vu*: three lineages of lymphocytes in lampreys. *Immunol. Cell. Biol.* 91: 2013. 599-600. doi: 10.1038/ icb. 2013.52. (査読有)

(学会発表)(計52件)

- 外丸詩野:プロテアソームの機能異常と病態. 第102回日本病理学会総会 シンポジウム「細胞ストレス応答の破綻と病態」, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道), 2013.6.6-8
- 中沢大悟, 外丸詩野, 西尾妙織, 渥美達也, 笠原正典, 石津明洋:好中球細胞外トラップ(NETs)の異常とMPO-ANCA 関連血管炎の発症. 第102回日本病理学会総会 シンポジウム「炎症-免疫機構の新基軸と疾病の病理」, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道), 2013.6.6-8
- 川上 愛, 飯沼千景, 脇 雅, 山口まどか, 外丸詩野, 笠原正典, 吉木敦, 石津明洋:自己血管内皮細胞反応性NKT 細胞による血管炎発症モデル. 第102回日本病理学会総会 ワークショップ「血管炎の発症メカニズム」, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道), 2013.6.6-8
- 宮武由甲子, Andre L.A.O, Ali, J.M., 太田秀一, 外丸詩野, 豊嶋崇徳, W. W. Hall, 笠原正典:成人T 細胞白血病/ リンパ腫(ATLL)の病態における正常上皮細胞の役割. 第102回日本病理学会総会ワークショップ「造血器腫瘍病理学の新展開」, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道), 2013.6.6-8
- 池下隼司, 宮武由甲子, 大塚紀幸, 外丸詩野, 笠原正典:アテローム性動脈硬化症とヒトNKG2D リガンドMICA/B との関わり

についての検討, 第102回日本病理学会総会, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道), 2013.6.6-8

6) 大塚紀幸, 山本菜見子, 須藤洋一, 宮武由甲子, 笠原正典:胎盤形成期におけるNKG2D リガンド発現意義の検討, 第102回日本病理学会総会, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道), 2013.6.6-8

7) 紺野沙織, 外丸詩野, 岸本葉奈, 石津明洋, 笠原正典:プロテアソームの発現異常における免疫応答の変化, 第102回日本病理学会総会, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道), 2013.6.6-8

8) 畑中 豊, 鈴木雄太, 藤田裕美, 畑中佳奈子, 大庭幸治, 三橋智子, 山下啓子, 笠原正典, 松野吉宏:ヒトHER2 陰性luminal タイプ乳癌におけるNKG2D リガンドの発現解析, 第102回日本病理学会総会, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道), 2013.6.6-8

9) 今本鉄平, 中沢大悟, 大塚紀幸, 外丸詩野, 笠原正典, 石津明洋:顕微鏡的多発血管炎と血栓症はMPO-ANCA と好中球細胞外トラップを介して関連する, 第102回日本病理学会総会, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道), 2013.6.6-8

10) 山本 岳, 藤井真理子, 大塚紀幸, 光部兼一郎, 櫻井宏治, 外丸詩野, 石津明洋, 笠原正典:HELLP 症候群に合併したhepatic rupture の一剖検例, 第102回日本病理学会総会, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道), 2013.6.6-8

11) 味藤 静, 外丸詩野, 大塚紀幸, 石津明洋, 笠原正典:リツキシマブ投与後に日和見感染症を併発した顕微鏡的多発血管炎の一剖検例, 第102回日本病理学会総会, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道), 2013.6.6-8

12) Miyatake, Y., André L.A. Oliveira., Mohamed Ali Jarbouli., Ota, S., Tomaru, U., Teshima, T., William W. Hall and Kasahara, M.: Epithelial cells protect survival of adult T-cell leukemia/lymphoma cells, 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses HTLV 2013, Montreal, Quebec, Canada, June 26-30, 2013

13) Kanda, R., Sutoh, Y., Kasamatsu, J., Kasahara, M., Maenaka, K. and Ose, T. Crystal structure of variable lymphocyte receptor C derived from lamprey. 7th International Conference on Structural Genomics (Katsumi Maenaka, Keio Plaza Hotel Sapporo), Sapporo, Japan, July 29 – August 1, 2013

14) Kondo, M., Kasamatsu, J., Sarada, Y., Otsuka, N., Takada, T., Toyoda, A., Fujiyama, A., Shiroishi, T. and Kasahara, M. Genomic analysis in inbred mice provides insights into the evolutionary history of NKG2D ligand genes. 15th International Congress of Immunology, Milan, Italy, August 22-27, 2013

15) 宮武由甲子, Hall William W., 笠原正典:正常上皮細胞は成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)細胞の生存を保護する, 第108回北海道癌談話会例会, 旭川グランドホテル(北海道), 2013.9.21

16) Kasahara, M. Evolution of adaptive immunity. Masatoshi Nei Symposium "Molecular and Phenotype Evolution", Hokkaido University Sapporo, September 24, 2013

17) 宮武由甲子, 笠原正典:成人T細胞白血病細胞の生存における上皮細胞の保護的役割, 第72回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜(神奈川県), 2013.10.3

18) 池下隼司, 宮武由甲子, 大塚紀幸, 笠原正典:脾臓癌とその周囲微小環境における細胞間相互作用の検討, 第46回北海道病理談話会(病理分科会), 北海道大学(札幌市), 2013.10.12

19) 紺野沙織, 外丸詩野, 石津明洋, 笠原正典:プロテアソームの発現異常による免疫応答の変化, 第46回北海道病理談話会(病理分科会), 北海道大学(札幌市), 2013.10.12

20) 外丸詩野:プロテアソームの機能異常と病理作用, 第59回日本病理学会秋期特別総会, 甲府富士屋ホテル(山梨県), 2013.11.21-22

21) 大塚紀幸, 山本菜見子, 青木葉香, 宮崎智彦, 宮武由甲子, 笠原正典:NKG2D受容体阻害抗体投与による胎盤形成への影響, 第28回日本生殖免疫学会学術集会, 兵庫医科大学(西宮市), 2013.11.30-12.1

22) Otsuka, N., Yamamoto, N., Aoki, Y., Miyazaki, T., Miyatake, Y., Kasahara, M. Placental development is attenuated by disrupting the interaction between NKG2D and its ligands . 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ(千葉県), 2013.12.11-13

23) Hassan-Mohamed, R., Sutho, Y., Itoh, Y., Otsuka, N., Miyatake, Y., Ogasawara, K., Kasahara, M. : Inactivation of Skint1 in hominoids but not in Old World monkeys. 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ(千葉県), 2013.12.11-13

24) Konno, S., Tomaru, U., Ishizu, A., Kasahara, M. Aberrant proteasomal expression affects T cell differentiation and functions . 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ(千葉県), 2013.12.11-13

25) Kawakami, A., linura, C., Waki, M., Yamaguchi, M., Tomaru, U., Kasahara, M., Yoshiki, T., Ishizu, A. Establishment of invariant NKT cell clone from vasculitis-prone rats, which recognizes autoantigen but not α -galactosylceramide presented by CD1d . 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ(千葉県), 2013.12.11-13

26) Miyatake, Y., Hall, WW., Kasahara, M. Normal epithelial cells protect the survival of adult T-cell leukemia/lymphoma cells, 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ(千葉県), 2013.12.11-13

27) 岩崎沙理, 藤澤孝志, 桑原博昭, 外丸詩野, 笠原正典, 石津明洋, 鈴木 昭:鑑別に苦慮した胸腺腫瘍の一例:Type A thymomaから胸腺癌へのスペクトラムは存在するか? 第33回日本胸腺研究会, 東京大学伊藤国際学術研究センター(東京都), 2014.2.8

28) Kasahara, M., Miyatake, Y. Anchorage-dependent multicellular aggregate formation induces a quiescent CD44v8-10 high stem-like phenotype in pancreatic cancer cells. The 4th International Symposium on Carcinogenic Spiral Infection, Immunity, and Cancer, 京王プラザホテル札幌(札幌市), 2014.2.10-11

29) 笠原正典:主要組織適合遺伝子複合体をめぐる研究の進歩, 第103回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANAクラウンプラザ(広島), 2014.4.24-26

30) 朴鐘建, 宮武由甲子, 池下隼司, 大塚紀幸, 笠原正典:血管内皮細胞との直接共培養は脾臓細胞にがん幹細胞様性を誘導する, 第103回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANAクラウンプラザ(広島), 2014.4.24-26

31) 池下隼司, 宮武由甲子, 朴鐘建, 大塚紀幸, 笠原正典:上皮細胞存在下でコロニーを形成した脾臓細胞ではCD44バリエントの発現パターンが変化する, 第103回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANAクラウンプラザ(広島), 2014.4.24-26

32) 木内静香, 外丸詩野, 紺野沙織, 石津明洋, 宮島祥太, 平川彩香, 笠原正典:胸腺におけるプロテアソームキモトリプシン様活性サブユニットの発現とT細胞選択, 第103回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANAクラウンプラザ(広島), 2014.4.24-26

33) 宮武由甲子, Sheefy, N., Hall WW., 笠原正典:成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)細胞は正常上皮細胞との相互作用によってがん幹細胞化が誘導される, 第103回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANAクラウンプラザ(広島), 2014.4.24-26

34) 大塚紀幸, 青木葉香, 宮崎智彦, 山本菜見子, 宮武由甲子, 笠原正典:uNKG細胞によるNKG2Dシステムを介した胎盤形成機構の検討, 第103回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANAクラウンプラザ(広島), 2014.4.24-26

35) 伊藤智樹, 外丸詩野, 大村優, 石津明洋, 笠原正典:プロテアソーム機能異常と脳機能の低下, 第103回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANAクラウンプラザ(広島), 2014.4.24-26

36) 竹中淳規, 大塚紀幸, 藤田裕美, 中馬誠, 外丸詩野, 石津明洋, 笠原正典:高齢男性でみられたEBV陽性肝脾γδT細胞リンパ腫の一例, 第103回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANAクラウンプラザ(広島), 2014.4.24-26

37) 宮武由甲子, Sheefy, N., Hall, WW., 笠原正典:成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)細胞は足場依存性multicellular aggregate (MCA) 形成によってがん幹細胞様特性を獲得する, 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会 学術集会, 北海道大学医学部学友会館「フラテ」(札幌市), 2014.6.19-20

38) 笠原正典:適応免疫システムの設計原理について考える, 日本比較免疫学会第26回学術集会 第25回日本生体防御学会学術総会, シンポジウム 「生体防御を眺める視点」 東北大学 片平さくらホール(仙台市), 2014.7.9-11

39) 宮武由甲子, Sheefy, N., 池下隼司, Hall, WW., 笠原正典:ATL細胞はNF- κ Bシグナル経路を介した足場依存性のmulticellular aggregate (MCA) formationによってがん幹細胞様特性を獲得する, 第1回日本HTLV-1学会 学術集会, 東京大学医学研究所 1号館講堂(東京都), 2014.8.22-24

40) 三次有奈, 山田真衣, 館山ゆう, 楠由宏, 志田玄貴, 中沢大悟, 外丸詩野, 三好秀明, 渥美達也, 石津明洋:高血糖による好中球細胞トラップ(neutrophil extracellular traps:NETs)の形成亢進, 第47回北海道病理談話会(病理分科会), 旭川グランドホテル(北海道), 2014.10.11

41) 志田玄貴, 中沢大悟, 館山ゆう, 山田真衣, 楠由宏, 三次有奈, 外丸詩野, 渥美達也, 石津明洋:抗ラクトフェリン抗体の病原性, 第47回北海道病理談話会(病理分科会), 旭川グランドホテル(北海道), 2014.10.11

42) 伊藤智樹, 外丸詩野, 大村優, 戸松留花, 石津明洋, 笠原正典:プロテアソーム機能低下モデルマウスにおける脳機能障害の解析, 第47回北海道病理談話会(病理分科会), 旭川グランドホテル(北海道), 2014.10.11

43) 青木葉香, 大塚紀幸, 宮崎智彦, 宮武由甲子, 笠原正典:胎盤におけるNKG2Dリガンド発現意義の検討, 第47回北海道病理談話会(病理分科会), 旭川グランドホテル(北海道), 2014.10.11

44) 宮武由甲子, Sheefy, N., 池下隼司, Hall WW., 笠原正典:成人T細胞白血病細胞の足場依存性multicellular aggregate (MCA) formationによるがん幹細胞様細胞の拡大, 第47回北海道病理談話会(病理分科会), 旭川グランドホテル(北海道), 2014.10.11

45) 池下隼司, 宮武由甲子, 朴鐘建, 大塚紀幸, 笠原正典:上皮系ニッチに多細胞凝集塊(MCA)を形成した脾臓細胞は治療抗体性を獲得する, 第110回北海道病理談話会例会(腫瘍系分科会), 札幌医科大学医学部北第一講義室(札幌市), 2014.9.13

46) Hassan-Mohamed, R., 須藤洋一, 伊藤晴, 大塚紀幸, 宮武由甲子, 小笠原一誠, 笠原正典:SKINT1様遺伝子は類人猿では不活性化されているが旧世界猿では機能を保持している, 第23回日本組織適合性学会大会, 長崎大学医学部キャンパス(坂本キャンパス)(長崎市), 2014.9.13-15

47) 宮武由甲子, Sheefy, N., Hall, WW., 笠原正典:成人T細胞白血病/リンパ腫細胞は足場依存性多細胞凝集塊形成によってCD44強陽性がん幹細胞様特性を獲得する, 第73回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜(横浜市), 2014.9.25-27

48) 朴鐘建, 宮武由甲子, 笠原正典:血管内皮細胞との直接共培養は脾臓細胞にがん細胞にPSF1とCD44vvari-nat9の発現を誘導する, 第73回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜(横浜市), 2014.9.25-27

49) Kiuchi S., Tomaru, U., Konno, S., Miyajima, S., Ishizu, A., Kasahara, M. Aberrant expression of proteasomal β 5 subunit affects T cell repertoires in the thymus . 第43回日本免疫学会総会・学術集会, 国立京都国際会館(京都市), 2014.12.10-12

50) Miyatake, Y., Sheefy, N., Hall, WW., Kasahara, M. CD44 high cancer stem cell-like ATL cells are expanded by anchorage-dependent multicellular aggregate formation through NF- κ B signaling. 第43回日本免疫学会総会・学術集会, 国立京都国際会館(京都市), 2014.12.10-12

51) 木内静香, 外丸詩野, 辻隆裕, 石津明洋, 鈴木昭, 大塚紀幸, 伊藤智樹, 池田仁, 深澤雄一郎, 笠原正典:ダウン症患者の胸腺におけるプロテアソームサブユニット β 5 tの発現低下, 第34回日本胸腺研究会, ユニコムプラザさがみはら(相模原市), 2015.2.7

52) 笠原正典:主要組織適合遺伝子複合体についての最近の話題, 第934回 市立札幌病院 学術研修会, 市立札幌病院(札幌市), 2015.3.12

(図書)(計10件)

1) Miyatake, Y. and Kasahara, M., Springer, "Inflammation and Immunity in Cancer", Anchorage-dependent multicellular aggregate formation induces CD44 high cancer stem cell-like phenotypes

2) 笠原正典:南山堂, 南山堂医学大辞典改訂20版, 異形成, 2015.3.101. pp. 97-98,

3) 笠原正典:医学書院 標準病理学 第5版, 免疫とその異常, 2015.9.04. pp. 96-135

4) Kasahara, M. *Springer, Pathogen-Host: antigenic variation versus somatic adaptation*, Variable lymphocyte receptors: a current overview, 2015. 336, pp 175-192

5) Sutoh, Y. and Kasahara, M. Elsevier, *Encyclopedia of Immunobiology*, The immune system of agnathans (jawless vertebrates), 2015, 468-473.

6) 石倉 浩, 笠原正典:南山堂, 器官病理学 in adult T cell leukemia/ lymphoma cells. 2015 267, pp. 75-84

7) 笠原正典:南山堂, 器官病理学 改訂14版, 免疫応答機序と免疫異常, 2013.1018, pp. 13-26

8) 笠原正典:南山堂, 器官病理学 改訂14版, 遺伝子異常と疾患, 2013.1018 pp. 97-104

9) 笠原正典:南山堂, 器官病理学 改訂14版, 骨格筋, 2013.1.1018. pp. 835-847

10) Kasahara, M. (John Wiley & Sons Ltd, ed.) *Polyploid origin of the human genome*. (3rd Ed.). 2013.

(その他)

ホームページ
http://path1.med.hokudai.ac.jp/path1/index.html

多能性幹細胞を用いた新時代移植医療における新しい免疫寛容誘導法の開発

(平成25年度～平成26年度) New immune regulation strategy in the age of regenerative medicine using pluripotent stem cells.

和田 はるか 北海道大学・遺伝子病制御研究所

研究代表者

WADA, Haruka
北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師
70392181



研究開始当初の背景

近未来の医療として考えられていた多能性幹細胞を用いた再生医療はもはや現実のものとなってきている。理想的には、患者自身の細胞から作製したiPS細胞から必要な細胞・組織を分化誘導し、移植するという方法であろう。しかしこの場合、脊髄損傷など緊急に細胞移植を要する疾患には適用できない。また、作製したiPS細胞の品質や安全性の確認等には多大な費用と時間を要する。そこで現在、様々な試験を経て安全性を確保したiPS細胞を保管するiPS細胞バンク構想が進んでいる。

iPS細胞バンクでは、様々な種類のHLA型背景をもつiPS細胞をバンク化し、免疫学的拒絶問題に対する配慮がなされている。しかし実際には、非自己由来の細胞はHLA型を一致させても一卵性双生児でない限り拒絶されるため、免疫抑制剤の使用は避けて通れない。現代の免疫抑制剤は非常に優れており、移植臓器の生着率はその黎明期に比べ格段に向上している。しかしながら、免疫抑制剤は個体全体の免疫反応を抑制してしまうため、日和見感染症や新規腫瘍の発生など問題点が多く、移植片特異的免疫抑制法の開発が強く望まれている。

私たちは、新時代における新しい免疫制御法として多能性幹細胞を用いた試みに取り組んでいる。その礎として細胞リプログラミング技術や多能性幹細胞を取り扱い、マウスiPS細胞からFoxp3陽性制御性T細胞を含む様々な免疫系細胞の誘導が可能であること(Wada H. et al., *Int Immunol*, 2009)、腫瘍免疫療法への応用が可能であること(Wada H et al., *Hematopoietic Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells*, 2015)等を示してきた。

また、近い将来に現実となる多能性幹細胞を用いての移植医療を想定した実験系も構築し、研究してきた。ES細胞から拍動性心筋様細胞を誘導してアロにあたるマウスに移植し、このときそのES細胞から誘導しておいたPDL1⁻PDL2⁺CD11b⁺CD11c⁺でiNOS、TGFβを高発現する免疫抑制性細胞を並行して投与することで、無治療対照群と比べて移植片の生着期間を有意に延長することに成功した(Kudo H, Wada H, et al., *PLoS ONE*, 2014)。

しかしながら、これらの方法による免疫制御は非特異的免疫抑制の一面をもち、究極的には、移植片特異的な免疫抑制状態、つまり「寛容」を人為的に誘導できることが理想である。

これまでに多数の研究者が様々な方法で免疫寛容を誘導する方法を考案してきたが、現時点で臨床にて有効の見込みのあるものの一つにMixed chimerismの誘導によるものが挙げられる。本研究では、新時代移植医療における新しい免疫制御法について、多能性幹細胞から誘導した細胞を利用してMixed chimerismを誘導し、新世代移植医療における「望ましい免疫空間」へと積極的に再構築することで、多能性幹細胞由来移植片に対する寛容の誘導を目指す。

研究の目的

移植医療において、移植片特異的な免疫抑制法の開発が強く望まれている。本研究では、多能性幹細胞を用いての新時代移植医療における新たな免疫寛容誘導法の開発を行う。

新時代の移植医療で期待される多能性幹細胞から作られた移植片に対する免疫寛容の誘導を、多能性幹細胞に由来する有用細胞を用いて免疫空間を人為的に操作することで実現することを目指す。

研究の方法

(1) マウスiPS細胞由来移植片および免疫抑制性細胞を用いたアロ臓器移植／移植制御系の確立

マウスiPS細胞から移植片及び免疫抑制性細胞を作出し、これまでにES細胞を用いた実験系にて確認されている事項がiPS細胞を細胞ソースとした移植モデルにても同様の効果が得られるかについて検討を行なう。またそのメカニズム解析も行う。

(2) コモンマーモセットES細胞を用いての検討

前臨床研究に有効な霊長類モデルとして期待されているコモンマーモセット由来ES細胞を用いて免疫制御性の細胞を試みる。またその性状評価を行なう。同細胞の誘導に成功した場合には、コモンマーモセットのパー

キンソン病モデル等に対する多能性幹細胞由来神経移植治療モデルに適用し、パーキンソン病に対する治療効果の改善や移植片生着期間延長効果を測定する。

(3) ヒトiPS細胞由来免疫制御細胞の誘導および評価

ヒトiPS細胞から免疫制御性細胞の誘導を試みる。誘導に成功した際には、その性状解析を行う。また各種評価系にてその有効性を評価する。

研究成果

(1) マウスiPS細胞由来移植片および免疫抑制性細胞を用いたアロ臓器移植／移植制御系の確立

PSCとしてiPS細胞を用いた移植医療を想定した研究を行った。マウス線維芽細胞からiPS細胞を作製し、当iPS細胞からマウスiPS細胞由来免疫抑制性細胞(iPS-SCs)の誘導に成功した。iPS-SCsはマクロファージ様の特徴を有しており、アロ刺激によるT細胞の増殖反応を抑制する効果を有していた。当効果は、NO依存的であることを明らかにした。iPS-SCs投与による免疫制御により、同iPS細胞から誘導した心筋様細胞のアロ移植系における生着期間を延長させることに成功した。さらに、アロ移植片移植を受けたマウス個体においてiPS-SCs治療を施した場合、アロ移植片反応性の抗体産生が顕著に抑制されていた。これらの結果から、同一の多能性幹細胞から移植片と平行して有用細胞(免疫抑制性細胞)も誘導し、その投与により移植片に対する免疫制御を達成するというコンセプトの有用性が示された。

(2) コモンマーモセットES細胞を用いての検討

ヒトへの応用を見据えた前臨床研究を意識した検討としてコモンマーモセットES細胞から、免疫抑制性マクロファージ様細胞を誘導する方法を確立した。分化誘導にあたっては、当初、マウスPSCからマクロファージ様免疫抑制性細胞を誘導するプロトコルにて分化誘導を試みたが、目的とするような細胞は得られなかった。そこで各種低分子化合物のスクリーニングを経て、エビゲノム制御因子を修飾する低分子化合物の添加によ

り、最終的に免疫抑制性細胞を得ることができた。細胞表面マーカーとしては、CD11bをはじめとするマクロファージに特徴的な分子を発現していた。当該細胞はコモンマーモセットにおけるアロT細胞抑制能を有することをin vitroで確認しており、私たちの提唱するコンセプトを非ヒト霊長類動物モデルにて検証する基盤を整えた。

(3) ヒトiPS細胞由来免疫制御細胞の誘導および評価

ヒトiPS細胞からの免疫抑制性細胞誘導に対して独自の分化プロトコルを開発し、マウスES/iPS細胞から誘導したのと類似の免疫抑制性細胞の誘導に成功した。リアルタイムPCR等で免疫抑制性の分子の発現を確認した。

主な発表論文等

(雑誌論文) (計3件)

- 1) Kudo H, Wada H, Sasaki H, Tsuji H, Otsuka R, Kojo S, Baghdadi M, Chikaraishi T, Seino K. Induction of macrophage-like immunosuppressive cells from mouse ES cells that contribute to prolong allogeneic graft survival. *PLoS One* 9(10): e111826, 2014
- 2) Muto M, Baghdadi M, Maekawa R, Wada H, and Seino K. Myeloid molecular characteristics of human $\gamma\delta$ T cells support their acquisition of tumor antigen-presenting capacity. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 64:941-9, 2015
- 3) Sasaki H, Wada H, Baghdadi M, Tsuji H, Ohtsuka R, Morita K, Shinohara N and Seino K. New immunosuppressive cell therapy to prolong survival of iPS cell-derived allografts. *Transplantation* 99: 2301-2310, 2015.
- 4) Induction of regulatory macrophage-like cells from mouse iPS cells that can contribute to the suppression of allogeneic immune responses. Sasaki H, Wada H, Tsuji H, Otsuka R, Shinohara N, Seino K. World transplant congress, San Francisco, July 2014
- 5) Suppression of allo-immune response by ES cell-derived regulatory macrophage-like cell Hajime Sasaki, Hiroya Kudo, Haruka

iPS cells-derived graft survival in allogeneic recipients.

Sasaki H, Wada H, Tsuji H, Otsuka R, Shinohara N, Seino K.

America transplant congress, Philadelphia, May 2015

2) Induction of regulatory macrophage-like cells from mouse iPS cells that can contribute to the suppression of allogeneic immune responses.

Sasaki H, Wada H, Tsuji H, Otsuka R, Shinohara N, Seino K.

World transplant congress, San Francisco, July 2014

3) Induction of M2 macrophage-like immunosuppressive cells from mouse ES cells that contribute to the prevention of allogeneic rejection

Wada H and Seino K

The 4th Workshop of Synthetic Immunology, Kyoto, November 15-

16, 2013

4) A novel methodology of immune regulation using pluripotent stem cells

Kudo H, Sasaki H, Wada H, Kojo S, Chikaraishi T and Seino K

15th International congress of immunology, Milan, Aug. 22-27. 2013

Wada, Satoshi Kojo, Ken-ichiro Seino

The 8th International Symposium of the Institute Network, Kyoto, June

27, 2013

(図書) (計6件)

1) 和田はるか、工藤浩也、清野研一郎。iPS細胞からの免疫細胞分化誘導。再生医療事業の課題解決のための手引書 情報技術協会刊 2013

2) 工藤浩也、和田はるか、清野研一郎。移植と免疫。Medicina 50巻3号、416-418. 2013

3) 和田はるか、工藤浩也、佐々木元、ムハンマド・バグダディ、清野研一郎。多能性幹細胞を用いた再生医療における新しい免疫制御法。日本臨床73巻増刊号、90-95, 2015

4) 佐々木元、和田はるか、清野研一郎。再生医療における免疫制御。最新医学69巻3月増刊号707-713. 2014

「再生医療最新の進歩、次世代再生医療に向けた基盤研究」

5) Seino K, Wada H, Baghdadi M. New immunosuppressive strategies for transplantation based on pluripotent stem cell (PSC)-derived immunoregulatory cells. Stem Cell Transl Invest 2015; 2: e504. doi: 10.14800/scti.504

6) Wada H, Kudo H, Sasaki H, Baghdadi M, Seino K.

New immune regulation strategy in

研究組織

連携研究者

清野研一郎 (Seino, Ken-ichiro)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号: 20312845

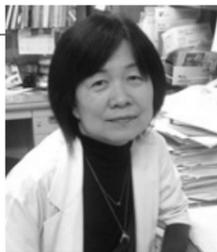
脱落膜リンパ球とトロフォブラストが構築する妊娠免疫系の再構築

(平成25年度～平成26年度) Reconstitution of pregnant immunity bydeciduous lymphocytes and trophoblasts

亀谷 美恵 東海大学・医学部・准教授

研究代表者

KAMTANI, Yoshie
東海大学・医学部・准教授
50338787



研究開始当初の背景

胚の着床と同時に妊娠免疫が成立する場である子宮内膜とトロフォブラストに関しては、近年多くの研究が行われている。両者の関係は、正常組織が唯一、浸潤し、血管新生を促し免疫抑制を誘導することから、癌とそのニッシュに類似しており、この場の成立とその不全が生じる機構を明らかにすることは腫瘍免疫の観点からも重要であることが示唆される。しかしげっ歯類胎盤やトロフォブラストの発現する免疫関連分子はヒトと大きく異なっており、ヒト妊娠免疫やヒト腫瘍免疫を包括的に理解するにはげっ歯類は十分なモデル動物とは言えない。一方、コモンマーモセットは、霊長類の中で突出して産仔数の多いことから、妊娠免疫に適した非ヒト霊長類であると考えられた。

研究の目的

本研究においては、非ヒト霊長類であるコモンマーモセットの、特にGFP トランスジェニック動物を用いて、着床に重要な役割を果たすトロフォブラストの浸潤性獲得に対し、子宮内膜から分化する脱落膜がどのような免疫環境を形成し、胎盤形成及び妊娠免疫のバランスを取るのかを主としてサイトカイン環境の変化により解析して明らかにすることを目的とした。

研究の方法

本研究では、コモンマーモセットトロフォブラストが母体側の脱落膜中に存在するリンパ球と相互作用する場でどのような免疫調節が生じているのかについて以下の方法で明らかにすることとした。

- 野生型コモンマーモセットにGFP マーモセット受精卵を着床させて形成された胎盤を用いて、トロフォブラスト幹細胞由来の細胞群と母体由来の細胞群を識別する。これらの組織の組織化学的解析を行うことにより、in vivo でトロフォブラストと脱落膜が形成している形状を明らかにする。
- ヒト、及びマウスにおいて解析されているトロフォブラストの遺伝子発現プロファイルより、マーモセットで発現変化が予想される遺伝子群、特に免疫系に関連する遺伝子群を特定する。
- cytotrophoblast(CT)よりextravillous

trophoblast (EVT) あるいは syncytiotrophoblast (STB)への分化を誘導する培養系をヒト細胞における分化誘導法をもとに確立し、mRNA の定量法を用いて、VT からEVT へ分化する過程で変化

- この分化系において母体側脱落膜由来のリンパ球を共培養し、両者の相互作用によりどのような遺伝子発現の変化が生じるのかについて解析する。
- 重度免疫不全マウスであるNOG マウスにヒト免疫系及びマーモセット免疫系を立ち上げた再構築マウスを作製し、これらを交配して妊娠ヒト化マウスを作製し、これらの胎盤に集積するリンパ球をフローサイトメトリーあるいは免疫組織化学的に解析し、さらに精製してmRNAの発現プロファイルを解析する。

これらを総合してコモンマーモセットのヒト妊娠免疫モデルとしての有用性と限界について明らかにすることを試みた。

研究成果

- GFPキメラ胎盤における胎児トロフォブラストの道程：我々は、まずGFPキメラマーモセット胎盤の免疫組織化学染色および胎盤組織細胞のフローサイトメトリーを行い、マーモセット胎盤におけるトロフォブラストの局在を確認した。マーモセット抗原を認識するモノクローナル抗体は限られているため、EVTおよびVTを識別するために、ヒトではHLA-GやhCGを用いるが、これらの陽性細胞を指標にTrkB, BD-L1をトロフォブラストが発現することを確認した上で、コモンマーモセットにおいて、これらの分子を発現する細胞を同定した。その結果、マーモセット胎盤においてもトロフォブラストは脱落膜に浸潤しており、マカクやヒトと同様に浸潤性の胎盤を持つことが明らかとなった。さらに、フローサイトメトリーを用いてリンパ球の解析を行ったところ、脱落膜にはヒトと比較してリンパ球が少なく、脱落膜へのリンパ球集積はヒトより抑制されていることが示唆された。
- トロフォブラストの遺伝子プロファイルについて：ヒト、及びマウスにおいて解析されているトロフォブラストの遺伝子発現プロファイルより、マーモセットで発現変化が予想される遺伝子群、特に免疫系に関連する遺伝子群を特定することも試みたが、webのデータのみでは明確な指標を得ることはできなかった。

- CTの採取とin vitro培養：ヒトにおいては、EVT, STBの前駆細胞であるCTの採取法は確立されていないものの、いくつかの報告がある。我々は、これらをもとにパーコールによる比重遠心分離法を立ち上げた東京大学の方法に準じ、ヒトCTの採取を行った。さらに、これを改良し、マーモセットCTの採取にも成功した。これらの細胞を培養し、STB様の細胞を得ることも成功した。現在は、これらの細胞のRNAを採取し、RNAseqを行うことによってこれらがどのように発現動態を変化させるのかを明らかにする予定である。しかし、TrkBについては既にRT-PCRおよびFCMによりその発現がCTではほとんどないが、特に絨毛ではその発現が亢進することが明らかになった。
- トロフォブラストとリンパ球の培養系：トロフォブラストとリンパ球の培養系においては、我々は、胎盤より精製したリンパ球(CD4T細胞、CD8T細胞)およびEVTについて、それぞれの組み合わせで共培養を行った。その結果、リンパ球との共培養系ではTRkBの発現に変化が生じることも明らかとなった。一方で、ヒト・マーモセットでは免疫系に大きな相違があることが明らかとなり、マーモセットの免疫系としてのヒトモデルには限界があることが示された。
- ヒト化妊娠マウスの系について：マーモセット免疫系の基礎的なデータとして、造血幹細胞の同定と正常解析を行い妊娠免疫においても役立てることを試みたが、造血幹細胞のマーカがマウス型であり、ヒト・マウスと異なるリンパ球分化を誘導することから、マーモセット化マウスではなく、ヒト化マウスを用いて妊娠免疫系を作製することとした。ヒト末梢血単核球を移植した重度免疫不全NOGマウスを交配して妊娠させ、2週間後に各種リンパ組織および末梢血を採取し、解析を行った。その結果、妊娠マウスでは、妊娠・胎盤の形成は可能であった。また、胎盤には特に異常形態は観察されなかった。しかし脾臓など末梢リンパ組織ではCD4T細胞優位であり、その一方で、胎盤ではCD8細胞優位であった。これらのマウスはGVHDで死ぬことも無かった。これらのマウスの血漿中には、様々なマウス抗原とともにヒトIgGが含まれており、その量は妊娠の有無とは関係なかった。また、これらのマウスでは、妊娠関連タンパク質であるマウスPZPの亢進も同時に観察された。また、胎盤組織内のTリンパ球と脾臓・骨髄のTリンパ球のTCRレパトリーを解析したところ、胎盤では、レパトリーが限られており、末梢リンパ組織とは異なるレ

パートリーの存在が確認された。以上の結果、マーモセットは浸潤性のトロフォブラストを持つヒト妊娠免疫のモデルとしては利用可能であるが、脱落膜へのリンパ球集積などヒトとは異なる性質もあり、今後もさらに詳細な比較解析をしながら実験に供する必要性が明らかとなった。しかし、ヒトと厳密に比較することにより、脱落膜におけるリンパ球とトロフォブラストの相互作用についてはGFPマーモセットを用いることが有用であると考えられた。

研究組織

連携研究者
鈴木 隆二(Suzuki Ryuuji)
独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター・教授
研究者番号：70373470

佐々木 えりか(Sasaki Erika)
実験動物中央研究所・部長
研究者番号：70390739

主な発表論文等

(雑誌論文)(計7件)

- NOG-hlL-4-Tg, a new humanized mouse model for producing tumor antigen-specific IgG antibody by peptide vaccination. Yoshie Kametani*, Ikumi Katano, Asuka Miyamoto, Yusuke Kikuchi, Ryoji Ito, Yukari Muguruma, Banri Tsuda, Sonoko Habu, Yutaka Tokuda, Kiyoshi Ando, Mamoru Ito *PLOS ONE* 2017 12(6):e0179239
- Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing. Sato K, Oiwa R, Kumita W, Henry R, Sakuma T, Ito R, Nozu R, Inoue T, Katano I, Sato K, Okahara N, Okahara J, Shimizu Y, Yamamoto M, Hanazawa K, Kawakami T, Kametani Y, Suzuki R, Takahashi T, Weinstein EJ, Yamamoto T, Sakakibara Y, Habu S, Hata JI, Okano H, Sasaki E. *Cell Stem Cell.* 2016 19(1):127-138
- Antibody-secreting plasma cells with unique CD5+IgG+CD21lo phenotype developed in humanized NOG mice. Yoshie Kametani*, Shin Shimada, Shuhya Mori, Mika Kojima, Shino Ohshima, Kazutaka Kitaura, Takaji Matsutani, Yoshinori Okada, Takashi Yahata, Ryoji Ito, Ikumi Katano, Hiroshi Suemizu, Ryuji Suzuki, Mamoru Ito, Sonoko Habu and Kiyoshi Ando, 2016 *Clinical Research and Trials* 2(3):164-173
- Improved hematopoietic differentiation of primate embryonic stem cells by inhibition of the PI3K-AKT pathway under defined conditions. Takenobu Nii, Tomotoshi Marumoto, Hiroshi Kohara, Saori Yamaguchi, Hirota Kawano, Erika Sasaki, Yoshie Kametani, Kenzaburo Tani. 2015 *Exp Hematol* 43:901-

911

- Common marmoset CD117-positive hematopoietic cells possess multipotency. Shin Shimada, Satoshi Nunomura, Shuya Mori, Hiroshi Suemizu, Toshio Itoh, Shuji Takabayashi, Yoshinori Okada, Takashi Yahata, Takashi Shiina, Hideki Katoh, Ryuji Suzuki, Kenzaburo Tani, Kiyoshi Ando, Hideo Yagita, Sonoko Habu, Erika Sasaki, Yoshie Kametani* 2015 *Int Immunol* 27:567-577
- NKG2D functions as an activating receptor on natural killer cells in common marmoset (callithrix jacchus). Watanabe M, Kudo Y, Kawano M, Nakayama M, Nakamura K, Kameda M, Ebara M, Sato T, Nakamura M, Omine K, Kametani Y, Suzuki R, Ogasawara K. *Int Immunol.* 2014 26(11):597-606
- Genomic sequence analysis of the major histocompatibility complex (MHC) class I G/F segment in common marmoset (Callithrix jacchus). Kono A, Brameier M, Roos C, Suzuki S, Shigenari A, Kametani Y, Kitaura K, Suzuki R, Inoko H, Walter L, Shiina T *J. Immunol.* 2014 (April) 192(7):3239-3246

(学会発表)(計12件)

- Pregnant humanized mouse as a model of human pregnant immunity: Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan, Department of Obstetrics and Gynecology, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan, Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki, Japan. Yusuke Ohno, Mika Kojima, Rihito Kinami, Shun-ichiro Izumi, Ryoji Ito, Mamoru Ito, Yoshie Kametani.
- Humanized mouse as a model of human pregnant immunity. Yusuke Ohno, Mika Kojima, Rihito Kinami, Mamoru Ito, Sonoko Habu, Yoshie

Kametani 第45回日本免疫学会総会・学術集会 2016年12月 5-7日 沖縄沖縄コンベンションセンター
Analysis of TrkB and PD1/PDL1 expression in Common Marmoset placenta 木南理仁、柏木寛史、沼尾絵里奈、寺山隼人、坂部貴、石本人士、和泉俊一郎、亀谷美恵 第31回日本生殖免疫学会総会・学術集会 2016年12月 2-3日 神戸 神戸国際会議場
Analysis of TrkB and PD1/PDL1 expression in Common Marmoset placenta Rihito Kinami, Hirofumi Kashiwagi, Erina Numao, Hitoshi Ishimoto, Shun-ichiro Izumi, Yoshie Kametani, International Symposium on Pituitary Gland and related Systems 2016年9月1-5日(5日) (Waikiki)
Comparison of pregnancy associated proteins -PZP, AZML1, PSG-expression in human and Common marmoset. Hirofumi Kashiwagi, Yoshie Kametani, Takashi Shiina, Masaki Momose, Miwa Yasaka, Yasuhisa Kanno, Takahiro Suzuki, Yusuke Ono, Rihito Kinami, Hitoshi Ishimoto, Shun-ichiro Izumi, Mikio Mikami International Symposium on Pituitary Gland and related Systems 2016年9月1-5日(5日) (Waikiki)
Humanized mouse as a model of human pregnant immunity Yusuke Ohno, Mika Kojima, Rihito Kinami, Yoshie Kametani, International Symposium on Pituitary Gland and related Systems 2016年9月1-5日(5日) (Waikiki)
Analysis of TrkB isoform expression in the placental tissue of fetal growth restriction. Yuko Haida, Rihito Kinami, Akane Konodo, Tomomi Iba, Shizue Nambara, Michiko Sone, Kazuhisa Maeda, Yoshie Kametani International Symposium on Pituitary Gland and related Systems 2016年9月1-5日(5日) (Waikiki)
Common marmoset CD117-

positive hematopoietic cells possess multipotency Kametani Yoshie, Shimada Shin, Nunomura Satoshi, Suemizu Hiroshi, Takabayashi Shuji, Shiina Takashi, Katoh Hideki, Suzuki Ryuji, Habu Sonoko, Sasaki Erika The 44rd Annual meeting of the Japanese Society for Immunology. 2015. Nov. 18-20, Sapporo Sapporo Convention Center
Characterization of Lymphocyte in Pregnant Immunity. Kinami Rihito, Nishigami Erina, Mori Shuya, Suzuki Ryuji, Sasaki Erika, Ito Mamoru, Kametani Yoshie The 44rd Annual meeting of the Japanese Society for Immunology. 2015. Nov. 18-20, Sapporo Sapporo Convention Center
ヒト胎盤における高遺伝子TrkBと免疫抑制遺伝子PD-L1の共発現 西上絵里奈、木南理仁、寺山隼人、坂部貴、石本人士、三上幹男、亀谷美恵 第30回日本生殖免疫学会総会・学術集会2015年11月21日(熊本)くまもと県民交流館/パレ
Analysis of immune cells in the fetal/maternal interface of the primate placenta. Kametani Yoshie, Numao Erina, Mori Shuya, Kinami Rihito, Kitaura Kazutaka, Shiina Takashi, Suzuki Ryuji, Sasaki Erika The 43rd Annual meeting of the Japanese Society for Immunology. 2014. Dec. 10-12, Kyoto, Kyoto International Conference Center
森修弥、沼尾絵里奈、大島志乃、嶋田岡、原純子、佐々木えりか、鈴木隆二、石本人士、椎名隆、亀谷美恵 コモンマーモセット胎盤における妊娠免疫系の解析 2014年5月17日 第61回日本実験動物学会総会 札幌・札幌コンベンションセンター

(図書)(計1件)

- ヒトにおける妊娠免疫 和泉俊一郎、近藤朱音、亀谷美恵 「ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ」第7巻「生体防御・社会性 -守-」p62-p75 2016年

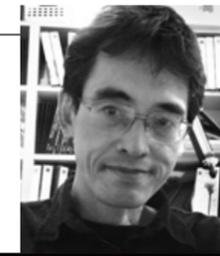
自己免疫寛容に必要な胸腺上皮細胞の特性を決定する分子機構の解明

(平成27年度～平成28年度) Identification of molecular mechanisms underlying differentiation of thymic epithelial cells establishing immunological self-tolerance

秋山 泰身 東京大学・医科学研究所

研究代表者

AKIYAMA, Taishin
東京大学・医科学研究所・准教授
50327665



研究開始当初の背景

胸腺は自己寛容なT細胞と制御性T細胞の分化の“場”となる。胸腺上皮細胞は、胸腺を構成するストローマ系細胞の一群であり、様々なサイトカインを産生することでT細胞分化や増殖を誘導するのみならず、自己抗原を発現・提示することにより、T細胞のMHC拘束性や自己抗原に対する免疫寛容に必要となる。

胸腺上皮細胞は髄質上皮細胞と皮質上皮細胞に分類されるが、髄質上皮細胞は、様々な組織に特異的に発現するタンパク質（組織特異的抗原；インシュリンなど）を、多種類にわたり異所的に発現する特色を持つ。これら組織特異的抗原は分化途中のT細胞へ提示される。提示された抗原を高い親和性で認識するT細胞は、アポトーシスで除去されるか、あるいは制御性T細胞へ変換され、結果として自己免疫寛容を誘導する。一部の組織特異的抗原の遺伝子発現は、髄質上皮細胞にほぼ特異的に発現する核内因子AIREにより制御されているが、組織特異的な遺伝子発現の詳細な制御機構は不明な部分が多く残されている。

髄質上皮細胞は、皮質上皮細胞と共通する前駆・幹細胞より分化すると考えられている。ところが分化の過程で、他の上皮細胞にはない髄質上皮細胞に特徴的な性質 — 組織特異的抗原の発現、AIREの発現、MHC分子や共刺激分子CD80/CD86の高発現 — を獲得する。これら自己免疫寛容の誘導に必須な髄質上皮細胞の特性が、どのような分子機構で形成されるのか、その解明は免疫システムの根幹の一つである自己—非自己識別機構の成立を分子レベルで理解する上で重要な課題といえる。

報告書らはこれまでに、RANKなどTNFレセプターファミリーシグナルによるNF- κ Bファミリー転写因子の活性化、続いて発現誘導されるEtsファミリー転写因子Spi-Bが髄質上皮細胞の分化を制御することを報告してきた。

研究の目的

上記のTNFレセプターファミリーシグナルを他の上皮細胞や株化した髄質上皮細胞に作用させても、髄質上皮細胞の特性は誘導されない。すな

わち、TNFレセプターシグナル以外にも、髄質上皮細胞の特性を誘導するために必要な機構が存在することになる。そして、その解明のためには、TNFレセプターシグナルを受ける前の胸腺髄質前駆細胞を同定して解析する必要があるとの考えに至った。

研究の方法

胎仔胸腺ではRANKシグナルが成熟髄質上皮細胞の分化に必須である。従って、RANKシグナルが作用しない胎仔マウス(RANKリガンド欠損マウスなど)においてRANKを発現する胸腺上皮細胞を、髄質上皮前駆細胞の候補とした。

RANKの発現を検出するために、RANK遺伝子座にRANK-IRES-EGFPを挿入したノックイン(以下、RANK-EGFP-KIと省略)マウスを利用し、RANK-EGFP-KIマウスとRANKリガンド(以下；RANKL)欠損ヘテロマウスを交配させ、RANK-EGFP-KIの背景を持つRANKL欠損ヘテロマウスを作成した。

RANKL欠損RANK-EGFP-KIマウスの胎仔胸腺を解析し、RANKシグナルを受けていないRANK発現髄質上皮細胞を同定する。RANKL欠損RANK-EGFP-KIマウスの胎仔胸腺を採取し、コラゲナーゼにより細胞を分散させた後、フローサイトメーターで解析し、EGFP陽性の上皮細胞を髄質上皮前駆細胞の候補とし、解析を行った。

研究成果

(1) 髄質上皮前駆細胞(pMEC)の同定
C57BL/6背景のRANK-EGFP-KI髄質上皮前駆細胞候補をセルソーターで採取した。一方で、(成熟した髄質上皮細胞が分化しない)Balb/c背景の*aly/aly*マウスの胎仔胸腺をコラゲナーゼで分散、採取した候補細胞と混合後に培養して、胸腺を再構成した。再構成胸腺をフローサイトメーターあるいは免疫組織染色で解析したところ、成熟した髄質上皮細胞が生じた。また上記と同様に、前駆細胞候補と再構成した胸腺をヌードマウスの腎臓皮膜下に移植し、移植した胸腺をフローサイトメーターや免疫組織染

色により解析したところ、Aireを発現する成熟した髄質上皮細胞に分化することが判明した。一方、胸腺の皮質上皮細胞には分化しなかった。すなわち、RANKを発現する前駆細胞候補は、成熟した髄質上皮細胞に分化する前駆細胞であることの証明に成功し、precursor of mTEC (pMEC)と名付けた。pMECが自己免疫を抑制する機能的な髄質上皮細胞になるのか検討するために、Balb/c背景のRANK-EGFP-KIマウスからpMECを単離し、Balb/c背景の*aly/aly*マウスの胸腺と再構成後にBalb/cヌードマウスに移植した。その結果、pMECを含めず*aly/aly*マウスだけで再構成した胸腺を移植すると、移植したヌードマウスの肝臓、膵臓、顎下腺などの組織に炎症性細胞浸潤が起き、移植ヌードマウスの血清中には、これらの組織のタンパク質に対する自己抗体が生じたが、これらは、pMECと再構成することで抑制された。これらの結果は、pMECは、自己免疫を抑制する成熟した髄質上皮細胞に分化できることを示している。

(2) pMECの遺伝子発現

pMECで発現する遺伝子を定量的PCR法で調べたところ、予想通り、髄質上皮細胞全般で発現するKeratin-5は発現しているが、成熟した髄質上皮細胞で発現するAireや様々な組織特異的遺伝子の発現は、ほぼ消失していた。さらに、予想外なことに、Keratin-8や β 5tなど通常は皮質上皮細胞で発現する遺伝子を高く発現していた。国内外の他のグループから、髄質上皮細胞と皮質上皮細胞の両方に分化できる共通前駆細胞は、 β 5tなど皮質上皮細胞で発現する因子を発現することが報告されている。pMECも同様な発現プロファイルを持っていることから、皮質上皮細胞で発現する因子は、髄質上皮細胞へと分化決定した後も発現している可能性が高い。

(3) pMEC分化を制御するシグナル機構

RANKシグナルは、髄質上皮細胞の分化に必要なである。RANKシグナルはTRAF6を介する古典的なNF- κ B活性化経路とRelBを活性化する非古典的経路を活性化することが知られており、両者は両方とも髄質上皮細胞の分化に必要なである。pMECからAire陽性mTECに分化する過程で、どちらの経

路が必要なのか調べるために、TRAF6を欠損するRANK-KIマウスとRelBを欠損するRANK-KIマウスを作成し、髄質上皮細胞の分化状態を解析した。その結果、TRAF6を欠損すると、pMECの段階で停止するが、RelBを欠損した場合、pMECよりも、より未成熟な段階で分化が停止することが判明した。すなわち、RANKからTRAF6を活性化するシグナルは、pMECからAire陽性髄質上皮細胞の分化を誘導する。一方、RelBを活性化する非古典的NF- κ B活性化シグナルは、pMECの前駆細胞からpMECへと分化する段階で機能することが判明し、pMECの前駆細胞をpro-pMECと名付けた。

(4) Pro-pMEC分化を制御するシグナル因子

RelBを活性化しpro-pMECからpMECへの分化を誘導するシグナル因子としてTNFファミリーシグナルの一つ、リンホトキシンシグナルに注目した。リンホトキシンシグナルのレセプターであるリンホトキシンbレセプター(LtbR)欠損マウスを調べたところ、一部の細胞だけpro-pMECの段階で停止していた。LtbR欠損を相補するシグナルとして、同じくRelBを活性化可能なRANKシグナルを予想した。実際、LtbRとRANKの両者を欠損するマウスでは、髄質上皮細胞の分化がpro-pMECで停止していた。したがって、pro-pMECからpMECは分化を進めるシグナルはLtbRとRANKであることが判明した。

まとめ

- 以上の実験の成果をまとめると、
- ①Aireを発現する髄質上皮細胞へ分化する胎仔前駆細胞であるpMECと、さらにpMECの前駆細胞であるpro-pMECを同定した。
 - ②pMECはRANKやKeratin-5など髄質上皮細胞のマーカーに加えて、皮質上皮細胞のマーカーも発現する
 - ③pMECからAire陽性細胞への分化は、RANK-TRAF6シグナルが誘導する。
 - ④Pro-pMECからpMECへの分化は、LtbRあるいはRANKにより活性化される非古典的NF- κ B経路が誘導する

本研究により、自己免疫疾患の発症抑制に必要な髄質上皮細胞の分化過程とその制御シグナルの一端が明らかとなった。これまでに報告されている共通前駆細胞や髄質上皮幹細胞との関連を明らかにすることで、自己免疫を抑制する上で必要な胸腺環境を形成する分子機構が、さらに明らかになると予想される。それらの知見は、免疫学の根本概念の一つである、自己—非自己の識別の解明に貢献する。またこの知見を利用して、自己免疫疾患の発症抑制、予防や治療など医療応用への展開も期待できる。

主な発表論文等

(雑誌論文)(計8件)

- 1) Akiyama N, Takizawa N, Miyauchi M, Yanai H, Tateishi R, Shinzawa M, Yoshinaga R, Kurihara M, Demizu Y, Yasuda H, Yagi S, Wu G, Matsumoto M, Sakamoto R, Yoshida N, Penninger JM, Kobayashi Y, Inoue J, Akiyama T. Identification of embryonic precursor cells that differentiate into thymic epithelial cells expressing autoimmune regulator. *J. Exp. Med.* (査読あり) 213:1441-1458 (2016) doi:
- 2) Shimbo M, Kudo T, Akiyama T (他36人、25番目), Takahashi S. Ground-based assessment of JAXA mouse habitat cage unit by mouse phenotypic studies. *Exp. Anim.* (査読あり)65:175-187 (2016) doi: 10.1538/expanim.15-0077
- 3) Kawasaki M, Kawasaki K, Oommen S, Blackburn J, Watanabe M, Nagai T, Kitamura A, Maeda T, Liu B, Schmidt-Ullrich R, Akiyama T, Inoue J, Hammond NL, Sharpe PT, Ohazama A. Regional regulation of Filiform tongue papillae development by *lkk α /lrf6*. *Dev. Dyn.* (査読あり)245:937-46. (2016) doi: 10.1002/dvdy.24427
- 4) Tateishi R, Akiyama N, Miyauchi M, Yoshinaga R, Sasanuma H, Kudo T, Shimbo M, Shinohara M, Obata K, Inoue J, Shirakawa M, Shiba D, Asahara H, Yoshida N, Takahashi S, Morita H, Akiyama T. Hypergravity Provokes a Temporary Reduction in CD4+CD8+ Thymocyte Number and a Persistent Decrease in Medullary Thymic Epithelial Cell Frequency in Mice. *Plos one* (査読あり) 10 :e0141650 (2015)

- doi: 10.1371/journal.pone.0141650
- 5) Varney ME, Niederkorn M, Konno H, Matsumura T, Gohda J, Yoshida N, Akiyama T, Christie S, Fang J, Miller D, Jerez A, Karsan A, Maciejewski JP, Meetei RA, Inoue J, Starczynowski DT. Loss of Tifab, a del(5q) MDS gene, alters hematopoiesis through derepression of Toll-like receptor-TRAF6 signaling. *J. Exp. Med.* (査読あり) 212:1967-1985 (2015) doi: 10.1084/jem.20141898.
- 6) Akiyama T, Tateishi R, Akiyama N, Yoshinaga R, Kobayashi TJ. Positive and Negative

- Regulatory Mechanisms for Fine-Tuning Cellularity and Functions of Medullary Thymic Epithelial Cells. *Front. Immunol.* (査読あり) 6:461(2015) doi: 10.3389/fimmu.2015.00461
- 7) Seki T, Yamamoto M, Taguchi Y, Miyauchi M, Akiyama N, Yamaguchi N, Gohda J, Akiyama T, Inoue J. Visualization of RelB expression and activation at the single-cell level during dendritic cell maturation in Relb-Venus knock-in mice. *J. Biochem.* (査読あり) 158:485-495 (2015) doi: 10.1093/jb/mvv064
- 8) Shinzawa M, Konno H, Qin J, Akiyama N, Miyauchi M, Ohashi H, Miyamoto-Sato E, Yanagawa H, Akiyama T, Inoue J. Catalytic subunits of the phosphatase calcineurin interact with NF- κ B-inducing kinase (NIK) and attenuate NIK-dependent gene expression. *Sci. Rep.* (査読あり) 5:10758 (2015) doi: 10.1038/srep10758.
- (学会発表)(計11件)**
- 1) Taishin Akiyama TNF receptor family RANK and CD40 signaling promote development of mature conventional dendritic cells in the thymus Kyoto T cell conference, 2017年3月6日、芝蘭会館 (京都府、京都市)
- 2) 秋山 泰身 Aire陽性髄質上皮細胞に分化するRANK発現前駆細胞の同定 胸腺研究会、2017年3月6日、「芝蘭会館 (京都府、京都市)」
- 3) Nobuko Akiyama, Riko Yoshinaga, Jun-ichiro Inoue, and Taishin Akiyama What is the role of lymphotoxin beta-receptor signaling in the development and function of medullary thymic epithelial cells? 第45回日本免疫学会学術総会、2016年12月6日、「沖縄コンベンションセンター (沖縄県、宜野湾市)」
- 4) Taishin Akiyama Quantitative analysis of T cell repertoire and homeostasis. 第54回生物物理学会、2016年11月26日、「つくば国際会議場 (茨城県、つくば市)」
- 5) Taishin Akiyama Novel embryonic precursor cells of medullary thymic epithelial cells expressing Aire, ThymUS, 2016年6月6日、「Maui (USA)」
- 6) 良永理子、秋山伸子、井上純一郎、秋山泰身 胸腺樹状細胞の成熟あるいは維持におけるRANKシグナルの役割、京都T細胞会議、2016年5月20日、「芝蘭会館 (京都府、京都市)」
- 7) 秋山伸子、良永理子、井上純一郎、秋山泰身 Aire陽性髄質上皮細胞に分化するRANK発現前駆細胞の同定、京都T細胞会議、2016年5月20日、「芝蘭会館 (京都府、京都市)」
- 8) Taku Ito-Kureha, Taishin Akiyama CNOT3 is important for thymocyte development through the regulation of TCR-mediated cell death signaling. 第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月19日、「札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)」
- 9) Ryosuke Tateishi, Taishin Akiyama Analysis of the molecular mechanism regulating regeneration of medullary thymic epithelial cells. 第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月19日、「札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)」
- 10) Kotaro Kitagawa, Taishin Akiyama, Takehito Sato Identification of thymic epithelial-like cells from human iPSC by ectopically expression of FOXN1 in stepwise culture system 第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月20日、「札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)」
- 11) 秋山泰身 RANKシグナルによる制御性T細胞の胸腺内分化誘導 第25回京都T細胞会議、2015年5月15日、「芝蘭会館 (京都府、京都市)」

Meetings

第4回徳島大学国際免疫学シンポジウム (共催)

日時 平成27年1月29日(木)~30日(金)

場所 徳島大学藤井記念ホール

Thursday 29 January

13:00 - 13:10 Opening remarks by Yousuke Takahama

Session 1. TCR-MHC and immune system (Chaired by Tetsuo Yamazaki)

13:10 - 13:40 Jonathan Sprent (Sydney)

TCR tuning and self tolerance

Takashi Saito (Yokohama)

Spacial regulation of T cell activation at Immune synapse

Yousuke Takahama (Tokushima)

Positive selection conditions TCR responsiveness in T cells

Hisashi Arase (Osaka)

Cellular misfolded proteins complexed with MHC class II molecules are targets for autoimmune diseases

Short talks 1 (Chaired by Il-mi Okazaki)

15:00 - 15:10 Kyoko Masuda (Kyoto)

Segregation of $\gamma\delta$ T cell progenitors prior to TCR β chain gene rearrangement independently of TCR-mediated signals

Izumi Ohigashi (Tokushima)

Adult thymus medullary epithelium is maintained and regenerated by lineage restricted cells rather than bipotent progenitors

Erdenezaya Odkhuu (Aichi)

The search for endogenous ligand of RP105/MD1 receptor complex on B cells

Session 2. Autoimmune mechanisms (Chaired by Mitsuru Matsumoto)

16:00 - 16:30 Yoshinori Fukui (Fukuoka)

A novel mechanism controlling Aire protein expression in the thymus

Mitsuru Matsumoto (Tokushima)

Transgenic Aire expression at the ectopic sites to elucidate the unique function of Aire

Yoichiro Iwakura (Tokyo)

Pathogenic mechanisms of rheumatoid arthritis revealed by animal models

Koji Yasutomo (Tokushima)

Genetic dissection of autoinflammatory disorders

Aoi Akitsu (Tokyo)

IL-1 receptor antagonist-deficient mice develop autoimmune arthritis due to an intrinsic defect in IL-17-producing gamma delta T cells

Yumiko Nishikawa (Tokushima)

Dysregulation of IgE homeostasis in hyper-IgE syndrome

Lynett Danks (Tokyo)

RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation

Il-mi Okazaki (Tokushima)

Genetic reconstitution of autoimmune diseases in mice.

Short talks 2 (Chaired by Tohru Sakai)

17:40 - 17:50

Hosted by Sumihare Noji, Vice President, University of Tokushima

MC by Naozumi Ishimaru

Friday 30 January

Session 3. Inflammation and regulation (Chaired by Koji Yasutomo)

09:00 - 09:30 Gabriel Núñez (Michigan)

Sensing pathogenic and commensal bacteria via the inflammasomes in the gut

Sidonia Fagarasan (Yokohama)

Regulation of gut microbiota by Foxp3+ T cells and IgA

Yoshiyuki Minegishi (Tokushima)

Molecular mechanisms and therapeutic approaches to hyper-IgE syndrome

Coffee

Session 4. Immune defense (Chaired by Taku Okazaki)

10:40 - 11:10 Isaac Chiu (Boston)

The role of nociceptive sensory neurons in neuro-immune modulation and host defense

Kenya Honda (Tokyo)

Regulation of T cells by the gut microbiota

Taku Okazaki (Tokushima)

Regulation of autoimmunity by immuno-inhibitory receptors

Tetsuo Yamazaki (Tokushima)

Manipulation of the ER: a novel strategy against protein deposition disease

Short talks 3 (Chaired by Yoshiyuki Minegishi)

12:20 - 12:30 Takashi Kanaya (Yokohama)

IL-22BP affects the properties of the follicle-associated epithelium of Peyer's patches through inhibiting IL-22 signaling

Takahiro Furukawa (Tokushima)

Delta1 regulates CD4T cell survival

Hiroshi Kawano (Tokushima)

Aire expression in medullary thymic epithelial cells is conditional

Tomoyuki Kondo (Tokushima)

Crosstalk between tumor immunity and autoimmunity

Tohru Sakai (Tokushima)

Soy isoflavone regulates immune responses

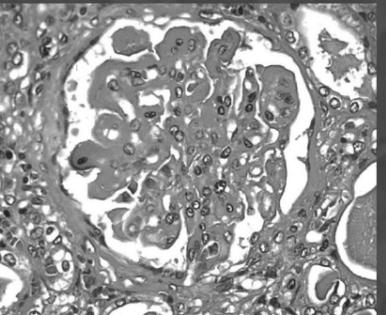
Lunch with students (13:30-14:30)

Organized by Yasusei Kudo & Kensuke Takada

The Fourth Bizan Immunology Symposium at University of Tokushima

Immune System Development, Deviation, and Regulation

Thursday 29th and Friday 30th January 2015
Fujii Memorial Hall, Kuramoto Campus,
University of Tokushima



Invited speakers

- Hisashi Arase (Osaka)
- Isaac Chiu (Boston)
- Sidonia Fagarasan (Yokohama)
- Yoshinori Fukui (Fukuoka)
- Kenya Honda (Tokyo)
- Yoichiro Iwakura (Noda)
- Gabriel Nunez (Michigan)
- Takashi Saito (Yokohama)
- Jonathan Sprent (Sydney)

Abstracts for oral or poster presentation are open for submission. The deadline is 16 December 2014. Travel bursary up to 50K JPY per abstract application is available for up to 10 young researchers including graduate students. Please notify the application at abstract submission. Successful applicants will be notified by the end of December 2014.

演題申込み切 2014年12月16日
10名を上限とする若手研究者に5万円を上限とする旅費支援を支援します。抄録送付の際に旅費支援申込み用紙をご記入ください。選考結果は12月末までに通知いたします。

Free Entry For All
入場無料 来聴歓迎

Contact:
Immunology Program at University of Tokushima (PUT)
3-18-15 Kuramoto, Tokushima 770-8503, Japan
Phone: +81-88-633-9452 E-mail: takahama@genome.tokushima-u.ac.jp

主催：徳島大学革新的特色プロジェクト「免疫自己システム研究プログラム」
共催：新学術領域研究「免疫四次元空間ダイナミクス」/共同利用共同研究拠点「免疫学研究拠点」
医学部教育課・東海生命科学教育部の大学院特別講義および免疫免疫クラスターセミナーを開催しています

I PUT ST



免疫の「場」を形成する新たなストローマ細胞としての破骨細胞の機能解明

(平成27年度～平成28年度) Investigation of osteoclasts as a novel type of stromal cells.

竹ヶ原 宜子 大阪大学・免疫学フロンティア研究センター

研究代表者

TAKEGAHARA, Noriko

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・
特任准教授

10444522



研究開始当初の背景

骨髄は免疫細胞の分化に必須の免疫器官であり、骨を形作る骨代謝細胞(骨基質を形成する骨芽細胞と、骨基質を吸収する破骨細胞)がその形成を担っている。骨代謝細胞は組織学的に造血幹細胞や免疫系細胞と同じ空間に存在することから、骨髄の形成のみならず、造血幹細胞や免疫系細胞との接着を介した免疫への関与が推測されている。しかしながら、骨代謝細胞による免疫の制御の実態はいまだ明らかではない。

申請者は破骨細胞を標的とした骨代謝制御機構の研究に従事し、これまでに破骨細胞表面に発現する分子群を同定している。中でも新規接着分子・lgSF11は、同種親和性を有することが知られているlgCAMsファミリーに属し、また申請者は予備実験からlgSF11が細胞同士の接着を担う性質を有していること見出している。破骨細胞がlgSF11を介して免疫系細胞と直接接着し、免疫系細胞の維持に関わるストローマ細胞のひとつとして機能する可能性を示唆している。

研究の目的

本研究では免疫の『場』を形成するストローマ細胞として破骨細胞に注目し、破骨細胞と免疫系細胞の接着の動態、さらにそれに伴う免疫系細胞の分化・活性化の変動を時空間的に明らかにすることにより、骨による免疫応答の制御の実態を明らかにする。破骨細胞表面発現分子群なのでもlgSF11を解析の取り掛かりとして、細胞接着を介した破骨細胞から免疫細胞への働きかけを解明し、免疫空間の新たな構成細胞としての破骨細胞を明らかにする。

研究の方法

本研究ではlgSF11に注目し、in vitroでの細胞培養システムを用いた実験に加えて遺伝子欠損マウスの作成・解析を行い、lgSF11が破骨細胞においてどのように機能するのか解明するとともに、細胞接着分子として免疫系細胞との相互作用に関与するのかを検討する。

また、lgSF11の他にも破骨細胞表面に発現する分子群の遺伝子欠損マウスを作成し、破骨細胞分化過程におけるこれら分子群の機能解析並

びに免疫応答への関与について解析を行った。

研究成果

(1) lgSF11は破骨細胞分化誘導因子RANKLの刺激によって発現が誘導される:lgSF11の発現様式をRT-PCRおよびウエスタンブロットにて検討し、RANKLの刺激によって発現が誘導されることをmRNAおよびタンパクレベルで確認した。

(2)lgSF11は同種親和性相互作用をする:EGFP標識したlgSF11を骨髄由来単球に導入した後、破骨細胞へと分化誘導する過程でEGFPの局在を継続的イメージングによって観察した。その結果、lgSF11を発現している細胞間での接着面および融合の際のみEGFPの凝集が認められ、同種親和性相互作用が明らかとなった。

(3) リコンビナントタンパクによってlgSF11相互作用を阻害することにより、破骨細胞の多核化が阻害される:lgSF11の細胞外領域にヒトIgG-Fc領域を融合したキメラタンパクを作成し、破骨細胞分化への影響を検討した。その結果、濃度依存的に多核化が阻害されることが明らかとなった。

(4) リコンビナントlgSF11の投与による多発性骨髄腫(Multiple myeloma)への影響の検討: ミエローマをマウスに移植し、多発性骨髄腫を誘導する際、リコンビナントlgSF11あるいはコントロールタンパクを投与し、多発性骨髄腫による骨侵襲をマイクロCTにて比較した。現在、条件検討を行っている段階である。

(5) lgSF11欠損マウスの作成:lgSF11が生体内でどのような機能を有するかを明らかにするため、遺伝子欠損マウスをCRISPERシステムによって作成し、結果として第一エクソンの一部を欠損したマウス系統を樹立した。遺伝子の欠損は定量PCRによって確認した。

(6) lgSF11欠損細胞は破骨細胞の多核化が阻害される:野生型およびlgSF11欠損マウスの骨髄からM-CSFを用いて単球を分化誘導し、RANKLを用いて破骨細胞へと分化誘導した。その結果、遺伝子欠損単球は野生型単球に比べて多核化が顕著に抑制されることが明らかとなった。また、この表現型は細胞を高密度で培養することにより消失した。この結果はから、lgSF11は細胞間接着を担う

ことにより多核化に寄与することが示唆された。

(7) lgSF11の細胞内領域は破骨細胞の多核化に必須である:細胞間接着作用にlgSF11がどのように機能するのかを検討するため、細胞内領域欠損型のlgSF11発現ベクターを作成し、lgSF11欠損単球へ導入した後、RANKLを用いて破骨細胞へと分化誘導した。すると、全長lgSF11の導入によってlgSF11欠損細胞の表現型は回復するが、細胞内領域欠損型のlgSF11の導入によっては回復が認められなかった。この結果から、lgSF11は細胞内領域を介して機能を発揮していると考えられた。

(8) lgSF11欠損細胞を用いたトランスクリプトーム解析: lgSF11が細胞内領域を介してシグナル伝達に寄与していると考えられたことから、野生型および遺伝子欠損細胞を用いてDNAマイクロアレイ解析を行い、lgSF11の欠損によって影響を受けるシグナル伝達経路の探索を行った。その結果、lgSF11欠損細胞ではインテグリンシグナル制御が損なわれている結果が得られた。実際、lgSF11欠損細胞ではインテグリンを制御するRap1の活性に影響が認められた。

(9) lgSF11欠損マウスは大理石骨病を発症する:lgSF11の欠損が破骨細胞の多核化を阻害することが明らかとなったことから、マウス骨髄腔の形成に影響が出る可能性が考えられた。そこで野生型および遺伝子欠損マウスの長管骨を採取し、マイクロCTによって骨形態解析を行った。その結果、遺伝子欠損マウスは大理石骨病様の症状を呈することが明らかとなった。

上記の研究結果に加えて、破骨細胞表面発現分子群の中でもP2X5がinflammasomeを介して破骨細胞の成熟に関与することを明らかにした。骨と免疫の相互作用のさらなる解明に貢献すると期待される。

まとめ

免疫の『場』を形成するストローマ細胞として破骨細胞に注目し、破骨細胞に発現する新規膜分子lgSF11の機能解析を行った。その結果、lgSF11が同種親和性により細胞間接着を担う接着分子であること、また細胞内領域を介してインテグリンシグナルを制御することを明らかにした。多発性骨髄腫を実験モデルとして、ミエローマと破骨細胞間の細胞間接着へのlgSF11の関与については、現在解析中である。

主な発表論文等

(雑誌論文)(計3件)

- 1) Kim H, Walsh MC, Takegahara N, Middleton SA, Shin Hl, Kim J, Choi Y. The purinergic receptor P2X5 regulates inflammasome activity and hyper-multinucleation of murine osteoclasts. *Sci Rep.*, 査読あり, 7, 2017, 196. doi: 10.1038/s41598-017-00139-2.
- 2) Kimura T, Nada S, Takegahara N, Okuno T, Nojima S, Kang S, Ito D, Morimoto K, Hosokawa T, Hayama Y, Mitsui Y, Sakurai N, Sarashina-Kida H, Nishide M, Maeda Y, Takamatsu

H, Okuzaki D, Yamada M, Okada M, Kumanogoh A. Polarization of M2 macrophages requires Lamtor1 that integrates cytokine and amino-acid signals. *Nat Commun.* 査読あり, 7, 2016, 13130. doi: 10.1038/ncomms13130.

- 3) Takegahara N (corresponding author), Kim H, Mizuno H, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Tomura M, Kanagawa O, Ishii M, Choi Y. Involvement of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL)-induced Incomplete Cytokinesis in the Polyploidization of Osteoclasts. *J Biol Chem.* 査読あり 291, 2016, 3439-54. doi: 10.1074/jbc.M115.677427.

(学会発表)(計5件)

- 1) 竹ヶ原宜子、破骨細胞の融合メカニズム、日本骨代謝学会、2016年7月21日、大阪国際会議場、招待講演
- 2) 竹ヶ原宜子、細胞質分裂の失敗 破骨細胞の多核化を担う新たなメカニズム、日本リウマチ学会、2016年4月21日、パシフィコ横浜、招待講演
- 3) 竹ヶ原宜子、Hyunsoo Kim, Yongwon Choi, RANKLによって誘導される細胞質分裂の失敗は破骨細胞の倍数性増大に寄与する、日本分子生物学会、2015年12月4日、神戸ポートアイランド、一般講演
- 4) Noriko Takegahara, RANKL-induced osteoclast polyploidization in addition to cell fusion, Australian New Zealand

Bone and Mineral Society Annual Scientific Meeting 2015, 2015年11月3日、Hotel Grand Chancellor Hobart (Tasmania Australia)、一般講演

- 5) 竹ヶ原宜子、RANKLによって誘導される細胞質分裂の失敗は破骨細胞の倍数性増大に寄与する、日本骨代謝学会、2015年7月23日、京王プラザホテル、一般講演

免疫四次元空間におけるNotchリガンドの役割解明

(平成27年度～平成28年度) The physiological role of Notch ligands in central and peripheral lymphoid tissues.

穂積 勝人 東海大学・医学部

研究代表者

HOZUMI, Katsuo

東海大学・医学部・准教授

30246079



研究開始当初の背景

免疫細胞の発生および機能分化は、一次あるいは二次リンパ組織の分化環境において支持され、特徴的な環境因子との相互作用がその基盤として機能している。こうした個体内の特徴的な「場」において認められる現象を分子レベルで理解することは、免疫応答能の再構築や難治性疾患の治療を実現するうえで、きわめて重要な課題である。

Notch系は、細胞分化・増殖を環境依存的に制御する広く共有されたシステムである。我々はこれまで、Notchリガンド(NotchL)：DII4が胸腺分化環境の分子的本態であることを明確に示してきた。また最近、Notch系が、in vivoでの免疫応答に重要な役割を担うことが示され、生体内の「場」における免疫細胞の挙動を理解するために、環境要因としてのNotchLからNotchを介して誘導されるNotchシグナルは、きわめて重要な研究対象と考えられた。

研究の目的

本研究では、T細胞の系列決定におけるNotch/NochLの組み合わせ特性について、誘導型遺伝子欠損および発現マウスを用い、in vivoにてその分子的理解を深める。また、自然免疫リンパ球(ILCs)の分化環境要因としてのNotchLの寄与を明確にし、ILCs分化の「場」や系列決定の分子機構について、T細胞と比較し、解明する。さらに、免疫応答の「場」を、NotchLの視点から解析し、特にIgA産生に重要なパイエル板に特徴的に見出されるNotchシグナルのTfh細胞分化における役割について検証する。

研究の方法

(1) T、B、ILC2細胞のin vitro誘導系

骨髄支持細胞：OP9に、DII4、DII1とその相互置換体や変異体を遺伝子導入し、細胞株とした。造血未分化細胞(HPC)としてLin⁻c-kit⁺、幹細胞(HSC)としてKSL、リンパ系未分化細胞(CLP)としてIL7R+画分を胎仔肝臓より分離し、IL7、Flt3L存在下に13日間培養し、DN3期(Thy1⁺CD25⁺CD44⁻)やDP期のT細

胞、ILC2細胞(ST2⁺CD25⁺IL7R⁺)、B細胞(CD19⁺)への分化を観察した。

(2) 遺伝子改変マウス

DII1-(Hozumi K et al., *Nat Immunol* 5:638, 04)、DII4-(Hozumi K et al., *J Exp Med* 205:2507, 08) floxedマウスを、Foxn1-Cre、RosaCreERマウスと交配し、胸腺上皮細胞での、あるいはTam処理にて全身性の遺伝子欠損マウスを使用した。Notch1-(Yang X et al., *Dev Biol* 269:81, 04)、Notch2-(Saito T et al., *Immunity* 18:675, 03) floxedマウスは、CD4-Creマウスと交配し、Notch1/2欠失T細胞を有するマウスとして使用した。Rosa floxed STOP-DII1、-DII4マウス(Rosa遺伝子座に、GFP cDNAをloxPではさみ、その下流にDII1/4 cDNAを配した)は、Cre依存的DII1、DII4発現(gain-of-function)マウスとして用いた。

(3) パイエル板および虫垂リンパ組織におけるNotchシグナルの検出

遺伝子改変マウスよりパイエル板および虫垂を採材し、凍結組織切片を作製し、免疫組織化学染色を行った。抗DII4(R&D)、Notch1断片(Cell Signaling)、CD35(、MadCAM1(、CD31、Foxp3、CD4、B220抗体を使用した。

研究成果

(1) NotchL：DII4/DII1間のNotch1を機能的差異の分子機構解析

我々はこれまで、in vitroおよびin vivoでのT細胞分化誘導において、DII4が、DII1と比較し、効率的なNotch1シグナル発動能を有し、高いT細胞誘導能を保持することを示してきたが、その差異を理解できる分子機構については明らかでなかった。DII4分子は、DII1と異なり、NotchLの重要な共通構造であるDOSモチーフを有しておらず、これを含むDOS領域が両分子の機能的差異を生み出していると考え、それをDII4/1間で置換したキメラ分子をそれぞれ作製し、その機能について調べた。その結果、DII4のDOS領域は、DII1分子内ではまったく機能せず、Notch1シグナル誘導能が消失することがわかった。一方、DII1由来のDOS領域(DOS

モチーフを有する)は、DII4分子内でも機能し、野生型DII4に比べ、明らかに強い活性を発揮した。これらの結果は、DII分子におけるDOSモチーフの重要性を示したものの、DII4の機能的優位性については、DOS領域以外の部位が重要であることを意味した。また、Notchとの結合に重要なDSL領域については、両者に機能的差異を認めなかった。

そこで、これまで機能的意義が不明瞭であったDII分子N末(MNNL)領域に着目し、先と同様にキメラ分子を作製し、その機能を調べた。その結果、DII4分子のMNNL領域がきわめて機能的に重要であることが判明し、逆に、DII1分子のMNNL領域はほとんどその機能に寄与していないことが示唆された。以上の結果は、2つのDII分子は、少なくともNotch1を介したシグナル発動に際し、それぞれ異なる領域を中心として機能していることを示している。この結論は、これまでのNotchリガンド研究からはまったく想定されてこなかったものであり、より詳細な分子機構の解明が待たれる。現在、千葉大学医学部・田村研との共同研究にて、Notch/NotchL間の結合状態をシミュレートすべく、高分子結合モデルの策定を急いでおり、この領域への新たな貢献が期待される。T細胞分化環境としての胸腺環境を担うNotchリガンドの役割を指標に、DII4のDII1に対する優位性の分子機構を調べ、これまでのNotchリガンド研究ではまったく想定されてこなかったDII4に特徴的な機能発現様式を明確にできた。これは、進化的に胸腺が認められる軟骨魚類にはDII1様の遺伝子しか存在せず、硬骨魚類からDII4遺伝子が出現し、何らかの効率的な運用がなされていることを考えさせ、興味深い。

(2) DII4欠失胸腺での自然リンパ球の分化

我々はこれまで、DII1およびDII4を介して誘導されるNotchシグナルが、シグナル量に依存してT/B細胞系列分化決定を制御すること、特に、B細胞分化抑制とT細胞分化誘導を行うシグナル量には、明らかな乖離があることを示してきた。すなわち、B細胞分化が抑制されるものの、T細胞分化を誘導できない状態が存在する。我々は、この中間的なシグナル量にて、自然リンパ球(Innate Lymphoid Cells, ILC)が誘導されることを見出した。さらに、Notchシグナル発生量が

激減する、Foxn1-Cre・DII4-floxedにおける胸腺上皮細胞でのDII4の消失により、B細胞に加えて、ILC2細胞が顕著に出現することを認めた。この分化は、胸腺での完全なDII4欠失により消失することから、一定の微弱なNotchシグナルによって支持されているものと考えられた。この結果は、ILC2細胞分化のNotch依存性を理解するうえできわめて興味深い現象であり、同細胞が関与する腸管寄生虫排除や呼吸器アレルギー応答等の制御にも有用な情報と考えられる。

(3) パイエル板および虫垂におけるNotchシグナル発生機構とその生理的意義

我々はこれまで、胸腺以外の免疫組織において、DII4を強発現する場所として、パイエル板を見出した。DII4の発現は、多くのCD31+血管内皮細胞に認められるが、パイエル板ではB細胞領域を中心とした支持細胞に強い発現を見出した。DII4は、MadCAM1+かつCD35+細胞に主として認められることから、濾胞樹状細胞(FDC)を含む支持細胞集団に発現することが示唆された。同様の結果を、マウス虫垂リンパ組織においても認めた。次に、パイエル板におけるDII4の生理的意義を理解することを目的として、Notchシグナルを受容している細胞の同定を試みた。マウス・パイエル板よりリンパ系細胞を回収し、各細胞群をセルソーターにて単離後、各細胞群を固定・播種し、Notchシグナル発動に

伴い出現するNotch1細胞内断片(N1ICD)の検出を試みた。その結果、T細胞の中のFoxp3⁺制御性T(Treg)細胞にて高頻度に、またCxcr5⁺濾胞ヘルパーT(Tfh)細胞にて低頻度に、それぞれ検出できることが明らかになった。同様の結果を、パイエル板の免疫組織化学染色からも、得ることができた。T細胞にてNotch1を欠失するCD4-Cre・Notch1-floxedマウスでは、N1ICDの染色像が消失することから、検出の特異性についても確認できた。さらに、DII4欠失を生後、全身性に誘導したマウス(RosaCreER・DII4-floxed)のパイエル板でも、DII4分子とともに、N1ICDも検出できなくなることが確認され、N1ICDの出現は、DII4/Notch1の結合を介したNotchシグナル発動に依存していることが示された。

そこで、パイエル板TregおよびTfh細胞に誘導されるNotchシグナルの意義を調べるため、T細胞で発現するNotch1およびNotch2をT細胞にて消失させたCD4-Cre・Notch1/Notch2-floxedマウスより腸管を採材し、IgA産生B細胞の出現効率を調べた。その結果、対照マウスと比較し、Notch1/2欠失マウスでは、IgA産生B細胞の出現頻度が低下していた。また、個体差はあるものの、パイエル板でのAID+B細胞を含むリンパ濾胞の出現も低下する傾向を認めた。これらの結果は、パイエル板に存在する

消化管抗原応答性Tfh細胞の出現がDII4とNotchを介して誘導されるNotchシグナルに依存している可能性を示唆している。しかし、腸管でのIgA産生は、T細胞非依存的になされるものも多く、Notchシグナル依存性を明確に示すことが難しい。我々は、Notchシグナル受容細胞としてTreg細胞が多いことを認めており、パイエル板でのIgA産生に寄与することが報告されているFoxp3⁺細胞由来Tfh細胞の出現にNotchシグナルが関与する可能性が考えられる。今後は、FoxP3⁺CD4⁺T細胞に依存したIgA産生に注目し、Notch依存性について解析する予定である。

まとめ

胸腺環境を担うNotchリガンドの役割から、DII4のDII1に対する優位性の分子機構として、DII4に特徴的な機能発現様式を明確にした。またDII4/DII1分子間の機能的差異を探索する過程で、T/B/NK細胞いずれの系列でもないILC2細胞への分化が支持される状況を確認、各リンパ系細胞のNotchシグナル依存性の違いを示した。胸腺以外のリンパ組織として、パイエル板での強いNotchシグナル発動を認めた。同シグナルが、Tfh細胞を介したIgA産生に寄与する可能性を見出した。

主な発表論文等

(雑誌論文) (計1件)

Liu L, Wada H, Matsubara N, Hozumi K and Itoh M. Identification of domains for efficient Notch signaling activity in immobilized Notch ligand proteins. *J Cell Biochem*, 118: 785-796, 2016.

(学会発表) (計3件)

1) Hozumi K, Ochiai S and Hirano K. Essential role of Lmo2 for the maintenance of T-cell differentiation potential in Ebf1-deficient pro-B cells. 日本免疫学会・学術集会、2016.12.5. 沖縄コンベンションセンター・沖縄県・宜野湾市.

2) Yazawa M and Hozumi K. DII4-mediated Notch1 signaling is required for the conversion from Treg to Tfh in Peyer's patch. 日本免疫学会・学術集会、2016.12.7. 沖縄コンベンションセンター・沖縄県・宜野湾市.

3) Hozumi K and Hirano K. Identification of the essential factors for receiving the Notch signaling in early T cell progenitors. 日本免疫学会・学術集会、2015.11.19. 札幌コンベンションセンター・北海道・札幌市.

時計遺伝子*Nfil3*によるリンパ組織形成メカニズムの解明

(平成27年度～平成28年度) Mechanistic approach of Lymphoid tissue organization by clock gene *Nfil3*

久保 允人 東京理科大学・生命医科学研究所

研究代表者

KUBO, Masato
東京理科大学・生命医科学研究所・教授
40277281



研究開始当初の背景

リンパ節やパイエル板は胎生期に構築される末梢リンパ組織であり、いずれもリンパ組織形成を誘導する造血系細胞由来のLymphoid Tissue Inducer (LTi)細胞とリンパ組織形成の場となるストローマ細胞であるLymphoid Tissue Organizer (LTo)細胞との相互作用により形成が開始される。胎生期におけるLTi細胞は肝臓のCommon Lymphoid Progenitor (CLP)から分化する。この過程にはId2やRORγtなどの様々な転写因子の発現が関与していると考えられているが、その分化メカニズムの詳細は未だ不明な点が多く残されている。また、パイエル板は、腸管での免疫応答を制御する器官と考えられているが、その形成過程にどのような制御が関わるのか、リンパ節どう異なるのかなどについてはほとんど分かっていない。

NFIL3/E4BP4はE boxに結合する基本ロイシンジッパー転写因子であり、時計遺伝子を抑制的に制御する転写因子として同定された。我々はNFIL3/E4BP4はT細胞において、IL-10およびIL-13の産生を制御していた (Nature Immunol. 2011)。NFIL3欠損マウスでは、パイエル板の数が減少しているのに対し、ヘテロ欠損マウスにおけるパイエル板の数は、WTマウスとホモ欠損マウスの中間程度の数を示すことから、NFIL3の発現量がパイエル板の形成を制御することを示唆していた。また、NFIL3欠損マウスでは、腸管内に存在する3型自然リンパ球(Innate Lymphoid cell-3;ILC3)を欠損している。現在では、LTiはILC3に分類されていることから、これがパイエル板形成に影響を与える可能性は推察されるが、腸管リンパ節の形成などには影響しないことなどから、必ずしもILC3の欠損だけでパイエル板だけへの影響を説明することはできない。NFIL3はがpre-LTiの形成・ILC3の分化御を介して、パイエル板の形成制する因子であることがそうていされた。

NFIL3は松果体細胞において24時間の周期で発現の変動する転写因子であり、概日時計の進行を制御する分子である。我々をはじめとする複数のグループによる欠損マウスの解析から、NK細胞やCD103⁺樹状細胞の分化に必須の転写因子であり、様々な免疫システムに関与することが示されてきた。*Nfil3*欠損マウスではがほぼ完全に消失していることから、これら細胞に必須の転写因子である。一方、NFIL3はLTi(ILC3)を含むILC全般(ILC1(NK), ILC2, ILC3)の初期分

化過程ををコントロールする転写因子となることが分かってきている。

研究の目的

2次リンパ組織であるリンパ節やパイエル板は、リンパ組織形成を誘導する造血系細胞由来のLymphoid Tissue Inducerとリンパ組織形成の場となるストローマ細胞であるLymphoid Tissue Organizerとの相互作用により形成される。欠損マウスの解析から、NFIL3はILC3(pre-LTi)の分化制御に関わる転写因子と考えられる。また、最近の知見から、NFIL3はILC1(NK)やILC3のみならずILC2の発生分化にも多大な影響をもたらすことが分かってきた。そこで本研究では、NFIL3によるILCの分化における役割を明らかにする。

研究の方法

NFIL-3のILC分化における影響を見るため、*Nfil3^{-/-}*, *Nfil3^{fl/fl}* ERT2creマウスを作製し、タモキシフェン誘導型欠損のシステムを構築する。また、NFIL-3遺伝子の欠損は、ダニ抗原などに多く含まれるシステインプロテアーゼで誘導されるアレルギー性気道過敏症を起こさなくなる。このことは、肺に存在するILC2の機能を制御する分子となることが想定できる。そこで、分化が完了している肺由来ILC2の機能を解析するため、タモキシフェン誘導システムを活用する。

T細胞を用いた先行研究では、また、NFIL-3の標的となるIL-13遺伝子のプロモーター領域には、NFIL-3のみならず、GATA3も結合できることから、この2つの転写因子結合配列には相同性があることが分かっている。そこで、タモキシフェン誘導システムを用いて*Nfil3*と*Gata3*遺伝子をそれぞれを欠損させ、プロテアーゼアレルゲンによって誘導されるアレルギー性気道炎症の解析する。また、同時にILC2における遺伝子発現解析をおこなう。この解析結果から、NFIL-3の標的遺伝子の同定するとともに、NFIL-3とGATA3の相互関係を明らかにしていく。

研究成果

我々はこれまでのT細胞に焦点を当てた研究から、時計遺伝子として知られる転写因

子E4BP4/NFIL-3が、過剰な免疫反応を沈静化する働きを持つことを報告した(*Nature Immunology* 2011)。この分子を欠くマウスは、腸管内に存在するリンパ組織であるパイエル板の数が激減していた。このパイエル板に与える影響は、Lymphoid tissue inducer ('LTi')の発生過程に障害があることを明らかにした。また、NFIL-3の欠損は腸管内に主に分布する3型自然リンパ球(ILC3)の発生過程でも鍵となる分子として働いていることが分かった。ILCはサイトカインの産生パターンの違いによって、ILC1, ILC2, ILC3に分類できる。NFIL-3は、NK細胞の分化に加え、ILC1とILC2の分化過程、特に初期分化過程において必須の分子であることを見いだした。さらに、エピジェネティックな解析から、NFIL-3はId2遺伝子に結合することで、ILCの初期分化課程を制御していることを明らかにしてきた(*Cell Report* 2015)。

上記のようにNFIL-3は初期段階でのILC2分化を制御するが、*Nfil3*遺伝子欠損下でも肺など末梢組織には十分検出可能なILC2細胞が存在していた。このことは、ILC2細胞にはNFIL-3非依存性の分化経路が存在することを示していた。ところが、Nfil3欠損マウスではシステインプロテアーゼアレルゲン投与で誘導される好酸球性気道炎症が完全に消失することから、NFIL-3はILC2の機能を制御している可能性がある。また、タモキシフェンで誘導的に*Nfil3*を欠損させたマウスでも同様の炎症消失が起こっていた。システインプロテアーゼアレルゲンは、ILC2などの自然免疫系に影響するだけではなく、Th2細胞を気道にリクルートする役割を持つ。このT細胞の気道へ集積は、誘導型*Nfil3*欠損マウスにおいて、完全に抑制されることから、現在2つの可能性1) *Nfil3*欠損によるILC2の機能障害と2) *Nfil3*欠損によるT細胞機能への影響、を想定している。タモキシフェン依存的*Nfil3*欠損マウスを使った、ILC2細胞を対象とした遺伝子発現解析では、1000個以上の遺伝子が発現低下していた。低下がみられた特徴的な遺伝子としては、*Gata3*を含めIL-5, IL-13, IL-33受容体、Arginineやアルギナーゼ1、アンフィレグリンなどが含まれていた。一方、*Gata3*欠損マウスの解析結果から、発現低下のみられる遺伝子の多くは、*Nfil3*欠損により影響を受けた遺伝子に相当していた。このことは、NFIL-3はGATA3の上位に存在する転写因子であることが明らかにされた。

まとめ

E4BP4/NFIL-3は、ILC1とILC2の分化過程、特に初期分化過程において必須の分子である。しかしながら、ILC2細胞にはNFIL-3非依存性の分化経路が存在しており、*Nfil3*欠損マウス、タモキシフェン誘導性*Nfil3*欠損マウスでは、システインプロテアーゼアレルゲンの点鼻投与で誘導される気道炎症が完全に消失しておりNFIL-3は、アレルゲンによって誘導される自然免疫系によるアレルギー反応のみならずTh2細胞の気道への集積においても役割を持ち、この反応系を制御す

る新しい働きが明らかにされた。

研究組織

連携研究者

原田 陽介(HARADA, Yohsuke)
東京理科大学・薬学部・講師
研究者番号:20328579

尾見 歩惟(OMI, Ai)
研究者番号:00750796

主な発表論文等

(雑誌論文)(計20件)

- 1) Wang, Y., Kubo, M., Hooper, L.V., (6名中5番目) The intestinal microbiota regulates body composition through NFIL3 and the circadian clock. *Science* 357, 912–916, 2017 査読有
- 2) Kubo, M., T follicular helper and Th2 cells in allergic responses. *Allergology International* 66,377-381, 2017 査読有
- 3) Kondo,T., Kubo, M., Yoshimura, A., et al. (13名中9番目) Notch-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy. *Nature Commun.* 8:15338, 2017 査読有
- 4) Kubo, M., Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation. *Immunological Review*, 2017 査読有
- 5) Matsui, A., Konomi, A., Kubo, M., et al. (9名中9番目) E3 ubiquitin ligases SIAH1/2 regulates HIF-mediated Th17 cell differentiation. *Int.Immunol.* 2017 査読有
- 6) Hussain, M., Kubo, M., Noti, M., et al. (10名中6番目) Basophil-derived interleukin-4 promotes epicutaneous antigen sensitization concomitant with the development of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, pii: S0091-6749(17)30566-3. 2017 査読有
- 7) Mukai, K., Kubo, M., Galli, S.J., et al. (6名中4番目) Differences in the importance of mast cells, basophils, IgE and IgG in primary and

secondary immunity to *Strongyloides venezuelensis*. *Infection and Immunity*, pii: IA1.00053-17. 2017 査読有

8) Shirota, H., Kubo, M., Ishioka, C., et al. (6名中5番目) IL4 from T follicular helper cells downregulates antitumor immunity. *Cancer Immunology Research*, 5(1):61-71 2017 査読有

9) Domínguez-Hüttinger, Kubo, M., and Tanaka, R.J., et al. (7名中6番目) Mathematical Modeling of Atopic Dermatitis Reveals “Double switch” Mechanisms Underlying Four Common Disease Phenotypes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016 Dec 5. Pii:S0091-6749(16)31433- 査読有

11) Miyauchi, K., Sugimoto-Ishige, A., Kubo, M., et al. (16名中16番目) Protective neutralizing influenza antibody response in the absence of T follicular helper cells. *Nature Immunol.* 17, p1447-1458, 2016 査読有

12) Yasuda, T., Kubo, M., Yoshida, H., et al. (18名中12番目) Hyperactivation of JAK1 tyrosine kinase induces stepwise, progressive pruritic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 126(6):2064–2076. 2016 査読有

13) Takeuchi, A., Kubo, M., and Saito, T., et al. (14名中13番目) CRTAM determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage. *J. Exp. Med.* 213:123-138, 2016 査読有

14) Hara, Y., Kubo, M., Azuma,T., et al. (8名中6番目) High Affinity IgM⁺ Memory B Cells Are Generated through a Germinal Center-Dependent Pathway. *Mol. Immunol.*, 68, Issue 2, 617–627, 2015 査読有

15) Yashiro, T., Kubo, M., Nishiyama, C., et al. (5名中2番目) PU.1 suppresses Th2 cytokine expression via silencing of GATA3 transcription in dendritic cells. *PLoS ONE* 10(9): e0137699, 2015 査読有

16) Kubo, M., TCF-1 and LEF-1 are new players that help launch the TFH program. *Nature Immunol.*, 16(9):900-1, 2015 査読有

17) Morita, H., Kubo, M., Nakae, S., et al. (19名中15番目) An interleukin-33-mast cell-interleukin-2 axis suppresses papain-induced allergic airway inflammation by promoting regulatory T cell numbers. *Immunity* 43,1, p175–186, 2015 査読有

18) Ugajin, T., Kubo, M., Hirano, T., et al. (8名中6番目) Zinc-binding metallothioneins are key modulators of IL-4 production by basophils *Molecular Immunology* 66, Issue 2, 180-188, 2015 査読有

19) Nakano, N., Kubo, M., Ogawa, H., et al. (8名中6番目) Notch Signaling Enhances FcεRI-Mediated Cytokine Production by Mast Cells through Direct and Indirect Mechanisms. *J Immunol.* 194:4535–44, 2015 査読有

20) Xu, W., Domingues, R.G., Kubo, M., Veiga-Fernandes, H., et al. (16名中14番目) NFIL3 orchestrates the emergence of common helper innate lymphoid cell precursors *Cell Report* 10, Issue 12, 2043–2054, 2015 査読有

有

(学会発表)(計14件)

- 1) Masato Kubo Role of T follicular helper (Tfh) and Th1 cells in anti-viral immunity. 7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference (KTCC2017) 13th and 17th March 2017, Shiran Kaikan, Kyoto University, Kyoto
- 2) Masato Kubo 2017 INTERNATIONAL BIOMEDECAL INTERFACE SYMPOSIUM, New therapeutic approach for atopic dermatitis (AD) using comprehensive analysis and system biology, March 4-5, 2017, Taipei Medical University, Taiwan
- 3) Masato Kubo The 13th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity (IWA2016), Role of T follicular helper (TFH) in humoral immunity, 11-13 October, 2016, The Westin Miyako Kyoto, Kyoto
- 4) 久保允人 第65回日本アレルギー学会 学術大会 教育講演8『アレルギーにおける自然免疫と獲得免疫のクロストーク』2016年6月18日(土) 東京国際フォーラム 東京
- 5) Masato Kubo The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (JSI), Humoral Immunity against Influenza virus infection, Nov.18-20, 2015, Sapporo
- 6) Masato Kubo 2015 Fall Conference of The Korean Association of the Immunologists, Innate and acquired immunity in influenza virus infection. Nov. 12–13, 2015, Sejong University Convention Center, Seoul, Korea

- 7) Masato Kubo International Symposium on Allergy and Inflammation 2015, Innate and acquired immunity in influenza virus infection. October 29th-30th, 2015 Oarai Park Hotel, Chiba
- 8) Masato Kubo International Symposium of Center for Animal Disease Model (CADMIS) 2015 —Frontiers of Immunology and Neurobiology—, Host defense mechanisms against Influenza virus infection. July 21, 2015, Tokyo
- 9) Masato Kubo RISP 2015: Cytokine regulation in T dependent and independent allergic responses. Jun 12-17, 2015, Yokohama
- 10) 久保允人 第80回サイトカイン・インターフェロン学会 アレルギー性気道炎症における自然免疫細胞 シンポジウム 2015年7月17日 東京
- 11) 久保允人 四国四大学皮膚科研究会 特別講演「皮膚の恒常と炎症の制御」2015年7月11日(土) ザクラウンパレス 新阪急高知 高知
- 12) 久保允人 第64回日本アレルギー学会 学術大会 シンポジウム19「免疫・アレルギー疾患の治療のための マスト細胞・好塩基球における新規分子標的」マスト細胞・好塩基球欠損マウスシステムの構築とサイトカイン産生能 2015年5月28日 グランドプリンスホテル新高輪 東京
- 13) 久保允人 第64回日本アレルギー学会学術大会 シンポジウム3「気道炎症の病態と自然免疫」転写因子E4BP4 と自然リンパ球によるアレルギー性気道炎症の制御 2015年5月26日 グランドプリンスホテル新高輪 東京
- 14) 久保 允人 SCIENCE in Shinagawa 特別講演「アレルギー性気道炎症における自然免疫細胞」2015年4月18日 ガーデンシティ品川 東京
- (図書)(計11件)
- 1) 久保允人: システムズバイオロジーを用いた皮膚恒常性制御機構の解明 先端医学社「炎症と免疫」vol. 25 no. 1, 3-10, 2017
- 2) 宮内浩典, 久保允人: 濾胞性ヘルパーT細胞に依存しないインフルエンザ中和抗体の産生メカニズム 「新着論文レビュー」ライフサイエンス統合データベースセンター 2016
- 3) 宮内浩典, 久保允人: インフルエンザウイルス感染に対する液性免疫 臨床免疫・アレルギー科 科学評論社 臨床免疫・アレルギー科, 66(3):256-260, 2016
- 4) 久保允人: マスト細胞・好塩基球欠損マウスシステムの構築とサイトカイン産生能 アレルギー65(7) 926-931, 2016
- 5) 久保允人: システインプロテアーゼによるアレルギー炎症 臨床免疫・アレルギー科 科学評論社 65(6) 557-562 2016年6月
- 6) 久保允人: 好塩基球と肥満細胞 類似性と役割の違い 臨床検査 医学書院 60巻89号 2016年8月号
- 7) 久保允人: Th2細胞による胚中心依存性IgE応答 臨床免疫・アレルギー科 科学評論社 65(4) 340-344 2016年4月
- 8) 久保允人: 免疫グロブリンの産生制御機構、研修ノートシリーズ「膠原病・リウマチ・アレルギー-研修ノート」株診断と治療社 61-65, 2016年4月
- 9) 久保允人: 好塩基球による免疫応答制御 感染・炎症・免疫 vol.45-2 63-67, 2015
- 10) 久保允人: 新たなアレルギー発症メカニズム ファルマシア vol.51, 6, 526-531, 2015
- 11) 久保允人: 新たなアレルギー発症メカニズム IL-33と好塩基球 医学のあゆみ 252巻 12号 1203-1207 2015
- (その他)
- メディア報道
- 1) 平成28年11月18日 科学新聞
- 2) 平成28年11月21日東京ビジネスアイ
- 3) 平成28年12月5日 薬事日報
- アウトリーチ活動 免疫ふしぎ未来(日本免疫学会)
- 受賞、等
- 平成27年度 東京理科大学優秀研究者特別賞

Meetings

第6回総括班会議

日時 平成27年3月24日(火)
場所 京都大学医学部



Meetings

第4回班会議・第7回総括班会議・第3回サマースクール

日時 平成27年7月1日(水)~7月4日(土)
場所 広島県広島市国際会議場・広島県廿日市市宮島



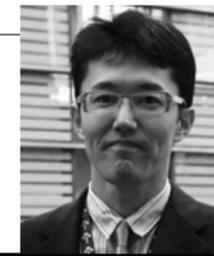
皮膚を場とした血管と免疫システム間のインターフェイスの理解

(平成27年度～平成28年度) Understanding the interface between blood and immune systems in the skin

梶島 健治 京都大学・医学研究科

研究代表者

KABASHIMA, Kenji
京都大学・医学研究科・教授
00362484



研究組織

連携研究者

本田 哲也 (HONDA Tetsuya)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 40452338

研究協力者

小野 さち子 (ONO Sachiko)
京都大学・医学研究科・大学院生

研究開始当初の背景

- 皮膚は重要な免疫臓器の1つであり、多様な免疫反応の誘導及び惹起反応が生じ、生体恒常性維持や病態形成に関与する。しかし、これらの免疫反応は皮膚単独では生じず、リンパ節や脾臓などの二次リンパ組織を介した反応であると考えられてきた。即ち、免疫反応起点としての皮膚の役割はほとんど解析されていない。
- 近年、tertiary lymphoid organ(三次リンパ組織)という概念が注目されている。三次リンパ組織は、様々な臓器で慢性炎症時などに誘導されるリンパ節様構造を指す。構造だけでなく、細胞分化や抗体産生など、機能面でもリンパ節に類似する。しかし、このような構造の皮膚での存在は明らかとなっていない。
- 我々は生体イメージング技術を活用した皮膚免疫研究を展開してきた。その過程で、皮膚免疫応答時に、免疫細胞が集積する場が後毛細血管周囲に誘導される事(誘導型皮膚リンパ様組織構築: inducible Skin-Associated Lymphoid Tissue; iSALTと命名)を世界で初めて見出した(Natsuaki et al. *Nat Immunol* 2014)。この際、iSALT内における皮膚血管が高内皮静脈(High Endothelial Venules:HEV)の性質を獲得していることを見いだした。HEVは一般にリンパ節に存在し、ナイーブT細胞、B細胞などの流入に重要である。皮膚には分化したエフェクターT細胞のみが浸潤すると考えられていたが、HEVが生じた皮膚にはナイーブT細胞、B細胞が存在することが確認された。即ち、皮膚にはナイーブT細胞を積極的に呼び込むシステムが存在し、皮膚が三次リンパ組織として、免疫反応の誘導、惹起を自己完結的に行う能力がある可能性が示唆された。

研究の目的

上記の背景から、本研究では、免疫反応起点としての皮膚の新たな役割に迫るため、皮膚でのHEV様血管形成メカニズムの解明と、その形成意義を解明することを目的とする。

皮膚が免疫反応起点としての役割を持つという発想は極めて独創的概念であり、証明されれば様々な皮膚疾患の病態解明・治療応用の可能性

を秘めている。

研究の方法

- 皮膚における HEV様血管の誘導条件の検討
HEV様血管を皮膚に誘導する刺激について、マウス耳介皮膚に種々の刺激 (MC903, DNFB, Oxazolone, Imiquimod)を加え、炎症を誘導し、その後の HEV形成を検討した。HEV様血管形成については、血管内皮細胞における HEVマーカー(PNAd)発現を flow cytometry 及び免疫染色にて評価した。
- 皮膚における HEV様血管の形成メカニズム (シグナル、責任細胞) についての検討
HEV様血管形成に必要な因子について検討するため、種々の候補因子の阻害剤、及び、その欠損マウスを用いて HEV形成に与える影響を検討した。候補因子として、リンパ節における HEV形成に重要であるリンホトキシンシグナルに着目した。細胞については、皮膚樹状細胞と、血管周囲のマクロファージについて検討した。それぞれ、CD11c-DTRマウス、CD169-DTR マウスを用いて検討した。
- 皮膚におけるHEV様血管の生理的意義の検討
HEV様血管形成後にナイーブT細胞が皮膚に浸潤する。このナイーブT細胞が皮膚でエフェクターT細胞に分化する可能性について、HEV様血管形成誘導後に抗原特異的ナイーブT細胞(OT-II細胞)を移入し皮膚にナイーブT細胞を集積後に、同部に特異的抗原(OVA)を投与し、皮膚におけるT細胞分化・増殖の有無を検討した。分裂については、移入T細胞を事前に染色(CTB)しておき、そのdilutionを見ることで評価した。

研究成果

- 皮膚におけるHEV様血管の誘導条件の検討
いずれの刺激による炎症においても、HEV様血管形成が認められたが、MC903誘導の炎症において最も効率的に HEV様血管が誘導されることが明らかとなった(図1, 2)。MC903 による皮膚炎はアトピー性皮膚炎

様の炎症である。ヒトアトピー性皮膚炎患者皮膚においても検討したところ、PNAd陽性のHEV様血管形成が認められた。(図3)

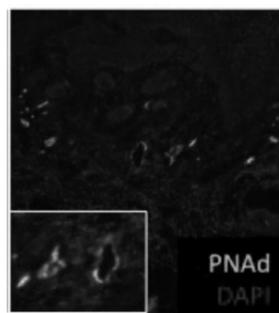


図1 MC903外用による皮膚でのHEV様血管誘導

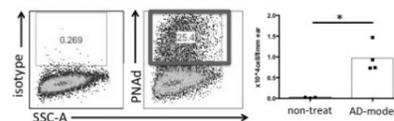


図2 MC903外用による皮膚でのHEV様血管誘導定量評価(フローサイトメトリー)

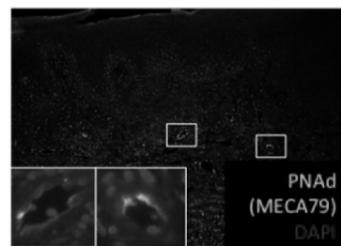


図3 アトピー性皮膚炎病変部におけるHEV様血管形成

- 皮膚におけるHEV様血管の形成メカニズム (シグナル、責任細胞) についての検討
リンホトキシンを誘導するとされるIL-7の欠損マウスを用いたところ、HEV様血管の形成が減弱した。またCD11c-DTRマウスにて樹

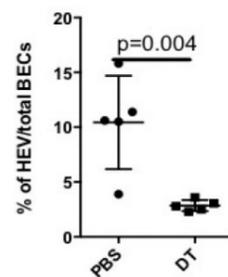


図4 皮膚樹状細胞除去によるHEV様血管誘導の減弱

状細胞を除去すると、同様にHEV様血管形成が低下した(図4)。血管周囲マクロファージの欠損はHEV様血管形成に影響しなかった。

- 皮膚におけるHEV様血管の生理的意義の検討
OVAの皮膚局所投与により、皮膚におけるナイーブT細胞の分裂が確認された。
- 総合考察
皮膚におけるHEV様血管が、アトピー性皮膚炎及びそのモデルマウスにおいて形成さ

れることが明らかとなった。さらに、皮膚樹状細胞がその誘導に必須であることを明らかとした。またIL-7を介したシグナルが皮膚でのHEV様血管の形成に重要であることが示唆された。ナイーブT細胞の分裂が皮膚でみられたことから、皮膚におけるT細胞分化が生じた可能性が示唆された。以上より、慢性炎症下においては皮膚で3次リンパ組織が形成され、エフェクターT細胞への分化・増殖を生じさせる起点となった可能性が示唆された。

主な発表論文等

(雑誌論文)(計3件)

- Murata, T., Honda, T., Egawa, G., Kitoh, A., Dainichi, T., Otsuka, A., Nakajima, S., Kore-Eda, S., Kaku, Y., Nakamizo, S., Endo, Y., Fujisawa, A., Miyachi, Y., Kabashima, K. Three-dimensional evaluation of subclinical extension of extramammary Paget's disease: Visualization of histological border and its comparison to clinical border, *Br J Dermatol*, 査読有, in press, 2016 DOI: 10.1111/bjd.15282
- Ono, S., Egawa, G., Kitoh, A., Dainichi, T., Otsuka, A., Nakajima, S., Honda, T., Kabashima, K. Local inflammation exacerbates cutaneous manifestations in a murine autoimmune pemphigus model, *J Allergy Clin Immunol*, 査読有, in press, 2017 DOI: 10.1016/j.jaci.2016.12.959
- Honda, T., Yamamoto, O., Sawada,

Y., Egawa, G., Kitoh, A., Otsuka, A., Dainichi, T., Nakajima, S., Miyachi, Y., Kabashima, K. Receptor-interacting Protein Kinase 3 Controls Keratinocyte Activation in a Necroptosis-independent Manner and Promotes Psoriatic Dermatitis in Mice *J Allergy Clin Immunol*, 査読有, in press, 2017 DOI: 10.1016/j.jaci.2017.02.027

リンパ組織ストローマとしての交感神経の機能

(平成27年度～平成28年度) Functional analysis of adrenergic nerves as lymphoid stroma cells

鈴木 一博 大阪大学・免疫学フロンティア研究センター

研究代表者

SUZUKI, Kazuhiro

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター
特任准教授(常勤)

60611035



研究開始当初の背景

神経系による免疫系の調節機構が存在することは古くから指摘されてきたが、そのメカニズムは今なお十分に理解されていない。我々はこれまでの研究において、交感神経から放出される主要な神経伝達物質であるノルアドレナリンが、リンパ球に発現するβ2アドレナリン受容体を介してケモカイン受容体CCR7およびCXCR4のシグナル伝達を増強することによって、リンパ球のリンパ節からの脱出を抑制することを明らかにした(*J. Exp. Med.* 211: 2583-2598, 2014)。しかし、交感神経がリンパ節のどこでどのようにリンパ球と相互作用するのか、その実態は明らかにされていなかった。また、リンパ球動態がこのような形で制御されることの生理的な意義は不明であった。

研究の目的

本研究では、交感神経をリンパ組織を構成するストローマとして捉え、交感神経によるリンパ球動態制御の実態と生理的意義を明らかにすることを目的とした。

研究の方法

(1) リンパ組織における交感神経の網羅的可視化

ノルアドレナリン産生細胞に蛍光タンパクを発現するマウスを4%PFAで灌流固定した後、リンパ組織を採取し、透明化試薬で透明化した。個々の透明化したリンパ組織を2光子励起蛍光顕微鏡で撮影し、3次元的に再構築した。

(2) 交感神経の除去

0.01%のアスコルビン酸を含む生理食塩水に溶解した6-hydroxydopamine (6-OHDA)を100 mg/kgの用量で2回、200 mg/kgの用量で1回、マウスに隔日投与し、その3日後に実験を行った。

(3) リンパ球のリンパ節からの脱出の評価

12時間の明暗サイクル(8時点灯、20時消灯)のもとで飼育されているマウスに9時あるいは21時にα4およびαLインテグリンの中和抗体(クローンPS/2およびM17/4、各100 μg)を投与することによってリンパ球のリン

パ節への進入を遮断し、その12時間後にリンパ節に残存するリンパ球の数を測定した。

(4) マウスの免疫

12時間の明暗サイクル(8時点灯、20時消灯)のもとで飼育されているマウスの耳の皮内に13時と1時にモデル抗原としてnitrophenyl(NP)を付加したニワトリのγグロブリンを免疫し、IgMおよびIgG1型のNP特異的な血清抗体価、および所属リンパ節において生成したNP特異的な胚中心B細胞の数を測定した。

研究成果

(1) リンパ節における交感神経の分布

ノルアドレナリン産生細胞に蛍光タンパクを発現するマウスのリンパ節を透明化し、2光子励起蛍光顕微鏡によるイメージングを用いて3次元的に再構築することによって、リンパ節における交感神経を網羅的に可視化した。その結果、交感神経が主にB細胞の集まるリンパ濾胞の周辺部分に投射していることがわかった。

研究期間内にはリンパ節における交感神経とリンパ球の相互作用の実態を明らかにするには至らなかったが、今後も2光子励起蛍光顕微鏡によるイメージングを用いた検討を継続する。

(2) 交感神経によるリンパ球動態制御の生理的意義

交感神経の活動性は1日のうちで身体の活動性が高まる時間帯に上昇するという日内変動を示す。我々は、マウスの交感神経の活動性が高まる夜間にリンパ球のリンパ節からの脱出が抑制される結果、リンパ節にお

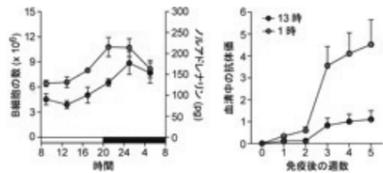


図 リンパ節におけるリンパ球数と適応免疫応答の日内変動
左: マウスのリンパ節におけるB細胞の数(赤)とノルアドレナリンの含有量(青)を1日を通して測定した。
右: 昼間(13時)と夜間(1時)にマウスを免疫し、血清中の抗体価(IgG1型)を測定した。

るリンパ球数が増加するのに伴って、リンパ節における適応免疫応答が昼間に比べて強く誘導されることを見出した(図)。さらに、マウスの体内で交感神経を除去する、あるいはリンパ節におけるリンパ球の出入りを遮断することによって、リンパ節における適応免疫応答の日内変動が消失した。これらの結果から、我々が見出した交感神経によるリンパ球動態の制御機構が免疫応答の日内変動に寄与していることが明らかになった(*J. Exp. Med.* 213: 2567-2574, 2016)。
多くの動物種にとって、交感神経の活動性が高まる時間帯は、身体の活動性の高まりとともに病原体に遭遇する危険性も増す時間帯である。そのような時間帯に、リンパ節でより強い免疫応答を起こす準備ができており、ここに交感神経によるリンパ球動態制御の生理的意義があると考えられる。

主な発表論文等

(雑誌論文)(計3件)

- 1) Suzuki, K. and Nakai, A. Control of lymphocyte trafficking and adaptive immunity by adrenergic nerves. *Clin. Exp. Neuroimmunol.* 8: 15-22, 2017. (査読有り)
DOI:10.1111/cen3.12376
- 2) Suzuki, K., Hayano, Y., Nakai, A., Furuta, F. and Noda, M. Adrenergic control of the adaptive immune response by diurnal lymphocyte recirculation through lymph nodes. *J. Exp. Med.* 213: 2567-2574, 2016. (査読有り)
DOI:10.1084/jem.20160723
- 3) Suzuki, K. and Nakai, A. Autonomic control of inflammation. *Clin. Exp. Neuroimmunol.* 7: 10-17, 2016. (査読有り)DOI:10.1111/cen3.12292
- 4) 鈴木 一博, 交感神経によるリンパ球動態と免疫応答の制御. 第3回六甲医学研究会, 淡路夢舞台国際会議場, 淡路市, 兵庫県, 2016年10月28日~29日.
- 5) 鈴木 一博, 交感神経によるリンパ球の動態制御とその免疫応答における意義. 千里ライフサイエンスセミナーK1, 千里ライフサイエンスセンター, 豊中市, 大阪府, 2016年5月31日.
- 6) 鈴木 一博, 交感神経によるリンパ球の動態制御. 膜生物学・医学学術講演会, 神戸大学大学院医学系研究科・医学部, 神戸市, 兵庫県, 2016年3月3日.
- 7) Suzuki, K. Adrenergic control of lymphocyte recirculation through lymph nodes. The 7th IFRcC Symposium "Immunology at the Forefront", Knowledge Theater at Grand Front Osaka, Osaka, Japan, January 21-22, 2016.
- 8) 鈴木 一博, 交感神経系によるリンパ球動態の制御メカニズム. 第38回日本分子生化学会年会, 神戸ポートアイランド, 神戸市, 兵庫県, 2015年12月1日~4日.
- 9) 鈴木 一博, 交感神経によるリンパ球動態と炎症の制御. 第43回日本臨床免疫学会総会, 神戸国際会議場, 神戸市, 兵庫県, 2015年10月22日~24日.
- 10) 鈴木 一博, β2アドレナリン受容体を介したリンパ球動態の制御機構. BioJapan 2015, パシフィコ横浜, 横浜市, 神奈川県, 2015年10月14日~16日.
- 11) Suzuki, K. Control of lymphocyte trafficking and inflammation through β2-adrenergic receptors. The 4th CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology, Jinling Guanyuan International Hotel, Suzhou, China, September 20-21, 2015.
- 12) 鈴木 一博, 交感神経系による免疫調節のメカニズム. GSK皮膚免疫カンファレンス, 大津プリンスホテル, 大津市, 滋賀県, 2015年7月26日.
- 13) 鈴木 一博, 交感神経による免疫調節の

(学会発表)(計14件)

- 1) Suzuki, K. Control of lymphocyte trafficking and adaptive immune responses by adrenergic nerves. The 6th NIF Winter School on Advanced Immunology, Grand Copthorne Waterfront Hotel, Singapore, January 22-26, 2017.
- 2) Suzuki, K. Control of lymphocyte trafficking by adrenergic nerves. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Laguna Garden Hotel, Ginowan, Okinawa, Japan, December 5-7, 2016.
- 3) Suzuki, K. Overview talk: neuro-immune interactions. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Laguna Garden Hotel, Ginowan, Okinawa, Japan, December 5-7, 2016.

メカニズム. 第17回免疫サマースクール, 淡路夢舞台国際会議場, 淡路市, 兵庫県, 2015年7月21日~24日.- 14) Suzuki, K. Control of lymphocyte dynamics by adrenergic nerves. NCNP Neuroimmunology International Symposium, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo, Japan, June 10, 2015.

(図書)(計1件)

- 1) Suzuki, K. Chapter 33: Adrenergic control of lymphocyte dynamics and inflammation. In Chronic Inflammation: Mechanisms and Regulation. M. Miyasaka and K. Takatsu, editors. Springer Japan, KK, Tokyo. 429-439, 2016.

(その他)

- ホームページ
- 1) 鈴木研究室ホームページ
URL:http://kazuhirosuzuki.com/
 - 2) 大阪大学免疫学フロンティア研究センターホームページ
http://www.ifrec.osaka-u.ac.jp/
- メディア報道
- 1) 「ワクチン接種は午前が効果的?」朝日新聞(11月1日朝刊)
http://www.asahi.com/articles/ASJBW66W5JBWPLBJ002.html
 - 2) 「ワクチン接種 午前がいい? 交感神経働き 免疫アップ」読売新聞(11月1日朝刊)
https://yomidr.yomiuri.co.jp/article/20161101-OYTET50013/
 - 3) 「ワクチン接種 午前中が効果的」共同通信(10月31日配信)
 - 4) 「ワクチン接種 午前が効果大? マウスで仕組み解明」時事通信(10月31日配信)
http://medical.jiji.com/news/2143
 - 5) 「ワクチンは午前中が効果的!？」読売テレビ かんさい情報ネットten

蛍光生体イメージング技術による免疫細胞の骨吸収制御機構の解明

(平成27年度～平成28年度) Intravital fluorescent imaging of immune cell-mediated bone resorption.

菊田 順一 大阪大学・医学系研究科

研究開始当初の背景

骨組織は、骨格の維持だけでなく、血液系幹細胞から多種多様な免疫細胞が生成される造血の場であり、免疫システム構築の場でもある。骨髓腔内では血管が縦横無尽に走行し、その血管壁には多くの開窓が存在するという特徴を持つ。骨髓腔で生成された免疫細胞は、この開窓を利用して骨髓腔と血管腔を出入りし、末梢に遊走する、もしくは末梢より骨髓に戻る事で、免疫系を維持していると考えられている。生体内で感染や炎症が生じると、多くの免疫細胞が骨髓腔から炎症部位に動員され、細胞遊走が活発になる。骨髓内の血管透過性によって制御された免疫系の細胞遊走システムは、生体の恒常性維持だけでなく、生体防御反応においても必要不可欠な機能である。精緻に制御された免疫システムの本質を理解するためには、骨髓腔内を流れる豊富な循環血流を保ったまま、生体骨組織内の免疫細胞動態を四次元で解析することが重要である。

本研究者はこれまで、蛍光イメージング技術を駆使して、生体内における免疫細胞の時空間的な挙動を明らかにしてきた。特に、単球・マクロファージ系由来の破骨細胞に注目して研究を行い、骨髓腔内で分化した単球系破骨前駆細胞が、一度血流を介して体内を循環した後再び骨髓腔に戻り、破骨細胞へと分化・成熟し得ることを明らかにした (Kotani, Kikuta, et al., *J Immunol*, 2013)。また、組織深部の観察が可能な二光子励起顕微鏡を用いて、従来生きてきたままでの観察が極めて困難であると考えられていた骨組織内部の細胞動態を可視化し、単球系破骨前駆細胞が骨表面へ遊走する分子メカニズムを解明した (Ishii, Kikuta, et al., *J Exp Med*, 2010; Kikuta, et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013)。さらに、骨表面上での生きて成熟破骨細胞による骨破壊過程をリアルタイムで観察することに成功し、成熟破骨細胞には骨吸収期だけでなく休止期も存在し両者を繰り返すこと、CD4陽性ヘルパーT細胞のサブセットの一つであるTh17細胞が休止期の破骨細胞に直接作用して骨吸収期へと移行させることにより、骨吸収を誘導することを明らかにした (Kikuta, et al., *J Clin Invest*, 2013)。

以上より、骨表面上で骨吸収を行う成熟破骨細胞数は、血管腔と骨髓腔を出入りする単球系破骨前駆細胞の数を調節することによって制御

されていると考えられる。しかしながら、血管透過性ゲートによる細胞の動態制御機構についてはよく分かっていない。

研究の目的

骨髓腔内の血管透過性の制御は、全身の免疫システムを維持する上で重要な役割を担っているが、従来の研究手法では解析が困難であった。本研究では、これまで技術を確立してきた骨の蛍光生体イメージング技術をさらに発展させ、骨髓腔内の血管透過性制御のダイナミクスを解析し、それに関わる分子機構を明らかにする。

研究の方法

本研究では、野生型マウス (C57BL6/J) およびLysM遺伝子のプロモーターの下流にEGFPを発現させたマウス (LysM-EGFP) を使用した。マウスを吸入麻酔下で管理しながら、頭頂部の皮膚を切開し、頭頂骨を露出させた後、顕微鏡用のステージにマウス頭蓋を固定し、生体骨組織内部を二光子励起顕微鏡で観察した。

骨髓腔内の血管透過性を定量的に評価するために、イメージング実験中、フルオレセインイソチシアネート (FITC) を標識した複数の分子量のデキストランを静脈内投与した。実験後、画像解析ソフトウェア (NIS-Elements) を用いて、イメージング画像データから、FITC標識デキストランの蛍光強度の比 (= 骨髓腔内の平均蛍光強度 / 血管腔内の平均蛍光強度) を算出し、骨髓腔内における血管透過性を定量化した。さらに、マウス耳介皮膚においても同様の生体二光子励起イメージング実験を行い、皮膚における血管透過性を定量評価した。

研究成果

(1) 生体イメージングによる骨髓血管透過性の評価

野生型マウスの生体骨組織内部を二光子励起顕微鏡で観察中に、FITC標識デキストランを静脈内投与し、血管透過性を検討した。その結果、すべての分子量のデキストラン (40, 70, 150, 250, 500, 2000 kDa) が血流を通して速やかに観察部位に到達し、その一部が骨髓腔内へ漏出する様子が観察

された。一方、皮膚においては、40 kDaのデキストランは血管腔から末梢組織への漏出が認められたが、70 kDa以上のデキストランは血管腔から末梢組織への漏出が認められなかった。画像解析ソフトウェアを用いて血管透過性を定量化した結果、骨髓腔内の血管透過性は、皮膚の血管透過性と比較して顕著に高いということが明らかとなった。

(2) 骨髓血管透過性の制御機構の解析

次に、骨髓腔内の血管透過性を制御する因子について検討を行った。骨の代謝状態を制御する主要なサイトカインであるreceptor activator of NFκB ligand (RANKL) は破骨細胞の分化誘導因子としてよく知られているが、最近、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた *in vitro* の実験系で、RANKLが内皮細胞に作用してNOを産生させ血管透過性を亢進させることが報告されている。しかしながら、これまで生きた組織での実証は得られていなかった。そこで、RANKLの骨髓血管透過性に対する効果を*in vivo* で検討するために、FITC標識デキストランを投与したマウスにRANKL (1 mg/kg) を急速に静脈内投与し、骨髓腔内の血管透過性の変化を検討した。その結果、RANKL投与直後より、血管腔から骨髓腔へのデキストランの漏出が増加したことから、RANKLが生体内において骨髓血管透過性を亢進させる働きを持つことが示唆された。さらに、NO 阻害剤 (NG-monomethyl-L-Arginine, 50 mg/kg) で治療を行ったマウスにRANKL (1 mg/kg) を急速投与した結果、未治療群と比較して、RANKLによる骨髓血管透過性の亢進が抑制された。以上の結果から、生体内の骨髓腔において、RANKLによる血管透過性亢進はNO依存的事であることが示唆された。

骨組織内においてRANKLを発現する細胞には、新しい骨を形成する骨芽細胞、およびこれが終末分化した骨細胞等が挙げられるが、骨髓血管透過性制御に関わるRANKL発現細胞の同定に関しては今後の検討課題である。

(3) 骨粗鬆症における骨髓血管透過性の解析

卵巣を摘出し1か月後に骨粗鬆症を誘導したマウスを用いて、骨髓腔内の血管透過性の変化を検討した結果、骨粗鬆症群では、卵巣を摘出していないコントロール群と比較し

て、血管腔から骨髓腔へのデキストランの漏出の増加が認められた。骨粗鬆症の病態では、骨髓腔内のRANKLの発現量が増加することで、破骨細胞による骨吸収が促進すると考えられているが、骨髓血管透過性も亢進することが明らかとなった。

(4) 骨髓血管透過性ゲートにおける免疫細胞の動態解析

FITC標識デキストランを用いて、血管腔から骨髓腔へのデキストランの漏出を定量化することで、骨髓腔内の血管透過性の評価を行うことができた。最後に、骨髓腔で産生された免疫・血液細胞が有窓の血管壁をどのように通過するのかを解析するために、LysM-EGFPマウスの生体骨組織内を二光子励起顕微鏡で観察した。その結果、GFP

陽性細胞が骨髓腔と血管腔を出入りする様子をリアルタイムで可視化することに成功した。また、骨髓腔内の血管壁には多くの開窓が存在すると考えられているが、細胞が骨髓腔と血管腔を出入りする部位は一部に局限していた。さらに、骨粗鬆症群では、コントロール群と比較して、細胞が出入りする際の血管内皮細胞の細胞間隙が増大していることが明らかとなった。

骨粗鬆症の病態では、体内を循環する単球系破骨前駆細胞が成熟破骨細胞に分化する割合が増加することで、骨吸収が促進することを過去に報告しているが、今回の研究結果より、RANKLの発現増加による血管透過性の亢進が、骨髓血管透過性ゲートにおける細胞の出入りの制御に寄与している可能性が示唆された。



研究代表者

KIKUTA, Junichi

大阪大学・医学系研究科・助教

60710069

まとめ

骨の蛍光生体イメージング技術を駆使して、循環血流を維持したまま、骨髓腔内の血管透過性ゲートを四次元で可視化し動態解析を行った。その結果、骨髓腔内の血管透過性が皮膚の血管透過性と比較して顕著に高いこと、RANKLが骨髓血管透過性を制御し得ること、さらに骨粗鬆症では骨髓血管透過性が亢進することが明らかとなった。本研究成果は今後、骨吸収制御機構だけでなく、免疫系の細胞遊走システムが担う生体恒常性維持機構の解明にもつながると考えられる。

| 主な発表論文等 | (学会発表) (計19件) | |
|--|--|---|
| (雑誌論文) (計4件) [全て査読有] | | |
| 1) Maeda H, Kowada T, Kikuta J, Furuya M, Shirazaki M, Mizukami S, Ishii M, Kikuchi K. Real-time intravital imaging of pH variation associated with osteoclast activity. <i>Nat Chem Biol</i> , 12(8):579-85, 2016. DOI: 10.1038/nchembio.2096 | 1) 菊田順一: 蛍光生体イメージングで解く骨髄・免疫細胞の動的ネットワーク、第122回日本解剖学会総会・学術集会、2017年3月28日、長崎大学坂本キャンパス、長崎 | 10) 菊田順一: 破骨細胞動態イメージング、第60回日本リウマチ学会総会・学術集会、2016年4月21日、バシフィコ横浜、神奈川県 |
| 2) Yoshikawa S, Usami T, Kikuta J, Ishii M, Sasano T, Sugiyama K, Furukawa T, Nakasho E, Takayanagi H, Tedder TF, Karasuyama H, Miyawaki A, Adachi T. Intravital imaging of Ca(2+) signals in lymphocytes of Ca(2+) biosensor transgenic mice: indication of autoimmune diseases before the pathological onset. <i>Sci Rep</i> , 6:18738, 2016. DOI: 10.1038/srep18738 | 3) 菊田順一: 蛍光生体イメージングで解く破骨細胞・骨芽細胞のクロストーク、第31回日本整形外科学会基礎学術集会、2016年10月13日、福岡国際会議場、福岡 | 11) 菊田順一: 骨の蛍光生体イメージング～骨代謝・免疫研究の新展開～、第23回OMMC Talk with the expert、2016年4月15日、独立行政法人国立病院機構大阪南医療センター、大阪 |
| 3) Nevius E, Pinho F, Dhodapkar M, Jin H, Nadrah K, Horowitz MC, Kikuta J, Ishii M, Pereira JP. Oxysterols and EBI2 promote osteoclast precursor migration to bone surfaces and regulate bone mass homeostasis. <i>J Exp Med</i> , 212(11):1931-46, 2015. DOI: 10.1084/jem.20150088 | 4) 菊田順一: 骨関節破壊のイメージング、第44回日本臨床免疫学会総会、2016年9月8日、京王プラザホテル、東京 | 12) 菊田順一: 骨の蛍光生体イメージング技術による病態解析と薬効評価、第10回京阪神バイオメディクス研究会、2016年3月18日、プリーゼプラザ、大阪 |
| 4) Sano H, Kikuta J, Furuya M, Kondo N, Endo N, Ishii M. Intravital bone imaging by two-photon excitation microscopy to identify osteocytic osteolysis in vivo. <i>Bone</i> , 74:134-9, 2015. DOI: 10.1016/j.bone.2015.01.013 | 5) 菊田順一: 菊地和也、石井優: pH応答性蛍光プローブによる破骨細胞の骨吸収制御機構の解明、第2回Neo Vitamin D Workshop 学術集会、2016年8月26日、TKPガーデンシティ品川、東京 | 13) 菊田順一: 蛍光生体イメージングでみる骨の炎症・再生、第15回日本再生医療学会総会、2016年3月18日、大阪国際会議場、大阪 |
| | 6) 菊田順一: 蛍光生体イメージングで解く免疫・血液細胞の動的ネットワーク、第26回日本サイトメトリー学会、2016年7月24日、九州大学医学部 百年講堂、福岡 | 14) 菊田順一: 血管透過性ゲートによる免疫・炎症細胞の動態制御機構、第6回産と学をつなぐSENRIの会、2016年1月13日、千里ライフサイエンスセンター、大阪 |
| | 7) 菊田順一: 骨免疫イメージング、第34回日本骨代謝学会学術集会、2016年7月21日、大阪国際会議場、大阪 | 15) 菊田順一、石井優: RANKL-mediated vascular permeability in bone marrow analyzed by intravital two-photon microscopy. 第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月19日、札幌コンベンションセンター、北海道 |
| | 8) 菊田順一: 生体二光子励起イメージングによる骨髓血管透過性の制御機構解明とDDS研究への応用、第32回日本DDS学会学術集会、2016年7月1日、グランシップ (静岡県コンベンションアーツセンター)、静岡 | 16) 菊田順一: 丸ごとのイメージング～免疫細胞の動く世界の解析～、第49回日本実験動物技術者協会総会、2015年10月10日、グランシップ (静岡県コンベンションアーツセンター)、静岡 |
| | 9) 菊田順一: 骨の炎症・再生の生体イメー | 17) 菊田順一、石井優: ビタミンDによる骨吸収抑制メカニズムの解明、第1回Neo Vitamin D Workshop学術集会、2015 |
| | | 年8月28日、大津プリンスホテル コンベンションホール、滋賀 |
| | | 18) 菊田順一: In vivoバイオイメージングを用いた骨粗鬆症治療薬の薬効評価、第24回硬組織再生生物学会学術大会・総会、2015年8月22日、大阪歯科大学創立100周年記念館、大阪 |
| | | 19) 菊田順一、石井優: Dynamic analysis of short-term effects of bisphosphonates by using intravital two-photon microscopy. 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015年4月23日、名古屋国際会議場、愛知 |
| | | (図書) (計19件) |
| | | 1) 菊田順一、古家雅之、石井優. 生体骨イメージングで捉える骨代謝. 骨粗鬆症治療 16(1): 52-57 2017. |
| | | 2) 菊田順一、松浦良信、石井優. 骨代謝と慢性炎症. 最新医学 71(11): 2257-2262, 2016. |
| | | 3) 菊田順一、石井優. 破骨細胞. 医学のあゆみ 259(5):446-452, 2016. |
| | | 4) 菊田順一、松浦良信、岡田良香、柳澤篤、石井優. 膠原病・アレルギー疾患の可視化. 別冊IBO Clinica 5(2):1-4, 2016. |
| | | 5) 菊田順一、古家雅之、石井優. 骨芽細胞と破骨細胞の生体イメージング観察. THE BONE 30(2):141-144, 2016. |
| | | 6) 菊田順一、石井優. 生体イメージングで捉える免疫炎症・骨破壊の動的な実体. 日本臨床免疫学会誌 39(2):124-129, 2016. |
| | | 7) 菊田順一、石井優. 慢性炎症時のマクロファージ動態のイメージング解析. 最新医学 71(5):1026-1030, 2016. |
| | | 8) 菊田順一、石井優. 生体イメージング. 骨 |

粗鬆症治療 15(1):59-63, 2016.

9) 菊田順一, 石井優. 免疫細胞の生体イメージング. 医学のあゆみ 257(6):727-731, 2016.

10) 菊田順一, 石井優. 血管生物学におけるイメージング技術. 血管医学 17(1):41-45, 2016.

11) Kikuta J, Nevius E, Ishii M, Pereira JP. Trafficking of Osteoclast Precursors. Osteoimmunology (Second Edition), Pages 25-40, 2015.

12) 菊田順一, 石井優. ビタミンDの骨吸収抑制機序. 臨床整形外科 50(11):1114-1117, 2015.

13) 菊田順一, 石井優. In vivoイメージング: 骨関節疾患評価の新たな取り組み. Rheumatology Clinical Research 4(3):180-185, 2015.

14) 菊田順一, 水野紘樹, 古家雅之, 石井優. 骨のライブイメージング最前線. O.I. v.e. -骨代謝と生活習慣病の連関- 5(3):208-211, 2015.

15) 菊田順一, 石井優. 多光子励起顕微鏡を用いた骨組織細胞動態イメージング. 臨床免疫・アレルギー科 64(2):194-199, 2015.

16) 菊田順一, 石井優. S1P. 骨粗鬆症治療 14(2):151-154, 2015.

17) 菊田順一, 石井優. 骨の生体イメージング. 骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典 316-318, 2015.

18) 菊田順一, 石井優. 骨の4Dイメージング. O.I.v.e. -骨代謝と生活習慣病の連関- 5(2):64-67, 2015.

19) 菊田順一, 石井優. 破骨細胞の生体イメージング. Clinical Calcium 25(6):815-822, 2015.

(その他)
受賞歴
1) 菊田順一: 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会 国際ワークショップ賞, 2015年4月23日

Meetings

第5回徳島大学国際免疫学シンポジウム (共催)

日時 平成28年3月3日(木)~4日(金)

場所 徳島大学日亜メディカルホール

Thursday 3rd March

13:00-13:10 Welcome remarks by Sumihare Noji
Opening remarks by Yousuke Takahama

Session 1. Thymus development (Chaired by Yousuke Takahama)

13:10-13:40 Graham Anderson (Birmingham)
Regulation of T-cell development by thymic microenvironments
Yoko Hamazaki (Kyoto)
Medullary thymic epithelial stem cells ensuring lifelong T-cell tolerance
14:10-14:25 Junko Morimoto (Tokushima)
Novel Aire-dependent tolerogenic lineage(s) of medullary thymic epithelial cells expressing Ly6 family protein
14:25-14:40 Izumi Ohigashi (Tokushima)
A Foxn1-binding cis-regulatory element for optimal T cell generation

Group photo & coffee

Session 2. Immune regulation (Chaired by Koji Yasutomo)

15:10-15:40 Tomohiro Kurosaki (Osaka)
Selection mechanisms of germinal center cells into memory compartment
Yoichi Maekawa (Gifu)
Notch controls the maintenance of memory CD4 T cells in health and disease
16:10-16:25 Takumi Maruhashi (Tokushima)
Context-dependent inhibition of antigen-specific T cell activation by LAG-3
16:25-16:40 Xuesong Qian (Chiba)
ICOS-ligand B7-H2, expressed on human type II alveolar epithelial cells, plays a role in pulmonary defense

Break

Session 3. Human immunity (Chaired by Mitsuru Matsumoto)

17:00-17:30 Christoph Klein (Munich)
Human immunity - learning from rare patients with primary immunodeficiency disorders
17:30-17:50 Yoshiyuki Minegishi (Tokushima)
Molecular pathogenesis of hyper-IgE syndrome

Isuien dinner

Hosted by Sumihare Noji
Chaired by Naozumi Ishimaru

Friday 4th March

Session 4. Gut and nutrition (Chaired by Tohru Sakai)

9:00-9:30 Hiroshi Ohno (Yokohama)
Function and differentiation of intestinal epithelial M cells
9:30-10:00 Satoshi Uematsu (Chiba)
Acute and chronic radiation injury in small intestine
10:00-10:15 Tohru Sakai (Tokushima)
Sudachitin, polymethoxylated flavone from Citrus sudachi, regulates antigen-specific immune responses
10:15-10:30 Jun Nishida (Tokushima)
Regulation of Peyer's patch by PTPRK

Coffee

Session 5. Immune homeostasis (Chaired by Taku Okazaki)

10:50-11:20 Masahiro Ono (London)
Time-dependent dynamics of regulatory T cell differentiation in vivo
11:20-11:50 Toshiyuki Fukada (Tokushima)
Zinc signaling: An emerging player for epithelial tissue homeostasis
11:50-12:10 Tetsuo Yamazaki (Tokushima)
ER as a potential therapeutic target for protein aggregation disease
12:10-12:25 Kou Motani (Tokushima)
Cyclic GMP-AMP-dependent and -independent cytokine induction by self-DNA

Lunch with students (12:30-13:30)

Organized by Yasusei Kudo & Kensuke Takada

Session 6. Disease regulation (Chaired by Tetsuo Yamazaki)

13:30-14:00 Norimitsu Kadowaki (Kagawa)
Combination of targeted therapy and immunotherapy for cancer
14:00-14:15 Takeshi Wada (Tokushima)
Exacerbation of oxazolone-induced atopic dermatitis in mouse model of hyper-IgE syndrome
14:15-14:30 Hitoshi Nishijima (Tokushima)
Augmented expression of the autoimmune regulator (AIRE) induces paradoxical development of polymyositis-like autoimmunity in mice
14:30-14:45 Tomoyuki Kondo (Tokushima)
Acceleration of tumor growth due to dysfunction in M1 macrophages and enhanced angiogenesis in an animal model of autoimmune disease

The Fifth Bizan Immunology Symposium at University of Tokushima

Immune System Development, Deviation, and Regulation

3rd (Thu) - 4th (Fri) March 2016
Nichia Medical Hall, Kuramoto Campus
University of Tokushima

Invited speakers
Graham Anderson (Birmingham)
Mary Ellen Conley (New York)
Toshiyuki Fukada (Tokushima)
Yoko Hamazaki (Kyoto)
Norimitsu Kadowaki (Kagawa)
Christoph Klein (Munich)
Tomohiro Kurosaki (Osaka)
Hiroshi Ohno (Yokohama)
Satoshi Uematsu (Chiba)

Abstracts for oral or poster presentation are open for submission. The deadline is 31st December 2015. Travel bursary up to 50K JPY per abstract application is available for up to 10 young researchers including graduate students. Please notify the application at abstract submission. Successful applicants will be notified in the middle of January 2016.

登録申込の切 2015年12月31日
10名を上限とする若手研究者に5万円を上限とする旅費支援を交付します。登録申込の切に併せて申請申込を明記してください。選考結果は1月中旬に通知します。

Free Entry For All
入場 無料 **来聴 歓迎**

Contact
Immunology Program at the University of Tokushima (IPUT)
3-18-15 Kuramoto, Tokushima 770-8503, Japan
Phone: +81-88-632-9452 | E-mail: takahama@genome.tokushima-u.ac.jp

主催: 徳島大学革新的特許プロジェクト「免疫システム」研究プラットフォーム
共催: 徳島大学医学部免疫学講座・徳島大学大学院生命科学研究科免疫学講座・徳島大学大学院生命科学研究科免疫学講座・徳島大学大学院生命科学研究科免疫学講座

IPUT



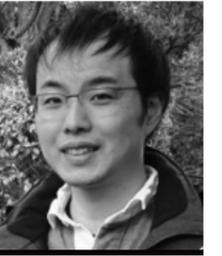
パイエル板濾胞随伴上皮 (FAE) の機能制御を行う微小環境の解明

(平成27年度～平成28年度) Identification of the microenvironment required for the maintenance of Peyer's patch FAE.

金谷 高史 国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター

研究代表者

KANAYA, Takashi
国立研究開発法人理化学研究所・
統合生命医科学研究センター・研究員
20553829



研究開始当初の背景

パイエル板は小腸に分布する代表的な腸管関連組織であり、腸管内に侵入した抗原に対して特異的な免疫応答を誘導する役割を担う。パイエル板への抗原の取り込みは、粘膜面を覆う濾胞随伴上皮細胞層 (follicle-associated epithelium: FAE) に分布するM細胞によって行われる。近年の研究によりM細胞に発現する分子群が同定され、M細胞の機能や分化を制御する仕組みが明らかになってきた。FAEはM細胞を含む以外に、粘液を産生する杯細胞が少ないことやIgA抗体の分泌に必要とされるplgRの発現が抑えられていることが知られているが、その性状は十分に理解されていない。このFAEの性状は直下のsub-epithelial dome (SED) 領域に形成される微小環境によって規定されたと考えられているがその詳細なメカニズムは明らかにされていない。

研究の目的

申請者はFAEに近接するパイエル板のSED領域においてインターロイキン (IL) -22結合タンパク質 (BP) が高発現することを見出した。IL-22BPは上皮細胞で発現するIL-22受容体と競合してIL-22へ結合し、IL-22シグナルを阻害する。よってSED領域に発現するIL-22BPは、FAEにおけるIL-22シグナルが恒常的に抑制することが示唆される。

本研究の準備段階においてマウスへIL-22を投与し、腸管上皮細胞におけるIL-22シグナルの活性化を調べたところ、当初の推測通りFAEにおいてIL-22シグナルが阻害されることが観察された。この結果を踏まえ、本研究ではパイエル板SED領域のIL-22BP産生細胞の同定、およびIL-22BPによって規定されるFAEの性状とその腸管恒常性維持における役割を明らかにすることを目的とした。

研究の方法

(1) IL-22BP産生細胞の同定

パイエル板から細胞を採取し、セルソーターにより各種細胞を分離し、IL-22BP産生する細胞種の同定を行った。

(2) IL-22BP欠損マウスFAEの性状解析

本研究室で作製されたIL-22BP欠損マウスよりFAEを採取し、遺伝子発現を解析した。具体的にはM細胞関連遺伝子、FAEマーカー遺伝子およびIL-22シグナル標的遺伝子の発現を解析した。

(3) IL-22BP欠損マウスの腸管恒常性維持における役割の解析

FAEの性状変化はパイエル板への細菌抗原の取り込みに大きな影響を与えることが予測される。そこでM細胞を介してパイエル板へ取り込まれる*Salmonella typhimurium* やパイエル板内に常在する*Alcaligenes* spp.のパイエル板への取り込みがIL-22BP欠損マウスにおいて変化するか解析した。

研究成果

(1) パイエル板におけるIL-22BP産生細胞の同定

免疫染色によってIL-22BP産生細胞はパイエル板のSED領域に集中していることが分かった。SED領域には樹状細胞が多く分布すること、およびIL-22BP産生細胞が樹状細胞であることが過去に報告されていることから、パイエル板においてもSEDに分布する樹状細胞がIL-22BPを産生することが推測された。そこでパイエル板よりCD11c^{high}の樹状細胞を分離し、各サブセットにおけるIL-22bp mRNAの発現を解析したところ、CD11b+CD8a-樹状細胞がパイエル板における主要なIL-22BP産生細胞であることが明らかとなった。腸間膜リンパ節や脾臓にもCD11b+CD8a-樹状細胞は存在するが、これらの細胞はほとんどIL-22bp mRNAを発現しないことから、パイエル板SED領域における微小環境がIL-22BPの発現に必須であることが示唆された。

(2) IL-22BP欠損FAEではIL-22シグナル標的遺伝子の発現が亢進する

IL-22BP欠損マウスではFAEにおいてもIL-22シグナルが阻害されない。実際にIL-22をIL-22BP欠損マウスへ投与するとFAEにおいてもIL-22シグナルの活性化が確認された。そこで生理条件下においてIL-22BP欠損マウスのFAEにどのような性状変化が引き起こされるのか検証した。IL-22BP欠損マウスおよび陽性対照マウスよりFAEを採取し、

遺伝子発現を解析したところ、IL-22BP欠損マウスではIL-22シグナル標的遺伝子であるReg3g、Muc3やFut2の発現が有意に上昇することが明らかとなった。一方でM細胞関連遺伝子やFAEマーカー遺伝子の発現には大きな変化は見られなかった。またRNAseq解析でもIL-22標的遺伝子以外の遺伝子の発現変動は殆ど見られなかった。

(3) IL-22BP欠損マウスではパイエル板への細菌抗原の取り込みが減少する

IL-22標的遺伝子であるMuc3は粘液産生を、Reg3gは抗菌タンパク質を調節する遺伝子であり、これらは上皮細胞への細菌抗原の接着を妨げると考えられる。またFut2は上皮細胞表面のフコシル化を調節する。FAEのフコシル化をUEA-IL렉チン染色を用いて解析したところ、IL-22BP欠損マウスのFAEにおいて顕著なフコシル化が観察された。腸管上皮細胞表面のフコシル化は、近年*S. typhimurium*の感染に対して防御的に作用することが報告されている。申請者はFAEのフコシル化がM細胞からの*S. typhimurium*の取り込みを阻害すると考えた。*S. typhimurium*を経口的に投与し、パイエル板へ取り込まれる量を測定したところ、予想通りIL-22BP欠損マウスにおいて*S. typhimurium*の取り込みが減少する傾向が見られた。加えてパイエル板内に常在する*Alcaligenes* spp.の数がIL-22BP欠損マウスにおいて減少することが確認された。

これらの結果により、IL-22BP欠損はFAEにおいておけるフコシル化、粘液および抗菌タンパク質産生の増強を引き起こすことが明らかとなった。そしてこのようなFAEの性状変化はパイエル板への細菌抗原の取り込みを妨げる。本研究によりIL-22BPがFAEの性状を適切に調節することにより、M細胞を介した細菌抗原のパイエル板が円滑に行われる環境を整えていることがわかった。

(4) まとめと今後の展望

本研究の成果によりパイエル板への細菌抗原の取り込みは、M細胞の機能だけではなくFAEの性状が適切に保たれることによって円滑に行われることが明らかとなった。この知見はパイエル板への効率的なワクチン抗原のデリバリーシステムへの応用されることも期待される。本研究領域のテーマである「免疫の場」を

形成する諸因子としてIL-22BPを産生する樹状細胞の同定は非常に有意義な知見であるといえる。上述の通り、同じリンパ節に分布するCD11b+CD8a-樹状細胞の中でもパイエル板のSED領域に分布するCD11b+CD8a-樹状細胞のみIL-22BPを産生する能力を獲得していた。これはSED領域に形成される微小環境がIL-22BPの発現に不可欠であることを示唆する。2009年にSED領域に分布するストロマ細胞が産生するRANKLがFAEのM細胞分化に必須であることが報告されている。本研究によってFAEやストロマ細胞に加え、樹状細胞がSED領域の微小環境を形成する重要な因

子であることが明らかとなった。他にも樹状細胞-ストロマ細胞の相互作用、またM細胞によって取り込まれる細菌抗原の刺激など様々な事象がSED領域の微小環境形成に寄与していると考えられる。これらの分子メカニズムを解明が今後の課題である。

まとめ

パイエル板は粘膜側を覆う上皮細胞層であるFAEに分布するM細胞によって細菌抗原を取り込む。本研究ではFAEに近接するSED領域においてIL-22BPが発現することを見出した。IL-

主な発表論文等

(雑誌論文) (計2件)

- 1) Toshi Jinnohara*, Takashi Kanaya*, Koji Hase, Sayuri Sakakibara, Tamotsu Kato, Naoko Tachibana, Takaharu Sasaki, Yusuke Hashimoto, Toshiro Sato, Hiroshi Watarai, Jun Kunisawa, Naoko Shibata, Ifor R Williams, Hiroshi Kiyono, and Hiroshi Ohno
IL-22BP dictates characteristics of Peyer's patch follicle-associated epithelium for antigen uptake. *Journal of Experimental Medicine*, 2017; 214(6):1607-1618. doi: 10.1084/jem.20160770. *equal contribution. 査読有
- 2) Takashi Kanaya, Sayuri Sakakibara, Toshi Jinnohara, Masami Hachisuka, Naoko Tachibana, Shinya Hidano, Takashi Kobayashi, Shunsuke Kimura, Toshihiko Iwanaga, Tomoo Nakagawa, Tatsuro Katsuno, Naoya Kato, Taishin Akiyama, Toshiro Sato, Ifor R Williams, Hiroshi Ohno.
Development of intestinal M cells and follicle-associated epithelium is regulated by TRAF6-mediated NF- κ B signaling. *Journal of Experimental Medicine*, 2018; doi: 10.1084/jem.20160659. [Epub ahead of print].

査読有

(学会発表) (計1件)

- 1) 金谷高史、榊原小百合、大野博司、腸管M細胞におけるNF- κ Bの役割、第68回細胞生物学会 (ポスター発表)

(図書) (計2件)

- 1) Kendle Maslowski, 金谷高史、大野博司、感染および腫瘍に対する腸管上皮細胞の自然免疫機構、臨床免疫・アレルギー科、Vol.66 No.3 p294-300.
- 2) 金谷高史、大野博司、腸管上皮細胞と生体防御、実験医学増刊 生体バリア 粘膜や皮膚を舞台とした健康と疾患のダイナミクス、Vol.25-No.7 2017 p1056-1060.

(その他)

ホームページ
http://www.riken.jp/research/labs/ims/intest_ecosys/

Fat-associated lymphoid clusterの発生と機能解析

(平成27年度～平成28年度) **Generation and function of Fat-associated lymphoid cluster**

茂呂 和世 国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター

研究代表者

MORO, Kazuyo

国立研究開発法人理化学研究所・
統合生命医科学研究センター・
チームリーダー

90468489



研究開始当初の背景

Fat-associated lymphoid cluster (FALC)は、我々が新規に発見した脂肪組織内のリンパ組織である。FALCは様々な脂肪組織に観察され、IL-33に反応して大量の2型サイトカインを産生する自然リンパ球(Innate lymphoid cell: ILC)であるナチュラルヘルパー(Natural Helper: NH)細胞を含む多様な免疫細胞とストローマ細胞から構築される。リンパ節とは異なり、外周に皮膜構造を持たず、FALC内の細胞は周囲の脂肪細胞と直接接触し、また、加齢、肥満、炎症によってその数と容積を増すことから、FALC周囲の脂肪組織やFALC内のストローマ細胞とFALC内の免疫細胞は互いに相互作用を持つものと予想されたが、機能についてはほとんどわかっていなかった。申請者らは新しい自然免疫系のリンパ球として発見したNH細胞に関する研究に取り組んできたが、そもそもNH細胞はFALCの発見に伴って見いだされた。リンパ節を欠損するaly/alyマウスやLTI細胞を欠損するRORγ欠損マウスでもこの集積は存在することから、リンパ節とは異なる新規のリンパ組織であると考え、脂肪関連リンパ組織FALCと名付けるに至った。

FALCがどのようにして形成されるのかについては明らかになっていなかったが、FALCと加齢の関係を調べるために4～40週齢のマウス腸間膜からパラフィンブロックを作製しFALCの数と大きさを調べたところ、明瞭なFALC構造は4週齢までは見られず、その後加齢に伴って数、大きさ共に増加し、直径0.5mmを超えるような大きなFALCは36週例以降に出現することが明らかになった。

全てのILCに共通の前駆細胞は胎児肝臓または骨髄のId2+PLZFhigh細胞(ILCP: Innate lymphoid cell progenitor)として報告されていたが、骨髄が形成されていない胎児でもNH細胞は腸間膜で検出されることから、Id2+PLZF+細胞からNH細胞への最終的な分化は胎児肝臓もしくは脂肪組織などの抹消で起こると予想した。

研究の目的

本研究ではFALCの形成機構を明らかにし、NH細胞の最終分化の場として機能するかを調べることでこれまで知られてこなかったFALCの役割を明らかにすることを目的とする。FALCの

形態学的な特徴、ストローマ細胞の種類や分布についても明らかにする。

研究の方法

TSt4-DLL1細胞とCLPの共培養実験においてIL-7濃度とNotchシグナルの発現をかえることにより、T細胞、NH細胞を含むすべてのリンパ球分化に最適なIL-7濃度、Notchシグナルの長さ、強さを調べた。また胸腺上皮細胞におけるDLLを欠損させたマウスでT細胞とNH細胞の分化にどのような影響が出るかを調べた。

NH細胞の分化の時期と場を探るために、胎生期から生体まで様々な組織におけるNH細胞の存在を確認した。この実験では、NH細胞だけでなくNH細胞前駆細胞がいつからどこに存在するかについても着目した。NH細胞の分化の場でのような細胞がNH細胞分化を支持するかを調べるために、ストローマ細胞に着目した実験を行い、NH細胞分化を支持したストローマ細胞の表現型および遺伝子発現を精査した。

研究成果

脂肪組織のFALCにおいてNH細胞が分化する可能性を探るために、まずNH細胞の分化に必要な環境因子を調べる必要があった。そこで、NH細胞の分化に必要な環境因子を特定するため、CLPとNotchリガンドを発現するTSt4-DLL1ストローマ細胞との共培養を行った。NH細胞の分化にはT細胞分化にも必須であるIL-7とNotchシグナルが必要であることが知られていたが、CLPを異なる濃度のIL-7刺激下で培養したところ、CLPは低濃度のIL-7刺激下でT細胞へ優位に分化した一方、高濃度のIL-7刺激下ではNH細胞へ優位に分化した。また、CLPとNotchシグナルの強さをDoxycycline依存的に調節できるTSt4 Tet-off DLLストローマ細胞との共培養を行った結果、受け取るNotchシグナル量の違いがCLPからT細胞、B細胞、NH細胞への分化を制御していることが明らかになった。

骨髄に存在するCLPは*in vitro*の実験でNH細胞への分化誘導が可能のため、NH細胞は骨髄CLPから分化すると一般的に考えられている。しかしながら血流を共有するパラビオーシスマウスを使った実験からNH細胞は組織常在性の細胞であることが明らかになったことから、NH細胞は胎生期に末梢組織において組織依存的な分

化成熟を遂げることが示唆された。そこで、生体内の真のNH細胞の分化の場、時期を特定するため、胎仔期から成体においてNH細胞が最も多く存在する腸間膜FALCの細胞を精査した。その結果、胎仔期の腸間膜にはすでにILCPおよび機能的に未成熟なNH細胞が存在することが明らかになった。この未熟なNH細胞は成熟にIL-2やIL-7などのSTAT5シグナルを必要とすることも明らかになった。さらに、腸間膜にはCD45-CD31-PDGFRα+gp38+ストローマ細胞が存在し、*in vitro*においてこれらの細胞とILCPとの共培養を行った結果、NH細胞の分化・成熟を優位に支持することが明らかになった。

以上の結果から、IL-7濃度、Notchシグナル量の違いが胎仔肝臓においてCLPからT細胞、B細胞、ILCPへの分化決定を行い、ILCPが末梢組織に移動した後、末梢組織に存在するストローマ細胞の支持により未熟なNH細胞へと分化し、生後、STAT5刺激を受けることで成熟NH細胞へと分化することが明らかになった。

本研究でNH細胞が腸間膜などの末梢組織において分化することが明らかになったが、腸間膜の中のFALCで分化するか否かについては未だ結論にいたっておらず、現在も解析を進めている。FALCの解析に関しては大阪大学との共同研究でライブイメージング解析を行っており、リンパ球が密集することで形成されると考えていたFALCには実は血管が網の目状に張り巡らされている事が明らかになっている。今後はNH細胞のレポーターマウスを用いて、胎児期から生体に至るFALCの構造とNH細胞の分布について解析していく予定である。

研究組織

連携研究者

穂積 勝人 (HOZUMI Katsuto)

東海大学医学部・准教授

研究者番号: 30246079

主な発表論文等

(雑誌論文)(計6件)

- 1) K. Moro, H. Kabata, M. Tanabe, S. Koga, N. Takeno, M. Mochizuki, K. Fukunaga, K. Asano, T. Betsuyaku and S. Koyasu. Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. *Nat Immunol*, 2016. 17(1): p. 76-86.
- 2) H. Morita, K. Moro and S. Koyasu. Innate lymphoid cells in allergic and nonallergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2016. 138(5): p. 1253-1264.
- 3) A. Vasanthakumar, K. Moro, A. Xin, Y. Liao, R. Gloury, S. Kawamoto, S. Fagarasan, L. A. Mielke, S. Afshar-Sterle, S. L. Masters, S. Nakae, H. Saito, J. M. Wentworth, P. Li, W. Liao, W. J. Leonard, G. K. Smyth, W. Shi, S. L. Nutt, S. Koyasu and A. Kallies. The transcriptional regulators IRF4, BATF

and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2015. 16(3): p. 276-85.

- 4) K. Moro and S. Koyasu. Innate lymphoid cells, possible interaction with microbiota. *Semin Immunopathol*, 2015. 37(1): p. 27-37.
- 5) K. Moro, K. N. Ealey, H. Kabata and S. Koyasu. Isolation and analysis of group 2 innate lymphoid cells in mice. *Nat Protoc*, 2015. 10(5): p. 792-806.
- 6) H. Kabata, K. Moro, S. Koyasu and K. Asano. Group 2 innate lymphoid cells and asthma. *Allergol Int*, 2015. 64(3): p. 227-34.

(学会発表)(計29件)

- 1) Kazuyo Moro
Interferon and IL-27 antagonize ILC2 function and type 2 innate immune responses
44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
Sapporo, Japan

2015年11月18日
茂呂和世
ILC2による好酸球性炎症誘導機構
第65回日本アレルギー学会学術大会
2016年6月18日
東京
Kazuyo Moro
Suppression mechanism of Group 2 innate lymphoid cells
FASEB IgE and Allergy, 50 Years & Onward
West Palm Beach, Florida
2016年6月26日

- 4) 茂呂和世
ILC2をターゲットとした喘息治療の展望
第53回日本小児アレルギー学会
2016年10月9日
高崎
- 5) Kazuyo Moro
Group 2 innate lymphoid cell and allergic inflammation
Advances in Targeted Therapies Meeting
Mandelieu, France
2017年3月29日

(その他)
ホームページ
<http://www.ims.riken.jp/labo/56/index.html>

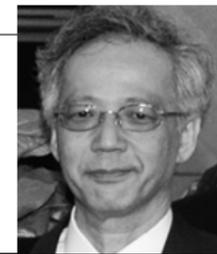
腸管神経による免疫系・上皮系バリアおよび腸内フローラ制御機構解析

(平成27年度～平成28年度) Regulation of intestinal immunity, epithelial barrier function and intestinal bacterial flora by enteric nervous system

幡野 雅彦 千葉大学・大学院医学研究院

研究代表者

HATANO, Masahiko
千葉大学・大学院医学研究院・教授
20208523



研究開始当初の背景

腸管は上皮細胞バリアを隔てて腸内細菌と免疫系細胞が隣接し、さらに粘膜下および筋層間に神経細胞が分布している。また腸管は第2の脳と呼ばれており大脳に次ぐ神経細胞数が存在する。近年の研究により腸内細菌と免疫系との相互作用は正常免疫系の発達にも必須であることが示されておりまた腸管免疫系に特徴的な細胞も同定されている。一方で解剖学的には免疫系・神経系・上皮細胞・腸内細菌は近接した位置に存在しているが腸管神経系と免疫系、上皮細胞および腸内細菌との相互作用はあまり明らかにされていない。臨床的には腸管神経の異常に起因する疾患としてHirschsprung病およびHirschsprung病類縁疾患が知られており、これらの疾患では壊死性腸炎など腸管の重症感染症の頻度が高い。本研究では腸管神経系に焦点を当て腸管神経と免疫系・上皮細胞バリアおよび腸内細菌との相互作用を解析する。

研究の目的

腸管神経系と腸管免疫系、腸管上皮バリア機構および腸内細菌叢との相互作用および腸内恒常性の維持機構について腸管神経細胞が増加しているNcx KOマウスを用いて明らかにすることを目的とした。

研究の方法

腸管神経細胞増多の認められるNcx KOマウス(Hatano et al. *J Clin Invest* 100; 795-801, 1997)を用いて以下の実験を行った。

- DSS腸炎モデルの作成と病態解析
- KOマウス腸管パイエル板、粘膜固有層などにおけるリンパ球サブセットの解析およびサイトカイン・ケモカイン遺伝子発現解析
- KOマウス腸管上皮細胞におけるカドヘリン発現およびDextran-FITC経口投与による腸管透過性の解析
- KOマウス腸管蛋白のニトロ化解析(抗ニトロチロシン抗体による免疫染色およびウエスタンブロット)
- KOマウス腸内細菌の培養法(マッコンキー培地、GAM培地)による解析、16SrRNA/PCR解析およびメタゲノム解析
- KOマウス糞便移植実験

研究成果

(1) Ncx KOマウスはDSS腸炎に対する感受性が高い:

Ncx KOマウスおよび野生型マウスに2.5%DSSを1週間飲水させ腸炎の発症について検討した。KOマウスでは体重減少、血便などを認め50%が死亡したが野生型では死亡しなかった。KOマウスでは腸管組織における細胞浸潤や上皮細胞の破壊が顕著で炎症性サイトカインの発現も上昇していた。一方でKOマウス骨髄細胞より分化させたマクロファージをLPSで刺激してIL1b, IL6などの産生を調べたところ、野生型とは差がなかったことよりNcx KOマウスの免疫系細胞におけるサイトカイン産生能には異常はないと考えられた。また、Ncx KOマウス腸管神経細胞ではnNOS産生神経の増加が認められ腸管組織においてもnNOS蛋白の発現量が野生型の2~3倍に増加していた。一方でiNOSおよびeNOS蛋白の発現は野生型と比較して変化はなかった。

(2) Ncx KOマウス腸管上皮細胞バリア機構の異常:

DSS腸炎モデルにおいてNcx KOマウスは100%の個体で血便を認めたことより腸管上皮細胞バリアの異常が示唆された。上皮細胞間接着に関連するタンパクとしてE-Cadherinの発現を免疫組織染色およびウエスタン法で解析したところKOマウスにおいて低下していた。さらに腸管透過性も高進していた。また、KOマウスにnNOS阻害剤であるL-NPAを投与したところ腸管上皮細胞のE-Cadherinの発現は野生型と同じレベルに回復した。一方でiNOS阻害剤である1400wの投与によっては回復が認められないことより腸管神経由来のNOにより上皮細胞E-Cadherin発現が低下していると考えられた。またKO腸管上皮は抗ニトロチロシン抗体で染色され過剰のNOにより蛋白のニトロ化が起こり細胞障害が示唆された。

(3) Ncx KOマウスにおけるDysbiosis:

Ncx KOマウスのDSS腸炎はカナマイシンの投与により改善することより腸内細菌の関与についても検討した。培養法によりNcx KOマウスにおいてはマッコンキー培地で発育する通性嫌気性菌のコロニー数が野生型の10~100倍に増加しているこ

とが明らかになった。一方でGAM培地において発育する偏性嫌気性菌のコロニー数は野生型・KOマウスとも差がなかった。次に16SrRNA/PCR法により解析したところ、*Enterobacteriaceae*がKOにおいて増加していることが明らかとなった。さらにメタゲノム解析によってもこの傾向は認められ、Ncx KOマウス腸内細菌叢はdysbiosisの状態であることが明らかとなった。

(4) Ncx KOマウス腸内細菌におけるNorV(+)高病原性細菌の増加:

腸内細菌科のある菌では、nitric oxide reductase (norV) により脱窒反応とよばれる嫌気呼吸を行い、ATPを合成し、嫌気条件下で生育するものがある。さらにこれらの菌は、マクロファージに貪食されてもマクロファージ由来のNOによって殺菌作用を受けないため、さらに増殖し、非常に高病原性であることが報告されている。マウス糞便を用いて、norV遺伝子について調べたところ、Ncx-KOの多くの個体がnorV遺伝子を持つ腸内細菌が増加していることが明らかとなった。次に病原性について解析する目的で、野生型マウス由来およびNcx KOマウス由来の糞便をそれぞれ野生型マウスに移植しDSSにより腸炎を誘導した。Ncx KOマウス由来糞便を移植した個体において体重減少や下痢がより高度に認められDisease activity indexの悪化が認められた。これらの結果よりNcx KOマウス腸管においてはNOのストレスに暴露されることによりNorV遺伝子を持つより病原性の強い腸内細菌が増加しDysbiosisの状態となることが示唆された。

(5) Ncx KOマウス腸管では好酸球増加が認められる:

Ncx KOマウス腸管における免疫系細胞についてFACSで解析した。パイエル板の数、大きさ、T細胞、B細胞サブセットなどには野生型とKOでは差が認められなかった。一方KOマウスの粘膜固有層において野生型に比べ好酸球が増加していることが確認された。この傾向は炎症所見のない4週令の個体においても認められた。次に腸管組織におけるサイトカイン・ケモカインの発現をPCRで解析した。KOマウス腸管においてIL5 mRNAの発現が野生型の10~20倍に増加していた。

(上記結果の一部は論文投稿中のため図表などは割愛した)

研究組織

連携研究者

坂本 明美(SAKAMOTO, Akemi)
千葉大学バイオメディカル研究センター准教授
研究者番号:90359597

藤村 理紗(FUJIMURA, Lisa)
千葉大学バイオメディカル研究センター 助教
研究者番号:30376363

主な発表論文等

(雑誌論文)(計12件)

- Sunahara S, Watanabe E, Hatano M, Swanson PE, Oami T, Fujimura L, Teratake Y, Shimazui T, Lee C, Oda S.Influence of autophagy on acute kidney injury in a murine cecal ligation and puncture sepsis model. *Sci Rep.* 2018 8:1050. doi: 10.1038/s41598-018-19350-w.
- Oami T, Watanabe E, Hatano M, Teratake Y, Fujimura L, Sakamoto A, Ito C, Toshimori K, Swanson PE, Oda S. Blocking liver autophagy accelerates apoptosis and mitochondrial injury in hepatocytes and reduces time to mortality in a murine sepsis model. *Shock.* 2017 Oct 25. doi: 10.1097/SHK.0000000000001040.
- Shimazui T, Nakada TA, Fujimura L, Sakamoto A, Hatano M, Oda S. Development of Noninvasive In vivo approach to assess vascular permeability in inflammation using fluorescence imaging. *Shock.* 2017 Dec 4. doi: 10.1097/SHK.0000000000001075.
- Ogasawara T, Hatano M, Satake H, Ikari J, Taniguchi T, Tsuruoka N, Watanabe-Takano H, Fujimura L, Sakamoto A, Hirata H, Sugiyama K, Fukushima Y, Nakae S, Matsumoto K, Saito H, Fukuda T, Kurasawa K, Tatsumi K, Tokuhisa T, Arima M. Development of chronic allergic responses by dampening Bcl6-mediated suppressor activity in memory T helper 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114:E741-E750. DOI: 10.1073/pnas.1613528114
- Umezawa H, Naito Y, Tanaka K, Yoshioka K, Suzuki K, Sudo T, Hagihara M, Hatano M, Tatsumi K, Kasuya Y. Genetic and Pharmacological Inhibition of p38 α Improves Locomotor Recovery after Spinal Cord Injury. *Front Pharmacol.* 2017; 8:72. DOI:10.3389/fphar.2017.00072
- Teratake Y, Kuga C, Hasegawa Y, Sato Y, Kitahashi M, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Sakamoto A, Arima M, Tokuhisa T, Hatano M. Transcriptional repression of p27 is essential for murine embryonic development. *Sci Rep.* 2016; 6: 26244. DOI: 10.1038/srep26244
- Oami T, Watanabe E, Hatano M, Sunahara S, Fujimura L, Sakamoto A, Ito C, Toshimori K, Oda S. Suppression of T Cell Autophagy Results in Decreased Viability and Function of T Cells Through Accelerated Apoptosis in a Murine Sepsis Model. *Crit Care Med.* 2017;45:e77-e85. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002016
- Saito T, Sakamoto A, Hatano M, Iwai J, Higashimoto Y, Yoshida H. Systemic and Local Cytokine Profile

in Biliary Atresia. *Eur J Pediatr Surg.* 2016 Sep 16. [Epub ahead of print] DOI: 10.1055/s-0036-1592136

- Watanabe-Takano H, Takano K, Hatano M, Tokuhisa T, Endo T. DA-Raf-Mediated Suppression of the Ras-ERK Pathway Is Essential for TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Type 2 Cells. *PLoS One.* 2015; 10: e0127888. DOI: 10.1371/journal.pone.0127888
- Hashimoto M, Sato T, Muroyama Y, Fujimura L, Hatano M, Saito T. Nepro is localized in the nucleolus and essential for preimplantation development in mice. *Dev Growth Differ.* 2015; 57: 529-38. DOI: 10.1111/dgd.12232
- Kobayashi T, Tanaka K, Fujita T, Umezawa H, Amano H, Yoshioka K, Naito Y, Hatano M, Kimura S, Tatsumi K, Kasuya Y. Bidirectional role of IL-6 signal in pathogenesis of lung fibrosis. *Respir Res.* 2015; 16: 99. DOI: 10.1186/s12931-015-0261-z
- Matsushita K, Kitamura K, Rahmutulla B, Tanaka N, Ishige T, Satoh M, Hoshino T, Miyagi S, Mori T, Itoga S, Shimada H, Tomonaga T, Kito M, Nakajima-Takagi Y, Kubo S, Nakaseko C, Hatano M, Miki T, Matsuo M, Fukuyo M, Kaneda A, Iwama A, Nomura F. Haploinsufficiency of the c-myc transcriptional repressor

FIR, as a dominant negative-alternative splicing model, promoted p53-dependent T-cell acute lymphoblastic leukemia progression by activating Notch1. *Oncotarget.* 2015;6:5102-5117. DOI: 10.18632/oncotarget.3244

(学会発表)(計4件)

- 藤村理紗,小原由紀子,大崎敬子,神谷茂,幡野雅彦 腸管恒常性維持における腸管神経の役割について 第19回腸内細菌学会 2015年6月18日~19日 北里大学コンベンションホール 東京都港区
- Lisa Fujimura, Akemi Sakamoto, Masafumi Arima, Takeshi Tokuhisa, Masahiko Hatano Role of enteric neurons in regulation of intestinal homeostasis. 第44回日本免疫学会 2015年11月18日~20日 札幌コンベンションセンター 北海道札幌市
- 小林茉結,幡野雅彦,坂本明美,藤村理紗,寺竹洋一,深谷小百合 腸管神経細胞分化におけるNcxの機能解析 第39回日本分子生物学学会 2016年12月1日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市
- 藤村理紗,坂本明美,幡野雅彦 腸管神経過多マウスを用いた腸管神経系と免疫系の相互作用の解析 第39回日本分子生物学学会 2016年12月1日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市

(その他)

ホームページ:http://www.m.chiba-u.ac.jp/dept/biomed/

加齢に伴う二次リンパ組織内細胞間相互作用の変容による疾患発症の分子基盤解明

(平成27年度～平成28年度) **Alteration of intercellular communication in secondary lymphoid tissues with age and development of diseases**

門松 毅 熊本大学・大学院生命科学研究部

研究開始当初の背景

免疫系では、加齢に伴い獲得免疫機能の低下や炎症反応の遷延化が認められ、これらの加齢に伴う免疫系の機能変化は免疫老化と呼ばれる。この原因の一つとして、加齢に伴う胸腺の早期萎縮によって末梢へのナイーブCD4 T細胞の供給が減少することが挙げられる。通常、末梢のCD4 T細胞プールの組成は、抗原刺激などによって一度活性化されたメモリーCD4 T細胞に比ベナイーブCD4 T細胞優位であるが、加齢に伴うナイーブCD4 T細胞減少による末梢CD4 T細胞プールの恒常性を維持するために、メモリーCD4 T細胞が抗原刺激非依存的な恒常性増殖により増加し、末梢のCD4 T細胞プールの組成がメモリーCD4 T細胞優位へとシフトする。近年、このような加齢に伴い増加するメモリーCD4 T細胞の一部の集団が、炎症性サイトカインなどの液性因子を過剰に産生する能力(SASP)を獲得し、がんや自己免疫疾患などの病態の発症・進展に関わっていることが注目されている。これまでの免疫老化に関する研究では、免疫細胞を中心に解析が行われてきた。しかし、免疫空間は免疫細胞とストローマ細胞によって構成されており、これらの細胞間相互作用が免疫システムの恒常性維持に重要であると考えられる。従って、加齢に伴う免疫細胞とストローマ細胞の細胞間相互作用の変容が、免疫老化およびその関連疾患の発症・進展に関わっていると考えられ、免疫細胞とストローマ細胞の細胞間相互作用の分子機構解明が、免疫系の老化病態を明らかにするうえで重要である。

我々は、これまでにアンジオポエチン様因子(ANGPTL)ファミリー分子の1つであるANGPTL2が、その生理的機能として組織リモデリングを誘導することで様々な内的・外的ストレスによる組織の損傷を修復し、組織の恒常性維持に関わっていること、一方、持続的なストレスによってANGPTL2の分泌が増加し過剰応答となった結果、慢性炎症が惹起されることで不可逆的な組織リモデリングが生じ、肥満に伴随する代謝異常症、動脈硬化性疾患の発症・進展、発がんやがんの浸潤・転移の促進、さらに関節リウマチ等の自己免疫疾患の発症・進展に関わっていることを明らかにした。また、我々は、ANGPTL2による組織の恒常性維持に関わる分子機構として、ANGPTL2は機能的受容体であるインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介して、①Rac活性化による細胞

の運動能の促進、②NF κ Bを介した炎症経路活性化、③p38 MAPK/マトリックスメタロプロテアーゼ経路の活性化による細胞外基質の分解促進を引き起こすことを明らかにしてきた。さらに、最近、ANGPTL2の受容体としてB細胞や骨髄系細胞などに発現するLILRB2(leukocyte immunoglobulin-like receptor B2)が同定され、LILRB2を介したANGPTL2シグナルが造血幹細胞や白血病幹細胞の分化制御、幹細胞性維持に関わることが報告された。

最近、我々は、①加齢に伴い増加するメモリーCD4 T細胞(CD4⁺ CD44^{high})のなかでも、PD-1(Programmed death-1)を細胞表面に発現し、生理的には重要だがその過剰産生によって加齢病態の進展に関わる液性因子を大量に産生することで、白血病や自己免疫疾患の病態進展に関わることが報告されているメモリーCD4 T細胞がANGPTL2を豊富に発現すること、②野生型マウスでは、加齢に伴い脾臓におけるPD-1陽性メモリーCD4 T細胞が増加するのに対し、*Angptl2* KOマウスでは加齢に伴う PD-1陽性メモリーCD4 T細胞の増加が抑制されていることを見出した。以上より、ANGPTL2シグナルが免疫老化に関わっている可能性が示唆された。また、PD-1陽性メモリーCD4 T細胞におけるANGPTL2の高発現は、SASPの一つとして捉えることができ、PD-1陽性メモリーCD4 T細胞によって過剰産生されたANGPTL2が慢性炎症を惹起し、免疫老化に伴うがんや自己免疫疾患の発症・進展に寄与している可能性が考えられた。

研究の目的

加齢に伴いANGPTL2を豊富に発現するメモリーCD4 T細胞集団が出現すること、ANGPTL2の受容体であるLILRB2はB細胞や骨髄系細胞に発現し、一方、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ はT細胞や骨髄系細胞に加え内皮細胞などのストローマ細胞にも発現することから、ANGPTL2シグナルを介したこれらの細胞間相互作用が免疫老化やこれに伴う疾患の発症・進展に関わっている可能性が示唆される。そこで本研究では、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ やLILRB2を介したANGPTL2シグナルによる免疫細胞とストローマ細胞の細胞間相互作用を明らかにするとともに、加齢に伴うANGPTL2シグナルを介した細胞間相互作用の変容と加齢病態との連関を解明し、免疫老化関連疾患の発症・進展の分子機構

解明を目的とした。

研究の方法

卵白アルブミンを完全フロイントアジュバントとともに野生型もしくは*Angptl2* KOマウスの足蹠部の皮下に投与し、投与後に所属リンパ節を摘出した。コラゲナーゼ、ディスパーゼおよびDNA分解酵素(DNAase I)を用いて摘出したリンパ節を処理し、細胞懸濁液を得た。得られた細胞を用いて、フローサイトメトリーによる各種ストローマ細胞や免疫細胞の細胞表面マーカー分子やサイトカインの発現解析を行った。また、リンパ節内のストローマ細胞におけるANGPTL2の発現を検討する目的で、摘出したリンパ節を用い凍結組織切片を作製し、蛍光免疫染色を行った。コラーゲン誘導性関節炎モデルは、野生型もしくは*Angptl2* KOマウスにコラーゲンと完全フロイントアジュバントを共に尾根部に皮下投与し、21日目にコラーゲンのみを腹腔内、26日目にLPS(リボ多糖)を投与し作製した。2回目のコラーゲン免疫後、経時的に採血を行い、血中のコラーゲンに対するIgM、IgG1、IgG2c抗体レベルをELISA法にて測定した。さらに、致死量(9 Gy)の放射線を照射した野生型もしくは*Angptl2* KOマウスに野生型もしくは*Angptl2* KOマウスの骨髄細胞をそれぞれ移植したマウスを用いて、コラーゲン誘導性関節炎モデルを作製し、骨髄由来細胞由来もしくはストローマ細胞由来のいずれのANGPTL2が関節炎発症に寄与しているか検討した。

CD4 T細胞において、卵白アルブミンに対する特異的なT細胞受容体を発現するOT-IIマウスより単離したCD4 T細胞を野生型または*Angptl2* KOマウスに移植した。卵白アルブミンを完全フロイントアジュバントとともに同マウスの足蹠部の皮下に投与し、投与後5日目に所属リンパ節を摘出し、リンパ節内のOT-IIマウス由来Tfh細胞におけるサイトカインの発現解析を行った。

研究成果

リンパ節組織内でANGPTL2を発現する細胞を同定する目的で、卵白アルブミンを完全フロイントアジュバントとともに野生型マウスの足蹠部の皮下に投与し、投与後10日目に摘出した所属リンパ節を用いて蛍光免疫染色を行った。その結

果、卵白アルブミン投与前のリンパ節では、細網繊維芽細胞、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞においてANGPTL2の発現を認めた。一方、卵白アルブミン投与後では、上述のストローマ細胞に加え、胚中心に存在する濾胞樹状細胞においてもANGPTL2が豊富に発現していることを見出した。

そこで、これらストローマ細胞におけるANGPTL2の意義を検討する目的で、*Angptl2* KOマウスを用いてコラーゲン誘導性関節炎マウスモデルを作製した。その結果、野生型マウスは2回目のコラーゲン免疫後3週間で全てのマウスが関節炎を発症したのに対し、*Angptl2* KOマウスでは著明に関節炎の発症が抑制された。さらに、血中のコラーゲンに対するIgMおよびIgG1抗体レベルには差を認めないが、野生型マウスに比べ*Angptl2* KOマウスでは有意にコラーゲンに対するIgG2c抗体レベルが低いことが明らかとなり、*Angptl2* KOマウスではB細胞におけるIgG2cへのクラススイッチが抑制されていることが示唆された。B細胞における*Angptl2*の欠損がクラススイッチに影響している可能性を検討したところ、野生型および*Angptl2* KOマウス由来B細胞は*in vitro*におけるクラススイッチの誘導に差を認めなかった。さらに、野生型マウスおよび*Angptl2* KOマウスの骨髄をそれぞれ野生型マウスおよび*Angptl2* KOマウスに移植し、同様に関節炎モデルを作製したところ、ドナーの遺伝型に関わらずレシピエントが*Angptl2*を欠損している場合に関節炎の症状が抑制された。これらの結果から、免疫細胞以外のストローマ細胞に由来するANGPTL2がB細胞におけるクラススイッチに重要である可能性が示唆された。

IgG1からIgG2cへのクラススイッチにおいて

は、Tfh細胞由来のIFN γ が促進的に作用することが報告されており、ANGPTL2の発現を認めた細網繊維芽細胞や濾胞樹状細胞はT細胞の増殖や胚中心B細胞の成熟過程で重要な役割を果たしている。そこで、卵白アルブミンを完全フロイントアジュバントとともに野生型および*Angptl2* KOマウスの足蹠部の皮下に投与し、投与後14日目に所属リンパ節内の細網繊維芽細胞や濾胞樹状細胞、Tfh細胞、胚中心B細胞数を検討した。その結果、野生型マウスに比べ、*Angptl2* KOマウスにおいて細網繊維芽細胞や濾胞樹状細胞数が有意に少ないことを見出した。一方、Tfh細胞や胚中心B細胞数には有意な差を認めなかったが、Tfh細胞では減少傾向にあった。次に、卵白アルブミンを完全フロイントアジュバントとともにOT-II細胞を移植した野生型および*Angptl2* KOマウスの足蹠部の皮下に投与し、投与後5日目に所属リンパ節内のOT-IIマウス由来T細胞や胚中心B細胞数、Tfh細胞におけるIFN γ 産生を検討した。その結果、胚中心B細胞数に差を認めなかったが、野生型マウスに比べ、*Angptl2* KOマウスの所属リンパ節内に存在するOT-IIマウス由来CD4 T細胞およびTfh細胞数が有意に少なく、同Tfh細胞におけるIFN γ の発現も減少していることが明らかとなった。

以上の結果から、ANGPTL2は、免疫応答に伴う細網繊維芽細胞や濾胞樹状細胞の増殖促進に関わっていることが示唆された。さらに、細網繊維芽細胞や濾胞樹状細胞に由来するANGPTL2がTfh細胞の増殖やTfh細胞におけるIFN γ 発現誘導を介して胚中心B細胞におけるクラススイッチ促進に寄与する可能性が示唆された。ANGPTL2による細網繊維芽細胞や濾胞樹状細胞に対する増殖促進作用の有無を検

討するとともに、細網繊維芽細胞や濾胞樹状細胞特異的*Angptl2* KOマウスを作製し、ストローマ細胞由来ANGPTL2シグナルと胚中心B細胞の成熟との関連をより詳細に検討することや、ストローマ細胞におけるインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ やLILRB2などのANGPTL2受容体として機能する分子の発現やその下流シグナル同定が今後の重要な課題である。

まとめ

本研究の成果として、二次リンパ節組織を構成している種々のストローマ細胞においてANGPTL2が豊富に発現していることを見出した。さらに、これらストローマ細胞のうち、リンパ節内の胚中心に存在し胚中心B細胞の成熟に関わる濾胞樹状細胞にもANGPTL2が発現していること、*Angptl2*ノックアウトマウスがコラーゲン誘導性関節炎発症に対して抵抗性を示し、血中のコラーゲンに対するIgG2c抗体量が減少していることを見出した。以上より、リンパ組織内のストローマ細胞由来ANGPTL2が胚中心B細胞の成熟過程に関わっている可能性が示唆された。

研究組織

連携研究者

尾池 雄一(OIKE, Yuichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号:90312321

| | | | |
|--|--|--|---|
| | | | |
| 主な発表論文等 | srep34690 査読有 | (学会発表)(計3件) | 日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会)、2015年12月3日、神戸ポートピアホテル(神戸市) |
| (雑誌論文)(計2件) | 2) Yugami M, Odagiri H, Endo M, Tsutsuki H, Fujii S, Kadomatsu T, Masuda T, Miyata K, Terada K, Tanoue H, Ito H, Morinaga J, Horiguchi H, Sugizaki T, Akaike T, Gotoh T, Takai T, Sawa T, Mizuta H & Oike Y. Mice Deficient in angiopoietin-like protein 2 (<i>Angptl2</i>) gene show increased susceptibility to bacterial infection due to attenuated macrophage activity. <i>J. Biol. Chem.</i> 291, 2016, 18843-18852 DOI: 10.1074/jbc.M116.720870 査読有 | 1) 門松 毅, Role of angiopoietin-like protein 2 in tumor development and metastasis. 「新規バイオ医薬ピロール・イミダゾール(Pi)ポリアミドの創薬開発国際シンポジウム」平成28年度 日本大学学部連携研究推進シンポジウム、2017年2月24日、日本大学校門会館(東京都) | (図書)(計2件) |
| 1) Tanigawa H, Miyata K, Tian Z, Aoi J, Kadomatsu T, Fukushima S, Ogata A, Takeda N, Zhao J, Zhu S, Terada K, Endo M, Morinaga J, Sugizaki T, Sato M, Morioka MS, Manabe I, Mashimo Y, Hata A, Taketomi Y, Yamamoto K, Murakami M, Araki K, Jinnin M, Ihn H & Oike Y. Upregulation of ANGPTL6 in mouse keratinocytes enhances susceptibility to psoriasis. <i>Sci. Rep.</i> 6, 2016, 34690 DOI: 10.1038/ | | 2) 門松 毅、伊藤 仁、尾池 雄一、がん微小環境変化による組織恒常性維持機構の活性化とがん病態進展の分子機構、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日、パシフィコ横浜(横浜市) | 1) 門松 毅、尾池 雄一、羊土社、膨大なデータを徹底整理する サイトカイン・増殖因子キーワード事典、2015、420、287-289 |
| | | 3) 門松 毅、尾池 雄一、生活習慣病「がん」の共通分子機構とSASPとしてのアンジオポエチン様因子2シグナル、BMB 2015 (第38回 | 2) 門松 毅、尾池 雄一、北隆館、別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患「慢性炎症制御による加齢関連疾患治療の展望」、2015、170、103-109 |
| | | | (その他) |
| | | | ホームページ http://molegene.kumamoto-u.ac.jp |

内臓脂肪組織内の免疫空間ニッチェの攪乱と T細胞老化

(平成27年度～平成28年度) Disturbance of immune space niche in visceral adipose tissue and T cell senescence

佐野 元昭 慶應義塾大学・医学部・循環器内科

研究代表者

SANO, Motoaki
慶應義塾大学・医学部・循環器内科
30265798



研究開始当初の背景

内臓脂肪型肥満に伴う慢性炎症の機序については、これまでも示唆に富む研究成果が多くあり、我々のグループでも再現してきた。しかし、これまでの研究は、通常の炎症過程で活躍する正常な免疫細胞のバランスが崩れることにより慢性炎症が引き起こされるとするものであった。

研究の目的

我々は、正常では存在しない病気特異的な細胞集団が出現することが、炎症が終焉に向かわずに慢性化する原因ではないかと考え、実験を進めてきた。

研究の方法

おなかについた「内臓脂肪」がさまざまな生活習慣病の引き金となり、死を早めてしまうことが問題となっている。それだけでなく、メタボリック症候群は感染に対する抵抗力が低下する、癌や自己免疫疾患、認知症の発症リスクが高まるなど様々な異常をきたす。メタボに起因するこれらの体調の変化は、高齢者の特徴でもある。したがって、メタボが老化の徴候を加速させている可能性が指摘されてきた。我々は、私たちの体を外敵から守る免疫システムの老化現象に着目し、メタボが老化の徴候を加速させている仕組みを解明することを試みた。

研究成果

高脂肪食負荷マウスの内臓脂肪でCD4 T細胞の一部が、本来加齢マウスで出現する細胞老化の性質を獲得すること、この細胞老化がB細胞依存的に起こること、さらに、Senescence associated secretory phenotype(SASP)としてのオステオポンチンの大量分泌を介して、内臓脂肪組織の慢性炎症と全身のインスリン抵抗性に関与しているということを発見した(*J Clin Invest*, 2016)。

主な発表論文等

(雑誌論文)(計1件)

- 1) Shirakawa K, Yan X, Shinmura K, Endo J, Kataoka M, Katsumata Y, Yamamoto T, Anzai A, Isobe S, Yoshida N, Itoh H, Manabe I, Sekai M, Hamazaki Y, Fukuda K, Minato N, Sano M. Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue. *J Clin Invest*. 2016 Dec 1;126(12):4626-4639. doi:10.1172/JCI88606.

(学会発表)(計5件)

- 1) 佐野元昭 第81回日本循環器病学会学術集会 金沢 2017年3月19日 Diabetes and Heart Failure—From Clinical and Basic Research Point of View—AHA-JCS Joint symposium
- 2) 佐野元昭 第39回分子生物学会 横

浜 2016年12月2日 臓器老化による臓器間ネットワークの破綻を探る—免疫老化と肥満関連疾患—

- 3) 佐野元昭 The 2nd IMCR Symposium on Endocrine and Metabolism: International Frontier in Homeostatic Regulation Research. 群馬 2016年11月10日Visceral obesity and T cell senescence
- 4) 佐野元昭 第80回日本循環器病学会学術集会 仙台 2016年3月19日 Functional importance of immune cells in the hear -T cell senescence & cardiovascular-metabolic disease
- 5) 佐野元昭 第80回日本循環器病学会学術集会 仙台2016年3月18日 Molecular mechanism of obesity/T2DM- associated cardiomyopathy -AHA-JCS Joint symposium -from the point of view of T cell senescence- AHA-JCS Joint Symposium

(図書)(計4件)

- 1) 佐野元昭 臓器の記憶と血管代謝ニッチェ 心臓ストレス記憶形成機構と心不全への分子機序 メディカルレビュー社, 16 (4), 339-344, 2015
- 2) 白川公亮, 佐野元昭 内臓脂肪の慢性炎症を惹起するヘルパーCD4 T細胞とB細胞の役割 代謝調節における免疫細胞の役割 医師薬出版株式会社, 医学のあゆみ 257(6), 673-679, 2016
- 3) 佐野元昭 肥満糖尿病におけるCD4 T細胞とB細胞の役割 臓器連関による代謝制御を中心とした恒常性維持と生活習慣病 科学評論社, 内分泌・糖尿病・代謝内科 42(5), 342-345, 2016
- 4) 佐野元昭 老化制御と循環器疾患 日本臨床社, 74(9), 1508-1512, 2016

(産業財産権)

○出願状況(計1件)
名称:加齢又は肥満に伴う慢性炎症の抑制剤、加齢又は肥満に伴う慢性炎症に関連する疾患の治療剤又は予防剤、罹患可能性評価装置及びスクリーニング方法
発明者:佐野 元昭、新村 健
権利者:学校法人慶應義塾
種類:出願審査請求中
番号:特願2014-058581
出願年月日:2014/3/20
国内外の別: 国内

(その他)

ホームページ
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20161108-2/>
科学技術振興機構(JST)のサイエンスポータルというサイトの「サイエンスクリップ」(<http://scienceportal.jst.go.jp/clip/>)
JST News and Topics 2016年度1月号
<https://www.jst.go.jp/pr/jst-news/backnumber1701.html>

mTORC1シグナルを介した胸腺環境維持機構の解明

(平成27年度～平成28年度) Analysis of mTORC1 signal-mediated mechanism required for maintenance of thymic microenvironment

松田 達志 関西医科大学・医学部

研究代表者

MATSUDA, Satoshi
関西医科大学・医学部・准教授
00286444



研究開始当初の背景

免疫系の司令塔であるT細胞は、胸腺において「自己」と「非自己」を選別するための能力を獲得する。それを支えるのは、胸腺上皮細胞や樹状細胞等から構成される3次元の精緻なネットワークであり、これら胸腺環境の異常は自己免疫疾患やT細胞機能不全などの免疫病を引き起こす。

個体の老化に伴う最も顕著な免疫系の変化は、胸腺環境を構築する細胞群の減少に伴う胸腺の退縮であり、鳥類や両生類を含む全ての高等動物にプログラムされた現象である。しかし、胸腺退縮の生理的な意義やその分子機構に関しては、適切な老化モデルが少なく、未解明な点が多く残されているのが現状である。例えば、老化に伴う自己免疫応答の亢進や抗腫瘍免疫能の低下といった変化が、T細胞の側の細胞老化に起因するのか、胸腺の退縮によるT細胞応答の質的な変化に起因するのか、もしくはその両者の相乗効果の結果なのか、未だに議論が続いている。

研究の目的

研究代表者は、ごく最近、金沢大学がん研究所・平尾教授との共同研究で、PI3Kの下流で機能するmTORC1シグナルを全身で欠失させたところ、胸腺退縮が引き起こされることを見出した(Hoshii *et al.*, PNAS.111, 3805 (2014))。その後の骨髄キメラマウスを用いた解析から、骨髄由来の血球系細胞ではなく、胸腺を形作る上皮側の細胞においてmTORC1シグナルを消失させるだけで、胸腺の速やかな萎縮が誘導されることが明らかとなった(図1)。以上の事実は、胸腺上皮細胞におけるmTORC1シグナルが、胸腺環境維持に必須の役割を担っていることを強く

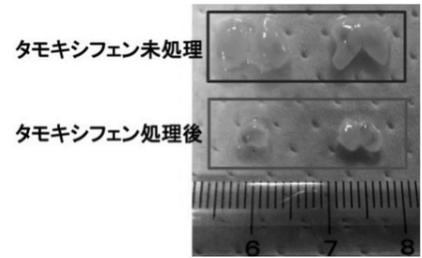


図1 mTORC1シグナルと胸腺退縮
タモキシフェン誘導性にmTORC1シグナル伝達に必要なRaptor分子を欠失可能なマウス(Raptor-ERT2)に、野生型マウス(SJL)由来の骨髄を移植することで、胸腺上皮側のmTORC1シグナルのみを選択的に欠失させたところ、胸腺の退縮が引き起こされた。

示唆している。以上の知見に基づき、mTORC1シグナルを切り口に胸腺退縮の生理的意義とその分子基盤の解明を目指すべく、本研究を着想するに至った。

胸腺環境を構成する胸腺上皮細胞は、胸腺皮質細胞(cTEC)と胸腺髄質細胞(mTEC)に大別され、それぞれT細胞の「正の選択」と「自己寛容の確立」に重要な役割を果たしている。そこで第一に、mTORC1シグナルの欠失がcTEC・mTECの細胞数や分化状態に影響を及ぼすか否かを検証すると共にその背景となる分子機構の解明に取り組む(課題1:胸腺退縮の分子機構)。並行して、胸腺上皮細胞におけるmTORC1シグナルの欠失がT細胞分化に与える影響を個体レベルで評価する(課題2:胸腺退縮とT細胞分化)。さらに、老化に伴う胸腺退縮がmTORC1シグナルの異常によって説明できるか否か、個体レベルでの検証を行う(課題3:老化とmTORC1シグナル)。

研究の方法

(1) 胸腺退縮の分子機構の解明
cTECとmTECは、共に転写因子であるFoxn1依存性に、共通の胸腺上皮前駆細胞から分化することが知られている。cTECとmTECの分岐を調節する分子機構は未だ解明されていないが、RANKL-TRAF6経路がmTECの分化・成熟に特異的に関与するなど、両者が異なる分子機構で制御されているのは間違いない。そこで、mTORC1シグナルの欠失がこれら上皮細胞の分化・増殖・生存等に影響を及ぼすか否か、FACSを用いた細胞生物学的な解析を行う。

(2) 胸腺退縮がT細胞分化に及ぼす影響の評価
Raptor-ERT2マウスにタモキシフェンを投与すると、腸の上皮細胞の増殖不全が原因となり、2週間程度で全例が死亡する。したがって、そのままではT細胞分化に与える影響を長期にわたって評価することが困難である。そこで、Raptor-ERT2マウスの胎児胸腺を、内在性の胸腺を欠損したnudeマウス(C57BL/6-nude)の腎皮膜下へ移植する。この操作により、胎児胸腺が生着後にタモキシフェン処理を行うことで、移植胸腺のみでmTORC1シグナルの欠失を誘導することが可能となる。タモキシフェン処理に伴う移植胸腺退縮によりT細胞の分化に異常が見られるか否か、FACSにより解析を行う。

(3) 老化に伴うmTORC1シグナル変化の検証
老化に伴い、胸腺上皮細胞のmTORC1シグナルに変動が認められるか否かを検証する。具体的には、mTORC1シグナルの下流でリン酸化されることが知られる、p70S6Kのリン酸化状態を調べるとともに、p70S6Kの活性化の指標であるS6分子のリン酸化状態についても検討を加える。

研究成果

(1) 胸腺退縮の分子機構の解明
胸腺上皮細胞のmTORC1シグナルのみを特異的に欠失させるために、致死量のガンマ線を照射したRaptor-ERT2マウスに野生型マウスの骨髄を移植し、胸腺細胞が全て野生型由来となるキメラマウスを作成した。得られたキメラマウス群にタモキシフェンを投与して2週間後にcTEC/mTECの細胞数や性状を調べたところ、胸腺上皮を構成するmTECとcTECの比率が著しく低下していることが明らかとなった(図2)。各々の細胞数を調べたところ、タモキシフェン処理に伴い、mTECの細胞数の顕著な減少が認められ、このことがmTEC:cTECの比率の原因と考えられた。さらにその分子基盤を調べべき各種の解析を行ったところ、タモキシフェン処理群から回収されたmTECで、細胞増殖の指標となるKi67陽性細胞の割合の著しい低下が観察された(図3)。すなわち、

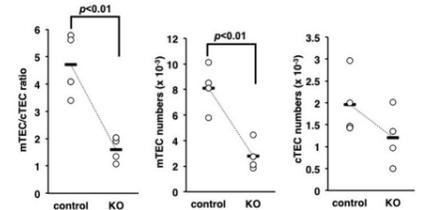


図2 mTORC1シグナル欠失と胸腺上皮
mTORC1シグナルの欠失に伴い、mTEC細胞数の著しい低下が認められた。

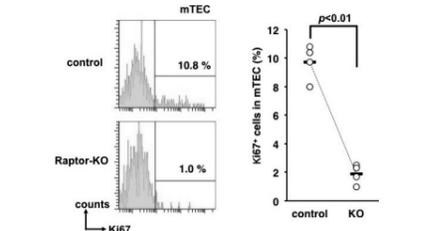


図3 mTORC1シグナル欠失によるmTECの増殖能低下
mTORC1シグナルの欠失に伴い、mTECに占めるKi67陽性細胞の比率が著しく低下した。

mTORC1シグナルの低下によりmTECの増殖能が抑制されることが、急速な胸腺退縮の原因であるものと考えられた。興味深いことに、老齡マウスの胸腺においても同様なmTEC:cTEC比率の低下が報告されており、mTORC1シグナルの低下が生理的な胸腺退縮をもたらしている可能性が強く示唆される。

(2) 胸腺退縮がT細胞分化に及ぼす影響の評価
当初の計画に従い、C57BL/6-nudeマウスの腎皮膜下へ胎児胸腺を移植することで、mTORC1シグナルの欠失がT細胞分化に与える影響の評価を試みたが、技術的な問題のため解析に必要な個体数を確保することが難しく、計画の変更を余儀なくされた。新学術領域研究班のネットワークを活用し、上皮細胞において誘導的にCreを発現可能なマウスを探したところ、K14-CreERTマウスならびにβ5t-iCreマウスの2つのラインが利用可能であることが分かった。前者はタモキシフェンにより胸腺上皮細胞を含む上皮細胞においてCreが誘導されるマウスであり、後者はドキシサイクリン依存的に胸腺上皮細胞特異的にCreが誘導される。そこで、両ラインとRaptor-floxマウスとの交配を進め、個体レベルで上皮細胞特異的なmTORC1シグナル欠失を目指すこととした。しかし、先行して交配を進めたK14-CreERT x Raptor-floxマウスについて、タモキシフェンを投与したところ、投与後2週間程度で全例が死亡することが分かり、結果としてT細胞分化への影響を評価することはできなかった。現在、β5t-iCreマウスとの交

配を進行中である。

(3) 老化に伴うmTORC1シグナル変化の検証
組織におけるmTORC1シグナルを定量するためには、mTORC1の下流因子であるp70S6Kのリン酸化状態を免疫染色で調べるのが一般的であるが、胸腺上皮細胞は数が少なく、周囲の胸腺細胞由来のシグナルがノイズとなるため、そのままでは評価が困難である。そこで第一に、FACSによって胸腺上皮細胞内のS6のリン酸化状態を特異的に評価することを試みた。しかし、胸腺上皮細胞を単離する過程で各種の刺激が入るため、生理状態のmTORC1経路の活性を評価することが難しいことが判明した。そこで、次に、致死量のガンマ線を照射した野生型マウスに、Raptor-ERT2マウスの骨髄を移植し、胸腺細胞が全てRaptor-ERT2由来となるキメラマウスを作成した。解析対象のキメラマウスをタモキシフェンで処理すると、胸腺細胞数が激減すると同時にノイズとなるmTORC1シグナルが消失するため、残存する胸腺上皮細胞におけるmTORC1シグナルの解析が容易になるため、胸腺上皮細胞におけるmTORC1シグナルが加齢と共に変動するか否かを明らかにすることが可能になるものと期待された。しかし、若齡マウスにおいて予備検討を行ったところ、血球系のmTORC1シグナルを欠失させるだけで、間接的に胸腺上皮細胞内の代謝シグナルの低下が誘導されることが分かった。当初の目的は果たせなかったものの、この結果は胸腺上皮細胞とT細胞の相互作用を反映した現象と考えられ、老齡化に伴い胸腺上皮細胞

側のmTORC1シグナルの低下が引き起こされる要因の一つとなっている可能性が示唆された。

まとめ

胸腺上皮細胞特異的にmTORC1シグナルを欠失させる系を用いて、胸腺退縮の分子機構解明に取り組んだ。mTORC1シグナルの欠失により、特にmTECにおいて、増殖能の著しい低下とそれに伴う細胞数の減少が観察された。老齡マウスにおいても同様なmTECの増殖能低下が観察されたことから、mTORC1シグナルの低下がmTECの増殖能低下をもたらすが、老化に伴う胸腺退縮の一因となっていることが示唆された。

研究組織

連携研究者
渡邊 利雄(WATANABE, Toshio)
奈良女子大学・大学院人間文化研究科・教授
研究者番号:60201208

三輪 佳宏(MIWA, Yoshihiro)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号:70263845

研究協力者
住吉 麻実(SUMIYOSHI, Mami)

主な発表論文等

(雑誌論文)(計2件)

- 1) Arima, M., Cui, D., Kimura, T., Sonoda, K.H., Ishibashi, T., Matsuda, S., and Ikeda, E. Basigin can be a therapeutic target to restore the retinal vascular barrier function in the mouse model of diabetic retinopathy. *Sci. Rep.*, 査読
- 2) Cui, D., Arima, M., Takubo, K., Kimura, T., Horiuchi, K., Minagawa, T., Matsuda, S., and Ikeda, E. ADAM12 and ADAM17 are essential molecules for hypoxia-induced impairment of neural vascular barrier function. *Sci. Rep.*, 査読有、vol.5、2016、12796 DOI: 10.1038/srep12796

(学会発表)(計2件)

- 1) 松田達志、江口稚佳子、住吉麻実、生田優希、小河穂波、丹賀直美、早川夏姫、渡邊利雄、マスト細胞脱顆粒過程におけるPI3K経路の役割解明、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月1日、パシフィコ横浜(横浜)
 - 2) 逆井智貴、田中順子、松田達志、水野聖哉、濱田理人、高橋智、三輪佳宏、近赤外イメージングマウスを用いたリンパ球集積から見る炎症反応の可視化、第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日、パシフィコ横浜(横浜)
- (その他)
ホームページ
<http://www3.kmu.ac.jp/bioinfo/>
アウトリーチ活動
出張講義「ヒトゲノムと遺伝」
大阪府立枚方高等学校(H28.6.20)

Meetings

第5回班会議・第8回総括班会議・第4回サマースクール

日時 平成28年7月6日(水)～8日(金)

場所 徳島大学藤井節郎記念ホール



オンラインニュースレター

Meetings

最終年度国際シンポジウム

国際T細胞ワークショップ KTCC2017 (共催)

日時 平成29年3月13日(月)～17日(金)

場所 京都大学芝蘭会館

Monday 13th March 2017

Keynote lectures (chaired by Yousuke Takahama)

Jonathan Sprent (Garvan Institute)

The Thymus: From the Greeks to Miller

Shigeo Koyasu (Riken)

From T cell to ILC

Nagahiro Minato (Kyoto University)

Aging of Immunity and Immunity in Aging



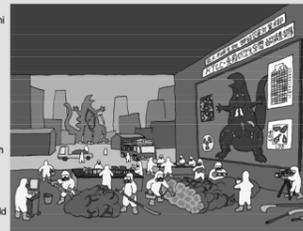
The 3rd International Symposium for MEXT Grant-in-Aid for Scientific Research on
**Analysis and Synthesis of
 Multidimensional Immune Organ Network**
 13th – 17th March 2017
 Shiran Kaikan, Kyoto University, Kyoto, Japan

Keynote speakers
 Jonathan Sprent
 Shigeo Koyasu
 Nagahiro Minato

Special lecturer
 Shimon Sakaguchi

International registrants include:
 (confirmed as of 9th November 2016)

| | |
|--------------------|-----------------------------|
| Jakob Abramson | Georg Höllander |
| Graham Anderson | Ludger Klein |
| Avinash Bhandoola | Nancy Manley |
| Thomas Boehm | Cornelis Muires |
| Clare Blackburn | Jenko Nikolich-Zugich |
| Remy Bosselut | Hyun Park |
| Richard Boyd | Platt Peterson |
| Ann Chidgey | Fredrick Radtke |
| Vishwa Deep Dixit | Ellen Ritchie |
| Lauren Ehrlich | Hans-Reimer Rodewald |
| Wilfried Elmeyer | Ellen Rothenberg |
| Douglas Engel | Roland Scollay |
| Nicholas Gascogne | Alfred Singer |
| Katia Georgopoulou | Charles Surh |
| Dale Godfrey | Naomi Taylor |
| Daniel Gray | Marcel van den Brink |
| Cynthia Guadros | David West |
| Adrian Hayday | Li Wu |
| Kristin Hogquist | Juan Carlos Zúñiga-Pflücker |



Topics to be discussed include:
 Thymus microenvironments
 Progenitors and lineage commitment
 Selection and differentiation
 Recognition and activation
 Immune response and memory
 Stromal cells for immune functions
 Aging of immune system
 Disease and immune regulation

KTCC2017 Organizers
 Manami Itoi
 Hiroshi Kawamoto
 Toshihori Nakayama
 Takahito Saito
 Ichiro Tanuchi
 Yousuke Takahama, Chair

Abstract deadline: 30th November 2016
 Selection for oral and poster presentation will be made by the organizers

- Travel bursary of 100,000 JPY per abstract application is available for 20 postdocs and graduate students from outside of Japan
- Registration fee: 10,000 JPY (on site in cash only)
- For more information, visit our website: <http://ktcc.umin.jp>

Co-organized with The 7th International Workshop of
Kyoto T Cell Conference
 a part of the Global Thymus Network conference series, alternating
 with ThymO2, EUThyme, and ThymUS

文部科学省科学研究費助成事業「免疫応答と免疫調節」国際シンポジウム
 実行委員会 代表 高橋洋介 (takahama@genome.kokushu-u.ac.jp) 徳島大学免疫学研究所



第1号(2012年12月号)

班会議とオンラインニュースレターの発行

高濱 洋介(徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター)

本新学術領域研究班の発足後、研究班運営という慣れない仕事に取り組みはじめております。多士済々の計画研究者各位はそれぞれ良質の研究を推進しておられる方々ばかりですので、個別研究の推進という面では領域代表として今はどっさり構えていてよいと思っております。一方、班研究の要諦は「研究班を組織したことでのどのようなメリットが生じたか」が問われる



という点です。その意味で、班員の緊密な交流による「情報と視点の共有」は班研究に不可欠の基盤と位置づけられます。また、それによって、個別研究では生じることのない新しい展開が発信されていくことが期待されているのが班研究です。今回、本研究班発足後はじめて、班員各自が研究成果や研究計画をもちよって討論する「場」、班会議を開催しました。また、それをふまえて今後の班運営について話し合う第2回総括班会議を開きました。日常から離れ、開催中は論議と交流に没頭できるよう、ロケーションの設定や時間の使い方は工夫したつもりです。班会議の様子は下の投稿やプログラムそしてスナップ写真にお目通しいただければと思いますが、刺激に満ちた学術会議であったばかりでなく、班としてこれから積極的に取り組むべき課題のいくつかが明確にあぶりだされた会議でした。また、その観点から、大いに成果があったと考えております。実際、それら課題のひとつとして、研究班と社会のコミュニケーション強化ということが挙げられ、それをふまえた班活動の一環として、このニュースレターの発刊に至った次第です。ニュースレターの発行にあたっては、スピードやコストに加えて社会へのオープン性や発信内容の柔軟性などに鑑みて、紙媒体というよりも電子媒体としてのオンラインニュースレターという形態をとってみることにしました。今後、本研究班のさまざまな活動等について、このニュースレターを媒介のひとつとして活用していきたいと思っております。今後とも引き続き本研究班へのご支援ご指導よろしくお願い申し上げます。

「免疫四次元空間ダイナミクス」第一回班会議に出席して

宮坂 昌之(大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

第一回班会議は11月16日(金)～17日(土)、大阪湾や神戸の街を一望にできる「緑のオアシス」六甲山ホテルで行われた。初日は、紅葉が青空に映え、見事な秋の天気だったが、二日目は一転して激しい風と降雨となり、めまぐるしく変わる秋の気候の中で会議が行われた。初めに、研究代表者による研究発表の後、支援班研究者の発表に対して参加者全員により熱心な討論が行われた。2日目は研究分担者による研究発表があり、これまた活発な討論が行われた。中には班会議であればこそ出来るような発表者とフロア



間のきびしいやりとりもあり、特に若手の参加者には非常に良い経験であったのではないかと思います。また、懇親会、二次会では、さらに突っ込んだ研究談義が行われ、これも合宿形式での班会議ならではのことであった。われわれの班では「免疫空間」の本態解明を大目標に掲げているが、これを世界に先駆けて実現するためには、お互いの独創的な研究とチーム間の切磋琢磨、さらには強い連携が必要であり、そのためにはこの会議が目標実現に向かっのの良いスタートとなったのではないかと思います。開催場所、時期ともに、まさに当を得た高濱・領域代表の選択であった。

「免疫四次元空間」第一回班会議に参加して

高木 淳一(大阪大学蛋白質研究所)

領域発足後初めての班会議であり、計画班員と支援班員、総括班員という、いわば「身内」だけの2日間であった。「身内」でしかも各自の興味の対象も非常に近いとすれば、ある意味で非常にリラックスした、悪く言えば仲間うちだけのゆるい会議になることも十分に考えられるわけだが、その期待(?)は見事に裏切られ、全体として極めて緊張感に満ちた会議であった。そうなった理由はたくさんある。一つには、新学術領域研究というものに要求される、個別研究成果以上のファクター(新しい学術領域の開拓や融合研究の推進、若手育成といった側面)をどうしたらクリアできるのか、外部からのきびしい評価に耐えることができるのか、という問題意識が領域代表だけでなく各班員に広く共有されていたからだと思う。領域運営の先輩として参加された河本先生の時に厳しい突っ込みも、我々にいやが上にもこの点についてのさらなる自覚を促す効果があった。2番目に、個々の発表者のサイエンスがどれも最新の知見に満ちた盛りだくさんのものであり、聴く側が集中していないとついていけないレベルのものだったということもある。そして3番目に、免疫研究一辺倒に見られがちなこの領域で、実際には極めて広い範囲のサイエンスやアプローチをカバーしていて、非常に刺激的であったせいもあると思う。かくいう私は、構造生物学というアプローチを免疫系の接着分子やシグナル受容体に応用する研究課題をおこなうメンバーであり、その研究内容や手法には他の班員には聞き慣れないものとして新鮮なおもしろさを感じていただけたのではないかと考えている。その一方で、自分にとっては最先端の免疫研究者による発表になんとか付いていこうと必死の2日間であった。二日目に六甲山をおそった大嵐のおかげでせっかくの紅葉シーズンの観光地をたのしむことは出来なかったが、これからの課題ややりたいことで頭をいっぱいにして山を降りた。

第一回領域班会議に参加して

片貝 智哉(関西医科大学生命医学研究所 分子遺伝学部門)

11月16、17日の2日間、港街神戸に隣接しながらも都会の喧噪から隔絶され、自然あふれる六甲山のすばらしいロケーションにて、新学術領域研

究「免疫四次元空間ダイナミクス」第一回領域班会議が行なわれました。計画班員ならびに総括・支援班員が一堂に会し、本領域の主眼である免疫の「場」とその時空間動態という観点から最新の成果や今後の計画に関する発表がおこなわれ、各班員が培ってきた経験や蓄積をベースにこの重要な問題に取り組む意気込みと熱意を語りました。私の第一印象は、これまでに我が国において「免疫組織環境」というテーマをこれほど意識して議論がなされた機会はなかったのではないかとことです。一方で、多次元で複雑な問題が山積するなか、さまざまな視点と方法論をもって取り組んでいく必要があることを痛感させられました。若手に対しては領域からの大きな期待と激励があり、私自身は一層身の引き締まる思いとともに、この研究班に参加できる喜びを改めて実感しております。初日は懇親会終了後も高濱領域長の宿所に多人数が集結し、夜遅くまで熱く濃密な(内容もさることながら人口密度と言う意味でも)議論を満喫しました。非常に刺激のある有意義な班会議であったと思います。今後はさらに公募班員の方々が多くの若手研究者が加わり、本領域が一層活気づいていくのではないかと期待しています。

第一回班会議に参加して

佐々木 尚子(大阪大学大学院医学系研究科・免疫制御学)

神戸・六甲山ホテルで行われた第一回班会議に参加させていただきました。会議では激しい討論に圧倒されましたが、他の班員の方々の成果を聞くことで、自分の意識も鼓舞されました。これまで、とにかく実験をこなすだけで精いっぱいでしたが、少し立ち止まって自分たちの研究を見直す良い機会になりました。また、懇親会でも議論に熱中するあまり、美しい神戸の夜景を一度も見ることなく、班会議は終了しました。班会議は参加したらそれで終わりではありません。研究がうまくいかないときに、技術や材料を提供し合えるような、研究者同士の交流も大切にしていきたいと思っています。実際に私たちのグループも多くのアドバイスをいただきました。また、自分の分野だけに偏らない多くの仲間に出会えたことが、大きな収穫となりました。次回の班会議では、自分の研究成果が発表されることを目標に、研究を進めていきたいと思っております。

免疫四次元ダイナミクス第一回班会議の感想

鈴木 慶(大阪大学蛋白質研究所分子創製学研究室)

私は、これまであまり免疫について勉強する機会がなかったので、今回は勉強も兼ねて参加させて頂きました。班会議では、この分野の最前線で活躍しておられる先生方のお話を聞く事ができ、この分野にあまり親しみのなかった自分にもこれから取り組んでいかねばならない問題の輪郭がようやく見えてきた気がしました。また、参加されている先生方の顔ぶれも非常に多彩で、今後これらがどのように組み合わせられていくのか考えるだけでとてもわくわくします。それぞれの発表内では、先生方の活発な意見交換が繰り広げら



れ、その勢いにただただ圧倒されてしまいました。夕食時には、先ほどまで熱く議論を交わしていた先生方が打って変わって和やかに語らう姿に、一つの大きな目標に向けて共に戦っていく研究班としてのまとまりを感じました。日程の上では、一日目の午後から二日目の午前までという実質一日の短い時間でしたが、実際に参加してみると非常に中身の濃い有意義な時間を過ごすことが出来たと思います。今回の班会議では、これから自分たちが取り組んでいく研究課題を改めて見つめ直すとともに、研究班という大きな枠の中での自分たちの役割というものを考えさせられました。自分もこの研究班の一員として、今後自分たちの強みを生かした研究でこの研究課題に果敢に挑戦していきたいと思っております。

第1回の班会議では大変お世話になりました。

中村 真人(富山大学 工学部生命工学科)

今回、初めて、この研究チームの活動に参加させていただきました。未知なる免疫現象に対して、免疫学の深い知識と思考をベースにした研究計画と、それに対しての深いディスカッションが行われ、さらにそこに最新鋭の技術も加わって、まさにこの研究班の活動で新しい時代の免疫学が拓かれていこうことを実感いたしました。自分の培ってきた技術と知識と経験をこの新学術領域に役立てるとともに、メンバーの先生方からの新たな発想とアイデアをいただいて、自らの技術をより発展させながら新しい時代を拓くチームの一助となれば幸いです。『空間と時間を征服できれば時代が変わる。』ですね!

新学術領域第一回領域会議に思う事

河本 宏(京都大学 再生医科学研究所)

この新学術領域には総括班員として参加させて頂いています。今回の領域会議は、総括班からは私の他に石川文彦先生(理研RCAI)、石井優先生(大阪大学)、中村真人先生(富山大学)が参加しました。

この班のテーマは、私の理解では、「支持細胞(ストローマ細胞)の機能」という視点から免疫系の発生、機能分化、応答の機序を解明しようとするものだと思います。ストローマ細胞の研究自体は、骨髄、胸腺、リンパ組織などについては、それぞれ異なる研究領域で長い歴史があり、各々が研究分野として確立されています。しかし、ストローマ細胞を主軸としているような分野の研究を横断的にまとめた今回のような研究領域は、これまで無かったのではないかと感じます。そういう意味で、まさに新学術領域の名にふさわしい研究テーマだと言えます。

今回の会議では、計画研究の代表者と、数人の研究分担者による発表がありました。それぞれの発表内容は学術的に非常にレベルが高く、すばらしいものばかりでした。発生学的な視点の研究から、免疫応答の機序、免疫の破綻によって起こる病気の病態生理の話まで、バランスよく配置されていて、免



疫系の統合的理解に向けての布陣としては、とてもよく構成されていると思われました。

私の研究室では、造血前駆細胞の系列決定の過程のメカニズムを主な研究課題としていますが、系列決定に環境がどう影響を及ぼすかという課題も研究しており、今回もそのような研究内容について少し話をさせて頂きました。今後も、意見交換、情報交換を通じて、本領域の研究の発展に少しでも貢献できればと思います。とはいえ実際には、貢献するというよりも、勉強させて頂く部分の方がずっと大きいとは思います。

一点、問題提起をしておきます。こういうメンバーが集まったことにより、discussionも深まり、知識や手法の共有も進むでしょう。また共同研究も自然発生的にたくさん生じるだろうと思われます。ただし、新学術領域という研究組織において期待されるのは、そういう散発的な効果ではなく、この領域ができたからこそその新機軸が形成されることだろうと思います。そういう観点でみれば、今回の発表で語られたそれぞれの計画研究の将来計画には、新しい潮流へと発展しそうなアイデアは、まだあまり見られなかったように思えました。例えば本領域の課題のひとつとしてあげられている「内分泌系や神経系などの高次生体システムと免疫系とのインターフェースの理解」について、もう少し具体的なアイデアがあってもよかったかなと思います。来年度から参加する公募研究に期待できるのかもしれませんが、継続性を考えた場合、計画研究の中で何らかの方向性が打ち出されてもいいのではないかと思います。私自身も、この領域の総括班員として、計画研究や来年度から加わる公募研究の関係者の方々とともに、今後も議論を深めていければと思います。

今後ともどうかよろしくお願いします。

タイムキーパーを務めて

笠井 道之(徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター)

よく晴れて、紅葉のみならず、小鳥たちをも上から見下すことのできる六甲山ホテルで免疫四次元空間ダイナミクス班会議はスタートした。会議は代表の高浜先生の挨拶からはじまり、研究代表者の先生がた、支援班研究者、研究分担者の順で発表が行われた。さて、私はこの班会議のタイムキーパーを務めたが、まずその役目をあらためて自分自身に説いてみた。この班会議に参加される先生方はいずれも免疫反応の場である微小環境の形成・連携・再構築に関与する細胞の機能とその機能を担うタンパク質について時間軸を含む四次元で、最先端の解析を行っている先生方なので、発表や質問がヒートアップすることは目に見えている。そうならば、発表や質問途中の水を差す無粋なベルは禁物である。たか

がタイムキーパーという向きもあるが、されどタイムキーパーであり、班会議の円滑かつ活発な運営の一端を握っていると再認識して臨んだ。班会議前には、もう一度生化学(Vol.84, No.3, 2012)などを読み返し、先生方の発表にあまり深く聞き入らないように注意をはらったつもりでいたが、それでもつい聞き入ってしまうことが度々あり、特に残り五分を知らせるためのベルが2~3分遅れてしまった。タイムキーパーの本来の務めを忠実に果たすことができなかった件につきましてはこの場を借りて深くお詫び申し上げます。しかし、その理由をあらためて考えてみると、単に各先生方の語る研究の学問的興味の深さに引き込まれただけでなく、様々な研究分野の先生たちがわざわざ集まりこの班を形成し、互いに連携し合い、新たなパラダイムを構築することの意義を語る、あるいは問いかけるということを含む発表や質問に引き込まれ、感じ入るものがあったからである。この感覚はかつて大学院生時代に初めて班会議に参加したときの感覚と共通するものがあり、本当に新しい学術領域が生まれつつあるということを感じざるを得なかった。

免疫四次元空間ダイナミクス 班会議に出席して

三井 優輔(自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスエンター)

これまで私は免疫学になじみがありませんでしたが、今回班会議に出席させていただいたことは刺激的ですばらしい機会だったと感じています。そもそも、「班会議」というものに出席すること自体、私にとっては初めてだったのですが、通常の学会では見られないような、参加された先生方同士の熱い議論に圧倒されました。私が研究している発生学の分野では近年、定量的なアプローチが目目されていますが、FACSなどを多用する免疫学は、定量的な方法論が確立されており、学ぶべきことが多いと感じました。残念ながら今回は内容を十分消化できなかったところも多かったので、免疫学の教科書を手に入れて、次回の班会議までに勉強しておこうと思います。しかし素人なりに、演者の先生方のサイエンスには衝撃的とも言えるような強い印象を受けました。そして夜の懇親会の時には昼間とは打って変わって、飲みながら楽しく、深い議論になり、勉強になりました。また二日目は嵐に見舞われたものの、初日は天気も良く、会場となった六甲山ホテルにいくまでにすばらしい紅葉を目にしながらの山道はとても楽しかったです。

これからこの領域において、未だ謎が多い分泌性蛋白質の挙動の普遍的理解を進めることで、貢献していければと考えております。どうぞよろしく願いいたします。

第2号(2013年5月号)

オンラインニュースレター第2号に寄せて

高濱 洋介(徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター)

発足から二年目を迎えた本新学術領域研究班は今春、公募班員16名の参加を得ました。研究班は、当初メンバーと連携研究者を含めて、43名の所帯となりました。新参加の班員各位は、厳格なる選考を経た強者(つわもの)ぞろい。心より歓迎いたします。また、順調に各自の研究課題を進展していかれますようにと大いに期待しております。研究支援の欄に記載していますとおり、研究班は班員の研究を支援しています。公募研究と計画研究のいずれもが支援対象です。具体的な支援要望等につきましては、いつでも遠慮なく相談いただけます幸いです。

ニュースレター第1号の記事にも書きましたように、新学術領域研究では、「研究班を組織したことでどのような学術的メリットが生じたか」を明確に打ち出すことが必要です。この観点で、新たに参加された班員各位におかれましても、「免疫四次元空間ダイナミクス」という新学術領域のめざすべきところについて積極的に考察・発信し、本学術領域の発展と定着にご協力いただければとお願い申し上げる次第です。発足時のメンバーとともに検討した内容は、領域概要や領域代表者挨拶の欄に記載しているとおりです。班会議や近く開設する班員ブログなどを通して、新班員各位を含め更なる議論を交わしていければと楽しみにしております。何卒よろしくお願い申し上げます。このような議論を開始していくためにも、このニュースレター第2号では、公募班員各位に、自己紹介を兼ねて本領域に対する考えや抱負を執筆いただければと原稿依頼をいたしました。まずは届いた文章から順に掲載し、最終的には全員からの文章をご紹介できればと思います。新学術領域「免疫四次元空間ダイナミクス」に向き合う視点と意気を交換することで、本学術領域の意義について吟味を深める端緒になればと願います。

「免疫四次元空間ダイナミクス」参加に際して

深澤 太郎(理化学研究所バイオリソースセンター)

本領域へは「胸腺Tregニッチ仮説に基づいた成熟Treg“卒業証書分子”の探索」という課題で参加させていただきます。学位取得後初めての職での研究ですが、このところやっと芽吹いてきた、そんな実感が本領域への採択通知を頂いたときに湧き上がってきました。元々は発生学に興味があり大学院では理学系研究科の生物科学専攻へ進み、そこでアフリカツメガエルのオタマジャクシの尾の再生の研究をしていました。当初は形態形成に関わるような因子の研究になるかと思っていたのですが、進めていくうちに再生には免疫系が深く関与していることがわかってきました(尾を切断したときに大きな傷口ができるので、免疫応答が起こるのは今思えば至極当然なのですが)。免疫学の講義は受けたことが無かったので、読破できそうな一番薄い免疫学の教科書を生協で買ってきたのがこの世界への第一歩でした。私は免疫学のバックグラウンドもまだ浅いのですが、著名な先生方が名を連ねる本領域へ参加させて頂くことができ、誠に恐縮に感じると同時に非常に光栄に思います。学ばせて頂くことの方が多くいかと思いますが、よろしく願い申し上げます。

新参加公募班員としての自己紹介と抱負

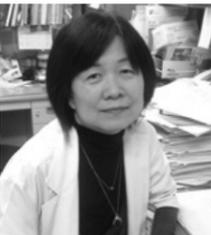
岩田 誠(徳島文理大学香川薬学部生体防御学講座教授)

本年度より公募班員として参加させて頂くことになった徳島文理大学の岩田誠です。本学は、メインキャンパスが徳島市内にあり、大学名にも「徳島」が入っておりますので、「徳島に移られて如何ですか」と聞かれることも多かったのですが、私共は、香川県の志度という町にある香川キャンパスにおります。高松の東約12kmにあります。私共の所属する「香川薬学部」は2004年にここに新設されました。私はその翌年に赴任して「生体防御学講座」を立ち上げました。セットアップに時間がかかりましたが、今では研究設備は一通り揃っており、研究と教育の両立を目指して頑張っております。本研究では、前職場から続けてきた「ビタミンAとその代謝産物レチノイン酸の免疫系における役割」の研究に基づき、小腸や腸間膜リンパ節などに存在するレチノイン酸産生樹状細胞(非炎症性「腸型樹状細胞」)の分化誘導の機序を明らかにしたいと思っております。そのために、in vivo四次元空間における樹状細胞の動きと周囲細胞との相互作用を解析し、その過程をin vitroで統合的に再現することを目指します。それによって、経口抗原特異的な炎症性およびアレルギー性疾患の新たな誘導機序の解明と、画期的な治療法確立のための基盤作りを目指したいと思っております。様々なご専門の先生方とのディスカッション、共同研究などを通じて、幅広く学ばせて頂けたらと存じます。何卒、宜しく願いいたします。

「免疫四次元ダイナミクス」研究班へ公募研究として参加して

亀谷 美恵(東海大学医学部 基礎医学系生体防御学領域)

この度、新学術領域研究「免疫四次元空間ダイナミクス」に公募研究として参加させていただきました、東海大学の亀谷です。自分の今までの研究レベルからすれば、非常に高いレベルの先生方の研究に参加させていただき、とても嬉しいと同時に身の引き締まる思いです。私は垣生研の時代から免疫研究について勉強しながら、ラボでの立ち位置として教授のサブワークの仕事を担当し続けてきましたが、ここ5年ほど、やっと自分が本当にやりたいことを研究する環境が整ってきました。留学もせず子供を持ったりしましたので、驚くほどのスロー・スターターです。さて、私は細々と癌の研究を臨床と共同で行ってきましたが、現在特に盛んである、突然変異に裏打ちされたテーラーメードの治療法とは異なる視点でこれを考えてみたいと思ってきました。癌は最終的には非常に多様でありながら、原則として共通の性質を持ちます。それは増殖・浸潤・血管新生・免疫抑制です。これを同時に持つ正常臓器を模倣した分化を癌が遂行していると考える事は理にかなっているのではないか、では、その正常臓器とは何か、そう考えて、胎盤にたどり着きました。しかし胎盤は癌にはならず、子宮筋層で浸潤は停止するので、その独特な環境、特に免疫との相互作用を解析することにより、あるべき免疫療法や分化誘導療法が見えてくるのではないかと思います。幸い私はヒトモデル動物についての研究を多く行ってきており、中でもコモンマーモセットという性成熟が早く出産数も多いユニークな霊長類の免疫系を解析するという経験があったため、比較的ヒトに近い胎盤環境を解



析するチャンスに恵まれていると思います。しかし胎盤という材料から正しい答を得るための方法論はまだ未熟です。特に豊長類については抗体などのツールが少なく、どこから切り口を探せばよいのか、また、どのようなアプローチは可能なのかについて、十分先生方を納得させられるデータが出せるかどうか不安もあります。しかし厳しい議論の中でこのプロジェクトを磨いていきたいと思っております。

厳しいご指摘とアドバイスを、どうぞよろしく御願いたします。

免疫四次元空間公募班員としての抱負

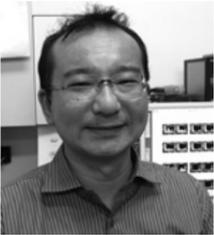
片桐 晃子(北里大学理学部生物科学科生体防御学講座)

私は、リンパ球の停止・移動の基盤となっているインテグリンLFA-1を介する接着の制御機構について研究しています。リンパ球が血流を介して全身に配置された免疫器官を巡回するための経血管内皮移動は、「場」であるHEV(高内皮細静脈)からの情報をリンパ球が受容し、Rap1シグナルを介して、LFA-1が秒単位で活性化され、血流に抗して停止することが重要です。本研究班では、まず、このRap1による速やかなLFA-1活性化の機構を解明し、HEVによっていかに制御されているのかを明らかにしたいと思っています。さらに、分単位でRAPL-Mst1シグナルを経由して、ほとんど全てのLFA-1が、細胞内からの極性輸送でリンパ球の先端部へ集積し、それが新たな接着ポイントを創り出すとともに、この接着ポイントがそのまま移動装置として機能することを見出しました。新たな接着ポイントはリンパ球が高速で飛んでいるように移動したり、方向を大きく変化させるのに重要であり、「スキップ移動」と(勝手に)呼んでいますが、これがRap1シグナルによって誘導されると考えられます。一方、接着ポイントがそのまま移動装置として機能する仕組みは、自発的なendocytosis-recyclingで、Rap1シグナルは必要ないと思われます。また、Rap1シグナル依存性の接着ポイントは、リンパ球が抗原提示細胞上で完全に停止し、免疫シナプスを形成するのに重要です。抗原刺激によって接着ポイントは移動装置ではなくドーナツ状のp-SMACとなります。このように、リンパ球は、そのリンパ器官の「場」であるストローマ細胞や樹状細胞から供給される複雑な情報を受容し、それを足場に移動する或いは停止しますので、本研究班では、まず「接着ポイント」の形成及び制御の分子基盤を明らかにし、それがどのように場からの液性因子或いは表面分子によって調節されているのかを解明したいと考えています。また、こうした研究を進展させ、これらのLFA-1制御分子を欠損させることで生じる、様々なリンパ球動態の時空間変化を、体内イメージングにより定量解析し、リンパ球の分化・選別・活性化にどのような影響を与えるのか解明したいと思っています。「場」という視点を共有することで、独自の知見を、動的な免疫システムの本質に関する本研究班ならではの研究成果に高めることができたらと願っています。

「免疫四次元空間ダイナミクス」研究班への参加に際して

田中 芳彦(九州大学生体防御医学研究所)

公募班員の九州大学生体防御医学研究所 田中芳彦と申します。私はMHC/ペプチドとT細胞受容体の相互作用に関する研究を起点として、T細胞と樹状細胞のシグナル伝達機構や免疫応答について研究を行ってきました。現在、T細胞の発生と胸腺の発育に必須であり、胸腺上皮細胞において重要な役割を担っている核内酵素に



着目して解析を進めております。

オンラインニュースレター第一号を通して第一回領域班会議の様子を拝見して、計画班員、支援班員と総括班員の先生たちがこの研究班に期待される熱い想いがよく伝わって来ました。ストローマ細胞の機能に着目し免疫系の謎を解き明かすために集結したトップランナーの先生たちと交流できるチャンスを頂き、この研究班に参加できる喜びを感じております。この夏の班会議の後に企画されているサマースクールには研究室のメンバーとともに参加させていただくことにしており、とても楽しみにしております。ご指導よろしくお願い申し上げます。

熱く、活性化して

和田 はるか(北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野)

今回私たちは「多能性幹細胞を用いた新時代移植医療における新しい免疫寛容誘導法の開発」という研究テーマで領域に参加させていただくのですが、この研究テーマに巡り合うまでに2つの大きなきっかけがありました。このたびは自己紹介も兼ねまして、触れさせていただければと存じます。

一つ目のきっかけは、横浜理研の免疫発生研究チーム(河本研)にて学ばせていただいたことです。大学院修了後、もともと興味をもって分化研究を河本宏先生(現京都大学)、桂義元先生(京都大学名誉教授)のもとに学ばせていただき、研究全般について手ほどきを受けました。その中で、血液細胞の分化プログラムの基本概念に迫る壮大な研究テーマに取り組みせていただきました。右も左もわからない状態からのスタートでしたが、熱く、根気よく教えていただき、実際の実験手法だけでなく、細胞分化の世界観、ものの見方、考え方まで教わりました。そして基礎研究に取り組む中、いずれは研究成果を臨床応用という形で社会還元したいという思いも持っておりましたが、当時としては、されどなかなか難しいだろうなあとも思っておりました。

そんな中、現所属研究室のボスでもある連携研究者の清野先生がPIとして独立される際、研究室に参加させていただくことができました。清野先生は以前、実際に移植医療に携わっていたということもあってか、ラボに集まる大学院生の中には現役の若手移植外科医もおります。“熱い”清野先生のもとに集まってきた“熱い”彼らとの出会いが二つ目のきっかけです。彼らから、優れた免疫抑制剤が存在する現在となってもなお移植臓器の免疫学的拒絶は重要な問題の一つであること、免疫抑制剤の使用による感染症の発症や腫瘍の新生など二次的な問題も決して小さくはないということを臨床現場からの生の声として聞き、移植医療の現状を現実味をもって知ることとなりました。そんな折、自身の過去の研究のことを思い出しました。河本研時代に学んだことを更に発展させ、清野研で出会った熱い彼らとともに移植医療の問題点を克服できる可能性があるのは今しかない!と思い立ち、「多能性幹細胞を用いた新時代移植医療における新しい免疫寛容誘導法の開発」という研究が生まれました。さらにこの度は「免疫四次元空間ダイナミクス」の班員に加えていただき研究を支援していただけるという大きな幸運にも恵まれました。各分野の最先端を走られている熱い先生方のもとに勉強させていただけること、研究を共にさせていただけるということは本当にありがたいことであり、感謝しております。私自身も、勉強させていただくだけでなく少しでも領域の発展に貢献できますよう、熱く活性化して、努力してまいりたいと思います。どうぞよろしく願いたします。

免疫系のはじまり？

澤 新一郎(東京大学大学院医学系研究科 免疫学)

小児科診療を行ってきた私にとって、生体防御反応としての免疫は常にリアリティのある主題であった。小児科外来に来る患者の95%が何らかの感染症と言っても過言ではないだろう。新生児から思春期早期にかけて、ヒトは急激な体の変化を遂げる。免疫系もその例外ではない。本来無菌状態である胎児が子宮外に出されるや有象無象の微生物に溢れかえる環境に暴露され、免疫系を成熟させてゆく。この過程は、一見偶然に支配されている現象のように見えるが、長い進化の過程で培われてきた必然的な(プログラムされた)要素も強いのではないだろうか。リンパ節は適応免疫応答の場として重要なことが明白であるが、子宮内無菌環境下の胎児期に形成される。あたかも出生後の修羅を予見しているかのような事例である。免疫系のはじまりをもう少し詳しく調べてみたい。これが「免疫四次元空間ダイナミクス」に応募した理由である。

公募班員として参加して

生田 宏一(京都大学ウイルス研究所)

4月からこの新学術領域に公募班員として参加させて頂いています。私たちのグループは、IL-7レセプターの機能というリンパ球側の観点からながらく研究を進めてきました。しかし、その過程で生体内の各組織・各局所でのサイトカインの実効濃度すらほとんどわかっていないことに愕然とし、数年前から本格的にサイトカインを産生する免疫微小環境を研究し始めた次第です。まったくの素人の領域でしたので、この班の多くの班員の方々にもいろいろとご指導・ご支援をいただきながら、ようやくIL-7産生性ストローマ細胞の局在といくつかの局所機能を明らかにできたところです。また、ごく最近ではIL-15産生細胞の局在についても調べていまして、IL-7産生細胞とは異なる分布をしていることがわかりつつあります。産生するサイトカンの種類によって、ストローマ細胞もいくつかのサブセットに機能的分化しているようです。今後は、この班への参加をきっかけにして、さらに「四」次元目の観点を加えて研究を展開していきたいと考えています。引き続きご指導をよろしくお願い申し上げます。

免疫四次元空間で迷子にならないように

後飯塚 僚(東京理科大学 生命医学研究所)

このたびは、公募班の一員として、「免疫四次元空間ダイナミクス」領域に参加させて頂けることになり、メールが回ってくるたびに、若手のサマースクールとか、素晴らしいイベント情報の数々に、「この班に入れてもらってよかったなあ」と喜びに浸っているのも、つかの間、「5月10日まで待つので寄稿せよ」という高浜領域代表の朝一番のメールが、寝ぼけた頭に、目覚まし代わりに、しかも顎にガツーンとクリーンヒットして、そのままリングにぶっ倒れて、10カウント聞きそうになっておりましたが、まだ、試合開始のゴングも鳴ってはないので、もう一回、ファイティングポーズを取り直して、せめて、4ラウンド



この4月からこの新学術領域に公募班員として参加させて頂いています。私たちのグループは、IL-7レセプターの機能というリンパ球側の観点からながらく研究を進めてきました。しかし、その過程で生体内の各組織・各局所でのサイトカインの実効濃度すらほとんどわかっていないことに愕然とし、数年前から本格的にサイトカインを産生する免疫微小環境を研究し始めた次第です。まったくの素人の領域でしたので、この班の多くの班員の方々にもいろいろとご指導・ご支援をいただきながら、ようやくIL-7産生性ストローマ細胞の局在といくつかの局所機能を明らかにできたところです。また、ごく最近ではIL-15産生細胞の局在についても調べていまして、IL-7産生細胞とは異なる分布をしていることがわかりつつあります。産生するサイトカンの種類によって、ストローマ細胞もいくつかのサブセットに機能的分化しているようです。今後は、この班への参加をきっかけにして、さらに「四」次元目の観点を加えて研究を展開していきたいと考えています。引き続きご指導をよろしくお願い申し上げます。



くらいまではリングの上には立っていたい、と思っている次第です。もともと、切れのあるサウスポーでも、強烈な右フックがあるファイターでも、かといって、打たれ強いタフネスでも、足を使ったスウェーバックやヒット&アウェーができる技巧派でもなく、一発、まくれ当たりのようなカウンターを狙うくらいしかできない4回戦ボクサーですが、本領域では、数あるリンパ器官の中でも、ある意味、秘境的存在である脾臓の微小環境を対象にして、その器官形成に必須の転写因子であるTlx1を発現する間葉系細胞に焦点を絞り、他組織の幹細胞解析で近年広く使用されているレポーター・細胞系譜追跡技術を応用して、脾臓間葉系細胞の起源、相互の関係性、成体組織の修復や再生における役割などについて、切り込んでいきたいと思っております。本領域には、ニッチ形成、イメージング、組織工学、数理モデルなど、四次元どころか、五次元、六次元レベルで最先端の研究を行っておられる先生が集結なさっておられるので、御助言・御協力を頂きながら、四次元空間で迷子にならないように、確実に、カウンターをヒットさせて行きたいと思っている所存であります。

迷子のための道しるべ

鈴木 敬一朗(京都大学医学研究科、AKプロジェクト)

この4月より公募班員として参加させて頂いております。私は消化器内科医としてキャリアを出発しましたが、初めの数年は「研究」という活動に自分に関わる様になるとは考えてもいませんでした。ましてや、診療を完全に離れて日々研究ばかりしている現在の状況が、改めて考えると奇妙な感じすら致します。その意味では、私は既に「四次元空間」で迷子になってしまった一人なのだと思います。このような私にとりまして、自分の研究を少しでも医学応用が可能となる方向に傾けて行く、という事は大きなテーマになっております。(少なくともそのように考える事が精神安定剂的な役割を果たしています。)「免疫四次元空間ダイナミクス」の領域には、これまでの研究から少しでも踏み出したい、また、自分のホームである医学領域に近づく為の道しるべにしたい、という思いで参加させて頂きました。実際の研究では、腸管の免疫システムがどのように全身組織での免疫恒常性に影響を与えているのか、という疑問について特にアレルギー反応に重要であるIgE産生制御の観点から取り組んで行きたいと考えております。「経口免疫寛容」の現象は100年以上前から観察されて来ましたが、医学応用に関する試みはことごとく失敗しています。この原因の一つとして、腸内細菌の関与があまり考慮されて来なかった事があるのではないかと感じており、そのような観点から少しでも新しい切り口の研究をする事ができると良いなと考えております。これから2年間大変お世話になりますけれども、ご指導の程何卒よろしく願ひ申し上げます。

免疫四次元空間への参加にあたり

高田 健介(徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター)

本年度から公募班員として参加させていただいております。「免疫四次元空間ダイナミクス」では、従来免疫学研究の中心であった血球系細胞から、場を構成する非血球系細胞(ストローマ細胞)に視点を移すことで、免疫システムの時空間的な理解を進展させることが大きな目標のひとつと理解しています。私は、米国留学中にT細胞のホメオスタシス研究に携わり、場あるいはストローマ細胞についての理解がいかに重要であるか、また、それらについて研



究する術を自分が持っていない事のもどかしさを強く感じました。これがきっかけとなって、帰国後の現在の研究に結びついています。公募研究課題では、リンパ節のなかで、もっとも解析の進んでいない部位と思われるT細胞領域辺縁領域に着目し、それを構成するストローマ細胞の特性と機能を解明したいと考えています。血球系細胞側の要素としては、これまでの検討を基にメモリーT細胞に注目しています。ストローマ細胞は単純なFACS解析ひとつとっ

第3号(2013年8月号)

「サマースクール特集」によせて

高濱 洋介(徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター)

本研究班は、今年度から公募班員およびその連携班員を加え研究者43名の所帯となり、先般7月11日から13日、第1回目のサマースクールを開催いたしました。サマースクールは次の3点を目的に企画したものです。



まず、新学術領域研究「免疫四次元空間ダイナミクス」には、免疫学、発生物学、血液学、構造生物学、組織工学など、異分野にまたがる多様な研究者が参集しています。異なる背景の多様な研究者が、緊密に研究の目的と技術およびアイデアを交換し、互いに学び合うことで、新たな学術領域に臨む視点を共有することを目的としました。

また、さまざまな背景や経験をもつ研究者が胸襟を開いて数日にわたる集中的な交流と議論を行うことで、研究領域の運営や新学術領域の将来展望や課題について認識を共有することを目的としました。

更に、各班員の研究室に所属し本研究領域の次世代を担う若手研究者の参加を促しました。若手研究者が新学術領域の今後のありかたおよび将来にわたる方向性に関する考察を深め、忌憚なく意見交換する場を提供することで、この新学術領域の本邦への定着と今後の発展に資することを目的としました。このような目的で参加者を募りましたところ、班員12名と班員の研究室に所属する若手研究者30名の合計42名の参加申込がありました。若手研究者30名の内訳は、教員9名、研究員5名、大学院生10名、学部生3名、その他3名。免疫四次元空間ダイナミクスに密接に関連する学術領域で先鋭的な研究を進めてこれら最近独立された長谷耕司先生を特別講演者としてお招きしましたので、長谷先生を加えて合計43名によるサマースクールとなりました。開催場所としては、若手研究者を中心とする研究者集団が緊密な情報交換と集中的な交流を合宿形式で行うために適した「場」として、都市圏の喧噪から離れた場所を検討しました。新しいアイデアの創造には、日常生活から距離を置いた美しい自然環境での滞在が効果的だと考え、領域代表者の故郷を班員に紹介したいとの思いも加味して、今回は徳島県海陽町の穴喰温泉を選定しました。

サマースクールでは、長谷先生による特別講演のほか、直前に開催された班会議では発表しなかった若手研究者12名による発表討論、出席者のなかでは比較的シニアな班員4名が研究者としての歩みを紹介する特別講演、そして雄大な海岸線の散策や深夜に至る車座でのグループディスカッションや意見交換会を通して、2泊3日にわたる交流を重ねました。その様子は本号投稿記事やスナップ写真から窺っていただければと思います。

開催にあたって、領域代表者として強く留意したのは次の2点です。ひとつめは、安全第一ということです。たくさんの方途有望な若手研究者を非日常

でも、リンパ球と比べて扱いが格段に難しく、研究開始当初は大変苦労しました。それらの問題を解決する過程で、本新学術領域研究が立ち上げられる前から、何人かの現班員の先生方にはしばしばアドバイスをいただきました。今後は本領域研究の班会議やサマースクールなどを通してより濃密なディスカッションができればと思っています。ご指導よろしく願い申し上げます。

に連れて行くということですので、何よりも無事に帰宅いただくことの大事さを考えつつ運営した次第です。もうひとつは、参加者各位に他人のデータやアイデアに対して品位と節度をもって臨む(プライオリティを尊重する、決して盗用しない、会議後は口外しない)ことを要求しました。併せて、サマースクール参加者と研究グループの主宰者に対して、各研究グループの未発表成果やアイデアのうち「どこまで話してよいか、何を話しては差し支えるか」について事前に合意に至っておいてほしいと何度か繰り返しアナウンスしました。サマースクールを終えた今、少なくとも上記2点については大過なく開催できたのではないかと考えています。

サマースクールではまた、優れたサイエンスを発表し、プレゼンテーションの技術に長け、ディスカッションをリードした若手研究者3名に対してベストプレゼンテーション賞を授与しました。Wntの拡散について研究する三井優輔さん、セマフォリン分子群の構造機能相関について研究する松永幸子さん、腸内細菌によるアレルギー制御について研究する中島啓さんの3名です。これらの方々には、受賞の喜びを胸に歩み続ける期間、免疫四次元空間ダイナミクス領域の次世代を担う研究者として班の宝「免疫四次元空間班宝(はんぼう)」と称することを許可いたしました。おめでとうございました。事後アンケートは、参加者43名のうち30名(70%)から回答がありました。詳細は下表のとおりですが、プログラム・ロケーション・運営・目的を含め、総合的にみても概ね良好な評価をいただきました。もちろんいくつかの点について「よくなかった」という評価がありました。とりわけ、会議室として使った和室や長いバス移動については、改善すべきとのご意見が多数ありました。一方、回答者全員から次回も開催したほうがよいとの意見をいただきました。課題については是非次回のサマースクールにて改善したいと思います。次回開催地としては、夏シーズンに東北地方で、という意見が一番多数でした。被災地支援の観点もあると考えられ、前向きに検討いたします。以上、第1回サマースクールを無事に終えることができたことを感謝とともにご報告申し上げます。今後とも新学術領域研究「免疫四次元空間ダイナミクス」の活動にご支援ご協力いただけますよう、またお気づきの点があればご教示ご指導いただけますよう、何卒よろしく願い申し上げます。

第2回班会議&第1回サマースクールの感想

松永 幸子(大阪大学蛋白質研究所・分子創製学研究室)

我々の研究室は本新学術領域の中で唯一の構造生物学分野です。免疫や発生はもちろんのこと、生体組織／細胞をほとんど扱ったことがない我々が、どれほど内容を理解できるのか…。そのような不安を胸に、研究室での勉強会で予習した免疫学の知識を携えて、京都にやってきました。班会議に出席し、ある現象や疾患、臨床に



おける問題点と結びつけて解り易く説明してくださる先生方のおかげで、なんとか各班の研究テーマを学ぶことができました。同時に、私がまだまだ勉強不足の部分を把握することもできました。これらは今後の勉強会の課題にします。

班会議に引き続き開催されたサマースクールでは各課題班の研究内容を理解していることが前提の発表が多く、先に班会議で学んでおいて良かった…と心底思いました。また、私にとって若手研究発表とは異分野の方々にと少しでも我々を知ってもらうチャンスでもありました。蛋白質の構造－機能相関に興味を持ってくださる先生方が多くいらっしゃり、たくさんの方とディスカッションできたことを本当に嬉しく思います。本サマースクールでもっとも印象深かったことは、教授の先生方が率先して若手研究者との垣根が低くなるように接してくださったことです。若手研究発表会における厳しくも親切な質疑や、夕食時の班員特別講演会でのユーモアに富んだ発表内容、夜の意見交換会での気さくな討論、グループディスカッションでの共同作業からもまた学ぶことが多くありました。このような合宿勉強会を通じて、新しい交流や共同研究が発展していくのだろうと感じ、貴重な体験をさせていただきました。最後になりましたが、この度は、ベストプレゼンテーション賞をいただき、ありがとうございました。今回の私の発表はただの問題提議に過ぎませんでしたので、「班宝」と呼ばれるには全く相応しくありません。今後は、実験データが私を後押ししてくれるよう、日々、研究に邁進していきたいと思ひます。

第1回サマースクールに参加して

野津 智尋(東京理科大学 薬学部 生命創薬科学科)

徳島県穴喰で行われたサマースクールに、この学術領域の活動として初めて参加させて頂きました。日常とかけ離れた大自然の中でどのような体験ができるのだろうとわくわくしながら、遊び半分の軽い気持ちで参加してしまったのですが、会話から垣間見える班員の方々の研究意欲の高さに初めから圧倒されました。講演に関しましては、自分の知識が乏しいために理解が追いつかない部分もあり勉強不足であることを実感いたしました。どの班員の方のお話も非常に興味深く、とても勉強になりました。また、このような機会でないと交流できない有名な先生方や研究者の方々や世代も関係なくお話できたこともとても刺激となり、私にとって良い経験ができた嬉しくっております。今後さらに知識や技術を学んでこの領域に貢献できるように研究をしていきたいと思ひます。そして今回このような貴重な場を設けていただき本当に感謝しております。ありがとうございました。

サマースクールに参加して

佐々木 尚子(大阪大学大学院医学系研究科)

サマースクールでは、大変貴重な経験をさせていただきありがとうございました。非常に有意義な時間を過ごせたこと、そして何より多くの研究者の方々に出会えたことに大変満足しています。

長谷先生のご講演は、基礎の部分から詳しく話して下さいだったので、非常にわかりやすく、興味深いものでした。これまで混乱して理解していた腸管免疫を、頭の中で整理することができました。若手研究者の発表でも、自分とは異なる技術を使った実験から様々な情報を得ることができました。



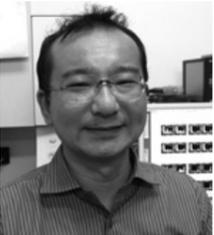
研究室にいと、自分の研究に関連する情報ばかりを収集しがちになるので、研究を更り多いものにするためのいい勉強になったと思います。また、班員の先生方の特別講演では、普段聞くことのできない研究者としての道のりや、研究に対する考え方などを聞くことができ、自分の研究者としての今後を考えていく上で、非常に参考になりました。

バックグラウンドの異なる参加者同士の交流は、これからの研究の励みにもなりました。三日間のサマースクールでは、研究発表や講演にも増して参加者の方々との出会いや交流の持つ意義は大きいと思います。これを機に、サマースクールで出会った方々との交流を続けていきたいです。

「免疫四次元空間ダイナミクス」第2回班会議と第1回サマースクールに参加して

田中 芳彦(九州大学生体防御医学研究所)

公募班員の九州大学生体防御医学研究所 田中芳彦と申します。京都大学芝蘭会館で開催された第2回班会議に参加しました。はじめに領域代表の高濱先生から本学術領域の意義と方向性についてしっかりとした指針を示していただき、この班がめざすべきところについて再確認いたしました。その後、ストローマ細胞の機能に着目し免疫系の謎を解き明かすために集結した



トップランナーの先生たちの最新の成果と今後の計画に関する発表がなされ、緊張感に満ちた活発な討論が行われました。私自身は身の引き締まる思いとともに、この研究班に参加できる喜びを改めて感じました。引き続きご指導よろしく願い申し上げます。

第1回サマースクールに研究室のメンバーとともに参加させていただきました。開催地となった徳島の穴喰は自然に恵まれたとても美しい海辺の町で、都会の喧噪から完全に隔絶された環境でのサマースクールとなりました。合宿形式でシニアから若手の研究者が寝食を共にし、サイエンスの活発な討論に没頭できるように趣向が凝らされた夢のようなサマースクールでした。研究分野や年代を越えて様々な研究者と密接に交流できたことは、参加者全員が共有できた財産であったと思います。班会議ならびにサマースクールをお世話してくださった領域代表の高濱先生をはじめとするスタッフの方々にごの場を借りてお礼申し上げます。

サマースクールに参加して

佐々木 元(北海道大学遺伝子病制御研究所 免疫生物分野)

今回はじめて、サマースクールに参加させていただきました。班員特別講演、招待講演、若手研究者発表会、屋外でのグループ討論さらに510号室での意見交換会など盛りだくさんで楽しくかつ刺激的な会でした。免疫4次元空間ダイナミクスという同じ班に所属しながらも、実は異分野の研究者の集団であり、有機的につながりをもち、互いの理解を深めるためにも、このような機会は必須であると感じました。都会から遠く離れた自然の中で、学ぶという領域代表のお言葉に感銘をうけ、納得して北海道に帰りました。貴重な経験をさせていただきありがとうございました。まだまだ知識が足りていませんがこれからも努力していきたいです。大変に有意義な初徳島であったと思っております。



班会議 感想文

近藤 博之(徳島大学医科学教育部修士1年生)

今年度から、高浜研究室に配属しました徳島大学医科学教育部修士1年生 近藤博之です。今回の班会議/サマースクールでは、研究室に入ったのが今年からなので、運営スタッフとして参加させていただきました。学部時代の卒業研究の内容が、分子シャペロンに関わることであり、免疫については素人でしたが高浜研究室に来て、現在は免疫学の知識をつけながらT細胞の成熟に関わる胸腺上皮細胞について研究にいそんでいます。班会議・サマースクールというようなものに参加することが初めて、どのようなものなんだろうと思いましたが、すごく有意義な時間が過ごせました。班会議では、先生達の研究内容を拝見し、やっぱり免疫学は奥が深くて面白いなと思ひ、サマースクールでは、自然が多い徳島県の穴喰にいき、そこでの班会議とは違った雰囲気での若手の先生達の発表も、非常に面白い内容でした。サマースクールの方の発表では、修士2年生の先輩や同学年の学生が発表していて、来年は自分もこの場で発表できるように頑張っていきたいです。

第二回班会議ならびに第一回サマースクールに参加して

高田 健介(徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター)

京都大学芝蘭会館で行なわれた第二回班会議には公募班員として参加しました。一人当たり15分という短い持ち時間、休憩をはさまずに2時間半というセッションもあり、一見かなりの強行日程のように思えましたが、自分の興味に関連する内容が豊富で、集中力をきらすことなく勉強することができました。班会議というものに参加するのは今回が初めてでしたが、一見厳しいやりとりの中にも、この新学術領域を皆で成功させようという思いが伝わってきて、通常の学会などにはない会場の一体感は新鮮でした。雰囲気飲まれて発言できませんでしたが、次回からがんばります。2日目の午後からは徳島県穴喰に場所を移し、第一回サマースクールが開催されました。こちらは若手を主な対象とした会であり、私が高浜研のメンバーということもあって、裏方スタッフとして企画の段階から関わるチャンスに恵まれました。美しい砂浜が広がる穴喰は個人的にも大好きな場所で、県外の皆さんをご案内できたことには感慨深いものがありました。都会から遠く離れて寝食をともにするうち、始めはよそよそしかった若手参加者が次第にほぐれて、最終日にはかなり活発な意見交流がされていたと思います。台風による高波で企画のいくつかが予定どおりに進まないなどのハプニングもありましたが、何とか無事に終える事ができてほっとしています。ご協力頂いた方々にお礼申し上げます。

第1回サマースクールに参加して

春若 航一路(九州大学)

この度、第1回サマースクールに参加させて頂きました、九州大学の春若航一路と申します。私は今年の4月に修士課程に入学し、飛び込んで間もないこの世界で、まだまだ右も左もわかりません。この段階で、班員の皆さんの研究内容やディスカッション、研究に対する意気を直に聞けたことは、私にとって本当に良い刺激となり、有意義な時間を過ごすことができました。夜遅く



まで続いた510号室での意見交流会は、私にとってこの夏一番の刺激でした。同志あるいは将来のライバルとなる同世代が頑張っている姿を知れたこと、そしてトップランナーの先生方も同じように若く一所懸命な時を経て今に至っていると気付けたことは、これからの研究生活に対する大きなモチベーションにつながりました。広大な太平洋を望みながら…というシチュエーションも、日々の閉じこもりがちな空間から距離を置いて客観視できる良い機会でした。

次世代の研究を切り開いていく上で私が重要だと感じているのは、研究交流の「場」が独創的な個人の力を連携させ、班員同士が連帯感を持つことです。様々な専門分野の研究者で成り立つこの領域にとって、今回の班会議・サマースクールがとても良い「場」であったことは、きっと参加した誰もが感じられていることと思います。

今回私は発表会での研究報告はできませんでしたが、班員のみなさんと連携しながらこの研究領域に貢献し、疾患克服のための社会的使命を果たせる研究者を目指して努力していきたいと思います。これからたくさんのことを学ばせて頂きたく思います。よろしくお願い致します。

免疫四次元空間 第一回サマースクールに参加して

三井 優輔(基礎生物学研究所)

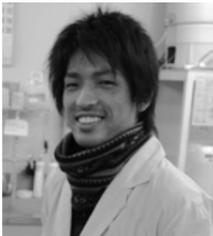
徳島県海陽町穴喰で開催された、第一回サマースクールに参加いたしました。京都での班会議から場所を移し、南国的な雰囲気のある穴喰に移動することで、気分も新たにすることができました。私は隣の香川県の出身なので四国はなじみの場所ではありますが、穴喰の海は瀬戸内とは全く違い、水平線が見えるし波も荒く、新鮮に感じました。

サマースクールでは若手の発表ということで私もWntの拡散についてお話をさせていただきました。Wntは濃度勾配により位置情報を与える物質「モルフォゲン」の事例として発生学の分野では盛んに研究されておりますが、胸腺で発現していることもあり、免疫学の研究者の方も一定の関心をお持ちなのではないかと思います。これまでに遺伝学的解析や発生学的解析により、Wntのシグナル伝達系や標的遺伝子はかなりの部分が同定されてきたと言えますが、モルフォゲンとしての性質を考えるうえで重要なWnt蛋白質の動態についての知見はまだまだ不足していると言わざるを得ません。今回はWntの動態を解析するモデル系としてアフリカツメガエルでの実験についてお話しましたが、得られた知見の中にはケモカイン、サイトカインなどの他の分泌因子の動きを理解するうえで共通する部分があるのではないかと考えております。多くの方にあまりなじみの無い話になってしまい、どのくらい伝えられたか心配しておりましたが、今回ベストプレゼンテーション賞を頂いたことは大変励みになると共に、身の引き締まる思いがいたします。今回のサマースクールは私にとって良い経験になったので、第2回のサマースクールが開催されれば、また参加できればと思います。

第2回班会議、第1回サマースクールに参加して

外丸 詩野(北海道大学大学院医学研究科 分子病理学分野)

京都での第2回班会議と、引き続き徳島の穴喰温泉で行われました第1回サマースクールに参加させて頂きました。会を通して、皆様と情報を共有す



ることで「免疫四次元空間ダイナミクス」という新学術領域の目指す研究が良く理解できましたし、大変勉強になりました。私は胸腺上皮細胞等の免疫ストローマにおけるプロテアソームの発現がT細胞選択や機能に与える影響に関して研究を進めておりますが、会ではいろいろな専門の先生のお話をお伺いすることができ、研究を進める上での貴重なアイデアやアドバイスを頂きました。この場をお借りして御礼申し上げます。ありがとうございました。

サマースクールでは徳島の南の海岸まで遠征することになりましたが、穴喰温泉の名前は初めて聞きましたので、気温の高さも含め、正直なところ参加する前は少し不安な気持ちでした。しかし、合宿のように寝食を共にする中で、参加者の皆様と打ち解け、連帯感が生まれましし、それぞれ専門分野は違えども、大先輩の先生から若手の先生まで、皆同じ方向を目指して研究をしているメンバーが集結したという感で、充実感があり、参加して本当に楽しかったです。先輩の先生方のこれまでの研究者としての歩みについてお話をお伺いできたことも、大変勉強になりました。他の会ではお伺いできないような、とても貴重なお話でした。

暑い京都、徳島でしたが、それ以上に熱いディスカッションが展開し、密度の濃い充実した4日間でした。今後もサマースクールが開催されましたら、リピーターとして是非参加したいと思っております。次の会までに、班研究に少しでも貢献できるよう、何らかの結果を出せるように継続的に努力したいと思います。今後ともどうぞよろしくお願い申し上げます。

第二回領域班会議と第一回サマースクールに参加して

増田 喬子(京都大学)

京都で行われた第二回領域班会議、引き続き徳島に場所を移してのサマースクールに総括班員である河本先生のラボの一員として参加させていただきました。班会議はそれぞれの先生方が最新のデータでアクティブに議論されており、時に出る厳しいコメントも含めて全てがよい勉強となりました。新学術領域はお互いのマテリアルやプロトコルの共有も推進しており、私達のラボからも班会議のほんの数週間前に班員の先生に細胞を供与しました。その細胞を使ったデータを班会議で発表していらっしゃるのを見て、その迅速さに驚くと共にとてもうれしく思いました。今後も色々な形で領域の班員の先生と協力し合っていければと思います。サマースクールが開催された徳島・穴喰までは京都から遠く、道中では「なぜ穴喰まで行くのだろう」と思っていました。実際に到着してみると「あえて日常から切り離された開放的な空間で開催することに意味がある」と実感しました。会場も普段の会議室とは全く違い、座敷にローテーブルというまるで寺子屋のようなスタイルが新鮮に感じました。夕食をとりながらの特別講演はシニアの先生方の研究の歴史を聞くことができ、興味深いものでした。学会のシンポジウムなどでは決して聞くことができない話を聞くことができるというのはサマースクールのような会の醍醐味だと思います。また全体的にリラックスした感じで、野外でのグループディスカッションなどでは普通では声をかけづらい先生方との距離が近いように感じられたこともうれしかったです。全体を通して4日間というすこし長いミーティングでしたが、とても内容の濃い4日間でした。次回もぜひ参加させていただきたいと思います。

「免疫四次元空間ダイナミクス」第一回サマースクールに参加して

戸村 道夫(京都大学医学研究科)

京都で行われた班会議に引き続き、高知県の県境に近い徳島県の穴喰温泉で行われたサマースクールに中堅スタッフとして参加した。5時間越えのバス移動には、遠いなあ、との感覚もあるが、私にとっては楽しい時間であった。若手発表のセッションでは私も座長を務めさせて頂いたが、専門分野の異なる研究者にも理解出来、発表も堂々としていて良かった。私は細胞・個体レベルから免疫系を理解するという視点から研究を進めているが、同じ生命現象でも視点が異なれば見えるものは当然全く異なる。タンパク質は物質であるが、その物質の動的な構造変化、細胞内外での挙動が、細胞・生命個体を支える原点・基本であることを実感できた発表を聞いた貴重な機会であった。そして、交流会において、自分たちの研究を、「生命を理解する」ことに結びつけるために自分たちの分野が現在の直面している課題と将来の可能性を語ることが出来たことも素晴らしい時間であった。同じ場所で寝食を共にするサマースクールだからこそ可能なことなのだと思う。招待講演の長谷先生の腸管免疫のお話しは、私自身の知識を最新版にupdateできた良い機会であった。若手にとっても、人間の恒常性は腸内細菌と共生することで保たれており、免疫系も例外ではない、ということを理解出来る良い機会だったのではないと思う。

私にとって特に印象深かったのは、シニアの4人の先生がたの特別講演であった。教科書の中の研究成果でなく、生きている人間が長い人生の中で一つ一つ研究を積み重ね、今の研究成果と地位を築いて来られたことを、お聞きできた。先生がたの人生談は、私たち中堅の研究者にとても元気を与えただけでなく、若手には研究に留まらずこれからの人生を将来に向けて如何に生きていくか、を考える、かけがえのない機会であったと思う。日々の生活圈、都会の喧噪から離れて過ごしたサマースクールの記憶は、一ヶ月経った今でも鮮明に残っている。日常と全く異なる空間で行う密度の高い研究者の交流は、新規研究分野の開拓と推進に重要であると思う。今後の継続した開催を期待致します。

サマースクールに参加して

中西 保貴(京都大学医学研究科AKプロジェクト戸村G)

この度は、穴喰という風光明媚な地で、貴重な経験をさせていただきまして誠にありがとうございました。基礎研究に携わって日の浅い私にとって、講演など十分に内容が理解できない事は多々ありますが、今回のサマースクールでは、最先端で活躍されている先生方より様々な経験・研究成果を非常にわかりやすく解説いただき、非常にためになりました。また、参加された皆様の研究に対する強い情熱を感じ、刺激的な会でありました。自身の研究発表(大腸炎回復期、Tregの所属リンパ節への移動)について、貴重なご意見を多くいただきましてありがとうございました。今後の研究にいかしていけるよう努力してまいります。一外科医として培ってきた経験を、4次元イメージングという手法とうまく融合させ、新たな知見が少しでも得られるよう日々精進してまいります。若輩者ではありますが、今後ともよろしくお願い申し上げます。



第 2 回班会議ならびに第 1 回サマースクールに参加して

梅本 英司(大阪大学医学系研究科・免疫制御学)

京都での第2回班会議と、引き続き行われた徳島での第1回サマースクールに参加させていただきました。免疫細胞における場の理解という大きなテーマにいかに切り込んでいくか、白熱した議論のなかで、この新学術領域が目指す方向性を感じ取ることができたのが大きかったように思います。

サマースクールの場所は、最初どうして徳島県は宍戸温泉とも思いましたが、いざ実際に始めると「日常から切り離された空間」を共有することの意義を感じました。単に一緒に長時間を過ごすというだけでなく、お互いの発表に耳を傾け議論する過程を通じて、この新学術領

第4号(2013年10月号)

ニュースレター第4号に寄せて

高濱 洋介(徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター)

新学術領域研究とは、「研究者または研究者グループにより提案された、我が国の学術水準の向上・強化につながる新たな研究領域について、共同研究や研究人材の育成等の取り組みを通じて発展させる」と規定された科学研究費の研究種目で、ひとつの領域に5年の期間が定められています。すなわち、本研究班を担う研究者には、5年間のうちに、共同研究や研究人材の育成等の取り組みを通じて、標榜する「免疫四次元空間ダイナミクス」研究領域を発展させることが求められているのです。

5年間という限られた期間のうちに、共同研究や研究人材の育成等の取り組みを実践し、それらを通して「免疫四次元空間ダイナミクス」研究領域の発展を実現させるのは並大抵のことではありません。参画する研究者ひとりひとりが新学術領域研究とは何かを理解し、本研究領域を発展・定着させる意思を持ち、それらの共有を基盤に、班員相互の生産的な共同研究を推進するとともに、次世代研究者の育成企画に寄与することが求められていることを自覚する必要があります。

今回のニュースレターは、第2号に引き続いて、公募班員の皆さんに自己紹介を兼ねて本領域に対する考えや抱負を執筆いただき発行するものです。このことについて計画班員各位とともに発足当初に検討した内容は、領域概要や領域代表者挨拶の欄に記載しております。班員各位におかれましては、是非とも「免疫四次元空間ダイナミクス」という新学術領域の目標と活動について引き続き積極的に考察・発信し、共同研究の推進を含め本学術領域の発展と定着に向けて主体的に取り組んでいただければとお願い申し上げます。

第2回班会議に参加して

七田 崇(慶應義塾大学医学部)

京都大学芝蘭会館で行われた第2回班会議に公募班員として初参加させて頂きました。「免疫四次元」という壮大なテーマのもと、幅広い免疫研究の最

域がカバーする「免疫系を構成する場」に対する共通の認識が生まれ、これを抛り所にできるような安心感が育てられた気がします。発表に関しては、いずれも興味深かったのですが、議論が盛り上がったところで次に移ることも多く、特に学生さんが質問をひねり出すには発表と質疑応答の時間配分が今後の課題とも思いました。シニア4人の先生による特別講演を伺うことができたのも大変な刺激になりました。これまでどのようにサイエンスに向かい合ってこられたか、ターニングポイントも含めて包み隠さずオープンにしてくださり、私自身、心の奥に喝を入れられ、初心に立ち返されたような気がします。私もこの免疫四次元空間の狭間でなんとか自分のニッチを見つけるべく、日々精進しなくては…と思う次第です。最後になりましたが、非常に細かい点まで配慮して運営して下さいました高濱先生と研究室の皆様(学生さんの気合いがよく伝わってきました)に深く感謝いたします。

先端にじっくりと浸ることができました。研究の内容はどれも興味深く、思わず聞き入ってしまうものばかりでした。リンパ器官形成、骨髄ニッチ、リンパ球の遊走に関する詳細なメカニズム、さらに免疫細胞の動きをとらえたイメージング技術、と今でも心に残っています。また、様々な分野で研究をされている先生方と直接お話しできたことも非常に幸せな経験でした。ありがとうございました。

どの研究発表にも斬新な視点があり、自分も多角的な視点を持つ必要があると思います。また、脳と免疫のつながりを研究するために、日常の研究生活では見過ごしていた、もっとたくさんの切り口があることに気付かされました。次の班会議でも新たな出会いを楽しみにしております。これからどうぞよろしくお願ひ致します。

二次元から三次元、そして四次元へ

濱崎 洋子(京都大学大学院医学研究科)

私はもともと大学院では上皮細胞の細胞生物学研究に携わっていました。上皮細胞の一般的な定義は、上下の極性を持ち“二次元”のシートを形成してバリア機能を担うということです。しかし、この定義を完全に無視しているにもかかわらず、何故か“上皮”とよばれている胸腺上皮細胞に遭遇しました。

上皮としては例外的に、“三次元”の網目構造を形成して組織を支え、バリア機能も持たず、T細胞分化の支持に特化した胸腺上皮細胞の成り立ちに興味を抱いて免疫学の世界に飛び込みました。T細胞の分化・選択には、胸腺組織そのものが正常に発生することが必須ですが、そのメカニズムはよく分かっていませんでした。大切なことであるにもかかわらず流行っているようにも見えないから、じっくり本質的なことに取り組めるだろうと思っていたのですが、胸腺に限らず免疫組織のストロマ細胞の研究はここ数年で急速に進展し、そ

こそこに騒がしい分野となってきました。当初のオリジナルな謎はまだ解けずにはいますが、その間私は、胸腺の中も然ることながら、T細胞も含めきわめて多様な細胞群がダイナミックに全身を駆け廻ることによって成り立つ免疫システムの妙、またそのシステムの破綻によりおこる免疫疾患の複雑さと難しさに、どんどん惹き込まれていきました。

一方で、ヒトの様々な疾患のベースともなる加齢に伴う免疫機能の低下・あるいは変容のメカニズムは、現代医学の重要な課題にもかかわらずほとんど理解されていません。これは一度正常に形成されたシステムが緩徐に破綻していくもので、生まれながらにして特定分子に機能異常を有するノックアウトマウスのような系だけでは説明しうる事象ではないはずです。こうした背景から、胸腺ストロマが分子レベルで理解されてきた今こそ、この時間軸で大きく変化する胸腺という免疫臓器を中心として、歳をとると何故免疫機能が落ちるのか?自己免疫疾患発症率が上るのか?といった単純かつ重要な問題を、今一度よく考えてみるべきなのではないかと思うようになりました。この世界に入るきっかけとなった“三次元”の謎を解けないうちから、免疫“四次元”の謎にも挑もうとすることに若干の気恥ずかしさを覚えています。自分のこの問いに真っ直ぐにじっくりと取り組んでいきたいと思っています。

胸腺微小環境に舞い戻った私ですが

新田 剛(国立国際医療研究センター研究所免疫病理研究部)

7月の班会議を欠席して高濱先生に怒られた新田です。すみません。私は以前に高濱先生のラボにて、胸腺皮質上皮細胞に発現されるプロテアソームサブユニット「β5t」の機能解析に携わりました。その後、職場を異動し、2年ほど前、飼育室で奇妙なマウスを見つけました。TNマウスと名づけたこの自然変異マウスは、胸腺でのT細胞分化が著しく低下していました。TNマウスでのT細胞分化障害はT細胞自身ではなく胸腺環境の異常に起因し、組織解析の結果、胸腺の皮質上皮細胞が欠損していることがわかりました。連鎖解析とシーケンスにより明らかになった原因遺伝子は、驚くべきことに、β5tでした。ホンマかいな?! その後、β5tの変異が皮質上皮細胞の死を引き起こすメカニズムを明らかにし、現在はこのマウスの表現型を詳しく調べることで皮質上皮細胞の生理的意義を再発見することを目標に研究を進めています。面白いことに、胸腺上皮細胞はαβT細胞の正負選択だけでなく、NKT細胞やγδT細胞サブセットの分化を個体発生に沿って巧みに制御していることがわかってきました。この時空間的に制御された細胞間相互作用の分子メカニズムを解明することが、次の大きな課題になると思います。こんな偶然の発見によって胸腺微小環境の研究分野に舞い戻った私ですが、さらに幸運なことに、「免疫四次元空間」公募班に採択していただきました。多くの幸運に支えられた研究成果が「一発屋」で終わることのないよう、本領域で得た知識、情報、人脈を活かし、今後とも自分なりの切り口で研究を進め成果を発信してゆく所存です。ご指導よろしくお願ひ申し上げます。

免疫四次元空間をさまよう記憶 B 細胞

北村 大介(東京理科大学 生命医科学研究所)

狭義の「免疫」は「二度なし現象」すなわち「獲得免疫」であり、それを担う細胞が記憶B細胞であることは昔から知られていますが、その記憶B細胞が何十年の間、増えもせず死にもせず、どこでどうやって生き長らえているのか、いまだに謎です。組織の何処にいるかくらい簡単に分かりそうなもので

が、記憶B細胞は数が非常に少なく、特有のマーカーもないので、なかなか居場所を確定できません。もちろん他のリンパ球と同様に体内を循環しているはずですが、ナイーブB細胞がリンパ節の濾胞に留まるように、記憶B細胞も一時的に隠れ家(ニッチェ)に宿り、生き長らえるための栄養を支持細胞からもらっているはずです。また、記憶B細胞にも、表面に発現する抗原受容体のアイソタイプによって色々とあり、例えばIgA記憶B細胞は粘膜組織というように、それぞれが異なる場所に宿っていても不思議ではありません。私は、記憶B細胞がニッチェにたどり着き、支持細胞と触れ合い、生存シグナルをもらうためには記憶B細胞特有の細胞表面分子が関わっているだろうと考えて、その分子群とそれらのリガンドを発現する支持細胞を明らかにしたいと思っています。この「免疫四次元空間ダイナミクス」研究班では、班員の皆さんからアイデアと靈感、アドバイスをいただいて、何とかこの記憶B細胞の謎を解明したいと思います。)

「免疫四次元空間ダイナミクス」研究班への参加にあたって

笠原 正典(北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野)

遅ればせながらご挨拶申し上げます。本年4月から公募班員として参加させていただいております。胸腺皮質上皮細胞に特異的に発現される胸腺プロテアソームの機能を主に遺伝子改変マウスを用いて解析することを計画しています。私がプロテアソームの研究を始めたのは、今から20年ほど前、田中啓二先生によって免疫プロテアソームが発見されたころに遡ります。

免疫プロテアソームを特徴付けるサブユニットはβ1i, β2i, β5iの三つですが、このうちβ1i, β5iサブユニットをコードする遺伝子はTAP1, TAP2 遺伝子と隣り合わせになってMHCのクラスII領域でコードされています。このような興味深い遺伝子配置がどのようにして形成されたのかを解析している過程で、ヒトゲノムにMHCと遺伝子組成が類似した遺伝領域が3か所存在することを見出し、脊椎動物進化の初期段階でゲノムが2回重複したとする大野 乾氏の説に強い支持を与えることになりました。また、β1i, β2i, β5iサブユニットがそれぞれβ1, β2, β5サブユニットから個々の遺伝子重複によって創られたのではなく、ゲノム重複の一環として、MHCシステムの誕生と期を一にして誕生したことが明らかになりました。これに対して、今回の研究テーマである胸腺プロテアソームを特徴づけるβ5t サブユニット遺伝子は、β5サブユニット遺伝子から直列重複によって誕生した遺伝子です。おそらく、免疫プロテアソームが誕生してから間もなくして、胸腺プロテアソームが誕生したのではないかと推測しています。それはさておき、遺伝子重複によってβ5サブユニットとは切断特異性を異にするβ5i, β5tサブユニットが創り出され、胸腺におけるT細胞選択、末梢組織における抗原提示に使われるようになったのはまさに進化の妙であると感じ入っています。遺伝子改変マウスを用いた研究の他、病理学教室としての強みを活かして、ヒト材料を用いた研究も推進したいと考えています。どうぞよろしくお願ひいたします。

第5号(2014年8月号)

科学と想像力 ―宮古海岸で考えたこと―

高木 淳一(大阪大学蛋白質研究所)

本領域の第3回全体班会議に加え、このたびサマースクールに参加させていただきました。“シニア”という位置づけで参加することになったことに少なからぬ葛藤(?)を抱えながら、宮古海岸の断崖絶壁が目の前に迫る国民休暇村で、二泊三日の有意義な時間を過ごさせていただきました。学部学生さんから若手PIまで活気のある人々と、夜遅くまでいろいろなことを話し、笑い、飲んで、あっという間の3日間でした。

唐突ですが、私はいつも「想像力」というものが、人間が磨かねばならない最大の能力だと思っています。自分以外の他人や他の物体の身になって、自分が体験したことのない、あるいは体験し得ない事象もありありと思ひ描く能力で、特に科学者には大事だと思っています。発表をするときは聴く人の身になって内容を考えるなどというのは基本だし、細胞を扱うときは自分が細胞だと思って、どんな風に扱われたいか考える、タンパク質を精製するときはタンパク質の身になって試料をあつかうことが、実験がうまくいくコツだと思っています(ただしあまりマウスの身になって考えるのはやめた方が良くもしませんが…)。

ですから自分は少なくとも人並み以上には想像力をつねに働かせているという自負もあるわけですが、今回、津波で大きく被災した宮古海岸を訪れて、いまさらながら「百聞は一見にしかず」という感慨を新たにしました。3年も経つのに、まだブルドーザーがコンスタントに稼働している状態であること、湾を襲った16mの津波の高さは、地面が突然深い海底になったも同然であること、東京オリンピックの開催決定で建設資材の調達が早くも遅れはじめ、東北の人たちが複雑な感情を抱いていること、などなど。我々の使うリサーチマネーは、東北復興の予算と地続きであることも、ますます想像力を働かせて実感しなければならぬと感じます。しかし、いや、だからこそ我々基礎研究者が何をなすべきなのか、軽薄な論理で科学が評価・批判される時代に、津波にもびくともしなかつた岸壁のような揺るがないサイエンスを打ち立てるにはどうしたらよいかを、ますます知恵を絞って考えなければならないのだと思います。

と、大上段に振りかぶってはみても、日々できることは限られます。今回久しぶりに、日常の雑事からisolateされた環境で大勢の若い人たちと身近に過ごし、自分が学生の頃と同じように皆さんがひたすら研究(実験)を楽しんで居る様子をうかがい知ることができたことで、楽観的になることもできました。ああ今も昔も我々はこうやってサイエンスをつないできたんだなあと、今更ながら平凡な感想を持った次第です。「緊張感を持ちながらもゆったりと」をキーワードに、領域研究後半を乗り切っていきたいですね。

第3回班会議に出席して：日常と非日常、そして発生学と免疫学

高田 慎治(自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター/基礎生物学研究所)

今年度の班会議は7月16、17日の2日間、岩手県の花巻温泉郷にあるホテル千秋閣にて行われました。班会議やシンポジウムをどのような場所で行うかについては常々議論のあるところですが、人間誰しも非日常の世界に身

を置けば、新たなアイデアが湧き出て来るとも言われます。そんな期待を胸に、久しぶりに夏の岩手県へと向かいました。ホテルはとても静かなところにあり、班会議の間には周囲の豊かな自然を堪能することができました。特に、片貝先生に教えられて見に行ったホテルの近傍の滝(釜淵の滝)はなかなかのものでした。このような素晴らしい環境の中で素晴らしいアイデアが湯水のごとく湧き出して来たかという、私の場合、現実さはほど甘くも単純でもなかったようです。それでも日常の世界にいる時よりも幾分解放的になったせいか、さまざまな方々と楽しく議論ができ、意義深い非日常の体験になりました。

さて、私の研究のバックグラウンドは発生学です。専門分野という言い方もされますが、そのような言葉の使い過ぎには少しばかり抵抗を感じることがあります。たしかに専門分野が何々であると表明することは、自分の研究の立ち位置を他人にわかりやすく伝えるという点でも有効ですが、その反面、専門分野という区分けに囚われすぎると、大事な何かを見落としてしまうことになりはしないかと危惧するからです。発生学や免疫学といった分野の垣根を無意識に設けてしまうことによって、発想や実験の自由度を自ら制限することに繋がってはいないか、という思いは時折頭をよぎります。

そんな折、ご縁があって「免疫四次元空間」に発生学サイドから参加させていただくことになりました。このことをHPなどで知った発生屋の仲間からは、「いったいどうしちゃったの。専門を変えるわけ？」などとよく突っ込まれています。私としては、最近の研究テーマである「細胞外微小環境でのWntタンパク質の時空間的局在」という問題を扱う系として、胸腺におけるストローマ細胞とT細胞の相互作用はベストのものの一つであるにごくシンプルに捉えているつもりです。しかしそうは言うものの、自分たちだけで胸腺の解析することはかなり厳しいというのもまた事実です。発生学という私にとっての日常的世界の延長線上に免疫学との現実的な接点を持つためには、日常と非日常を上手に結びつけるしかけが必要であり、私の場合には班員の方々からサポートをいただけることが大きいのだと実感しています。

班会議で何う多くの皆さんの研究とはこれまであまり接する機会がなかったため、私にとっての班会議は「非日常」的な気づきを得る場でもあります。例えば、発生学では研究者ごとにさまざまな細胞や組織・器官を扱うのに対して、免疫学を研究される方々は扱われる対象が主に免疫器官とB細胞、T細胞に特化されています。これだけ多くの研究者が特定の器官と細胞に集中しても、研究のテーマが次々と出て来るところは門外漢には大きな驚きですが、それと同時に、研究対象についての共通理解があるせいか、議論がいきなり本質的な深いところから始まるなと感じることが度々あり、真摯なやりとりにはたびたび感動を覚えます。一方、免疫細胞の分化や幹細胞の維持、はたまた細胞のシートを免疫細胞がどのようにすり抜けるのかといったような細胞の動態には、発生学や細胞生物学にとっても大事な問題が数多く含まれます。そのような問題においては、「日常か非日常か」「専門分野か否か」というこだわりはあまり大きな意味を持ち得ないのだということもまた実感できました。

花巻温泉で感じた非日常の開放感を日常の研究の場に上手に結びつけられるように、そして私にとって非日常の系であった胸腺微小環境との出会いが、発生学や免疫学といった区分けを超えた何かに結実するように願いつつ、これからも研究を進めて参りたいと思います。今後ともよろしくお願ひします。



「免疫四次元空間ダイナミクス」第3回班会議に出席して

福井 宣規(九州大学生体防御医学研究所)

本領域は、血液系細胞を対象とした従来の免疫学から視点を移し、リンパ器官を主とする「免疫の場」とそれらのネットワークからなる「免疫空間」の本態を解明することを目的としている。領域代表の高浜先生より、このコンセプトを初めて伺った際、その斬新さに感銘すると共に、きっと「新学術」の名にふさわしい新しい研究領域を立ち上げることができるに違いないと感じたものである。あれから2年。折り返し地点を迎えて参加した第3回班会議において、その思いは益々強くなった。骨髄ニッチの形成や胸線上皮細胞の機能発現に重要な分子が同定され、「免疫の場」の実体を分子レベルで議論出来る日もそんなに遠くはないであろう。また、若手研究者の発表も素晴らしく、この領域の発展を担ってくれる世代が確実に育っていることも頼もしく感じられた。一方私はと言うと、三次元微小環境下での免疫細胞の動態制御機構の解明に取り組んでいるが、「免疫空間連携」の本質に迫ることができる様に、もっともっと頑張らないといけないなど反省した次第である。残念ながら翌日、あるプロジェクト研究の審査委員を仰せつかっていたことから、若手での滞在は11時から18時までで、東北の今にふれる時間はなかったが、東京に向かう新幹線の中で食べたホタテ弁当は秀逸であった。

第3回班会議に出席して

石川 文彦(理化学研究所 統合生命医学科学研究センター)

花巻から鶴見(横浜市鶴見区)にもどって、第3回班会議での興奮がさめないうちに、ニュースレターへの投稿依頼が来ました。班会議では、特別講演として、石井先生がご紹介された“imagingにてひも解く免疫のダイナミクス”に圧倒され、「schemeで説明する教科書でなく、実際のeventで伝える教科書を作って、免疫学を学生に伝える」という思いにも心打たれました。特別講演の前後に組まれた班員の発表では、それぞれの進捗もすばらしく、河本先生の質疑を中心に、いつものごとく盛り上がりました。次第に熱を帯びてきて、総括班・計画班・公募班、いろいろな方が質問・コメントし、発表者も、よい緊張感のなか、今後の方針を決定するうえでヒントを得て、サマースクールに出発されたものと思います。

総括班の話し合いでは、免疫四次元空間のみならず、免疫特定領域から新学術領域へのtransition、免疫に関わるほかの新学術領域の立ち上げなど、さまざまなことが議論されました。清野先生は、免疫特定や新学術領域という班会議の、若手が成長する場としての大切な位置づけについて言及されました。免疫特定領域では、理研に赴任したばかりであった私も、免疫学のさまざまな研究、捉え方を学ぶとともに、自身の研究発表に対して多くのアドバイスをいただきました。

思い返すと、渡邊武先生と河本宏先生が企画された第1回 RCAIワークショップ(2005年2月 http://www.rcai.riken.go.jp/workshop/050218/pdf/wsposter-1.pdf)にて発表させていただいたことが、それまで免疫学と縁のなかった私が、この世界で仕事をさせていただききっかけとなりました。ワークショップでご一緒した方の何名かは、この新学術領域「免疫四次元空間」でもご一緒です。10年という歳月が経ようとしているなか、免疫を教えてくださいと先輩方に感謝し、同世代の方々と同切磋琢磨



できたことに感慨深く思います。免疫学という世界で、幾度も、大切な機会をいただいては、分からないことばかりで、勉強して臨み、その場でさまざまな指摘をされては勉強して、という繰り返してした。それこそが今に至る大切な糧となったように思います。

普段、振り返る時間などありませんが、上記のような機会をいただいた方々への感謝の思いをあらためて認識した班会議でした。そして、中継所としても名高い鶴見にて、次の世代へ良い形で襷を繋げるべく、ゴールまであと何キロかもわからないコースではありますが、懸命に走りたいと思います。

班会議・サマースクールに参加して

戸村 道夫(京都大学医学研究科)

新学術領域に参加できることの魅力は、先輩の諸先生方並びに若手研究者との縦のつながりと、自分と似た環境にいる研究者との横の交流を広げ深くできることと、班会議・サマースクールに参加し改めて実感しました。班会議終了からほぼ半日かけての移動にも関わらず、シニアから若手までが、それぞれの立場で朝から、本当に夜中まで元気に語り合いました。宮坂先生、高浜先生、高木先生によるシニアトークは、研究の公正性と自分を追い込んでの実践トークに、身を乗り出して聞き入りました。若手から中堅までの全員が話す指定発言は、とても良い試みであったと思います。みなそれぞれが当然持っているけど、日常では相談できなかつたり、相談できたとしてもなかなか自分が納得できる答えを得られなかつたり。そのような時に研究を進めて行く上で、あるいは研究者として生きていくために大切なことを語り合えたと思います。全ての世代に於いて共通する大切な事項は、ともかくがんばって進む、ということを共感できたことは私自身にとっても有意義でした。

日常を離れた自然の中で、共に過ごす時間は、お互いの連帯感を深めると密度の高い3日間でした。来年度の開催に期待致します。最後に企画・運営をして下さった、高浜先生をはじめ徳島大学のスタッフのみなさま、ありがとうございました。改めて感謝致します。

岩手での班会議とサマースクールに参加して

大久保 直(北里大学医学部・実験動物学)

夏の岩手は実に十数年ぶりと久々でした。新幹線とはいえ意外と往路は遠く感じました。おそろくそれは、この1年の研究の進展具合?と成果発表への緊張感からくるものだったのかもしれない。案の定、班会議はかなりのプレッシャーのなかでの発表となりました。私の進めている研究テーマは、胸腺原基の形成の場である咽頭弓の分節化メカニズムを理解することです。多くの班員とは常日頃観察している細胞や組織は異なりますが、様々なアプローチで「免疫の場」を研究されている演者のみなさんの成果発表を聞き、非常に勉強になりました。

続いて、花巻から宮古へ移動して行われたサマースクールは、若手の研究者や大学院生を中心に、自己紹介を兼ねた最新のデータについてのディスカッション、そしてシニア研究者との交流の場になりました。我々班員は、これま



サマースクールに参加して

三田 一帆(北里大学 理学部 生物科学科免疫学講座)

今年度から片桐研究室に所属している北里大学理学部4年生の三田一帆です。この度、岩手県陸中宮古で行われた第2回サマースクールに参加させていただきました。このような研究者が一同に集まる会に初めて参加し、非常に多くの刺激を受け、有意義な時間を過ごすことが出来ました。



研究者として一線で活躍されている方々や先輩大学院生に囲まれ、緊張ながらも自分なりの議論を展開できました。

各先生たちのプレゼンテーションを2日間聞き続けるスケジュールに最初は怯えていましたが、真剣なプレゼンテーションに時間を忘れて勉強することができ、あっという間に終わってしまった印象です。自分自身も15分間の研究発表をさせていただく機会をいただき、未熟な発表でしたが、私にとって非常に良い経験となりました。

討論会では、どのような考えで研究を進めているか・なぜ研究者になろうと思ったのか、など普段聞くことができない貴重な話が聞け、自分の将来を少し明確に意識することができたと思っています。今回、奨励賞を頂くことができましたが、私は研究を始めたばかりであり受賞するに相応しい存在ではありませんが、受賞できた事を自分自身の自信にし、日々の研究を邁進していきたいと思います。

今後さらに知識や技術を学んでこの領域に貢献できるように研究をしたいと思います。そして今回このような貴重な場を設けていただき本当に感謝しております。ありがとうございました。

班会議に出席して

澤 新一郎(東京大学大学院医学系研究科 免疫学)

以前高濱先生がブログにも紹介されたことがあるように、ヨーロッパではLymphoid Tissue meetingというものが3-4年毎に開催され、免疫器官形成、特にリンパ組織形成、胸腺上皮細胞分化、ストロマ細胞に関し濃密な議論が行われています。第1回目の会議は2006年にパリで開かれ、若手研究者として片貝智哉先生(当時京大)、鈴木敬一郎先生(当時横浜理研)も参加されていました。両先生とも既にストロマ細胞や腸管免疫で重要なお仕事をされており、まさにこれからLymphoid Tissueの領域に入っていくとする私には眩しいような存在であったと記憶しています。それから8年後、領域代表の高濱先生をはじめ、名実共にトップレベルの先生方で構成されている本領域に加えていただき、嬉しい限りであります。班会議での深い洞察に満ちた研究成果発表、鋭い質問と建設的なコメントは、私自身の研究にとっても極めて有意義なものでありました。

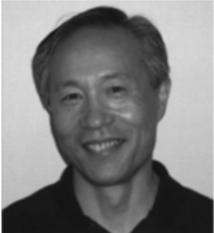
私が研究対象とする免疫器官形成では、リンパ球の研究が近年急速に進みましたが、ストロマ細胞はまだまだ研究が追いついていません。班員の先生のご協力を仰ぎつつ、この難問に対して真摯に取り組む必要性を痛感した第3回領域班会議でありました。



特別号：フィンランド便り

フィンランド人と日本人

宮坂 昌之(大阪大学)



一昨年の4月から、現在の阪大のポストの他に、フィンランド学士院のFiDiPro (Finland Distinguished Professor)という肩書をいただき、阪大と併任の形で、フィンランド・トゥルク大学のMediCity Laboratoryに年に3ヶ月ぐらい滞り、院生の指導、選抜や一部の講義を担当している。MediCity Labは、免疫細胞動態の研究でその名が知られるSirpa Jalkanen教授(女性)が主宰する研究室で、共同研究がきっかけとなって招かれることになった。フィンランド学士院とは5年契約で人件費と研究費が出る。昨年7月からは、阪大の私の研究室で博士号の仕事をした竹田彰君がポスドク研究員としてトゥルク大学のラボに参加してくれ、新しい研究が進みだしている。ここ約2年間、日本とフィンランドの間を足繁く往復する間に、日本人とフィンランド人の共通性と違いに気付き始めている。ここにそれを書いてみる。まず、共通点としては、フィンランド人も日本人と同様に、効率と正確さを好むことである。仕事の手早く、出来ることはその場で済ませてしまう。また、時間は正確で、公共の乗り物は本当に時間通りに動いている。人々はきれいな好きで、街並みはきれいだ。治安も非常に良い。

両国人ともにシャイなこともよく似ている。彼らの場合、英語が上手な人が多く、言葉のバリアは殆ど無いはずなのだが、こちらが話しかけないと向こうからどンドン話してくることはない。どちらかというと朴訥という感じの人が多い。無駄なことは話さないのである。冗談のような話だが、一説にはフィンランド人は直接顔を合わせて話をするのがあまり得意でないので、携帯電話の普及が早まったという(フィンランドにはかつて携帯電話の分野で世界首位のシェアを持っていたIT企業ノキアがあり、世界で最も早く携帯電話が普及した)。

デザイン的にシンプルなものも好むこともよく似ている。日本では北欧デザインと言うと、シンプルな良いデザインの代表とされ、スウェーデンのIKEAが有名であるが、フィンランドにもいくつもの有名デザイン企業があり、そのデザインはやはりシンプルで、飽きが来ないものが多い。また、フィンランド人も、日本人と同様、自然を愛でる。四季それぞれの食べ物を愛し、たとえば森で採れる種々のキノコやベリーが旬の食べ物で、その香りや風味を楽しむための種々のレシピがある。春、夏、秋は、森にウォーキングやランニングに出かけ、森林浴を楽しみ、海や湖ではヨットでのセーリングや、魚釣りを楽しむ。冬は街中でノルディックウォーキング(2本のストックを使ってウォーキング)や、森に出かけてクロスカントリースキーを楽しむ。自然の中で楽しみながらからだを動かすことが生活の中に取り込まれている。国民性はおだやかで、とても親切である。余計なことは言わないが、何か困っているとそれとなく声をかけてくれて、優しく教えてくれる。

このおだやかなフィンランド人が急に活発になるのは、サウナについて語る時である。サウナは殆どの人の家にある(お風呂はなくてもサウナがある)。サウナの中にはストーブがあり、電気あるいは薪を炊いて温めるサウナストーンが入っている。この石を熱して水をかけ、蒸気を出してサウナをするのである。このサウナストーンにはどんな石がいいとか、どうやって熱くするとか、どのくらい水

をかけて蒸気を出すとか、彼らがサウナについて話し出すと、延々と止まらない。仲の良い人の家に夕食に招かれると、サウナにまで招かれることがある。サウナの後は一緒に庭に出て、タオル一枚で一涼み。あるいは池や川に飛び込む。冬でもそうで、凍った池に一部分だけわざわざ氷を割って水面が見えるようにしてあり、その中にドボンと入るのである。慣れるとこれが気持ち良くなり、病み付きになるとのこと。豪快と言うかなんというか、普通の日本人には形容すべき言葉が見つからない。

日本人とフィンランド人の一番の違いは仕事時間であろう。彼らは朝早く、たとえば私の居る研究室ではテクニシャンは7時半には仕事を始めている。帰るのも早く、早い人は4時、遅い人でも5時過ぎには帰宅をする。研究者でも同様で、一日8時間以上仕事をする人が殆ど居ない。ところが、彼らはこの仕事時間でありながら、日本人に劣らないだけの成果をあげる。研究面では、しっかりと良い論文を書いて、論文の数も日本人研究者とあまり変わらない。自宅には然るべき仕事スペースと仕事環境(特にネット環境)が整備されていて、やる人は家に帰ってからやるべきことをしっかりやっている。彼らは、よく文献を読み、よく考え、そして必要な実験だけをする。出たデータはすぐに解析をして、論文の原稿を書き始める。そして余暇を見つけてしっかりと休む。すべてに無駄がない。日本人研究者に比べると、実にcivilized lifeを送っている。見ていて実に勉強になる国である。



朝焼けに映えるトゥルク大聖堂。13世紀終わり頃に建てられ、その後何度も改修を重ねて今の姿になる。トゥルク大学のすぐ横にある。

第6号(2015年6月号)

ニュースレター第6号に寄せて

高濱 洋介(徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター)

本新学術領域研究班では、班員間の情報共有と共同研究促進に資するべく、また、科学者コミュニティと一般社会への情報発信を推進すべく、オンラインニュースレターを刊行してきています。今年度の刊行予定としては、当面まず、今年度から二年間の公募研究等にて新たに参加された先生方を紹介する第6号、班会議やサマースクールなどの活動を紹介する第7号を予定しています。

この第6号では、今年度から新たに参加された先生方を対象に、自己紹介や抱負などを書いていただけないかと執筆をお願いいたしました。快く引き受けてくださいました先生方、ご多用でいらっしゃるところ誠にありがとうございました。新学術領域研究では、単なる個人研究のよせあつめではなく、活発な連携と共同に基づく新学術領域研究の科学者コミュニティへの定着と次世代研究者の育成を図ることが求められています。その観点で、このオンラインニュースレターが少しでも寄与することを願う次第です。

免疫四次元のメンバーに加えていただいて マラソンと研究

梶島 健治(京都大学医学研究科)

この度、免疫四次元の公募班に加えていただきました梶島(かばしま)です。珍しい名前とよく言われますが、徳之島から鹿児島あたりが出身となります。徳之島に行くとき梶島さんは結構いるのですが関西では稀少なため、レストランの予約などでいつも苦労しています。

さて、免疫四次元には、サマースクールで以前一度講演させていただいてからいつかメンバーに加わせていただきたいと願ってきました。そして漸く思いが通じてとても嬉しく思っています。私が専門としている皮膚は、外界とダイレクトに接しています。そして外的刺激に対して様々な免疫応答を為しますが、その詳細を理解するためには四次元での観察に大きな価値があります。従来は、皮膚生検をしても、ある一時点における二次元の情報しか得られませんでしたから時代は大きく変わってきています。

時間軸は病態の解明に大きな役割を果たすわけですが、この時間軸というのはなかなかのくせ者です。時間には、秒・分・時・日・月・年という単位があり、どれも病態を考える上で無視できない要素です。最近私たちは、物事をshort termで結論させようとしがちです。年単位の実験なんて誰もやってくれないでしょう。。。でもアトピー性皮膚炎などは年単位で病勢が動きます。この年単位の事象を捉えるためには、研究者・観察者にどこまで忍耐力があるかが重要になってきます。最近の若い人達は(こう言い始めると私も年ですわ)、自分の限界まで頑張るということをほとんど経験していないのではないかと思います。頑張りすぎて体調を壊したり、返って失敗したり、そういう経験を僕は今まで何度もしてきました。そして漸く自分の限界がわかると同時に、その限界を少しずつ広げていけたような気がします。

話は飛びますが、マラソンというスポーツに興味を持っています。最初は10kmしか走れなかったのに、今では100kmでも大丈夫になりました。京セラの稲



森会長は、以前、実業団チームを持っていてそのうちの一人がオリンピックでマラソンに出場しました。そのとき途中でトップ集団から後れてしまい、結局それでも無事に入賞しました。しかしながらその選手に稲森さんは、どうして無理してでもトップの集団についていかなかったのか!と逆鱗したそうです。体力を温存して後半勝負などと言う考えは稲森さんにはまったくないようです。限界まで走り続ける!！。これは研究にも通じる気がします。今最大限の努力ができない人は、これからもできないよ、と稲森さんは僕らにメッセージを残してくれたように感じています。そしてその精神を僕は自身にいつも課すようにしています(いつも実行できているわけではないのですが。。。それが凡人のつらいところ)。

ということで、不束な私ですが、今後ともどうぞよろしく願いいたします。

胸腺～髄質ふしぎ発見!

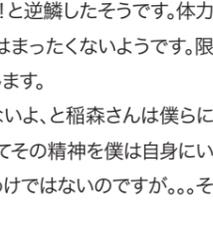
秋山 泰身(東京大学医科学研究所)

本年度より本領域に参加させていただくことになりました。よろしく願いいたします。胸腺の髄質上皮細胞は、とても不思議な細胞だと思います。次世代シークエンスによる最近の研究では、細胞で発現可能な遺伝子の87%を発現している、とのこと。精巢も多種類の遺伝子を発現することが知られていますが、それに匹敵する種類を発現していることとなります。そして、その遺伝子発現は“確率論的”であると言われています。この考えは、遺伝子発現プロファイルが1細胞ごとに異なる、との結果に基づいていると思いますが、本当に確率論で決まるのか、あるいは、これを説明できる何らかの決定論的なメカニズムが存在するのか。さらには、このような特性はどのような過程で形成されていくのか。どこから手をつけて始めればいいのか、結構難しいところですが(図1)、先生方にご意見いただきながら、少しでも解き明かすのが目標です。

リガンドーとしての矜持

穂積 勝人(東海大学医学部・生体防御学)

本年度より、新学術領域研究「免疫四次元空間ダイナミクス」に参加させていただきます、東海大学の穂積です。班員のみなさまには、様々な角度から、率直なご助言をいただけますと幸いです。よろしく願いいたします。2年前のことですが、私は国内のNotch研究者の集まりである「Notch研究会」(2006年から毎年開催、International Meetingである「The Notch Meeting」よりも古い)でのポスターセッションにて、Notchリガンドからの視点を強調し、数人の研究仲間と議論していました。その際に、ある先生が、私が数少ないNotchリガンド(Notchそのものではなく)の研究者であることを、「Notchリガンドー」、と笑顔で評してくれました。ロボットアニメにでも出てきそうな“硬そうな”名前ですが、私は何となく気に入っていて、今でも時々、この名前を名乗らせてもらっています。そもそも、Notchシステムの研究では、Notch受容体そのもの、あるいはその



シグナルが誘導する現象が主たる研究対象であり、そのあたりの登場分子の寄与が明らかになると、あたかもNotchシステムの寄与がすべて理解されたような“感覚”になるようです。「Notchリガンドー」としては、それは“錯覚”であり、完全な理解に向けた道半ばの状態であろうと考えます。それは、Notchリガンドの関与が明らかにされなければ、Notchシグナルが発生する「場所とタイミング」が確定しないからです。例えば、私の研究対象であるT細胞の分化におけるNotchシステムの寄与についても、Notch1遺伝子欠損によるT細胞分化の破綻を示す論文にて明示されました。しかし、この結果からは、Notch1がT細胞分化に必須であることがわかるのみで、Notchシグナルがいつ、どこで付与されるのか、という視点が決定的に欠けていました。その答えは、T細胞の分化環境を構成する胸腺上皮細胞でのNotchリガンド：Dll4の欠失を誘導し、結果、T細胞分化が完全に消失することをもって、胸腺へ未分化造血細胞が到達した際に、Dll4によってNotchシグナルが付与されることが明確になったわけです。

この視点は、免疫四次元空間ダイナミクス、を研究対象とする班員のみなさまには、きっとご理解いただけるものと思っています。すなわち、「いつ、どこで」その事象が発生するのか、との視点を、免疫応答あるいは免疫細胞分化の包括的理解に向けて持ち込んだ研究こそ、本領域の目指す一つの方向と推察しているからです。

しかしながら、この「リガンドー」としての視点は、研究を遂行するうえでの独特の難しさを供してくれます。例えば、私がよく使用する誘導型遺伝子欠損(Cre/loxP系)マウスを用いて実験を行う場合、受容体側の遺伝子欠失については、レポーター遺伝子(Creの発現により新たにマーカー遺伝子、蛍光タンパク質等、が発現)の使用により、ある程度モニタリングが可能であることから、表現型は、完全な遺伝子欠失が期待できなくとも、比較的容易に検出可能です。一方で、リガンドの場合は、環境を構成する分子であることから、少なくとも当該領域において100%の(あるいは限りなくそれに近い)遺伝子欠失が誘導されていることが求められます。当然、90%では、10%の残った分子の寄与を排除することがきわめて難しいからです。こうした制約は、「環境側」を研究対象にした際にとても顕著になり、常々、悪戦苦闘することになります。要は、実験が難しい…。

それでも、個体の中での本来の(!)姿を理解しようとするれば、自ずと環境側の要因に眼を向けざるをえず、こうした難点を克服したううえで、研究対象のin vivoでの正しい姿を観察したいと願っています。表に現れる現象に比較し、それを支持する環境側の研究は、多少地味に見えることが多いと思いますが、班員のみなさまが有しておられる様々な研究ツールやその使用経験を活用させていただき、環境要因としてのNotchリガンドの研究を進展させたいと考えております。班会議をはじめとした様々な機会にて、みなさまと議論できますことを楽しみにしております。今後とも、よろしく願い申し上げます。

神経系と免疫系：パラレルとクロストーク

鈴木 一博(大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

今年度より公募班員として参加させて頂くことになりました。私は4年前に研究室を立ち上げて以来、神経系による免疫制御を中心テーマに据えています。「神経系と免疫系」というと唐突に聞こえるかもしれませんが、それには私なりの伏線があります。私は大学院時代にセマフォリンの免疫系での機能解析に携わっていました。セマフォリンはもともと神経細胞の軸索のガイダンス因子として知られていた分子です。私はこの研究経験から神経系と免疫系の間には機能分子を共有するというパラレルが存在することを知り、二つの生体シス

テムの関係性に興味をもちました。そこで私が考えたのは、神経系と免疫系の間にはこのようなパラレルに加えて、機能的あるいは物理的な接点、つまりクロストークは存在しないのだろうかということです。「病は気から」と言われるように神経系が免疫系に何らかの影響をおよぼすことは昔から逸話的に語られてきましたし、文献的にも精神機能と免疫機能の関連性は20世紀の初頭から記述されていますので、神経系と免疫系のクロストークは存在するはずです。しかし、そのメカニズムはほとんどわかっていません。それで私は神経系と免疫系のクロストークのメカニズムを研究しようと考えたわけです。とは言え当時なら有望な予備データが手もとにあったわけではなく、ある程度の見通しが得られるまでにはだいぶ時間がかかってしまいましたが、交感神経がリンパ節を介したリンパ球の再循環を調節する仕組みを明らかにすることができました。この研究から交感神経系と免疫系の物理的な接点がリンパ節にあることが示唆されましたが、その実態は明らかではありません。そこで本領域で行う研究では、交感神経をリンパ節を構成するストローマ細胞と捉える視点から交感神経によるリンパ球動態調節の実態に迫ります。領域の先生方とのディスカッションや共同研究を通して、この領域の発展に貢献する成果を挙げることができると考えています。ご指導のほどよろしくお願い申し上げます。

免疫細胞は脂肪細胞がお好き?

茂呂 和世(理化学研究所統合生命医科学研究センター)

2型サイトカインを狂ったように出しまくる細胞に出逢ってから10年が経とうとしている。Group 2 ILC (Innate lymphoid cell)、通称ILC2と呼ばれるようになったこの細胞は見つけようとして見つかったものではない。当時博士課程3年生で研究テーマが決まっていなかった私は「自分は何を研究したいのか」を模索する毎日だった。「何をやってもいいよ」という寛容なボスの言葉を鵜呑みにし、今考えるとソツとするが、別段焦ることもなく気の向くままネズミと戯れる毎日を過ごしていた。その頃免疫学のことは全く分からなかったが、免疫細胞についてふしぎに思うことが2つあった。1つは「なぜリンパ節は脂肪に包まれているのか」、もう1つは「腹腔内に投与した細胞はどうしてちゃんと全身に行くのか」である。1つめについては、リンパ球をリンパ節から分離するとき感じたことで、どんなリンパ節でも脂肪組織につつまれていて、これをきれいに剥がしてあげないとぐっと細胞数が減ってしまう。また、胸腺も骨髄も加齢と共に脂肪細胞が浸潤することが切片を作製するとよくわかる。このことから、脂肪と免疫細胞にはまだ誰も知らない秘密があるのではないかと思うようになった。2つめの疑問は、細胞を移植する時に感じたことで、私は当時尾静脈内投与派だったのだが、ラボには腹腔内投与派が多数いた。免疫細胞は血液からいれるからこそ全身を駆け巡って戻るべき場所に戻るのだと主張する私に、腹腔内投与してもちゃんと戻るべき場所に戻るからいいでしょう、という腹腔内投与派。なんとなく尾静脈のほうがいい気がするものこれに反論する術を持たずとても悔しい気持ちがあったのを覚えている。ここから生まれたのが、血管が開口しているわけでもない腹腔からどうやって細胞は全身に移動するのか?という疑問である。1の疑問と2の疑問を併せて気ままに腹腔内の脂肪組織、腸間膜をいじるようになり、期せずして見つかったのがILC2である。ILC2自体はすっかり私の手を離れ、続々と新しい報告が飛び交う今日この頃である。しかし、最初の疑問、免疫細胞と脂肪細胞の謎は一向に答えがみつからない。だから私は今回頂いたこの領域班での研究する機会を使わせて頂き、脂肪組織に存在する謎のリンパ組織FALC (Fat-associated lymphoid cluster)の謎に挑みたい。ねちっこく、マニアックに、油にまみれて2年間を過ごさせて頂く所存です。



免疫四次元空間ダイナミクス 参加に際して

菊田 順一(大阪大学大学院医学系研究科・免疫細胞生物学)

この度、新学術領域研究「免疫四次元空間ダイナミクス」に公募研究として参加させていただくことになりました、大阪大学の菊田と申します。私は、研修医・リウマチ内科医として3年間病院で働いた後、大学院に進学し、生体二光子励起顕微鏡を用いて生きた骨組織内部を観察する方法論を立ち上げた石井優先生のもとで研究を開始しました。関節リウマチや骨粗鬆症における骨破



第7号(2015年8月号)

班会議に参加して

長澤 丘司(京都大学 再生医科学研究所)

平成27年度の班会議は、7月に広島市平和公園内の、代表的な近代日本建築の一つである原爆資料館の隣という、粋な場所で行われました。2日間、大部分の発表が興味深い内容で、とても勉強になりました。例えば、私たちと近い研究分野での脾臓の髄外造血微小環境を制御する転写因子の話題は印象的でした。



領域研究のよさは、領域の目標に向かうという共通点を持ちながらも参加研究者の研究内容や方向性、進め方が多様であること、多様な研究者の出会いによる忌憚のない意見交換であることを再認識できました。また、画期的な成果は必ずしも多くなかったかもしれませんが、大部分が着実な研究で、これは、我が国が誇る重要な研究姿勢であると思いました。世界的には、根拠が十分でなくとも派手なことを主張する研究が少なくありませんが、その多くが10年くらい経つと否定されるか忘れ去られてしまいます。したがって、特に若い研究者の皆さんには、焦らず、慎重な研究を進める中での大きな本物の発見を狙ってほしいと思います。評価する立場の方も、そのような研究を見抜き、短期的成果がなくても我慢して応援してほしいと思います。

免疫四次元の研究分野には取り組むべき謎が多く残っていると思いますが、着想と解明は容易ではありません。

本領域研究が、本物の発見への挑戦が持続できる研究環境作りに役立つことを願います。

第4回班会議・第3回サマースクールに参加して

片貝 智哉(新潟大学大学院医歯学総合研究科)

昨年9月に関西医科大学から新潟大学に異動いたしました。これに際して本領域の先生方には何かとお世話になる機会が多く、この場をお借りして改めてお礼申し上げます。また、今後とも何卒よろしく願ひいたします。昨年の若手で行われた第3回班会議・第2回サマースクールに参加した後、慌ただしく異動の準備を進め、8月下旬



壤に興味をもっていただ私は、破骨細胞による骨吸収の現場をin vivoで可視化するべく技術開発を行い、生体二光子励起イメージング系を改良することで、骨破壊が起きている骨の表面部分を詳細に可視化する系を開発しました。その結果、骨表面上での破骨細胞による骨破壊過程をリアルタイムで観察することに成功し、破骨細胞による骨吸収制御機構をin vivoで明らかにしました。大学院卒業後も引き続き、骨の蛍光生体イメージング技術を用いた研究を行い、生体内における免疫細胞の時空間的な挙動の可視化と動態解明に取り組んでいます。

本領域では、班会議やサマースクールなどを通して、多方面で御活躍されている先生方とたくさんディスカッションをさせていただき、幅広く学ばせていただければと思います。今後とも御指導御鞭撻の程どうぞ宜しくお願い致します。

に長らく過ごした関西を後にしました。新潟に移ってからも息つく間もなく、研究の立ち上げや講義の準備、雑務などに追われ、あっという間に1年が過ぎてしまったというのが実感です。そんな中で、今年も班会議とサマースクールが近づいてきたとき、私にとってそれが特別な意味を持っているように思えました。この1年を振り返る良い機会になったということもありますが、何よりも「免疫の場」という視点を共有できる研究者の方々が集結する貴重な場であり、最新の情報を見聞きすることで大いに刺激を受けながら他の集会では得られない充実感を味わえるからです。このような機会はなかなかないことから、私の中で年に一度の班会議の場が重要な位置付けになっているといえます。さらに、私自身が異動の前後で領域から多大なご支援を受けていることは言うまでもありませんが、班員の先生方からもさまざまなお支援・ご助力をいただき、真にこの領域に「育ててもらっている」という気持ちが益々大きくなっています。感謝の気持ちに加え、本領域の存在が大変心強く思えてなりません。

さて、今回広島で開催された班会議・サマースクールへの参加を通して感じたことは、一言で言うと「深まってきた」ということです。広島平和公園内の国際会議場という肅然とした場で行われた班会議では、領域発足時から今年で4年目となる先生方は当初の目標に向けてより一層研究内容を深めておられるという印象を強く受けました。異動にかまけて研究に遅れを生じさせている我身にとっては、尻を叩かれる思いです。また、今年は多くの公募班員の方々が新たに加わり、より広がりのある内容で魅力的な研究提案も多く、全体として領域の深みが増したように思います。各グループ間の繋がり・連携がさらに強化されれば、素晴らしい成果が生まれるのではないかと感じました。私個人としては、茂呂先生が発表されたILC2が活躍するFALCという脂肪に囲まれた組織のストローマ細胞がいったいどのようなものか、頭から離れませんでした。また、Tlx1が規定する脾臓ストローマ細胞群に関する後飯塚先生のご研究はいつも心惹かれるものがあります。総じて刺激溢れる班会議でした。

宮島の厳島神社のすぐそば、国民宿舎みやじまの杜という、こちらも類稀な口ケーションで開催されたサマースクールでは、各グループの若手による研究討論会、名古屋大学・宮田卓樹先生による招待講演、PIトーク、自由討論会、夜と、タイトなスケジュールではありましたが、濃密な時空間を満喫しました。特に研究討論会をはじめとして全体的に感じたのは、若手にも領域の特色・独自性の視点が着実に定着しているように思えたことです。サマースクールのような企画を続けている成果なのではないでしょうか。活発な議論を先導した若手の方々を大変頼もしく感じました。また、招待講演では宮田先生の徹底的に細部にこだわったご研究が圧巻でした。個人的には、いつも目の前に立体的なタンパク質があるかのように新鮮な驚きを与えてくださる高木先生のお話をまた聞けてよかったことと、「夜の部」が本丸の門を開放していたことが印象に

残っています。若手の皆さん、もっと「夜の部」に参加しましょう。ちなみに、貴重な自由時間には名物の牡蠣料理を堪能した後、数人の先生方と弥山山頂への登山を試み(もちろんロープウエーを利用)、絶景を楽しみながらも私自身は日頃の体力不足が祟り悲鳴を上げる力も失われていました。(松田先生が麓から徒歩による往復登山を達成されたことをここに書き記し、讃えさせていただきます。)

以上、2つの世界遺産に隣接した至高の「場」をセッティングし、議論を大いに促進された高濱先生の采配の妙に感銘しながら、それにどっぷりと浸かることができた4日間でした。この経験を一年の糧として、自身の研究も深めていければと思います。

第4回班会議およびサマースクールに参加して：環境が細胞に与える意味

梅本 英司(大阪大学医学系研究科・免疫制御学)

広島での7月1日～2日の班会議、続いて2日～4日のサマースクールに参加させていただきました。4日間ぶっ通しのタイトな日程はしんどいところもある反面、普段これだけまとまったテーマで発表を聞くことは限られているので、ひとつひとつの発表とその背景について、深く考えることができ、有意義な時間を過ごしました。特に、免疫四次元ダイナミクスの領域を意識した議論



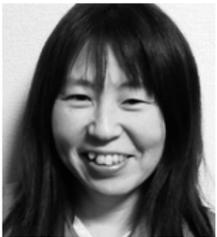
が活発に行われ、視点の共有という意味でも貴重な機会だったと思います。この領域では言うまでもなく、免疫細胞そのものに加え、免疫細胞を支える「場の役割」が重要な主題のひとつです。そのような中、今回、私が自分の中で意識させられたキーワードはアフォーダンスという概念です。これはもともと心理学者のジェームズ・ギブソンによってつくられた造語であり「環境が動物に与える意味」になります (afford = 与える・提供する)。例えば、ギブソンは、陸地の表面がほぼ水平で、平坦で、十分な広がりを持っていて、その材質が固いならば、その表面は我々の体を支えることをアフォードする、というようなことを述べています。私たちは意識的にせよ無意識的にせよ、環境から何かしらの意味を受け取って、その意味を積極的に活用するともいえるし、逆にその環境の意味に行動が制約されているとも言えます。人間が動くには重力が大事ですが、水中の微生物が動きまわるには重力よりも周囲の水の粘性のほうが大きな意味を占める(らしい)。

名古屋大学・宮田卓樹先生の本サマースクールでのご講演は目の覚めるような切り口でした。大脳皮質の形成過程において、脳の中心に近い領域で分裂した神経細胞は密な環境の中でどのように脳の表面方向に移動できるのか、ひとつの答えは、母細胞は分裂するときに一度膨らむことで環境を押しやり、この蓄積した弾性力を、分裂後に自分自身が伸張するときの起爆剤に使うとのこと。つまり、混雑した空間は、神経細胞の伸張に意味のあるアフォーダンスということになります。

身体の中で免疫細胞の周囲には、いわゆるストローマ細胞や他の免疫細胞が存在します。もちろん、そういった細胞は臓器や組織によって異なり、組織特異的な微小環境を創り出します。そのような組織特異的な微小環境は独特のアフォーダンスを免疫細胞に与えることでしょう。実際、2次元と3次元ではリンパ球の運動のしかたもそのときの分子機序も異なります。環境はいかに免疫細胞をアフォードするのか、そんな視点をもって、生体で実際に起きていることを明らかにしていきたいと思うところです。

広島での班会議に参加して

早坂 晴子(近畿大学 理工学部)



今年の班会議は、まだ本格的な夏が到来する前の平和公園内国際会議場で開かれました。4月に赴任したばかりの職場で講義と学生実習の準備に明け暮れていた私にとって、7月の班会議は久しぶりにアカデミックな討論に参加できる場でありました。第一線の班員の先生方のトークはどれもすばらしく、各研究テーマが免疫システムを「場」から理解するという点で同じ方向を向いており、さらに研究対象とする組織は違ってもお互いの研究がネットワークを形成していることに感動しました。これはまさしく、領域のテーマである「高次の機能的ネットワーク」そのものでした。特に、組織幹細胞や前駆細胞の分化に関するテーマと加齢に伴う組織微小環境の変化に関するテーマは興味深く、加齢やストレスで衰えた免疫機能を回復することによる「若返り」が近い未来に実現するのではないかと感じました。また、一日目最後の河本先生による総括班特別講演では、がん免疫の問題点と将来展望をわかりやすく解説していただき、がん免疫を正しく理解する事の重要性を改めて認識しました。今回、第一線で免疫組織を研究する先生方のトークや活発な討論にふれ、自分自身がこの領域に班員として貢献したいという思いを新たにしました。また会議の合間に平和公園と平和記念資料館を訪れることができ、広島をより身近に感じる事ができました。この時期に広島という地で会議が開催された意味を考え、この班会議で得たものを研究者・大学教員としての将来に活かしたいと思います。

ストローマと若手

松田 達志(関西医科大学 附属生命医学研究所)

本年度から本領域に加えていただきました、関西医大の松田です。本領域の班会議・サマースクールに参加するのは今回が初めてで、緊張しながら広島行きの新幹線に乗り込みました。広島平和公園内の国際会議場で行われた班会議で、緊張感を伴った研究発表・討論に度肝を抜かれた後は、宮島で行われたサマースクールにおいて、研究哲学や社会に対するサイエンスコミュニケーションの責任といった、本質的ではあるけれども普段は意識しないような内容から、最近の学生の結婚観に至るまで、非常に幅広い「議論」の波間を漂い、色々な意味で充実した3日半を過ごすことができました。

その中で印象に残ったのは、領域代表の高濱先生が「若手の育成」を領域の目標として掲げ、それを実践していらっしゃる姿でした。私も、ずいぶん前になりますが、学会の懇親会の折に、高濱先生が「質問するためにマイクの前に立つときは今でもドキドキしますよ、当たり前じゃないですか」とおっしゃるのを聞いて、質問に立つハードルが下がったのを覚えています。今回の班会議・サマースクールを通じて、ストローマの語源が、何かを「包み込んで」「支える」という意味であることを知りましたが、本領域のシニアの先生方は、まさにストローマとして後進に接して下さっているように感じました。

私自身は未だストローマとして立つ器量はありませんので、本領域に参加させていただいている間は「若手」として甘えさせていただき、少しでも大きく育つことができるよう精進したいと思います。今後とも宜しく願ひ致します。

免疫四次元空間ダイナミクス 班会議に参加して

幡野 雅彦(千葉大学大学院医学研究院)



今年度より新学術領域免疫四次元空間ダイナミクスに公募班員として参加させていただいています。さっそく7月1日～2日にかけて広島平和記念公園内の国際会議場で開催されました班会議に参加いたしました。前日新幹線の火災という前代未聞の事故があり予定より大幅に遅れて雨の中広島に到着しようなることかと思いましたが、班会議当日は梅雨の晴れ間がのぞき会議開始までの朝の時間、平和記念公園から原爆ドームへと散策をしながら改めて平和な中で自らの興味と好奇心に根ざした研究に没頭できることの幸せを感じました。班会議は免疫四次元空間ダイナミクスという名の通りその守備範囲も多岐にわたりすべての分野をフォローするのは大変でしたがそれぞれの分野における最先端の研究発表・討論があり非常に興味深く参加させていただきました。私は「腸管神経による免疫系・上皮バリア及び腸内フローラ制御」の研究課題で発表させていただきました。今回のテーマは私が留学中にT細胞白血病染色体転座部位からクローニングしたHOX11(TLX1)の相同遺伝子Ncx (Tlx2, Hox11L1)を帰国後クローニングして作製したノックアウトマウスにはじまります。20年以上も前のことで今でこそ外注や共同研究でノックアウトマウスの供与・譲渡を幅広く行っていますが当時はマウスを作る研究室も多くはなく自前でシステムを立ち上げ作成しました。幸いにして腸管神経細胞の増加をとまなうヒトHirschsprung病類縁疾患モデルマウスということで論文発表しましたがその後20年間は免疫学とは無縁のマウスでした。ところが数年前に腸炎を自然発症することまたDSS腸炎に感受性が高いことがわかり腸管神経細胞・腸管バリア機構・腸内細菌叢・腸管免疫をキーワードとして研究を進めこのたび本研究班に加えていただきました。腸管は上皮細胞を隔てて腸内細菌をはじめとする外来抗原と免疫細胞が共存しさらに第2の脳と呼ばれる腸管神経細胞が複雑なネットワークを形成しておりこれらの相互作用を研究するには格好の場といえます。班員の皆様方には今後共同研究の相談などで連絡させていただくこともあるかと思いますがよろしくご指導お願い申し上げます。

広島・宮島での班会議・サマースクールに参加して

竹ヶ原 宣子(大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

広島は高浜先生がおっしゃられていたように、まさにモニュメントです。多くの方にとってこれまでに訪れたことのある地だと思いますが、私は今回の班会議で初めて広島を訪れることとなりました。この意味でも、今回の班会議は私にとって印象深いものとなりました。私はかつて免疫応答の研究に従事していたものの、ミエロイド細胞つながりで、今はすっかり骨を溶かす破骨細胞の研究にシフトしました。このような私が免疫4次元空間ダイナミクスの班会議で、免疫のスペシャリストの先生方に加わって研究発表するということは、少なからず緊張するものでした。しかし班会議では、班員の先生方の“濃い”免疫研究に触れることができ、自分の拙い想像力を刺激され、とても勉強になりました。骨と免疫の相互作用の実態、特に生理的状況下での実態は未だ明らかではありません。班会議での刺激を今後に活かし、研究を遂行していこうと意を新たにしました。広島での班会議に続いて、世界遺産である宮島でサマースクールが開催され、

図らずとも世界遺産を訪れる好機となりました。サマースクールで設けられた5分間プレゼンテーションは、事前準備の時点で「ちょっと難しいのでは…」と思っていました。しかしながら発表者全員がきれいに5分にまとめており、時間を超過した自分としては冷や汗をかきました。5分は短い反面、集中して討論することができたと思います。また、夜の討論会で河本先生、宮坂先生が提起された問題はいずれも大変印象深く、考えさせられました。サイエンスをしていく上での公正性、またサイエンスで得られた結果を一般社会へ正しく伝えていくということの難しさを改めて認識しました。

サマースクールでは、日常お会いすることのない研究者の方々と交流する大変良い機会だったと思います。宮島の自然やおいしい特産品と一緒に満喫し、非日常の経験を共有したことは、連帯感を強める結果になったと思います。とても有意義な3日間でした。

最後に、運営を担われた高浜先生、そして高浜研の皆様に深く感謝申し上げます。

班会議・サマースクールに参加して

金谷 高史(理化学研究所統合生命医科学研究センター)

本年度より公募研究の班員として班会議およびサマースクールに参加しました。これまで私にとって新学術領域研究の「班会議」というものは敷居が高く遠い存在でしたが、今回班会議に参加したことで新学術領域研究の位置づけを多少なりとも実感できたのではないかと考えています。他の研究計画と単純に比較することはできませんが、研究目的が明瞭である、その道のエキスパートから具体的な問題点を指摘してもらえる、共同研究を計画しやすい環境である、といった点においてアドバンテージがあると考えております。もちろん討論の時間では非常に活発な意見交換が行われており、こういった討論に積極的に参加することによって研究者としてのアイデンティティが培われていくものと改めて感じました。一方でアンケートのコメントに「若手からの質問は少ない」との指摘もありました。これは自分にとっても耳が痛い話であり、今後の課題とさせていただきます。サマースクールの自由討論およびPIトークは、私にとって研究者としての姿勢を鑑みる良い機会となりました。来年度も同様な機会があると思いますが、その際に今年感じたことを少しでも消化できているよう研究に取り組みたいと思います。最後になりますが企画、運営をしてくださった高浜先生および徳島大学の皆様に深く御礼申し上げます。

第4回班会議と第3回サマースクールに参加して

門松 毅(熊本大学大学院生命科学研究部)

今年度から公募班員として参加させて頂くことになり、広島市の平和公園内にある国際会議場で行われた班会議に参加しました。班会議では、各班員がそれぞれの研究の進捗状況や研究計画についての発表を行い、活発な議論が行われました。もともと免疫学のバックグラウンドを持たない私にとっては、全ての発表内容が新鮮で大変勉強になりました。ストローマ細胞に焦点した免疫システム研究の奥深さを実感するとともに、各班員の先生方の研究内容や研究手法の多様性に感銘を受けました。今回の班会議で頂いたアドバイスや得た知識を最大限自身の研究に還元し、研究を進めて参りたいと思います。

広島市内で行われた班会議に引き続いて宮島で行われたサマースクールにも参加させて頂きました。広島市内から宮島への移動は、原爆ドームのすぐ近くから乗船できる遊覧船を利用しました。遊覧船は広島市内を流れる太田川を下り、広島湾に出た後、宮島へと向かうものでした。川を下る際はあまり揺れることもなくのんびりとしていましたが、広島湾に出てからは船のスピードがアップしたのと波の影響でなかなかの揺れを感じながら宮島に到着しました。宮島は初めてでしたので、厳島神社や参道、宮島グルメを楽しむことができました。サマースクールでは、大学院生や若手研究者の発表を中心に、自由討論会や宮田先生の招待講演、PIトークが行われ、非常に濃密で充実した時間を過ごすことができました。また、大変盛り上がった高浜先生のお部屋での交流会も含め、若手とシニア研究者の貴重な交流の場として、サマースクールは大変有意義なものであったと感じています。

最後に、班会議とサマースクールの準備や運営を行っていただきました高浜先生の研究室の皆様我心より感謝申し上げます。ありがとうございました。また、今後ともご指導のほど宜しくお願い申し上げます。

免疫四次元の研究領域に参加して思うこと

久保 允人(東京理科大学 総研機構生命医科学研究所/理化学研究所 統合生命医科学研究センター)

この度、免疫四次元の公募班に加えていただきありがとうございました。班会議に参加させていただき、以前の免疫特定班で一緒にさせて頂いた先生方や、興味の対象が似通った先生方と直接お会いして情報を交換できる機会を目の当たりにして、このような研究班の重要性を改めて感じました。

私の研究室は免疫反応において情報伝達ツールの一つとして働く液性因子サイトカインに拘って研究を行ってまいりました。その一連の研究過程の中で 今回の公募研究で採択して頂きましたE4BP4と言う時計制御に関わる転写因子に行き着きました。E4BP4はもともとT細胞ではIL-3の産生を制御する分子と言うことで、NFIL-3とも呼ばれています。T細胞系列を用いた発現解析では、特にTh2細胞で高い発現があることが知られていましたが、その意義については長い間良く分かっていませんでした。我々はTh1細胞がTh2サイトカイン、IL-10やIL-13を産生することに注目し、E4BP4はIL-10やIL-13遺伝子に対して転写因子としての発現制御に関わることを明らかにしました。その際作成したE4BP4欠損マウスでは、リンパ節は正常であるにもかかわらず、腸管の免疫器官であるパイエル板の数だけが減少していること気がつきました。これがきっかけになって、E4BP4がNK細胞を含めた自然リンパ球の分化過程でリンパ系組織形成に共通に働く転写因子Id2の発現制御に関わることが分かってきました。しかしながら、Id2の欠損はほとんどのリンパ節が無くなるのに対し、E4BP4欠損の表現系はパイエル板にしか見えません。従って、未だに何故E4BP4の欠損による影響がパイエル板だけに現れるのかは不明のまま残されたままなのです。今のところこれと言ったアイデアは現状ありませんが、この2年間で何かしらヒントを見つけていきたいと考えています。

また、E4BP4は従来から時計制御に関与する分子として報告されてきました。時計機能については、E4BP4がショウジョウバエで時計機能をもつvriItrと非常によく似た塩基性ロイシンジッパー構造を持つことから予想されています。しかしながら、欠損マウスの解析からは、それを裏付ける証拠は得られておりませんが、体内時計とTh17の関係に関与することが報告されています。この2年間で体内時計との関与についても何かしら新しい切り口が見つけられればと班会議に参加して改めて思い直しました。

第4回班会議と第3回サマースクールに参加して

菊田 順一(大阪大学大学院 医学系研究科 免疫細胞生物学)



この度、「免疫四次元空間ダイナミクス」の第4回班会議と第3回サマースクールに参加させていただきました。新学術領域そのものに参加するのが今回初めてで、班会議での発表も初日の最初のセッションだったので、雰囲気分からず緊張しましたが、先生方に的確な御指導をいただき、大変勉強になりました。今回の班会議が行われた広島国際会議場は平和記念公園内にあり、小学校の修学旅行以来、原爆ドームを見ました。戦後70年という節目の年に戦争の爪痕を見ると、感慨深いものがありました。普段何気なく研究をしていますが、平和の有難さを改めて実感しました。後半の宮島でのサマースクールは、若手中心で全員が発表するというプログラムでした。こちらも自分の発表が最初のセッションだったので、あっという間でしたが、その後の討論は楽しく参加させていただきました。宮田先生の講演は、大変分かりやすく、興味深く勉強させていただきました。河本先生と宮坂先生の自由討論会やPIトークも、普段聞けない話を聞くことができ、大変有意義な時間を過ごすことが出来ました。4日間を通して、常にディスカッションが活発で、各方面で御活躍されている先生方に囲まれて、非常にたくさんの刺激を受けました。今後、さらにこの領域に貢献できるように研究に精進していきたいと思います。最後に、班会議とサマースクールの準備、運営をして下さった、高浜先生をはじめ関係者の皆様に心より御礼申し上げます。ありがとうございました。

第三回サマースクールに参加して

高田 健介(徳島大学 疾患プロテオゲノム研究センター)

早いもので免疫空間ダイナミクスサマースクールも3回目の開催となりました。高浜研のスタッフとして、毎年、運営に携わる機会をもらっています。今回はマイクの数足りず、急遽、カラオケマシーンを引っ張りだして発表用マイクにしました。これもまた、サマースクールらしいということでご勘弁いただければと思います(個人的には宴会場に座布団という3年前のスタイルも捨てがたいです)。回を重ねることに言葉を交わす知り合いが増えるためか、今回は初日から打ち解けた雰囲気活発な議論がされたように思います。視点の共有という目標にはまだ課題が残されているかもしれませんが、少なくとも、幅広い分野の若手が集まり、学会とは違ったリラックスした雰囲気自由で自由に議論ができる場としては定着したのではないのでしょうか。今回の新たな試みが、若手研究発表やPIトークをすべて発表5分質問5分の計10分にするという高浜先生のアイデアでした。聴く側の集中力には丁度良いのですが、発表する側は大変です。あらかじめかなりの情報が共有されている専門家の集まりならまだしも、研究分野も研究経験も多様な聴衆を相手に5分で自分の研究をアピールするというのは難しく、どういう話の展開にしたら良いものか、かなり思索しました。マニアックにならぬよう気をつけたつもりでしたが、やはり危惧した通り、自分が意図したメッセージを充分に伝えられず、大変勉強になる経験でした。最後に、開催にご協力いただきました皆様にこの場をかりて感謝申し上げます。

免疫四次元空間 班会議・サマースクールに参加して

三井 優輔(基礎生物学研究所)

2年ぶりに班会議およびサマースクールに参加させていただきました。基生研の三井 優輔(みいゆうすけ)と申します。今回のサマースクールでは少し毛色の違う話ですが、分泌性蛋白質Wntの細胞レベルでの局在と細胞極性の話題でお話させて頂きました。ほぼ全員が免疫学のバックグラウンドをお持ちの免疫四次元の場に来ると、自分のバックグラウンドが発生物学であるということをご否応なしに意識させられる訳です。しかし一番参加している学会が「日本発学生物学会」で現在の所属が「分子発生物学研究部門」であるにも関わらず、実は私は発生物学に苦手意識を持っています。思えば学部生の時に分子生物学や生理学の講義は面白いと思った一方、発生物学の講義は何故かあまり頭に入っこなかったものです。その理由を考えてみると、遺伝子Aのミュータントでは表現型Aが見られる、といった遺伝学的な考え方があまり好きではない、或いは物事の理解の仕方として不十分と感じるからかもしれない、と最近になって思うようになりました。当然ながら遺伝学というのは極めて論理的、かつ厳密な手法で、本当に数えきれないほど多くの重要な発見が「遺伝学」によってもたらされたことは全く異論がありません。しかし遺伝子Aと表現型A'の間に巨大なブラックボックスが存在しているのもまた事実です。物事を理解しようとしたときに理解できた気になるのはその現象より一つ下の階層のレベルの現象で説明可能な場合ではないかと思います。そこで私は遺伝学では分からないこととして、蛋白質の挙動を見ながら細胞の形態・挙動をサブ細胞レベルのイベントで説明したいと思っています。その点、分泌蛋白質は多細胞間のコミュニケーションに関与する訳で、細胞の集合として上の階層である組織や胚の形づくりへも繋がる理解を目指す所存です。今回のサマースクールでは宮島の素晴らしい口ケーションで、多くの出会いがあり、先生方や同年代の参加者から大いに刺激を受けました。高濱先生をはじめ運営に関わられた高濱研の皆様、他の参加者の皆様に、この場を借りてお礼申し上げます。

班会議（広島）と若手サマースクール（宮島）に参加して

松永 幸子(大阪大学蛋白質研究所)

免疫四次元班会議&サマースクールは今年で2回目の参加でした。一昨年京都&徳島の会に参加した際の自身のノートを持ち込み、広島国際会議場へ。しかし、やはり、初っ端で躓きました。ILC (innate lymphoid cell) って何だろう。Aire (autoimmune regulator) ってどんな分子？繰り出される知らない単語や略語の数々に班会議一日目で圧倒されてしまいました。とにかく分かる範囲でメモって、また宿題の山。めまぐるしく発展している免疫学に驚き、まだまだ異分野の壁は厚いものだと感じました。引き続き開催された若手サマースクールは、宮島という世界遺産の地で、「人と神々が共に生きる島」というキャッチコピーそのままに、自然が多く残り、日本古来の文化を強く感じる土地でした。自由時間では軽いハイキングのつもりでロープウェイに乗り、汗ダクダクの登山になってしまいましたが、原生林の残る宮島を堪能しました。こんなに自然や文化に囲まれつつ勉強するサマースクールは他にありません。非常に贅沢な時間を過ごさせていただきました。この会に参加する度に、免疫学初心者の私が免疫四次元に対して何が出来るだろうか、自身の研究(構造生物学)の存在価値はどこにあるだろうか、と考



え悩みます。とりえず、自身の研究の魅力を最大限分かりやすく伝えることと、精一杯その時を楽しむことかなと思ひ、今回も参加させていただきました。全員とお話することはできませんでしたが、初めてお会いする人や異分野の人と話すことは良い刺激になりますし、先生方から様々なご質問やご意見を賜り、今年もまた実りある経験となりました。どうもありがとうございました。

2回目のサマースクールで感じたこと

池淵 良洋(大阪大谷大学薬学部)

昨年度、岩手県で開催されたサマースクールでは学生さんからシニアの先生までたくさんの方々と自由な討論を行えたため、今回の宮島でのサマースクールも非常に楽しみに参加させて頂きました。昨年度は初めての免疫領域の研究会への参加だったので、緊張と共に「勉強させて頂く」という姿勢で臨んでおりました。今回は、「自分の意見を言う」ことを目標に議論に参加したつもりでした。ところが、5分の極短の発表時間にも関わらず、皆様素晴らしいデータを発表され、結局意見というよりはわからない箇所を質問するといういつも通りの流れになり、まだまだ修行不足だと実感致しました。このようなチャレンジをしようと思えるのも、サマースクールの良いところだと感じております。異分野の方々と交流できることも非常にサマースクールの楽しみにしている点です。今回の場合は、特に招待講演の内容が印象的で、まさに異分野の技術や思考法を持ち出した研究には興奮しました。免疫学をもっと魅力的な領域にするためには異文化交流は必須であり、サマースクールはそのきっかけに最適な場であると思っています。私は、研究に限らず、ヒトと違う道を進もうとする性格のようで、上司である戸村先生から道を外れ過ぎないように注意を受けます。今回の私の発表に対して様々な有り難い意見を頂戴しました。その意見を聞いてやはり王道を外し過ぎてはいけないうえと思ひ自分がある一方で、皆様の素晴らしい発表とDiscussionを聞くとやっぱりこのヒト達とは違う道を行かないと闘えんと思ひ自分もいます。タバコをプカプカしながら、夜中の宮島の海岸を一人フラフラ歩き、二人の自分がアッチコッチしましたが、未だに結論はフワフワです。このように、たくさんの方々の意見をもらうことができ、自然の中でたくさん考えることができるこのサマースクールは最高の会だと思ひます。ぜひ来年も楽しみにしております。最後になりましたが、この素晴らしいサマースクールの運営を行ってくださる高浜研究室のスタッフの皆様に深く御礼申し上げます。ありがとうございました。

宮島の四次元時空間でのサマースクール

佐藤 郷介(京都大学大学院医学研究科)

広島・宮島での第3回サマースクールに参加いたしました。予めからサマースクールの盛況ぶりを伺い関心を抱いたため、本研究室の先生方へお願いして参加させていただくこととなりました。宮島は以前から訪れたかったところであり、到着早々に大鳥居まで歩いたり鹿と戯れたり干潮の宮島を楽しんで普段のラボ空間を忘れてリフレッシュした後に会場へと向かいました。

多くの著名な先生方と過ごした三日間は非常に濃密でした。学会とは違ってフランクでリラックスできる雰囲気でありながらも活発で鋭い質問の飛び交う議論は刺激的で、普段の研究の中では触れることのないイメージ分野の



研究にも触れて視野を広げる機会ともなりました。さらに先生方と近い距離感で昼夜を問わず交流させていただき多くのことを学ばせていただきました。何よりも参加して良かったことは私自身の発表について多くの意見を頂いたことでした。現在取り組んでいる研究の形が徐々にできつつあり、もっと様々な意見を伺う機会を得たいと考えていたため、今回は絶好の機会となりました。また、応援のお言葉もかけていただき今後のモチベーションにもなりました。この度は、「班宝」として若手奨励賞を賜り大変光栄に存じております。班宝の名に恥じぬよう、よい研究を目指してこれからも研鑽を積んでまいります。最後になりますが、サマースクール運営にご尽力くださった先生方にこの場を借りて感謝申し上げます。

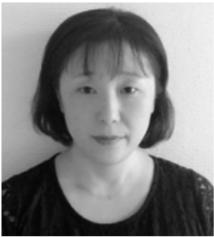
班会議とサマースクールに参加して

的場 京子(大阪大学 蛋白質研究所 分子創製学研究室)

広島平和記念公園での班会議と、それに引き続き宮島でのサマースクールに参加させていただきました。どちらの地も小学校の修学旅行以来、人生で2度目の訪問となりました。また、ちょうど会議の前月に息子が修学旅行で平和記念公園を訪れており、土産話などであらかじめ広島の予習ができたのでとても楽しみにしておりました。少し浮かれた気分で広島駅に到着しましたが、会議場に向かうタクシーの窓越しに見えた原爆ドームにまず圧倒され、急に身が引き締まる思いがいたしました。国際会議場で行われた班会議では、タイトなスケジュールの中、非常に熱いディスカッションがなされ、単に科学に対する質問やコメントだけでなく新学術領域での研究の位置付けを強く意識させるような促しが随所にあり、新学術領域ならではの会議である事を強く実感いたしました。免疫から離れた分野で研究に携わってきた私にとっては、班会議の内容はいずれも難解なもので、特に、今年度より新しく公募班で参加された先生方の御講演は初めて聴講する内容だったため、聞き漏らさないよう必死にノートをとりつつ話についていくのに精一杯でした。

頭がパンク気味になった2日間の班会議終了後、広島名物のお好み焼きを堪能してから、記念公園より出航している観光船に乗りサマースクールが開催される宮島に渡りました。さすが世界遺産というだけあって外国人の多さに驚きつつ、美しい風景を眺めながらのんびりと途中厳島神社に参拝もして会場に向かいました。夕方から早速始まった研究発表会では、発表5分、質疑応答5分という大変厳しいプレゼン条件だったにも関わらず、ほとんどの発表者が大幅な時間超過もなく、しかも手の込んだスライドで密度の濃い発表をされていきました。班会議で既にパンク寸前になった頭に更に負荷をかけるという研究発表会に対して、自由討論会では河本先生や宮坂先生の楽しいお話に声を出して笑い、張り詰めた頭のガス抜きをさせていただきました。今回、初めてサマースクールに参加させていただきましたが、班会議には参加されていなかった若手研究者の方との交流や(特に同室になった方には大変お世話になりました)、緩急のついたプログラムの中でのシニアの先生方のお話に大変刺激を受けました。

最後になりますが、この度は名誉ある班宝に認定していただき誠にありがとうございました。研究者としてはまだまだ未熟者ですが、年齢的には若手ではございませんので大変驚き恐縮いたしております。しかしながら、私のプレゼンを見た同室の若手研究者の方が、「ネガティブセレクションは何度も聞いたことがあるけど、ネガティブ染色は初めて聞きました。」という面白いコメントを下さいまして、普段、電子顕微鏡を用いた構造生物学に親しみのない研究者の方々に異分野研究を知っていただききっかけが作れたことは良かったかと思ひます。有り余る光栄である班宝の名に恥じぬよう、残り少ない期間ではあ



りますが、班会議、サマースクールで受けた刺激を活かして研究に励みたいと思ひます。

第3回サマースクールに参加して

古賀 諭(理化学研究所 統合生命医科学研究センター)

広島県宮島にて行われた第3回サマースクールに参加させて頂きました。今回、初めて参加させて頂きましたが、普段の生活から離れた合宿形式での会合であったため、先生方や同世代の方々と非常に濃密な時間を過ごすことが出来ました。各先生方の発表は、領域研究に対する視点は同じであるものの、非常に多分野にわたる研究についてのお話が多く、自身の実験に対する考え方だけでなく、研究に対する視野を広げることが出来ました。特に、発表5分、質疑5分という限られた時間の中で、自分の研究がいかにも本領域を活性化し、貢献することが出来るかを意識して発表を行うことの大切さを勉強させて頂きました。私も未熟ながら発表をさせて頂く事が出来、反省点等はありませんでしたが、貴重な経験をさせて頂きました。討論会では、シニア、若手、大学院生関係なく自由な雰囲気の中、ディスカッションを行うことが出来ました。最近問題となっている研究倫理についての討論では、実験、研究結果に対する誠実さ、忠実さを改めて考えさせられました。発表会、討論会以外の時間にも先生方と自由にお話をさせて頂き、また同世代の方々とも議論を交わす機会もあり、モチベーションを高めることが出来、あっという間の3日間でしたが、とても有意義な時間を過ごすことが出来ました。

今回、奨励賞に選んで頂き、本当に有難うございました。私自身、賞というもの頂くのは初めてであり非常に感激しておりますが、この賞に恥じぬよう「班宝」として日々の研究に精進し、努力を重ねていきたいと考えております。最後になりましたが、領域長である高濱先生をはじめ、サマースクールをコーディネートして頂いた皆様、このような若手の成長の場を与えて頂き、本当に有難うございました。この場を借りてお礼申し上げます。

サマースクールに参加して

香西 美奈(徳島大学 疾患プロテオゲノム研究センター)

サマースクールでの研究発表は、発表時間5分、質疑応答10分という時間設定でした。発表時間と質疑応答の時間が逆になっているのかな…と一瞬思いましたが、その時間設定は間違えではありませんでした。5分は短いから、6ー7分の発表にしようと思った中で密かに思っていました。高濱先生からの「5分厳守!!」という指令が下り、私の密かな野望は打ち砕かれました。何が何でも5分で発表するための準備をしました。短時間で、自分の研究内容をピンポイントで伝えるため、スライド作り、発表練習により多くの時間を費やさなければならぬことが良く分かりました。5分発表にチャレンジすべく、発表練習を重ねましたが、いざ本番になると緊張し、声はどもり、結局予定時間は、超えてしまいました。自分に与えられた時間が短ければ短いほど、ポイントをまとめ、それを聞き手に分かりやすく伝えるための入念なスライド作りと発表の準備と工夫を行わなければいけないのだということに改めて気づきました。サマースクールではほぼ初対面でありながらも寝食を共にすることで、自然と打ち解け合い、研究のことや日々の悩み等を共有しながら仲良くなる事ができ



ました。

国民宿舎から一歩外へでると、世界文化遺産の厳島神社の鳥居を眺めることができる贅沢なロケーションで、充実した3日間を過ごす事ができました。

第8号(2016年4月号)

| シンポジウム “Environment controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems” を開催して | |
|---|--|
| <p>石川 文彦(総括班員・計画研究班員、理化学研究所)</p> | |

昨年7月、広島での総括班会議にて、高浜先生よりシンポジウム開催のご依頼を頂きました。私自身は、血液学を中心に研究をしているため、「免疫四次元空間」のシンポジウムとして、どれだけ良い会を企画・運営できるか不安もありましたが、お引き受けしました。



開催にあたって、最初に決めなくてはならないことは、どなたにご講演をご依頼するかでした。年度末の開催ですので、多忙な先生方にご連絡差し上げること自体が心苦しかったのですが、ご依頼した先生方全員が、講演のご依頼を快く引き受けてくださいました。免疫学に関係する新学術領域の連携の在り方や、免疫学研究の様々な面について、若手を交えて議論することの意義を大切なものと考えてくださったのであろうと想像し、有り難く思いました。その後の準備においては、試行錯誤の連続でしたが、これまで参加するばかりでしたシンポジウム・ワークショップも、見えなところで、運営される先生方ならびにその教室・ラボのスタッフの方々の、大変なご苦労の上にあることを、今さらながら気づき、あらためて感謝の念を抱きました。

当日は、予定を超える約100名の研究者が参加し、急遽、ほかの部屋からの椅子を会場に追加に入れるほどになりました。参加者の人数もさることながら、出席した方々同士の議論、ポスター発表に対する講演者のコメント、講演における演者から若手研究者へのメッセージなど、世代を超えた活発なやり取りに会場は熱気を帯びました。

海外からいらっしゃったお一人が、「会は素晴らしかった。それでも、良かった点、改善したほうがよい点の両者を書き留めておくとよい」と言葉をかけて、帰られました。反省すべき点は、ここには記載しませんが、良かったこととして、やはり、世代を超えて語り合う貴重な機会になったことは、確かに良かったものとして挙げられます。実際にシンポジウムを運営し終わって、今回の機会を設けていただきました領域長の高浜先生の思いに、改めて感じ入りました。

今回のニュースレターへの寄稿をもって、参加してくださった皆様に改めて感謝の言葉を述べる機会とさせていただきます。とりわけ、一緒にorganizeしていただきました石井先生、茂呂先生には、どのような会にすることで若手が刺激を受けるか、ポスターやtalkの間の時間をいかに世代間の交流に使うかなど、多くのアイデアを出していただいたおかげで盛会になったと感謝しています。

ポスター発表のためやaudienceとして参加してくれた若手研究者が、近い将来、今回のゲストスピーカーの先生方のように活躍する姿を思い浮かべながら、このニュースレターの筆を置きたいと思います。そして、彼らが学会やシンポジウムなどの場でspeakerとして発表する時、私も、応援を兼ねて、audienceのひとりとして参加したいものです。

| 次世代シンポジウム 「Environment controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems」に参加して | |
|---|--|
| <p>金谷 高史(理化学研究所統合生命医科学研究センター(IMS))</p> | |

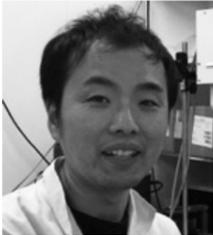
去る3月2日、当研究班と理研IMS共催のシンポジウムに参加いたしました。石川先生、石井先生、茂呂先生による素晴らしいオーガナイズの結果、IMS内外から非常に多くの研究者の方々が集まりました。小さくはない会場でしたが部屋の隅までぎっちな人が入っていたことが印象的として残っています。国内外の十数名の研究者がシンポジストとして発表し、いずれのセッションも大変盛況であったと思います。特に若手の先生が発表する際は、将来自分がそういった機会を得たとき(そういった機会が得られれば良いのですが・・・)のシミュレーションも兼ねてじっくり観察させていただきました。そのせいか百戦錬磨の先生たちからの質問はいつもより厳しく感じた気がします。私は指導している学生とともにポスターセッションの方にも参加させていただきました。

若手の先生が多かったためか、より現場に近いレベルで研究内容の討論することができ、私にとっては非常に有意義な機会となりました。私の所属するIMSでは随時セミナーが行われており、常に討論が活発に行われていますが、やはり外部の研究者を交えたシンポジウムはひと味もふた味も刺激的であると実感しました。最後になりますがおーガナイザーの石川先生、石井先生、茂呂先生およびIMSのスタッフの方々に深く御礼申し上げます。

シンポジウム” Environment controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems”に参加して

| | |
|-------------------------------------|--|
| <p>後藤 義幸(千葉大学真菌医学研究センター感染免疫学分野)</p> | |
|-------------------------------------|--|

2016年3月2日に、横浜の理化学研究所にて本領域研究との共同開催でありますシンポジウム「Environment controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems –これからの免疫学、免疫システムと環境、疾患、新技術との関わり-」に参加させていただきました。朝から晩まで最先端の研究発表が続き、極めて密度の濃い一日となりました。今回のシンポジウムの特徴として、比較的若い研究者が発表者となり、様々な分野の免疫学研究によって構成されていた事が挙げられます。まさに免疫四次元ダイナミクスという名の通り、多様な免疫学研究が一同に会し、個々の研究が独自性を保ちつつも有機的に繋がって新たな研究の展開が次々と生まれる現場を見る事ができ非常に感銘を受けました。また「宿主と環境因子」、「宿主内における免疫細胞同士」の相互作用や連携を通じて免疫システムの理解が進むと同時に、今後は各組織における免疫システムが



一個体の中でどのように影響し合うかなど、さらなる研究の展開が期待されているように感じました。お昼の時間には、大学院生を中心としたポスター発表もあり、若手のPIの先生方と積極的に議論する姿や先生方の講演時に英語で質問し、議論を活性化する姿が強く印象に残りました。個人的には研究室を立ち上げたばかりという事もあり、他の若手PIの先生方の背中を見ながら、独自性のある研究を行う必要性、新技術を自分の研究に効果的に融合させる術について考えさせられる一日となりました。再びこのような場に呼んでいただく事を目標に、真に良い研究を目指して日々精進してまいりますと存じます。石川先生、石井先生、茂呂先生はじめ本シンポジウムを準備、運営いただきました先生方、研究室の皆様には心より感謝申し上げます。今後とも何卒宜しくお願い申し上げます。

シンポジウム 「Environment controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems」に参加して

| | |
|------------------------------------|--|
| <p>川上 英良(理化学研究所 統合生命医科学研究センター)</p> | |
|------------------------------------|--|

この度、理研横浜キャンパスで行われた「免疫四次元空間ダイナミクス」のシンポジウムに参加させていただきました。声をかけていただいた石川文彦先生、また本稿の執筆の機会を与えてくださった領域長の高濱洋介先生にはこの場を借りて御礼申し上げます。免疫という数多くの細胞種、分子が関与する複雑な現象を、イメージングや最新の遺伝学的・分子生物学的手法を駆使して明らかにしようとしている諸先生方の発表には大変感銘を受けました。また、ポスター発表においては各所で熱気あふれる議論が繰り広げられており、刺激を受けました。

私は転写制御やシグナル伝達を始めとした生命現象をネットワークとして捉えて、重要な原因因子や制御メカニズムを明らかにする「ネットワークバイオロジー」いう研究を行っています。普段から、統合生命医科学研究センターで様々な先生方とコラボレーションさせていただいていますが、今回のシンポジウムの講演を聞いて、「多階層で時間的・空間的にダイナミックな現象として免疫を捉える」という方向性はネットワークバイオロジーと非常に相性がよいと感じました。近年、次世代シーケンサーや質量分析を始めとした多様なハイスルーブット測定手法が開発され、多くのデータが蓄積しつつあります。これらのデータを「時間的・空間的に」関連付け、ダイナミックなモデルを構築していくことで免疫現象の本質的な理解に繋がるのではないかと考えています。

今後も、機会がありましたらシンポジウムなどに参加させていただき、免疫に関して勉強させていただくと共に、先生方の質の高い実験研究に理論・解析面から新しい視点を僅かながら導入できれば大変嬉しく思います。

四次元 -IMS 合同シンポジウムに参加して

| | |
|------------------------------|--|
| <p>小林 由佳(田附興風会医学研究所北野病院)</p> | |
|------------------------------|--|

理研IMSで開催された“Environment controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems ”にポスタープレゼンテーションで参加をさせていただきました。5,6年ぶりの鶴見駅周辺の様子に少しばかり懐かしさを覚えながら理研横浜キャンパスを訪れました。今回のシンポジウムは、免疫学研究に携わる若い世代が集い、目標や成果を語



り合う機会となるようにとの趣旨の通り、ポスターセッションでは和やかな雰囲気のかなか、自由な討論が行われていたように感じました。わたくしも勉強不足でしたが、質問をしたり、教えを請うたりすることができ、限られた時間をとても有意義に過ごすと同時に今後に活かせる刺激を受けることが出来ました。オーラルプレゼンテーションでは先生方は大変わかりやすい講演をしてくださいました。私個人としては、stem cell nicheとcancerについて話されたProf. Andreas Trumppの講演に興味を惹かれ、stem cell nicheについての認識をアップデートすることが出来たように思います。

後ろ髪を引かれる帰路の新幹線車中において、シンポジウムを振り返った後に印象強く残ったキーワードは、“Work hard!!” 茂呂先生が発せられたメッセージであったように思います。

国際免疫学シンポジウム[5th Bizan Immunology Symposium “Immune System Development, Deviation, and Regulation”] の開催について

| | |
|--------------------|--|
| <p>高濱 洋介(徳島大学)</p> | |
|--------------------|--|

三月の第一週、本新学術領域のシンポジウムがふたつ開催された。ひとつめは3月2日、理化学研究所統合生命医科学研究センターとの共催による、次世代シンポジウム「Environment controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems」。理研横浜キャンパスで開催された。もうひとつは3月3日と4日、徳島大学革新的特色研究プロジェクト「免疫システム研究プログラム」との共催による、国際免疫学シンポジウム「5th Bizan Immunology Symposium “Immune System Development, Deviation, and Regulation”」。徳島大学蔵本キャンパスで開催された。いずれも多数の参加者があり、若手研究者を中心に活発な議論が繰り広げられた。ここでは以下、後者のシンポジウム(略称「眉山シンポ」)について、主催者の視点から簡単に報告したい。

わたしたちのいる四国には、5つの国立大学をはじめ、中小規模ながら特色ある研究機関がいくつも存在する。それらに所属する免疫学関連の研究室主宰者(現在18名)が世話人として「四国免疫フォーラム」という研究交流年次集会を運営している。今年で15年目になり、主なねらいは次世代を担う免疫学研究者を四国で育成し羽ばたかせることである。また徳島大学では、免疫学関連の研究室主宰者(現在9名)が「免疫システム研究プログラム」を形成しており、月1回の合同研究発表交流会(蔵本免疫懇話会)や年1回の合同リトリートを開催している。そこでも主眼は次世代研究者の育成・支援であり、その活動は今年で12年目を迎える。これらの活動の成果は意欲的な研究者達の輩出として、ゆっくりとではあるが着実に実を結びつつある。

こういった背景で、徳島大学の「免疫システム研究プログラム」は、大学の革新的特色研究プロジェクトのひとつとして支援を頂いており、その支援により国際シンポジウムを開催してきている。その第5回目となる今回の眉山シンポには、徳島のみならず四国を中心に約100名の参加者があった。招待演者としては、海外からGraham Anderson博士(英国)、Christoph Klein博士(ドイツ)、Masahiro Ono博士(英国)、国内から黒崎知博博士(大阪大)、大野博司博士(理研)、門脇剛光博士(香川大)、深田俊幸博士(徳島文理大)、植松智博士(千葉大)、前川洋一博士(岐阜大)、濱崎洋子博士(京大、本領域研究者)の参加があり、多様なテーマでそれぞれ良質な講演がなされた。また、若手を中心とする学内外の研究者12名による発表があり、院生諸君を含む若手研究者と招待演者らとの交流促進を主目的とする食事が開催された。スナップ写真からうかがうことができるとおり、質



思いました。2日間を通して、第一線で御活躍されている先生方の講演を聞くことができ、大変刺激を受けました。最後に、執筆の機会を与えていただきました高浜先生をはじめ、シンポジウムのオーガナイザーの先生に心より御礼申し上げます。ありがとうございました。

第5回眉山免疫シンポジウムに参加して

山下　ありさ(医薬品病態生化学分野 博士課程2年)

私が眉山免疫シンポジウムに参加させていた
だくのはこれが3回目です。ちなみに、国際学会に
参加したのも、生の英語をこれほど聞くのも3回
目。私にとってこのシンポジウムは色々な意味で
非常に貴重な機会でもあります。
毎回一番思うのはもっと英語力つきたい、という
ことです。眉山シンポジウムでは毎年著名な方々
のお話を聞くことができました。スピーカーの方々の
話をもっと理解したい、コミュニケーションが取れる
ようになりたい、といつも思っていました。「来年こそは!」、と1年が過ぎ、「撃沈する」、の繰り返
してでしたが、このシンポジウムが私の研究・英会
話の1つのモチベーション兼ペースメーカーになっ
ていました。皆さんを目標に、流暢な英語でわかり
やすく発表や会話ができるようこれからも頑張っ
ていきたいと思います。
2日目に私はマイク係を担当させていただきまし
たが、バタバタしてしまって申し訳ありません。
思いかえせば初めて参加した時のタイムキーパー
でも、ベルを上手く鳴らすことができなかつたりし
て悔悔した記憶があります。こういったお仕事をさ
せていただいたのもこのシンポジウムが初めてでし
た。大変勉強になりました。お手伝い係としても、
もっと精進していきたいと思います。
最後になりましたが、参加させていただき本当にあ
りがとうございました。

5th Bizan Symposium に参加して

増田　喬子(京都大学 再生医科学研究所)

すでに5回目となる本シンポジウムであるが、私
は3年連続で参加させていただきました。京都から
も近く、国内外から著名な研究者のお話を集中し
て聞くことができる貴重な機会の一つになっていま
す。若手にとっては、シンポジウムとは第一線で
活躍する研究者の話を聞いて勉強する場であるとい
う認識が強いように思います。ですが、本会は徳島
大学の若手研究者を中心に、若手にも発表の機会が
与えられるシンポジウムで、珍しいスタイルではな
いかと思えます。また、懇親会でも2日目の昼食会
でも、その席順やグループ分けによって、学外の研
究者と密接に交流する機会も設けられています。こ
れが毎年恒例となっているので、若手にとっては
緊張感もあるけれども非常に良い機会になっている
のではないかという印象を受けました。
本シンポジウムは、今年は高濱先生が代表を務めら
れている新学術領域「免疫4次元空間ダイナミクス
」との共催とのことでした。そのため、胸腺上皮細
胞研究の専門家としてAnderson博士(パーミンガム大学)と濱崎博士(京都大学)が学外からの招待されていま
した。胸腺はT細胞の成熟の場ですが、その成熟を
促す胸腺上皮細胞自身はどのように発生・分化する
のかという疑問に対し、高濱領域長や両博士を含む
複数のグループの研究成果によって、近年大きく理
解が進みました。その最先端のお話を聞く機会が得
られ、大変嬉しく思いました。その他、免疫学の様
々な分野についてのテーマが設定されており、どの
研究も非常に興味深いものでした。記憶B細胞がで
きるメカニズムにつ

いて(大阪大学、黒崎博士)、腸管において抗原の取
り込みを担う細胞について(理研、大野博士)、亜鉛
が免疫系に及ぼす影響について(徳島文理大学、深
田博士)などのお話を聞くことができ、また懇親会
や休憩時に先生方とお話しさせていただいたことで
、疑問に思っていたことを解消することもできまし
た。このプログラムが来年度以降も存続するかどう
かはまだ未定であるとのことでしたが、是非継続し
て開催していただければと願っております。

シンポジウム「Environment controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems」に参加して

有田　誠(理化学研究所統合生命医科学研究センター)

過日、理研IMSにて国際シンポジウム「Environment controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems」が開催されました。私は理研IMSのメンバー、そして平成27年度から発足した新学術領域「リポクオリティ」の代表として、本シンポジウムの世話人である石川文彦先生からお声がけいただき、参加させていただきました。当日は120名を超える参加者で、会場はほぼ満杯となる大盛況でした。当初本シンポジウムの趣旨は、若手研究者や大学院生のモチベーションが高まるような領域横断的な機会を設けることと伺っており、実際に口頭発表に加えて多くのポスター発表があり、若手中心に活発な議論がなされていました。プログラム全体としては何か一つのテーマというよりはむしろ、多様な分野からサイエンスとして面白い演題を集めたように思われ、若手にとっても刺激的であり私自身も大いに楽しむことができました。本シンポジウムの主題である「生体と環境との相互作用」は、我々の研究領域においても主要なテーマです。生体は常に外界(環境因子)の変化を感知して、適応することにより恒常性を維持しています。一方で脂質は「場」を作ることができる生体分子であり、生体膜の構成成分や生理活性物質の前駆体としていち早く環境変化を感知し、その局在や代謝の変化が様々なシグナル伝達に寄与していると考えられています。また、腸内細菌と宿主免疫系との相互作用や免疫細胞と周辺組織との相互作用などにおいても、脂溶性代謝物によるコミュニケーションの存在が示唆されています。このような低分子の動態を高精度に測定・可視化し、目的の生命現象との関連性を見出すためには、最新の質量分析技術は大いに威力を發揮します。今回のシンポジウムには当領域からも多くの若手研究者が発表・参加させていただきました。このような機会を通して領域横断的な交流が生まれ、新たな研究の枠組みが生まれるきっかけになればと願います。最後に、本シンポジウムのオーガナイザー(石川文彦先生、茂呂和世先生、石井優先生)に感謝申し上げます。



第9号(2016年8月号)

第5回班会議、第4回サマースクールに参加して

宮坂　昌之(大阪大学未来戦略機構・生体統御ネットワーク医学教育プログラム)

7月6日から「免疫四次元空間ダイナミクス」の第5回班会議、第4回サマースクール(若手研修会)が行われた。今年は、5年プロジェクトの最終年度であり、領域代表者の高浜先生のお膝元の徳島大学蔵本キャンパスに、異分野をまたがる多様な数十名の研究者が集まり、朝から晩まで会議場に缶詰め状態で自分たちの仕事について語り合った。例年どおり、領域代表者の高浜先生および会議運営スタッフによるすべてにおける非常に細かい「気配り」があり、予定された行事が滞りなく進んだ。今年が最終年度ということもあり、班会議、サマースクール(若手発表会)ともに非常に充実した研究発表が多かった。特に、若手からの質問が多く、彼らが順調に力を付けてきたことがわかり、印象深かった。また、発表内容のみならず、彼らの発表技術も向上していて、異分野からの発表内容であっても以前に比べてずっと理解しやすくなっており、このことも内容的に深まった充実した議論をすることができた理由であったように思う。会議に引き続き、連日、夜には懇談会があり、地ビール、ワインを飲みながら研究者間の緊密な情報交換が継続して行われ、2日半ではあったが、集中的な交流をすることが出来た。これにより参加メンバー間の連帯感がますます高まるとともに、免疫四次元空間ダイナミクスの概念の先にさらに何か新しいものを創っていくという機運が次第に参加者の中に生まれつつあるような気がしたのは私のみではないかもしれない。会議の合間には、近くの藍住町を訪れ、「藍の歴史館」と藍の豪商だった奥村家を見学し、昔ながらの藍汁を使った藍染の体験もした。自分で染めたいものを選び、染めのデザインを考え、藍液に浸しながら自分で好きなように染めるという作業は実に面白かった。普段は研究室にこもりがちな中でこのような非日常的な体験は実に有難く、とても楽しくリラックスできるひと時だった。さらに私自身はこの他に、徳島ラーメンが忘れられず、「いのたに本店」、「麵王」と二軒を訪れた。どちらもなぜかやみつきになりそうな味で、徳島に戻ってくる時にはまた行ってしまおうかもしれない。というわけで、今回の班会議、サマースクールは私にとってはサイエンティフィックに実に濃厚で楽しいひと時だった。今回も、例年のごとく、高浜先生およびそのスタッフにより周到に計画された班会議、サマースクールであったと思う。運営スタッフの皆様、まことに有難うございました。参加の方々はいずれも満足した気持ちで徳島を後にしたと思います。

第5回班会議・第4回サマースクールに参加して

大久保　直(北里大学医学部 実験動物学)

今年度の班会議は、ちょうど梅雨の晴れ間の徳島大学で行われました。本研究班には、私が北里大に移って研究基盤を何とか立ち上げようと右往左往していたときに入れて頂きました。私の研究テーマは、Ripply3という分子を基軸に咽頭弓という胎生初期に現れる分節構造の成り立ちとその派生器官の形成機構を解明することで、まさに胸腺原基の足場となる組織が研究対象です。正直この5年間は不安の連続で、今年は例年よりも早く緊張状態のなかで

班会議に向けた発表の準備を進めてきたつもりでしたが、終わってみるといんな角度から助言も頂き、もっと深く掘り下げるべき課題もあらわとなりました。当初はどのような研究へ展開できるかかなり未知な部分もあったのですが、この5年間でいくつかの芽が出始め、次の段階への道筋がすこし見え始めてきています。本研究班の暖かなサポートなくしてここまで進めることはできなかったと大変感謝しています。

本研究班では、各自の研究を推進するのはもちろんですが、研究者どうしが様々なことに腹を割って議論をする機会に恵まれました。例えば、大きな研究グループを組織し運営していく苦労話や、同時に次世代の若手研究者をいかに育てていくか、などなど、普段なかなか聞くことができないようなことまで、特に代表である高濱先生をはじめ、多くの著名な研究者のその思想的な部分に触れることができたのは大きな財産です。最後になりましたが、サマースクールの合間に訪れた藍住町の藍染め体験は、会議で煮詰まった頭をほぐすには持ってこいの体験でした。それぞれが染め上げた模様は違いましたが、その藍の青さに本研究班のまとまりと力強さを感じました。そして最終日、離陸した飛行機の窓から小さくなる街並みを眺めながら、後ろに眉山、速くに吉野川を望む徳島は学問的にも文化的にもその素養の醸成にとても良い風土だと感じました。



徳島での班会議に参加して

早坂　晴子(近畿大学 理工学部)

今年の班会議は、拠点長である高浜先生の本拠地である徳島で開催されました。最終年度ということもあってか、どの先生方も持ち時間内では語りつくせないような豊富なデータを発表されておりました。どの研究内容も最新のトピックであり実験手法も洗練されておりましたが、特に長澤先生のご発表は、研究背景から最近の研究の流れ、海外グループによる研究との相違点や今後の展開が15分の発表の中にバランスよく配置されており、造血幹細胞Nicheの維持調節機構、構成細胞についての新しい知見がよく理解できました。また昨年のオンラインニュースレター第7号に長澤先生が書かれていた「本物の発見」を追求する姿勢を感じ取ることができ、研究者のあるべき姿を再認識しました。自分自身の研究との関連では、梶島先生のiSALTの話が特に興味深く、会議終了後に徳島ラーメンを食べながら直接お話しできたことも収穫でした。また渡邊先生の脾臓形成に関連するストローマ細胞サブセットのお話しや、片貝先生がさまざまなレポーターマウスを用いて可視化されたストローマ



さりありがとうございました。

| 第5回班会議・第4回サマースクールに参加して |
|--|
| |
| 宮島 優里奈（理化学研究所 統合生命医科学研究センター） |

徳島大学での第5回班会議と第4回サマースクールに参加いたしました。新学術領域の班会議およびサマースクールへの参加は今回が初めてで、とても緊張しながら徳島を訪れました。これまでに、学会以外の会議には参加したことがなかったため、「免疫の場」および「免疫空間」に焦点を当て活発な議論が繰り広げられる本会議で「新学術領域研究とはどのようなものか」ということを肌を感じながら学ぶことができたと思います。今回は、「免疫四次元空間ダイナミクスで研究されている先生方の研究内容を理解する」ことを念頭に聴講いたしました。勉強不足の部分が浮き彫りになり、研究室に戻り今回の経験を次に活かすには何が必要かを考えました。今後このような機会が得られた際には、研究内容を理解し自分の意見を発言することを目標にしたいと思います。また、藍染め体験にも参加しましたが、藍染め後の作品にも個性が現れる点に感銘を受けました。素敵なストールを作ることができ、とても心に残る思い出になりました。サマースクールでの自身の発表は3日目でした。班会議1日目から緊張し続けた結果3日目には疲れきってしまい、体力と精神力も研究には重要だなと感じました。質疑応答では多くのご意見をいただき、自身の研究に何が足りないのか、今後どのように研究を進めていくのか深く考えるきっかけになり、貴重な経験になったと思います。さらに、今回名誉ある「班宝」として選出いただき誠にありがとうございました。班宝の名に恥じぬよう、今回得られた経験を活かし、日々研究に精進していきたいと思います。最後になりましたが、高濱先生をはじめ、サマースクール運営にご尽力くださいました先生方にこの場を借りて御礼申し上げます。

| 班会議とサマースクールに参加して |
|------------------|
| |
| 加藤 |

今回初めて、免疫四次元班会議、サマースクールに参加させていただきました。免疫の分野で著名な先生が多くおられる徳島大学に行くのは楽しみでありながら、様々な領域で日々精力的に研究されている方々の中で発表するのに緊張も感じていました。異分野から様々なバックグラウンドの方が来られるので、あまりなじみのない話もあり良い刺激を受けましたし、特にサマースクールでは、発表者は皆、若手と呼ばれる人達にも関わらず、自由でのびやかな発想が光る発表に感銘をうけたり、上手なプレゼンテーションから学ばせてもらったりと、貴重な経験をさせていただきました。自身の発表でも、先生方から様々なご質問やご意見を賜り、実りある研修となりました。中でも特に印象に残ったことの1つは、サマースクールの発表が終わった後の交流会の席で「自分で真剣に考えているのは(discussionの時間に)話をしたらわかる。」と高濱先生に言っていただいたことです。3年間、自分なりにもがき苦しみやってきたことがほんの少し、ラボの外の先生にも分かって頂けたのかな…と思うと、感激でした。また、この度奨励賞「班宝」に認定して頂き、本当にありがとうございました。研究をしていると、心が折れそうになることもあります。班宝を頂いたことを励

みに、またその名に恥じぬよう、精進しようと思います。最後になりましたが、今回サマースクールへの参加を動めて下さった濱崎先生、そして、領域代表の高濱先生をはじめ、運営して下さった方々に深く御礼申し上げます。ありがとうございました。

| 活発な班会議、サマースクールに参加して |
|---|
| |
| 陣野原 俊（理化学研究所 統合生命医科学研究センター） |

この度、「免疫四次元空間ダイナミクス」の第5回班会議と第4回サマースクールに参加させていただきました。阿波おどり空港に到着するやいなや、久しぶりの徳島の空気を感じ、やはり四国はいいなあと思いながら、これから始まる班会議とサマースクールに向けて気を引き締めたのを覚えています。班会議では、先生方のご自身の研究に対する愛を強く感じながら最新の研究結果を拝見でき、私の中でも今後の研究へのモチベーションがどんどん高まっていきました。また、活発な質疑応答に大変刺激を受けました。しかし実際‘自分でも質問を！’と思うと…ついつい二の足を踏んでしまい、質問できず反省点が残りました。次このような機会がありましたら、勇気を出して質問したいと思います。今回このサマースクールで初めて自身の研究の発表をさせていただきました。非常に緊張し、稚拙な発表になったにもかかわらず、多くの先生方からご質問、ご指導いただき大変嬉しくまた勉強になりました。この発表で奨励賞という身に余る賞をいただき驚きとともに、「班宝」という賞に恥じない研究に進進することを心に強く誓っております。最後になりましたが、班会議とサマースクールの準備、運営をして下さった、高濱先生をはじめ関係者の皆様に心より御礼申し上げます。ありがとうございました。

| 班会議・サマースクールに参加して |
|----------------------------------|
| |
| 阿部 真也(京都大学ウイルス研究所) |

京都大学ウイルス研究所生田研の阿部真也と申します。研究を始めて1年が過ぎ、ようやく免疫学のイロハがわかってきた中、この度の班会議・サマースクールに参加させていただきました。サマースクールでは、ナチュラルキラー細胞の分化に関する発表させていただきました。第一線で研究をされている先生方を前にとすると、緊張で声が震えましたが、発表の後は、皆様よりの確な意見いただき、自分の研究を見つめ直し、どうゆうことを調べていかないといけないか、どうゆう方向性に研究を進展させるかを考えることができました。また、この度は名誉ある「班宝賞」をいただき、ありがとうございました。班宝の名に恥じぬよう、よりいっそうに研究に励みたいと思います。今回の班会議とサマースクールを通して感じたのは、個々の研究内容は違えども、免疫の場を視点を置き、「免疫空間」を解明しようとする本領域研究の壮大さを感じました。また、様々な研究内容・視点に触れることができ、自分の視野が広がりました。この素晴らしい刺激を今後活かしていきたいです。本年で事業が終了ということで、私にとって最初で最後のサマースクールとなりましたが、最終年度ギリギリで参加できた喜びと、もう来年はないという残念さを感じます。最後になりましたが、素晴らしい機会をいただきました領域代表の高浜先生

をはじめ、サマースクールの運営に関わられた先生方にこの場をお借りして感謝申し上げます。本当にありがとうございました。

| 最後のサマースクールに参加して |
|---------------------------------------|
| |
| 三井 優輔(岡崎統合バイオ／基礎生物学研究所) |

今年も班会議・サマースクールに参加させていただきました。高濱先生の本拠地での開催ということで久しぶりに徳島市を訪問しました。サマースクールは第2回には参加できなかったのが個人的には3回目ということになります。今回は若手にも15分と比較的長い発表時間が与えられ、Wnt蛋白質と細胞極性・細胞形態の制御というテーマでお話をさせていただきました。当然、前回の非常に短い発表時間とは違うので発表の組み立ても変えなければなりません。なるべく分野外の方にも理解していただけるよう心がけましたが、ある程度時間があっても、なかなか難しいなと反省させられました。直近に出たデータも盛り込んだ為、上司の高田先生にも初見のデータもありました。そのため、発表が終わってからディスカッションになったのですが、話をしているうちに交流討論会で眉山に行く他の人々とはぐれてしまいました。そこで我々は道が良くわからないながら眉山に登り、今後すべきことなどいろいろと話をしました。暑かったですが、眺めのよいところにたどり着き、自分の研究を考える良い機会になりました。

班会議・サマースクールに来る度に感じるのが、コミュニティで若手を育てようという先生方の強い意識です。サイエンスに対する姿勢を毎回教えていただいているように思います。特別講演をいつも楽しみにしているのですが、今回は高濱先生の胸腺への熱い思いと石川先生の自らの経歴を交えながらのお話が大変印象的でした。また若手同士、年齢が近い人々からも大いに刺激を受けました。特に池淵さんの母乳のお話は、獣医学のバックグラウンドをお持ちだからこそその研究で、自分の持っているものを大切に研究をしなければ、と再認識させられました。街では阿波踊りの練習が行われており、活気がありました。私は隣の香川の人間なのですが、ちょっと羨ましく思いました。四国は狭い中で四つに分かれているだけあり(互いに山で隔てられているからでしょう)、それぞれ文化的にはっきり違います。それで大人になるまで阿波踊りを見たことがなかったのですが、それも以前に発生学会が徳島で開催された際に、阿波踊りが披露された時に初めて見たのでした。懇親会にて、その時の三味線を高濱先生が演奏されていたことを今回知って、驚いてしまいました。世の中意外なところでつながっているものだと思います。最後になりますが、免疫四次元空間の新学術領域に参加させていただいたこの経験を活かしていくことで、恩返しができると思います。

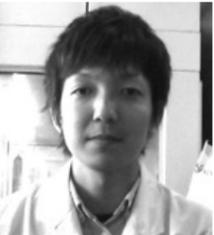
| 自由な場としてのサマースクール |
|---|
| |
| 池淵 良洋(大阪大谷大学薬学部・日本学術振興会特別研究員PD) |

サマースクールは今回で3回目の参加になった。自由な発表を推奨して下さっている本会はお硬い学会が嫌いな私としては非常にありがたい。少し話がそれるが、個人的には近年の免疫学会に魅力を感じてない。完璧なデータと完成されたスライドとお硬い結論ばかりで、初めて学会に行った時の面白さを感じない。どちらかというとな分子生物学会の方が自由な発表が多いと思うし、私

自身もオタクなテーマ(single-cellだとか進化学だとか)のもっと小さな学会・研究会に行くことが増えた。このような個人的状況の中で、本班会議とサマースクールは非常に面白かったです。クローズの研究会のおかげか、Preliminaryなデータと真実かどうかわからないSuggestionと本当の意味で自由なDiscussionを大量に拝聴できました。免疫学会でよくあるような「医療に役立ちます」といった結論とは違って、免疫学の先生方も純粋科学的な面白いことを考えているんだなと安心しました。まさに、新学術領域を作るという雰囲気を感じました。また、若造としては不完全なデータからどういう風に仮説を立てて、次にどういう実験をしたいかを学べる場だったと思います。大変勉強になりました。私自身のアイデアの発表に対してもたくさんのご指摘アドバイスを頂き非常に感謝致します。今後の研究の方向性が見えてきた気がしました。先生方からのアドバイスから、私自身は免疫学以外の分野に行った方が良さそうだと感じましたし、免疫学以外の分野から免疫学の発展に寄与できるような方向性もあるかもしれないと感じました。まだ将来のことはわかりませんが、サマースクールでお会いした先生方の耳に入るような研究をすることを目標に頑張っていきたいと感じております。最後に、班会議とサマースクールを運営して下さった高濱先生を始めとする徳島大学の皆様、誠にありがとうございました。免疫学の新参者が入りやすい雰囲気を作ってください、3回にわたって非常に楽しませて頂きました。改めて御礼申し上げます。

| 第5回班会議ならびに第4回サマースクールに参加して |
|-----------------------------------|
| |
| 近藤 健太(徳島大学先端酵素学研究所) |

今年度から徳島大学先端酵素学研究所に着任しました近藤健太と申します。この度初めて、徳島大学で行われた第5回班会議ならびに第4回サマースクールに高濱研究室のスタッフとして参加させて頂きました。昨年度まで腫瘍免疫の領域において主に腫瘍抗原特異的CD8+ T細胞におけるクローン毎の機能の差異について解析を行っていた私にとって、本領域の「免疫の場」を対象とした研究は初めてのものが多く大変刺激的な時間を過ごさせて頂きました。血球系細胞を対象とした従来の研究と異なり、胸腺やリンパ節、脾臓、炎症部位へ免疫細胞が遊走する分子機構やこれらの「免疫の場」に存在するストローマ細胞の役割を理解することの重要性を認識することができ、研究に対する視野を広げられたと思います。また、本会議やサマースクールは、他の学会と異なり些細な疑問であってシニア、若手、大学院生関係なく自由に質問できる雰囲気があり、大変新鮮に感じました。私自身は十分に質問できていませんでしたので、今後は積極的に質問しディスカッションに加われるよう頑張りたいと思います。サマースクールの最後に行われた特別講演では高名な先生方のこれまでの研究のターニングポイントなどを聞くことができ、研究に対するモチベーションを高められたと同時に、大きな成果をあげるためには大きな問題点や疑問点を明確にし、それを乗り越えた先にあるのだと感じました。最後になりましたが、3日間で得たことを糧に、より良い研究成果が出せるよう精進したいと思います。



Members

