

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31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790483

研究課題名（和文） パイエル板の分化発生過程における高次構造構築メカニズムの解析

研究課題名（英文） Construction of T/B-Cell zone in neonatal Peyer's Patches

研究代表者

中川 れい子 (NAKAGAWA REIKO)

独立行政法人理化学研究所・幹細胞研究グループ・専門職研究員

研究者番号：40469911

研究成果の概要（和文）：

二次リンパ器官であるパイエル板は、効率よく迅速な抗原特異的な免疫応答を行うため、組織内部は明確な高次構造が形成されている。B/T細胞領域は胎児期には存在せず、生後形成されると考えられたが、そのメカニズムは解明されていない。本研究では胎児期パイエル板の形成に働く inducer 細胞が、出生後に CXCR4 依存的にパイエル板内で局在を変えることで、B細胞領域/T細胞領域の形成を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Peripheral lymphoid tissues such as lymph nodes and Peyer's patches are the organs where all cellular components required for immune response are assembled around the antigen processing cells. In order to mount efficient immune reactions against a small dose of antigen, a highly organized tissue architecture with distinct zones for T and B cells have to be developed. In this study, we present the evidence that lymphoid tissue inducer cells that initially play the pivotal role in the formation of PP anlagen are involved in the formation of B and T cell zones in neonatal mice. In order to migrate over different zones, PPI undergoes chemokine receptor switches.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

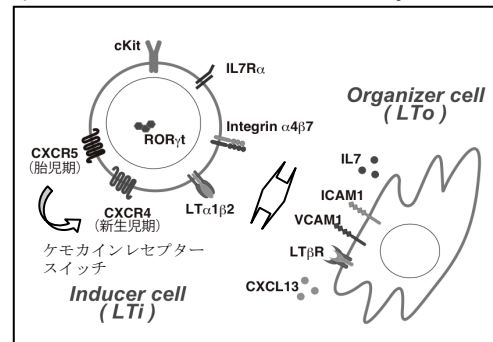
キーワード：パイエル板、CXCR4、リンホトキシン、Lymphoid tissue inducer(LTi)

1. 研究開始当初の背景

外来抗原に対する免疫応答を担う場である二次リンパ器官は、多数の T 細胞/B 細胞のレパトリーを保持する器官であり、その最大の役割は、抗原提示細胞が提示する外来抗原に対し特異的レセプターを有するリンパ球を活性化することである。どのリンパ器官も膨大な数のレパトリーの中から効率よく目的細胞を選別し活性化するために、細胞領域が区画分けされた秩序だった高次構造が構築されているのが特徴である。腸管粘膜由来抗原に対する免疫応答は、腸管関連リンパ組織 (GALT) によりコントロールされ、腸管壁に存在するパイエル板はその要として重要な器官の一つである。パイエル板内部は B リンパ球の集まる濾泡 (B 細胞領域) とそれを取り囲む旁濾泡域 (T 細胞領域) が複数集積してきており、その間には高内皮細静脈 (HEV) が B/T 領域を取り囲むよう走行する複雑な構造をもつ。パイエル板は胎児期に血球系細胞と間葉系細胞の相互作用により原基が形成された後、生後数日間かけて内部の高次構造が構築されるが、この新生児期のパイエル板成熟過程の詳細は不明である。本研究は、この新生児期におけるパイエル板の高次構造の形成過程に着目し、主として B 細胞領域/T 細胞領域の発生メカニズムを細胞レベルおよび分子レベルで解明することを目的としている。

パイエル板の器官形成過程は、胎児期の腸管壁にパイエル板原基が形成される『発生過程』と、出生直前から始まる T/B 細胞領域構造形成による『成熟過程』とに大きく分けることができる。二次リンパ組織の胎児期における分化発生メカニズムの解析は、この 15 年で大きな進展を見せており (Randall TD. *et.al.* 2008 *Annu Rev Immunol.* 26: 627-50)、胎児肝臓由来の血球系細胞である二種類の細胞『CD3⁺IL7R α ⁺ Lymphoid Tissue Inducer 細胞 (LTi)』と、『間葉系細胞由来の VCAM1⁺ ICAM1⁺ Lymphoid Tissue organizer 細胞 (LTo)』の相互作用が原基形成に重要な役割を果たす。この細胞群の相互作用は、パイエル板だけでなくリンパ節や他の粘膜付随リンパ組織 (MALT) の形成にも同じメカニズムで機能することが知られている。しかし二次リンパ組織発生のタイミングは各組織や所属部位ごとに異なり、リンパ節の場合は比較的早く E10.5 に発生が開始し胎生期ですでに内部の高次構造まで完成する。これに対し、粘膜付

属リンパ組織 (MALT) では遅い傾向にあり、パイエル板の場合は E15.5 に、鼻腔粘膜付随リンパ組織の場合は出生直前に発生がスタートし、いずれも出生後の新生児期の成熟過程を経てようやく完成する。この分化過程の時間差は、MALT が粘膜面での免疫応答に特化したリンパ組織を完成させるうえで、出生後の外的環境要因からの刺激が必須であることを反映しているものと予想される。



LTi 細胞と LTo 細胞の相互作用によるパイエル板原基の形成過程は、サイトカインおよびケモカインに制御されており、なかでも大きな鍵を握るのが『リンフォトキシン β レセプター (LT β R)』と『IL7 レセプター α (IL7R α)』を介するシグナルである。IL7R α と LT β R のリガンド LT $\alpha\beta$ は LTi 細胞に発現し、LT β R と IL7 は LTo 細胞に発現している。E15.5 でパイエル板発生予定領域に集積した LTi 細胞は、LTo 細胞由来の IL7 の刺激を受けて LT $\alpha\beta$ 発現を誘導し、それは LT β R シグナルを介して LTo 細胞での CXCL13、VCAM1/ICAM1、さらなる IL7 の発現を誘導する。CXCL13 はそのレセプターである CXCR5 を発現する LTi 細胞の原基への集積を促進し、VCAM1/ICAM1 は LTi 細胞表面の integrin $\alpha4\beta7$ との相互作用に働く。このようにして LTi/LTo 細胞間の各種因子のやり取りを介して、パイエル板原基形成は相乗的に促進されることになる。(Honda K. *et.al.* 2001 *J.Exp.Med.* 193:621-630)。

形成されたパイエル板原基内には、発生の進行に伴い組織内部に高内皮細静脈 (HEV) などの細網構造が構築され、成熟リンパ球の流入によって B 細胞の集まる濾泡 (B 細胞領域)、その内部に活性化 B 細胞の集積する胚中心、そして樹状細胞等の抗原提示細胞や T 細胞の存在する旁濾泡域 (T 細胞領域) といった明瞭に区分された領域構造が生じるが、領域が形成されるメカニズムは明らかではなく、成熟リンパ球群が高次構造形成に関わるのかどうかもまた明らかではない。

2. 研究の目的

胎児期パイエル板発生過程の解明が進んでいる一方で、出生後の成熟期における B 細胞/T 細胞領域の形成に関わるメカニズムについては不明な点が多い。我々が行った予備実験では、胎児期の発生過程でパイエル板原基全体に均一に分布していた LTi 細胞は、出生後パイエル板内部での局在が大きく変化し、その行程のあとに成熟リンパ球がパイエル板へ流入が開始していた。またこのような細胞分布の変化と同時期に、LTi 細胞の表面上ではケモカインレセプターの発現パターンが変化しており、従って、ケモカインによって制御される LTi 細胞分布の変遷が、各細胞領域形成に何らかの役割を果たすのではないかと予想された。そこで本研究ではこのケモカインレセプタースイッチに着目し、レセプタースイッチをコントロールするメカニズムの解析、及び、CXCR4 陽性 LTi 細胞のパイエル板形成における機能解析を目的とした。

3. 研究の方法

- ① パイエル板形成過程における B 細胞領域/T 細胞領域形成過程を解明する目的で、免疫組織学的手法にて新生児マウスのパイエル板構造の経時的な変化を詳細に解析する。
- ② LTi 細胞の組織内局在の変化がパイエル板成熟過程に果たす機能を解明する目的で、LTi 細胞特異的 CXCR4 欠損コンディショナル KO マウスを作製し、パイエル板の構造解析を行う。
- ③ LTi 細胞のケモカインレセプタースイッチとパイエル板成熟過程との関連性を検討する目的で、レセプタースイッチの阻害効果のある LTβR ブロッキングタンパク (LTβR-Fc) を新生児マウスに投与し、パイエル板構造の解析を行う。
- ④ 出生後に始まるパイエル板成熟過程におよぼす成熟リンパ球の影響を検討する目的で、成熟リンパ球欠損マウスのパイエル板構造解析を行う。

4. 研究成果

免疫組織学的手法を用いてパイエル板の形態を観察した結果、LTi 細胞は出生後の成熟リンパ球の流入に先行して一時的に B 細胞領域予定域に集積した後、生後 7 日以内に T 細胞領域との境界部へと移動することが明らか

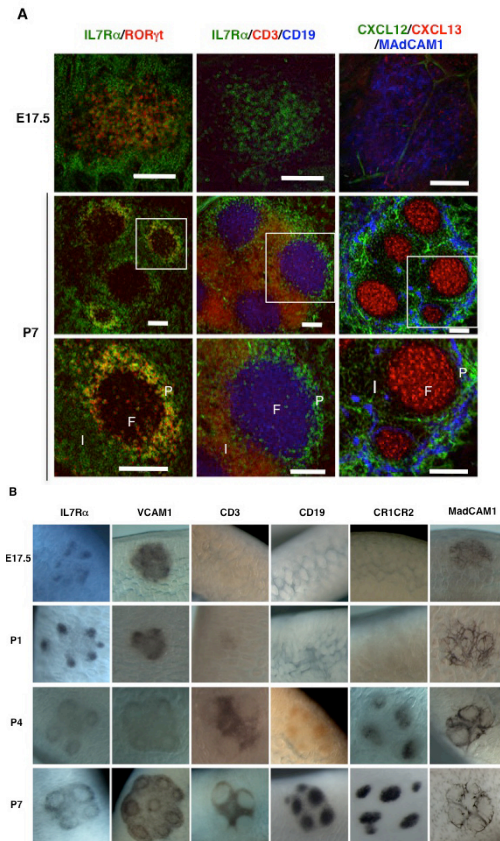


図1 新生児マウスパイエル板 wholemount 免疫染色による組織構造と細胞分布
それぞれ LTi 細胞:IL7Rα, RORγt, LTb 細胞:VCAM1、B 細胞:CD19、T 細胞:CD3、胚中心:CR1CR2、HEV:MadCAM1 を表す。

かとなった (図 1)。そこで、LTi 細胞の新生児期の特徴的な細胞分布の変遷をコントロールする因子を探索する目的で、LTi 細胞表面のケモカインレセプターの発現を FACS で解析した結果、胎児期の LTi 細胞に発現していた CXCR5 は新生児期の LTi 細胞では検出されず、代わりに CXCR4 が発現していることが明らかとなった (図 2)。

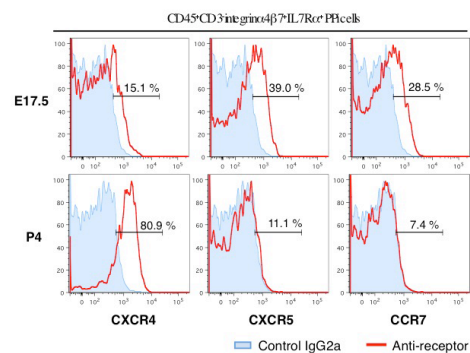


図2 パイエル板 LTi 細胞に発現するケモカインレセプター
胎児期(E17.5)では CXCR5、CCR7 陽性であるが、新生児期(P4)になると両者ともダウンレギュレートされ、かわりに CXCR4 陽性となる。

両ケモカインレセプターのリガンドである CXCL13 および CXCL12 は、出生後のパイ

エル板ではそれぞれ B 細胞領域と T 細胞領域の L_{Ti} 細胞由来の間質系細胞に発現している。そこで、新生児パリエル板で L_{Ti} 細胞と CXCL13/CXCL12 の局在を蛍光組織免疫染色で検出したところ、L_{Ti} 細胞は CXCL12 陽性の T 細胞領域に分布していた (図 1)。従って、新生児期のパリエル板において、CXCR5 → CXCR4 というケモカインレセプタースイッチが L_{Ti} 細胞の B 細胞領域 → T 細胞領域への局在の変化を制御している可能性が考えられた。

そこで、新生児期 L_{Ti} 細胞の特徴的な細胞分布にはケモカインレセプタースイッチ、特に CXCR4 の発現が必須であるのかどうかを検討する目的で、L_{Ti} 細胞特異的転写因子 ROR γ t のプロモーター支配下に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを用いて、L_{Ti} 細胞特異的 CXCR4 コンディショナル KO マウスを作製した。その結果、このマウスの新生児パリエル板では、L_{Ti} 細胞は T 細胞領域境界部へ移動は観察されず、生後 7 日目になっても B 細胞領域内に停滞していることが明らかとなった (図 3)。面白いことに、このパリエル板では成熟 B 細胞は正常に濾泡領域に流入し、さらに胚中心も形成され正常な B 細胞領域が形成されるのに対し、T 細胞の分布はパリエル板の一部に局限されており、T 細胞領域の形成が不完全であることが判明した (図 3)。

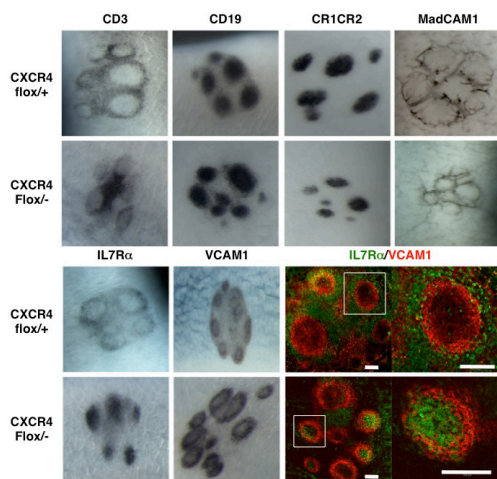


図 3 CXCR4 コンディショナルノックアウトマウスのパリエル板組織構造 (生後 7 日目)
L_{Ti} 細胞:IL7R α , ROR γ t, L_{Ti} 細胞:VCAM1、B 細胞:CD19、T 細胞:CD3、胚中心:CR1CR2、HEV:MadCAM1 を表す。

この結果より、パリエル板成熟期における L_{Ti} 細胞の T 細胞領域への移動は、CXCR4 /CXCL12 ケモカインシグナルにより制御されており、この現象は T 細胞領域の形成に必

須であることが明らかとなった。

一方、B 細胞欠損 JHD マウスや B/T 両細胞を欠損した SCID マウスでは、正常な L_{Ti} 細胞のケモカインレセプタースイッチが観察され、B/T 細胞領域いずれの構造も正常であった。従って、成熟リンパ球はパリエル板の分化形成には必須ではなく、生後のパリエル板高次構造の構築の鍵を握るのは主として L_{Ti} 細胞であると考えられる。

続いて我々は、L_{Ti} 細胞のケモカインレセプタースイッチをコントロールするメカニズムを解明する目的で、すでに胎児パリエル板原基形成時にケモカインおよびそのレセプターの発現制御に関わることが知られている IL7R α や LT β R の影響を検討した。日齢の異なる新生児マウスに IL7 中和抗体、および、LT β R ブロッキングタンパク LT β R-Fc を腹腔内投与 (1 回) したところ、IL7 中和抗体投与群ではどの日齢のマウスでも影響が認められなかった。これに対し、LT β R-Fc 投与群では、生後 1 日目の投与群では CXCR5 /CXCR4 のケモカインレセプタースイッチは抑制され、その後の成熟パリエル板の形成が完全に阻害された。ケモカインレセプタースイッチ完了後の生後 3 ~ 5 日目に投与した群では、CXCR4 のダウンレギュレーション、CXCR5 のアップレギュレーションが起こり L_{Ti} 細胞表面のケモカインレセプターは胎児型になっていた。この現象は完全にパリエル板の分化成熟が終了した生後 7 日以降のマウスに投与しても観察されなかった。LT β R-Fc 投与群の組織構造を観察したところ、生後 5 日目より前に投与した場合、投与翌日には L_{Ti} 細胞の分布は T 細胞領域境界部から B 細胞領域内へ戻り (図 4)、成長後のパリエル板では CXCR4 コンディショナルノックアウトマウスと同様、T 細胞領域の形成に異常が認められた。以上の結果は、ケモカインレセプタースイッ

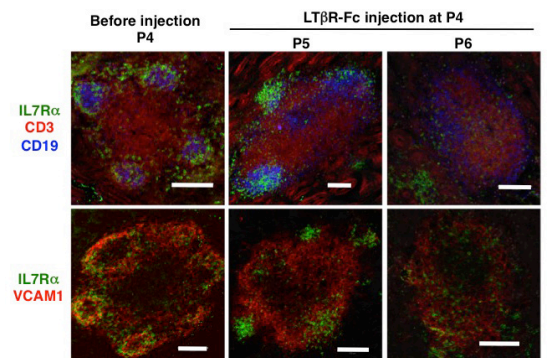


図 4 LT β R-Fc 投与後の L_{Ti} 細胞分布の変化
投与前 (P4)、B/T 細胞の境界領域に分布していた L_{Ti} 細胞は、投与の翌日 (P5) には B 細胞領域内に集積し、細胞領域形成に影響を及ぼす。

チは $LT\beta R$ シグナル依存的なメカニズムにより調節されており、この過程は生後一週間以内という非常に短い時間枠でコントロールされているということを示唆している。しかし、 $LT\beta R$ は $LT\alpha$ 細胞での発現は確認されているものの、 LTi 細胞には発現しておらず、 $LT\beta R$ -Fc 投与による LTi 細胞に対する影響は間接的であると考えられる。すなわち $LT\beta R$ シグナルを介して他に LTi 細胞にレセプタースイッチを誘導するような液性因子がパイエル板組織中に存在すると考えられる。我々は現在までに、*in vitro* の実験系において、培養胎児型 LTi 細胞細胞に対し $TGF\beta 1$ が $CXCR4$ 発現を誘導するデータを得ており、今後 *in vivo* での関連性の証明が課題となる。

二次リンパ器官形成に関わる研究報告はリンパ節や脾臓を中心に多数あるものの、出生後の成熟過程が必要とされる粘膜付随リンパ組織(MALT)の形成メカニズムに関する報告は少ないのが現状である。本研究は、MALTの中でもパイエル板の新生児期の分化成熟過程の解明につながる最初の報告となり得るものである。外界と接する粘膜組織内のリンパ組織には、常に万全の監視機構により病原体の侵入を防御しなければならない。近年では特に腸管関連リンパ組織(GALT)は自己免疫疾患やアレルギーといった免疫機能異常との関連性が多数報告されており、GALTの要となるパイエル板の構造異常が免疫反応にどのような影響を及ぼすのか、興味深いところである。さらに LTi 細胞は近年、リンパ器官形成だけでなく、NK様細胞への分化など免疫機能をもつ細胞として近年大きく注目されている。本研究は、その LTi 細胞のリンパ組織分化形成過程に於ける新たな役割を示すものであり、多様な LTi 細胞の機能を理解する上で重要な位置を占めるものである。

複雑な免疫反応は、各リンパ組織内部での秩序だったリンパ球の分布および動態の上に初めて成立するものである。本研究はその秩序の形成メカニズムが一端を解明したものである。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

①第14回国際免疫学会(ICI 2010)

2010年8月22日

神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

LT-dependent switch from CXCR5 to CXCR4 is required for relocation of lymphoid tissue inducer cells from B- to T-cell zone of Peyer's patch

中川れい子、戸川温、長澤丘司、西川伸一

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 れい子 (NAKAGAWA REIKO)

独立行政法人理化学研究所・幹細胞研究グループ・専門職研究員

研究者番号: 40469911