

平成 22年 5月 24日現在

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20689005
 研究課題名（和文） 二次リンパ器官ストローマ細胞ネットワークの構築と免疫・生理学的機能解析
 研究課題名（英文） Immunological and physiological analysis of the function and construction of stromal cell network in secondary lymphoid organ
 研究代表者
 片貝 智哉（KATAKAI TOMOYA）
 関西医科大学・医学部・講師
 研究者番号：00324682

研究成果の概要（和文）：

免疫応答が誘導される二次リンパ器官では、ストローマ細胞のネットワークが組織構造や免疫細胞活動の基盤となっているが、その機能はいまだ不明な部分が多い。また、ストローマ細胞を調べるための新たな研究手法が必要である。

我々は、マウスのリンパ節からストローマ細胞を単離培養する手法を開発し、試験管内でリンパ球の機能を支持することに成功した。また、網目状の足場素材を用いてストローマ細胞の三次元的なネットワーク構造を再現した。一方、ストローマ細胞特異的に誘導性遺伝子改変が可能なモデル動物の作製を試みた。

研究成果の概要（英文）：

In the secondary lymphoid organs in which immune responses are efficiently induced, the network of mesenchymal stromal cells support tissue architecture and immune cells behaviors. However, the detailed functions of stromal cells are still largely unclear. Technical advances to investigate lymphoid stromal cells are also required.

We established a method to efficiently isolate stromal cell fraction from mouse lymph node and for the culture of the stromal cells to make a confluent monolayer. Using this technique, we observed that isolated primary lymphocytes efficiently migrated on the stromal monolayer. Moreover, We constructed three-dimensional network of primary stromal cells using supportive meshwork substrates in vitro. We also tried to develop an animal model for genetically modifying stromal cells in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2009年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	17,200,000	5,160,000	22,360,000

研究分野：免疫細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・細胞機能形態学

キーワード：細胞間相互作用、細胞動態、ストローマ細胞、組織微小環境、二次リンパ器官、免疫応答、リンパ節

1. 研究開始当初の背景

(1) 全身の各所に分布するリンパ節などの二次リンパ器官は、免疫系が異物に対して効果的に応答するために極めて重要な臓器群である。その組織内部では、リンパ球を中心とする各種の免疫細胞が局在した独特の構造が見られ、時間的・空間的に秩序のある免疫反応の誘導に役立っていると考えられる。また、リンパ球は組織内において活発に移動しながら特異的抗原を探する必要があるので、その移動や細胞どうしの接触を支持する足場ならびに適度な空間が不可欠である。緻密な三次元ネットワークを形成する間葉系由来のストローマ細胞とよばれる細胞群がこの特徴的な組織微小環境をつくり出す役割を担っている。

(2) ストローマ細胞は解析が困難なことからその性質が良くわからず、これまであまり注目されてこなかったが、免疫応答の様々な局面に関与する可能性があることから、近年その重要性が認識されつつある。しかし、複雑なネットワーク構造の構築やリンパ球の活発な移動を支持する分子メカニズム、免疫応答時における具体的な機能など、根本的な問題の多くは未解決のままである。研究代表者らはこれまでにストローマ細胞が構築する独特の組織構造や機能的な意義を探りいくつかの興味深い知見を得てきたことから、それを足がかりにして、ストローマ細胞に関してさらに追求する必要があった。

2. 研究の目的

(1) 二次リンパ器官（リンパ節）における間葉系ストローマ細胞の免疫学的・生理学的な役割を明らかにする。

(2) ストローマ細胞がとるユニークな三次元ネットワーク構造の構築メカニズムを明らかにする。

(3) 免疫細胞の機能を支持するメカニズムを明らかにする。特にリンパ球の遊走支持能に注目する。

(4) リンパ節からストローマ細胞を単離・培養するための効率良い実験システムを確立する。生体内においてストローマ細胞の遺伝子改変を誘導するモデルマウスを作製する。

3. 研究の方法

(1) マウスのリンパ節から酵素処理および磁気細胞分離法によりストローマ細胞分画を単離し、ファイブロネクチンによりコートしたガラス培養皿において初代培養を行なう。一週間ほどの培養でストローマ細胞単層を形成させ、その上にマウスから単離直後のT細胞をのせ、顕微鏡下において保温し、遊走運動を微速度撮影により観察する。

(2) 単離した初代ストローマ細胞や研究代表者により樹立されたストローマ細胞株にレトロウイルスベクターを用いて緑色蛍光タンパク質（GFP）を安定発現させる。この細胞を様々な網目状素材（スポンジ材等）を足場として播種し、二次リンパ器官で見られるような三次元ネットワーク構造を試験管内において再現し、詳細に観察する。

(3) マウスリンパ節より単離したストローマ細胞分画およびマウス胎仔線維芽細胞から全RNAを抽出し、マイクロアレイ解析により遺伝子発現プロファイルを比較する。

(4) 生体内におけるストローマ細胞の役割を明らかにするため、誘導的に遺伝子改変が可能なマウスモデル系の作成を試みる。そのために、間葉系細胞が発現するPDGFRb 遺伝子プロモーターを用いてタモキシフェン作動性の DNA 組換え酵素 CreERT2（エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン変異体に Cre リコンビナーゼを融合させた分子）を発現させるマウス系統、および CreERT2 により組換えられることで、I κ B α 変異体（ストローマ細胞の機能に重要な NF κ B のはたらきを強力に抑制する）を発現するようになるマウス系統を個別に作製し、交配により両導入遺伝子を持つマウス個体を得る。タモキシフェン投与により遺伝子改変を誘導し、ストローマ細胞の性質を速やかに変化させた場合に、それ以前と以降の免疫系の挙動を評価する。

4. 研究成果

(1) マウスリンパ節からストローマ細胞分画を効率的に単離・培養する手法を開発した。また、この方法を用いて形成させた単層（図1）上においてマウスから単離直後のT細胞を効率よく遊走させることに成功した（図2）。この実験系において、T細胞

がケモカインCCL21からのシグナルやインテグリンLFA-1を介したストローマ細胞への接着に依存して非常に活発に移動することを明らかにした(図3)。

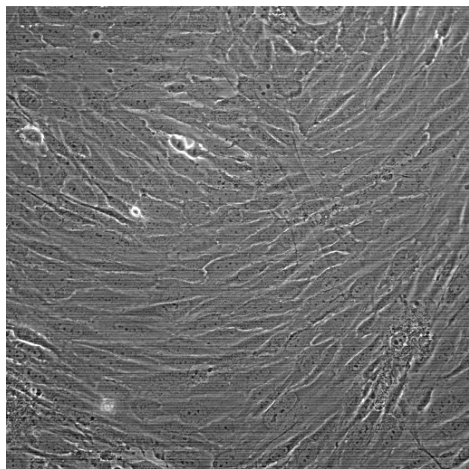


図1 マウスリンパ節より単離した初代ストローマ細胞の単層培養

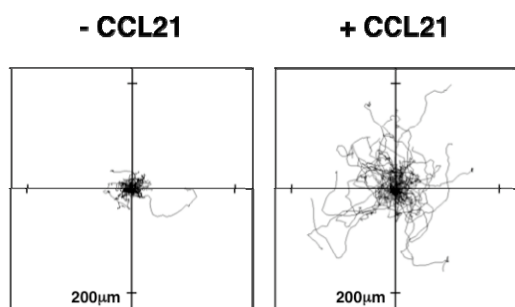


図2 ストローマ細胞単層上におけるケモカインCCL21に依存したT細胞の遊走軌跡(右)

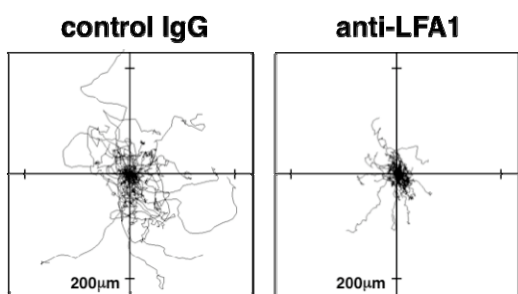


図3 抗インテグリンLFA-1抗体によるT細胞遊走の阻害(右)

(2) 繊維径や網目サイズが適した網目状素材(圧縮メラミンフォーム)を見出し、これにリンパ節由来初代ストローマ細胞を播種し、三次元的なネットワーク構造の再現を試みたところ、生体内に見られる三次元的な組織構造の状況を良く反映した細胞ネットワークを形成させることに成功した(

図4)。

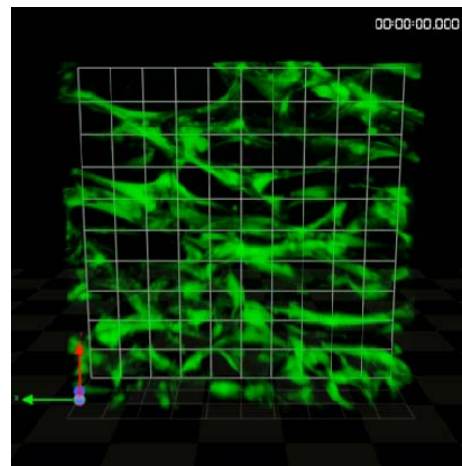


図4 編目素材上で培養したGFP発現マウスリンパ節由来初代ストローマ細胞による三次元的ネットワーク構造の形成

(3) マイクロアレイ解析によりリンパ節ストローマ細胞分画とマウス胎仔線維芽細胞を比較し、ストローマ細胞に特異的に発現する多数の遺伝子を同定した。これにより今後の研究を進める上での大きな手掛かりを得た。

(4) 生体内の組織におけるストローマ細胞の役割を直接的に調べるためには、ストローマ細胞特異的に誘導性遺伝子改変が可能なモデル動物を作製する必要があるが、この目的のために、ストローマ細胞を含む間葉系細胞においてCreERT2発現するマウス系統、および組換え誘導性I κ B変異体発現マウス系統を作製した(図5)。このマウスモデルに関しては現在引き続き解析を進めている。

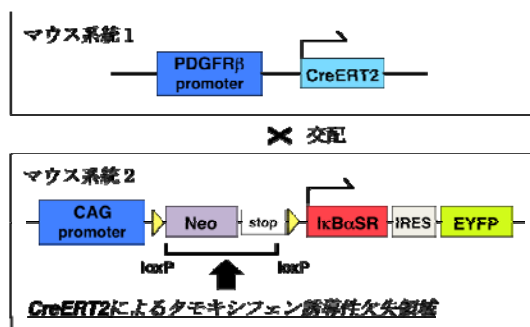


図5 トランスジェニックマウス系統

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5件)

1. Ebisuno Y., Katagiri K., Katakai T., Ueda Y., Nemoto T., Inada H., Nabekura, J., Okada T., Kannagi R., Tanaka T., Miyasaka M., Hogg N., Kinashi T., Rap1 controls lymphocyte adhesion cascade and interstitial migration within lymph nodes in RAPL-dependent and -independent manners. *Blood* 115: 804-814, 2010 (査読あり)
2. Katagiri K., Katakai T., Ebisuno Y., Ueda Y., Okada T., and Kinashi T. Mst1 controls lymphocyte trafficking and interstitial motility within lymph nodes. *EMBO J.* 28: 1319-1331, 2009 (査読あり)
3. Suto H., Katakai T., Sugai M., Kinashi T., Shimizu A. CXCL13 production by an established lymph node stromal cell via lymphotoxin-beta receptor engagement involves the cooperation of multiple signaling pathways. *Int. Immunol.* 21: 467-476, 2009 (査読あり)
4. Katakai T., Suto H., Sugai M., Gonda H., Togawa A., Suematsu S., Ebisuno Y., Katagiri K., Kinashi T., Shimizu A. Organizer-like reticular stromal cell layer common adult secondary lymphoid organs. *J. Immunol.* 181: 6189-6200 2008 (査読あり)
5. Katakai T. and Shimizu A. Undesired meeting of lymphocytes: organ-specific infiltration and the organization of ectopic lymphoid tissue in a murine experimental autoimmune gastritis. *Immunol. Lett.* 118: 103-109 2008 (査読あり)

[学会発表] (計2件)

1. 片貝智哉 他 “LFA-1 dependent adhesion to ICAM-1 contributes to high-velocity migration of primary T cells on stromal cells isolated from lymph nodes” 第39回 日本免疫学会総会・学術集会 (大阪国際会議場) 2009年12月2日

2. 片貝智哉 他 “Lymph node derived stromal cell lines support the motility of lymphocytes in vitro” 第38回 日本免疫学会総会・学術集会 (京都・国際会館) 2008年12月1日

○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

<http://www3.kmu.ac.jp/molgent/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片貝智哉 (KATAKAI TOMOYA)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：00324682