

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590194

研究課題名（和文）超多色・超高感度組織蛍光イメージング法による T 細胞分化過程の組織学的解析

研究課題名（英文）Histological analysis of T cell differentiation process based on hypermulticolor-hypersensitive fluorescence imaging method

研究代表者

鶴井 博理（TSURUI HIROMICHI）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40217386

研究成果の概要（和文）：色素の抗体へのラベル化状態を評価する方法として、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー、蛍光相関分光法、超高倍率の走査型電子顕微鏡法の確立及び超高感度画像分光法の試行を行い、それらの知見に基づいて 2 つのラベル化法の確立を行い、T 細胞分化特異的転写因子である、T-bet、GATA-3、ROR-gt、FoxP3 の同時イメージング及びサイトカインのうち IL-10、IFN- α のイメージングまでこぎつけた。

研究成果の概要（英文）：As the methods to evaluate chromophore-antibody conjugation state, gel-filtration chromatography, fluorescence-correlation spectroscopy, hyper-sensitive spectral imaging and high-magnification SEM were established or applied. Through those methods, two conjugation methods were established and applied to simultaneous imaging of T-bet, GATA-3, ROR-gt, FoxP3. IL-10 and IFN- α were also successfully imaged.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：①画像分光、②半導体色素、③サイトカインネットワーク、④超高感度蛍光イメージング、⑤分化特異的転写因子、⑥細胞分化・組織形成

1. 研究開始当初の背景

免疫担当細胞の分化動態の解明にはサイトカインネットワークの組織学的解析が必要であり、そのためには極めてシグナルの強い、直接ラベル可能な色素とともに、多種シグナルを同時解析可能な検出系が必要である。サ

イトカインの組織学的イメージングに関しては、それなりの蓄積があると思われるにもかかわらず、実は大きな問題が潜んでいる。Van der Loos et al. は市販されている、13種のヒト IFN- γ に対する抗体を用い、ヒト由来の扁桃、大動脈瘤、関節リ

ユウマチ標本を対象としたサイトカインの組織染色の信頼性を調べたが、シグナルが検出されるべきT細胞においては全ての抗体において全く認められず、またいくつかの抗体において明らかに擬陽性と判断されるシグナルが線維芽細胞、形質細胞、細胞外基質に認められ、ヒトIFN- γ 抗体の組織染色の解釈が極めて慎重を要することを示した(J Histochem Cytochem 49:699-709, 2001)。彼らの提起した問題は、cytokine, chemokine の組織染色一般に当て嵌まる問題であり、現状での vivo における免疫応答の理解が未熟にとどまっている大きな理由の一つである。更に、vivo におけるシステムとしての挙動に関する知見を得るためには、1種のサイトカインに関し高い信頼性の下にイメージングするだけでは不十分であり、多種の細胞を同定すると共に、それらの細胞間にやり取りされる複数のサイトカインを高い信頼性の下に解析することが必要である。結果として、極めてシグナルの強い、直接ラベル可能な色素が望ましいことになる。

申請者は、画像分光に基づく蛍光画像の超多色イメージング法を開発し(Tsurui et al., 2000, J Histochem Cytochem 48:653-662)、免疫組織、神経系その他の臓器を対象として日常的に7~8色の組織蛍光イメージングを行っている。

近年利用され始めた半導体色素は蛍光シグナルが強い上に退色が少なく、高感度化に適している。また、いずれも励起スペクトルを400nm程度の短波長領域に取れることから従来の有機合成系色素と励起波長の違いにより識別でき、画像分光を用いることにより有機合成系の色素とあわせて10色以上の識別が可能と思われる。画像分光とこのラベル化法とを結びつけることにより、サイトカインネットワークの解析が可能となること、そして免疫担当細胞の分化動態が解明されることが期待される。

2. 研究の目的

近年実用化されるに至った半導体色素は、シグナルが強く退色し難く、スペクトルのバンド幅が狭い、という特長があり、画像分光法と組み合わせることにより、超多色(6~8色)、超高感度のイメージングが可能となる。この手法を用いてin vivoでのサイトカインネッ

トワークの組織学的解析法を確立することが支援課題の目指すものである。

3. 研究の方法

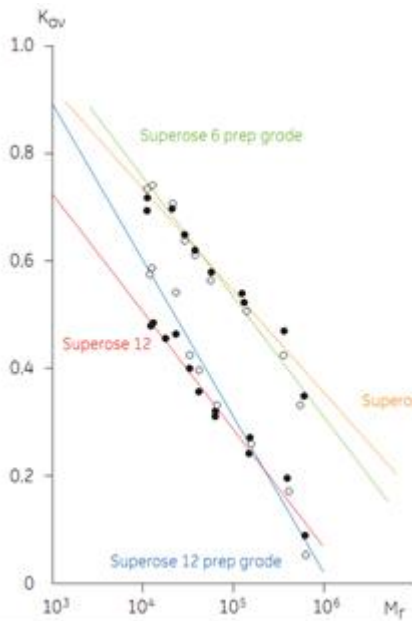
当初は、下記の手順で研究を進める予定であった。即ち

- (1) 半導体色素(eBioscience社、eFluor Nanocrystal Dyes、以下eFluor色素と略)を用い、蛍光シグナルを最大化する条件を求め、
- (2) IL-2, IL-4, IL-6 高産生 transfectant、Th-1, Th-2, Th-17 偏向培養条件下の細胞サイトスピン標本を用いての、免疫細胞染色による、サイトカイン・分化特異的転写因子の免疫染色法を確立し、
- (3) 同細胞をCFSE染色ものをマウスに静注して後作成される陽性コントロールを用いての、サイトカイン・分化特異的転写因子の免疫組織染色法を確立し、
- (4) マウス実験的自己免疫性脳脊髄炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE)の系を用いての、鼠頸リンパ節・脳内におけるサイトカインネットワーク、T細胞分化過程の解析、

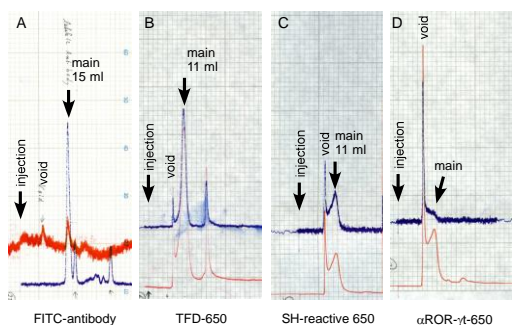
を行う予定であった。しかしながら、半導体色素がその利点を従前に発揮するためには抗体との結合状態が極めて重要であることが明らかとなった。即ち、色素分子、抗体の活性基が多価であることによる凝集塊形成(分子数が数10以上)を引き起こさず、色素分子と抗体とがほぼ1:1の割合で結合することが最重要であることが明らかとなったため、このラベル化法(コンジュゲーション法)を詳細に検討することが研究の主要な課題となった。

4. 研究成果

- (1) コンジュゲーション状態の評価法の確立
- ① ゲル濾過カラムクロマトグラフィー
Superose 6は図に見られるように、数1000から数百万の分画く分子量を持ち、Nanocrystal(eFluor 650が分子量最大で約740K)は、十分に分画分子量の範囲である。



このカラムを用いて、抗体単独、Nanocrystal 単独、活性化された Nanocrystal, 抗体と conjugate された Nanocrystal のクロマトグラフィーを行った。

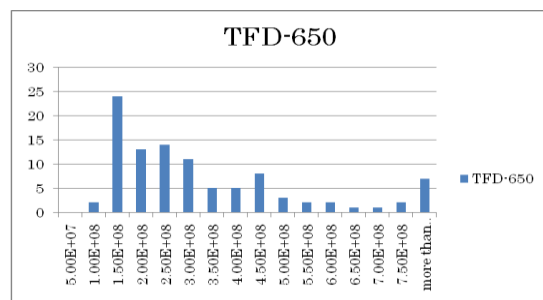


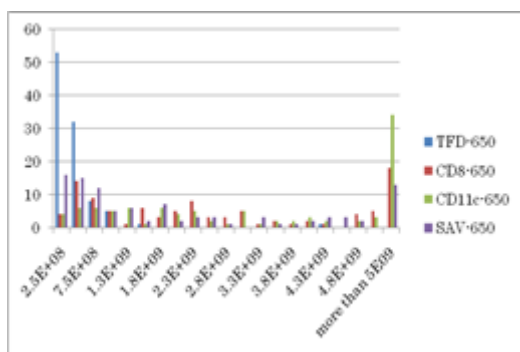
赤は 280 nm の吸収を、青は FITC は 512 nm, 650 とつくものは 650 nm の蛍光を示す。A : 抗体は FITC でラベルを入れてあるが、FITC の分子量は 330 程度であるので、1 抗体分子に 5 ~ 6 分子導入されたとしても抗体の分子量 150K に 2K が加わる程度でほとんど影響を受けない。Void は 7.5 ml の位置であり、サンプルに含まれている巨大な分子がこの位置に溶出される。抗体単独では 15 ml の位置に溶出される。B : TFD-650 は、Nanocrystal に Carboxyl 基を導入したものであり、ほぼ単分散であることがわかっている。Main peak は 11 ml の位置に溶出されている。クロマトグラフィーの過程でバンドの拡がりを生じ

ている。C : Nanocrystal の TFD-650 にさらに、チオール基 (SH-基) と結合を形成する活性基を導入したもの。TFD-650 と比べ平均分子量の変化はほとんどないが、やや分子量の分布がブロードになっていると思われる。D : 抗 ROR- γ t 抗体と SH-reactive 650 との conjugation を行ったもの。Main の溶出曲線が大きく左に (分子量が増大するように) シフトしている事が判る。このことは、conjugation により、種々の大きさのクラスターが形成されていることを示している。

② 蛍光相関分光法

1 \cdot m 立方程度の極めて微小な体積 (1 pl, 10⁻⁹l 程度) からの蛍光シグナルは、この空間の分子の出入りにより、含まれる分子の数変動するために変動する。この蛍光シグナルの自己相関係数を求めることにより、分子の平均拡散係数や分子量、単位となる蛍光シグナルの大きさ等が求められる。試料として、TFD-650, CD8-650, CD11c-650, Streptavidin-650 (SAV-650) を用いた。グラフ 1 に TFD-650 の質量分布を、グラフ 2 に、TFD-650, CD8-650, CD11c-650, SAV-650 の質量分布を示した。分子の形状を球状と仮定した場合に、拡散係数は質量の立方根に比例することから、拡散係数より質量比を求めている。質量は、TFD-650 が狭い範囲に分布しているのに比べ、CD8-650, CD11c-650, SAV-650 が広く分布していることが一見してわかる。このデータから判断すると、TFD-650 も必ずしも単分散とはなっていない。





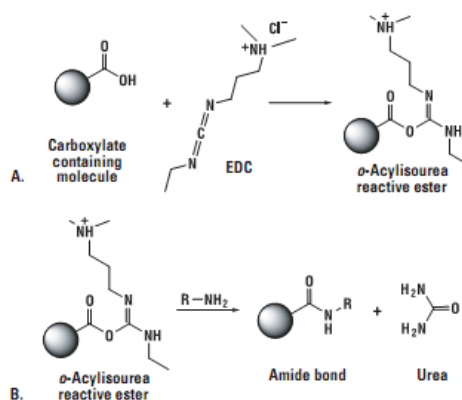
この蛍光相関分析による評価はやや変則的な方法を用いている。即ち、conjugationの産物を厳密に定量的解析を行うにはいくつかの問題がある。まず、分析する分子量の範囲がこの方法にとって適切な範囲を超えること、サンプルの質量分布が多様であり、分析の前提とする1乃至2種の分布をおおきく超えること、そしてNanocrystalがblinkingという現象を起こすことである。にもかかわらず、この測定はconjugation産物の質量分布に関して、かなりいい見積もりを与えてくれると思われる。

③ 超高感度画像分光法の試行

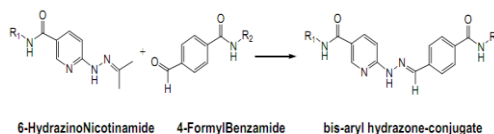
Nanocrystal 1分子をイメージングの対象としえる、高感度の画像分光システムにより、conjugation産物を低濃度に塗布した試料を計測し、その輝度分布を測定すれば、おそらく最も信頼性の高い定量的な評価法となる。東京インスツルメンツ株式会社の協力を得て、試験的にTFD-650に関する画像分光測定を行った。前述のように、この試料は分布がかなり均一な試料である。Blinkingを起こす粒子のスペクトルを得ることが可能であった。この装置はかなり特殊であり、当研究機関で自由に利用できる状態にはない。利用しやすい範囲で代替可能な方法を検討している。

(2) 前記コンジュゲーション状態の評価法より得た知見も援用しつつ、2つのラベル化法の確立を試み、2種類のある程度実用的なラベル化法を確立した。

① 抗体のアミノ基とNanocrystalのカルボキシル基を、EDC + sulfo-NHSを用いて結合させる方法、



②Pierce Bioconjugate tool kit SANH(Succinimidyl 4-hydrazinonicotinate acetone hydrazone) でアミノ基(NH₂-基)でコートされたnanocrystalを活性化(hydrazineの導入)、SFB(succinimidyl 4-formylbenzoate)で抗体のアミノ基を活性化(aldehydeの導入)、両者を混合することにより、conjugation形成(bis-aryl hydrazone-conjugate)を行う。NanocrystalがR1に、抗体がR2に相当する。



(3)このように、種々のconjugationを行い、また、それらのconjugationの状態に関する評価を行った上で、T細胞分化特異的転写因子である、Foxp3, GATA-3, T-bet, ROR-γtの染色・イメージングを試みた。上記(2)の結果えられた、現時点で最善と思われるconjugationは、SH-基反応性のconjugation法である。このconjugation法により、上記抗体にNanocrystal 650をconjugateし、マウスの臓器(胸腺、鼠頸リンパ節)を染色してみた。いずれの抗体に関しても、妥当な染色像が得られたと判断している。eFluor 650はeFluor nanocrystal seriesの中ではシグナルが最も強い色素であるが、T-bet, ROR-γtは特に発現量が低い転写因子であり、これらに対する像が得られたと言うことは、直接ラベルによる、同時イメージングが可能であることを強く示唆する。これら4種の、分化特異的転写因子の同時イメージングが可能となることは、免疫応答におけるT細胞サブセット間の関わりを直接組織学的に追跡

出来ることを意味し、免疫応答の機序を解明する上で有力な手法を提供すると思われる。

(1) で述べたように、この SH-基反応性 conjugation は、やはりクラスターを形成していると思われる。

上記コンジュゲーション法を用いてマウス脾臓、胸腺、リンパ節を試料として、サイトカインとして比較的分泌量が多いと思われる IL-10, TNF- α に関しての蛍光画像を取得した。しかし、凝集塊形成によるバックグラウンドノイズが高くなることから、それ以外のサイトカインに関しては蛍光画像を取得できていない。このことは、やはりこの方法を用いたイメージング法の S/N 比に制約を与え、IFN- γ , TGF- β に対するイメージングを試みたが、かなりもっともらしい像を得たが、確定するにはいたらなかった。サイトカインネットワークの組織学的解析を行うには、やはりクラスター形成を起こさない conjugation 法を確立することが最も本質的かつ確実なアプローチと思われる。

(4) 得られた画像の解釈の枠組みを作る目的で、T 細胞の挙動と TCR-pMHC 結合自由エネルギーの関係を調べるための分子動力学に基づくシミュレーションを平衡して行い、MM-PBSA (GBSA) による計算法が動くようになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

② Kitabatake M, Toda T, Kuwahara K, Igarashi H, Ohtsuji M, Tsurui H, Hirose S, and Sakaguchi N. Transgenic overexpression of G5PR that is normally augmented in centrocytes impairs the enrichment of high-affinity antigen-specific B cells, increases peritoneal B-1a cells, and induces autoimmunity in aged female mice. *J. Immunol.* 189:1193-1201, 2012. doi: 10.4049/jimmunol.1102774

③ Kawano S, Lin Q, Amano H, Kaneko T, Nishikawa K, Tsurui H, Tada N, Nishimura H,

Takai T, Shirai T, Takasaki Y and Hirose S. Phenotype conversion from rheumatoid arthritis to systemic lupus erythematosus by introduction of *Yaa* mutation into Fc γ RIIB-deficient C57BL/6 mice. *43:770-778*, 2013. doi: 10.1002/eji.201243057

④ Akihisa Okumura, Masaharu Hayashi, Hikomichi Tsurui, Yoko Yamakawa, Shinpei Abe, Takahiro Kudo, Ryuyo Suzuki, Toshiaki Shimizu, Keiko Shimojima, Toshiyuki Yamamoto. Lissencephaly with marked ventricular dilation, agenesis of corpus callosum, and cerebellar hypoplasia caused by *TUBA1A* mutation *Brain and Development* Vol35 Issue 3 274-279, 2013. Doi:10.1016/j.braindev.2012.05.006

⑤ Sato-Hayashizaki A, Ohtsuji M, Lin Q, Hou R, Ohtsuji N, Nishikawa K, Tsurui H, Sudo K, Ono M, Izui S, Shirai T, Takai T, Nishimura H, Hirose S. Presumptive role of 129 strain-derived *Sle16* locus in rheumatoid arthritis in a new mouse model with Fc γ receptor type IIb-deficient C57BL/6 genetic background. *Arthritis & Rheumatism*, 2011; 63:2930-2938. Doi:10.1002/art.30485

⑥ Lin Q, Hou R, Sato A, Ohtsuji M, Ohtsuji N, Nishikawa K, Tsurui H, Amano H, Amano E, Sudo K, Nishimura H, Shirai T, Hirose S. Inhibitory IgG Fc receptor promoter region polymorphism is a key genetic element for murine systemic lupus erythematosus. *J Autoimmunity.* 2010; 34:356-363. Doi:10.1016/j.jaut.2009.08.011

⑦ Ando S, Amano H, Amano E, Minowa K, Watanabe T, Nakano S, Nakiri Y, Morimoto S, Tokano Y, Lin Q, Hou R, Ohtsuji M, Tsurui H, Hirose S, Takasaki Y. FTY720 exerts a survival advantage through the prevention of end-stage glomerular inflammation in lupus-prone BXSB mice. *Biochemical and Biophysical*

Research Communications. 2010
394:804-810.
Doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.078

[学会発表] (計 8 件)

① TSURUI Hiromichi, HIROSE Sachiko.
Thorough characterization of TCR-pMHC
binding free energy estimated by string model
and Miyazawa-Jernigan matrix.

第 41 回 日本免疫学会総会・学術集会記録 41
巻 110 頁 2012 年 12 月 5 日-7 日 神戸

② KAWANO Shinya, AMANO Hirofumi, LIN
Qingshun, KANEKO Toshiyuki, NISHIKAWA
Keiko, OKAZAKI Hideki, TSURUI Hiromichi,
NISHIMURA Hiroyuki, SHIRAI Toshikazu,
TAKASAKI Yoshinari, HIROSE Sachiko.

Phenotype conversion from RA to SLE in
FcγRIIB-deficient B6 mice by *Yaa* mutation. 第
41 回 日本免疫学会総会・学術集会記録 41
巻 194 頁 2012 年 12 月 5 日-7 日 神戸

③ LIN Qingshun, TSURUI Hiromichi,
NISHIKAWA Keiko, OKAZAKI Hideki,
OHTSUJI Mareki, NISHIMURA Hiroyuki, ONO
Masao, SHIRAI Toshikazu, HIROSE Sachiko.

The role of SAP-signal in SLE.

第 41 回 日本免疫学会総会・学術集会記録 41
巻 197 頁 2012 年 12 月 5 日-7 日 神戸

④ TSURUI Hiromichi, HIROSE Sachiko.
Characterization of TCR-pMHC
interaction-evaluating method based on
string model and Miyazawa-Jernigan
Matrix

第 40 回 日本免疫学会総会・学術集会記録 40
巻 140 頁 2011 年 11 月 27 日-29 日 幕張

⑤ 林 青順、大辻 希樹、佐藤 綾、大辻 奈
穂美、西川 桂子、鶴井 博理、須藤 カツ
子、西村 裕之、小野 栄夫、白井 俊一、
広瀬 幸子. SLE における SLAM シグナル
の役割

第 40 回 日本免疫学会総会・学術集会記録 40
巻 84 頁 2011 年 11 月 27 日-29 日 幕張

⑥ SATO Aya, OHTSUJI Mareki, LIN
Qingshun, OHTSUJI Naomi, NISHIKAWA
Keiko, TSURUI Hiromichi, ONO Masao,
SHIRAI Toshikazu, TAKAI Toshiyuki,
NISHIMURA Hiroyuki, HIROSE Sachiko.

Presumptive role of 129 strain derived
Sle16 locus for rheumatoid arthritis in a
new mouse model with FcγRIIB-deficient
C57BL/6 genetic background.

第 40 回 日本免疫学会総会・学術集会記録 40
巻 153 頁 2011 年 11 月 27 日-29 日 幕張

⑦ TSURUI H, HIROSE S. Phagocytosis
specific autofluorescence in marginal
metallophilic macrophage and marginal
zone macrophage.

International Immunology Meeting
Abstracts (2010) 22 (Suppl 1 Pt
3): iii31-iii42.doi:10.1093/intimm/dxq227

⑧ KITABATAKE M, IGARASHI H, TODA
T, OHTSUJI M, TSURUI H, HIROSE S,
SAKAGUCHI N.

Over-expression of protein phosphatase
subunit G5PR that suppresses
JNK-mediated apoptosis caused the
increase of B-1 cells associated with
autoimmunity

International Immunology Meeting
Abstracts (2010) 22 (Suppl 1 Pt
1): i118-i119.doi: 10.1093/intimm/dxq172

[図書] (計 1 件)

TSURUI H and TAKAHASHI T. Chapter 6,
Practical Estimation of TCR-pMHC
binding free-energy based on the dielectric
model and the Coarse-grained model in
“Molecular Dynamics - Studies of Synthetic
and Biological Macromolecules”, InTech
2012, Rijeka, ISBN:978-953-51-0444-5

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴井 博理 (TSURUI HIROMICHI)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：40217386