

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15149

研究課題名(和文)自然リンパ球前駆細胞の同定

研究課題名(英文)Identification of precursors of innate lymphoid cells

研究代表者

澤 新一郎 (Sawa, Shinichiro)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：80611756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：LTi細胞はリンパ節形成に必要な3型自然リンパ球であるが、詳細な分化経路および分化に必要な微小環境は明らかになっていない。本研究では網羅的遺伝子発現解析を用い、LTi細胞の分化成熟に必要な因子の同定を試みた。リンパ節原基にはRANKLを発現する間葉系細胞が存在する。また、LTi細胞はRANKL受容体、RANKを発現する。試験管内においてLTi細胞はRANKL依存的に成熟マーカーの発現が上昇する。さらに、LTi細胞特異的にRANKを欠損するマウスはリンパ節形成が阻害された。以上から、リンパ節原基では間葉系細胞が発現するRANKLがLTi細胞の成熟に必要な最終分化因子であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Lymphoid Tissue inducer (LTi) cell is a member of group 3 innate lymphoid cell required for lymph node organogenesis. So far, the developmental pathway of LTi cell was not precisely investigated, Additionally, the microenvironment required for the maturation of LTi cell was not identified yet. In this research, using comprehensive transcriptome analysis, I tried to identify factors required for LTi cell maturation in vivo.

In the lymph node anlagen, mesenchymal cells express RANKL and LTi cells express RANK, a receptor for RANKL. In vitro, RANK signal upregulates maturation markers of LTi cells. Moreover, LTi cell specific RANK deficient mice lack all the lymph nodes. From these results, I concluded that RANKL expressed by mesenchymal cells in the lymph node anlagen is the critical factor for the terminal differentiation of LTi cells in vivo.

研究分野：免疫学

キーワード：自然リンパ球 分化 網羅的遺伝子発現解析 リンパ節形成

1. 研究開始当初の背景

LTi 細胞は3型自然リンパ球(ILC3)の一種であり、マウスやヒトのリンパ組織形成や腸管バリア機能の維持に必須のリンパ球である。胎仔マウス肝臓や骨髄中に存在する PLZF 陽性 Id2 陽性細胞が LTi 前駆細胞であり、転写因子 ROR γ t 依存的に LTi 細胞へと分化することが知られている。また、成体マウスやヒトの腸管内に数多く存在する T-bet 陽性 ROR γ t 陽性の ILC3 は、LTi 細胞とは異なる前駆細胞から分化することも知られている。一方、LTi 細胞が LTi 前駆細胞から分化成熟する経路や微小環境は詳細には明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は LTi 前駆細胞を生体内に同定し、(1)リンパ球系前駆細胞から LTi 前駆細胞へと分化するための分子機構の解明 (2)LTi 前駆細胞が生体内で最終分化成熟する分子機構および微小環境の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) LTi 前駆細胞および成熟 LTi 細胞に関し、一細胞レベルの網羅的遺伝子発現解析を行い、前駆細胞から LTi 細胞への分化に必要な分子ネットワークを解明する。
(2) 成熟 LTi 細胞が存在する胎仔リンパ節に注目し、LTi 細胞が成熟分化するために必要な分子およびその分子を発現する細胞群を同定する。

4. 研究成果

本研究開始直後、国外研究グループから自然リンパ球に関する一細胞網羅的遺伝子発現解析結果が報告された (*Ishizuka, Nat Immunol., 2016*)。そのため、研究の目的(2)に焦点を絞り研究を進めた。

(1) LTi 細胞の遺伝子プロファイルの取得

胎生 14.5 日の ROR γ t-EGFP レポーターマウスから LTi 細胞 (CD3 陰性 ROR γ t 陽性細胞) をフローサイトメーターで採取し、RNAseq による遺伝子発現解析を行った。対照として成体マウス腸管における NCR1 陽性 ROR γ t 陽性細胞 (以下 NCR1+ILC3) の解析を行った。その結果、LTi 細胞には TNF ファミリーサイトカイン受容体である RANK や MHC クラス II をコードする遺伝子が高発現していた。さらに、RANK-EGFP レポーターマウスを用い、胎児期のリンパ節原基に集簇する LTi 細胞には RANK が高発現することも明らかになった。

(2) LTi 細胞分化成熟に必要な因子の同定

リンパ節形成において LTi 細胞に発現する RANK の機能的意義を調べるため、LTi 細胞特異的に RANK を欠損するマウス (*CD127-Cre/Tnfrsf11a^{flox/flox}* マウス) を

作成したところ、リンパ節形成が障害された。また、RANK を欠損するマウスでは正常コントロール群と比較して LTb 発現が有意に低下していることを定量 PCR 法で確認した。さらに、リンパ節中の LTi 細胞は CCR6 陰性分画と CCR6 陽性分画が存在しすることを見出し、CCR6 陰性分画の細胞を試験管内で可溶性 RANKL の存在下で培養すると CCR6 および LTb 発現が増強することも明らかになった。つまり、RANKL はリンパ節原基において LTi 細胞を最終分化成熟させるために必要なサイトカインであることを明らかにした。

(3) リンパ節内 LTi 成熟微小環境の同定

RANKL レポーターマウスを用い、リンパ節内における RANKL 発現細胞の同定を試みた。リンパ節原基では LTi 細胞と大血管表面に付着する間葉系細胞が RANKL を発現しうる。そのうち、間葉系細胞特異的に RANKL を欠損させたマウスではリンパ節形成が障害されたが、LTi 細胞特異的に RANKL を欠損させてもリンパ節は形成された。以上から、リンパ節原基の間葉系細胞が LTi 細胞成熟に必要な微小環境を供給することが明らかになった。

(4) LTi 細胞欠損マウスモデルの作出

これまで、LTi 細胞のみを特異的に欠損したマウスや時期特異的に LTi 細胞のみを除去可能なマウスモデルは存在しない。そこで、RANK はリンパ球系細胞においては LTi 細胞特異的に発現することに着目し、RANK のプロモーター下流で Cre 依存的にジフテリア毒素受容体 (DTR) を発現しうる RANK-iDTR^{flox} マウスを作出した。本マウスはリンパ球系細胞特異的に Cre を発現する CD127-Cre との 2 重変異マウスを作出することで LTi 細胞特異的な DTR 発現が可能になる。本マウス作成法を北海道大学から特許出願した (特願 2018-016832)

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3件)

1. Onder L, Mörbel U, Pikorl N, Novkovic M, Cheng H-W, Hehlhans T, Pfeffer K, Becher B, Waisman A, Rüllicke T, Gommerman J, Müller C, Sawa S, Scandella E and Ludewig B. Lymphatic endothelial cells control initiation of lymph node organogenesis. *Immunity*, 47(1):80-92 (2017) 査読有
2. Nagashima K, Sawa S, Nitta T, Tsutsumi M, Okamura T, Peninger JM, Nakashima T and Takayanagi H. Identification of subepithelial

mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota. *Nat Immunol.*, 18(6), 675-682 (2017) 査読有

3. Okamoto K, Nakashima T, Shinohara M, Negishi-Koga T, Komatsu N, Terashima A, Sawa S, Nitta T and *Takayanagi H. Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. *Physiol Rev.* 97(4):1295-1349 (2017) 査読有

〔学会発表〕(計9件)

1. 澤 新一郎, 免疫組織の構築に必要な間葉系細胞, 第2回 Fibrosis 特別公演, TKP ガーデンシティ PREMIUM 名古屋駅前(名古屋市) 2018年2月17日
2. Shinichiro Sawa, Development of novel mouse models lacking for group 3 innate lymphoid cells, 第46回日本免疫学会学術集会一般講演, 仙台国際センター(仙台市) 2017年12月14日
3. Shinichiro Sawa, A trip to the small world of fetal lymph node, 第46回日本免疫学会学術集会 シンポジウム, 仙台国際センター(仙台市) 2017年12月12日
4. Shinichiro Sawa, LT_i cells integrate mesenchymal cell-derived RANKL essential for lymph node organogenesis. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society 2017 (ICIS 2017) 一般講演 金沢音楽堂(金沢市) 2017年11月2日
5. 澤 新一郎 腸管3型自然リンパ球の生体内機能解明に向けた新規モデルマウスの開発, 第54回生化学会北海道支部会特別講演 北海道大学医学部フラテ(札幌市) 2017年7月7日
6. Shinichiro Sawa, Mesenchymal organizer cell-derived RANKL induces terminal differentiation of LT_i cell, 口頭発表, 7th International Workshop of

Kyoto T cell Conference, 芝蘭会館(京都市左京区) 2017年3月13日~2017年3月17日、国内

7. Shinichiro Sawa, Microenvironment for the lymph node organogenesis, 口頭発表, 11th International Symposium of The Institute Network "Frontiers in Biomedical Sciences", 徳島大学藤井記念ホール(徳島市) 2017年2月26日~2017年2月27日、国内
8. Shinichiro Sawa, Tomoki Nakashima and Hiroshi Takayanagi, Mesenchymal organizer cell-derived RANKL induces terminal differentiation of LT_i cell, 口頭発表, 45th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, 沖縄コンベンションセンター(宜野湾市) 2016年12月05日~2016年12月07日、国内
9. Shinichiro Sawa, Mesenchymal organizer cell-derived RANKL induces terminal differentiation of LT_i cell, ポスター発表, EMBO Conference Innate lymphoid cells-2016 (国際学会) Kalkscheune(ドイツ・ベルリン) 2016年11月30日~2016年12月02日、国外

〔図書〕(計2件)

1. 澤 新一郎 「腸内細菌と免疫」周産期医学. 47(12)・2017・1533-1538
2. 澤 新一郎 「新生児腸内細菌叢はどのように形成されるか？」生体の科学 2017; 68(2):1-4

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 標的細胞を欠損した非ヒト動物の作成方法

名称発明者: 澤 新一郎

権利者: 澤 新一郎、北海道大学

種類: 物質特許

番号: 特願 2018-016832

出願年月日: 平成 30 年 2 月 1 日

国内外の別: 国内

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤 新一郎 (SAWA Shinichiro)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授
研究者番号：80611756

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()