

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：84420

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893306

研究課題名(和文)眼・呼吸器関連リンパ組織(TALT・NALT)形成機構の解明

研究課題名(英文)Organogenesis of nasopharynx- and tear duct-associated lymphoid tissues

研究代表者

長竹 貴広(Nagatake, Takahiro)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：80608737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：粘膜関連リンパ組織の組織形成プログラムはCD3-CD4+CD45+ LTi細胞が中心的な役割を担っている。本研究では、小腸のパイエル板、鼻腔のNALT、涙道のTALTの各リンパ組織原基に集積するLTi細胞の生物学的特徴を精査してきた。例えば、パイエル板形成に関するリンフォトキシンはパイエル板LTi細胞には発現が認められたものの、NALTやTALTのLTi細胞には発現していなかった。一方で、Cbfb2はいずれのLTi細胞群にも発現が認められた。Cbfb2遺伝子欠損マウスの解析により、Cbfb2はパイエル板、NALT、TALTの組織形成に重要な役割をもつことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：CD3-CD4+CD45+ LTi cells plays a central role in mucosa-associated lymphoid tissues. In this study, we characterized and compared biological function of LTi cells in Peyer's patches (PPs), nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) and tear duct-associated lymphoid tissue (TALT). It is found that PP-LTi cells expressed high amount of lymphotoxin which is essential for the genesis of PPs. In contrast, lymphotoxin was not expressed by NALT- and TALT-LTi cells. We also found that Cbfb2, a transcriptional regulator, was expressed in PPs-, NALT- and TALT-LTi cells. Cbfb2-deficient mice showed impairment of PPs-, NALT- and TALT-development. These results indicate that Cbfb2 is essential molecule for mucosa-associated lymphoid tissues.

研究分野：免疫学

キーワード：粘膜関連リンパ組織 リンパ組織誘導細胞 組織形成 粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

1994年にリンフォトキシンがパイエル板や末梢リンパ節の形成に必須であることが示されてから現在に至る20年の間に、二次リンパ組織形成に関する研究が分子・細胞・個体レベルで飛躍的に進んだ。そのセントラルドグマとしては、CD3⁺CD4⁺CD45⁺リンパ組織誘導細胞(Lymphoid tissue inducer cell: LTi cell)がリンフォトキシンを中心としたサイトカインネットワークを介してVCAM-1⁺ICAM-1⁺リンパ組織原基細胞(Lymphoid tissue organizer cell: LTo cell)を活性化し、CXCL13やCCL19、CCL21などのリンフォイドケモカインや、VCAM-1などの接着分子を高産生させることでT細胞やB細胞、樹状細胞などの免疫担当細胞をリンパ組織原基に呼び集めるといえる。

一方、粘膜組織に存在する二次リンパ組織は粘膜関連リンパ組織として総称され、体内の全身系二次リンパ組織(末梢リンパ節)とは異なる構造的特徴を示す。例えば、上皮細胞層を介して直接外界に接しているという環境的特徴から、粘膜関連リンパ組織には末梢リンパ節で抗原取り込み経路となる輸入リンパ管が存在しない代わりに、上皮細胞層にM細胞と呼ばれる管腔抗原の取り込みに特化した細胞が存在する。粘膜関連リンパ組織に関する研究は小腸に点在するパイエル板を用いた研究が最も進んでおり、その組織形成に関しても上述のLTi細胞とLTo細胞との相互作用が起点になることが明らかとなっている。また、粘膜関連リンパ組織は消化管だけではなく、呼吸器や涙道にも発達することが知られている。小腸のパイエル板(PPs)、鼻腔の鼻咽頭関連リンパ組織(Nasopharynx-associated lymphoid tissue: NALT)、涙道の涙道関連リンパ組織(Tear duct-associated lymphoid tissue: TALT)は抗原特異的免疫応答の惹起に重要な二次リンパ組織である。これまでにPPs形成に用いられる分子群については詳細が明らかとなっており、リンフォトキシンやCXCR5が重要な役割を担っている。一方、NALTやTALTはリンフォトキシンやCXCR5に非依存的に発達することが明らかとなっており、そのユニークな組織形成メカニズムについては不明な点が多く残されていた。

粘膜関連リンパ組織の組織形成プログラムはCD3-CD4+CD45+リンパ組織誘導細胞(Lymphoid tissue inducer cells: LTi細胞)が中心的な役割を果たしている。これまで、PP-LTi細胞の性質については解析が進んでいるものの、NALT-LTi細胞、TALT-LTi細胞については未解明であった。そこで、本研究では各LTi細胞の免疫生物学的性質を明らかとすることで、NALTやTALTの組織形成に用いられる分子群の同定を目指した。

2. 研究の目的

NALT、TALT組織形成機構の解明と各粘膜関連リンパ組織の免疫生物学的役割の理解

3. 研究の方法

(1) PP-LTi細胞、NALT-LTi細胞、TALT-LTi細胞はそれぞれ胎生17日小腸、生後10日鼻腔、涙道から単離した。採取した組織からコラゲナーゼ処理により細胞を獲得し、CD45陽性集団をAutoMACS(ミルテニー)により粗精製した。さらにFACSaria(BD)によりCD3-CD4+CD45+細胞をLTi細胞として単離した。

(2) 単離したLTi細胞からcDNAを調製した。逆転写反応はSuperscript IIIにより行った。

(3) これまでに組織形成への関与が知られている分子群については(例:リンフォトキシン、CXCR5)各リンパ組織原基から単離したLTi細胞のcDNAを用い、Lightcycler(Roche)により遺伝子発現を定量比較解析した。

(4) 組織形成への関与が不明の未知の分子の同定のため、cDNAサブトラクション法により各LTi細胞に特徴的な遺伝子群のリストを作成した。cDNAサブトラクション法はClontech laboratoriesのプロトコールに従って行った。

(5) 候補遺伝子のKOマウスを組織学的に解析することにより組織形成への関与を検討した。NALTやTALT形成の評価については、脱灰処理した頭部組織のパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン&エオジン染色により評価した。また、LTi細胞の分化、動態についてはFACS解析と免疫組織化学的解析により評価した。

4. 研究成果

パイエル板形成に用いられるリンフォトキシン、インターロイキン7受容体、CXCR5はPP-LTi細胞において高い発現が認められたものの、NALT-LTi細胞、TALT-LTi細胞では発現していなかった。この遺伝子発現パターンの結果は、各分子の組織形成への依存度と一致しており、LTi細胞に発現する分子群の同定が組織形成機構の解明への足がかりとなることが期待された。cDNAサブトラクション法によりNALT-LTi、TALT-LTiに発現する特徴的な遺伝子群のリストが作成できたことは大きな成果であると言える。

Core binding factor b2(Cbfb2)はパイエル板の形成に必須となる分子であるが、興味深いことに、Cbfb2の発現はPPs-LTi細胞だけでなくNALT-LTi細胞、TALT-LTi細胞にも認められた。そこで、Cbfb2欠損マウスを組織学的に解析したところ、パイエル板だけでなくNALTやTALTの発達も障害されることが明らかとなった。Cbfb2は

Promotor-1-Runx1 (P1-Runx1) とヘテロダイマーを形成することで Retinoic acid-related orphan receptor gt (RORgt) の発現を誘導する。このことが、PP-LTi 細胞の分化には必須のイベントとなるために Cbfb2 KO マウス、P1-Runx1 KO マウス、RORgt KO マウスではパイエル板が形成されないことが知られている。一方、NALT や TALT の形成は Cbfb2 には依存するものの、P1-Runx1 や RORgt には依存しないことがわかった。そのため、Cbfb2 がはたらく仕組みについては PPs、NALT、TALT では異なることが予想された。そこで、Cbfb2 欠損マウスの NALT-LTi 細胞や TALT-LTi 細胞が PP-LTi 細胞と同じように細胞分化のステップが障害されているのかどうかを FACS 解析により検討した。その結果、Cbfb2 欠損マウスにも NALT-LTi 細胞や TALT-LTi 細胞が存在することがわかった。次に、Cbfb2 欠損マウスの NALT 原基、TALT 原基を免疫組織化学的解析により検討したところ、LTi 細胞が組織形成の原基ではなく、鼻粘膜あるいは涙道の粘膜固有層に散在していることがわかった。そのため、Cbfb2 は NALT-LTi 細胞や TALT-LTi 細胞のリンパ組織原基への遊走・集積過程を制御することで組織形成に必須の因子となっていることが示唆された。

今後の展望としては、cDNA サブトラクション法により見いだされた遺伝子群の機能的な役割の解明が待たれるとともに、各リンパ組織欠損マウスの免疫学的な解析を進めることで NALT、TALT の免疫生物学的役割が解明されることが期待される。

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)

Takahiro Nagatake, Satoshi Fukuyama, Shintaro Sato, Hideaki Okura, Masashi Tachibana, Ichiro Taniuchi, Kosei Ito, Michiko Shimojou, Naomi Matsumoto, Hidehiko Suzuki, Jun Kunisawa, and Hiroshi Kiyono. Central role of core binding factor b2 in mucosa-associated lymphoid tissue organogenesis in mouse. *PLoS ONE* (*in press*)

Masato Sanosaka, Minoru Fujimoto, Tomoharu Ohkawara, Takahiro Nagatake, Yumi Itoh, Mai Kagawa, Ayako Kumagai, Hiroyuki Fuchino, Jun Kunisawa, Tetsuji Naka and Hiroshi Takemori. SIK3 deficiency exacerbates LPS-induced endotoxin shock accompanied by increased levels of proinflammatory molecules in mice. *Immunology*, 2015, doi: 10.1111/imm.12445.

〔学会発表〕(計 5 件)

Takahiro Nagatake, Makoto Arita, Takahiro Hayasaka, Takashi Harada, Ryo Iwamoto, Tetsuya Honda, Naomi Matsumoto, Michiko Shimojou, Risa Nagasawa, Shiori Shikata, Eri Hashimoto, Yousuke Kurashima, Yuji Suzuki, Hidehiko Suzuki, Kenji Kabashima, Hiroyuki Arai, Mitsutoshi Setou, Hiroshi Kiyono and Jun Kunisawa. Dietary omega-3 fatty acid-originated 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid prevents the development of allergic inflammation in the gut and skin. 6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators. 2015 年 2 月 10 日. 東京.

Takahiro Nagatake, Naomi Matsumoto, Michiko Shimojou, Hidehiko Suzuki, Satoshi Fukuyama, Shintaro Sato, Kentaro Ogami, Yusuke Tsujimura, Mitsuo Kawano, Tetsuya Nosaka, Hiroshi Kiyono, Yasuhiro Yasutomi and Jun Kunisawa. Immunological and organogenesis diversity of mucosa-associated lymphoid tissues for the development of mucosal vaccine. 第 8 回次世代アジュバント研究会. 2015 年 1 月 20 日. 大阪.

Yan-Chun Zhao, Takahiro Nagatake, Yoko Hamazaki, and Nagahiro Minato. Role of Claudin-5 in the vascular system of thymic microenvironment. 第 43 回日本免疫学会. 2014 年 12 月 11 日. 京都.

Takahiro Nagatake, Shintaro Sato, Jun Kunisawa, and Hiroshi Kiyono. Eye-immune responses initiated by uniquely developing tear duct-associated lymphoid tissue. 第 42 回日本免疫学会. 2013 年 12 月 11 日. 幕張.

Ichiro Takahashi, Daiki Yamamoto, Yosuke Kurashima, Naoko Shibata, Takahiro Nagatake, Shintaro Sato, Jun Kunisawa, Fumito Maruyama, Ichiro Nakagawa, Akio Abe, and Hiroshi Kiyono. Molecular and Cellular analysis of symbiotic co-habitation with environmental bacteria in the colonic resident macrophages. 第 42 回日本免疫学会. 2013 年 12 月 11 日. 幕張.

〔図書〕(計 1 件)

長竹貴広、國澤純「脂質を介した腸管免疫システムの制御」医学のあゆみ 248 巻 13 号 1019-1024, 2014 年.

〔その他〕

ホームページ

http://www.nibio.go.jp/vaccine_material_project/index.html

6．研究組織

(1)研究代表者

長竹 貴広 (NAGATAKE TAKAHIRO)
独立行政法人 医薬基盤研究所
創薬基盤研究部 ワクチンマテリアルプロジェクト・研究員
研究者番号：80608737