

平成21年4月1日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390142

研究課題名(和文)人工リンパ節を用いた免疫記憶細胞の解析と応用

研究課題名(英文) Analysis and application of memory T and memory B cells by applying artificial lymph nodes

研究代表者：

渡邊 武 (WATANABE TAKESHI)

京都大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：40028684

研究成果の概要：

我々は世界で初めて、自然のリンパ節と類似の構造を持ち、強力な免疫機能を発揮できる移植可能な人工のリンパ節を構築したが、本研究では我々の作製した人工リンパ節において自然のリンパ節では到達し得ないほどの爆発的な二次免疫反応が効率的に誘導されてくることがわかった。我々の人工リンパ節を応用することで非常に高い親和性を持つ治療用モノクローナル抗体の作出が容易に可能となる。我々の作製した人工リンパ節では抗原特異的な記憶ヘルパーT細胞、記憶B細胞が高率に集積してくること、抗原刺激後には濾胞性ヘルパーT(TFH)細胞が高率に人工リンパ節内で分化、増殖してくること、増殖したTFHヘルパーT細胞からのサイトカインIL-21により、抗原刺激を受けたB細胞あるいはCD8陽性キラーT細胞の爆発的な増殖、分化が誘導されることがわかった。しかしながら、抗原特異的なIgGクラスの抗体が大量に産生されてくるにも拘らず、人工リンパ節においては自己抗体の産生は全く見られない。我々の人工リンパ節はヒト免疫系の修復、強化、再生など臨床応用に発展する可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2008年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

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、リンパ節、記憶T細胞、記憶B細胞、濾胞性ヘルパーT細胞、感染症治療、腫瘍免疫、再生医学

1. 研究開始当初の背景

免疫系はつねに全身をくまなく監視し、生体内に侵入してくる病原体や体内に生じたがん細胞などをいち早く見つけ出し、それを強力に排除する能力をもっている。さらに一度その脅威に遭遇すると免疫学的に記憶され、2度目の同じ脅威に対して速やかに強力な反応をおこして排除する。その反応の場所の中心がリンパ節などの二次免疫組織である。感染症や癌などを予防あるいは治療するワクチンが有効に作用するためには、ワクチン抗原が免疫系を的確に活性化させる構造を持っていることが必須であるが、同時に生体側の免疫系がその能力を十分に発揮出来る状態になっている必要がある。重症感染症、がん患者においてはしばしば免疫系の能力が大きく低下している。あるいはエイズウイルスのように感染微生物が免疫系を攻撃して破壊しその能力を低下、疲弊させる。一方、腫瘍免疫は癌細胞の排除に理想的な方法であるが、未だその効果を十分に発揮出来る戦術は確立されていない。これらの難題に対処するためには、免疫系すなわち免疫監視機構そのものを迅速に強力に賦活化あるいは修復、補強する方法の開発が必要である。

2. 研究の目的

我々は重篤な感染症あるいは癌などで疲弊した免疫系を回復させる新たな方法として、強力な二次免疫反応誘導能を有し、かつ装着、脱着が容易な免疫組織-リンパ節-を人工的に構築して治療に応用することを目指した。このような人工のリンパ装置はさらに *in vitro* で有用な免疫系産物すなわち抗体やサイトカインの新たな効率的な産生を提供するとともにヒト免疫反応を時空間的に

解明する手段を提供する。

3. 研究の方法

新生仔マウス胸腺上皮細胞株TEL-2細胞と骨髄由来樹状細胞をコラーゲンスポンジに吸着させ、これを腎臓皮膜下に移植することにより自然のリンパ節に類似したリンパ節組織が構築された (Suematsu and Watanabe *Nature Biotechnology* 22: 1539-1545, 2004)。

我々が作製した人工リンパ節では、1) T細胞や B細胞と共に樹状細胞も存在する。2) T細胞領域とB細胞領域が明確に区別され、濾胞(ろほう)が形成されている。3) 抗原刺激によりB細胞領域には胚中心の形成が認められ、正常リンパ組織の胚中心B細胞同様、活発に増殖しているB細胞が存在することが確認された。4) 抗原刺激により最終分化段階の抗体産生細胞となったB細胞、すなわち形質細胞も多数存在することがわかった。さらに、B細胞領域には明確な濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell : FDC) のネットワークの形成も認められ、構築されたB細胞領域が単なるB細胞の集合体ではなく、正常リンパ組織の濾胞と同様の免疫機能を果たす組織構造を保持していることがわかった。5) 高内皮静脈を持つ血管構造の形成が確認され全身循環とのつながりが証明された。6) T細胞領域におけるCD4/CD8 比は自然のリンパ節のそれとほぼ同じ比率であった。7) さらに小、毛細血管系の構築、リンパ管の構築が見られた。このような人工リンパ節を用いて以下の研究を行った。

4. 研究成果

1) 人工リンパ節は高効率の免疫機能を持つ。

我々の人工リンパ節を非免疫状態の個体、あるいは免疫不全症(SCID)の個体に移植し抗原で免疫すると、抗原特異的抗体産生系において、人工リンパ節内および人工リンパ節

を移植したマウス個体で、正常リンパ節では到達し得ないほどの強い二次免疫反応を誘導出来た。特に、免疫能力の無い免疫不全個体(SCID マウス)に移植して抗原刺激すると、正常個体に免疫した時よりも50~100倍高い二次免疫反応が誘導された。血清中には1mlあたり数mgの高濃度の抗原特異的抗体が産生される。すなわち、抗原特異的な高親和性のIgGクラス抗体の産生が速やかに大量に誘導された。このような高効率の免疫機能をもった人工リンパ節の成功は世界で初めてである。しかも高親和性IgG抗体を産生する抗体産生細胞が一度に大量に得られる。細胞融合法によって得られる抗原特異的なハイブリドーマのクローン数は従来の方法に比較して10-20倍以上の高効率である。しかも得られた抗原特異的なモノクローナル抗体のV領域diversityは多様性に富んでおり、種々の親和性の異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンが得られる。従来の方法ではなかなか得られなかった非常に高い親和性の抗原特異的なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを容易に得ることが出来る。以上の結果は、我々の人工リンパ節が抗原特異的超高親和性の(IgGクラス)モノクローナル抗体を作製する方法として非常に優れており治療用モノクローナル抗体を作製する方法として非常に優れたものであると言える。

	血清中のIgGクラスNP特異的抗体量 (ug/ml)
人工リンパ節を移植したSCIDマウス (非免疫)	0.61± 0.32
人工リンパ節を移植してSCID マウス (2回の免疫後)	7,258.9 ± 707.9
SCIDマウス (2回の免疫後)	2.8 ± 0.0
正常Balb/cマウス (NP-OVAで2回免疫後)	673.3 ± 271.8

人工リンパ節を移植されたSCIDマウスの血清中には、IgG1クラスのNP抗原特異的抗体が大量に産生されている

2) 人工リンパ節は強い抗腫瘍活性を發揮する。

人工リンパ節を構築する際にTH1型の免疫反応を誘導するような条件下で人工リンパ節を構築すると抗原特異的にIFN γ を効率に産生する組織を構築することが出来、担がんマウスに移植すると強い抗腫瘍効果を示した。がんを摘除してがん細胞で感作された個体において人工リンパ節を作製し、それを担がん動物に移植すると、がんの増殖が強く抑制された。

3) 人工リンパ節ではエフェクター・メモリーT細胞、特に濾胞性ヘルパーT細胞が濃縮される。

人工リンパ節内のCD4陽性T細胞の70-80%はCD4+, CD44+, CD62L-の記憶T細胞である。さらにこのT細胞を調べてみると、ICOS1+, CXCR5+, OX40+であり、しかもCD127(IL-7Ra)陽性であった(一方、CCR7は陰性である)。さらにこのIL-21サイトカインを高発現していることがわかった。また、BCL6を発現していた。このような結果から、人工リンパ節内のCD4陽性T細胞の多くは濾胞内ヘルパーT細胞(T-follicular helper, T-FH)およびeffector memory T細胞であることがわかった。T-FH細胞はGerminal centerにおいてB細胞を抗体産生細胞へ強力に増殖、分化させることがわかっている。また、CD8T細胞を増殖させ腫瘍免疫を促進することが示されている。

4) 人工リンパ節には抗原特異的メモリーB細胞も濃縮される。

一方、memory-B細胞も人工リンパ節で濃縮される。人工リンパ節内のB細胞の5-10%は抗原特異的記憶B細胞である。これほど高率に抗原特異的なメモリーB細胞が濃縮されてくる系はこれまでになかった。十分な数のメモリーB細胞を純粋に得ることが出来るこ

とから、現在、この細胞を用いて、メモリーB細胞特異的な遺伝子の単離を行っている。すでに3-5個の有力な候補遺伝子を同定しており、その一つの遺伝子の欠損マウスでは二次免疫反応の誘導が著明に低下していることがわかった。今後は、メモリーB細胞の分子基盤についても研究を進める。

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11件)

1. Okamoto, N., Nishimoto, S., Chihara, R., Shimizu, C. and Watanabe, T. Artificial lymph nodes induce potent secondary immune responses in naïve and immunodeficient mice. *J. Clin. Invest.* 117: 997-1007, 2007 (査読有り)
2. Beghdadi, W., Porcherie, A., Dubayle, D., Peronet, R., Huerre, M., Watanabe, T., Ohtsu, H., Louis, J., Mecheri, S. Inhibition of histamine-mediated signaling confers significant protection against severe malaria in mouse model of disease. *J. Exp. Med.* 205:395-408, 2008 (査読有り)
3. McGlade, P Gorman, S Lenzo JC, JW Tan, Watanabe T, JJ Finlay-Jones, WR Thomas, Hart. PH Effect of both UVB irradiation and histamine receptor function on allergic responses to an inhaled antigen. *J Immunol* 178: 2794-802, 2007 (査読有り)
4. Udono H, Wang J-O., Watanabe, T. Antigen presentation to lymphocytes. (review). *Encyclopedia of life science*. 2007. John Wiley & Son, Ltd. (査読有り)
5. Kubonishi, S., Kikuchi, T., Yamaguchi S., Tamamura H., N. Fujii, T. Watanabe, F. Arenzana-Seisdedos, Ikeda, K., Matsui T., Tanimotoi M., Katayama: Y. Rapid hematopoietic progenitor mobilization by

sulfated colominic acid. *BBRC* 355:970-975, 2007 (査読あり)

6 Bryce P.J., Mathias C., Harrison K., Watanabe T., Geha R.S., Oettgen H. The H1 histamine receptor regulates allergic lung responses.

J. Clin. Invest. 116:1624-1632, 2006 (査読あり)

7. Huang Zhi-Li, Mochizuki, T. Wei-Min Qu, Zong-Yuan Hong, Watanabe, T. Urade, Y.

and Hayaishi O., Alterations of sleep-wake behavioral characteristics and lack of arousal response to H3 receptor antagonist in histamine H1 receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 4687-4692, 2006. (査読有り)

8. K. Sonoda, S. Miyamoto, T. Hirakawa, H. Yagi, F. Yotsumoto, M. Nakashima, T. Watanabe, H. Nakano. Clinical significance of RCAS1 as a biomarker of uterine cancer. *Gynecologic Oncology* 103:924-931, 2006. (査読有り)

9. Takahashi H. K., Watanabe T., Yokoyama A., Iwagaki H., Yoshino T., Tanaka N. and Nishibori M.: Cimetidine induces IL-18 production through H2-agonist activity in monocytes. *Mol. Pharmacology* 70: 450-453, 2006 (査読有り)

10. Hossen M.A., Inoue, T. Shinmei, Y. Fuii Y, Watanabe T., Kamei C.: Role of substance P on histamine H3 antagonist-induced scratching behavior in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 100:297-302, 2006. (査読有り)

11. Ishikawa F., Yasukawa, M. Lyons B., Yoshida S., Miyamoto T., Yoshimoto G., Watanabe T., Akashi K., Shultz L.D., Harada M.: Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor g chain^{null} mice. *Blood* 106:1565-1573, 2005 (査読有り)

[学会発表] (計3件)

1. 渡邊 武、「免疫組織・臓器の構築—リンパ節の人工的構築」日本動物細胞工学会 (シンポジウム) 2007年10月24日 (東京)

2. 渡邊 武、「Generation of artificial lymph nodes and their immunological function」

理研-日本免疫学会ジョイントシンポジウム 2007年7月26日 (横浜)

3. 渡邊 武、「Generation of transplantable lymph node-like tissues and induction of immune responses」第38回日本免疫学会 (シンポジウム) 2008年12月3日 (京都)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

特願2005-357949

PCT/JP2006/325137 (外国特許)

発明者：渡邊 武

発明の名称：人工リンパ節を用いた効率的な抗原特異的ハイブリドーマの作成法

出願人：独立行政法人理化学研究所

出願日：平成17年12月12日

○取得状況 (計1件)

特許第4097544号

発明者：渡邊 武

末松佐知子

発明の名称：人工リンパ節

取得日：2008年3月21日

[その他]

テレビ、新聞報道：

NHK 総合テレビニュース 平成19年3月16日 (午前6時、午前7時、正午)

毎日新聞 平成19年3月16日朝刊

日本経済新聞 平成19年3月16日朝刊

日経産業新聞 平成19年3月16日

日刊工業新聞 平成19年3月16日

NIKKEI NET 平成19年3月16日

New Scientist(USA) 平成19年3月16日

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 武 (WATANABE TAKESHI)

京都大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：40028684

(2)研究分担者

小林 由佳(KOBAYASHI YUKA)

独立行政法人理化学研究所・特別研究員

研究者番号：00433590

(3)連携研究者

なし

