様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月 １７ 日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2015
課題番号：２６８６０７５０

研究課題名（和文）濾胞樹状細胞に発現するRANKを介した液性免疫制御

研究課題名（英文）Role of RANK expressed on FDCs in humoral immunity

研究代表者
田中　伸弥（TANAKA, SHINYA）

大阪大学・免疫フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：８０４６２７０３

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）：本研究においては、細胞相互作用を仲介する分子 Receptor activator of NF-kappa B (RANK)受容体とそのリガンド(RANKL)を介した液性免疫応答の解明を試みた。実施実験によって、follicular dendritic cell (FDC)とfollicular helper T (Tfh)細胞のRANKを介した相互作用が、T細胞依存的抗体産生を制御しうる可能性が示唆された。さらに、lymphatic endothelial cell (LEC) にもRANKの高い発現が見られ、これが液性免疫応答に寄与する可能性も示唆されている。

研究成果の概要（英文）：I examined roles of receptor activator of NF-kappa B (RANK) in humoral immune response in the research program. Our results suggest that the interaction between follicular dendritic cells (FDCs) and follicular helper T (Tfh) cells would promote T cell-dependent humoral immunity. In addition, I performed global gene expression analysis with stromal cell subsets using next generation sequencing. The assay provided unique gene expression patterns of each stromal cell subsets and revealed RANK receptor was highly expressed in stroma cells especially lymphatic endothelial cell (LEC) and/or LEC-like cells. The finding indicates that humoral immune response could be regulated by RANK expressed by these stromal cells. In addition, our gene expression data of stromal cells is useful information to understand role and function of stromal cells in host defense and immunopathological diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：FDC　RANK

１．研究開始当初の背景

高親和性抗体産生または、記憶液性免疫応答獲得に必須であり、その形成は、活性化 B 細胞、T follicular helper (Tfh) 細胞、follicular dendritic cell (FDC) との相互作用によって制御される。免疫応答時における、Diphtheria toxin receptor (DT-R) を用いた生体内 FDC の一過性除去によって、胚中心はほとんど消失することから、FDC は、液性免疫応答に必須であることが、明らかになっている (*J Exp Med* 208, 2497, 2011)。B 細胞、T 細胞の液性免疫における役割は、比較的よく研究されているが、FDC がいかに胚中心を形成し、高親和性抗体産生、記憶液性免疫応答を制御しているかは、ほとんどわかっていない。Tumor necrosis factor ファミリーに属する RANKL、またその受容体 RANK は、胸腺において、T 前駆細胞とストローマ細胞の相互作用を仲介し、成熟 T 細胞の産生に必須の役割を果たしている (*Immunity* 29, 423, 2008, *Immunity* 29, 438, 2008)。申請者らは、末梢リンパ組織において、FDC が RANK を、胚中心 B 細胞、Tfh 細胞が RANKL を発現していることを見出した。これらの知見から、RANK-RANKL は、B 細胞、Tfh 細胞、FDC の相互作用を仲介することにより、胚中心の形成を促し、液性免疫応答を制御する可能性が示唆された

２．研究の目的

本研究計画では、RANK-RANKL に焦点をあて、FDC **とリンパ球の相互作用を介した**液性免疫応答の制御機構の解明を目指す。また、リンパ節など二次リンパ組織におけるストローマ細胞サブセットの単離方法の樹立を行い、それら各サブセットにおける遺伝子発現パターンを明らかにする。

３．研究の方法

(1) CD21 は、免疫系では、FDC と B 細胞に主に発現しているが、FDC を含むストローマ細胞は、ラディエーションに耐性であるため、Cd21 *Cre Rank* flox マウスをレシピエントとして野生型マウスの骨髄を移植することで、FDC 特異的 RANK 欠損マウス [FDC *Rank* knock out (KO)] が作製できる。FDC *Rank* KO マウス、コントロールマウスを NP CGG-alum で免疫し、経時的な NP 特異的抗体産生、抗体親和性成熟を検討する。

(2) FDC を含むストローマ細胞は、様々なメカニズムを介して胚中心反応を制御していると考えられる。主に補体レセプターを介した抗原提示、CD40 などリンパ球に発現する共刺激分子を介した活性化、もしくは抑制性シグナルの供給、インターロイキン 6 等のサイトカイン産生を介した胚中心反応に関わる活性化リンパ球の機能、分化制御といった役割が想定される。これらに焦点を当て、ストローマ細胞の機能解析を行う。その為には、FDC を含む他のストローマ細胞をリンパ節より単離する方法を確立し、それらストローマ細胞に特異的に発現する分子を網羅的に同定する。

(3) 前述したように、FDC 上の RANK に、Tfh または、胚中心 B 細胞が産生する RANKL が結合することによって、適切な液性免疫応答が惹起されると考えられる。これを明らかにす

る目的で、申請者は、B細胞特異的なRANKL欠損マウス (Cd79a *Cre Rankl* flox) を樹立した。このマウスをNP CGGで免疫し、経時的なNP 特異的抗体産生、抗体親和性成熟、胚中心、について検討を行う。さらに、末梢においてTfh細胞由来RANKLの液性免疫応答への関与を検討するため、Tfh細胞でcreの発現を誘導するS1pr2 ERT2creマウスを*Rankl* floxと交配 (S1pr2 ERT2cre *Rankl* flox) する。これらマウスの骨髄細胞とT 細胞が欠損する Cd3 KO マウス由来の骨髄細胞を用いて、混合骨髄キメラマウスを作成する。これらマウスを同様に免疫し、液性免疫応答を解析する。

４．研究成果

(1) FDCにおけるRANKの欠損によって後期の胚中心反応、抗原特異的抗体産生応答にわずかに減弱が見られた。特に、高親和性抗体の産生が低下していることが明らかとなった。これらは、FDC が胚中心反応の維持、抗体のaffinity maturation に関わっていることを示唆するものと考えられる。RANKのFDCにおける発現がどのような外因性刺激によって制御されているのか、または、FDCにおいて、RANK 由来の刺激がどのような遺伝子の発現を誘導し、そのうちのどの分子が、胚中心 B細胞、Tfh 細胞といった活性化リンパ球の機能を制御するのか明らかいにすることは今後の課題である。

(2) リンパ節における細胞分離法を検討し、リンパ節の裁断後、エンザイムカクテルによってリンパ節片を消化することにより、viabilityの高いcell suspensionを得るプロトコルを作製した。各ストローマ細胞に発現する細胞表面分子をサイトメーターによって検討することで、ストローマ細胞サブセットを分取する染色パターンを確立した。これらの方法を用いて、各ストローマ細胞サブセットを単離し、網羅的遺伝子発現解析を行うことで、サブセットにおける遺伝子発現パターンを得ることに成功した。その結果、RANK の発現は、FDC に加えて lymphatic endothelial cell (LEC) に高く認められた。これらの情報は、感染防御、炎症関連疾患におけるストローマ細胞の機能解析に有益なものと考えられる。

(3) 免疫実験の結果より、B 細胞に発現するRANKL は、液性免疫応答には必須でないことが示唆された。一方で、Tfh細胞でRANKL を欠損した場合、免疫後のTfh細胞数の低下が認められた。これまでの研究で、FDC を含むストローマ細胞と Tfh 細胞が RANK-RANKL を介して相互作用することにより適切な免疫応答が惹起される可能性が示唆された。ウィルスの再感染など、二次免疫応答時には、メモリーB 細胞のみならず、メモリーTfh 細胞の活性化が必須であることが示されている。本研究課題で得られた結果から、RANK-RANKLを介したストローマ細胞とTfh細胞の相互作用によって、適切なメモリーTfh 細胞の形成が促される可能性が示唆された。今後、メモリーTfh 細胞の維持、または、二次応答時における活性化において、各ストローマ細胞がどのように関与しうるのかについて検討することが今後の課題と考えられる。

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　　0 件）

〔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：
出願年月日：
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
田中伸弥（TANAKA, Shinya　　　）
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター分化制御・特任助教

研究者番号：80462703

(2)研究分担者
（　　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　　）

研究者番号：