

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04791

研究課題名（和文）リンパ節由来ストローマ細胞株を用いる人工リンパ節構築系の開発

研究課題名（英文）Development of artificial lymph node construction systems using a stromal cell line derived from lymph node

研究代表者

曲 正樹（Magari, Masaki）

岡山大学・ヘルスシステム統合科学学域・助教

研究者番号：50359882

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：リンパ球は、血管やリンパ管を通して全身のリンパ節を循環し、病原体が侵入した際には感染部位近傍のリンパ節においてストローマ細胞の制御の元で免疫応答を行う。本課題では、リンパ球支持能力の高いストローマ細胞を樹立するため、ストローマ細胞の免疫系細胞に対する作用機構の解明を行なった。マウスストローマ細胞株（FL-Y細胞）にB細胞活性化因子（BAFF）と走化性因子（CXCL13）を発現させることによりB細胞の活性化と走化性の促進が見られた。また、FL-Y細胞が発現するSLAMF8は、B細胞活性化能力を持つ単球系細胞の分化促進作用を持つ一方、SLAMF5はB細胞による抗体産生機構を抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体は、病原体の排除のみならず感染予防においても有効である。実際、ワクチンの効果の一部は、体内に病原体に対する高機能な抗体を誘導することにより発揮される。ストローマ細胞は、リンパ球の集合体であるリンパ組織の構造構築のみならず、感染後に生じる高機能抗体の産生調節に重要な役割を担う。そのため、ストローマ細胞による免疫系細胞の制御機構を明らかにすることは、感染症対策やがん予防分野への展開が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Lymphocytes circulate in the body through blood vessels, lymph vessels and secondary lymphoid tissue including lymph nodes. When pathogens invade in the body, lymphocytes initiate in immune response under the control of stromal cells in draining lymph nodes. In this project, I aim to elucidate the regulatory mechanism of stromal cells on immune cells including lymphocytes to establish stromal cells with high lymphocyte-supporting ability. Firstly, we found that expression of B cell activating factor (BAFF) and chemotaxis factor (CXCL13) in a mouse stromal cell line (FL-Y cells) promoted B cell activation and chemotaxis. We also found that SLAMF8 expressed by FL-Y cells promotes the differentiation of monocytic cells with B cell activating ability, while SLAMF5 suppresses antibody responses by B cells.

研究分野：免疫学

キーワード：リンパ節 B細胞 抗体 濾胞樹状細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 科研費報告研究開始当初の背景

リンパ球の一種である B 細胞より産生される抗体は、生体内に侵入した病原体（抗原）の排除に重要な役割を担う。リンパ球は、血管とリンパ管を通して全身のリンパ組織を循環しているが、病原体が侵入した際には感染部位近傍のリンパ節で活性化し、ストローマ細胞の制御のもと抗原への免疫応答を開始する。リンパ節は、B 細胞とそれらを活性化する T 細胞を含むリンパ球や樹状細胞などが、組織常在性ストローマ細胞の時空間的な制御のもとに規則性を保って集合することにより形成されている。なかでも、抗原を認識した B 細胞は、ストローマ細胞の一種である濾胞樹状細胞 (FDC) の制御のもとヘルパー T 細胞 (Tfh) などからの刺激を受け、抗体の高機能化を起こしたのちに抗体産生細胞や二次免疫応答で活躍する記憶 B 細胞へと分化することで病原体排除に貢献する。ストローマ細胞は、リンパ節の形成および動的変化に必要不可欠であり、効率的な抗体応答を誘導する上で鍵となる細胞である。しかし、どのような刺激によりリンパ節が形成され、B 細胞に抗体の高機能化が誘発されるかなどを含め、リンパ節内でのリンパ球の時空間的制御の詳細は不明であるため、ストローマ細胞の機能解明は、リンパ節の構築および高機能抗体産生機構の全容を明らかにするために重要な課題である。しかし、リンパ組織に存在するストローマ細胞の単離が難しく、ストローマ細胞によるリンパ節の四次元的な制御機構を解明することが困難であった。

ストローマ細胞による二次リンパ組織の形成や効率的な免疫応答の動的制御にはサイトカインの一種であるリンホトキシン (LT) が重要な役割を担うことが知られている。そこで申請者は、マウスリンパ節から、LT 刺激により増殖するストローマ細胞株 (FL-Y) を樹立した。FL-Y 細胞は、B 細胞の生存を支持するなど体内の FDC の特徴を非常に良く再現する細胞株である。FL-Y 細胞を利用した細胞培養系は、FDC による B 細胞分化の制御メカニズムを解析するために有用であり、B 細胞応答の新たな発見へと繋がっている。

### 2. 研究の目的

本課題では、これまでの細胞培養系から得られている成果を進展させ、FDC 株を利用して、生体内に免疫能力を備えた人工リンパ節構造を構築できる手法を開発することを目的とした。これまでに、腎皮膜下へ移植した FL-Y 細胞の周辺にリンパ節様構造が形成され、さらにその中には B 細胞と T 細胞が集積していることを見出している。この発見は、FL-Y 細胞がリンパ節様構造を構築する能力を有することを示す。しかし、体内のリンパ節と比較して、FL-Y 細胞により形成された人工リンパ節様構造へ集積したリンパ球数は少ない。そのため、FL-Y 細胞のストローマ細胞としての機能を正確に評価できない。また今後は、人工的に作製したリンパ節様構造での抗体産生を含む免疫能力を正確に評価する必要がある。そこで、リンパ球の集積・活性化に関わる因子を遺伝子操作した FL-Y 細胞を作製し、細胞培養系を用いてリンパ球の活性化支持能力の高い細胞株を選択する。さらに、リンパ球の支持能力が高い改変 FL-Y 細胞を用いて、生体内のリンパ節と同等の免疫能力を有する人工リンパ節様構造を構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) FL-Y 細胞の培養

免疫したマウスリンパ節より樹立した FDC 株、FL-Y を使用した。FL-Y 細胞は、10%牛胎児血清および 50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノールを含む RPMI-1640/DMEM 培地中で培養した。また、FL-Y 細胞の培養には終濃度 5 ng/mL の TNF- $\alpha$  を添加した。FL-Y 細胞の刺激培養では、24 穴プレートに播種しておいた FL-Y 細胞に抗 LTBR 抗体 (2.5  $\mu$ g/mL) を添加し、4 日間培養した。

#### (2) FL-Y 細胞の機能改変

24 穴プレートに播種しておいた FL-Y 細胞に、ピューロマイシン耐性遺伝子を含む BAFF 発現ベクターとネオマイシン耐性遺伝子を含む CXCL13 発現ベクターを連続的に導入した。遺伝子導入翌日に、それぞれの薬剤を含む培地に交換し、薬剤耐性細胞を選択した (FL-YBC 細胞)。その後、FL-YBC 細胞から細胞破砕液を調整し SDS-PAGE により分離したのち、BAFF および CXCL13 の発現を抗 BAFF 抗体および抗 CXCL13 抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。また、同様の方法で SLAMF5 と SLAMF8 高発現 FL-Y 細胞を樹立した。

#### (3) FL-Y 細胞の B 細胞活性化能力の評価

TNP-KLH を足裏に免疫して 4 日後のマウスから、膝窩部リンパ節を摘出し細胞懸濁液を調製した。前日に播種した FL-Y 細胞もしくは遺伝子改変 FL-Y 細胞 ( $2 \times 10^3$  cells/mL) 上で、調整したリンパ節細胞 ( $4 \times 10^5$  cells/mL) を培養した。この際 TNP-KLH (10  $\mu$ g/mL) の刺激を加えた。培養 6 日目にフローサイトメトリーを用いて活性化 B 細胞数を評価した。また、トランスウェルの下層に、FL-Y および FL-YBC 細胞から回収した培養上清を添加した。上層には、マウス脾臓細胞 ( $2 \times 10^7$  cells/mL) を添加し、3 時間培養した。その後、下層に遊走した細胞をフローサイトメトリーを用いて評価した。

#### (4) FDMC の分化誘導

前日に播種しておいた FL-Y 細胞 ( $1 \times 10^4$  cells/mL) 上で、T 細胞を除去した脾臓細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/mL) を培養した。培養 7 から 12 日目にフローサイトメーターを用いて FDMC 数を評価

した。また、FL-Y 細胞上での FDC 分化誘導の際、SLAMF8 タンパク質は培養 0, 3, 6 日目に添加した。

#### 4. 研究成果

##### (1) BAFF/CXCL13 高発現 FL-Y 細胞の B 細胞活性化能力の評価

FDC は、活性化に伴い B 細胞活性化因子 (BAFF) や遊走因子 (CXCL13) を産生することが知られている。そのため、FDC の活性化状態により B 細胞調節能力が異なると考えられる。本研究では、活性化状態にある FDC を利用することが必要である。そこで、FL-Y 細胞に BAFF 発現ベクターと CXCL13 発現ベクターを導入し、BAFF/CXCL13 を恒常的に発現する FL-Y 細胞 (FL-YBC) を樹立した。薬剤選択後の FL-YBC 細胞における BAFF と CXCL13 タンパク質の発現をウェスタンブロットにより確認した。その結果、元の FL-Y 細胞と比較し FL-YBC 細胞では BAFF と CXCL13 が高発現していた (図 1 A)。次に、FL-YBC 細胞のリンパ球に与える作用を解析するため、免疫したマウスより回収したリンパ節細胞を FL-YBC 細胞上で 6 日間共培養した。その後、培養細胞を回収し、活性化 B 細胞 (GL7<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup> B 細胞) 数をフローサイトメトリーにより算出した。その結果、FL-YBC 細胞上で培養したリンパ球では、活性化 B 細胞数が有意に増加していた (図 1 B)。さらに、FL-YBC 細胞の産生する CXCL13 の B 細胞遊走活性化能力を評価するため、FL-YBC 細胞の培養上清を用いてトランスウェルアッセイを行った。その結果、FL-YBC 細胞の培養上清用いた場合において、B 細胞の遊走活性が向上していた (図 1 C)。これらの結果は、FL-YBC 細胞が B 細胞に対し高い活性化能力を持つとともに、B 細胞の誘因能力が高いことを示しており、生体内に人工的なリンパ組織を形成するために有用な細胞株となる可能性がある。

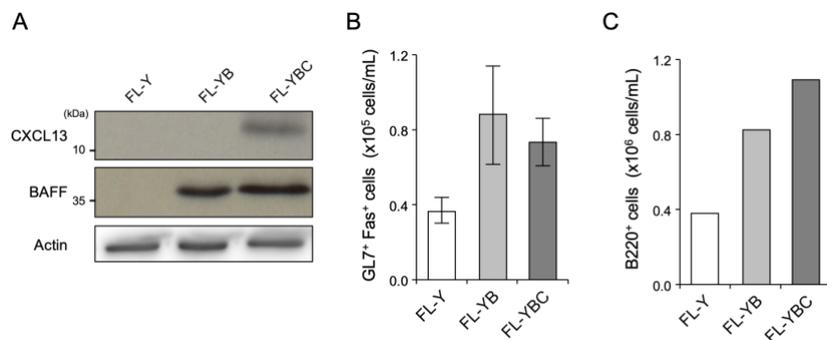


図1 FDCの発現するBAFFとCXCL13によるB細胞活性化促進

##### (2) FDC の発現する SLAMF8 の免疫系細胞に対する作用の解析

FDC は細胞表面に発現する LT $\beta$ R 刺激に伴い活性化することが知られている。先行研究において、FDC の活性化状態について評価するため、FL-Y 細胞を抗 LT $\beta$ R 抗体で刺激し mRNA の発現変化をマイクロアレイにより解析した。その結果、*Slamf8* や *Enpp2* を含む mRNA の発現上昇が認められた (図 2)。SLAMF8 は、これまでに免疫調節機能を持つことが報告されている 9 種類からなる SLAMF メンバーの一つである。FDC における SLAMF8 の機能を明らかにするため、B 細胞の生存促進因子であり、FDC において活性化に伴い発現することが知られている B cell activating factor (BAFF) を発現する FL-Y 細胞 (FL-YB) を親株として、レトロウイルス遺伝子導入法を用いて恒常的に SLAMF8 を高発現する FL-YB 細胞を作製した (BS8) (図 3 A)。次に、TNP-KLH で免疫したマウスより調整したリンパ節細胞を FL-YBS8 細胞上で培養し、B 細胞数および培養上清中の抗体量を評価した。その結果、FL-Y 細胞での SLAMF8 発現は B 細胞の生存および増殖に大きな影響を与えなかった (図 3 B)。また、抗体産生量にも有意な差が見られなかった (図 3 C)。これらの結果は、FDC の発現する SLAMF8 は活性化 B 細胞に対して直接作用しないことを示す。これまでに、FDC の新たな機能として B 細胞活性化能をもつ単球系細胞 (FDMC) の分化誘導を報告している。そこで、SLAMF8 の FDMC 分化に対する作用を解析するた

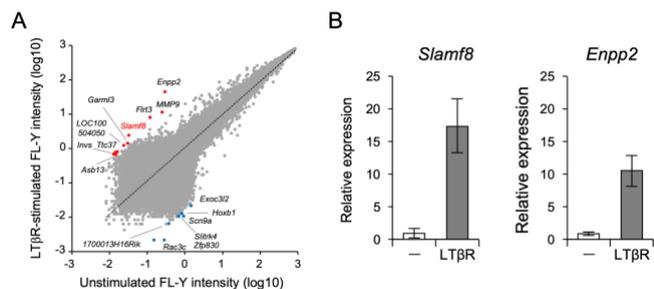


図2 FL-Y細胞の活性化による遺伝子発現変化

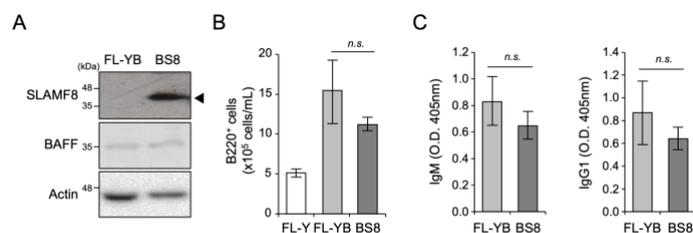


図3 FL-Y細胞の発現するSLAMF8の抗体産生に与える影響

め、SLAMF8を高発現させたFL-Y細胞(FL-YS8)上でFDMCの分化誘導を行なった(図4A)。その結果、SLAMF8の高発現によりFDMCの分化促進およびFDMCの最大数の増加が認められた(図4B)。また、FL-YS8細胞上で分化誘導したFDMCにおいて、FL-Y細胞上で分化誘導したFDMCで特徴的に発現が見られるCXCR4や*Plau* mRNAの同レベルの発現が認められた(図4C, D)。これらの結果は、SLAMF8がFDMCの分化促進を行う可能性を示唆する。SLAMF8は、ホモフィリックな相互作用により免疫系細胞の機能調節を行うことが報告されている。そこで、B細胞活性化および抗体産生を促進できる機能物質の開発を最終目的とし、外因性のSLAMF8によるFDMCの分化促進効果について検討した。まず、SLAMF8の細胞外領域、ヒトIgG1定常部とHisタグにより構成される融合タンパク質(SLAMF8-Fc)を作製するための発現ベクターを構築した。構築した発現ベクターを遺伝子導入し、Expi293発現系を用いて培養上清中にSLAMF8-Fc融合タンパク質を発現させた。その後、培養上清からニッケルカラムを用いてSLAMF8-Fcタンパク質を精製した。次に、作製したSLAMF8-Fc融合タンパク質をFL-Y細胞上でFDMCを分化誘導する際に添加した。その結果、SLAMF8-Fcの添加によりFDMC数の有意な増加が見られた(図4E)。一方、SLAMF8の細胞外領域とHisタグの融合タンパク質(SLAMF8-His)やヒトIgG1定常部(Human IgG1)では、FDMC数の増加は見られなかった。SLAMF8-Fcは二量体構造を形成するのに対し、SLAMF8-Hisは単量体構造を持つ。そのため、SLAMF8-FcによるFDMCの分化促進は、SLAMF8のFDMCへの強い結合力もしくはSLAMF8受容体の多量体化によるものであり、SLAMF8-FcがFDMC分化の促進に有用であると考えられる。

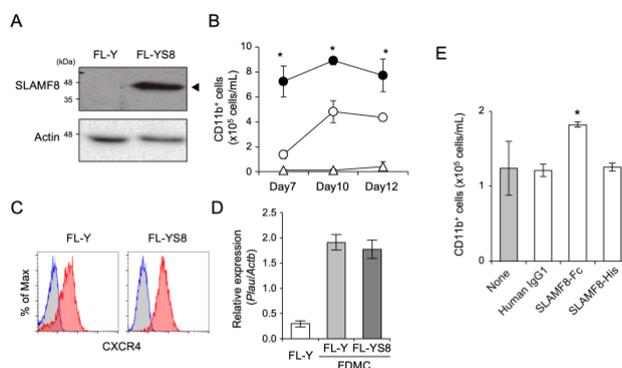


図4 FL-Y細胞の発現するSLAMF8のFDMC分化に与える影響

### (3) FDCの発現するSLAMF5のB細胞に対する作用の解析

FL-Y細胞において活性化に伴い*Slamf8* mRNAの発現が見られたため、他のSLAMFメンバーの発現も検討した。その結果、FL-Y細胞において*Slamf5* mRNAの発現増加も見られた。そこで、FDCの発現するSLAMF5の機能を解析するため、SLAMF5高発現FL-Y細胞を作製した。次に、SLAMF5高発現FL-Y細胞上で、免疫したマウスより調整したマウスリンパ節細胞を免疫抗原と共に培養した。その結果、抗体産生細胞の減少と分泌抗体量が減少していた(図5A)。一方、B細胞のみをFL-Y細胞上で培養した結果、SLAMF5高発現による抗体産生への影響は見られなかった(図5B)。これらの結果は、FDCの発現するSLAMF5がB細胞とT細胞と細胞間相互作用を阻害することで抗体産生を抑制する可能性を示唆している。

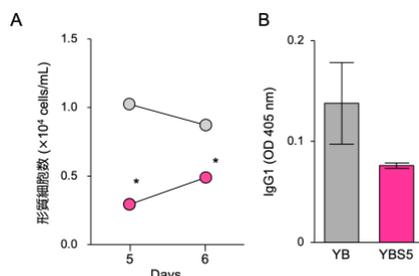


図5 FL-Y細胞の発現するSLAMF5の抗体産生に与える影響

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohtsuka Satomi, Miyai Yumi, Mima Hiroyuki, Magari Masaki, Chiba Yoichi, Suizu Futoshi, Sakagami Hiroyuki, Ueno Masaki, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 117
2. 論文標題 Transcriptional, biochemical, and immunohistochemical analyses of CaMKK $\beta$ splice variants that co-localize with CaMKIV in spermatids	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 102820 ~ 102820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceca.2023.102820	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamura Kento Nlandu, Yamauchi Haruki, Mima Hiroyuki, Chen Yerun, Ohtsuka Satomi, Magari Masaki, Morishita Ryo, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 659
2. 論文標題 Rapid detection of calmodulin/target interaction via the proximity biotinylation method	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 29 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.03.072	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Magari Masaki, Nishioka Miku, Hari Tomomi, Ogawa Sayaka, Takahashi Kaho, Hatano Naoya, Kanayama Naoki, Futami Junichiro, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 596
2. 論文標題 The immunoreceptor SLAMF8 promotes the differentiation of follicular dendritic cell dependent monocytic cells with B cell activating ability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2659 ~ 2667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kaneshige Riku, Ohtsuka Satomi, Harada Yuhei, Kawamata Issei, Magari Masaki, Kanayama Naoki, Hatano Naoya, Sakagami Hiroyuki, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 289
2. 論文標題 Substrate recognition by Arg/Pro rich insert domain in calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase for target protein kinases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 5971 ~ 5984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16467	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohtsuka Satomi, Okumura Taisei, abuchi Yuna, Miyagawa Tomoyuki, Kanayama Naoki, Magari Masaki, Hatano Naoya, Sakagami Hiroyuki, Suizu Futoshi, Ishikawa Teruhiko, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 61
2. 論文標題 Conformation-Dependent Reversible Interaction of Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase with an Inhibitor, TIM-063	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 545 ~ 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.1c00796	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 曲 正樹、西岡美玖、羽里知美、小川紗也香、高橋佳歩、大塚里美、金山直樹、徳光 浩
2. 発表標題 SLAM-family member 8によるB細胞活性化能を有する単球系細胞も分化促進
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 曲 正樹、西岡美玖、中塚梨沙、森 紀華、高橋佳歩、大塚里美、徳光 浩
2. 発表標題 B細胞活性化能を有する単球系細胞の分化に関する因子の探索
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋佳歩、西岡美玖、中島未琴、大塚里美、徳光 浩、曲 正樹
2. 発表標題 濾胞樹状細胞が活性化に伴い発現するB細胞調節因子の同定
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 羽里知美、高田美帆、西岡美玖、波多野直哉、金山直樹、徳光浩、曲正樹
2. 発表標題 単球系細胞が発現するUrokinase-type plasminogen activatorによるB細胞活性化機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋佳歩、西岡美玖、金山直樹、徳光浩、曲正樹
2. 発表標題 濾胞樹状細胞が活性化に伴い発現するB細胞調節因子の同定
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 曲正樹、岡本千怜、小川紗也香、金山直樹、波多野直哉、徳光浩
2. 発表標題 B細胞活性化能力を有する単球系細胞の分化におけるIL-34の糖鎖修飾による制御
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本千怜、小川紗也香、松岡由希子、金山直樹、波多野直哉、徳光浩、曲正樹
2. 発表標題 B細胞活性化能力を有する単球系細胞の分化におけるIL-34作用機構の解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西岡美玖, 西岡美穂, 小川紗也香, 金山直樹, 波多野直哉, 徳光浩, 曲正樹
2. 発表標題 濾胞樹状細胞の発現するSLAM-family memberによる抗体応答の制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 羽里知美, 高田美帆, 波多野直哉, 金山直樹, 徳光浩, 曲正樹
2. 発表標題 濾胞樹状細胞依存的に発生する単球系細胞が発現するB細胞活性化因子の同定
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関