

リンパ節における T リンパ球の動態制御機構

片 貝 智 哉

新潟大学大学院医歯学総合研究科

免疫・医動物学分野

Regulatory Mechanism of T - lymphocyte Migration in Lymph Node

Tomoya KATAKAI

*Department of Immunology Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences*

要 旨

獲得免疫応答の中核として機能するリンパ節において、T リンパ球は傍皮質領域に集積し、毎分平均 $10\mu\text{m}$ 以上という非常に速い速度で活発に遊走している。この現象は、末梢組織からリンパ管経由で移動してきた樹状細胞が提示する抗原を効率良く探索し、効果的な免疫応答を誘導するために必要であると推測される。近年の多光子励起レーザー顕微鏡を用いた生体イメージングによりそのメカニズムに関する解析が進み、特に樹状細胞やストローマ細胞などの組織微小環境を構成する細胞の役割が重要であることが明らかになりつつある。本稿では、筆者らによる最新の成果を中心にリンパ節内における T 細胞高速間質遊走の分子機構を概説する。

キーワード：インテグリン、ケモカイン、樹状細胞、ストローマ細胞、リンパ節、T 細胞

はじめに

リンパ管網の要所に配置されたリンパ節はリンパ球を中心とした免疫細胞が多数集積し、リンパ管を介して末梢組織の情報を効果的に収集することにより外来異物に対する免疫応答を効率良く誘導するための精密な監視装置である¹⁾。末

梢組織において外来抗原を取込んだ樹状細胞はリンパ管を経由してリンパ節に到達し、さらに T 細胞が集積する傍皮質領域に進入して抗原を提示することで一連の獲得免疫応答が開始される。このため傍皮質は抗原提示細胞と T 細胞を集中させ、接触のチャンスを高めるための重要な領域であるといえる。リンパ球はリンパ節内において活発に

Reprint requests to: Tomoya KATAKAI
Department of Immunology,
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences,
1 - 757 Asahimachi - dori, Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510, Japan.

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学医歯学総合研究科
免疫・医動物学分野

片貝智哉

移動しているが、特にT細胞は非常に速いスピードで傍皮質内を動き回り、短時間に多くの樹状細胞に接触して抗原を探索する。一般的に、抗原特異的T細胞の存在頻度は極めて低いが、それにもかかわらず効率良く免疫応答が誘導される理由はここにあると考えられる。しかし、どのようなメカニズムでこの高速移動が可能になっているのかは最近まで明らかにされていなかった。

リンパ節傍皮質の高速 T 細胞遊走と インテグリンの関与に関する問題

近年、多光子励起レーザー顕微鏡を用いたマウスのリンパ節生体観察によりリンパ球が組織間質内で非常に活発に遊走していることが明らかになった²⁾。傍皮質に集積するT細胞は毎分平均10 μm 以上でランダムに移動していることが知られているが、当初からこの運動にはケモカインなどの遊走刺激因子の関与が想定されていた³⁾。ケモカインはよく知られた濃度勾配による方向性のある動き(ケモタキシス)ばかりでなく、均一な濃度におけるランダムな遊走(ケモキネシス)を促進する活性がある⁴⁾。実際にGai共役型ケモカイン受容体のシグナルを阻害する百日咳毒素はリンパ節内のT細胞遊走をある程度(速度にして~50%ほど)阻害する⁵⁾⁶⁾。リンパ節傍皮質で産生されるケモカインCCL19およびCCL21は、その受容体CCR7を発現するT細胞の血中からリンパ節へのホーミングや傍皮質への局在に関与することが知られていたが、CCL19/21欠損マウスのリンパ節内における野生型T細胞の遊走および野生型リンパ節内のCCR7欠損T細胞の遊走はいずれも部分的(20~35%)に低下することから、限定的ではあるがT細胞遊走におけるこれらの分子の関与が示された⁵⁾⁶⁾。

一方、リンパ球のホーミングやin vitroの遊走過程に大きな役割を担う接着分子であるインテグリンLFA-1はケモカインのシグナルにより活性化することが知られていたため⁷⁾、間質遊走への関与が予想された。しかし、初期のLFA-1欠損T細胞を用いたリンパ節内の観察では、わずかな

速度低下(15%以下)しか認められず、T細胞の間質遊走に対するLFA-1の寄与はほとんどないと結論された⁸⁾。特に、固層化ケモカインがリンパ球のインテグリンを介した強力な接着は誘導せず、遊走のみ誘導することが示されたほか⁸⁾、ほぼ全てのインテグリンを欠損させた樹状細胞がリンパ節へ問題なく移動できることが明らかになり⁹⁾、組織間質内の白血球/リンパ球遊走にインテグリンは必要ないという認識が広まった。

リンパ節傍皮質は細網線維芽細胞(FRC)と呼ばれる非血球系のストローマ細胞がつくる緻密なネットワークに支えられている¹⁰⁾⁻¹²⁾。Bajenoffらはストローマ細胞を緑色蛍光タンパク(GFP)により可視化したリンパ節内のT細胞遊走を観察し、その多くがストローマ細胞に沿って移動していることを報告した¹³⁾。このため当初は、T細胞がストローマ細胞と直接接触し、それを足掛かりとして移動すると考えられ、一見ランダムに見える移動様式は細かく分岐したネットワークに沿って確率論的に進むためであると解釈された。この場合、T細胞はストローマ細胞表面に接着しながら移動していることになる。しかし、リンパ球の接着に重要なLFA-1の関与は否定されていたことから⁸⁾、その接着機構についての議論が紛糾した。またこの前後に、白血球遊走はin vitroの二次元的な状況では細胞接着に大きく依存するが、三次元的に圧迫された環境においてはアメーバ様の細胞運動様式による接着非依存的な移動が可能であるという説が出され⁴⁾¹⁴⁾、T細胞の間質遊走にもこの考えが適応されるようになった。

リンパ節のFRCはCCL21やLFA-1のリガンドであるICAM-1を発現している¹¹⁾¹²⁾。我々は以前からT細胞高速遊走におけるストローマ細胞の関与を想定し、リンパ節から単離した初代ストローマ単層培養を用いてin vitro遊走観察系を構築していた¹⁵⁾。初代培養により増殖したストローマ細胞はCCL19/21の産生能は消失するが、CCL21の添加によりT細胞の活発な遊走が再現できた。また、このストローマ細胞はICAM-1の発現を維持し、遊走過程がLFA-1/ICAM-1に依存することも明らかになった。このことから我々

は、実際のリンパ節内の間質遊走に LFA-1 は必要ないという結論に疑問を持ち、これをさらに追究することにした。また、二次元/三次元環境における移動様式の違いに関しても、リンパ節間質は細胞外マトリクスなどで満たされている訳ではなく、移動する細胞どうしが密集しながら接触しているため状況は大きく異なると考えた。強い接着は細胞移動の速度を低下させるか、または止めてしまうと予想されるが、足場に対する一過性で弱い接着は細胞が前進するための適度な静止摩擦力となり、むしろ移動効率を高める作用があると推測される。シグナルにより瞬時に接着活性が変化するインテグリンは、このような過程に最適な調節因子であると考えられた⁷⁾。

リンパ節組織スライスを用いた生体観察と T 細胞遊走における LFA-1/ICAM-1 の寄与

LFA-1 欠損マウスの T 細胞は一見正常に分化し、効率は低下するものの、血中からリンパ節へ移行することができる¹⁶⁾¹⁷⁾。しかし、この T 細胞は LFA-1 が不在状況下で分化した細胞であることから、正常細胞とは異なり LFA-1 がなくてもある程度移動する能力をもったものが選択されている可能性がある。はじめから LFA-1 を発現しない T 細胞が LFA-1 非依存的に移動できるからといって、正常 T 細胞が動くときに LFA-1 が必要ないとは言いきれない。こうした問題から、我々は正常リンパ球の機能を組織内で急性阻害できるリンパ節組織スライス法による観察系を構築した¹⁸⁾。マウスから取り出したリンパ節の上部を振動マイクロームにより切断し皮質領域を露出させ、切断面から T 細胞を進入させると同時に阻害剤などを加えて灌流下で観察を行なう。抗体や薬剤の組織への浸透が迅速で急性阻害が容易なうえ、マウス個体への細胞移入実験で問題となるリンパ節へのホーミング阻害によるバイアスを排除できる。我々はまず、抗体による LFA-1 の阻害を試み、T 細胞の遊走速度が再現性よく 30 ~ 40% ほど減弱することを観察した。特に 10 μ m/分以上の速度を示す分画が激減するとともに、運

動方向の角度変化が全体的に上昇した。また、ICAM-1 欠損マウス由来のリンパ節における正常 T 細胞の遊走も同様の速度低下を示しことから、LFA-1/ICAM-1 を介した接着機構がこれまで考えられていた以上にリンパ節内の間質遊走に寄与し、高速で比較的直線的な運動に重要であることを強く示唆する結果となった。

LFA-1 依存的な T 細胞遊走の足場となる ICAM-1 産生細胞

当初は我々も T 細胞が LFA-1 を使ってストローマ細胞表面の ICAM-1 に接着し、ネットワークを足場として移動すると予想していた。リンパ節内のストローマ細胞は高い ICAM-1 発現を示し、十分に接着の足場になると考えられたからである¹⁸⁾。リンパ球自体やマクロファージの ICAM-1 発現は比較的低く、一部の内皮細胞が高発現するものの、傍皮質内の T 細胞遊走に因与するとは考えにくい。しかし、樹状細胞はストローマ細胞以上に ICAM-1 を高発現していることが明らかになった。リンパ節の傍皮質には多数の樹状細胞が存在し、互いに樹状突起を伸ばすことでストローマ細胞とは別のネットワークと呼べる状況をつくり出している。そこで、ストローマ細胞と樹状細胞、どちらの ICAM-1 が重要かを検討するために、野生型と ICAM-1 欠損マウスを用いた骨髄キメラを作製し、リンパ節における T 細胞遊走を観察した。これらのキメラマウスでは血球系細胞もしくは放射線抵抗性の組織細胞がそれぞれ ICAM-1 を欠損する状況となっている。その結果、ICAM-1 欠損マウス骨髄を正常マウスに移植した場合に T 細胞遊走が顕著に低下し、その逆では全く変化を認めなかった。すなわち、血球系細胞の ICAM-1 発現が重要で、ストローマ細胞を含む組織細胞の ICAM-1 は必要ないということになる。さらに、Rag2 欠損マウスと ICAM-1 欠損マウスの骨髄を 4 : 1 で混合し ICAM-1 欠損マウスに移植することで、ICAM-1 欠損組織環境においてリンパ球は全て ICAM-1 を欠損し、骨髄球の大部分（理論的には 4/5）が ICAM-1

を発現するキメラを作成した。この環境下ではT細胞は正常な遊走能を示し、骨髄球が発現するICAM-1だけで通常速度のT細胞遊走を維持すること可能で、ストローマ細胞に加えリンパ球のICAM-1発現も必要ないことが明らかになった。傍皮質に存在する骨髄球はほとんどが樹状細胞であることから、樹状細胞表面のICAM-1がT細胞のLFA-1依存的な遊走を支持していると考えられる。

樹状細胞がEYFPを発現するトランスジェニックマウスのリンパ節を用いた観察から、大部分のT細胞が樹状細胞に接触しながら移動していることがわかる¹⁸⁾。組織切片の観察から、樹状細胞の細胞表面積はストローマ細胞に比べて大きいと見積もられたほか、ストローマ細胞表面のかなりの部分が多数存在する樹状細胞に覆われていることから露出する部分はそれほど多くないと考えられ、傍皮質内を移動するT細胞は樹状細胞に接触する機会の方が圧倒的に多いと予想される。樹状細胞はCCL21を発現していないが、表面糖鎖を介してCCL21を結合することが知られている。実際に、傍皮質の樹状細胞表面にはCCL21が検出され、ICAM-1との共局在が確認された。したがって、T細胞は樹状細胞に接触することでケモカインからのシグナルを受け取り、さらにLFA-1を使って樹状細胞上のICAM-1へ接着する一連の過程が想像される。また、樹状細胞単独でLFA-1依存的なT細胞遊走を実際に支持できるのかを検証する目的で、単離した樹状細胞を用いて*in vitro*でケモカイン依存的なT細胞の移動過程を観察した結果、抗ICAM-1抗体処理やICAM-1欠損樹状細胞を用いた場合に明らかに速度が低下した。したがって、樹状細胞が実際にLFA-1/ICAM-1を介してT細胞の移動を支持することが明らかになった。

ケモカイン、LFA-1/ICAM-1非依存的な 遊走刺激過程

リンパ節傍皮質におけるT細胞の高速遊走にストローマ細胞が産生するケモカインや樹状細胞

のICAM-1を介したLFA-1依存的な接着が関与することは明確になった(図1)。しかし、これらを阻害してもT細胞は停止せずかなりの運動能を残している。これが何に依存するのかは依然として不明であった。我々は、ストローマ細胞が産生する何らかの未同定分子がこれに関与している可能性を想定し、ストローマ細胞に発現する遺伝子についてマイクロアレイによる網羅的な検索を行っていたが、その過程でAutotaxin(ATX)がストローマ細胞に高発現することを見出した¹⁵⁾。ATXは脂質メディエーターであるリゾフォスファチジン酸(LPA)を産生する分泌型酵素で、LPAを介して様々な細胞の運動に関与することが知られていた。フローサイトメトリーを用いた解析からは傍皮質ストローマ細胞がケモカインCCL21とともにATXを細胞表面に提示していることが明らかになった。そこで、T細胞遊走への関与を確認するためにリンパ節スライス観察系にATX阻害剤S32826を加えたところ、有意な速度低下を認めた。また、LPA受容体の阻害剤Ki16425もほぼ同等の阻害効果を認めたことから、ATX/LPA経路がリンパ節内のT細胞遊走に関与することが明らかとなった。次にLPAシグナルとG α iシグナルの関係を調べるために、百日咳毒素を処理したT細胞をリンパ節スライスに入れ、同時にLPA受容体やATX阻害剤を添加すると、百日咳毒素単独と比較してさらに速度が低下したことから、T細胞遊走におけるLPAシグナルはG α i非依存的であることが示唆された。さらに、LFA-1との関係を検討するために抗LFA-1抗体とATX/LPA阻害剤を組み合わせて添加すると、LFA-1阻害により低下した遊走能が阻害剤によりさらに減弱し、ATX/LPA経路がLFA-1非依存的な運動を担っていることがわかった。

LPA受容体からのシグナルは低分子量Gタンパク質Rhoを活性化することが知られており、実際にT細胞でもLPAによりGTP結合型の活性化型Rhoが増加することが確認された¹⁵⁾。また、ケモカインCCL21もRhoの活性化を誘導するが、興味深いことにCCL21とLPAの同時刺激によりRho活性化がさらに増強され、協調効果があるこ

とが明らかになった。Rho 活性化を阻害する C3 毒素処理によりリンパ節内の T 細胞遊走は大きく低下し、Rho 活性化がこの過程に重要であることは明らかである。特に Rho 阻害は運動中の T 細胞体後方の収縮を抑え、細胞の前進を抑制している状況が観察された。Rho シグナルの下流ではキナーゼ ROCK の活性化および非筋型ミオシン II のリン酸化に続く細胞収縮の誘導が知られているが、ROCK および非筋型ミオシン II の阻害により組織内遊走が減弱し、しかも LFA-1 阻害による遊走低下をさらに抑制してほとんど動きが見られなくなった。したがって、Rho-ROCK-ミオシン II 経路は LFA-1 非依存的な運動を担っていると考えられる。

おわりに

以上のことから、ストローマ細胞や樹状細胞が作り出す特異な組織微小環境と、そこから供給される複数のシグナル、および T 細胞の独特な運動様式が協調して働くことによりリンパ節間質の高速遊走が成立していると考えられる (図 1)¹⁾¹⁹⁾。このように極めて動的で複雑な組織システムが高次免疫機能の基盤となっている訳だが、その分子機構は未だ不明な点が多く残されており、今後さらに解析を進めていく必要がある。

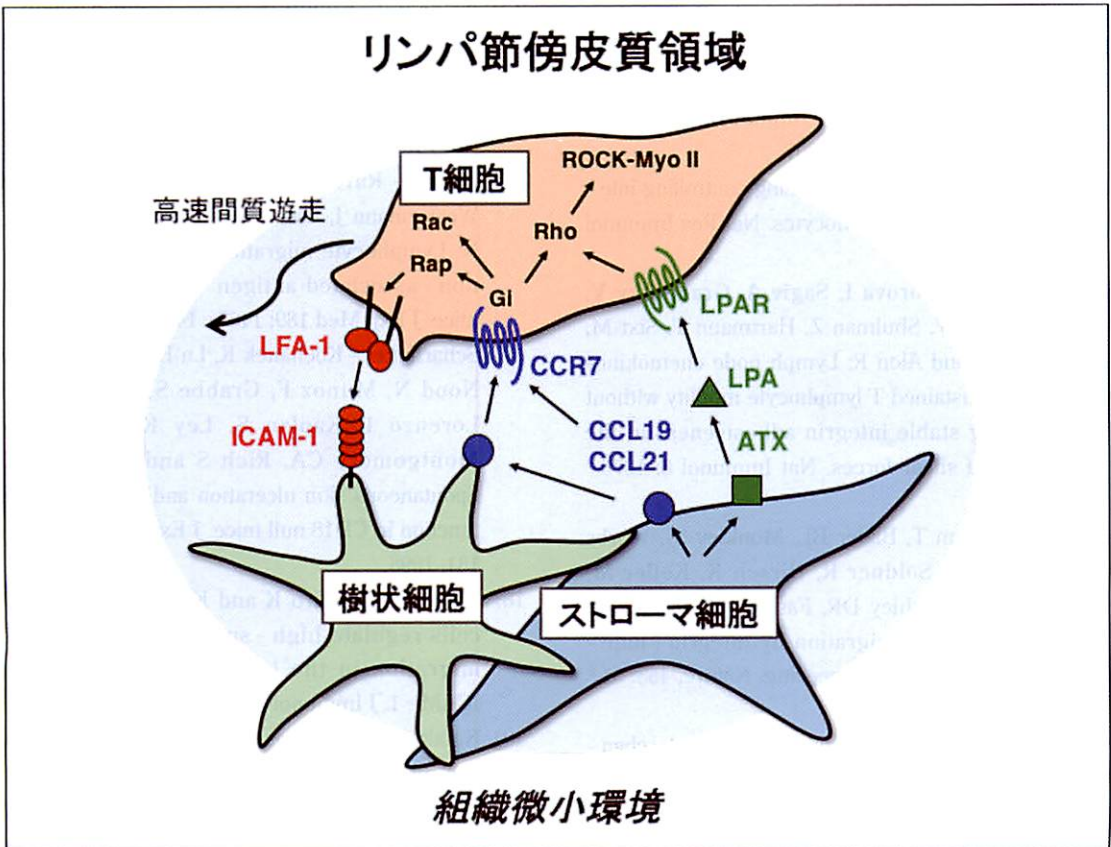


図 1 リンパ節傍皮質における T 細胞の高速間質遊走の分子機構

参考文献

- 1) 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: 602 - 608, 2014.
- 2) Miller MJ, Wei SH, Parker I and Cahalan MD: Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 296: 1869 - 1873, 2002.
- 3) Cyster JG: Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286: 2098 - 2102, 1999.
- 4) Friedl P and Weigelin B: Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol* 9: 960 - 969, 2008.
- 5) Okada T and Cyster JG: CC chemokine receptor 7 contributes to Gi-dependent T cell motility in the lymph node. *J Immunol* 178: 2973 - 2978, 2007.
- 6) Worbs T and Mempel TR, Bölter J, von Andrian UH and Förster R: CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 204: 489 - 495, 2007.
- 7) Kinashi T: Intracellular signaling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 5: 546 - 559, 2005.
- 8) Woolf E, Grigorova I, Sagiv A, Grabovsky V, Feigelson SW, Shulman Z, Hartmann T, Sixt M, Cyster JG and Alon R: Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nat Immunol* 8: 1076 - 1085, 2007.
- 9) Lämmermann T, Bader BL, Monkley SJ, Worbs T, Wedlich - Söldner R, Hirsch K, Keller M, Förster R, Critchley DR, Fässler R and Sixt M: Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*, 453: 51 - 55, 2008.
- 10) Gretz JE, Anderson AO and Shaw S: Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. *Immunol Rev* 156: 11 - 24, 1997.
- 11) Katakai T, Hara T, Sugai M and Shimizu A: A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Int Immunol* 16: 1133 - 1142, 2004.
- 12) Katakai T, Hara T, Sugai M and Shimizu A: Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J Exp Med* 200: 783 - 795, 2004.
- 13) Bajénoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N and Germain RN: Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph node. *Immunity* 25: 989 - 1001, 2006.
- 14) Lämmermann T and Sixt M: Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 21: 636 - 644, 2009.
- 15) 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.
- 16) Berlin - Rufenach C, Otto F, Mathies M, Westermann J, Owen MJ, Hamann A and Hogg N: Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice. *J Exp Med* 189: 1467 - 1478, 1999.
- 17) Scharffetter - Kochanek K, Lu H, Norman K, van Nood N, Munoz F, Grabbe S, McArthur M, Lorenzo I, Kaplan S, Ley K, Smith CW, Montgomery CA, Rich S and Beaudet AL: Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med* 188: 119 - 131, 1998.
- 18) Katakai T, Habiro K and Kinashi T: Dendritic cells regulate high-speed interstitial T cell migration in the lymph node via LFA-1/ICAM-1. *J Immunol* 191: 1188 - 1199, 2013.
- 19) Katakai T and Kinashi T: Microenvironmental control of high-speed interstitial T cell migration in the lymph node. *Front Immunol* 7: Article 194, 2016.