

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03483

研究課題名(和文) ILC3による液性免疫制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation for ILC3-mediated humoral immune response

研究代表者

澤 新一郎 (Sawa, Shinichiro)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80611756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：「リンパ節内ではLTi細胞の刺激を受けたMRCがFDCに分化する」という作業仮説を立て、液性免疫の成熟・維持に果たすLTi細胞の役割を実験的に証明する計画を着想した。RANKL(Tnfsf11)発現細胞の追跡実験から、リンパ節、パイエル板においてRANKL陽性MRCがFDCに分化することを証明した。また、ILC3/LTi細胞特異的なRorcエンハンサー領域の同定に成功し、LTi細胞特異的な減少マウスの樹立に成功した。また、FDC特異的レポーターマウスの作出にも着手した。一方、LTi細胞由来シグナルによるFDC分化への寄与については解明できていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FDCは抗原特異的B細胞の成熟に必須の線維芽細胞であるが、その由来や分化経路は不明な点が多い。本研究により、FDCの由来がMRCであることが明らかとなった。現在作出中のFDC特異的なレポーターマウスを活用することにより、FDC特異的な分子群や生体内における機能がより詳細に解明できる。また、これまでILC3/LTi細胞特異的な欠損マウスモデルが存在しなかったが、本研究により「二次リンパ組織形成には影響がなく、LTi細胞のみが特異的に減少したマウス」モデルの作出成功したため、成体リンパ組織におけるLTi細胞の機能解明が飛躍的に進むと期待される。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in proving differentiation of FDCs from MRC in both lymph nodes and Peyer's patches using inducible RANKL(Tnfsf11)-fate mapping system. We also succeeded in establishing ILC3/LTi-specific decreased mouse model focusing on ILC3/LTi-specific enhancer region. However, relationship between FDC differentiation and LTi cell function was not clarified yet.

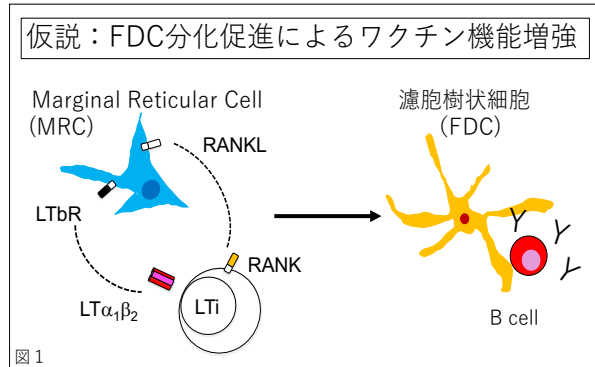
研究分野：免疫学

キーワード：LTi細胞 FDC MRC RORgt

1. 研究開始当初の背景

免疫記憶の原理を利用したワクチンは18世紀のイギリスの医学者 Edward Jenner の独創的かつ挑戦的な試みのうち、全世界広く受け入れられ、感染症の制圧という多大なる貢献に至った。現在のワクチンはアジュバントを使用し、自然免疫細胞の非特異的な活性化に伴う免疫原性の増強を期待したものである。そのため、炎症に起因する発熱や倦怠感などの副反応を避けて通ることができない。また、昨今問題となっている子宮頸がんワクチン接種者の神経障害のように、アジュバントと副作用の因果関係を完全に否定しきれず、ワクチン摂取率の改善が期待できないというジレンマを抱えている。現在、「副作用の少ないアジュバント開発」や、「アジュバントを使用しないワクチンの開発」は我々免疫研究者のみならず全人類にとり魅力的な命題である。

濾胞樹状細胞 (Follicular Dendritic cell=FDC) はリンパ節やパイエル板、脾臓などの2次リンパ組織のB細胞濾胞に存在する非血球系の間葉系細胞である。FDCは細長く伸長させた樹状突起上に捕捉した抗原をB細胞に提示することでB細胞をクローン増殖させ、抗原に対する高親和性抗体の産生を促進する。FDCはケモカインCXCL13を発現し、ナイーブB細胞の濾胞への遊走を促進する機能も有する。現在では、FDCは液性免疫の成熟に不可欠なストローマ細胞として広く受け入れられており (Cyster, *Immunol. Rev.*, 2000)、FDCの機能とワクチン効果の密接な関連を想像することは難しくない。FDCの起源や分化シグナルについては議論が多い。リンパ節の辺縁部にはMarginal Reticular Cell (MRC) と呼ばれるストローマ細胞が存在する (Katakai, *J. Immunol.*, 2012)。MRCはB細胞濾胞が形成される前からリンパ節に存在する。Bejenoffらのグループは遺伝学的なfate mappingの手法を用い、MRCがFDCの前駆細胞であることを実験的に証明した (Jarjour, *JEM*, 2014)。しかし、B細胞濾胞のサイズや免疫応答の大きさを規定するFDCがどのようなシグナルを介してMRCから分化するか完全には証明されていない。LTi (Lymphoid Tissue inducer) 細胞はリンパ節形成に必須の転写因子ROR γ tを発現する3型自然リンパ球(ILC3)であり、リンパ節や脾臓などの成熟2次リンパ組織にも残存する (Sawa, *Nat Immunol.*, 2011)。



LTi細胞は成熟リンパ節内のうちMRC近傍や濾胞間に局在する。MRCはTNFファミリーサイトカインの一種RANKLを豊富に産生し、リンパ節中のLTi細胞はRANKLの受容体RANKを高発現する。また、LTi細胞はLymphotoxin (LT) $\alpha_1\beta_2$ を発現し、MRCはLT $\alpha_1\beta_2$ の受容体LT β Rを発現する。つまり、LTi細胞とMRCは解剖学的な近位でRANKLとLT $\alpha_1\beta_2$ というシグナルを双方向性に授受し、リンパ節内でコミュニケーションを取り合っていると考えられる (図1)。本研究では「リンパ節内ではLTi細胞の刺激を受けたMRCがFDCに分化する」という作業仮説 (図1) を立て、液性免疫の成熟・維持に果たすLTi細胞の役割を実験的に証明する計画を着想した。

LTi細胞は成熟リンパ節内のうちMRC近傍や濾胞間に局在する。MRCはTNFファミリーサイトカインの一種RANKLを豊富に産生し、リンパ節中のLTi細胞はRANKLの受容体RANKを高発現する。また、LTi細胞はLymphotoxin (LT) $\alpha_1\beta_2$ を発現し、MRCはLT $\alpha_1\beta_2$ の受容体LT β Rを発現する。つまり、LTi細胞とMRCは解剖学的な近位でRANKLとLT $\alpha_1\beta_2$ というシグナルを双方向性に授受し、リンパ節内でコミュニケーションを取り合っていると考えられる (図1)。本研究では「リンパ節内ではLTi細胞の刺激を受けたMRCがFDCに分化する」という作業仮説 (図1) を立て、液性免疫の成熟・維持に果たすLTi細胞の役割を実験的に証明する計画を着想した。

2. 研究の目的

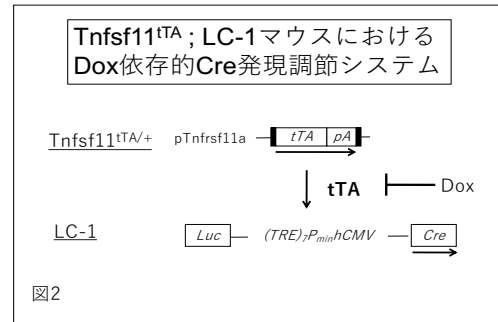
本研究はリンパ節におけるFDCの分化プロセスをMRCおよびLTi細胞との細胞間ネットワークの観点から解明し、FDCの分化促進や機能増強を介した新世代ワクチン療法への道を開拓することを目的とする。具体的には、以下3項目のマイルストーンを設定し、step-by-stepで「FDCの分化促進や機能増強を介した新世代ワクチン療法」への道を開拓する。① 独自マウスを用いたMRC-FDC間の細胞系譜関係の検証② LTi細胞数の人為的減少および増加がFDC分化に与える影響を検証③ FDC分化に必要なシグナルの検証およびin vitroにおける標的分子の探索

3. 研究の方法

①MRC-FDC間の細胞系譜関係の検証 (令和元年度)

BejenoffらのグループはWnt1-Creマウスによる遺伝学的なFate mapping法で耳介リンパ節のMRCがFDCの前駆細胞であることを証明した (Jarjour, *JEM*, 2014) が、耳介以外のリンパ節においてはWnt1発現履歴が担保されておらず、MRCとFDCの細胞系譜関係の普遍性は担保されていない。申請者はMRCがRANKLを発現すること (Katakai, *J. Immunol.*, 2012) に注目し、*Tnfsf11*^{tTA/+}マウスを樹立した。本マウスはRANKLをコードする*Tnfsf11*遺伝子の開始コドン直下にtetracycline transactivator (tTA)遺伝子をノックインしたマウスである。tTA自身はtetracycline responsive element (TRE) と呼ばれる応答領域に作用し、遺伝子発現を誘導するが、Tetracycline系

の薬剤の存在下では TRE への結合が阻害され、遺伝子発現が遮断される Tet-OFF システムである。一方、TRE の下流で Cre を発現可能な LC-1 マウス (Schonig, *Nuc Acid Res*, 2002) は *in vivo* における Tet-OFF 遺伝子発現調節を可能にするマウスモデルとして知られる (図 2)。申請者はこれまで本手法を用い、ILC3 における時期特異的な Cre 発現系を樹立した実績がある (Sawa, *Science*, 2010)。本研究項目では *Tnfsf11^{tTA/+}* マウスを LC1 マウス、*Rosa26-tdTomato* マウスと交配して 3 重変異マウス (*Tnfsf11^{tTA/+};LC1;Rosa26-tdTomato* マウス) を作出する。*Tnfsf11^{tTA/+};LC1;Rosa26-tdTomato* マウスに tetracycline 系薬剤の doxycycline (dox) を時期特異的に投与することで RANKL を発現する MRC のみを tdTomato で標識・追跡可能であることを利用し、出生直後に標識された細胞が 6 週齢マウスの B 細胞濾胞内に局在するか組織学的に検討する。



② LTi 細胞が FDC 分化に与える影響の検証 (令和元-令和 2 年度)

本研究では、リンパ節 B 細胞濾胞形成や FDC 分化に与える LTi 細胞の影響を検証するため、以下の実験を計画している a) **Gain of Function** 研究計画①で述べた MRC を特異的に標識した新生児 *Tnfsf11^{tTA/+};LC1;Rosa26-tdTomato* マウスに ROR γ t-EGFP BAC^{Tg} マウス (Lochner, Sawa, *JEM*, 2008) のリンパ節から単離採取した LTi 細胞を移入し、4 週間後の B 細胞濾胞の形成や FDC への分化促進度を蛍光顕微鏡で観察するとともにフローサイトメーターで B 細胞および FDC 数を定量する。申請者らの過去の研究では LTi 細胞は 2 週間で 50% ずつ新規細胞と入れ替わることが明らかとなっており (Sawa, *Science*, 2010)、移入後 4 週間目には約 25% の LTi 細胞が体内に生着しているの見積もっている。b) **Loss of Function** 申請者が最近開発した ILC3-iDTR マウスはリンパ節形成や T 細胞分化に影響を与えることなく、時期特異的に LTi 細胞を除去可能なマウスモデルである。6 週齢の ILC3-iDTR マウスに 200ng のジフテリア毒素(DTx)を腹腔内投与し、リンパ節 B 細胞濾胞の形成および FDC を組織学的に検証する。

③ **FDC 分化に必要なシグナル、標的分子の探索 (令和 2-4 年度)** 過去の報告では LT β R シグナルが FDC 分化に重要な役割を果たすことが明らかになっている (Krautler, *Cell*, 2012; Jarjour, *JEM*, 2014)。本研究では、リンパ節より FDC を単離し、分化に必須の役割を果たす分子群の同定を目指す。

4. 研究成果

①MRC-FDC 間の細胞系譜関係の検証

Tnfsf11^{tTA/+};LC1;Rosa26-tdTomato マウスに tetracycline 系薬剤の doxycycline (dox) を時期特異的に投与することで RANKL を発現する MRC のみを tdTomato で標識・追跡可能であることを利用し、出生直後のリンパ節内およびパイエル板に出現した *Tnfsf11* (RANKL)陽性細胞の運命追跡実験を行なった。

リンパ節においては生後 4 週後の皮膜直下に tdTomato 陽性細胞が確認され、これらの細胞は接着分子 MAdCAM-1 陽性であった。解剖学的な位置関係とマーカー分子から、これらの tdTomato 陽性細胞は辺縁細網細胞 (Marginal Reticular Cell=MRC) であると結論づけた。さらに、10 週齢まで追跡すると、tdTomato 陽性細胞は辺縁部から B 細胞領域内に連続しつつ侵入し、発達した樹状突起を有した形状を示した。さらに、これらの B 細胞領域内の tdTomato 陽性細胞は FDC-1, CD35 を発現することを免疫染色によって確認した。以上から、これらの B 細胞領域内の tdTomato 陽性細胞は濾胞樹状細胞 (Follicular Dendritic Cell=FDC) であると結論づけた。以上から、リンパ節内においては出生直後に出現した RANKL 陽性細胞に由来する MRC を経て FDC へと分化することが確認できた。

パイエル板においては、生後 4 週後の上皮直下に存在するドーム領域において tdTomato 陽性細胞が確認された。解剖学的な位置関係とマーカー分子から、

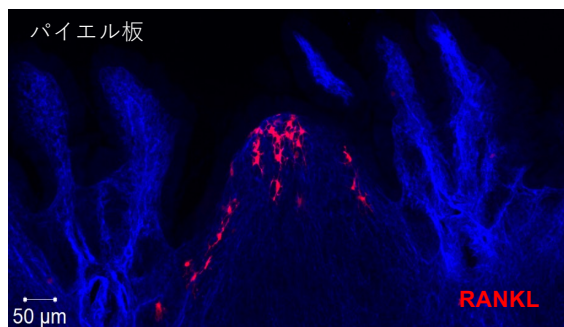


図3 : 出生直後から標識し、6 週齢まで運命追跡した *Tnfsf11^{tTA/+};LC1;Rosa26-tdTomato* マウスのパイエル板における RANKL 発現履歴を有する線維芽細胞。上皮直下に存在するだけでなく、パイエル板のドーム内部まで侵入した線維芽細胞の存在を確認できる。

これらの tdTomato 陽性細胞は我々が過去に報告した M 細胞誘導細胞(M cell inducing cell=MCi 細胞)に一致する (Nagashima, Sawa, *Nat Immunology*, 2017)。さらに、6 週齢まで追跡すると、tdTomato 陽性細胞は辺縁部からドーム内部に連続しつつ侵入し、発達した樹状突起を有した形状を示す繊維芽細胞が出現することが明らかとなった (図 3)。

ごく最近報告されたパイエル板線維芽細胞の単一細胞遺伝子発現解析に関する論文では、MCi 細胞をパイエル板における MRC として位置づけており、パイエル板においても MRC が FDC の前駆細胞として機能しうることを Trajectory 解析により示唆している (Prados, *Nat Immunol.*, 2021)。以上から、パイエル板においても出生直後に出現した RANKL 陽性細胞に由来する MRC/MCi 細胞を経て FDC へと分化すると推察された。

② LTi 細胞が FDC 分化に与える影響の検証

Gain of Function

ROR γ t-EGFP BAC^{Tg} マウス (Lochner, Sawa, *JEM*, 2008) のリンパ節から単離採取した LTi 細胞を野生型 C57BL/6/J マウスに移入し、EGFP 陽性細胞がリンパ節内に存在するか否かを検討した。10 匹の ROR γ t-EGFP BAC^{Tg} マウスよりした LTi 細胞を採取し、レシピエントマウス 1 匹あたり 1×10^4 の LTi 細胞を移入し、1 週間後の生着を評価したが、リンパ節内に EGFP 陽性細胞は確認できなかった。野生型マウスへの移入実験にはより多くのドナー細胞を準備する必要があり、当該実験は中止した。

Loss of Function

ILC3-iDTR マウスへの腹腔内ジフテリア毒素投与により、小腸 ILC3 は 40%-60%減少する。しかしながら、表在リンパ節における ILC3 である LTi 細胞に対する除去効果は極めて効果が薄いことがわかった。そこで、ILC3 特異的な ROR γ t エンハンサー領域の解析を行い、Rorc 領域の Conserved Non-coding Sequence (CNS) 領域に ILC3/LTi 細胞特異的なエンハンサー領域 (Peak1) の同定に成功した。Peak1 を欠損するマウスはパイエル板、リンパ

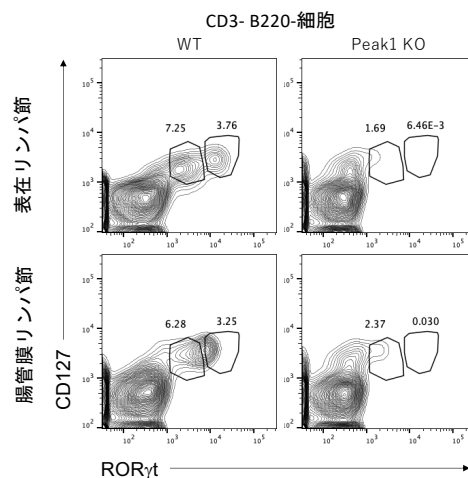
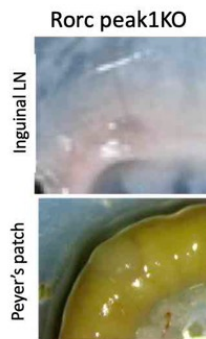


図4： ILC3特異的なエンハンサーであるPeak1を欠損したマウスはリンパ節、パイエル板は正常に形成されるが、成熟したLTi細胞 (ROR γ t high CD127+)を欠失する。

節などの二次リンパ組織形成に影響を与えないが、リンパ節における CD3⁺B220⁺細胞分画における ROR γ t^{high} CD127⁺の LTi 細胞が激減する (図 4)。ILC3/LTi 細胞を特異的に減少したマウスモデルとして有用と考える。現在、Peak1KO *Tnfrsf11^{TA/+};LCL1;Rosa26-tdTomato* マウスを作出し、MRC の FDC への分化に与える LTi 細胞の機能を検討中である。

③ FDC 分化に必要なシグナル、標的分子の探索リンパ節中の繊維芽細胞における FDC の割合は 1%以下であり、表面マーカー分子を用いた単離が極めて困難である。まず、FDC に発現することが知られている CXCL13 レポーターマウスを用いた FDC 単離を試みた。まず、既報の CXCL13- Cre/tdTomato BAC Tg マウス (Onder, *Immunity*, 2017) を導入し、リンパ節 B 細胞領域における tdTomato 陽性細胞の検出を試みた。しかし、B 細胞領域および MRC に多く存在すると想定された tdTomato 陽性細胞はほとんど観察されず、本実験を遂行するうえでは不適切なマウスモデルと判断した。そこで、Cxcl13-ERT2Cre ノックインマウスの作出に着手した。本マウスは Cxcl13 アミノ酸コード領域内に ERT2Cre 遺伝子を 1st Met 以下ノックインしたものである。現在、マウスのスクリーニング作業を進めている。続いて、繊維芽細胞の中では FDC 特異的に発現することが知られている CD35 をコードする Cr1 遺伝子のレポーターマウスの作出に着手した。マウスにおいて Cr1 遺伝子は Cr2 遺伝子のスプライシングバリエーションとして転写、翻訳される。そこで、Cr1 遺伝子の exon2 内にフレームを一致させた tdTomato-hDTR ノックインコンストラクトを作出した。今後、CXCL13, CR1 ダブルレポーターマウスを樹立し、FDC 特異的な可視化および除去マウスの作出を試みる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nitta Takeshi, Tsutsumi Masanori, Nitta Sachiko, Muro Ryunosuke, Suzuki Emma C., Nakano Kenta, Tomofuji Yoshihiko, Sawa Shinichiro, Okamura Tadashi, Penninger Josef M., Takayanagi Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Fibroblasts as a source of self-antigens for central immune tolerance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1172 ~ 1180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-020-0756-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Komatsu Noriko, Win Stephanie, Yan Minglu, Huynh Nam Cong-Nhat, Sawa Shinichiro, Tsukasaki Masayuki, Terashima Asuka, Pluemsakunthai Warunee, Kollias George, Nakashima Tomoki, Takayanagi Hiroshi	4. 巻 131
2. 論文標題 Plasma cells promote osteoclastogenesis and periarticular bone loss in autoimmune arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e143060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci143060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kunimura K, Sakata D, Tun X, Uruno T, Ushijima M, Katakai T, Shiraiishi A, Aihara R, Kamikaseda Y, Matsubara K, Kanegane H, Sawa S, Eberl G, Ohga S, Yoshikai Y, Fukui Y	4. 巻 29(9)
2. 論文標題 S100A4 Protein Is Essential for the Development of Mature Microfold Cells in Peyer's Patches.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 2823-2834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.10.091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 6件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 澤 新一郎
2. 発表標題 胎児期における免疫組織形成機構の解明
3. 学会等名 第31回日本生体防御学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤 新一郎
2. 発表標題 リンパ節形成を開始する細胞とは？
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 住谷瑛理子、澤新一郎
2. 発表標題 胎仔破骨細胞誘導細胞の生体内における分化能の解析
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤新一郎、住谷瑛理子
2. 発表標題 「免疫の場」を構成する細胞群の運命追跡
3. 学会等名 第4回理論免疫学ワークショップ(招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eriko Sumiya, Shinichiro Sawa
2. 発表標題 Transcriptomic characterization of cells involved in fetal bone development
3. 学会等名 The 29th Hot Spring Harbor International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinichiro Sawa
2. 発表標題 If ILC3s are absent, what happens in the gut?
3. 学会等名 JSPS-Crick Symposium on Gut Circuits (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤新一郎
2. 発表標題 リンパ節ストローマ細胞の起源に迫る
3. 学会等名 第 8 回生命科学阿波おどりシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 住谷瑛理子、澤新一郎
2. 発表標題 骨と骨髄の発生におけるRANKL陽性未分化間葉系細胞の寄与の解明
3. 学会等名 第29回 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤新一郎、住谷瑛理子
2. 発表標題 Investigation for the cell lineage of lymph node stroma cells
3. 学会等名 第29回 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinichiro Sawa
2. 発表標題 RANKL+ mesenchymal cell is the genuine lymphoid tissue organizer cell in the developing lymph node
3. 学会等名 Shinichiro Sawa (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinichiro Sawa
2. 発表標題 LTi-like cell conducts maturation of intestinal immune system
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 渡部貴秀, 澤新一郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 10
3. 書名 別冊 医学のあゆみ 「サイトカインのすべて」自然リンパ球とサイトカイン	

1. 著者名 澤 新一郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 5
3. 書名 実験医学 増刊号 「線維化 慢性疾患のキープロセス」免疫組織線維芽細胞	

1. 著者名 渡部貴秀、澤新一郎	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 5
3. 書名 週刊 医学のあゆみ サイトカインのすべて	

1. 著者名 澤新一郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 3
3. 書名 周産期医学 特集号 周産期医学と細菌叢	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	Institute Pasteur			
スイス	KSSG			
ドイツ	German Cancer Research Center			