

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790467

研究課題名（和文） T細胞ホメオスタシスにおける
リンパ節ストローマ細胞ネットワークの役割

研究課題名（英文） Roles of lymph node stromal cell network in T cell homeostasis

研究代表者

高田 健介（TAKADA KENSUKE）

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・講師

研究者番号：40570073

研究成果の概要（和文）：T細胞ホメオスタシスの場の実体解明を目指した長期計画の基盤として、末梢リンパ組織を構成するストローマ細胞の詳細な分類、およびT細胞ホメオスタシスに関与するストローマ細胞サブセットの同定を目的とした。リンパ節および胸腺におけるストローマ細胞について、上皮細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞、間葉系幹細胞の分類に用いられる一般的な分子マーカーの発現を網羅的に検討した結果、T細胞ホメオスタシスに重要な線維芽網状細胞および血管周囲細胞の分類における alpha smooth muscle actin の有用性を見出した。

研究成果の概要（英文）：As an initial step of a long-term project to understand the place of T cell homeostasis, we aimed to establish the classification of stromal cells constituting peripheral lymphoid tissues and to identify stromal cell subsets involved in the homeostasis of T cells. Stromal cells in the thymus and lymph nodes were analyzed for the expression of various molecular markers generally used for the classification of epithelial cells, blood endothelial cells, mesenchymal cells and mesenchymal stem cells. We found that alpha smooth muscle actin is potentially useful to classify fibroblastic reticular cells and perivascular cells which are thought to be important for T cell homeostasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：獲得免疫、T細胞

1. 研究開始当初の背景

ナイーブ T 細胞は、外部環境からの刺激に依存して恒常性を維持している。T 細胞のホメオスタシスは、生存、増殖、死などの数的要素と、抗原反応性や細胞運動といった機能的要素からなり、これらを一定かつ至適状態に保つことは、獲得免疫系が非自己成分の侵

入に対して速やかに反応するうえで、極めて重要である。ホメオスタシスをもたらす外部刺激の代表例として、現在、IL-7 と自己ペプチド-MHC 複合体の重要性が認識されている。一方で、T 細胞がどこで、どのようにこれらの因子を受け取るのかという、「T 細胞ホメオスタシスの場」について、全く解明されてい

ない。

最近、T細胞の生存に必須なIL-7を産生する細胞として、リンパ節T細胞領域の繊維芽網状細胞 (fibroblastic reticular cells, FRC) が同定された。また、研究代表者は、最近、ストローマ細胞に発現した自己ペプチド-MHCクラスI複合体がCD8T細胞の抗原反応性を制御していることを明らかにした。さらに、ストローマ細胞は、直接、ホメオスタシス因子を供給するばかりでなく、細胞外マトリックス成分を産生し、これを介して、CD4T細胞のホメオスタシスに必須とされるMHCクラスII分子を発現した樹状細胞とも密に連携している。末梢リンパ組織に存在するストローマ細胞が極めて多様な集団であることは容易に想像できるものの、その分類はほとんど進んでいない。

また、本研究では、当初計画していたナイーブT細胞に加え、メモリーCD8T細胞の維持に関わるストローマ細胞の同定についても予備的検討を行った。メモリーCD8T細胞の維持は現在のところ、抗原非依存的であり、ホメオスタティックサイトカインであるIL-15が重要な役割を果たすことが知られている。しかしながら、メモリーCD8T細胞ホメオスタシスの場についての検討はこれまでなされていない。

2. 研究の目的

本研究は、末梢リンパ組織を構成するストローマ細胞ネットワークが、T細胞ホメオスタシスの場の主体であるという作業仮説のもとに、未だ詳細な解析の進んでいない、末梢ストローマ細胞の分類を目的とした。その過程で、alpha smooth muscle actin (α SMA)を高発現する血管周囲細胞に着目し、その機能の解明を目指した。

3. 研究の方法

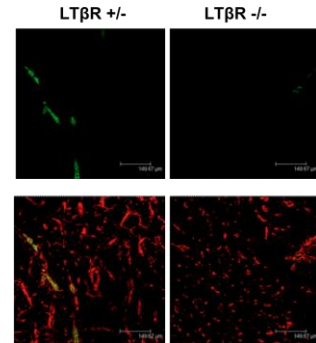
胸腺上皮細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞、間葉系幹細胞の分類に用いられる一般的な分子マーカーの発現を、正常マウスの胸腺およびリンパ節を構成するストローマ細胞について免疫組織学的解析およびFACS解析により検討した。その過程で、alpha smooth muscle actin (α SMA)を高発現する血管周囲細胞に着目し、各種遺伝子改変マウス (Rag欠損、ZAP70欠損、TCRトランスジェニック、CCR7欠損、LT β 受容体欠損、 α SMA-GFPレポーター)を用いて、 α SMAを発現するストローマ細胞の性状を解析した。さらに、 α SMA発現血管周囲細胞の機能を検索する目的で、リンパ節内におけるメモリーCD8T細胞と α SMA発現血管周囲細胞の局在を免疫組織学的に検討した。メモリーCD8T細胞の誘導には、Rag欠損OT-I TCRトランスジェニックマウスから得

られたCD8T細胞を正常B6マウスに移入し、LPSとOVAペプチド (SIINFEKL)の混合溶液を静脈内投与する方法を用いた。

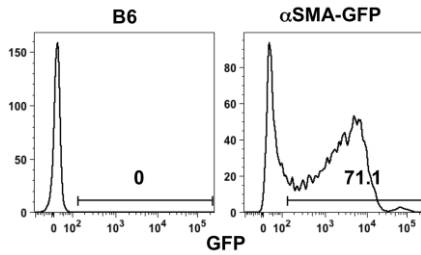
4. 研究成果

正常マウスの胸腺において、 α SMAの発現は、皮質髄質境界の血管周囲に認められた。Lymphotoxin (LT)は様々なストローマ細胞の分化と維持に関与が示唆されているTNFファミリー分子であるが、LT β 受容体欠損マウスの胸腺では、 α SMA発現細胞がほぼ完全に消失していた (図1)。このことから、胸腺における α SMA発現細胞の分化にはLT β 受容体シグナルが重要な役割を果たすことが考えられた。次に、これらの細胞の機能について検討を行った。これらの細胞が、血管周囲腔 (perivascular space)を構成することで胸腺細胞の移出を担っている可能性を想定し、FTY720投与による成熟胸腺細胞の移出阻害実験を行なった。しかしながら、血管周囲腔の形成は、 α SMA発現の見られない血管周囲に形成されていたことから、 α SMA陽性血管周囲細胞は胸腺細胞の移出には関与しないと考えられた。現在、リンパ球前駆細胞の骨髄から胸腺への移入に α SMA陽性血管周囲細胞が関与しているかを検討する予備的実験として、胸腺におけるc-kit陽性細胞と α SMA陽性細胞の局在について免疫組織学的解析を行なっている。

【図1】LT β 受容体欠損マウスの胸腺における α SMA (緑)の発現 (赤はERTR7+間葉系細胞)

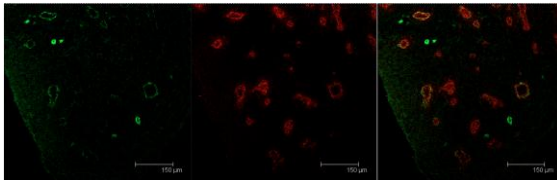


IL-7や恒常性ケモカインの産生を通して、T細胞ホメオスタシスに重要な役割を果たすストローマ細胞として、リンパ節のFRCが知られている。FRCは一般的にCD31+gp38+のストローマ細胞集団として知られているが、 α SMA-GFPレポーターマウスにおけるGFPの発現パターンから、この細胞集団が二種類に分類されることが明らかとなった (図2)。免疫組織学的解析において、GFP陽性細胞は血管周囲に多く認められたことから、CD31+gp38+FRCとして認識されている細胞集団の一部は α SMA陽性血管周囲細胞であると考えられた。これらの細胞の機能的な違いについて現在検討を進めている。



【図2】対照 B6 マウスおよび α SMA-GFP レポーターマウスから得られた gp38+CD31-FRC における GFP 発現

高内皮細静脈(HEV)は T 細胞のリンパ節内への移入を制御することが知られている。その周辺を取り囲む血管周囲細胞は、 α SMA の発現の有無により、二種類に分類されることが明らかとなった。これらの細胞の機能的な違いについて現在検討を進めている。



【図3】リンパ節 HEV 周囲の α SMA 発現細胞(緑) (赤は PNA+HEV を示す)

メモリー T 細胞は緩やかな自己複製を繰り返すことで、長期間にわたる免疫記憶を維持している。現在、メモリー CD4T 細胞の維持については、骨髄内の IL-7 産生ストローマ細胞の役割が報告されているものの、メモリー CD8T 細胞については全く不明である。本研究では、CD44hiCD62Lhi の表現型をもつセントラルメモリー型のメモリー CD8T 細胞のリンパ節内での局在を検討した。その結果、メモリー CD8T 細胞は予想に反してリンパ節 T 細胞領域には見られず、B 細胞領域と T 細胞領域の間に蓄積する傾向が見られた。この領域には多数の HEV および α SMA 発現血管周囲細胞が存在し、一部のメモリー CD8T 細胞は、血管周囲細胞に接触して存在していた。これらのストローマ細胞がメモリー CD8T 細胞の維持に関与している可能性を想定し、現在解析を継続中である。

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 3 件)

1. Takahama Y, Takada K, Murata S, Tanaka K. β 5t-containing thymoproteasome: specific expression in thymic cortical epithelial cells and role in

positive selection of CD8+ T cells. *Curr Opin Immunol*. 査読有 24, 2012, 92-98. DOI: 10.1016/j.coi.2012.01.006.

2. Takada K, Wang X, Hart GT, Odumade, OA, Weinreich MA, Hogquist KA and Jameson SC. Kruppel-like factor 2 is required for trafficking but not quiescence in postactivated T cells. *Journal of Immunology* 査読有 186, 2011,775-783. DOI: 10.4049/jimmunol.1000094.

3. Takada K and Takahama Y. Another zinc finger in the pie of CD4-CD8 lineage choice. *Nature Immunology* 査読有 11, 2010, 370-371. DOI:10.1038/ni0510-370.

[学会発表] (計 6 件)

1. 高田健介、高浜洋介 β 5t 欠損マウスにおける末梢 CD8T 細胞の解析、第 40 回日本免疫学会学術集会、2011.11.28、幕張メッセ(千葉)

2. 高田健介、高浜洋介 胸腺プロテアソーム非依存的に分化した CD8T 細胞の機能解析、第 151 回日本獣医学会学術集会、2011. 9.24、大阪府立大学(大阪)

3. 高田健介、高浜洋介 胸腺プロテアソーム構成因子 β 5t 欠損マウスに認められるメモリー様 CD8T 細胞、Kyoto T Cell Conference、2011.6.11、京都大学(京都)

4. Takada K, Nitta T and Takahama Y. Memory-like phenotype of CD8 T cells in β 5t-deficient mice. EUThyme-Rolduc Meeting. 2011.5.21, NH Conference Center (オランダ、アムステルダム)

5. Takada K, Hart GT, Odumade OA, Weinreich MA, Hogquist KA and Jameson SC. Kruppel-like factor 2 is dispensable for the quiescence of post-activated T cells. 14th International Congress of Immunology. 2010.8.24, Kobe Convention Center (神戸)

6. 高田健介、新田剛、高浜洋介 胸腺プロテアソーム構成因子 β 5t 非依存的に分化し

た CD8T 細胞の抗原特異性、第 21 回
Kyoto T Cell Conference、2010.6.10、京
都大学(京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 健介 (TAKADA KENSUKE)
徳島大学・疾患ゲノム研究センター・講師
研究者番号：40570073

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

高浜 洋介 (TAKAHAMA YOUSUKE)
徳島大学・疾患ゲノム研究センター・教授
研究者番号：20183858