

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：14301

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007 - 2011

課題番号：19059015

研究課題名（和文）人工免疫組織の作出と応用

研究課題名（英文）：Generation and application of artificial lymphoid tissues

研究代表者：

渡邊 武 (WATANABE TAKESHI)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：40028684

研究成果の概要（和文）：

我々は特定のストローマ細胞と樹状細胞をコラーゲンスポンジに吸着させてマウス腎臓皮膜下に移植するという簡単な方法によって、自然の二次リンパ節構造と類似した三次リンパ組織を世界で初めて人工的にしかも高率に再現よく構築することに成功した。今回の研究では以下のことを明らかにした。(1)我々が作製した「人工リンパ節」は移植、脱着が容易であり、2ヶ月以上にわたって生体内で安定した構造が保持される。抗原刺激により人工リンパ節内および人工リンパ節を移植された宿主において強い抗原特異的二次免疫反応を誘導される。人工リンパ節には抗原特異的な記憶B細胞、ヘルパーT細胞が濃縮される。(2)担がんマウスにおいて腫瘍を外科的に摘除した後にそのマウスで人工リンパ節を構築すると腫瘍の再発が大幅に抑制され、さらに、その人工リンパ節を別の担がんマウスに移植するとがんの増殖が強く抑制される。(3)ヒトを含めて動物種を越えてこのような強い免疫反応誘導能を有する人工リンパ節を構築する方法を確立した。まず、ストローマ細胞由来の分子の網羅的解析、スキャホールドとして徐放性に優れた生体適合材料の開発を行った。ストローマ細胞での遺伝子発現の網羅的解析からリンパ節様組織形成を誘導出来る特定の分子の組み合わせを見だし、新たに開発した徐放性ゲルに吸着させることにより、抗原特異的免疫反応誘導能をもつ自然の二次リンパ節構造と類似した大型の人工リンパ組織を構築することに成功した。(4)新生児マウスの脾臓ストローマ細胞の単個細胞凝集塊を用いて adult マウス体内に（白脾髄、赤脾髄、血管構造、Marginal zone 等を持つ）完全な脾臓を再構築することに成功した。今後ストローマ細胞の解析を行う。

研究成果の概要（英文）：

The generation of functional artificial lymphoid tissue will be a major focus of future research in Immunology. In human, this will be an alternative tool which induces specific immune responses at ectopic sites and offers a novel way to restore the immune status and to treat uncontrollable obstinate diseases such as cancer, autoimmune diseases, severe infection and immunodeficiency caused by primary defect or aging. Artificially synthesized lymphoid tissue may also provide us with a highly informative method to further study development and physiological functions of lymphoid tissues and organs. We recently reported successful generation of artificial lymph node-like tissues at ectopic sites in mouse. They showed a remarkable ability to induce secondary immune responses upon antigen stimulation, especially when transplanted into naïve or immuno-deficient hosts. It was found that a large numbers of memory T cells and follicular helper T cells besides of memory B cells are highly enriched in our artificial lymph nodes, supporting their ability to induce a strong antigen-specific immune response. In our previous trial, we have utilized a mouse lymphoid stromal cell line and dendritic cells as an organizer for formation of lymphoid tissues and collagen sponge as a scaffold. Recently, we have also succeeded to synthesize artificial lymph nodes, instead of using stromal cells, by using a combination of various kinds of soluble chemokines and cytokines, which are attached

to slow-releasing biomaterial (soft gel). The structure of newly synthesized artificial lymphoid tissues is stable in vivo more than one month. Antigen specific immune response could be induced in the tissues. Thus, we have successfully generated a complete structure of lymph node-like tissues without using any stromal cell component. We plan to apply this new method to generate human type secondary lymphoid tissues, which display immunological function, in humanized mice. We have also established the novel method to generate a complete structure of mouse spleen by using “single stromal cell-aggregates” derived from spleen capsules of newborn mice (3-6days after birth). We are now trying to identify and analyze the cells responsible for generation of adult type spleen from newborn mouse spleen capsules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	12,700,000	0	12,700,000
2008年度	12,700,000	0	12,700,000
2009年度	12,700,000	0	12,700,000
2010年度	10,000,000	0	10,000,000
2011年度	10,000,000	0	10,000,000
総計	58,100,000	0	58,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：人工免疫組織、人工リンパ節、ストローマ細胞、インデューサー細胞、抗原特異的二次免疫反応、感染防御、腫瘍免疫、人工脾臓、

1. 研究開始当初の背景

免疫組織とりわけ全身に分布するリンパ節は感染症、がん等の脅威から我々の身体を守り免疫監視機構として重要な働きをしている。その機能の破綻は生命の重大な危機を招く。重症感染症、がん、老化、先天性（あるいは後天性）免疫不全などに対して、患者体内に免疫系を再構築してその免疫能を修復させる方法は将来の治療法として期待される。しかし、このような試みは我々の成功まで報告がなかった。胎生期における二次リンパ組織の発生には、中胚葉性のリンパ組織特異的ストローマ細胞と造血幹細胞由来で転写因子 ROR γ t を発現するリンパ組織特異的インデューサー細胞との interaction が必須であり、その相互作用にはリンフォトキシンとその受容体、RANK リガンドとその受容体 RANK との相互作用が必須であることはすでに知られていた。そこで我々は二次リンパ組織の構築にはストローマ細胞とスキャホールドがあれば充分と考え、マウスのリンパ組織ストローマ細胞と樹状細胞をカラーゲンスポンジに吸着させてマウス腎臓皮膜下に移植するという簡単な方法によって、自然のリンパ節と極めて構造が類似したリンパ組織を世界で初めて人工

的に構築することに成功した。今回の研究でこの「人工リンパ節」のさらなる免疫機能の解析とさらに進んでストローマ細胞を人工の物質で置き換える試みを行った。

2. 研究の目的

免疫機能が著しく低下した患者体内に人工的に免疫組織を再構築し、あるいは人工的に構築した免疫組織を移植することにより、免疫系を再構築してその免疫能を修復させる方法の開発が本研究の目的である。まず、我々がマウス免疫組織由来の特定のストローマ細胞を用いて作製した人工リンパ節では強い抗原特異的二次免疫反応を誘導出来ること、がんの増殖を抑制する強い抗腫瘍活性を誘導できることを示して、人工的に免疫反応誘導能を持つリンパ組織の構築が可能であること、そしてその機能が疾患の治療に将来有用であることが示す。一方、ストローマ細胞などの細胞成分を用いる系は他の系統のマウスあるいはヒトを含む他の動物種に応用する場合にはそれぞれの動物種に対応したストローマ細胞を準備せねばならず実用的とは言い難い。そこで本研究ではさらに研究を進めて、人工的ストローマ細胞を構築してヒトを含めて

動物種を越えて人工リンパ節を構築する方法の確立を目指す。

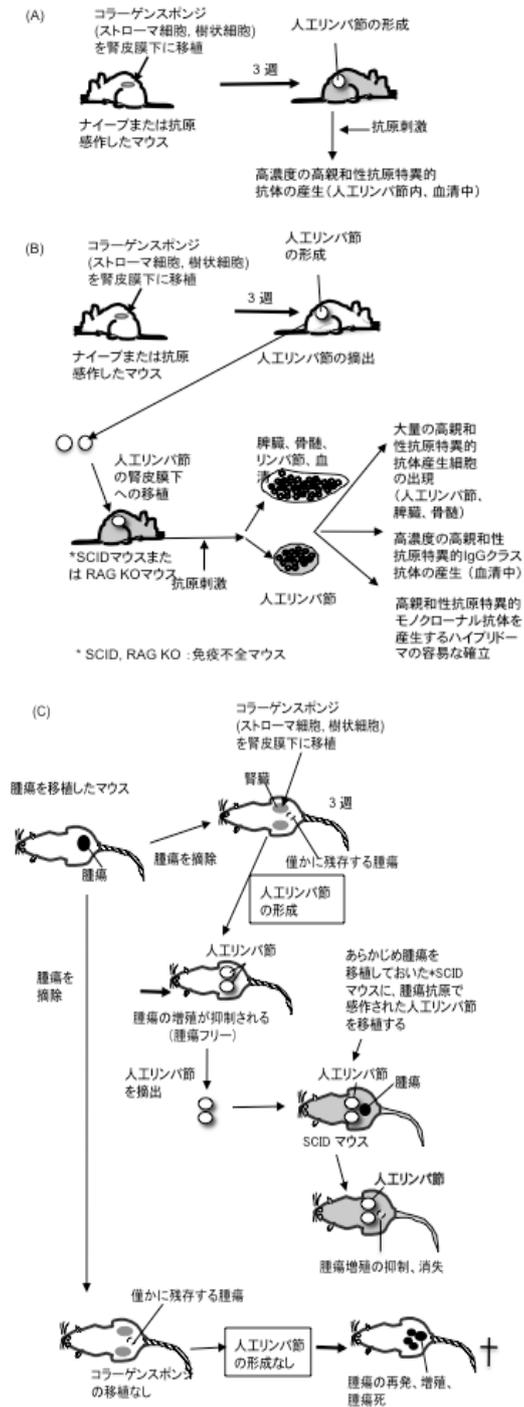
3. 研究の方法

(1) 効率的に強い免疫反応誘導能を持つ二次リンパ節様構造を人工的に構築することの出来るストローマ細胞およびインデューサー細胞の性状を発現遺伝子プロファイル等によって解析する。人工リンパ組織の構築に関連する分子群を網羅的に同定する。さらにそれらのタンパク分子を網羅的に合成して準備する。(2) 我々はこれまで「人工リンパ節」を再構築する際にはコラーゲンスポンジをスキヤホールドとして用いてきたが、コラーゲンスポンジはタンパク分子の保持、徐放性に問題がある。そこで、その解決策としてコラーゲン結合ペプチドを候補分子の全てに遺伝子レベルで結合させる。または、徐放性に優れた生体適合材料を探索して用いる。(3) 「人工リンパ節」内に濃縮されるメモリーT細胞、メモリーB細胞の機能解析を行なう、特に抗原特異的あるいは自己抗原反応性メモリー細胞の同定、濃縮、発現遺伝子の解析を行なう。(4) 生後1週間以内の新生仔マウスの脾臓皮膜のみを腎被膜下に移植すると、白脾髄、赤脾髄、血管構造を持つ完全な構造の脾臓を人工的に再構築出来ることを我々は見いだした。この系を用いて脾臓の人工的再構築にかかわるストローマ細胞の同定と単離を行う。(4) ストローマ細胞を用いて構築した人工リンパ節は強い抗腫瘍活性を發揮することを見いだしている。人工リンパ節を用いた「がん治療」モデルを確立する、(5) ヒト化マウス等を応用して「ヒト型人工リンパ節」の構築を行ない感染症、がん治療への臨床応用のための基礎研究を行なう。また、種々の自己免疫病の治療に適用出来る人工免疫組織の開発を目指す。図-1：人工リンパ節の形成とその機能

4. 研究成果

(1) 本研究において、我々がマウス免疫組織由来の特定のストローマ細胞を用いて作製した人工リンパ節では抗原特異的な記憶B細胞、ヘルパーT細胞が高率に濃縮されること、そのことにより強い二次免疫反応を誘導出来ること(図-1 A,B)、我々の人工リンパ節法を用いると高い効率で高親和性のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを容易に確立することが出来る。しかも多様性に富んだ種々の抗原特異的モノクローナル抗体が得られる(図-1 B)。さらに担がんマウス

図-1 人工リンパ節の形成と応用

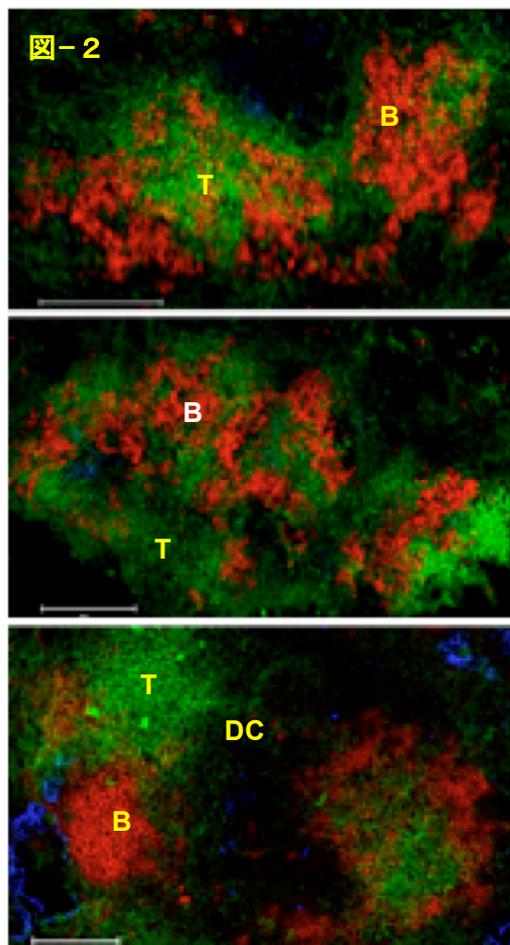


において腫瘍を外科的に摘除した後、人工リンパ節を構築すると腫瘍の再発が大幅に抑制され、そうして作製した人工リンパ節を別の担がんマウスに移植するとがんの増殖が強く抑制することを明らかにした(図-1 C)。他方、腫瘍を外科的に摘除した後に、人工リンパ節を形成しなかったグループのマウスは全て腫瘍死した(図-1 Cの最下段)。以上から我々の人

工リンパ節は抗腫瘍免疫にも応用が可能であることが示唆された。

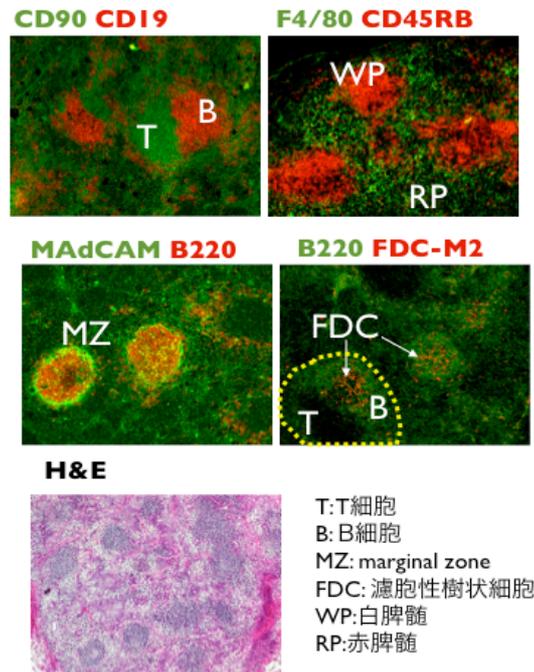
次に、このような人工のリンパ節様構造を構築出来るストローマ細胞の性状を遺伝子プロファイル等によって解析した。その情報をもとに、我々の人工リンパ節形成に関与していると思われる分子を網羅的に同定した。一方、スキャホールドとして従来のコラーゲンスポンジではなく徐放性に優れた生体適合材料となるゲルを見いだした。遺伝子プロファイル等によって同定された分子の幾つもの組み合わせを網羅的にゲルに吸着させて腎被膜下に移植した。膨大な組み合わせの中から特定の分子の組み合わせを見いだし、自然の二次リンパ節構造と類似した大型の人工リンパ組織の構築に成功した。その免疫誘導能については現在、解析中である。重要な因子として、種々のケモカイン、接着因子に加えて、RANK ligand、リンフォトキシンなどが同定され、今回の徐放性ゲルを基材として用いる方法においても宿主由来のストローマの関与が示唆された。

図-2 はケモカインとして基本的な CCL19, CCL21, CXCL12, CXCL13を徐放性



ゲルに吸着させ、腎被膜下に移植して4週目の人工リンパ節である (green:T細胞、red:B細胞、violet:樹状細胞。白いBarは500 μ m)。直径が0.5-1.5mmの大きなリンパ節がストローマ細胞を用いることなく形成が可能であることを示している。現在、ケモカインおよび接着因子の種類を変動させてより大きな人工リンパ節の形成を試みている。

図-3



青色：白脾髄， 赤色：赤脾髄

(2) 新生児マウスの脾臓ストローマ細胞 (CD45⁻, gp38⁺, MAdCAM⁺) を単個細胞にしてその細胞塊 (約100,000個) を腎被膜下に移植すると3-4週後にadultマウス体内で (白脾髄、赤脾髄、血管構造, marginal zone, など全ての組織構造を持つ) 脾臓を完全な形で再構築することに成功した (図-3)。免疫機能も性状に発揮された。ストローマ細胞群をさらに種々の細胞表面マーカーを用いて細分化する、あるいは細胞表面抗原に対する抗体を加えて再構築を行うことにより、脾臓再構築にかかわるストローマ細胞の同定を行っている。さらに今後その発現遺伝子プロファイルを明らかにしていく。一方、リンフォトキシン遺伝子欠損マウスにこのストローマ細胞を移植しても脾臓の再構築が生じないこと、*ROR γ t*遺伝子

欠損マウスでは白脾髄と赤脾髄の境界が明確でなくなることから、インデューサーとしてリンフォトキシン産生細胞、骨髄由来ROR γ t発現細胞の存在が必要であることがわかった。

(3) ヒト造血幹細胞を高度の免疫不全マウスに注入することにより安定してヒト化マウスを作り出すことができる。現在、このヒト化マウス等を用いて、上記で報告したケモカインなどタンパク因子の組み合わせのみを用いる方法で「ヒト型人工リンパ節」の構築を試みている。リンパ組織構造を構築することに成功しているが、免疫機能を有するヒト型リンパ組織の構築はまだ成功していない。今後の解決すべき課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Y. Kobayashi, K. Kato and T. Watanabe. Synthesis of functional artificial lymphoid tissues. *Discovery Medicine*. 査読有 vol.12, No.65, 2011, pp 351-362. (doi コードなし)
2. A. Otsuka, M. Kubo, T. Honda, G. Egawa, S. Nakajima, H. Tanizaki, B. Kim, S. Matsuoka, T. Watanabe, S. Nakae, Y. Miyachi and K. Kabashima.. Requirement of interaction between mast cells and skin dendritic cells to establish contact hypersensitivity. *PLoS ONE*, 査読有 vol.6, No.9, 2011, e25538, doi:10.1371/journal.pone.0025538
3. N. Aoki, M. Kido, S. Iwamoto, H. Nishiura, R. Maruoka, J. Tanaka, T. Watanabe, Y. Tanaka, T. Okazaki, T. Chiba, N. Watanabe. Dys-regulated generation of follicular helper T cells in the spleen triggers fatal auto-immune hepatitis in mice. *Gastroenterology* 査読有 vol.140 No.4, 2011, pp1322-1333, doi:10.1053/j.gastro.2011.01.002
4. M. Metz, E. Doyle, C. B.Jensen, T. Watanabe, T. Zuberbier, M. Maurer. Effects of antihistamines on innate immune responses to severe bacterial infection in mice. *Int. Arch. of Allergy and Immunology* 査読有 vol. 155, 2011, pp355-360. doi:10.1159/000321614
5. Y. Kobayashi and T. Watanabe. Synthesis of artificial lymphoid tissues with immunological function. *Trends in Immunology* 査読有 vol.31, 2010 pp422-428. doi:10.1016/j.it.2010.09.002
6. JKH Tan and T. Watanabe. Artificial engineering of secondary lymphoid organs. *Advance in Immunology* 査読有 vol. 105. 2010 pp133-150, doi コードなし.
7. Ke-Y Wang, A.Tanimoto, S.Yamada, X Guo, Y Ding, T. Watanabe, T. Watanabe, K.Kohno, K-I Hirano, H.Tsukada and Y.Sasaguri: Histamine regulation in glucose and lipid metabolism via histamine receptors :Model for nonalcoholic steatohepatitis in mice. *American J. Pathology* 査読有 vol.177, 2010 pp713-723, doi:10.2353/ajpath.2010.091198
8. S. Nakajima, T. Honda, D. Sakata, G. Egawa, H. Tanizaki, A. Otsuka, C.S. Morinaga, T. Watanabe, Y. Miyachi, S. Narumiya, K. Kabashima. Prostaglandin I receptor IP promoted Th1- differentiation through camp. *J. Immunol.* 査読有 vol.184, 2010, pp5595-5603. doi: 10.4049/jimmunol.0903260
9. M. Hondo, K. Nagai, K. Ohno, Y. Kisanuki, J.T. Willie, T. Watanabe, M. Yanagisawa, T. Sakurai. Histamine-1 receptor is not required as a downstream effector of orexin-2 receptor in maintenance of basal sleep/wake states. *Acta Physiologica* 査読有 vol. 198, 2010, pp287-294, Doi:10.1111/j.1748-1716.2009.02032
10. M.Tomura, T.Honda, H.Tanizaki, A.Otsuka, G.Egawa, Y.Tokura, S.hori, J.G.Cyster, T.Watanabe, Y.Miyachi, O.Kanagawa, K.Kabashima. Activated Regulatory T cells are the major T cell type emigrating from sensitized skin. *J. Clin. Invest.* 査読有 vol. 120, 2010, pp883-893, doi:10.1172/JCI40926
11. N. Rajasekaran, S. Solomon, T. Watanabe, H. Ohtsu, R. Gajda, H. Illges. Histidine decarboxylase but not histamine receptor 1 or 2 deficiency protects from K/BxN serum-induced arthritis. *Int. Immunol.* 査読有 vol. 21, 2009, pp1263-1268, doi:10.1093/intimm/dxp092
- 12.W. Beghdadi, A. Porcherie, BS. Schneider, D. Dubayle, R. Peronet, M. Huerre, T. Watanabe, H.Ohtsu, J.Louis, S.Mecheri. Role of histamine and histamine receptors in the pathogenesis of Malaria.

Med. Science (Paris) 査読有 vol. 25, 2009, pp377-381, doi コードなし。

13. W.Beghdadi, A.Porcherie, D.Dubayle, R.Peronet, M.Huerre, T.Watanabe, H.Ohtsu, J.Louis, S.Mecheri. Inhibition of histamine-mediated signaling confers significant protection against severe malaria in mouse model of disease. *J. Exp. Med.* 査読有 vol.205, 2008, pp395-408, doi:10.1084/jem.20071548

14. P McGlade, S Gorman, JC Lenzo, JW Tan, T.Watanabe, JJ Finlay-Jones, WR Thomas, PH Hart. Effect of both UVB irradiation and histamine receptor function on allergic responses to an inhaled antigen. *J Immunol* 査読有 vol. 178, 2007, pp2794-802, doi コードなし。

15. N. Okamoto, S. Nishimoto, R. Chihara, C. Shimizu and T. Watanabe. Artificial lymph nodes induce potent secondary immune responses in naïve and immunodeficient mice. *J. Clin. Invest.* 査読有 vol. 117, 2007, pp997-1007, doi:10.1172/JCI30379

〔学会発表〕(計1件)

2009年10月14-16日

第2回ヨーロッパ免疫学連合総会(ドイツ、ベルリン)招待講演。

シンポジウム名: Synthetic Immunology.

演題名: Generation of artificial lymph nodes and their application.

演者: 渡邊 武

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称: 人工リンパ節の作製方法(ストローマ細胞を用いない新規技術)

発明者: 渡邊 武、小林由佳

権利者: 国立大学法人京都大学、アステラス製薬株式会社

種類: 特願

番号: 2010-179889

出願年月日: 平成22年8月11日

特許公開日: 平成24年2月23日

国内外の別: 国内

名称: 癌治療用人工リンパ節

発明者: 渡邊 武、

権利者: 独立行政法人理化学研究所

種類: 特願

番号: 2006-331114

出願年月日: 平成18年12月7日

外国出願日: 平成19年11月21日

国内外の別: 国内

○取得状況(計3件)

名称: 人工リンパ節

発明者: 渡邊 武、末松佐知子

権利者: 独立行政法人理化学研究所

種類: 特許第4097544

特許取得日: 平成20年3月21日

(特願: 出願年月日: 平成15年2月27日)

国内外の別: 国内、米国、欧州

名称: Artificial lymph node treating cancer(癌治療用人工リンパ節)

特許番号: 8101195

登録日: 2012年1月24日

出願国: アメリカ合衆国

発明者: 渡邊 武、田中功二

権利者: 独立行政法人理化学研究所

名称: Method for production of antigen-specific hybridoma using artificial lymph node with good efficiency

発明者: 渡邊 武

権利者: 独立行政法人理化学研究所

国内外の別: 国内、国外

欧州特許 PCT/JP2006325137

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 武(WATANABE TAKESHI)

京都大学医学研究科・研究員

研究者番号: 40028684