

## 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～



新潟大学大学院医歯学総合研究科 免疫・医動物学分野  
片貝 智 哉

### はじめに

平成26年9月1日付けで、安保徹前教授の後任として新潟大学医学部免疫・医動物学分野教授を拝命いたしました片貝智哉と申します。この場をお借りして新潟県医師会の皆様にご挨拶申し上げます。私は平成6年に同大学理学部生物学科を卒業し、同大学院自然科学研究科で学位を取得した後は京都大学医学部や関西医科大学など、しばらく関西において研究活動を続けて参りました。このたび母校の医学部において教育と研究に携わる機会をいただき、その重責を感じながらも、再び新潟の地で生活できることを大変うれしく思っております。このすばらしい環境で、地域医療を担う人材の育成に貢献し、世界に発信できる研究成果を得るべく鋭意取り組んでいきたい所存です。今回、自己紹介を兼ねまして、私のこれまでの研究を含めて関連する免疫学領域の最近の動向についてご紹介いたします。

### 蛍光生体イメージング技術による動的組織環境の理解

私は大学院生時代にマウスの自己免疫性胃炎モデルの病態形成に関する解析を行っていましたが<sup>1)</sup>、胃粘膜という局所で見られる激しい慢性炎症性浸潤と組織破壊を目の当たりにし、組織内部における免疫細胞の活動や周辺微小環境との関連に大変興味を持ちました。立体的な組織の中で、さまざまな細胞がどのように関わり合いダイナミックに振る舞うのか、具体的にイメージできるかたちで知りたいと思い、後にそれらを観察するのに適した臓器としてリンパ節に注目するようになります。現在、おもにマウスを用いて免疫組織化学的手法や生体イメージング技術などを駆使し、リンパ節の微細構造や機能、それを支えるス

トローマ細胞と呼ばれる細胞群、免疫細胞の動態についての研究を進めています。

これまでの免疫学研究は、材料として比較的簡単に得られるリンパ球や他の血球系細胞、あるいはタンパク質などの成分を組織や血液から単離し、ばらばらの状態もしくは一緒くたにして解析することが主流でした。これにはメリットも多く、近年の分子・細胞生物学の発展を牽引する要因ともなりましたが、その反面、生体組織内の状況を必ずしも反映していない結果を招きました。しかし、組織のありのままの様子を知ることはそう容易なことではありません。染色した組織切片の観察は現在でも重要な手法のひとつですが、組織を固定し薄片にしてから観察するため、その空間的な広がりや立体的な構造を把握することが容易ではなく、ましてや生きた状態を正確に知ることはできません。

ところが、最近の顕微鏡技術と蛍光観察手法の進歩はこの問題を克服し、今後さらに発展する勢いです。「蛍光イメージング」と呼ばれるこの技術は医学・生物学を含むさまざまな分野で用いられ<sup>2), 3)</sup>、2008年にノーベル賞を受賞した下村脩先生の緑色蛍光タンパク質 (GFP) の研究はその発展に大きく貢献しました。免疫学も例外ではなく、特に多光子 (二光子) 励起レーザー顕微鏡という特殊な顕微鏡により生きた組織の内部を直接観察する方法は、15年ほど前から世界中の研究室が競って取り入れ、これまでの「イメージ」をくつがえす多くの成果を挙げています<sup>4), 5)</sup>。まさに、生体組織を三次元空間 (x, y, z) に時間軸 (t) を加えた「四次元」で理解することが可能な技術といえます。本邦ではその導入がやや遅れていましたが、最近では多くの研究機関に多光子顕微鏡システムが設置され、私も前任地の関西医科大学

において生体イメージングに取り組む機会を得て、組織構造や微小環境という観点から興味深い知見を得ることができました。新潟大学医学部にもこの顕微鏡が導入されており、今後さらに研究を進展させようとして取り組んでいるところです。

### リンパ節の微細構造

ご承知のように、リンパ節は全身に張り巡らされたリンパ管網の要所に多数存在する小さな臓器で、骨髄や胸腺などの一次リンパ器官で作られた成熟リンパ球をはじめとするさまざまな免疫系細胞が集中し、免疫システムの前線基地として機能

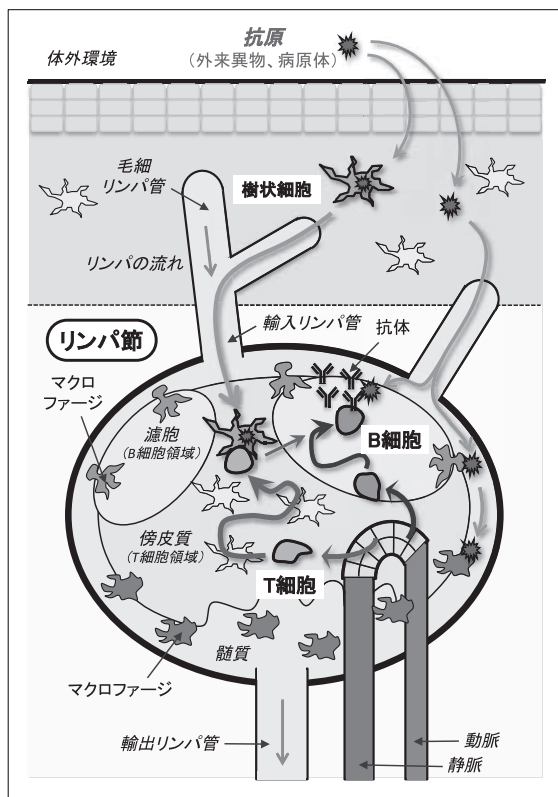


図1 リンパ節の構造と免疫系細胞の動き

T細胞やB細胞などのリンパ球は血液循環を介して頻りにリンパ節に入り込み、決められた組織区画内を活発に動きまわりながらしばらく駐留する。一方、外来異物や病原体（抗原）がからだに侵入すると樹状細胞がそれらを取込み、リンパ管を経由してリンパ節に移動する。そして、抗原の情報はT細胞に伝えられて活性化を誘導し、強力な免疫反応が開始される。B細胞も抗原に直接反応して活性化し、T細胞の補助を受けながら大量の抗体を産生する細胞に分化する。このように免疫応答の一連の過程には、免疫細胞のダイナミックな移動と適切な細胞間の情報伝達、組織微小環境が必要となる。

する二次リンパ器官です（図1）。リンパ液を濾過するフィルターであると同時に、運ばれてきた近隣組織の感染や異物侵入の情報を感知し、強力な免疫応答を誘導するためのセンサーとして働く精巧な装置といえます<sup>6)</sup>。哺乳類の進化過程において免疫系がより効果的に全身を監視する必要性から、組織液の回収システムに免疫器官を組込むという合理的な高次システムが発達した訳です。リンパ節の構造は大まかにリンパ球を中心とする免疫細胞が高密度に存在する皮質と、比較的細胞密度が低く血管とリンパ洞が複雑に入り込む髄質に分けられます。また、各種免疫細胞が種類ごとに分かれて存在する「組織区画」が見られ（図1）<sup>7)</sup>、機能的にも重要であると考えられますが、まだ解明されていないことが多い臓器でもあります。

免疫システムの重要な機能は、異物をすばやく排除するために標的親和性の高い抗体を大量に産生することと、過去に感染した病原体に対する長期的な記憶（免疫記憶）でしょう。リンパ節はこれらを誘導するために適した構造と環境が備わっていると考えられます。抗体を産生するB細胞（Bリンパ球）が集積する濾胞と免疫応答の際にその中に出現する胚中心は最も目立つ構造的特徴ですが、B細胞が活性化し高親和性抗体の産生細胞を選択的に増やすための重要な場となります<sup>8)</sup>。また、この反応には免疫系の司令塔であるT細胞（Tリンパ球）の助けが必要です。通常、濾胞とは別の傍皮質領域に集まっていますが、免疫応答のときには一部の特殊なT細胞が濾胞に入り込みます。リンパ球以外にもさまざまな免疫細胞が概ね決まった領域に配置されて異物侵入などの監視にあたり、それぞれが免疫応答を効率良く誘導するための役割を担っていると考えられます。

### 免疫現象のダイナミクス

近年、いくつもの細胞が多くの分子を介して情報交換（相互作用）を行うことで免疫応答が進行するということが明らかにされています。しかし、理解が進んでいる最中とはいえ、あまりにも多くの細胞や分子が関わる複雑な過程であるために研究者にとってもその全容を把握することは困難で、一般的にも免疫学が分かりにくいと言われる所以でもあります。もうひとつ、免疫系の理解を

難しくしているのが、基本的に免疫細胞がひとところに長く留まらず盛んに動きまわっているという事実です。血液循環を介して全身を巡っていることも、もちろん動いていることに違いはありませんが、これは血流に流されている状態で受動的な過程といえます。実は血管から出た(組織に入った)免疫細胞も組織中を活発に移動することが知られています<sup>9)</sup>。これは固定した組織切片では当然観察することができませんが、以前からさまざまな方法で予想されていました。しかし、文字通り目に見えるかたちでこれを白日のもとに曝したのが生体イメージング技術でした。特にリンパ節では高密度に存在するリンパ球のほとんどが同時に、しかもランダムに動きまわっているのです<sup>10)</sup>。これは研究者の予想をはるかに超える活動的なものでした。当教室のホームページでも観察結果を公開していますのでぜひご覧になって下さい<sup>11)</sup>。どのようにして活発に移動しながら複雑な情報交換をおこない、それが最終的に免疫応答として統合されていくのか、これこそが現在の免疫学における最もホットな領域のひとつであるといえます。

### リンパ節のストローマ細胞

免疫細胞が組織内を移動するためには何か足場になるものが必要であることは直感的に分かります。特に、動きまわる多くのリンパ球がひしめき合うリンパ節は、単なる袋ではなくしっかりとした組織の支えが必要です。また、動きながらもある領域に集まって存在し、必要に応じて異なる場所に移動するなど、細胞の局在をコントロールするメカニズムがありそうです。リンパ節ではストローマ細胞という非血球系の間質細胞がこれらに関与しており、細胞どうしが連結した緻密な網目構造を形成することで組織の骨組みとして免疫細胞の分布と区画構造を支えています<sup>7), 11)</sup>。

現在の私の中心的な研究テーマはこのストローマ細胞ですが、これに注目するきっかけは京都大学で助手をしていた頃に遡ります。マウス自己免疫性胃炎の解析を続ける過程でリンパ節から単離したリンパ球を培養する実験を頻繁に行っていましたが、そのとき使わなかった細胞を数週間放置することがしばしばありました。それらを捨てて

しまう前に念のため観察すると、培養皿の底に張り付いて広がる大きな細胞をよく目にしたのです。線維芽細胞のようにも見えるこの細胞は一体何だろうと思いつつも、あることを思い出していました。実は、学部の卒業研究でお世話になった理学部生物科・森和博先生の研究室では骨髄の造血系に関する研究を行っており、造血幹細胞が維持され、さまざまな血球系細胞に分化するためには骨髄中の間質細胞の働きが不可欠であることを繰り返し聞かされていたのです。造血系を陰で支えるストローマ細胞という言葉が頭に刷り込まれていました。また、骨髄由来のストローマ細胞を培養していたことから細胞の形や様子もよく知っており、リンパ球の培養で見られる付着性細胞はそれらにそっくりだったのです。自分はリンパ節のストローマ細胞を培養しているのかもしれないと思い文献をいろいろと調べましたが、当時ストローマ細胞という観点からリンパ節を研究した例はありませんでした。そんな中である一つの論文に目が止まります。Gretzらによるリンパ節の微細構造に関する総説でした<sup>12)</sup>。コラーゲンを主体とした線維束と細網線維芽細胞(FRC)(当時は単に細網細胞という呼び方が一般的でした)という間質細胞が作り出すネットワークについて詳しく書かれており、その内容に大変興奮したことを覚えています。その後、リンパ節細胞の長期培養からFRCの細胞株を樹立し、その詳細な解析からリンパ節ストローマ細胞の実態をはじめて明らかにしました<sup>13), 14)</sup>。この成果は二次リンパ器官のストローマ細胞が広く知られる契機となり、関連研究の火付け役になったのです。

これまでの研究から、リンパ節には区画ごとに性質の異なるストローマ細胞が存在しており、それぞれが違った種類のケモカインと呼ばれる液性因子を産生して免疫細胞を引き寄せていることが分かっています<sup>7), 15)</sup>。例えば、皮質最外層の濾胞には被膜の近傍に辺縁細網細胞(MRC)、中心部には濾胞樹状細胞(FDC)という2種類のストローマ細胞がネットワークを作っており、ケモカインCXCL13を産生することで、その受容体CXCR5を発現するB細胞や濾胞ヘルパーT細胞を引き寄せます<sup>15)-17)</sup>。一方、傍皮質では細網線維芽細胞(FRC/T領域細網細胞(TRC)とも呼ば

れる) が CCL19 や CCL21 を産生し、CCR7 を発現する T 細胞や樹状細胞を集めています<sup>13), 15), 18)</sup>。最近、濾胞/胚中心の T 細胞領域寄りに CXCL12 を産生する細網細胞 (CRC) が存在し、CXCR4 を介して胚中心 B 細胞の分化段階に応じた局在の違いを生み出していることが明らかにされました<sup>19)</sup>。また、ストローマ細胞は免疫系細胞の生存や増殖、機能に関わる分子も産生し、多面的に支援していると考えられます。しかし、その詳細に関してはいまだ十分には解明されておらず、今後の進展が待たれます。

### リンパ節の組織微小環境と免疫細胞動態

さて、2007年に関西医科大学に移ってからは多光子顕微鏡を用いた生体イメージングにより、リンパ節内のリンパ球移動とストローマ細胞の関連についての研究に取り組みました。特に、2002年に明らかにされた傍皮質でみられる非常に活発な T 細胞運動がどのような原理によるのかが大きな争点であり、その頃ちょうど FRC のネットワークに沿って T 細胞が移動しているという観察が報告されたことから、ストローマ細胞の機能的な関与に注目が集まりました<sup>20)</sup>。T 細胞は傍皮質において毎分平均 10 マイクロメートル以上の非常に速いスピードで移動しています<sup>10)</sup>。速いといっても顕微鏡下で実際に観察するとごくわずかずつ動いていくという印象ですが、他の細胞に比べれば極めて高速です。

私が所属していた分子遺伝学部門・木梨達雄先生の研究室では免疫細胞の接着分子であるインテグリンの機能調節が中心課題で、当初、T 細胞がストローマ細胞上を進むときにこの分子を使っているのではないかと予想していました。事実、ストローマ細胞にはその受け手となる分子が発現しています。おもに試験管内や外植リンパ節組織を用いた解析により、部分的ではありますが確かにインテグリンがこの過程に関与するという結果を得ていました。ところが、2008年に Alon のグループがリンパ節内の T 細胞遊走 (移動) にインテグリンはほとんど寄与していないという趣旨の論文を発表しました<sup>21)</sup>。これは私たちの観察結果と異なる結論であったため、しばらくはその原因を探る作業が続きました。結局、解釈の違いや彼ら

が用いた遺伝子変異マウスの潜在的な問題などもあり、現在では後に私たちが報告した「インテグリンは T 細胞の高速移動に必要である」という考え方がある程度受け入れられています<sup>22)</sup>。一方、ストローマ細胞がインテグリンを介した移動の足場となるのかに関しても紆余曲折がありました。私たちは当然そう予想して研究を進めていたのですが、どうもそうではなく、実は傍皮質に多数存在する樹状細胞がその役割を担っていることが明らかになりました<sup>22), 23)</sup>。ストローマ細胞はむしろ樹状細胞の足場となり、またケモカインや最近明らかになったある種の脂質を産生することで T 細胞の運動を促進しているようです<sup>23), 24)</sup>。

周辺組織からリンパ管を介して異物 (抗原) 情報を運ぶのも樹状細胞の役割であり、リンパ節傍皮質に到達した後に T 細胞にそれを伝え、強力な免疫応答が開始されます<sup>6)</sup>。しかし、実際に抗原情報を提示している樹状細胞は全体のごく一部です。しかもそれに反応する T 細胞は数十万から数百万個に一個という極めて低い頻度でしか存在しません<sup>25)</sup>。それでも通常、免疫応答は効率良く誘導されます。傍皮質に T 細胞と樹状細胞が集められ T 細胞が高速でランダムに動きまわる理由は、この数少ない出会いのチャンスを可能な限り高めるための戦略であると考えられます。ストローマ細胞はこれに一役買っているという訳です。

### おわりに

このように免疫器官の中では詳しく調べれば調べるほど、動的でイメージしにくいことがたくさん起きていることが分かります。炎症の現場ではさらに複雑な状況にあると考えられます。蛍光イメージングはそうしたことに切り込む際の強力なツールです。まだまだ限界はありますが、今後も技術は確実に進歩していくでしょう。これは基礎研究に限ったことではありません。新たな先進イメージング技術が開発されて臨床の現場にも取り入れられれば、いままで見ることができなかったものが可視化され、病態の正確な判断に役立つかもしれません。詳細なイメージ情報を積極的に治療に活かすことができるようになるはずです。検査の数値結果だけでなく、組織環境という具体的なイメージから病変部位をより深く理解していく

ことが大切になるのではないのでしょうか。

この原稿を執筆中に、ちょうど本学医学部にある多光子顕微鏡を用いた生体イメージングの観察系が動き始めました。今後このシステムを大いに活用し、また新技術も取り入れながら組織微小環境内で繰り広げられる動的な生命現象をより細かく鮮明に (vivid に) 捉え、新たなイメージを描き出していきたいと思っています。

## 文献

- 1) Katakai T, Shimizu A: Undesired meeting of lymphocytes: organ-specific infiltration and the organization of ectopic lymphoid tissue in a murine experimental autoimmune gastritis. *Immunol Lett* 2008; 118: 103-109.
- 2) Blow N: New way to see a smaller world. *Nature* 2008; 456: 825-828.
- 3) Cahalan MD, Parker I, Wei SH, et al: Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 872-880.
- 4) Germain RN, Miller MJ, Dustin ML, et al: Dynamic imaging of the immune system: progress, pitfalls and promise. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 497-507.
- 5) Bajenoff M, Germain RN: Seeing is believing: a focus on the contribution of microscopic imaging to our understanding of immune system function. *Eur J Immunol* 2007; 37 suppl 1: S18-33.
- 6) Matsuno K, Ueta H, Shu Z, et al: The microstructure of secondary lymphoid organs that support immune cell trafficking. *Arch Histol Cytol* 2010; 73: 1-21.
- 7) Muller SN, Germain R: Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 618-629.
- 8) McHeyer-Williams M, Okitsu S, Wang N, et al: Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 24-34.
- 9) Weninger W, Biro M, Jain R: Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 232-246.
- 10) Miller MJ, Wei SH, Parker I, et al: Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 2002; 296: 1869-1873.
- 11) 新潟大学大学院医歯学総合研究科. “免疫・医動物学分野”. 〈[www.med.niigata-u.ac.jp/zoo/welcome.html](http://www.med.niigata-u.ac.jp/zoo/welcome.html)〉. (閲覧2014年11月25日)
- 12) Gretz JE, Anderson AO, Shaw S: Cords, channels, corridors and conduits : critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. *Immunol Rev* 1997; 156: 11-24.
- 13) Katakai T, Hara T, Lee JH, et al: A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interaction among dendritic cells, T cells and B cells. *Int Immunol* 2004; 16: 1133-1142.
- 14) Katakai T, Hara T, Sugai M, et al: Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J Exp Med* 2004; 200: 783-795.
- 15) Cyster JG: Chemokine and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999; 286: 2098-2102.
- 16) Katakai T: Marginal reticular cells: a stromal subset directly descended from the lymphoid tissue organizer. *Front Immunol* 2012; 3: Article 200.
- 17) Heesters BA, Myers RC, Carroll MC: Follicular dendritic cells : dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 495-504.
- 18) Luther SA, Tang HL, Hyman PL: Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12694-12699.
- 19) Bannard O, Hoeton RM, Allen CD, et al: Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed

- program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity* 2013; 39: 912-924.
- 20) Bajenoff M, Egen JG, Koo LY, et al: Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* 2006; 25: 989-1001.
- 21) Woolf E, Grigorova I, Sagiv A, et al: Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nat Immunol* 2007; 8: 1076-1085.
- 22) Katakai T, Habiro K, Kinashi T: Dendritic cells regulate high-speed interstitial T cell migration in the lymph node via LFA-1/ICAM-1. *J Immunol* 2013; 191: 1188-1199.
- 23) 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* 2014; 33: 602-608.
- 24) Katakai T, Kondo N, Ueda Y, et al: Autotaxin produced by stromal cells promotes LFA-1-independent and Rho-dependent interstitial T cell motility in the lymph node paracortex. *J Immunol* 2014; 193: 617-626.
- 25) Bajenoff M, Egen JG, Qi H, et al: Highways, byways and breadcrumbs: directing lymphocyte traffic in the lymph node. *Trends Immunol* 2007; 28: 346-352.

### お詫びと訂正

前月号の「学術・綜説」欄の参考文献に記載漏れがありました。  
お詫び申し上げますとともに、下記のとおり訂正いたします。

#### 記

#### 文献

- 15) Watanabe H, Chopra N, Laver D, et al: Flecainide prevents catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in mice and humans. *Nat Med* 2009; 15: 380-383.