

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22528

研究課題名(和文) 動的な生体リンパ器官組織微小領域からの生細胞回収/広域網羅解析

研究課題名(英文) Live cell recovery and wide area analysis of dynamic lymphoid tissue subcompartments

研究代表者

片貝 智哉 (Katakai, Tomoya)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00324682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：免疫応答の根幹を担うリンパ節の時空間的な細胞間相互作用を明らかにするために、マウスのリンパ節から組織スライスを作成し、微小組織領域の細胞集団を効率的に回収する方法を探った。その結果、組織スライスの上下を樹脂薄層フィルムで覆い、実体顕微鏡下において微小生検トレパンを用いて円形に打ち抜くことにより、安定して微小領域の組織片を回収する手法を確立した。また、微小組織片をコラーゲナーゼおよびDNアーゼにより消化し、細胞を単離することに成功したほか、細胞を蛍光抗体染色した後にフローサイトメトリー解析を行い、組織領域によって予想どおりの免疫細胞サブセットの比率となっていることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、臓器の微細構造に関する理解は進んできているが、多くは固定した薄切標本を用いた観察や、観察可能な範囲に限定した一部の生体観察に基づく。一方、構造の空間的な位置情報を保ったまま生きた細胞を回収することは未だ容易ではない。また、免疫細胞の移動や分子過程が明らかになる一方、臓器ごとに免疫系の性質や挙動は大きく異なり、組織の場や局所環境を理解することが重要である。特にリンパ器官の動的・変動的な性状はそれを阻んでいる。本研究で確立された手法は、ダイナミックな臓器の生理的機能の解析とともに、幅広い臓器にも適応可能で、構造や機能、疾患に伴う病理的な組織変容を明らかにするための有用な方法となる。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the spatiotemporal cell-cell interactions in lymph nodes, which play a fundamental role in immune responses, we prepared tissue slices from mouse lymph nodes and explored an efficient method to collect cell populations in microscopic areas. We established a method to collect small tissue fragments by covering the top and bottom of the tissue slices with a thin layer of resin film and punching them out in a circular shape using a micro biopsy trepan under a stereomicroscope. The microtissue fragments were digested with collagenase and DNase, and cells were successfully isolated. Flow cytometric analysis of the cells after staining with fluorescent antibodies confirmed that the ratio of immune cell subsets was as expected in different tissue regions.

研究分野：免疫学

キーワード：細胞単離 ストローマ細胞 組織スライス 生体イメージング 免疫細胞 リンパ節

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胸腺・リンパ節・脾臓などのリンパ器官は、リンパ球を中心とした多様な免疫細胞が高密度で集積し、細胞分化や免疫応答の誘導、免疫記憶・自己寛容形成など、免疫システムの根幹を支える臓器群である。他の臓器とは大きく異なり、リンパ器官では膨大な数の免疫血球系細胞が組織内で常時活発に移動し、一か所に留まることは稀である。また、分化や活性化など様々な局面で個々の細胞は移動しながら他の細胞に次々と接触し、複雑な多細胞間相互作用が進行する。したがって、リンパ器官は自立的な細胞移動による組織変動が最も激しい臓器であるといえる。言い換えればこれは、細胞の挙動を時空間的に統制する必要性が高いことを意味するが、その動的な性状ゆえにリンパ器官の生理機能に関する詳細かつ包括的な理解はこれまで困難であった。リンパ器官の動的組織像は近年進歩した生体ライブイメージングによる成果である。しかし、現在の技術では比較的狭い視野空間内に存在する可視化された細胞のみを観察するにとどまり、広域で進行する現象の全体像を把握することはできない。また、イメージングで評価可能なパラメータは標的細胞の数や分布、形態と動態、わずかな機能的指標に限られ、各細胞がもつ分子的实际態を網羅的に調べることは不可能である。

一方、リンパ器官は単にリンパ球が雑然と詰まった臓器ではなく、分化段階や種類の異なる細胞が同在する複数の領域(亜区画)からなり、同じ区画内でも移動する個々の細胞の状態は多種多様で、極めて流動的であると考えられる。また、区画ごとに性質の異なる非血球系間質細胞が独特の微小環境を形成し、免疫細胞の活動を多面的に支持している。さらに、感染やアレルギー疾患、癌転移などにより免疫応答が誘導されるとリンパ器官の組織構造は劇的に再編され細胞の分布や状態は大きく変化する。このような活動性の高い混沌とした組織状態に関する情報は少なく、これまで効果的な解析方法もなかった。近年、様々な臓器の1細胞解析が盛んに行われ、ある細胞種の多様性や予想外のサブセットの発見が続いている。しかし、現行の問題点は細胞を単離する過程でその位置情報が失われてしまうことにある。特に複雑な細胞構成と流動的なリンパ器官では大きな情報の損失であり、組織の微小領域ごとの違いを把握することは困難である。免疫系の動態を包括的に理解するためには、位置情報を保ったまま個々の細胞状態を網羅的に検出する技術的な飛躍が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、リンパ器官の組織スライスを用いて、ライブイメージングとブレードアレイによる極小組織細断/微量ニードル自動吸引法を組み合わせ、組織の微小部位から生細胞を連続的に回収した「組織微小領域アレイ」に対して、1細胞解析もしくは少数細胞解析を適用する。これにより、細胞レベルの情報と広域位置情報の取得を両立した網羅的解析システムの構築を試みる。この方法は、免疫系の組織動態・微小構造に関する詳細な理解のみならず様々な臓器システムにも適応可能であり、生体組織解析に大きな革新をもたらすと考えられる。

3. 研究の方法

特定の免疫細胞や間質細胞が蛍光タンパク質を発現するレポーターマウスからリンパ器官を採取し、未固定のままアガロースゲルに包埋、振動マイクロトームを用いて200-300 μ m厚の組織スライスを作成する。混合ガス(95%O₂, 5%CO₂)飽和培地による還流もしくは静止培養系に組織スライスを置き、多光子励起レーザー顕微鏡もしくは通常の蛍光顕微鏡を用いて組織構造の把握、細胞分布・動態などを観察する。50-100 μ m四方で格子状に刃を配置したブレードアレイを組織スライスに押し込むことにより極小領域細断を行い、微量ニードル吸引法により生細胞集団を連続的に自動回収するシステムを構築する。間質細胞など強付着性細胞の単離・回収には、組織細断後にプロテアーゼ処理を施す。回収した細胞集団を1細胞単離し、全RNAのcDNA化・増幅の後、Dynamic Arrayシステムを用いた任意遺伝子セットの網羅的発現解析を行う。もしくは、ライブラリー作成後に次世代高速シーケンシングによるRNAseq解析を目指す。

4. 研究成果

本研究を開始後まもなく、リンパ節の組織が予想以上に柔軟な線維成分を基盤とするために伸展性に富んでおり(線維成分により構成される細網構造がゴムのような弾力性を有するため)ブレードアレイを含むカミソリ刃などを用いた組織スライス上部からの単純な加圧切断が極めて困難であることが判明した。そのため、当初想定していた微小領域片や細胞集団の回収が難航し、様々な技術的工夫や試行錯誤による検討を要することとなった。一方、コロナ禍の影響で、共同研究による技術開発の検討が予定どおりに進まず、研究のさらなる遅れを余儀なくされた。

試行錯誤の末、リンパ節の組織スライスを上下から柔軟な樹脂の薄層フィルムで挟み込み、実体顕微鏡下において組織形状を確認しながら、目的の微小領域に対して微小生検トレパンを用いて円形に打ち抜くことにより、特定の組織領域を主体とする微小組織片を安定的に回収する手法を確立した(図1)。

この微小組織片をコラーゲナーゼおよびDNアーゼにより消化することにより、十分な数の生細胞を単離することにも成功した。回収した細胞を各種蛍光標識抗体により染色した後にフローサイトメトリー解析を行い、組織領域ごとに予想される免疫細胞の局在を反映した細胞サブセットの比率になっていることを確認した(図2)。具体的には、濾胞領域を主体とした組織片ではB細胞の増加とT細胞の減少が認められ、T細胞領域および髄質を含む部位を主体とした組織片では、逆にT細胞の増加とB細胞の減少が確認された(図3)。また、これらの組織片を用いた網羅的な伝子発現解析を行うことが可能となった。

図1 微小生検トレパンを用いたリンパ節組織スライスからの領域打ち抜き

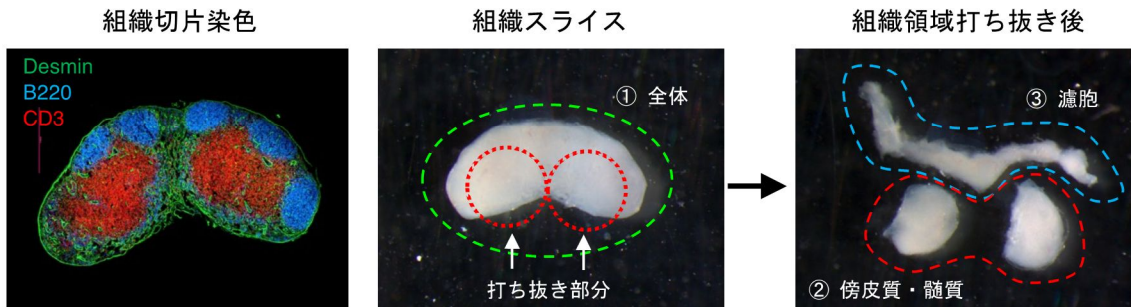


図2 組織領域片から回収した細胞のフローサイトメトリー解析

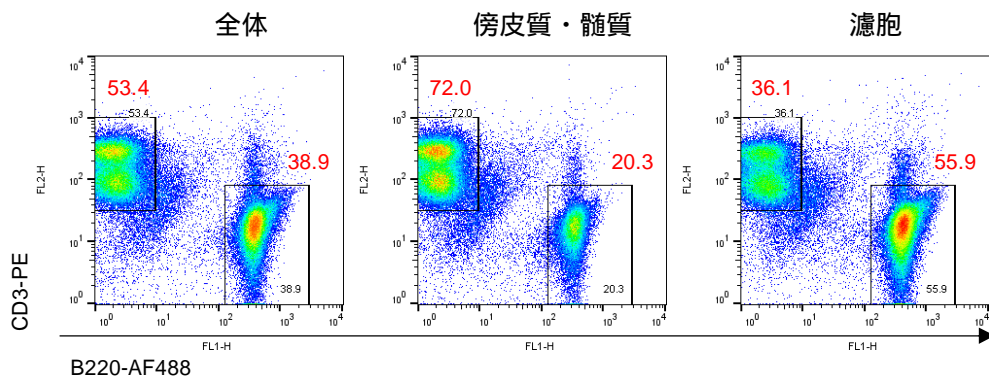
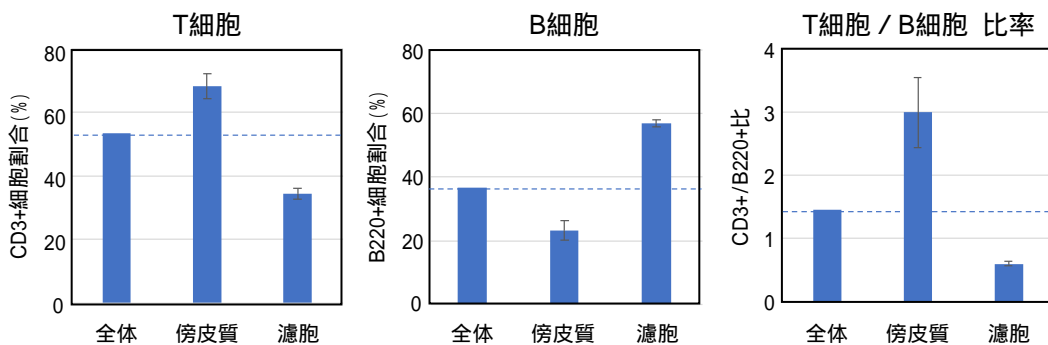


図3 組織領域片中のT細胞およびB細胞の比率



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kobayashi D, Sugiura Y, Umemoto E, Takeda A, Ueta H, Hayasaka H, Matsuzaki S, Katakai T, Suematsu M, Hamachi I, Yegutkin GG, Salmi M, Jalakanen S, Miyasaka M	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracellular ATP limits homeostatic T cell migration within lymph nodes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 786595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.786595	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 Takeuchi A, Ozawa M, Cui G, Ikuta K, Katakai T	4. 巻 434
2. 論文標題 Lymph Node Stromal Cells: Diverse Meshwork Structures Weave Functionally Subdivided Niches	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr Top Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 103-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-030-86016-5_5	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 Kanda Y, Okazaki T, Katakai T	4. 巻 13
2. 論文標題 Motility dynamics of T cells in tumor-draining lymph nodes: a rational indicator of antitumor response and immune checkpoint blockade	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13184616	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 Sumiyoshi Mami, Kotani Yui, Ikuta Yuki, Suzue Kazutomo, Ozawa Madoka, Katakai Tomoya, Yamada Taketo, Abe Takaya, Bando Kana, Koyasu Shigeo, Kanaho Yasunori, Watanabe Toshio, Matsuda Satoshi	4. 巻 206
2. 論文標題 Arf1 and Arf6 Synergistically Maintain Survival of T Cells during Activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 366 ~ 375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2000971	査読の有無 有
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 Rahman Md. Azizur, Kanda Yasuhiro, Ozawa Madoka, Kawamura Toshihiko, Takeuchi Arata, Katakai Tomoya	4. 巻 355
2. 論文標題 Transdermal entry of yeast components elicits transient B cell-associated responses in skin-draining lymph nodes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Immunology	6. 最初と最後の頁 104159 ~ 104159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellimm.2020.104159	査読の有無 有
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 Kunimura K, Sakata D, Tun X, Uruno T, Ushijima M, Katakai T, Shiraishi A, Aihara R, Kamikaseda Y, Matsubara K, Kanegane H, Sawa S, Eberl G, Ohga S, Yoshikai Y, Fukui Y.	4. 巻 29
2. 論文標題 S100A4 Protein Is Essential for the Development of Mature Microfold Cells in Peyer ' s Patches	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2823 ~ 2834.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.10.091	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 Nagai M, Noguchi R, Takahashi D, Morikawa T, Koshida K, Komiyama S, Ishihara N, Yamada T, Kawamura YI, Muroi K, Hattori K, Kobayashi N, Fujimura Y, Hirota M, Matsumoto R, Aoki R, Tamura-Nakano M, Sugiyama M, Katakai T, Sato S, Takubo K, Dohi T, Hase K.	4. 巻 178
2. 論文標題 Fasting-Refeeding Impacts Immune Cell Dynamics and Mucosal Immune Responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1072 ~ 1087.e14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2019.07.047	査読の有無 有
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 Kitazawa Y, Ueta H, Sawanobori Y, Katakai T, Yoneyama H, Ueha S, Matsushima K, Tokuda N, Matsuno K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel Targeting to XCR1+ Dendritic Cells Using Allogeneic T Cells for Polytopical Antibody Responses in the Lymph Nodes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 Article 1196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.01195	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 片貝智哉
2. 発表標題 マウスリンパ節の辺縁-髄洞接続帯に局限した髄洞マクロファージによるリンパフィルター機能
3. 学会等名 第45回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoya Katakai, Madoka Ozawa
2. 発表標題 Medullary sinus macrophages at the subcapsular-medullary sinus border/barrier (SMB) of lymph nodes play a pivotal role in lymph fluid filtering
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoya Katakai
2. 発表標題 The battle of two singularities: Immune response vs. Tumorigenesis
3. 学会等名 PacifiChem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片貝智哉
2. 発表標題 リンパ節のフィルター / 免疫センサー機能を支える組織・細胞基盤
3. 学会等名 第44回日本リンパ学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1 . 発表者名 Tomoya Katakai
2 . 発表標題 Stromal cell diversity in lymph nodes.
3 . 学会等名 Keystone Symposia “Stromal Cells in Immunity and Disease” (Invited speaker), Feb. 21. 2020. Victoria, Canada. (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Tomoya Katakai
2 . 発表標題 The battle of two singularities: Tumor vs. Immune system.
3 . 学会等名 ICSB2019 (The 20th International Conference on Systems Biology), Satellite Workshop “Singularity Biology: small elements change the function of the whole systems” Oct. 31, 2019, Okinawa, Japan. (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Takeuchi A, Ozawa M, Kanda Y, Katakai T.
2 . 発表標題 Newly supplied B cells from blood migrate to follicular area though deep cortex periphery within lymph node.
3 . 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec. 11, 2019, Hamamatsu.
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Katakai T, Ozawa M, Takeuchi A, Kanda Y.
2 . 発表標題 Rapid response to lymph-borne antigen accumulated in the lymph node medulla.
3 . 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec. 11, 2019, Hamamatsu.
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanda Y, Takeuchi A, Ozawa M, Okazaki T, Katakai T.
2. 発表標題 Involvement of stromal cells in promoting lymph node metastasis of cancer cells.
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec. 13, 2019, Hamamatsu.
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学 大学院医歯学総合研究科・医学部医学科 免疫・医動物学分野
<https://www.med.niigata-u.ac.jp/zoo/welcome.html>

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------