

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19142

研究課題名（和文）粘膜関連リンパ組織誘導細胞サブセットによる新規リンパ組織形成プログラムの解明

研究課題名（英文）Mucosa-associated lymphoid tissue organogenesis by unique inducer cell subsets.

研究代表者

長竹 貴広 (Takahiro, Nagatake)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 ワクチンマテリアルプロジェクト・研究員

研究者番号：80608737

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：生体の内側を覆う粘膜面には様々なリンパ組織が発達し感染防御に働いている。本研究では、呼吸器粘膜に発達する粘膜関連リンパ組織がその他の粘膜面（例：腸管や涙道）のリンパ組織とは異なるユニークな組織形成プログラムにより形成されることを明らかにした。さらに、鼻咽頭関連リンパ組織特異的欠損マウスを用いた解析により、鼻咽頭関連リンパ組織非依存的な上気道免疫システムの存在を示唆することができた。これらの知見を基礎的基盤情報とし、次世代の経鼻型粘膜ワクチン開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Mucosa-associated lymphoid tissues develop in various mucosal surfaces and play an important role in host defense. In this study, we found that respiratory lymphoid tissues develop using unique developmental programs that is different from intestinal and lacrimal lymphoid tissue programs. Further, we found that antibody response and allergic symptoms was normally induced in the absence of nasopharynx-associated lymphoid tissue, suggesting the presence of lymphoid tissue-independent immune systems in the upper respiratory tract. These findings indicate that respiratory immune system show uniqueness in tissue development and immune function which is a target of the development of effective nasal vaccine.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：粘膜関連リンパ組織形成 リンパ組織誘導細胞 パイエル板 NALT TALT iBALT

1. 研究開始当初の背景

生体の内側を覆う粘膜面には様々なリンパ組織が発達し感染防御に働いている。小腸に発達するパイエル板はその組織形成機構についてこれまでに詳細な研究がなされてきた。マウスのパイエル板発達プログラムは胎生後期に CD3-CD4⁺CD45⁺ で規定されるリンパ組織誘導細胞がパイエル板原基に集積することに始まる。パイエル板誘導細胞の分化は転写制御因子 Id2 や ROR γ t、P1-Runx1/Cbfb2 複合体などが関与することがわかっている。さらに、そのパイエル板原基への集積はケモカイン CXCR5/CXCL13 依存的に起こり、さらにそこでインターロイキン (IL) 7 受容体を介したシグナルにより活性化を受ける。活性化したリンパ組織誘導細胞は膜型リンフォトキシンを産生するようになり、パイエル板原基のストローマ細胞を活性化し B 細胞や T 細胞を呼び集めるためのケモカインや接着分子の発現が誘導されパイエル板形成プログラムが進行する。一方、マウスの鼻咽頭関連リンパ組織 (Nasopharynx-associated lymphoid tissue: NALT) はヒトの咽頭扁桃に相当する粘膜関連リンパ組織で、パイエル板形成に用いられる ROR γ t や CXCL13、IL-7 受容体、リンフォトキシンなどに非依存的に形成されることがわかっている。さらに、涙嚢に発達する涙道関連リンパ組織 (Tear duct-associated lymphoid tissue: TALT) の組織形成機構は NALT に類似するものの、Id2 にも非依存的に起こる点でユニークな発達プログラムを用いることが判明している。これら 3 つの粘膜関連リンパ組織 (パイエル板、NALT、TALT) の原基には CD3-CD4⁺CD45⁺ で規定されるリンパ組織誘導細胞が集積するため、組織形成に共通に働く細胞群として CD3-CD4⁺CD45⁺ リンパ組織誘導細胞が同定される一方、組織形成のための分子要求性は異なることが示唆されていた。

また、肺に発達する誘導性気管支関連リンパ組織 (inducible bronchus-associated lymphoid tissue: iBALT) はインフルエンザ感染や喘息等の炎症・アレルギー反応に伴って形成される三次リンパ組織である。その組織形成に働く細胞群や分子シグナルについては不明な点が多く残っているものの、Th17 細胞から産生される IL-17 や、CD11b を発現する樹状細胞から産生されるリンフォトキシンシグナルの重要性が指摘されている。

2. 研究の目的

パイエル板とは異なるメカニズムにより発生する NALT や TALT の組織形成機構の解明を第一目的とする。さらに、これらのリンパ組織欠損マウスの免疫学的解析により粘膜関連リンパ組織の免疫生物学的役割を明らかにすることを目標とする。また、炎症性三次リンパ組織 iBALT の組織形成機構を解

明し呼吸器の粘膜ワクチン開発に向けた基盤的情報の獲得を目指す。

3. 研究の方法

CD3-CD4⁺CD45⁺ で規定されるパイエル板誘導細胞、NALT 誘導細胞、TALT 誘導細胞を各リンパ組織原基からそれぞれ単離し、cDNA サブトラクション解析によって NALT 誘導細胞、TALT 誘導細胞に高発現する分子群リストを作成した。そこから得られた情報を基に、遺伝子欠損 (KO) マウスの解析を通してリンパ組織形成に与える影響を組織学的解析やフローサイトメトリー解析によって検討した。さらに、得られたリンパ組織欠損マウスにワクチンの投与やアレルギーを誘導し、抗原特異的な免疫応答やアレルギー・炎症反応を評価することで粘膜関連リンパ組織の免疫学的機能の解明を目指した。

また、iBALT 形成の誘導はヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルスをマウスに経鼻的に投与することにより行った。さらに、CD11b⁺ 細胞の iBALT 形成への関与を調べる目的で CD11b プロモーターの下流にジフテリア毒素受容体を組み込んだトランスジェニック (CD11b-DTR) マウスを用いた。

4. 研究成果

まず、cDNA サブトラクション解析により NALT 誘導細胞に特異的な発現を示すことがわかった Interferon regulatory factor 1 (IRF1) について、IRF1 欠損マウスの NALT を組織学的に解析した。その結果、IRF1 欠損マウスにおいて NALT 形成が著しく阻害されていることがわかった。一方、パイエル板や TALT、その他の末梢リンパ節の形成に異常は認められなかった。そのため、IRF1 は NALT 特異的に働くリンパ組織形成因子であることが判明した。さらにそのメカニズムを解明する目的で鼻腔組織の組織学的解析を行ったところ、IRF1 KO マウスの NALT 誘導細胞は鼻粘膜中に認められたものの、NALT が形成される場となる NALT 原基には認められなかった。そのため、IRF1 は NALT 誘導細胞の NALT 原基への遊走・集積過程に関与する可能性が考えられた。

次に、NALT 形成不全を呈する IRF1 KO マウスにコレラ毒素 (CT) を経鼻投与した際の鼻汁中に誘導される CT 特異的 IgA 抗体を測定した。その結果、野生型マウスと同等レベルの CT 特異的 IgA 抗体が誘導されていた。また、IRF1 KO マウスに鼻炎アレルギーモデルを適用し鼻症状 (例: くしゃみ、鼻掻き) を評価したところ、野生型マウスと比べて顕著な差は認められなかった。そのため、NALT 非依存的な上気道免疫システムが存在する可能性が示唆された。

また、ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルスをマウスに経鼻的に投与することによって iBALT が形成誘導されることを見出した。ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルスによ

て誘導される iBALT の免疫学的構造はこれまでに報告されているインフルエンザ感染によって誘導されるものと同様に B 細胞領域、T 細胞領域が認められ、胚中心反応も観察された。その結果と一致して、ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルスの投与によって Th17 細胞や CD11b⁺ 樹状細胞が肺において増加することもわかった。

そこで、CD11b-DTR マウスを用いて CD11b⁺ 細胞の除去を行ったところ、iBALT の形成を阻害することができた。そのため、iBALT 形成には CD11b⁺ 細胞がリンパ組織誘導細胞として働くことが明らかになった。

以上をまとめると、粘膜関連リンパ組織誘導細胞サブセットの 1 つとして、IRF1 を高発現する新規 NALT 誘導細胞を同定し、その組織形成メカニズムを解明することができた。さらに NALT 欠損マウスを用いた解析により、NALT 非依存的な上気道免疫システムの存在を示唆することができた。また、ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルスの経鼻的投与によって iBALT が形成誘導されることを見出し、CD11b⁺ 細胞が iBALT 誘導細胞として働くことを明らかにすることができた。

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 5 件)

Kuroda E, Ozasa K, Temizoz B, Ohata K, Koo CX, Kanuma T, Kusakabe T, Kobari S, Horie M, Morimoto Y, Nakajima S, Kabashima K, Ziegler SF, Iwakura Y, Ise W, Kurosaki T, Nagatake T, Kunisawa J, Takemura N, Uematsu S, Hayashi M, Aoshi T, Kobiyama K, Coban C, Ishii KJ. Inhaled Fine Particles Induce Alveolar Macrophage Death and Interleukin-1 α Release to Promote Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue Formation. *Immunity*, 2016 Dec 20;45(6):1299-1310. doi: 10.1016/j.immuni.2016.11.010. (査読あり)

Kunisawa J, Sugiura Y, Wake T, Nagatake T, Suzuki H, Nagasawa R, Shikata S, Honda K, Hashimoto E, Suzuki Y, Setou M, Suematsu M, Kiyono H. Mode of Bioenergetic Metabolism during B Cell Differentiation in the Intestine Determines the Distinct Requirement for Vitamin B1. *Cell Rep.*, 2015 Oct 6;13(1):122-31. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.063. Epub 2015 Sep 24. (査読あり)

Kunisawa J, Arita M, Hayasaka T, Harada T, Iwamoto R, Nagasawa R,

Shikata S, Nagatake T, Suzuki H, Hashimoto E, Kurashima Y, Suzuki Y, Arai H, Setou M, Kiyono H. Dietary ω 3 fatty acid exerts anti-allergic effect through the conversion to 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid in the gut. *Sci Rep.*, 2015 Jun 11;5:9750. doi: 10.1038/srep09750. (査読あり)

Nagatake T, Fukuyama S, Sato S, Okura H, Tachibana M, Taniuchi I, Ito K, Shimojou M, Matsumoto N, Suzuki H, Kunisawa J, Kiyono H. Central Role of Core Binding Factor β 2 in Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Organogenesis in Mouse. *PLoS One*, 2015 May 22;10(5):e0127460. doi: 10.1371/journal.pone.0127460. eCollection 2015. (査読あり)

Sanosaka M, Fujimoto M, Ohkawara T, Nagatake T, Itoh Y, Kagawa M, Kumagai A, Fuchino H, Kunisawa J, Naka T, Takemori H. Salt-inducible kinase 3 deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced endotoxin shock accompanied by increased levels of pro-inflammatory molecules in mice. *Immunology*, 2015 Jun;145(2):268-78. doi: 10.1111/imm.12445. (査読あり)

[学会発表] (計 9 件)

長竹貴広、菊田順一、本田哲也、Prabha Tiwari、柳澤篤、石井優、椋島健治、國澤純. 17,18-EpETE は好中球の遊走を抑制することで接触性皮膚炎を軽減する. 第 4 回先進イメージング医学研究会・学術集会 (兵庫) 2017 年 2 月 20 日

Nagatake T, Suzuki H, Nasu A, Hirata S, Wada Y, Matsumoto N, Shimojou M, Morimoto S, Hosomi K, Ogami K, Tsujimura Y, Kawano M, Nosaka T, Yasutomi Y, Kunisawa J. Organogenesis of inducible bronchus-associated lymphoid tissue has essential role in the induction of antigen-specific immune response by Ag85B-hPIV2-based anti-tuberculosis vaccine in mice. 第 10 回次世代アジュバント研究会 (大阪) 2017 年 1 月 24 日

Nagatake T, Honda T, Suzuki H, Arita M, Kiyono H, Kabashima K, Kunisawa J. 17,18-epoxy-eicosatetraenoic acid ameliorated contact hypersensitivity by inhibiting neutrophil infiltration into the skin. 第 45 回日本免疫学会 (沖縄) 2016 年 12 月 5 日

長竹貴広、平田宗一郎、古賀友紹、佐々木文之、鈴木英彦、細見晃司、横溝岳彦、國澤純. ロイコトリエン B₄ 受容体 BLT1 は B 細胞増殖を促進することで経口ワクチンに対する抗原特異的 IgA 抗体産生を

促進する. 第 20 回日本ワクチン学会(東京) 2016 年 10 月 22 日

Nagatake T, Shiogama Y, Honda T, Isoe Y, Arita M, Matsumoto N, Shimojou M, Tiwari P, Suzuki H, Yasutomi Y, Kiyono H, Kabashima K, Kunisawa J. Contact hypersensitivity is ameliorated by 17,18-epoxy-eicosatetraenoic acid, a metabolite from eicosapentaenoic acid, in the skin. International Congress of Immunology (Melbourne, Australia) 2016 Aug 25th.

Nagatake T, Wada Y, Matsumoto N, Shimojou M, Hirata S, Nasu A, Suzuki H, Hosomi K, Ogami K, Tsujimura Y, Kawano M, Nosaka T, Yasutomi Y, Kunisawa J. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue plays an important role in the induction of antigen-specific immune response by Ag85B-hPIV2-based anti-tuberculosis vaccine in mice. The 103rd Annual Meeting of The American Association of Immunologists (Seattle, Washington, USA) 2016 May 14th.

Nagatake T, Wada Y, Matsumoto N, Shimojou M, Hirata S, Nasu A, Suzuki H, Hosomi K, Ogami K, Tsujimura Y, Kawano M, Nosaka T, Yasutomi Y, Kunisawa J. Essential role of inducible bronchus-associated lymphoid tissue genesis for the induction of antigen-specific immune response by Ag85B-hPIV2-based anti-tuberculosis vaccine in mice. 第 9 回次世代アジュバント研究会 (大阪) 2016 年 1 月 19 日

Nagatake T, Arita M, Honda T, Suzuki H, Kiyono H, Kabashima K, Kunisawa J. Prevention of gut and skin allergic inflammation by 17,18-epoxy-eicosatetraenoic acid, an endogenously generated lipid metabolite from linseed oil. 第 44 回日本免疫学会 (札幌) 2015 年 12 月 20 日
長竹貴広、有田誠、本田哲也、磯部洋輔、松本直実、下條倫子、四方紫織、鈴木英彦、清野宏、椋島健治、國澤純. 接触性皮膚炎モデルにおける 17,18-EpETE の有効性評価. 第 57 回日本脂質生化学会 (東京) 2015 年 5 月 28 日

〔図書〕(計 5 件)

Nagatake T, Kunisawa J, Kiyono H. Lymphoid tissues associated with gastrointestinal (GI) mucosa. 「Lymph Node Metastasis in Gastrointestinal Cancer」 Springer, 2017. (in press).

長竹貴広、國澤純. 食物アレルギーの発症における食用油クオリティの影響「化

学と生物」(日本農芸化学会誌) 2017 年 1 月 55 巻 1 号 11-12.

中橋理佳、長竹貴広、清野宏. 粘膜関連リンパ組織のユニーク性と臨床応用「リンパ学」(日本リンパ学会機関誌リンパ学) 2016 年 12 月 39 巻第 2 号 80-87.

長竹貴広、國澤純. 脂質を介した腸管免疫の制御と疾患「実験医学増刊号 脂質疾患学」(羊土社) 2015 年 9 月 33 巻 15 号 94-99.

長竹貴広、國澤純. 腸管組織における多元的免疫制御システムと食物アレルギー「医学のあゆみ 粘膜免疫 Update」(医歯薬出版) 2015 年 5 月 253 巻 5 号 451-456.

〔その他〕

アウトリーチ活動として、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所一般公開を開催 (開催日: 2015 年 11 月 7 日及び 2016 年 11 月 19 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長竹 貴広 (NAGATAKE, Takahiro)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・ワクチンマテリアルプロジェクト・研究員

研究者番号: 80608737