

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24111005

研究課題名(和文)二次リンパ組織ストローマ細胞の性状と機能

研究課題名(英文)Characteristics and functions of stromal cells in secondary lymphoid tissues

研究代表者

宮坂 昌之(MIYASAKA, Masayuki)

大阪大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：50064613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 131,700,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者の宮坂、研究分担者の梅本は、フィンランド・Turku大学の竹田、S. Jalakanen、M. Salmi博士の協力を得て、ストローマ細胞が産生する複数の生理活性物質がリンパ球の動態を制御すること、さらに、特定のストローマ細胞がリンパ節への低分子量物質移動を司ることを明らかにした。研究分担者の早坂はケモカイン受容体重合によるケモカイン応答性調節機構を明らかにした。研究分担者の片貝はリンパ節ストローマ細胞を詳細に解析し、新たなストローマ細胞サブセットを発見した。

研究成果の概要(英文)：In collaboration with Drs. A. Takeda, S. Jalakanen, and M. Salmi of University of Turku, Finland, the principal investigator, M. Miyasaka, and the co-investigator, E. Umemoto, found that a specific stromal subset secretes multiple bioactive molecules that regulate lymphocyte trafficking into and within lymph nodes. They also found that a different stromal subset mediates transport of small-molecular substances from the lymphatic sinus into the lymph node parenchyma. A co-investigator, H. Hayasaka, identified a mechanism whereby a chemokine induces homo- and hetero-oligomerization of chemokine receptors. A co-investigator, T. Katakai, analyzed stromal cells in lymph nodes in detail and identified a novel stromal subset.

研究分野：免疫学

キーワード：ストローマ細胞 リゾリン脂質 ケモカイン ケモカイン受容体 リンパ球

1. 研究開始当初の背景

(1) これまで免疫系に関して行われてきた研究では、白血球を主体とした免疫細胞に対する分子レベル、遺伝子レベルな解析に大きな力点が置かれてきた。しかし、最近の研究結果から、免疫細胞の機能は、免疫組織を構築するストローマ細胞(線維芽細胞、細胞網細胞、内皮細胞、血管外膜細胞など)によりダイナミックな制御を受けていることが明らかになり、これらのストローマ細胞の理解無しには免疫系の本質的な理解は困難であることが明らかになってきた。

(2) 本申請の研究代表者である宮坂と研究分担者の片貝は、免疫細胞とストローマ細胞の相互作用の解析においてこれまでの独創的な研究成果により、国際的に高い評価を受けている。本研究では、宮坂はリンパ節への免疫細胞動員を制御するストローマ細胞の同定とその機能解明を試みる。片貝はリンパ節ストローマ細胞の多様性とその動態について分子レベルで解明することを試みる。

2. 研究の目的

免疫系の根源的な理解には、これまで行われてきた免疫細胞を対象とした研究のみならず、免疫組織(リンパ器官)を主とする「免疫の場」とそれらのネットワークからなる「免疫空間」に関する分子レベルでの理解が重要であり、その四次元的ダイナミクスを明らかにすることが必須である。本研究では、この「免疫の場」を分子レベル、遺伝子レベルで理解できるようにするために、免疫組織という「場」を構築するストローマ細胞の多様性とその機能を時空間的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者である宮坂は、研究分担者の梅本、早坂とともに、リンパ節へのリン

パ行性の免疫細胞の入り口であるリンパ節被膜を構成するストローマ細胞の機能、特に免疫細胞動員を制御する機能について分子レベルで明らかにすることを試みる。また、予備的解析により明らかになってきたリゾリン脂質産生ストローマ細胞と免疫細胞(樹状細胞と活性化T細胞)の相互作用に主眼を置き、リゾリン脂質を介した新たな免疫細胞動員機構を明らかにするとともに、ライブイメージングを用いてその時空間的なダイナミクスについても明らかにすることを試みる。

(2) 研究分担者の片貝は、リンパ節ストローマ細胞を単離して、その発現分子の解析から、これらの細胞の多様性、機能、動態について総合的に明らかにすることを試みる。

4. 研究成果

(1) 研究代表者の宮坂は、分担研究者の梅本、早坂とともに、リゾリン脂質 LPA (lysophosphatidic acid) 産生酵素である autotaxin がリンパ節の高内皮細静脈(HEV)内皮細胞により多量に産生されることを見出した。そして、autotaxin は HEV 周囲で体液中のリゾリン脂質 LPC (lysophosphatidyl-choline) を LPA に変換し、その LPA が HEV 内皮細胞にオートクライン的に働いて、HEV 内皮細胞の運動性を亢進させ、その結果、血中のリンパ球が HEV 内皮細胞間隙からリンパ節実質へと移行することを明らかにした(J. Immunol. 2013)。しかし、この時点では関与する LPA 受容体の詳細は不明であった。

(2) 研究分担者の片貝は、上述の autotaxin がリンパ節のT細胞領域に存在する CCL21⁺ストローマ細胞によっても産生され、LPA 受容体阻害剤を用いることにより、LPA が CCL21 と共同してT細胞の RhoA 活性を亢進させ、ROCK-myosin II 依存性にT細胞の動態を制御することを示唆した(J. Immunol.

2014)。しかし、この時点では LPA の局所産生は示されず、関与しうる LPA 受容体の詳細も不明だった。

(3) その後、研究代表者の宮坂、研究分担者の梅本、早坂は、フィンランド Turku 大学の竹田彰博士と共同で、リンパ節 T 細胞領域のリンパ節線維芽様細網細胞 (fibroblastic reticular cell; FRC) が産生する autotaxin が体液中の LPC に働いて局所的に LPA を産生することを imaging mass spectrometry により世界に先駆けて可視化した (慶応大学の杉浦悠毅、末松誠博士との共同; eLife 2016)。さらに、産生された LPA がリンパ球上の LPA 受容体 LPA₂ に働いて Rho-ROCK-myosin II 依存的にリンパ節内の隘路における T リンパ球移動を正に制御することを明らかにした (eLife, 2016)。

(4) 研究代表者の宮坂、研究分担者の梅本は、フィンランド Turku 大学の Sirpa Jalkanen, Marko Salmi らと共同で、リンパ節被膜下洞からリンパ節実質に続く物質通過路 conduit の入口がリンパ管内皮細胞層に開口する PV-1 陽性の caveola であり、PV-1 分子が caveola の口径を制御することを世界で初めて明らかにした (Nat. Immunol., 2015)。リンパ節の conduit はその周囲は線維芽細網細胞で包まれ、これまで一定サイズ以下の物質のみを通過させることが知られていたが、その選択輸送性の分子機構は不明であった。今回の研究により、conduit は複数種のストローマ細胞により形成され、その機能はリンパ管内皮細胞というストローマ細胞の一種の細胞膜上に発現する PV-1 という分子によって規定されることが明らかになった。

(5) 研究代表者の宮坂と分担研究者の梅本、早坂は、HEV 周囲で産生された LPA は LPA₄, LPA₆ という 2 種類の LPA 受容体を介して HEV 内皮細胞に選択的に働き、内皮細胞の運動性を亢進させることにより、内皮細胞層のリンパ球通過を促進することを明ら

かにした (Int. Immunol. 2016)。

(6) 研究代表者の宮坂は、分担研究者の梅本、早坂とともに、リンパ節内の T 細胞領域には、これまで DAMP (danger-associated molecular pattern) で催炎症性と考えられていた ATP (adenosine triphosphate) が、恒常的に細胞間隙に発現していることを明らかにした。ATP の存在は T 細胞トラフィッキングおよび樹状細胞に依存的であり、この領域に T 細胞あるいは樹状細胞が居ないとその発現はきわめて低下する。ATP は樹状細胞に働いてその遊走性を亢進する働きを持つことから、T 細胞領域に恒常的に発現することにより、免疫反応を起こしやすくする natural adjuvant としての機能があることが推測される (投稿準備中)。

(7) 研究分担者の早坂は、研究代表者の宮坂と共同して、CCL21 ケモカインが誘導する細胞遊走の調節に、レセプターである CCR7 の homo 重合化と別のケモカインレセプターである CXCR4 と CCR7 の hetero 重合化が関与することを明らかにした。CCR7 の homo 重合体は、リガンド結合とともに細胞内へのシグナル伝達を促進することから、機能的に重要な過渡的複合体であることが明らかになった (論文改訂中)。

(8) 研究分担者の片貝は、理研の齋藤隆博士らと共同で、class I-restricted T cell-associated molecule (CRTAM) という分子を発現する T 細胞が腸管に移動して CD4⁺ 細胞傷害性細胞 (CTL) として機能することを示した (J Exp Med, 2016)。

(9) 研究分担者の片貝は、計画研究班員の高濱との共同研究により、CCL21a が T 細胞の胸腺選択や二次リンパ組織へのホーミング・局在に非冗長的な役割を担っていることを明らかにした (J Exp Med, 2017 受理)。

(10) 研究分担者の片貝は、計画研究班員の長澤および高濱との共同研究により、種々の分子マーカーや発現レポーターマウス系

統を用いて、リンパ節内において組織区画を規定する性質の異なるストローマ細胞が少なくとも6種類存在することを明らかにした。また、リンパ節の髄質領域近傍においてこれまで知られていなかった組織構造と新規ストローマ細胞サブセットを発見して、その機能的な特徴を明らかにした。特に、髄索のストローマ細胞は leptin 受容体を高発現する特徴的な細胞であることを明らかにした(投稿準備中)。

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24件)

1. Takeda, A., Hossain, M.S., Rantakari, P., Simmons, S., Sasaki, N., Salmi, M., Jalkanen, S. & *Miyasaka, M. Thymocytes in Lyve1-CRE/S1pr1^{ff} mice accumulate in the thymus due to cell-intrinsic loss of sphingosine-1-phosphate receptor expression. *Front. Immunol.* 7:489, 2016. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00489. 査読有り. 被引用回数: 0.
2. Takeda, A., Kobayashi, D., Aoi, K., Sasaki, N., Sugiura, Y., Igarashi, H., Tohya, K., Inoue, A., Hata, E., Akahoshi, N., Hayasaka, H., Kikuta, J., Scandella, E., Ludewig, B., Ishii, S., Aoki, J., Suematsu, M., Ishii, M., Takeda, K., Jalkanen, S., *Miyasaka, M. & *Umemoto, E. (*equal correspondence) Fibroblastic reticular cell-derived lysophosphatidic acid regulates confined intranodal T-cell motility. *eLife* 5:e10561, 2016. DOI: 10.7554/eLife.10561. 査読有り. 被引用回数: 2.
3. *Hayasaka, H., Kobayashi, D., Yoshimura, H., Nakayama, E.E., Shioda, T. & Miyasaka, M. The HIV-1 gp120/CXCR4 axis promotes CCR7 ligand-dependent CD4 T cell migration: CCR7 homo- and CCR7/CXCR4 hetero-oligomer formation as a possible mechanism for up-regulation of functional CCR7. *PLOS One* 10:e0117454, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0117454. 査読有り. 被引用回数: 3.
4. Rantakari, P., Auvinen, K., Jäppinen, N., Kapraali, M., Valtonen, J., Karikoski, M., Gerke, H., Iftakhar-E-Khuda, I., Keuschnigg, J., Umemoto, E., Tohya, K., Miyasaka, M., Elima, K., Jalkanen, S. & *Salmi, M. The endothelial protein P1vap in lymphatics controls the entry of lymphocytes and antigens into lymph nodes. *Nat. Immunol.* 16:386-396, 2015. DOI: 10.1038/ni.3101. 査読有り. 被引用回数: 27.
5. #Bai, Z., #Cai, L., #*Umemoto, E., #Takeda, A.**, Tohya, K., Komai, Y., Veeraveedu, P.T., Hata, E., Sugiura, Y., Kubo, A., Suematsu, M., Hayasaka, H., Okudaira, S., Aoki, J., Tanaka, T., Albers, H.M.H.G., Ovaa, H. & *Miyasaka, M. (#equal contribution, *equal correspondence) Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the ATX/LPA axis. *J. Immunol.* 190:2036-2048, 2013. DOI: 10.4049/jimmunol.1202025. 査読有り. 被引用回数: 41.

[学会発表](計60件)

1. Takeda, A. & Miyasaka, M. Thymocytes in Lyve1-CRE/S1pr1^{ff} mice accumulate in

the thymus due to cell-intrinsic loss of sphingosine-1-phosphate receptor expression. 7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference (KTCC2017). Oral presentation. Mar. 13-17, 2017. Shiran Kaikan, Kyoto University, Kyoto.

2. Miyasaka, M. Emerging approaches in leukocyte trafficking. The Scandinavian Society for Immunology 2016 Summer School “Recent breakthroughs in immunology - emerging new concepts, approaches and methods”. Invited talk. May 10, 2016. Turku, Finland.
3. Miyasaka, M. A locally generated motogenic lysophospholipid, LPA, regulates trans-HEV and also interstitial migration of lymphocytes in lymph nodes. Ringberg Symposium, Molecular Mechanisms in Leukocyte Traffic. Invited talk. Sep.13-17, 2015. Tegernsee, Germany.
4. Miyasaka, M. The autotaxn/LPA axis is a novel regulator of lymphocyte extravasation at high endothelial venules. Invited talk. Biomedicum Helsinki Lecture. Oct. 29, 2014. Helsinki, Finland.
5. Miyasaka, M. The autotaxin/lysophospholipid axis regulates constitutive lymphocyte transmigration across high endothelial venules in lymph nodes. Invited talk. Seminar at Karolinska Institute. Sep. 8, 2014. Stockholm, Sweden.

〔図書〕(計3件)

1. Miyasaka, M., Takeda, A., Hata, E., Sasaki, N., Umemoto, E. & Jalkanen, S. The role of lysophospholipids in immune cell

trafficking and inflammation. In: Chronic Inflammation: Mechanisms and Regulation. Editors: Miyasaka, M. & Takatsu, K. Chapter 35, Springer Japan, 1st. ed.:459-471, 2016. 総ページ数: 702

2. Miyasaka, M., Hata, E., Tohya, K. & Hayasaka, H. Lymphocyte recirculation. In: Encyclopedia of Immunobiology. Editors: Michael Ratcliffe et al. Chapter 7: Anatomy and Microanatomy of Immune Tissues, Elsevier, Vol. 3:486–492, 2016. 総ページ数: 3126
3. Miyasaka, M., Takeda, A., Hata, E., Sasaki, N. & Umemoto, E. S1P and LPA: Regulators of immune cell egress and ingress in lymphoid tissues. In: Encyclopedia of Immunobiology. Editors: Michael Ratcliffe et al. Chapter 7: Anatomy and Microanatomy of Immune Tissues, Elsevier, Vol. 3:533–536, 2016. 総ページ数: 3126

〔産業財産権〕なし

〔その他〕

メディア報道：

産経新聞 web 版「世界初！リンパ球が狭いリンパ節(砦)でスムーズに動くしくみを解明」
- 免疫細胞のパトロール機構には脂質が重要 -

<http://www.sankei.com/west/print/160130/wst1601300008-c.html>

「本研究成果は、英国の生命科学雑誌 “eLife” 誌電子版に 2016 年 2 月 2 日に公開された。」

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮坂 昌之 (Miyasaka, Masayuki)

大阪大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：50064613

(2) 研究分担者

片貝 智哉 (Katakai, Tomoya)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00324682

梅本 英司 (Umemoto, Eiji)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90452440

早坂 晴子 (Hayasaka, Haruko)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：70379246

(3) 研究協力者

竹田 彰 (Takeda, Akira)

フィンランド・Turku 大学・博士研究員

Sirpa Jalkanen

フィンランド・Turku 大学・教授

Malko Salmi

フィンランド・Turku 大学・教授