

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07603

研究課題名（和文）皮膚所属リンパ節における抗原捕捉部位の違いがアレルギー性に及ぼす影響の解明

研究課題名（英文）The relationship between the antigen uptake site and lymphocyte activation caused to the onset of allergy in superficial lymph nodes.

研究代表者

竹内 新 (Takeuchi, Arata)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00360579

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：経皮的に侵入した抗原はアレルギーの発症と深く関係する。本研究ではリンパ節における抗原の取り込みとリンパ球の活性化について新たな知見を得た。リンパ節に流入する免疫原性の高い抗原は、リンパ節深部に蓄積する。抗原の一部はCD11c陽性細胞に捕捉され、リンパ節の内部に取り込まれた。抗原の取り込まれた領域は特殊な間質細胞により独自の微小環境（deep cortical periphery: DCP）を形成しており、B細胞が帯状に集積している。抗原特異的B細胞はDCP領域で抗原を認識して活性化することを確認した。リンパ節深部における独自の免疫監視システムと免疫応答が存在することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ節に存在するB細胞は主に皮質に存在する濾胞領域に集積する。リンパを介してリンパ節に流入する抗原は、様々な経路でこの領域に運ばれ、B細胞の活性化が誘導されることが報告されている。この様に皮質で起こるイベントについては詳細な解析が進んでいるのに対し、複雑な構造で解析が難しいリンパ節の深部には不明な点が多く残されている。今回我々はリンパ節の深部に存在し、B細胞の集積を認める微小環境に注目して、皮質とは異なる免疫作用機序が存在することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：It has become clear that dermal uptake antigens are related to the onset of allergy, but its induction mechanisms are remained unclear. In this study, we focused on the superficial lymph nodes (LNs) and tried to clarify the relationship between the antigen uptake site in LNs and lymphocyte activation caused to the onset of allergy. Lymph-borne highly immunogenic antigens tend to accumulate around the medullary sinus. We confirmed a part of these antigens were captured by CD11c positive cells and are internalized into deep side of LNs. In this area, specific stromal cells present and form a unique microenvironment (deep cortical periphery: DCP) where B cells are accumulated. We found B cells newly entered lymph node from blood stream migrate to follicular area via DCP. During this migration, antigen specific B cells were immediately activated in DCP area. Thus, we demonstrated the unique immune surveillance system and induction of immune response in deep side of lymph nodes.

研究分野：免疫学

キーワード：リンパ節 免疫監視 ストローマ細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

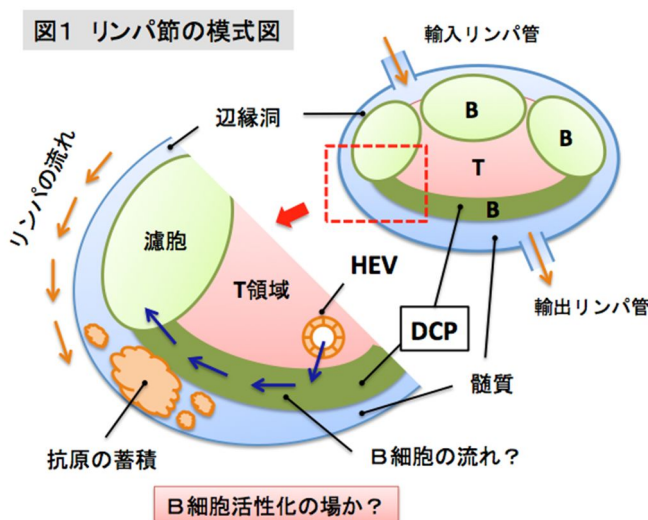
1. 研究開始当初の背景

リンパ節は生体防御の前衛の場であると同時に、アレルギーや自己免疫疾患の発症とも関わりの深い組織の一つである。近年、経皮的に侵入した抗原が予想以上にアレルギーと深く関わっていることが明らかとなってきた。皮膚から取り込まれた抗原は、皮下に存在する抗原提示細胞に捕捉されるか、直接リンパの流れに乗って表在リンパ節に到達し、リンパ球による獲得免疫系が活性化される。リンパ節に流入する抗原のうち、特に免疫原性が高いとされる分子量の大きな抗原はリンパ節深部の髄質域に蓄積する傾向がある。しかし、蓄積した抗原から免疫応答がどの様に誘導されているのかは詳しく分かっていない。我々はこの抗原蓄積部位の近傍に新規の間質細胞で支持される新たな構造域を見いだした。興味深いことに、この帯状の構造域にはB細胞が集積しており、未知のリンパ球活性化の場である可能性が示唆された。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、リンパ節の皮質と髄質の境界面にB細胞が多く集積する帯状構造域(深皮質辺縁部: DCP)を新たに同定した(文献)。しかし、その生理的意義は不明である。

一方、食物アレルギーのモデル抗原としてオオアルブミン(OVA)を皮下に投与すると、短時間のうちに所属リンパ節に到達し、大半はリンパ節深部、DCP近傍の髄質域に蓄積し、その一部がDCP内に取り込まれる。DCPではB細胞と取り込まれた抗原が極めて効率良く出会うことが可能であると考えられ、絶好の免疫監視ポイントであることが予想される(図1)。本研究では、この領域で誘導される新たなリンパ球の活性化モデルを示し、既知の免疫応答との違いを明らかにすることを目的とする。



3. 研究の方法

(1) リンパ節内におけるB細胞の動態を把握する

リンパ節内におけるB細胞の循環を共焦点や多光子励起顕微鏡を用いて詳しく観察する。FTY720や抗CD62L抗体の投与でリンパ球の流入阻害を行い、B細胞分布の変化を確認する。蛍光標識したB細胞をマウスに移入して経時的に追跡し、新規に同定した構造領域(DCP領域)や濾胞へB細胞が集積する一連の細胞の流れを把握する。

(2) DCP近傍における抗原の蓄積と免疫原性との関係を確認する

抗原の分子量、安定性、凝集性などが高くなると免疫原性、アレルギー性も高くなると言われている。食物アレルギーのモデル抗原としてOVAや卵白リゾチーム(HEL)、熱変性凝集体など、分子量の異なる同一抗原を調整して各々皮下に投与する。それぞれの抗原について所属リンパ節への到達時間、抗原捕捉部位の関係を調べる。

(3) DCP領域における免疫応答の誘導を確認する

蓄積した抗原がリンパ節内部に取り込まれ、DCP領域に存在する抗原特異的B細胞と接触して活性化が誘導されるまでの機序を確認する。

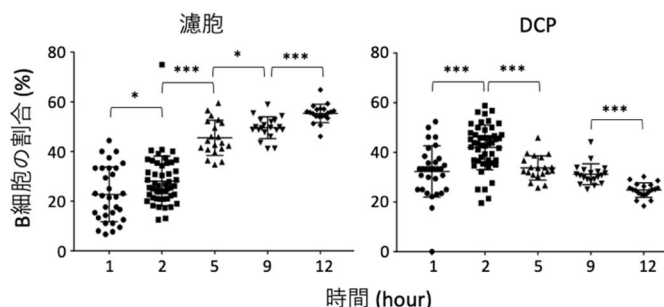
OVAを投与後、DCP近傍に存在するマクロファージ、樹状細胞、間質細胞などを注意深く観察し、抗原がDCPへ取り込まれる仕組みを明らかにする。

取り込まれた抗原と抗原特異的B細胞がDCP領域で接触する機会があるのか、顕微鏡で確認する。

DCPでのB細胞の活性化を確認する。HEL特異的BCRトランスジェニックマウス(MD4)由来のB細胞をマウスに移入して抗原投与を行い、DCPに存在するB細胞の活性化をマーカーの発現で確認する。

4. 研究成果

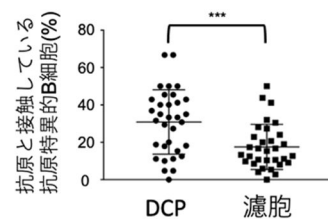
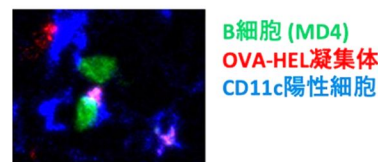
(1) リンパ節内におけるB細胞の循環経路について詳細な解析を行った。抗CD62L抗体をマウスに投与し、新たにリンパ節にホーミングしてくるリンパ球を阻害すると、DCP領域に存在するB細胞は濾胞と比べて早い時点で消失する。FTY720投与によりリンパ球の流出を阻害した場合は、DCPと比べて濾胞領域の膨張が認められた。また、蛍光色素で標識したB細胞をマウスに移入して継時的に追跡すると、DCPに占めるB細胞の割合は移入後2時間でピークを迎えてその後減少するのに対し、濾胞に占めるB細胞の割合は遅れて上昇する。これらの結果から、リンパ節に流入したB細胞はDCP領域を経由して濾胞に到達していることが確認された(右図)。



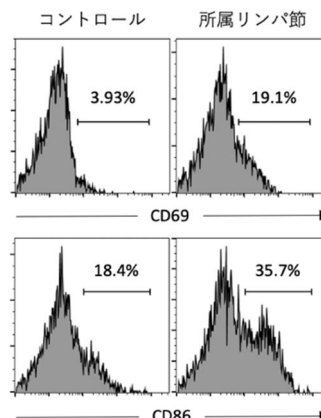
DCPにはCXCL12ケモカインが高発現している。DCP特異的にCXCL12発現を欠失させるとB細胞がDCPを経由する動きが認められず、直接濾胞へ移動することが確認された。これらの結果からリンパ節に流入したB細胞は一度CXCL12依存的に髄質近傍のDCP領域に集積し、帯状のDCP領域に沿って皮質に存在する濾胞へ移動する循環経路が明らかとなった。

(2) 抗原の免疫原性は、一般的に分子の大きさや複雑性、潜在的なエピトープの多様性が増すほど大きくなると考えられている。今回は、より免疫原性が高いと予想される抗原として、細菌類とほぼ同等の大きさであるOVA-HEL複合体を調製して解析に用いた。このタンパク質複合体を抗原として皮下に投与したところ、数時間後には所属リンパ節への到達が確認された。流入した抗原の大部分はリンパ節の辺縁洞を経て、髄洞との境界周辺に蓄積しており、多くはこの場所に存在する髄洞マクロファージによって捕らえられていた。OVA単体を投与した場合には、髄洞の深部まで到達しやすく、タンパク質複合体の方が辺縁洞と髄洞の境界面に蓄積し易いことが分かった。また、この境界に蓄積した抗原のうちの一部が近傍に存在するDCP領域に取り込まれている様子も確認された。CD11c-vinustランスジェニックマウスを使用した解析から、この抗原の取り込みはDCP領域に存在するCD11c、F4/80ダブルポジティブの細胞によって行われている事が明らかとなった。

(3) DCP領域で実際にB細胞による抗原の認識が行われているのかを確認した。一連の実験において抗原として使用しているOVA-HEL複合体は、HEL特異的B細胞受容体を持つトランスジェニックマウス(MD4)由来のB細胞によって認識することができる。MD4由来のB細胞を蛍光染色した後にレシピエントマウスに移植し、OVA-HEL複合体を皮下に投与した。所属リンパ節のDCP領域では抗原を取り込んだCD11c、F4/80ダブルポジティブの細胞がMD4由来のB細胞と接触している様子が観察され(右上図)、抗原特異的B細胞が抗原と接触する頻度は濾胞領域よりもDCP領域で優位に高いことが示された(右下図)。



(4) 抗原を捕らえたCD11c、F4/80ダブルポジティブ細胞との接触で抗原特異的B細胞が活性化できるか確認した。OVA-HEL複合体を皮下に投与後、所属リンパ節から得られた細胞をフローサイトメーターで確認した。細胞表面に抗原を保持している細胞は、主にCD11c、F4/80ダブルポジティブの細胞であり、顕微鏡による観察と一致した。また、抗原投与後の所属リンパ節より単離したCD11c陽性細胞と抗原特異的B細胞との共培養を行ったところ、B細胞の活性化マーカーであるCD69及びCD86が顕著に上昇したことから、B細胞がCD11c、F4/80ダブルポジティブ細胞の表面に存在する抗原を直接認識して活性化することを確認した(右図)。



これらの結果より、不明な点が多く残されているリンパ節深部の機能の一端が明らかにすることができた。T細胞が存在する傍皮質と髄質領域との間には、間質細胞が密な網目構造を形成するDCPと呼ばれる帯状の構造域が存在する。リンパ節に存在するB細胞は、ほぼ1日をかけて入れ替わることが知られているが、リンパ節にホーミングしてきたB細胞はCXCL12ケモカイン依存的に一度DCP領域に集められてから濾胞へ移動することを今回新たに示すことができた。また、免疫原性が高い複雑な構造を持つ抗原はリンパ節の辺縁洞と髄洞との境界周辺に蓄積し易いことが分かった。抗原が蓄積する場所とDCP領域は近接しており、DCP領域に存在するCD11c、F4/80ダブルポジティブの細胞は蓄積した抗原の一部をリンパ節内に取り込むことができる。取り込まれた抗原を抗原特異的B細胞が認識して活性化することを確認した。

リンパ節にホーミングしてきたB細胞が濾胞に移動する際、その経路をDCPという限られた領域内に限定することで抗原とB細胞が接触する機会を増やし、効率的な免疫監視が行われている可能性が示唆された。これは今まで報告されていたなかったリンパ節の機能である。今後はDCP領域で活性化したB細胞とT細胞との相互作用などを解析することで、経皮的に侵入した抗原とアレルギー発症の関係について理解が深まると期待できる。

<引用文献>

Takeuchi A. et.al. A Distinct Subset of Fibroblastic Stromal Cells Constitutes the Cortex-Medulla Boundary Subcompartment of the Lymph Node. *Front Immunol.* 2018 Oct 2; 9:2196.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kobayashi Daichi, Watarai Tomoya, Ozawa Madoka, Kanda Yasuhiro, Saika Fumihiro, Kiguchi Norikazu, Takeuchi Arata, Ikawa Masahito, Matsuzaki Shinsuke, Katakai Tomoya	4. 巻 13
2. 論文標題 Tas2R signaling enhances mouse neutrophil migration via a ROCK-dependent pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 973880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.973880	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 -
1. 著者名 Ozawa Madoka, Nakajima Shihori, Kobayashi Daichi, Tomii Koichi, Li Nan-Jun, Watarai Tomoya, Suzuki Ryo, Watanabe Satoshi, Kanda Yasuhiro, Takeuchi Arata, Katakai Tomoya	4. 巻 10
2. 論文標題 Micro- and Macro-Anatomical Frameworks of Lymph Nodes Indispensable for the Lymphatic System Filtering Function	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 902601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.902601	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 -
1. 著者名 Takeuchi Arata, Ozawa Madoka, Cui Guangwei, Ikuta Koichi, Katakai Tomoya	4. 巻 434
2. 論文標題 Lymph Node Stromal Cells: Diverse Meshwork Structures Weave Functionally Subdivided Niches	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Topics in Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 103 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-86016-5_5	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 -
1. 著者名 Rahman Md. Azizur, Kanda Yasuhiro, Ozawa Madoka, Kawamura Toshihiko, Takeuchi Arata, Katakai Tomoya	4. 巻 355
2. 論文標題 Transdermal entry of yeast components elicits transient B cell-associated responses in skin-draining lymph nodes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Immunology	6. 最初と最後の頁 104159 ~ 104159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellimm.2020.104159	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Arata Takeuchi, Madoka Ozawa, Yasuhiro Kanda, Tomoya Katakai
2. 発表標題 Newly supplied B cells from blood migrate to follicular area though deep cortex periphery within lymph node.
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arata Takeuchi, Madoka Ozawa, Yasuhiro Kanda, Tomoya Katakai
2. 発表標題 Deep cortex periphery reticular cells attract newly supplied B cells and provide a place to recognize antigens efficiently in early time point of exposure.
3. 学会等名 Keystone Symposia (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内新、神田泰洋、小澤まどか、町山裕亮、横須賀忠、片貝智哉
2. 発表標題 リンパ節の皮髄境界面は新規の間質細胞サブセットで構成され、リンパ球に抗原認識の場を提供する
3. 学会等名 Kyoto T cell Conference (KTCC)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	片貝 智哉 (Katakai Tomoya) (00324682)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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
---------	---------