

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390062
 研究課題名（和文） 人工リンパ組織によるリンパ管の誘導と抗腫瘍免疫療法の研究
 研究課題名（英文） Study for lymphangiogenesis and tumor immunity by artificial lymphoid tissue construction
 研究代表者 末松 佐知子（SUEMATSU SACHIKO）
 独立行政法人 医薬基盤研究所・基盤的研究部免疫細胞制御プロジェクト・プロジェクトリーダー
 研究者番号：50250345

研究成果の概要（和文）：我々が独自に開発した方法により「人工リンパ組織」の構築が可能である。本研究から人工リンパ組織では新生血管の発達に伴ってリンパ管が形成されること、また、通常の毛細血管やリンパ節の血管とは異なる血管の存在が証明された。さらに、人工リンパ組織には活性化リンパ球が濃縮して集積する性質があり、人工リンパ組織によって腫瘍に対する細胞傷害性 T 細胞活性を免疫不全マウスに導入可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：A tissue-engineered artificial lymphoid tissue (aLT) can be constructed by introducing stromal cells embedded in a collagenous scaffold. In this study, we confirmed functional efferent lymphatic vessel formation in aLTs. It was revealed aLTs had specialized blood vessels distinct from ordinary blood vessels or high endothelial venules. Further, we found that activated lymphocytes were concentrated in aLTs, which enabled aLTs to introduce effective cytotoxic T cell activities in severe-combined immunodeficient mice. Our data suggested that possible therapeutic application of aLTs for adaptive immunity activation against intractable infectious diseases or cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2007 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：免疫学、組織工学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：リンパ管、血管、リンパ球ホーミング、適応免疫、ストローマ細胞、細胞傷害性 T 細胞活性

1. 研究開始当初の背景

適応免疫は抗原特異的リンパ球による高度に進化した自己防衛反応であり、抗原に対する「反応の特異性」と「免疫学的記憶」

を特徴とする。しかし、抗原特異的なリンパ球はごく稀にしか存在しない（10 万～100 万個に 1 個の割合）ため、効率よく適応免疫反応を誘導するために哺乳類は二次リンパ組

織を備えている。近年の研究により、二次リンパ組織の特殊な組織構造が適応免疫の誘導に重要であることが明らかになってきた。

本研究課題申請時には人工リンパ組織が二次リンパ組織の基本構造を備えており、適応免疫反応を誘導可能であることが証明されていた。しかし、人為的に再構築した人工リンパ組織がなぜ二次リンパ組織よりも強い適応免疫反応を示すのか、そのメカニズムは不明であった。また、人工リンパ組織がリンパ節の高内皮細静脈 (HEV) と同様の血管を有することを確認していたが、リンパ管形成については解析が進んでいなかった。人工リンパ組織によって効果的な抗腫瘍免疫が誘導できるかどうかについては検討されていなかった。

2. 研究の目的

(1) 非常に稀な抗原特異的リンパ球が抗原を認識して効率よく適応免疫を始動するためには、二次リンパ組織と二次リンパ組織へのリンパ球と抗原提示細胞の輸送経路である脈管系が重要な役割を果たしている。リンパ節ではほとんどのリンパ球が HEV を介して、また樹状細胞 (DC) や抗原は輸出リンパ管を通過してリンパ節に流入し、リンパ節内で活性化したリンパ球や抗体は輸出リンパ管を通過してリンパ節から流出することが分かっている。

人工リンパ組織が強い適応免疫機能を発揮するメカニズムを解明することを目的として、血管とリンパ管の形成について詳細に調べると共に、人工リンパ組織に集積するリンパ球サブセットを解析することにした。(2) 我々は人工リンパ組織を利用して適応免疫機能を賦活し、様々の疾患の治療に応用することを最終目的として研究を続けてきた。本研究課題では、悪性腫瘍に対する新しい免疫細胞治療として人工リンパ組織を応用可能かどうかを検証するために、免疫不全マウスを用いて人工リンパ組織による腫瘍治療モデルを構築した。

3. 研究の方法

(1) 人工リンパ組織の構築

BALB/c マウス由来のストローマ細胞株と抗原で刺激した骨髄由来樹状細胞 (BMDC) をコラーゲンスポンジに添加して (以後、構築3要素と記述する) BALB/c マウスの腎皮膜下に移植すると、コラーゲンスポンジの周囲にリンパ球が集積し、やがて T, B リンパ球の集団が区域に分かれて3週間以内に二次リンパ組織の基本構造 (T 細胞領域、B 細胞領域、濾胞樹状細胞ネットワークなど) を備えた人工リンパ組織が完成する。

(2) 脈管系形成の解析

人工リンパ組織への免疫細胞や抗原の輸

送経路となる脈管系 (血管とリンパ管) の形成を調べるために、経時的に人工リンパ組織を回収して組織切片の免疫組織学的解析とホールマウント免疫組織解析を行った。血管のマーカーとして CD31、リンパ管のマーカーとして LYVE-1, Prox-1, VEGFR-3 (さらに、人工リンパ組織のリンパ管が機能的なリンパ管かどうかを調べるために、Ferritin lymphangiography と Evans blue lymphangiography を行った。

(3) 抗腫瘍効果の検討

① モデル腫瘍抗原発現腫瘍細胞株の樹立。

A20 細胞株 (B lymphoma cell line) にモデル腫瘍抗原遺伝子を導入し、発現量を解析してモデル腫瘍抗原タンパク (Model-Ag) を強く発現する安定発現細胞株

(A20-Model-Ag) を樹立した。

② 人工リンパ組織の構築

A20-Model-Ag 細胞ライセート (細胞溶解物) とアジュバントの混合物で一次免疫した BALB/c マウスの腎皮膜下にストローマ細胞株と A20-Model-Ag 細胞ライセートで刺激した BMDC を添加したコラーゲンスポンジを導入して A20-Model-Ag 特異的人工リンパ組織 (A20-Model-Ag-aLT) を構築した。また、モデル腫瘍抗原ペプチド (Model-Ag-pep) で刺激した BMDC (Model-Ag-pep-BMDC) で免疫した BALB/c マウスの腎皮膜下にストローマ細胞株と Model-Ag-pep-BMDC を添加したコラーゲンスポンジを導入してモデル腫瘍抗原ペプチド特異的人工リンパ組織 (Model-Ag-pep-aLT) を構築した。

③ 免疫不全マウスでの抗腫瘍効果の検討

構築3要素を腎皮膜下に導入して3週後の人工リンパ組織 (A20-Model-Ag-aLT あるいは Model-Ag-pep-aLT) を重症複合性免疫不全 (SCID) マウスの腎皮膜下に移植すると同時に A20-Model-Ag 腫瘍細胞を皮内に接種し、人工リンパ組織による抗腫瘍効果 (予防的治療) を判定した。

4. 研究成果

(1) 人工リンパ組織の脈管系形成

人工リンパ組織では構築3要素導入の数日後から血管形成が観察され、2週間後にはすべての人工リンパ組織が豊富な血管のネットワークを有していた。一方、リンパ管は血管形成より遅れて発達することが分かった。また、リンパ管が血管の近傍に発達している様子が観察されたことから、リンパ管形成が新生血管によって誘導される可能性が示唆された。

(2) リンパ管の機能

(1) で人工リンパ組織のリンパ管形成が血管よりも遅れることがわかったので、構築3要素を導入後5週目の人工リンパ組織を用いて、Ferritin lymphangiography と Evans

blue lymphangiography を行った。

マウスの腎臓を麻酔下で体外に露出し、腎皮膜下にある人工リンパ組織の表面数カ所に毛細ガラス管で ferritin を注入して 20 分間循環させた後、マウスから腎臓を摘出してパラホルムアルデヒドで固定した。固定した組織の凍結切片を LYVE-1 (リンパ管マーカー) 免疫染色と同時に ferritin 染色を行うと、ferritin を内腔に含む LYVE-1 陽性リンパ管が検出された。また、同様に Evans blue 溶液を人工リンパ組織に注入し、リンパ管に入った Evans blue 溶液の流れる様子を実体顕微鏡下でビデオ撮影を行って観察した。その結果、Evans blue 溶液が人工リンパ組織の中心部から外向きの方向、すなわち遠心性に流れることがわかった。逆方向、すなわち人工リンパ組織の外側から中心に向かうリンパ液の流れは確認できなかった。また、リンパ管の弁の存在を示唆する結果も得られた。これらの事から、人工リンパ組織にはリンパ節の輸出リンパ管に相当する機能的なリンパ管が存在することが分かった。

さらに、一次免疫したマウスを用いて人工リンパ組織を構築した後に同じ抗原を静脈内投与し、4 日後に人工リンパ組織を回収して免疫組織学的解析を行ったところ、抗原特異的抗体産生細胞を含むリンパ球が管腔内にぎっしりと詰まったリンパ管の存在が確認された。この結果から活性化リンパ球や抗体が人工リンパ組織から輸出リンパ管を通過して外部へ供給されることが示唆された。

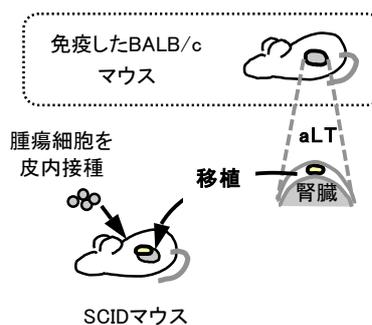
(3) 人工リンパ組織の血管について

人工リンパ組織にはリンパ球が多数集積してくるにも関わらず、すべての人工リンパ組織でリンパ節の HEV と同様の血管が存在するわけではない。HEV 以外のリンパ球の流入経路を見つけるために、人工リンパ組織の血管について詳細な免疫組織学的解析を行った。その結果、通常の毛細血管ともリンパ節の HEV とも性質の異なる血管が形成されていることが分かった。

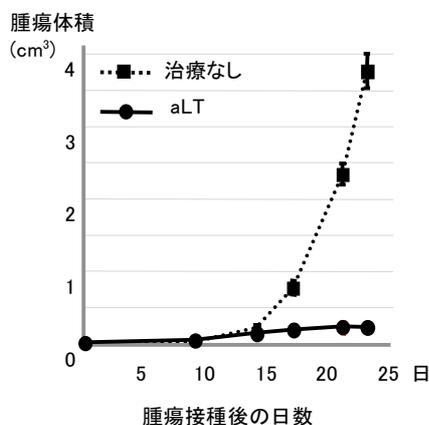
また、人工リンパ組織からリンパ球を回収して T 細胞上の活性化マーカーの発現をフローサイトメトリーによって解析したところ、同じマウスの二次リンパ組織の T 細胞と比較して、活性化 T リンパ球の割合が高いことが分かった。二次リンパ組織の T 細胞の約 10% が活性化リンパ球であるのに対して、人工リンパ組織では T 細胞の約 55% が活性化リンパ球であった。

(4) 抗腫瘍免疫反応の誘導

A20-Model-Ag-aLT または Model-Ag-pep-aLT を重症複合性免疫不全 (SCID) マウスの腎皮膜下に移植すると同時に A20-Model-Ag 腫瘍細胞を皮内に接種し、腫瘍形成に及ぼす影響を検討した。



A20-Model-Ag-aLT あるいは Model-Ag-pep-aLT いずれの人工リンパ組織を移植した SCID マウスでも皮内に接種した腫瘍細胞の増殖が抑制された。下の図は A20-Model-Ag-aLT を移植した SCID マウスでの実験結果を示す。



モデル腫瘍抗原 (Model-Ag) に対する抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 活性を CTL assay により解析した。A20-Model-Ag-aLT を移植した SCID マウスでは一部のマウスで、また、Model-Ag-pep-aLT を移植した SCID マウスは全例で Model-Ag 特異的な CTL 活性が検出された。人工リンパ組織に含まれるリンパ球の数、すなわち人工リンパ組織によって SCID マウスに導入できるリンパ球数は一匹当たり、わずか 2×10^5 個から多くて 1×10^6 個であるにも関わらず効果的に抗腫瘍免疫を導入する事ができることが明らかになった。これらの結果と成果(3)に述べたフローサイトメトリーの結果から、人工リンパ組織には抗原特異的 T 細胞が濃縮されており、それらが SCID マウスの体内で抗原特異的 CTL 活性を発揮して腫瘍の増殖を抑制したと考えられる。

組織工学技術を用いて構築した免疫組織における血管とリンパ管の形成と適応免疫機能の関係を本研究のように詳細に調べた研究はこれまで例がない。本研究課題によって、人工リンパ組織が活性化リンパ球を濃

縮する性質を持つことが明らかになった。また、人工リンパ組織によって抗腫瘍免疫を誘導し、その治療効果を証明することができた。今年4月にアメリカでFDAの承認を受けて樹状細胞を用いた免疫治療が悪性腫瘍の治療の選択肢の1つとして適用できることになった。今後、人工リンパ組織の構築法を改良すれば、腫瘍特異的なリンパ球により効率よく腫瘍免疫を賦活化する新しい免疫細胞治療として応用が可能になると考えている。

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 2 件)

① Katakai T., Suto H., Sugai M., Gonda H., Togawa A., Suematsu S., Ebisuno Y., Katagiri K., Kinashi T., and Shimizu A. Organizer-Like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J. Immunol.* 181(9): 6189-200, 2008

② 末松 佐知子 「人工リンパ組織構築とは何か」 *Organ Biology* 15(1) 23-32, 2008

[学会発表] (計 8 件)

① 服部 祐紀、松岡 須美子、末松 佐知子 「人工リンパ組織による抗原特異的T細胞免疫機能の解析」 第39回日本免疫学会, 2009年12月2日, 大阪(大阪国際会議場)

② 松岡 須美子、服部 祐紀、末松 佐知子 「人工リンパ組織におけるリンパ球ホーミングと脈管系形成(ホールマウント免疫組織解析)」 第39回日本免疫学会, 2009年12月2日, 大阪(大阪国際会議場)

③ 服部 祐紀、末松 佐知子 「腫瘍特異的人工リンパ組織による抗腫瘍効果」 第8回再生医療学会 2009年3月5日, 東京(東京国際フォーラム)

④ SUEMATSU Sachiko, HATTORI Yuki. Characteristic vascular system induction is important for artificial lymphoid tissue construction and its immune function: 第38回日本免疫学会, 2008年12月2日, 京都(国立京都国際会館)

⑤ HATTORI Yuki, SUEMATSU Sachiko. Functional Lymphatic Vessel Formation in Tissue-engineered Secondary Lymphoid Tissue-like Organoid in mice. 第37回日本免疫学会, 2007年11月20日, 東京(グランドプリンスホテル新高輪)

⑥ 末松 佐知子

「ストローマ細胞を用いたマウス人工リンパ組織の構築」 第34回臓器保存生物医学会 2007年11月17日, シンポジウム 札幌(北海道大学学術交流会館)

⑦ Yuki Hattori, Takeshi Watanabe, and Sachiko Suematsu. Vascular structure in tissue-engineered secondary lymphoid tissue-like organoid in mice. 第36回日本免疫学会 2006年12月11日, 大阪(大阪国際会議場)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○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

末松 佐知子 (SUEMATSU SACHIKO)

独立行政法人 医薬基盤研究所・

基盤的研究部免疫細胞制御プロジェクト・

プロジェクトリーダー

研究者番号: 50250345

(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

服部祐紀 (HATTORI YUKI)

独立行政法人 医薬基盤研究所・

基盤的研究部免疫細胞制御プロジェクト・

特任研究員