

令和元年6月1日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05204

研究課題名(和文) リンパ節における自然-獲得免疫機能連携の時空間制御と組織基盤

研究課題名(英文) Spatio-temporal regulation and tissue basis of functional innate-adaptive immune cooperation in the lymph node

研究代表者

片貝 智哉 (Katakai, Tomoya)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00324682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫応答に重要な臓器であるリンパ節において、自然免疫および獲得免疫細胞が混在する髄質-皮質移行領域(MCT)とそれを支える新規の間質支持細胞(ストローマ細胞)サブセットに注目し、組織の三次元的空間構造・細胞構成・分子発現の詳細と細胞動態・相互作用の観察を行うことで、これまでに注目されていなかった組織区画構造とそれを支える独特なストローマ細胞を見出した。これにより、リンパ節全体で少なくとも6種類のストローマ細胞が存在すると考えられる。また、髄質側を經由する早期の自然免疫・獲得免疫活性化経路の存在が示唆された。さらに、多様なストローマ細胞の発達には転写因子NF- κ Bが重要であることも判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ節の組織構造とストローマ細胞の関係がより明確になったことから、感染症やアレルギー性疾患、自己免疫疾患、癌などのさまざまな疾患においてこれらがどのように変化し、病態と関連するのかを理解する手がかりとなる。多様なストローマ細胞がリンパ節の各部分で異なる働きを持つことから、それぞれを人為的にコントロールする手段が見つかれば免疫応答を細かく制御することが可能となり、複雑な病気を治療するための基盤となる。リンパ節髄質における免疫応答誘導に関する理解が進めば、新規のワクチン開発などに向けた効果的な免疫惹起の手法が見つかる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Lymph node is an important organ for immune responses. In this study, we focused on a tissue area, medulla-cortex transitional region (MCT), in which innate and adoptive immune cells are co-localized and unique stromal cells support the tissue. Three dimensional tissue structure, cell composition, molecular expression, and the motility/interaction of immune cells were investigated in detail. Consequently, we found previously less understood tissue subcompartments and unique stromal cell subsets, showing that at least 6 stromal cell subtypes are present in lymph node. These findings also suggest an innate-adoptive immune activation pathway through the medullary side. Moreover, transcription factor NF κ B plays crucial role in the differentiation of multiple stromal cell types in the lymph node.

研究分野：免疫学

キーワード：リンパ節 ストローマ細胞 組織区画 髄質 免疫細胞動態 自然-獲得免疫連携 ケモカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染性微生物や外来異物に対する効果的な免疫応答が誘導されるためには自然免疫と獲得免疫という2つの生体防御システムが各臓器・組織内で時空間的に連携することが不可欠である。しかし、その過程は依然として不明な点が多く、医学・免疫学における重要課題であるといえる。様々な感染症、アレルギーや自己免疫疾患、癌においても自然-獲得免疫連携の時空間的な動作原理を理解し疾患における変容を明らかにすることで、病態の解明と治療法開発に結びつく手がかりが得られると考えられる。

リンパ節は高親和性抗体の産生に繋がる獲得免疫応答の誘導、免疫記憶、末梢性寛容などに関わる重要な免疫器官で、リンパ液の濾過機能と免疫監視システムが連結したユニークな精密装置といえる。リンパ節の組織構造は皮質と髄質に大きく分けられるが、リンパ節細胞の大部分を占めるリンパ球はおもに皮質領域に集積し、さらにT細胞とB細胞がそれぞれ傍皮質と濾胞に分離局在している。末梢組織で抗原を取りこんだ樹状細胞はリンパ管経路でリンパ節に移動した後、傍皮質のT細胞へ抗原情報を伝えることで獲得免疫応答が開始され、続いてT細胞の補助を受けたB細胞が抗体産生細胞へと分化する。この一連の過程には数日を要するが、実際にはリンパを通じて流入した様々な成分に対するさらに早い応答が見られる。しかし、その実態は未だ明確になっていない。

リンパ液を濾過し異物や老廃物を処理することもリンパ節の重要な機能であるが、これはおもに髄質で行われる。この領域には強力な貪食能を示す髄質マクロファージや常在性樹状細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞などの自然免疫系細胞が多数存在し、リンパ液中成分に対する迅速な自然免疫応答が誘導されると考えられ、迷路のように入り組んだリンパ洞と血管網を主体とする複雑な組織構造・細胞構成のためにこの過程の理解はあまり進んでいない。これまで髄質と皮質の機能が切り離されて考えられてきたことも解析が遅れている原因のひとつといえる。しかし、リンパ節の本質的な役割が「リンパを介して異物情報を収集し、素早く効果的な免疫応答に繋げる」ことであるとすれば、髄質の自然免疫系と皮質の獲得免疫系は連動していると考えるのが自然であり、両者の直接的な機能連携が容易に想像される。

2. 研究の目的

本研究では、マウスのリンパ節で見出された自然免疫および獲得免疫細胞が混在する髄質-皮質移行領域 (MCT) 領域とそれを支える新規の間質支持細胞 (ストローマ細胞) サブセットに注目し、組織の三次元的空間構造・細胞構成・分子発現を理解するとともに、細胞動態や相互作用を観察することで、これまでに注目されていなかった髄質を経由する早期の獲得免疫活性化の組織基盤と、この場で起こる自然-獲得免疫の機能連携の実証・解明を進め、時空間的に適切に制御された自然-獲得免疫連動の意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) リンパ節の髄質およびMCT領域の各組織構造の構成細胞と発現分子の空間的配置、微細構造を把握するために、C57BL/6系統マウスからリンパ節を単離し、マクロファージ、樹状細胞、NK細胞、T細胞、B細胞、形質細胞、ストローマ細胞、リンパ管・血管内皮細胞に発現する各種分子マーカーを組み合わせ、蛍光標識抗体を用いて組織切片もしくはホルマリン固定法により染色し、共焦点レーザー顕微鏡および多光子励起レーザー顕微鏡を用いた観察を行なった。特に、Z軸方向についての高解像度の光学セクションングを行い、三次元的な立体構造の理解に努めた。ある特定の細胞集団が蛍光タンパク質を発現する複数の遺伝子改変マウス系統 (CCL19-cre/Rosa26-stop^{fllox}-EYFP, Ccl21a-tdTomato, Cxcl12-EGFP, Pdgfrb-EGFP, Cd11c-EYFP) のリンパ節を用いて、ストローマ細胞サブセットの分布や細胞構造の詳細を観察した。ストローマ細胞のネットワーク構造を決める様々なECM成分に対しても抗体染色を行い、それぞれの領域に特徴的な構造を探った。最近、新たに見出されたストローマ細胞に発現するいくつかの機能分子を利用し、免疫機能との関連を考慮しつつ分布を把握した。

2) リンパ節髄質とMCT領域における免疫細胞動態を直接捉えるために、多光子励起レーザー顕微鏡を用いた生体イメージングを行ない、各細胞の運動・移動、細胞間の接触を含めた動態を観察した。リンパ節の観察方法としては、①麻酔下マウスのリンパ節を外科的に露出させ観察するIntravital法、②単離したリンパ節を灌流下に置いて観察するExplant法、③単離リンパ節の上部を切断した後、灌流下において組織深部を直接観察する組織スライス法を用途に応じて使い分けた。リンパ球を磁気細胞分離法 (MACS) により単離、CFSE、CMTMRなどの蛍光色素で標識後、マウスに移入し、リンパ節にホーミングした細胞を観察した。得られた画像データはIMARIS等の解析ソフトウェアを用いて三次元的な細胞分布、移動の軌跡、速度などを測定した。

3) Ccl21a-tdTomatoマウスおよびCxcl12-EGFPマウスは各遺伝子座に蛍光タンパク質遺伝子を挿入したノックイン・ノックアウトマウスであることから、これらのマウス系統を交配し両遺伝子を様々な組み合わせでヘテロ/ホモ欠損するマウスを作成し、それらのリンパ節髄質、MCT

領域を観察した。また、B細胞を欠損する μ MT マウスのリンパ節を回収し、髄質、MCT 領域の構造を評価した。リンパ組織ストローマ細胞において特異的に NF κ B シグナルの阻害を誘導するマウス系統 CCL19-cre/ Rosa26-stop^{flox}-I κ BSR を作成し、リンパ節の組織構造、ストローマ細胞サブセットの変化を観察した。

4) 癌のリンパ節転移における組織構造、ストローマ細胞の役割を明らかにするために、C57BL/6 マウス由来乳癌細胞株 E0771 の皮下移植によるリンパ節転移モデルを用いた解析を行った。ECFP, EYFP, tdTomato 等の蛍光タンパク質を哺乳類細胞強制発現ベクターにより安定導入した E0771 細胞を作成し、同系マウスの腹側部皮下に移植・成長させ、腋下・鼠径リンパ節への転移を誘導した。リンパ節髄質および MCT 領域の組織構造、各種免疫細胞・ストローマ細胞分布、分子発現などに関して系時的な免疫・組織学的解析を行った。また、免疫細胞あるいはストローマ細胞可視化マウスに癌細胞を移植し、リンパ節に転移した癌細胞の組織内動態、免疫細胞・ストローマ細胞との接触過程を追跡した。

4. 研究成果

マウスのリンパ節髄質および MCT 領域に関して、共焦点レーザー顕微鏡と二光子励起レーザー顕微鏡を用いた蛍光免疫組織化学的手法による観察を進めた結果、その三次元微細構造や細胞構成・機能分子の空間配置に関する詳細な情報が得られ、それぞれ他の組織領域と異なる特徴的なストローマ細胞サブセットがネットワークを形成し、独特な免疫細胞集団の局在を支持していることが明確になった。また、CCL19-cre/Rosa26-stop^{flox}-EYFP, Ccl21-tdTomato, Cxcl12-EGFP, Pdgfrb-EGFP などの遺伝子発現レポーターマウスを用いた包括的な観察から、リンパ節には性質の異なるストローマ細胞サブセットが少なくとも6種類存在し、それぞれが機能的に異なる組織区画の形成基盤となっているという結論に至った (図1)。

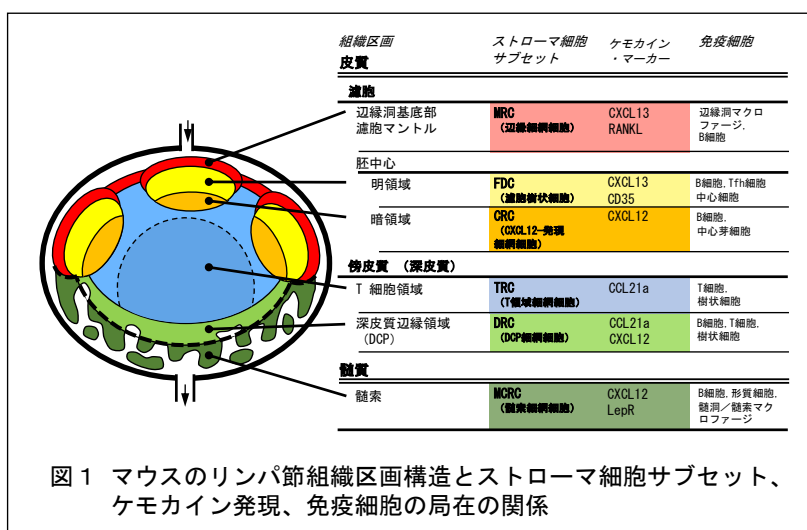


図1 マウスのリンパ節組織区画構造とストローマ細胞サブセット、ケモカイン発現、免疫細胞の局在の関係

特に MCT 領域は、B細胞が帯状に局在するこれまでに詳細が知られていない独特な組織区画であることがわかり、以前に深皮質辺縁領域 (DCP) として解剖学的に報告されていた領域と一致することが明らかになった。生体イメージングを用いた動態観察により、この領域に局在しているB細胞は濾胞などの主要なB細胞領域とは異なる挙動を示したことから、自然免疫細胞やストローマ細胞との密接な相互作用が局所的に異なる機能性状を与えていると考えられる。また、このことはリンパ節の DCP 領域が免疫応答の過程でユニークな働きを担っている可能性を示唆する。

DCP領域のストローマ細胞は特徴的な性質を示し、CCL21aとCXCL12を同時に発現するサブセットであった。この2つのケモカインを発現する性質がB細胞をこの領域に集め、組織区画を構築する要因であると考えられたことから、両遺伝子を様々な組み合わせで欠損するマウスを作成し詳細な観察を行った。その結果、遺伝子数が減るに従ってDCP領域へのB細胞局在が段階的に減少するこ

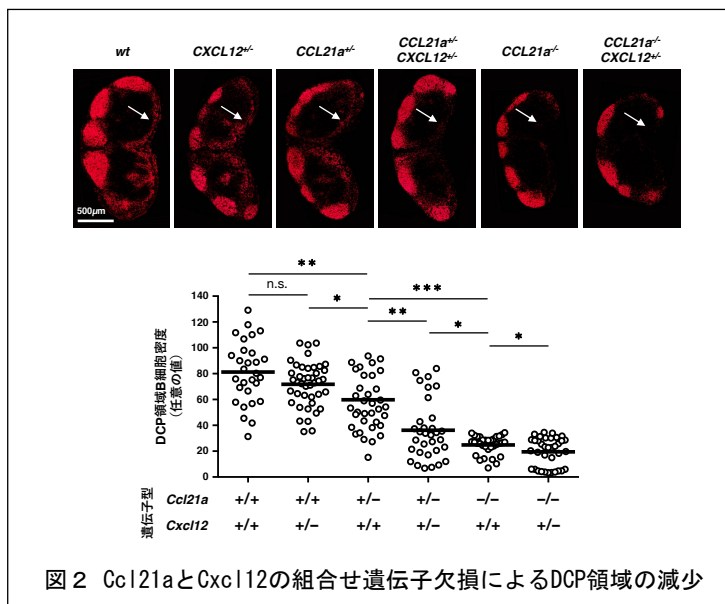


図2 Ccl21aとCxcl12の組合せ遺伝子欠損によるDCP領域の減少

とが明らかになった(図2)。したがって、DCP領域に存在するストローマ細胞サブセットをDCP領域細胞(DRC)と名付け、この細胞がCCL21serとCXCL12を産生することでB細胞を誘引し、DCP領域の形成に重要な役割を担っていることが明確となった。

次に、リンパ節の髄質およびDCP領域の形成との関連が示唆される遺伝子を改変したいくつかのマウス系統や機能障害処置について観察を進めた。B細胞を欠損する μ MTマウスでは、DCP領域および髄質の構造の発達が不十分であったことから、B細胞がこれらの組織構造の形成に必要であることが示唆される(図3)。一方、リンパ組織の発達に重要な役割を担うリンフォトキシンの機能障害では明確な影響は認められなかった。

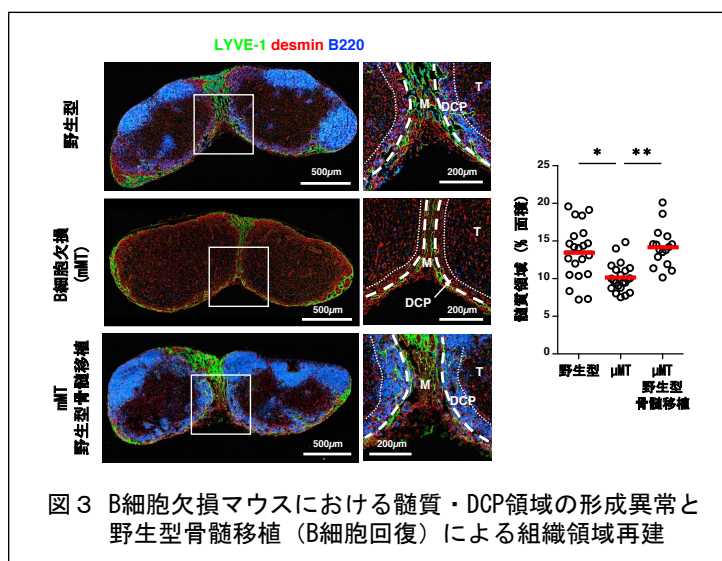


図3 B細胞欠損マウスにおける髄質・DCP領域の形成異常と野生型骨髄移植(B細胞回復)による組織領域再建

リンパ組織ストローマ細胞において特異的にNF κ Bシグナル

の阻害を誘導するマウス系統CCL19-cre/Rosa26-stop^{flox}-I κ BSRを作成してリンパ節を観察した結果、T細胞領域のストローマ細胞分化、CCL21ser発現などが抑えられている一方、濾胞や髄質領域は形成されていた。しかし、このマウスのリンパ節では明確なDCP領域は存在しないことから、T細胞領域の存在がDCP領域形成に必須であることが示唆される。

マウス由来リンパ節転移性乳癌細胞株E0771の皮下移植することにより、近傍の表在性リンパ節に転移を誘導し、免疫細胞局在やストローマ細胞構造の乱れや破壊・再編を引き起こしながら転移癌巣が増殖する過程の詳細を捉えた。蛍光タンパク質を恒常的に発現させたE0771の皮下移植によりリンパ節に転移を誘導し、組織内における転移癌細胞の局在やストローマ細胞との接触、組織構造・免疫細胞局在の変化を詳しく観察することができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計13件)

1. Kitazawa Y, Ueta H, Sawanobori Y, Katakai T, Yoneyama H, Ueha S, Matsushima K, Tokuda N, Matsuno K. Novel targeting to XCR1+ dendritic cells using allogeneic T cells for polytopical antibody responses in the lymph nodes. *Front Immunol.* in press, (2019). 査読あり doi: 10.3389/fimmu.2019.01195
2. Bogdanova D, Takeuchi A, Ozawa M, Kanda Y, Rahman MA, Ludewig B, Kinashi T, Katakai T. Essential Role of Canonical NF- κ B Activity in the Development of Stromal Cell Subsets in Secondary Lymphoid Organs. *J Immunol.* 201, 3580-3586, (2018). 査読あり doi: 10.4049/jimmunol.1800539
3. Takeuchi A, Ozawa M, Kanda Y, Kozai M, Ohigashi I, Kurosawa Y, Rahman Md A, Kawamura T, Shichida Y, Umemoto E, Miyasaka M, Ludewig B, Takahama Y, Nagasawa T, Katakai T. A distinct subset of fibroblastic stromal cells constitutes the cortex-medulla boundary subcompartment of the lymph node. *Front Immunol.* 9:Article 2196, (2018). 査読あり doi: 10.3389/fimmu.2018.02196
4. Kanda Y, Takeuchi A, Ozawa M, Kurosawa Y, Kawamura T, Bogdanova D, Iioka H, Kondo E, Kitazawa Y, Ueta H, Matsuno K, Kinashi T, Katakai T. Visualizing the rapid and dynamic elimination of allogeneic T cells in secondary lymphoid organs. *J Immunol.* 201:1062-1072. (2018). 査読あり doi: 10.4049/jimmunol.1700219
5. Katakai T. Live Imaging of Interstitial T Cell Migration Using Lymph Node Slices. *Methods Mol Biol.* 1763:29-42, (2018). doi: 10.1007/978-1-4939-7762-8_4.
6. Kurosawa Y, Ozawa M, Kanda Y, Takeuchi A, Kawamura T, Narita I, Katakai T. Extensively reorganized systemic lymph nodes provide a feasible environment for self-reactivity in lupus-prone NZB/NZW F1 mice. *Int Immunol.* 29:567-579, (2017). 査読あり doi: 10.1093/intimm/dxx066.

7. Kozai M, Kubo Y, Katakai T, Kondo H, Kiyonari H, Schaeuble K, Luther SA, Ishimaru N, Ohigashi I, Takahama Y. Essential role of CCL21 in establishment of central self-tolerance in T cells.
J Exp Med. 214:1925-1935, (2017). 査読あり doi: 10.1084/jem.20161864.
8. Katakai T, Kinashi T. Microenvironmental control of high-speed interstitial T cell migration in the lymph node.
Front Immunol. 7:Article 194, (2016). 査読あり doi: 10.3389/fimmu.2016.00194.
9. Takeuchi A, Badr Mel S, Miyauchi K, Ishihara C, Onishi R, Guo Z, Sasaki Y, Ike H, Takumi A, Tsuji NM, Murakami Y, Katakai T, Kubo M, Saito T. CRTAM determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage.
J Exp Med. 213:123-138, (2016). 査読あり doi: 10.1084/jem.20150519.
10. 片貝智哉 「リンパ節のストローマ構造とリンパ球動態」
リンパ学 41:20-24, (2018)
11. 片貝智哉 「蛍光イメージングで探るリンパ節の動的細密構造」
臨床免疫・アレルギー科 69:326-332, (2018)
12. 片貝智哉 「リンパ節の組織微小環境に制御されるT細胞の高速遊走」
生化学 88:615-620, (2016)
13. 片貝智哉 「リンパ節におけるTリンパ球の動態制御機構」
新潟医学会雑誌 130:269-274, (2016)

[学会発表] (計10件)

1. Kanda Y, Takeuchi A, Ozawa M, Kinashi T, Matsuno K, Katakai T. Live imaging of the allogeneic T cell rejection in secondary lymphoid organs.
第47回日本免疫学会学術集会
2018年12月10日 仙台国際センター (福岡県・福岡市)
2. Takeuchi A, Ozawa M, Kanda Y, Katakai T. DRC is a distinct subset of fibroblastic stromal cells construct the cortex-medulla boundary subcompartment and perform specific function in lymph node
第47回日本免疫学会学術集会
2018年12月10日 仙台国際センター (福岡県・福岡市)
3. Katakai T, Bogdanova D, Takeuchi A, Ozawa M, Kanda Y, Ludewig B, Kinashi T. Conditional inactivation of canonical NF- κ B activity in the fibroblastic stromal cells of secondary lymphoid organs.
第47回日本免疫学会学術集会
2018年12月10日 仙台国際センター (福岡県・福岡市)
4. Katakai T. Fine structure of multi-layered lymph node subcompartments and fibroblastic stromal cell subsets.
CIML/Japan joint symposium for immunology.
2018年3月22日 Centre d' Immunologie de Marseille Luminy (CIML), (フランス・マルセイユ)
5. 片貝智哉 「二次リンパ器官の発達とストローマ細胞分化におけるNF- κ Bシグナルの意義」
第5回先進イメージング医学研究会
2018年1月12日 有馬グランドホテル (兵庫県・神戸市)
6. 片貝智哉 「リンパ節のストローマ構造とリンパ球動態」
第41回日本リンパ学会総会 リンポジウム3 S3-1
2017年6月3日 鹿児島県医師会館 (鹿児島県・鹿児島市)
7. 片貝智哉 「リンパ節におけるストローマ細胞サブセット層状亜区画構造」
第4回先進イメージング医学研究会
2017年2月20日 有馬グランドホテル (兵庫県・神戸市)
8. Takeuchi A, Ozawa M, Kanda Y, Ohigashi I, Kawamura T, Umemoto E, Miyasaka M, Ludewig B, Takahama Y, Nagasawa T, Katakai T. Six different types of mesenchymal stromal cells provide the framework of multi-layered sub compartments in lymph node.
第46回日本免疫学会学術集会
2017年12月12日 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
9. Kanda Y, Takeuchi A, Ozawa M, Matsuno K, Kinashi T, Katakai T. Live imaging of the allogeneic T cell elimination in secondary lymphoid organs.
第46回日本免疫学会学術集会
2017年12月12日 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
10. Kanda Y, Takeuchi A, Ozawa M, Kawamura T, Matsuno K, Kinashi T, Katakai T. Visualizing the rapid and dynamic elimination of allogeneic T cells in the secondary lymphoid organs.
第45回日本免疫学会学術集会
2016年12月7日 沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)

〔図書〕（計4件）

1. Katakai T. Stromal cells in secondary lymphoid organs. Elsevier Ltd.
Encyclopedia of Immunobiology. pp473.
(2016) ISBN: 978-0-08-092152-5
2. 片貝智哉 「Q89:リンパ組織のストローマ細胞はどのように調製すればよいでしょうか？」
実験医学別冊「フローサイトメトリーQ&A」（戸村道夫編）
第8章 p268-271、(2017)
3. 片貝智哉 「からだの中を動きまわる免疫細胞」
生命誌 年間号 vol.88-91 ゆらぐ、新曜社 p114-116. (2017)
4. 片貝智哉 「からだの中を動きまわる免疫細胞」
生命誌 89号 (2016)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

なし

○取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

新潟大学大学院医歯学総合研究科 免疫・医動物学分野

www.med.niigata-u.ac.jp/zoo/welcome.html

新潟大学医学部医学科・大学院医歯学総合研究科(医学系)|News&Topics|研究成果

www.med.niigata-u.ac.jp/contents/info/news_topics/95_index.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：竹内 新

ローマ字氏名：TAKEUCHI, Arata

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00360579

研究協力者氏名：神田 泰洋

ローマ字氏名：KANDA, Yasuhiro

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：助教

研究者番号（8桁）：00436768

研究協力者氏名：小澤 まどか

ローマ字氏名：OZAWA Madoka

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：特任助手

研究者番号（8桁）：50548740

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。