

研究終了報告書

「Heterogeneous な組織境界層を起点とした時空間的な細胞間相互作用」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：岡部 泰賢

1. 研究のねらい

腹腔は、腹膜(漿膜)で囲まれた閉鎖空間(体腔)である。その内部は単なる空洞ではなく漿液で満たされるとともに、多数の白血球(リンパ球やマクロファージ)が集積するユニークな免疫コンパートメントが形成される。そして、これら白血球の一部(リンパ球など)は血管系を介して全身を行き来し、腹腔と末梢の間には常時白血球の循環が生じる。しかし、これら白血球がどのようにして閉鎖空間である腹腔に流入し、そして腹腔外へと流出するのか、そのメカニズムは明らかにされていない。

腹腔内臓器である『大網組織』には、リンパ球の腹腔-末梢間の移動を制御する『関門』が存在する。大網組織の大部分は脂肪組織により構成されるが、一般的な脂肪組織と異なり『大網乳斑』と呼ばれる白血球の凝集(クラスター)が複数点在する。この大網乳斑が腹腔-末梢の間を繋ぐ『関門』の実体と考えられているが、リンパ球が腹腔内へと移動する具体的なメカニズムは明らかにされていない。

一般的に、免疫応答を担う中枢であるリンパ組織は、個体発生とともに先天的に形成される二次リンパ組織と、感染・肥満・老化などの後天的な要因により発生する三次リンパ組織に大別される。これら二次リンパ組織や三次リンパ組織に対して、大網乳斑は胎生期に形成されると同時に、感染や肥満などの後天的な要因によっても著しくその数や大きさが増大する性質を有する。このことから、大網乳斑は二次リンパ組織と三次リンパ組織の両者の性質を備えたユニークなリンパ組織と位置付けられる。しかしその形成を制御する分子メカニズムはほとんど分かっていない。

このような背景において、研究代表者は大網乳斑を被う中皮層に局在する新規のストローマ細胞を同定した。本さきがけ研究では、リンパ球の腹腔移動および大網乳斑形成における本ストローマ細胞の役割を明らかにすることを目指す。

(1) 概要

研究代表者は、大網乳斑で産生されるレチノイン酸が、腹腔内の白血球の動態を制御することを明らかにしてきた (Cell, 2014, 157, 832-844)。本研究では、大網乳斑を被う中皮層近傍に存在するストローマ細胞がレチノイン酸産生を産生することを見出した。細胞生物学的な解析により、この細胞は細網細胞に分類されることを明らかにした。一方、リンパ節などでみられる既知の細網細胞とはことなり、レチノイン酸合成酵素 **Raldh2** や血管内皮細胞マーカー **Tie2** などを発現するユニークな表現型を示すことから、この細胞を **Raldh2⁺細網細胞** と名付けた。

遺伝学的な手法により、**Raldh2⁺細網細胞** を除去したマウスでは大網乳斑へのリンパ球の浸潤が抑制されるとともに、大網乳斑が著しく退縮した。この時、リンパ球のリクルートメントを制御するケモカイン **CXCL12** の発現が有為に低下することを見出した。さらに、**Raldh2⁺細網細胞** から産生されるレチノイン酸が、血管内皮細胞における **CXCL12** の発現を誘導することを見出した。以上の結果から、**Raldh2⁺細網細胞** はレチノイン酸依存的に血管内皮細胞の **CXCL12** を誘導することで大網乳斑の形成を制御すると結論した。

(2) 詳細

大網乳斑においてレチノイン酸を産生する細胞を同定する目的で、マウス大網から細胞を単離した。この大網細胞に対して、蛍光標識したレチノイン酸合成酵素基質を処理し、**Flow cytometry** を用いてレチノイン酸合成活性を有する細胞をスクリーニングした。その結果、性腺周囲脂肪や皮下脂肪では弱いレチノイン酸合成活性を示す細胞集団しか存在しないのに対し、大網組織では **CD45** 陰性のストローマ細胞の一部に強いレチノイン酸合成活性が見いだされた。このストローマ細胞をソーティングし、**RNA-seq** によるトランスクリプトーム解析を行ったところ、レチノイン酸合成酵素 **Raldh2** がこの細胞で非常に強く発現することを見出した。さらに、この細胞が大網乳斑を被う中皮層近傍に存在することを明らかにした。

次に本ストローマ細胞の細胞生物学的な表現型の解析を行った。本ストローマ細胞は中皮層近傍に存在するが、**Msln** や **Lrrn4**、**Upk3b** などの中皮細胞に特徴的なマーカー遺伝子は発現しておらず、一般的に報告されている中皮細胞とは異なる細胞種であることが示唆された。一方、リンパ節に存在する細網細胞に特徴的なマーカー遺伝子である **PDPN**、**CD140a**、**CCL19**、**Col4a1**、**Col14a1** などが発現することから、この細胞は細網細胞のサブセットであると結論した。しかし、リンパ節に存在する細網細胞とは異なり、本細胞は前述のレチノイン酸合成活性に加え、血管内皮細胞の表面マーカーである **TIE2** を発現することから大網組織に特異的に存在する細胞であると結論し、**Raldh2⁺細網細胞** と名付けた。

Raldh2⁺細網細胞 の生理的役割を解析する目的で、この細胞に特異的に発現する **Postn**

遺伝子のプロモーターの下流にジフテリア毒素受容体遺伝子(DTR)を挿入した Postn-DTR マウスを作製した。Postn-DTR マウスにジフテリア毒素を投与すると、24 時間以内に Raldh2⁺ 細網細胞がほぼ完全に除去された。大網乳斑の構造形成における Raldh2⁺ 細網細胞の役割を検討するため、Raldh2⁺ 細網細胞を除去した後、経時的に大網乳斑構造を解析したところ、ジフテリア毒素投与 3 日後から大網乳斑が退縮し始めることを見出した。この時、大網乳斑を構成する細胞種のうち、マクロファージや B-1 細胞などの常在性の白血球の細胞数には変化がなかったが、T 細胞や B-2 細胞などの移動性のリンパ球数は顕著に減少した。このことから、Raldh2⁺ 細網細胞は大網乳斑へのリンパ球のリクルートメントを制御する可能性が示唆された。そこでこの可能性を検討するため、リンパ球の移植実験を行った。GFP で標識した脾臓リンパ球を野生型および Postn-DTR マウスに静脈注射した後、リンパ球のリクルートメントを評価したところ Raldh2⁺ 細網細胞の除去により大網乳斑へのリンパ球移動が著しく減少することを見出した。以上の結果から、Raldh2⁺ 細網細胞は血流からリンパ球をリクルートすることで大網乳斑の白血球集積構造を形成すると結論した。

Raldh2⁺ 細網細胞がリンパ球のリクルートメントを制御するメカニズムを明らかにするため、野生型および Postn-DTR マウスの大網組織のトランスクリプトーム解析を行ったところ、Postn-DTR マウス大網組織ではリンパ球のリクルートメントを制御するケモカイン CXCL12 の発現が有為に低下していた。実際、野生型マウスに CXCL12 受容体の阻害剤 AMD3100 を投与すると、Postn-DTR マウスと同様に大網乳斑の退縮が見られた。この結果から、Raldh2⁺ 細網細胞は CXCL12 の発現を誘導することでリンパ球のリクルートメントを制御すると結論した。

野生型マウスの大網では、CXCL12 は血管から組織実質へのリンパ球移動を司る特殊な血管内皮細胞である高内皮細静脈(High endothelial venule: HEV)に局在する。一方、この HEV における CXCL12 の発現は Postn-DTR マウスでは消失していた。レチノイン酸は CXCL12 遺伝子の活性化を誘導することが報告されていることから、Raldh2⁺ 細網細胞はレチノイン酸を介して HEV に CXCL12 遺伝子の活性化を誘導する可能性について検討を行った。野生型マウスの大網から HEV を含む血管内皮細胞を単離し、In vitro でレチノイン酸を処理したところ、CXCL12 遺伝子の活性化が誘導された。以上の結果から、Raldh2⁺ 細網細胞に由来するレチノイン酸が HEV に CXCL12 を誘導することで、大網乳斑へのリンパ球のリクルートメントを制御すると結論した(論文投稿中)。

3. 今後の展開

本研究開始当初、Raldh2⁺ 細網細胞の生理的機能として、『大網乳斑形成』と『大網乳斑から腹腔へのリンパ球移動』に関する解析を達成目標として掲げていた。前者の『大網乳斑形成』のメカ

ニズムについては一定の進展がみられ、現在論文として投稿中である。大網乳斑や腹腔内にはB-1細胞などのユニークな白血球が集積し、他のリンパ器官では代替できない特異な役割を担う。本研究成果はこれら腹腔や大網乳斑特有の免疫反応の理解の進展や医学的応用に繋がるものであると考える。

一方、もうひとつの達成目標として掲げていた『大網乳斑から腹腔へのリンパ球移動』については、引き続き解析を継続する必要がある。特に、大網を被う中皮層には特徴的な穴構造(小孔)が存在し、既存の報告や本さきがけ研究で得られた知見を統合して考えると、大網乳斑のリンパ球がその穴構造を通過することで腹腔内へと移動することが示唆される。実際、本研究期間中の解析により、リンパ球が小孔を通過することを示唆する電子顕微鏡や免疫染色のデータが得られている。しかしこれらは状況証拠的な知見であり、今後は機能的な解析により本現象の実体に迫る必要があると考えている。特に Raldh2^+ 細網細胞がリンパ球の小孔通過を制御する可能性については検討を予定している。

4. 自己評価

本研究期間において、達成目標のひとつであった『大網乳斑形成』について進展がみられた。大網乳斑を形成するメカニズムは長らく明らかにされてこなかったが、本研究において大網乳斑特異的に存在する Raldh2^+ 細網細胞が重要な役割を担うことを解明した点で、免疫発生学の理解に貢献する成果と考える(論文投稿中)。本研究成果に基づき、大網乳斑や腹腔を介した免疫応答の理解が今後進展することが期待される。

本さきがけ研究内容や領域内での交流の成果により、2020年度秋から大阪大学免疫学フロンティア研究センターにおいて独立ポジションとして新たな研究室を構えることになった。今後、日本の免疫学研究の中心的な研究機関において、本さきがけ領域で培った交流や経験を活かし、細胞生物学・発生学・免疫学などの複数の学術領域を横断する新たな研究の開拓を目指していく。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

Yoshihara T. & Okabe Y.

Aldh1a2⁺ fibroblastic reticular cells shape omental milky spots and secure peritoneal immunity

論文投稿中

大網乳斑に存在する Raldh2^+ 細網細胞はレチノイン酸を産生することで高内皮細静脈(HEV)にケモカインCXCL12を誘導することで血中のリンパ球を大網乳斑に遊走させることを見出した。

(2) 特許出願

該当なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Macrophage plasticity in homeostasis and diseases

Okabe Y.

Rinsho Ketsueki. 2022;63(5):368-372

doi: 10.11406/rinketsu.63.368.PMID: 35662159

Immune Niche Within the Peritoneal Cavity.

Okabe Y.

Curr Top Microbiol Immunol. 2021;434:123-134.

doi: 10.1007/978-3-030-86016-5_6.PMID: 34850285

Macrophage Plasticity in Homeostasis and Diseases

Okabe Y

The 83rd Annual Meeting of the Japan Society for Hematology

9/23/2021

Regulation of Body Cavity Immunity

Okabe Y.

The 73rd Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology

6/29/2021

Tissue-Resident Macrophages in Homeostasis

Okabe Y

The 100th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan

3/14/2023