

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790525

研究課題名（和文） 炎症に伴うリンパ節構造のリモデリングによる抗体産生応答制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the mechanism for the regulation of antibody responses by inflammation-associated remodeling of lymph nodes

研究代表者

阿部 淳（ABE JUN）

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50581831

研究成果の概要（和文）：本研究では、リンパ節のリモデリングによる抗体産生応答制御機構の解明を目指して解析を行い、以下の知見を得た。1) 抗体産生細胞ニッチであるリンパ節髄質の間質ネットワーク構成分子は、T細胞領域におけるそれと酷似している、2) 抗原非特異的B細胞によって誘導されるリンパ節髄質領域のリモデリングが、抗原特異的抗体産生応答を制御する、3) 間質ネットワークを構成する主要な細胞である細網線維芽細胞（FRC）は、活性化によって数的変動を伴わずに入れ替わる、4) 活性化FRCによって、抗体産生応答の重要な制御因子である濾胞ヘルパーT細胞をはじめ、ヘルパーT細胞応答の減衰が促進される。

研究成果の概要（英文）： In this study, I sought to clarify the mechanism for the regulation of antibody responses by lymph node (LN) remodeling. I obtained the following insights through this study: 1) Molecular components of stromal network in LN medulla resembled closely to those in T cell region of the LN; 2) Medullary remodeling of LN mediated by antigen-non-specific B cells regulate the antigen-specific antibody response; 3) Upon activation, fibroblastic reticular cells (FRCs), the major cell type shaping the LN stromal network, undergo the turnover without expansion of their number; 4) Activated FRCs promote the contraction of antigen-specific helper T cell response, thereby affecting the number of follicular helper T cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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

## 1. 研究開始当初の背景

抗体産生応答により産生される抗体は、その特異抗原を中和・修飾することで免疫応答や抗原の伝播性を制御し、感染免疫や腫瘍免疫、SLEなどの自己免疫疾患の発症に重要な役割を果たしている。その主体を成す抗体産生細胞は、応答の誘導の場となる二次リンパ組織内では赤脾髄やリンパ節髄質領域といった、特定の部位に集積することが知られている。過去の研究によって、抗体産生細胞の

分化や生体内遊走を制御する分子について多くのことが明らかにされてきたが、その一方で抗体産生細胞の二次リンパ組織内局在と生存・機能の相関性については不明な点が多く残されていた。

リンパ節では、主に細網線維芽細胞（FRC）や血管・リンパ管内皮細胞といった間質細胞によって機能構造が形成されている。研究開始当初リンパ節における抗体産生応答を含む獲得免疫応答の誘導には、十全なリンパ節

の機能構造が必須であることが既に示されていた。しかし、抗体産生応答の誘導に不可欠となる機能構造の分子実態や応答のニッチがいかんして形成されるのかは依然不明なままであった。

抗体産生応答のニッチを形成するメカニズムの候補として、リンパ節のリモデリングが挙げられる。リンパ節の構造は、炎症刺激を受けることでその機能を維持あるいは改変しながら変化することが知られている。リンパ節におけるリモデリングは、他の臓器での創傷治癒過程におけるそれとは異なり、刺激後ごく早期から誘導されるため、応答の極大化と並行してニッチ形成が行われるという可能性が示唆される。申請者はこの仮説に基づいた研究を行い、研究開始当初までにリンパ節髄質領域のリモデリングと抗体産生応答の関連として、以下の知見を得ていた。

- i) 様々な炎症刺激に伴い、B 細胞および lymphotoxin 依存的に髄質領域のリモデリングが誘導される。この時、抗原特異的な T 細胞依存的 B 細胞応答は必須ではない。
- ii) 髄質領域のリモデリングは、刺激後 3 日目頃から顕著になり、10 日目前後をピークを迎え、刺激の種類により多少の前後はあるものの 21 日目までに定常状態に戻る。この時系列は抗体産生細胞の応答曲線と酷似しており、活性化 B 細胞から抗体産生細胞への分化にわずかに先んじたものである。
- iii) リモデリング後の髄質領域では、高内皮細静脈を中心とした血管周囲に存在するコラーゲン線維が豊富な領域と、血管から離れた位置にあるコラーゲン線維が疎な領域に分かれ、抗体産生細胞と B 細胞がそれぞれコラーゲンに富んだ領域と疎な領域に分離して局在化される。
- iv) 髄質領域のリモデリングと抗体産生応答の強度に相関が認められる。

これらの知見に基づき、リンパ節のリモデリングによって形成される抗体産生応答ニッチの分子構成ならびに生理的意義の解明を目指して本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

抗体産生応答は、種々の細菌・ウイルス感染における生体防御に重要な役割を果たす他、自己抗体産生によって自己免疫疾患の発症・増悪を促すなど、生理的・病的に重要な意義を持つプロセスである。したがって、抗体産生応答のさらなる理解は、免疫システムの人為的制御による病態克服に向けて重要な課題となる。本研究では、抗体産生応答

誘導の場であるリンパ節、とくに髄質領域のリモデリングによる間質ネットワークをはじめとする微小環境の変化に着目し、リモデリングによって形成される応答の新たな「足場」が持つ生理的意義の解明を目指した。具体的には、当初計画として以下の 3 点を達成することを目的とした。

- (1) 髄質領域の間質ネットワーク構成分子群の同定
- (2) 髄質領域のリモデリングによる抗体産生応答制御メカニズムの解明
- (3) 「足場」構成分子の阻害による抗体産生応答制御の可能性に関する検討

## 3. 研究の方法

- (1) 髄質領域の間質ネットワーク構成分子群  
髄質領域のリモデリングによって形成される「足場」について、リモデリング前後での細胞外マトリックス構成分子の免疫染色やマイクロダイセクションにより採取した髄質領域サンプルでの定量 PCR を行うことで、その分子構成を明らかにする。
- (2) リモデリングと抗体産生応答  
髄質領域のリモデリングが抗体産生応答を制御することを種々の実験によって実証とともに、そのメカニズムを探る。具体的には、抗体産生細胞の生存や髄質領域への保持を支持する「足場」がリモデリングによって形成されるかどうかを、抗体産生細胞と「足場」の動態から検証する。
- (3) 「足場」構成分子阻害による抗体産生応答制御  
抗体・低分子薬剤などを用いてリモデリングによって形成される「足場」の構成分子を阻害することで、抗体産生応答にどのような影響が生じるかを解析する。ここで得られた結果と(2)で得られた結果を併せることで、髄質領域のリモデリングによって形成される「足場」の抗体産生応答制御における生理的意義を解明する。

## 4. 研究成果

- (1) 髄質領域の間質ネットワーク構成分子群  
免疫蛍光組織染色によって I 型、III 型、IV 型コラーゲンやサイトケラチンといった代表的な細胞外マトリックス分子の発現局在解析を行った結果、リンパ節髄質領域における間質ネットワーク構成は、傍皮質領域のそれと類似していることが明らかとなった。そのため、remodeling によって髄質領域に形成

される「足場」の分子実態を捉えるためには、網羅的な分子発現検索が必要であると考えられた。しかし、そのためには髄質領域に存在する間質ネットワーク構成細胞を同定しうるマーカーを得る必要があった。そのような細胞は T 細胞領域と同様に FRC 画分に含まれることが予想されたため、フローサイトメトリーにより FRC 画分をさらに細分化しうる表面分子抗原の探索を行ったところ、既報の通り CD157 (BP-3) によって FRC 画分が 2 つに分離可能であることは確認できたが、詳細な免疫染色解析の結果、T 細胞領域以外の間質細胞が濃縮されるとされる CD157 陰性の FRC 画分に含まれる細胞は、必ずしも髄質領域の細胞に限定されないことがわかった。CD157 陰性の FRC 画分をさらに分離可能な抗原を探索したが、そのような抗原の同定には至らなかった。

## (2) リモデリングと抗体産生応答

まず、Lymphotoxin- $\beta$ 受容体 Fc 融合タンパク (LT $\beta$ R-Fc) の投与によって髄質領域のリモデリングを阻害できるという知見を利用して、抗体産生応答と髄質領域のリモデリングの関係を解析した。LT $\beta$ R-Fc 投与マウスでは、髄質領域のリモデリングが抑制されることに加え、抗原特異的な T 細胞依存的抗体産生応答も顕著に抑制されることが明らかとなった。

LT $\beta$ R-Fc は髄質領域のリモデリングだけでなく、長期的な投与によって他の間質細胞や高内皮細静脈をはじめとするリンパ節内の脈管系にも影響を与えてしまうことが懸念されたため、別の視点からの検証を加えた。ここでは、髄質領域のリモデリングが B 細胞依存的であることを利用し、B 細胞欠損マウスに大量の抗原非特異的 B 細胞と少量の抗原特異的 B 細胞を分けて養子移入することで、膠原特異的 B 細胞の応答を抗原非特異的な B 細胞の存在の有無により比較した。本実験系では、抗原非特異的 B 細胞の移入のみでリモデリングが回復するが、少量の抗原特異的 B 細胞のみではリモデリングが回復しないこと、また抗原非特異的 B 細胞とともに移入した時のみ、要旨移入した抗原特異的 B 細胞による抗体産生応答が回復した。この時、抗体産生応答において重要な役割を果たすと考えられる濾胞樹状細胞、辺縁洞マクロファージ、濾胞ヘルパー T 細胞の数は、抗原非特異的 B 細胞の有無による差異を示さなかった。したがって、抗原非特異的 B 細胞の移入による抗体産生応答の回復は、髄質領域のリモデリングによるものであることが推察された。したがって、髄質領域のリモデリングは抗体産生応答と密接な関係を持つ現象であることが示唆された。本成果は、研究開始当初までに得ていた知見と合わせて原著論文とし

て発表した。

## (3) 「足場」構成分子の阻害

(1) において該当する候補分子を得ることができなかったため、実行することができなかった。

## (4) FRC 応答と免疫応答制御

当初計画で予定した候補分子の取得に至らなかったことから、間質細胞による免疫応答制御機構について別角度からの解析を試みた。具体的には、(i) 各種炎症刺激に対する FRC 応答における数的・質的变化の同定、(ii) FRC 応答によるヘルパー T 細胞応答への影響の解析を行った。ヘルパー T 細胞、とくに濾胞ヘルパー T 細胞は抗体産生応答の制御に重要な役割を果たしていることから、抗体産生応答の理解を目指して間質細胞-T 細胞間の機能的相互作用を明らかにしようとする事は、本研究の当初計画とも密接に関連するものと言える。

本項目では、フロイント完全アジュヴァント (CFA) を用いたタンパク抗原の免疫とウイルス感染をモデルとして用いた。

### (i) FRC 応答の実態解明

FRC 応答を量的観点から解析したところ、リンパ球数の変動に比して FRC はごく小さな数的変化しか示さないことが明らかになった。一方、刺激後 4~5 日後から FRC の「入れ替わり」が起き、14 日目までにおよそ 60% の細胞が免疫応答の過程で新たな細胞に置き換わっていたことから、FRC は炎症環境下で動的平衡状態にあることが明らかになった。

また、FRC 応答における量的変化が乏しかったことから、網羅的遺伝子発現解析により質的变化の同定を試みた結果、細胞の入れ替わりと相関して各種代謝経路や転写、細胞内高分子輸送を担う遺伝子の発現が増加していた。さらに、クラス II MHC および関連遺伝子や細胞外基質構成因子の発現が刺激後に増加することも明らかになった。また、各種コラーゲンや細胞外マトリックス構成タンパクをコードする遺伝子の発現も増加していたことから、FRC を中心としたリンパ節リモデリングは、ネットワーク構築を担う FRC 数の増加ではなく、FRC の質的变化によるマトリックス産生の増加に依存するプロセスであると考えられる。

### (ii) FRC 応答とヘルパー T 細胞応答

活性化 FRC におけるクラス II MHC 発現の増強に着想を得て、FRC 応答と抗体産生応答の関係を CD4 陽性ヘルパー T 細胞応答に着目して解析した。ここでは、FRC をはじめとする放射線抵抗性間質細胞で変異型クラス II

MHC を発現するマウスを用いた解析を行った。このようなマウスに卵白アルブミン (OVA) 特異的ヘルパーT細胞 (OT-II 細胞) を養子移入後、OVA/CFA を免疫し OT-II 細胞数の推移を解析したところ、応答のピークまでは間質細胞での MHC アリルに関係なく同程度の数を保って応答が進行することがわかった。しかし、応答の退縮期に至ると間質細胞において変異 MHC アリルを有するキメラマウスにおいて野生型よりも4倍程度多い OT-II 細胞が生残しており、その数的優位が維持されたままメモリー細胞形成に至ることが明らかとなった。OT-II 細胞数の差異は、とくに濾胞ヘルパーT細胞において顕著に認められたことから、FRC による獲得免疫応答制御によって抗体産生応答が間接的に制御されうる可能性が示された。また、リンパ節の各種間質細胞における MHC クラス II 発現は、CD157 陽性 FRC において最も強く発現が誘導されており、これらの細胞が上述の OT-II 細胞数変化の主因として寄与していることが示唆される。

これらの結果を原著論文としてまとめ、本報告書執筆現在、投稿準備中である。

#### 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 Abe J (著者 17 名、4 番目) : Coordinated changes in DNA methylation in antigen-specific memory CD4 T cells. **J. Immunol.** 190(8):4076-4091, 2013 (査読有)
- ② Abe J (著者 10 名、1 番目) : B cells regulate antibody responses through the medullary remodeling of inflamed lymph nodes. **Int. Immunol.** 24(1): 17-27, 2012. (査読有)
- ③ Abe J (著者 11 名、5 番目) : Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8<sup>+</sup> T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration. **J. Exp. Med.** 208(8): 1605-1620, 2011 (査読有)

[学会発表] (計2件)

- ① Abe J (著者 10 名、1 番目) : B cells regulate antibody responses through the medullary remodeling of antigen-draining lymph nodes. Keystone Symposia "B Cell Development and Function" 2013 年 2 月 11 日、Keystone Resort, USA
- ② Abe J (著者 7 名、1 番目) : Cognate and non-cognate B cells mediate the remodeling of lymph node medulla that contributes to

antibody responses. 40th Annual Meeting of Japanese Society of Immunology. 2011 年 11 月 27 日、幕張

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

阿部 淳 (ABE JUN)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 5 0 5 8 1 8 3 1

##### (2)研究分担者

該当なし

##### (3)連携研究者

該当なし