

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08437

研究課題名(和文)炎症性腸疾患発症/持続/寛解/再燃時における腸炎惹起性メモリーT細胞動態の可視化

研究課題名(英文)Visualization of the dynamics of colitogenic memory T cells in vivo

研究代表者

岡田 英理子 (Okada, Eriko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：20376784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患は寛解と再燃を繰り返す難治性の疾患であり未だ根治療法は存在しない。我々はこれまでに研究において、本疾患の難治性の原因は寛解時においても半永久的に維持される疾患記憶T細胞であることを報告している。一方で腸管局所および二次リンパ組織における、本細胞の維持機構には未だ不明な点が多く残されており、その解明が求められている。

今回我々は、腸炎モデルマウスの大腸および二次リンパ組織におけるT細胞動態の可視化、すなわちin vivo live imaging技術を確立した。これは世界初の生体マウスの大腸粘膜におけるin vivo live imagingであり、今後の研究での利用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究において、我々は世界で初めて慢性大腸炎モデルマウスの大腸粘膜およびリンパ組織におけるメモリーT細胞動態の可視化に成功した。本システムは今後のIBD研究のみならず、様々な大腸疾患の研究において有用なツールとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory bowel disease (IBD) is characterized by an intractable intestinal inflammation and patients usually need life-long maintenance treatment to prevent their recurrence. In a series of previous studies, we have clarified that colitogenic memory T cells, which survive even in a remission stage, play important roles for the intractability of IBD and they are ultimate target for the radical treatment of IBD without any maintenance treatment. On the other hand, the maintenance system of colitogenic memory T cells are not completely clarified yet. In this study, we have established in vivo live imaging systems to visualize the dynamics of colitogenic memory T cells in the intestinal mucosa and their reservoir organs for the first time. This system will be useful tool to clarify the pathogenesis of IBD and to develop next-generation treatment for IBD targeting colitogenic memory T cells.

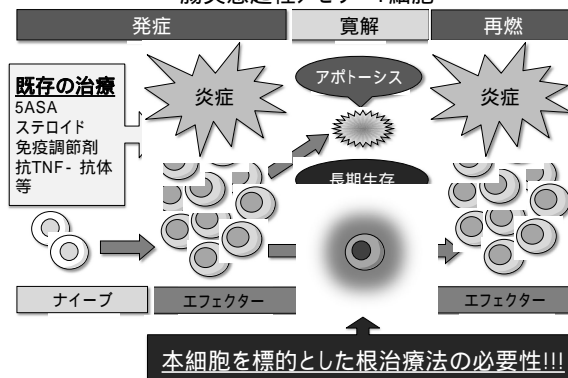
研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 メモリーT細胞 in vivo live imaging

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は再燃、寛解を繰り返す難治性炎症性疾患であり、現在のところ根治療法はなく、生涯にわたる治療の継続を必要とする。主に若年者に発症する事もあり、高額な分子標的薬、生物製剤などによる維持療法が不要な根治療法の開発は、医学的、社会的、医療経済的にも急務である。2001年から2013年までの研究によって我々は炎症性腸疾患難治性の要因は、疾患フェノタイプを記憶した腸炎惹起性メモリーT細胞であることを突き止めた (Nemoto Y et al. *J Immunol* 2009, *J Immunol* 2013)。既存の治療法は主にマクロファージやエフェクターT細胞などを標的としたものであり、このような治療の結果、炎症が抑制され、寛解に至っても腸管粘膜局所および所属リンパ節などの二次リンパ装置、更には骨髄においてメモリーT細胞は残存し、再燃時には速やかにエフェクターT細胞へ分化し、炎症を惹起する事になる。疾患記憶をリセットする究極の根治療法のためには本細胞維持機構の解明が必要である (図1)。

図1: 炎症性腸疾患根治療法の究極の治療標的
-腸炎惹起性メモリーT細胞



2007年から2013年までの研究において、我々は二次リンパ装置における IL-7 産生細胞が腸炎惹起性メモリーT細胞の維持に重要であると証明して来た (Nemoto Y et al, *Gut* 2013, *Gastroenterology* 2011, *Gastroenterology* 2007)。一方で、メモリーT細胞の維持機構においては未だ謎が多く、特にこれらの IL-7 産生細胞、抗原提示細胞、更に免疫を負に制御する制御性T細胞 (Treg) と腸炎惹起性メモリーT細胞の位置関係、cell to cell contact を介した相互作用などは依然として不明である。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患発症、再燃、寛解時の腸管粘膜、リンパ節における腸炎惹起性メモリーT細胞の時間的空間的分布、速度、および細胞間相互作用を多光子顕微鏡による in vivo live imaging 技術を用いて可視化する。

3. 研究の方法

(1)、腸管および GALT における in vivo live imaging の樹立

T細胞特異的に緑色の蛍光を発現する DPE-GFP マウスを用いて、小腸、腸管膜リンパ節、パイエル板、大腸の in vivo live imaging システムを樹立した。マウスを麻酔後、Hoechst を静脈内投与し、細胞核を青く標識した。マウスを特注の保温/固定装置に固定し、腹部を切開した後、腸間膜血管の血液灌流に注意しつつ、臓器を露出した。出血箇所は圧迫または電気メスで適宜止血したのちに in vivo live imaging を行った。

(2)、腸炎モデルマウスの作成

腸炎モデルマウスとしては、我々が腸炎惹起性メモリーT細胞に関する一連の研究で使用した T細胞移入型腸炎モデルを使用した。これは naïve T細胞分画である CD4⁺CD45RB^{high} T細胞を、T細胞と B細胞の存在しない RAG2^{-/-}マウスに移入することにより、腸内細菌抗原依存的に大腸炎を発症するものである。このモデルマウスの大腸粘膜における CD4⁺ T細胞は、他個体に移入すると腸内細菌抗原依存的に炎症を惹起つまり再燃を起こすメモリーT細胞である。また本モデルマウスに制御性T細胞 (Treg) の分画である CD4⁺CD25⁺ T細胞を供移入することで、腸炎が抑制されることが報告されており、今回はこの供移入群を Control とした。

In vivo live imaging での可視化のために、全身の細胞に緑色の蛍光色素を有する GFP マウスをドナーに用いた。

GFP マウス脾臓よりリンパ球を単離し、CD4⁺CD45RB^{high} T細胞をフローサイトメーターによって分取し、3x10⁵の細胞を RAG-2^{-/-}マウスに腹腔内投与した。

コントロール群として 3x10⁵の GFP 由来 CD4⁺CD45RB^{high} T細胞と 3x10⁵の WT 由来 CD4⁺CD25⁺T細胞移入群を作成した。

両群ともに、T細胞を移入してから1週間に3回体重を記録し、腸炎発症の指標とした。2光子顕微鏡による観察実験は移入後6週から8週の間に行った。

(3)、腸炎惹起性メモリーT細胞の In vivo live imaging

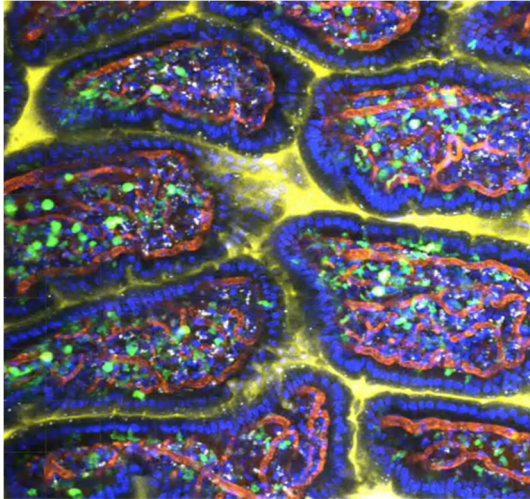
(1)で樹立したメソッドを用いて、腸炎マウスの in vivo live imaging を行った。

T細胞の動態解析はImarisを用いて行い、speed、track length、track displacement lengthを解析した。

4. 研究成果

腸管 Imaging の樹立 (血管を含む)

腸炎マウスに先立ち、当研究室に新たに導入した2光子蛍光顕微鏡(Nikon, A1RMP)を用いて、DPE-GFPマウス(全てのT細胞にGFPが発現するマウス)で小腸および大腸のIn vivo live-imaging法を樹立した。麻酔下のマウスにHoechst33342およびデキストラン-Alexa Flour 546を静注後、腹部を除毛、1cmの小切開を作成し、小腸あるいは大腸を露出、保温可能な特製ステージ上に固定し、腸管に小切開を加え、管腔側にデキストラン Alexa Flour 594を滴下、管腔側からカバーガラスを被せて2光子蛍光顕微鏡で観察する方法を樹立した。875nmで励起する事によって1本のレーザーで4色を励起し、4色の同時観察が可能となった(下図)。

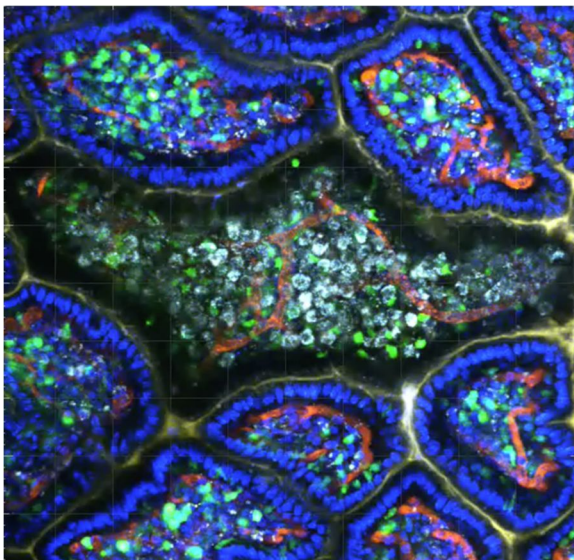


マウス小腸の Imaging

緑：GFP: T細胞
赤：血管
黄色：腸管腔
青：ヘキスト：細胞核

GALT Imaging の樹立

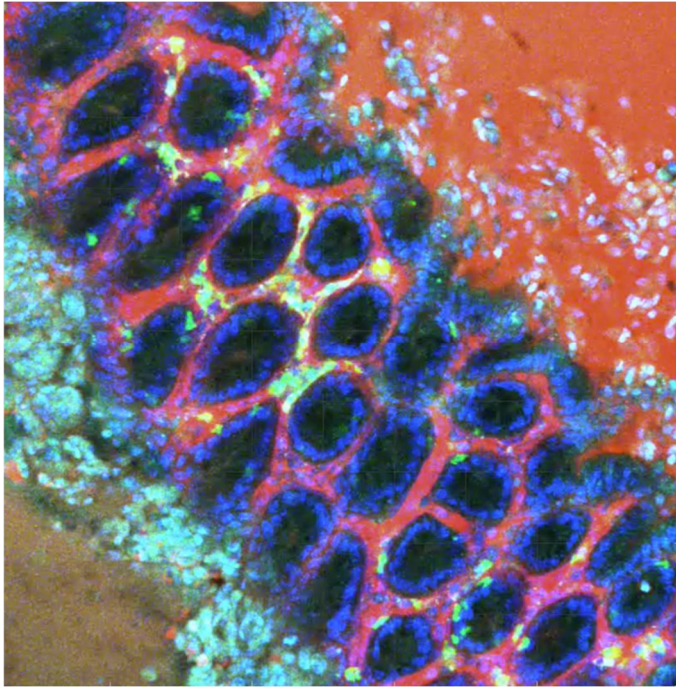
腸炎マウスの観察し先立ち、と同様におよびパイエル板、腸間膜リンパ節のIn vivo live-imaging法樹立を試みた。とほぼ同様の方法で、マウスパイエル板を特製ステージに固定し、2光子蛍光顕微鏡で観察を行った。



マウスパイエル板：管腔側
緑：T細胞、赤：血管、青：

大腸粘膜 Imaging の樹立

と同様の方法を用いてDPE-GFPマウスの大腸のIn vivo live-imagingの樹立に成功した(下図)。



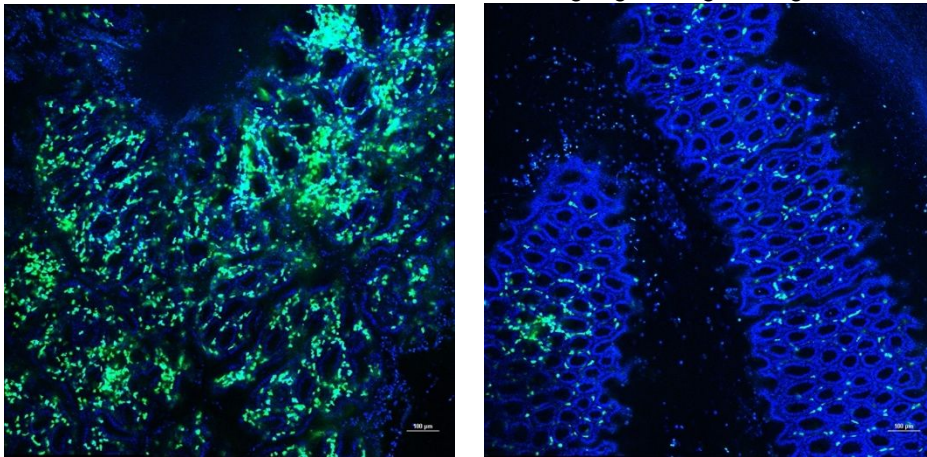
DSS 腸炎大腸 Imaging

緑：T 細胞
 赤：腸管腔
 青：細胞核

腸炎モデルマウス Imaging の樹立

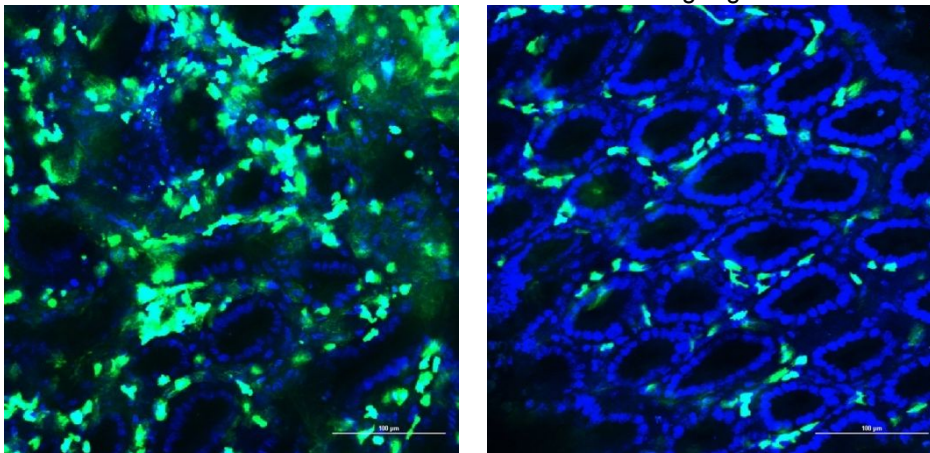
- で樹立した in vivo live imaging システムを用いて、GFP マウス由来 $CD4^+CD45RB^{high}T$ 細胞移入大腸炎モデルマウスの大腸粘膜および腸管膜リンパ節における腸炎惹起性メモリーT細胞の可視化に成功した(下図)。

大腸粘膜における in vivo live imaging (large image)



Hoechst / EGFP 左) 腸炎群 右) Control 群

大腸粘膜における in vivo live imaging



Hoechst / EGFP 左) 腸炎群 右) Control 群

定量的なT細胞の動態解析では、移動速度を表す speed、全移動距離の合計を表す track length、そして移動した直線距離を表す track displacement length を測定した。大腸炎を発症したマウスでは、コントロール抑制群に比して、有意な speed の低下が見られ、炎症時の大腸粘膜においては、腸炎惹起性メモリーT細胞の移動速度が低下していることが分かった。

今後はこのシステムを用いて、腸炎発症時、寛解時、再燃時の腸炎惹起性メモリーT細胞の動態の比較や、T細胞と腸内細菌の相互作用の可視化などを行うことで新規事項の発見につながる可能性がある。さらに間葉系細胞が蛍光標識されたマウスを腸炎モデルマウスに用いることで、T細胞と間葉系細胞の相互作用や空間的位置関係の解析も可能である。In vivo live imaging は、生体内でまさに働いている細胞の動態を解析できる唯一無二のツールであり、メモリーT細胞の組織局所における維持機構の解明、最終的に炎症性腸疾患根治療法の開発に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takei Yuria, Nemoto Yasuhiro, Morikawa Ryo, Tanaka Shohei, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Okamoto Ryuichi, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Watanabe Mamoru	4. 巻 523
2. 論文標題 CD8 + T cells show amoeboid shape and frequent morphological change in?vitro, and localize to small intestinal intraepithelial region in?vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 328 ~ 335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Shohei, Nemoto Yasuhiro, Takei Yuria, Morikawa Ryo, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Okamoto Ryuichi, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Stutte Susanne, Watanabe Mamoru	4. 巻 522
2. 論文標題 High-fat diet-derived free fatty acids impair the intestinal immune system and increase sensitivity to intestinal epithelial damage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 971 ~ 977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Morikawa Ryo, Nemoto Yasuhiro, Yonemoto Yuki, Tanaka Shohei, Takei Yuria, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Tsuchiya Kiichiro, Nozaki Kengo, Mizutani Tomohiro, Nakamura Tetsuya, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Intraepithelial Lymphocytes Suppress Intestinal Tumor Growth by Cell-to-Cell Contact via CD103/E-Cadherin Signal	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1483 ~ 1503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2021.01.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takei Yuria, Nemoto Yasuhiro, Morikawa Ryo, Tanaka Shohei, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Okamoto Ryuichi, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Watanabe Mamoru	4. 巻 523
2. 論文標題 CD8 + T cells show amoeboid shape and frequent morphological change in?vitro, and localize to small intestinal intraepithelial region in?vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 328 ~ 335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.021	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Shohei, Nemoto Yasuhiro, Takei Yuria, Morikawa Ryo, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Okamoto Ryuichi, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Stutte Susanne, Watanabe Mamoru	4. 巻 522
2. 論文標題 High-fat diet-derived free fatty acids impair the intestinal immune system and increase sensitivity to intestinal epithelial damage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 971 ~ 977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.158	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡辺 守 (Watanabe Mamoru) (10175127)	東京医科歯科大学・高等研究院・特別荣誉教授 (12602)	
研究分担者	根本 泰宏 (Nemoto Yasuhiro) (20456213)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------