

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670101

研究課題名(和文)リンパ節傍皮質領域FRC特性の人為的発現誘導法の開発

研究課題名(英文)Artificial induction of the property of FRC in lymph node paracortex

研究代表者

片貝 智哉 (Katakai, Tomoya)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00324682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：免疫応答の誘導に不可欠なT細胞と樹状細胞の接触が起こるリンパ節傍皮質領域は、ケモカインCCL21を産生する細網繊維芽細胞(FRC)が存在し、免疫応答において重要な役割を担う。しかし、FRCの発達とCCL21産生に至る分子機序は明らかにされておらず、本研究はその分子過程の解明を目的とした。マウスのリンパ節ストローマ細胞に高発現する候補遺伝子をストローマ細胞株に安定導入することにより、CCL21発現に必要な制御遺伝子の同定を試み、一部の遺伝子に関しては炎症性サイトカイン刺激を加えた場合に反応性亢進を含む変化を示すものがあったが、CCL21の発現が誘導する状況は見出されなかった。

研究成果の概要(英文)：The paracortical region of lymph node (LN) is a prime site where antigen-specific interactions between T cells and dendritic cells takes place, therefore it plays a crucial role in the induction of adoptive immunity. Tissue structure of the paracortex is supported by fibroblastic reticular cells (FRCs) that produce CCL21, an important chemokine for attracting T cells and dendritic cells. However, mechanism for the selective expression of CCL21 in FRCs remains to be elucidated. The purpose of this study is to clarifying the molecular process. To identify the regulatory factors critical for the expression of CCL21, candidate genes highly expressing in mouse LN stromal cells were stably transfected to FRC cell lines established from LN using retroviral vectors. Although some transfectants showed alterations in responsibility to inflammatory cytokines, we unfortunately could not found the settings that induce CCL21 expression in FRC cell lines.

研究分野：免疫学

キーワード：CCL21 ケモカイン ストローマ細胞 発現制御 リンパ節

### 1. 研究開始当初の背景

リンパ節は多様な免疫細胞が集積し、感染が起こるとその情報を集約して効果的な応答を誘導するための前線基地として働く免疫系の臓器(二次リンパ組織)である。特に傍皮質領域にはリンパ球の一種であるT細胞が集中しており、リンパ管を介して末梢組織からの病原体情報を携えて移動してきた樹状細胞が、抗原特異的なT細胞にその情報を伝えることにより、免疫記憶をつかさどる獲得免疫応答が開始される極めて重要な組織区画である。

T細胞と樹状細胞はともにGタンパク質共役型ケモカイン受容体CCR7を発現し、傍皮質で産生されるケモカインCCL21に誘引されてこの場に局在・集積する。このケモカイン・受容体システムは免疫系の恒常性や免疫記憶、自己寛容にも関与し、その発現欠損は傍皮質領域の消失とともに様々な免疫異常を引き起こすことから、免疫システム制御の要となる生理活性分子であるといえる。一方、傍皮質領域は細網線維芽細胞(FRC)と呼ばれる特殊な間質ストローマ細胞のネットワークにより構造的に支えられ、T細胞と樹状細胞の移動や定着の足場となっているが、CCL21はFRCから大量に分泌され細胞表面に固着化されている。したがって、CCL21産生能こそがFRCの最も重要な機能特性であるといっても過言ではなく、この細胞が免疫応答の支持基盤として不可欠な要素であることを示している。

しかし、どのようなメカニズムで傍皮質領域のFRCが発生・分化し、CCL21産生能を獲得するのかに関しては全く明らかになっておらず、その端緒となるべきCCL21遺伝子の発現制御機構は未だ不明である。CCL21を安定発現する細胞株が存在しないことも解析が進まない理由のひとつであるといえる。

我々はこれまでマウスFRC様細胞株を多数樹立したが、CCL21発現を保持しているものは得られなかった。また、リンパ節から単離したストローマ細胞の初代培養系では、CCL21発現が数日のうちに消失してしまう。二次リンパ組織の発生・維持に必須のリンフォトキシンなどの添加やリンパ節由来免疫細胞との共培養でも維持できないことから、組織環境内の複雑な要因を必要とすることが示唆される。三次元的な組織環境や体液流などの物理刺激が関与する可能性もあるが詳しいことはわかっておらず、大きな謎として残されている。

このCCL21発現をもたらす特定の細胞内状態とそれともなう転写プログラムがストローマ細胞内で働いていると推測されるが、最近我々はリンパ節から単離した直後のFRCと胎仔線維芽細胞との遺伝子発現を比較す

ることにより、いくつかの転写制御因子および細胞内タンパク質がFRC特異的に高発現していることを見出した。

### 2. 研究の目的

リンパ節の傍皮質領域は免疫応答の誘導に不可欠なT細胞と樹状細胞の抗原特異的な接触が起こる現場であり、ケモカインCCL21を発現する特殊な間質ストローマ細胞のネットワークにより組織化・維持され、免疫システムの空間的、あるいは機能的な中枢としての役割を担っている。

この特殊なストローマ細胞の発達とCCL21産生に至る分子機序は通常の免疫応答のみならず、さまざまな病態形成との関連が示唆されることから極めて重要な問題であるが、いくつかの技術的に困難な状況からほとんど理解が進んでおらず手掛かりも乏しい。

本研究ではこの現状を打開するために、最近得られた知見に基づいてやや飛躍した想定をおこない、CCL21発現をとまなうストローマ細胞の特性を人為的に誘導するための手法を探索した。そして、その分子過程の解明に向けた研究基盤の構築を試みる。

### 3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ解析によってリンパ節のストローマ細胞に高発現することがすでに明らかになっている複数の転写制御因子および細胞内タンパク質に関して、そのcDNAを、哺乳類細胞発現プラスミドベクターpCDNAもしくはレトロウイルスベクターpMXに組み込み、CCL21を発現していないマウスリンパ節由来のストローマ細胞株BLS4およびBLS12、初代リンパ節ストローマ培養細胞、あるいは一般的な間葉系細胞株などに、さまざまな組み合わせで安定導入し、強制発現させることにより、CCL21発現が誘導されるかどうかを検討する。

(2) 二次リンパ組織形成に関わるリンフォトキシンなどの液性因子の刺激やリンパ節由来免疫細胞との共培養、あるいは細胞外マトリクス成分素材を利用した三次元的な環境などの多様な培養環境下におき、おもにCCL21遺伝子発現を指標としてリンパ節傍皮質領域のFRCが有する特性が誘導される条件を探索する。

(3) CCL21遺伝子の転写調節領域およびその発現制御シグナル/転写制御ネットワークの解析を進めることで、ストローマ細胞の特性発現機構の解明に向けた基盤構築を試みる。

### 4. 研究成果

(1) マウスのリンパ節ストローマ細胞に高発現することが明らかになったいくつかの

候補遺伝子を、複数の哺乳類細胞発現ベクターシステムを用いることにより、マウスリンパ節由来ストローマ細胞に安定的に導入・強制発現させることができた(図1)。

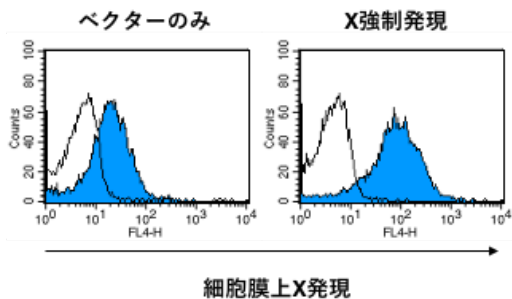


図1 ストローマ細胞株 BLS12 への安定導入が成功したある細胞膜タンパク質遺伝子のフローサイトメトリーによる発現確認。ストローマ細胞株にもともと弱く発現していた X が(左)、遺伝子導入による強制発現でさらに増強されている(右)。

(2) 候補遺伝子を発現させたストローマ細胞の一部は、腫瘍壊死因子(TNF) $\alpha$ やリンフォトキシンなどの炎症性サイトカイン刺激を加えた場合に、対照群と比較して CXCL9 や CXCL10 などの炎症性ケモカイン発現の亢進などが認められるものがあった(図2)。これは、ストローマ細胞に何らかの性状変化がもたらされ、炎症性シグナルに対して反応性が増した結果である可能性が考えられる。しかし、残念ながらこれまでのところ、CCL21 の遺伝子発現が誘導される条件は見出されていない。

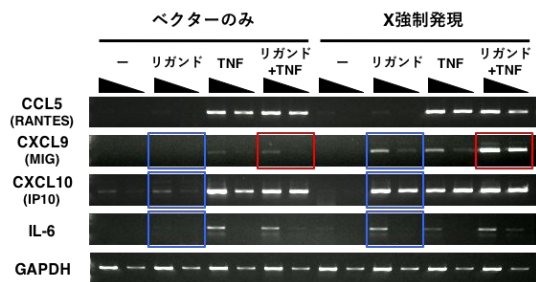


図2 候補遺伝子 X を強制発現させたリンパ節由来ストローマ細胞の性状変化。細胞膜タンパク質である X に結合する既知のリガンドや TNF、あるいはそれらの共刺激を加えた後に、RT-PCR 法によりいくつかの遺伝子発現を検討した。CXCL9 および CXCL10 の発現誘導が増強されていることがわかる(青枠もしくは赤枠で囲まれた部分どうしを比較)。

(3) 一方で、リンパ節においてほとんどのストローマ細胞が発現する増殖因子受容体 PDGFR $\beta$  の遺伝子プロモーター制御下におい

て黄色蛍光タンパク質 EYFP および Cre DNA 組み換え酵素/ERT2 融合タンパク質を発現し、タモキシフェン誘導的に遺伝子改変を行なえるマウス系統の樹立に成功した。また、このマウス系統で、リンパ節のストローマ細胞に EYFP が発現していることが確認された(図3)。

これにより今後、生体内におけるリンパ節ストローマ細胞の性状やネットワーク構造、サブセットの系譜追跡、さらには条件的遺伝子欠損による影響を検討するなどの解析が可能となった。現在いくつかの標的遺伝子の欠損マウスとの交配を進めている。

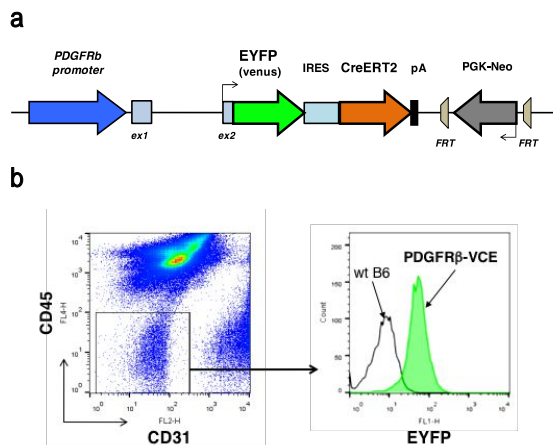


図3 PDGFR $\beta$  プロモーター制御下 EYFP/CreERT2 発現ロックインマウス (PDGFR $\beta$ -VCE) の遺伝子構造 (a) とリンパ節ストローマ細胞 (CD45<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>分画) における EYFP 発現のフローサイトメトリーによる確認 (b)。

## 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4件)

1. Sugimoto K., Hayakawa F., Shimada S., Morishita T., Shimada K., Katakai T., Tomita A., Kiyoi H., and Naoe T. Discovery of a drug targeting microenvironmental support for lymphoma cells by screening using patient-derived xenograft cells. *Sci. Rep.* 5:13054. (2015). 査読あり doi: 10.1038/srep13054
2. Katakai T., Kondo N., Ueda Y., and Kinashi T. Autotaxin produced by stromal cells promotes LFA-1-independent and Rho-dependent interstitial T cell motility in the lymph node paracortex. *J. Immunol.* 193: 617-626, (2014). 査読あり

doi:10.4049/ jimmunol.1400565

3. 片貝智哉 「免疫細胞が活動する現場で何が起きているのか ～Dynamic かつVivid な組織微小環境のイメージを求めて」  
新潟県医師会報 H27.1:2-7, (2015). 査読なし
4. 片貝智哉、木梨達雄 「リンパ球の高速移動を制御するリンパ節組織支持細胞ネットワーク」  
細胞工学 33:107-111, (2014). 査読なし

〔学会発表〕(計3件)

1. 片貝智哉 「生体イメージングでのぞく免疫応答のダイナミクス」  
平成 27 年度日本生化学会関東支部例会・第 56 回新潟生化学懇談会  
2015 年 6 月 20 日 新潟日報メディアシップ (新潟県・新潟市)
2. 片貝智哉 「リンパ節内のリンパ球動態と組織微小環境」  
第 17 回新潟血液研究会  
2015 年 6 月 5 日 ANA クラウンプラザホテル (新潟県・新潟市)
3. 片貝智哉 「免疫臓器の組織微小環境と免疫細胞動態」  
第 12 回 Niigata Bone Research Conference  
2015 年 3 月 3 日 新潟医療人育成センター (新潟県・新潟市)

〔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

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
免疫・医動物学分野ホームページ  
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/zoo/welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
片貝 智哉 (KATAKAI, Tomoya)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：00324682

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：