

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 28日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790194

研究課題名（和文） リンパ節ストローマ細胞産生因子群による免疫組織基盤の形成機構

研究課題名（英文） Construction of the basis of lymph node tissue microenvironment by stromal cell derived factors

研究代表者

片貝 智哉（KATAKAI TOMOYA）

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：00324682

研究成果の概要（和文）：

リンパ節は免疫応答誘導のために重要な「場」であり、緻密なネットワークを形成するストローマ細胞が免疫細胞の活動を支えている。しかし、その分子基盤に関しては良く解っていない。本研究は、マウスのリンパ節ストローマ細胞に発現する因子を探索し、それらが免疫細胞機能の制御に関与する可能性を検証した。その中で、リゾフォスファチジン酸（LPA）合成酵素であるオートタキシン（ATX）がストローマ細胞に発現し、リンパ節内のリンパ球遊走に関与することを示唆する知見を得た。このように、ストローマ細胞はさまざまな分子群を産生し、リンパ球の活動を制御していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Lymph node is a crucial site for the induction of immune responses, in which stromal cells constructing elaborate network support the activity of immune cells. However, the molecular basis of stromal cell function is still unclear. In this study, we tried to identify factors expressed in stromal cells and addressed their roles in the regulation of immune cell function. As a consequence, we found that stromal cells produce a lysophosphatidic acid (LPA) synthetic enzyme, autotaxin (ATX), and ATX-LPA axis is involved in the interstitial migration of lymphocytes. Therefore, stromal cells are suggested to control the activity of lymphocytes via producing various molecular mediators.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	9,000,000	3,900,000

研究分野：免疫細胞生物学

科研費の分科・細目：解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞間相互作用、細胞動態、ストローマ細胞、組織微小環境、二次リンパ器官、免疫応答、リンパ節

1. 研究開始当初の背景

免疫系は体内の異物を認識し、排除する生体防御システムであるが、それが機能するためには、それに適した「場」すなわち体内組織環境が不可欠である。特にリンパ管網の要所に配置され、全身の各所に分布するリンパ節は、免疫監視の前線基地として異物の情報を効率よく収集し、効果的な免疫応答を誘導するために重要な臓器である。

リンパ節内において免疫細胞が活発に活動するためには、足場となる組織の構造と適度な空間が必要である。緻密で三次元的なネットワークを形成する間葉系由来のストローマ細胞がこの機能を果たし、免疫システムの支持基盤として組織微小環境を形成していると考えられる。

ストローマ細胞はこれまであまり注目されることがなかったが、近年、しだいにその重要性が認識されつつある。しかしながら、複雑なネットワーク構造の形成過程や免疫細胞活動を支える分子機構など、根本的な問題の多くは未解決のままである。

2. 研究の目的

本研究は、マウスのリンパ節ストローマ細胞に高発現する複数の因子を探索し、同定された因子群について詳細な機能解析を行なった。そして、それらがリンパ球を含む免疫細胞の活動や機能に影響を及ぼし、免疫応答の制御に関与する可能性を多角的に検証することを目的とした。

3. 研究の方法

マウスの胎仔線維芽細胞およびリンパ節から単離したストローマ細胞分画の RNA を抽出した後、その試料をもとにマイクロアレイ解析を行なった。リンパ節ストローマ細胞に高発現する遺伝子セットから免疫細胞機能の調節に関与する可能性があるものを選び出した。

リンパ節ストローマ細胞分画において、定量的 PCR 法、特異的抗体を用いた細胞や組織の染色により、注目した遺伝子の発現の確認を行ない、マイクロアレイ解析の結果を検証した後、さらに詳細な解析を行なった。

ストローマ細胞由来の因子が、組織内における T 細胞の活発な移動に関与するかどうかを検討するため、二光子励起レーザー顕微鏡を用いたリンパ節組織スライスのライブイメージングを行なった。通常、この観

察系において T 細胞は 10 ミクロン/分以上の平均速度で移動する。これに注目した因子の特異的阻害剤を加え、その影響を評価した。

4. 研究成果

マウス胎仔線維芽細胞とリンパ節ストローマ細胞のマイクロアレイ解析を比較した結果、ストローマ細胞においてリゾホスファチジン酸 (LPA) 合成酵素であるオートタキシン (ATX) が顕著に高発現していることが明らかになった(図1)。この結果を受け、定量的 PCR 法、特異的抗体を用いた細胞や組織の染色を行い、ストローマ細胞における実際の ATX 発現を確認した。

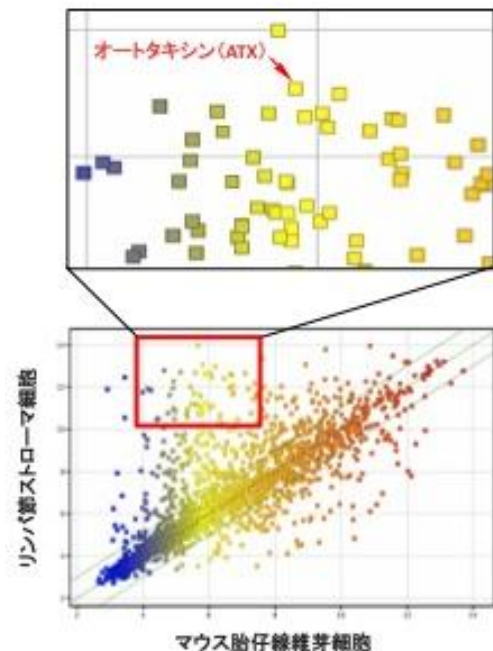


図1 マイクロアレイ解析の結果

マウス胎仔線維芽細胞と比較して、リンパ節ストローマ細胞で発現が高い遺伝子(下図・左上区画)の中で、さらに高発現する一群(下図・赤四角、上図)にオートタキシンが含まれる。

これまでに ATX が産生する LPA は、さまざまな細胞の機能、特に細胞運動や遊走に関与することが明らかにされていた。そこで、ストローマ細胞が発現する ATX およびその産物である LPA が、T 細胞のリンパ節内遊走過程に関与する可能性を想定し、二光子励起レーザー顕微鏡により、リンパ節組織スライスを用いたライブイメージングを行なった。そして、この観察系に ATX の酵素活性の阻害剤、もしくは LPA 受容体シグナルの阻害剤を加え、その効果を検討し

たところ、両阻害剤ともにT細胞遊走の平均速度を部分的であるが有意に低下させた(図2)。

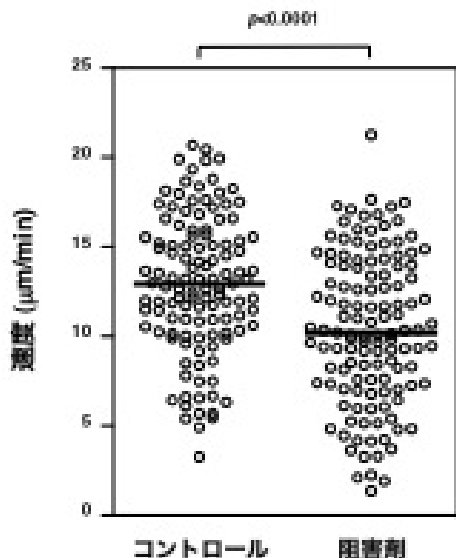


図2 リンパ節内T細胞遊走に対するLPA受容体シグナル阻害剤の効果

二光子励起レーザー顕微鏡によるリンパ節組織スライスのライブイメージングにより取得した画像をもとに、T細胞の遊走速度を測定した。阻害剤存在下では平均速度が有意に低下している。

また、in vitroにおいてLPAはリンパ節由来T細胞に対して、ケモキネシス型遊走(方向性のない、ランダムな遊走)を増加させることを確認した。したがって、リンパ節内におけるT細胞のランダムな遊走活性の一部は、ストローマ細胞が産生するATX/LPAによって担われている可能性が示唆される。

このように、ストローマ細胞が産生するさまざまな因子の働きにより、リンパ節内の免疫細胞の活動が制御され、免疫応答が調節されていると考えられる。したがって、ストローマ細胞を標的とした免疫制御や治療などの応用に向けて、今後も基礎的な知見を蓄積していく必要がある。

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. Harada Y, et al. DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. *Blood* 119:4451-4461, 2012. 査読有

2. 片貝智哉 リンパ節ストローマ細胞の機能と組織構築、*生化学*, 84:183-188, 2012. 査読無

3. Tanaka S, et al Graded attenuation of TCR signaling elicits distinct autoimmune diseases by altering thymic T cell selection and regulatory T cell function. *J. Immunol.* 185:2295-2305, 2010. 査読有

[学会発表] (計6件)

1. 片貝 智哉 リンパ節の組織構築とストローマ細胞の機能 第11回樹状細胞・免疫セミナー(招待講演)2012年3月9日獨協医科大学(栃木県)

2. Tomoya Katakai High-speed interstitial T cell migration within lymph node parenchyma involves LFA-1-dependent and -independent motility modes. 第40回日本免疫学会・学術集会 2011年11月29日 幕張メッセ(千葉県)

3. Tomoya Katakai High-speed interstitial T cell migration in lymph node involves LFA-1-dependent and -independent mechanisms controlled by stromal cell network. Seminar series 2011(招待講演)2011年9月29日 理研RCAI(神奈川県)

4. Tomoya Katakai Efficient interstitial T cell migration within lymph node involves a cooperation of LFA-1-dependent and -independent modes. The 2nd Synthetic Immunology Workshop, December 17, 2010, Kyoto・京都大学芝蘭会館

5. Tomoya Katakai Dynamic LFA-1/ICAM-1 adhesion contributes to high-velocity migration of primary T cells on stromal cells isolated from lymph node. 14th International Congress of Immunology, August 24, 2010, Kobe・神戸国際会議場

6. 片貝 智哉 リンパ節の構築 第一回 Synthetic Immunology 研究会 2010年4月9日 京都・京都大学医学部A棟

[その他]

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/molgent/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

片貝 智哉 (KATAKAI TOMOYA)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：00324082

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：