

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22113006

研究課題名（和文）癌免疫応答と免疫病態の機能的二光子イメージング

研究課題名（英文）Two-photon imaging of cellular function in tumor immunity and immune dysregulation

研究代表者

岡田 峰陽（Okada, Takaharu）

独立行政法人理化学研究所・その他部局等・その他

研究者番号：50452272

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 86,400,000円

研究成果の概要（和文）：胚中心はウイルスや細菌などから身を守る抗体の産生や、免疫記憶の形成に重要な免疫応答の場である。本研究はBリンパ球が胚中心Bリンパ球へと分化する組織内微小環境を特定し、転写因子Bcl6がBリンパ球の胚中心への移動に重要な役割を果たすことをライブイメージングにより明らかにした。また胚中心反応に必須のTリンパ球が、スフィンゴシン 1 -リン酸の受容体の一つであるS1PR2によって胚中心に留められていることライブイメージングを用いて突き止めた。さらに、腫瘍免疫において重要な細胞傷害性Tリンパ球の形成・分化に、重要な役割を果たす樹状細胞サブセットをライブイメージングにより特定した。

研究成果の概要（英文）：Germinal centers are the important site for the production of high affinity antibodies against pathogenic microbes. Our study revealed where in the lymphoid tissues B cells become committed to differentiation to germinal center B cells. Real time imaging analyses showed that the transcription factor Bcl6 plays an important role in B cell immigration into germinal centers. Imaging analyses also revealed that S1PR2, a receptor for sphingosine-1-phosphate, expressed by germinal center helper T cells is critical for their retention in germinal centers. In addition, our imaging analyses identified a subset of dendritic cells that is likely to be the most important for cytotoxic T lymphocyte development and differentiation, which are critical for tumor immunity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：イメージング 免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 現代社会では、毒性の強い新しいウイルスや細菌による健康被害が頻発している。私たちの体は、これらの外敵(抗原)から、免疫応答という生体防御機能を発揮することによって守られている。体内に侵入した抗原の根絶や、同じ種類の抗原による2度目以降の感染を抑え込むためには、抗原を効率よく排除する抗体の長期産生や、免疫記憶の形成が重要である。抗原に対して親和性の高い抗体の長期産生や免疫記憶形成には、胚中心と呼ばれる特殊な反応場が免疫組織の中に形成されることが鍵となる。しかし、抗体を作るBリンパ球やそれを助けるTリンパ球が、胚中心反応に参加するための細胞分化のメカニズムについては、いまだにその大部分が謎に包まれたままである。特に免疫応答中のBリンパ球やTリンパ球は、免疫組織の中を非常に活発に移動しており、組織の中の細かい環境の違いがこれらの細胞の運命決定に大きな影響を与えると考えられているが、胚中心反応を担うBリンパ球やTリンパ球の細胞分化がいつ、どこで起こり、どのように胚中心に移動するのか、そしてどのようなメカニズムで胚中心に滞在し続けるのかは、明らかになっていなかった。

(2) 私たちの体が持っているもう一つの防御システムに細胞傷害性Tリンパ球(CTL)があり、CTLはウイルスや細菌などの病原体だけでなく、癌細胞とも戦うために重要であることが知られている。概して、高い殺傷能力を獲得したCTLは増殖能力が低下する傾向にあるため、CTLによる効果的な癌免疫応答のためには、増殖能力の高いCTLと殺傷能力の高いCTLの分化バランスがとれていることが重要と考えられる。CTLはリンパ性組織でCD8陽性T細胞が増殖・分化することで形成され、そのあと腫瘍組織などへと浸潤していく。CTLの増殖や分化には、樹状細胞との相互作用が重要であることが知られている。しかしながら、リンパ性組織に存在するどのタイプの樹状細胞がもっともCTLの形成に貢献しているのか、また腫瘍組織の中でCTLの分化はどのように調節されているのかについては明らかにされていない部分が多く残っている。

2. 研究の目的

(1-1) 胚中心反応に参加するBリンパ球やTリンパ球の分化に必須の転写因子であるBcl6に注目し、Bcl6の発現の詳細な追跡とBリンパ球の移動の解析を同時に行うことで、胚中心反応のための細胞分化の場所と、細胞移動経路を特定することを目指した。

(1-2) Tリンパ球が胚中心に留まるための分子メカニズムを明らかにするための研究を行った。

(2) CTL形成におけるリンパ性組織中の樹状

細胞のサブタイプの貢献度を明らかにするための研究を行った。また腫瘍組織中におけるCTLの増殖・分化に腫瘍組織内に数少ないながら存在する樹状細胞が貢献しているかどうかを調べるための研究を行った。

3. 研究の方法

(1-1) 免疫応答中のBリンパ球やTリンパ球におけるBcl6の発現を、組織の中で効率よく検出するために、Bcl6を発現する細胞が蛍光を発するようにした遺伝子改変マウスを用いた。このマウスと、Bリンパ球の抗原特異性を固定したトランスジェニックマウスを交配し、得られたマウスからBリンパ球を野生型マウスに移植し、移植されたマウスのリンパ節の組織切片観察やフローサイトメトリーを行った。さらに、二光子励起レーザー顕微鏡と呼ばれる特殊な顕微鏡を用いて、生きた組織の中のBリンパ球の細胞移動をライブイメージングにより可視化した。

(1-2) 胚中心反応に参加するTリンパ球に強く発現することが示唆される遺伝子をDNAマイクロアレイ解析によって探索した。得られた候補遺伝子の発現を組織中で効率よく検出するために蛍光レポーターマウスを作成した。このマウスと、Tリンパ球の抗原特異性を固定したトランスジェニックマウスを交配し、得られたマウスからTリンパ球を野生型マウスに移植し、移植されたマウスのリンパ節の組織切片観察やフローサイトメトリーを行った。さらに、二光子励起レーザー顕微鏡を用いて、生きた組織の中のTリンパ球の細胞移動をライブイメージングにより可視化した。

(2) 抗原特異性を固定したCD8陽性Tリンパ球を、特定の樹状細胞サブタイプを可視化できる蛍光レポーターマウスに移植して、リンパ節内における細胞間相互作用を、二光子励起レーザー顕微鏡を用いたライブイメージングにより解析した。またモデル抗原を発現させたメラノーマ細胞株を用いて、担癌マウスを作成し、腫瘍組織に浸潤してきた抗原特異的なCTLと腫瘍組織内の樹状細胞との相互作用を観察した。

4. 研究成果

(1-1) リンパ節切片観察やフローサイトメトリーの結果、免疫応答中のBリンパ球が、胚中心反応の開始前に、濾胞外縁部と呼ばれる別の場所でBcl6の発現を開始することを発見した。さらに、Bcl6の機能が欠損したBリンパ球では、濾胞外縁部から胚中心反応への細胞の移動が著しく損なわれていることがライブイメージングにより明らかとなった(図1)。これらの結果から、Bリンパ球の胚中心反応のための細胞分化は、濾胞外縁部の微小環境で起こり、その後Bcl6の働きで胚中心への移動が可能になると結論付けられた。

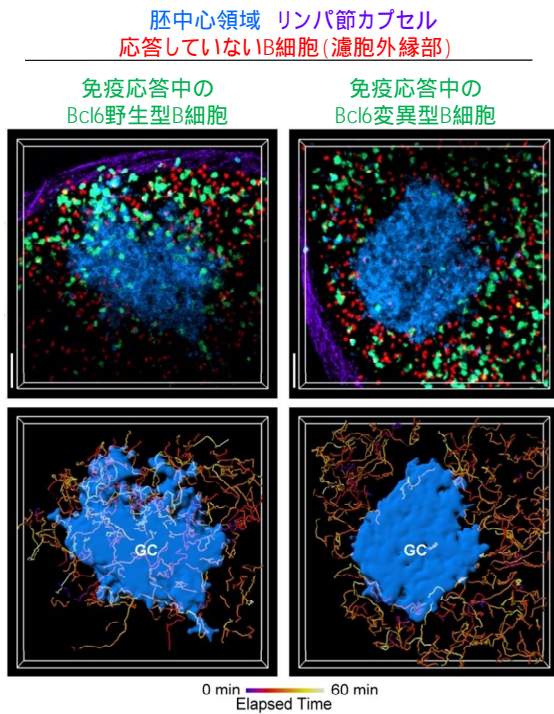
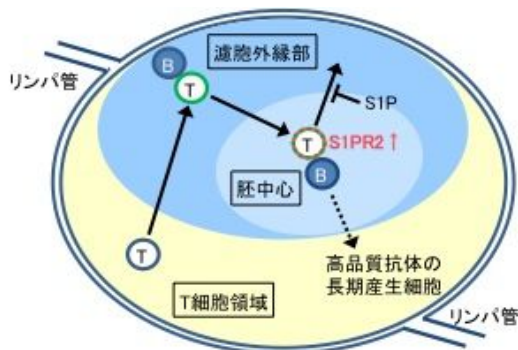


図1 . Bリンパ球の胚中心への移入に Bcl6 が重要であることを示すライブイメージングデータ

(1-2) 遺伝子発現解析の結果、生理活性因子「脂質メディエーター」の1つであるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) の受容体 S1PR2 が、胚中心反応に参加する Tリンパ球では他の Tリンパ球に比べて強く発現していることが示唆された。S1PR2 の発現を追跡する蛍光レポーターマウスを作成し、リンパ節切片観察を行ったところ、やはり S1PR2 は胚中心に局在する Tリンパ球に強く発現していることを確認した。さらに S1PR2 を Tリンパ球で欠損させると、胚中心へ局在する Tリンパ球の数が半減することが分かった。ライブイメージング解析の結果、S1PR2 を発現する Tリンパ球は胚中心内に留まろうとするのに対して、S1PR2 を欠損した Tリンパ球では、胚中心内に留まろうとする動きが全く観察されなかった(図2)。これらのことから、S1PR2 は胚中心反応に参加する Tリンパ球が胚中心内に留まるために必要な因子であることが明らかとなった。

図2 . Tリンパ球を胚中心に留める S1PR2 の働き



これら(1-1)、(1-2)の結果は、胚中心反応に

参加する Bリンパ球や Tリンパ球の数をコントロールする方法の開発、ひいてはより良い抗体の長期的な産生を目的としたワクチン療法の新規開発や改良につながることを期待される。

(2)皮下リンパ節のライブイメージングにより、抗原特異的な CD8 陽性 Tリンパ球と最も効率的に安定接合するのは、皮膚からリンパ節に移動してきた CD103 陽性の樹状細胞であることが判明した。またリンパ節内で増殖・分化した CTL は、癌細胞の殺傷を開始する前に、腫瘍組織に侵入した CTL は、抗原特異性に関係なく腫瘍組織の辺縁部に存在する樹状細胞付近へと引き寄せられることが観察された。そして引き寄せられた CTL が腫瘍抗原に特異的であった場合は、CD103 陽性の樹状細胞と安定接合を行うことが分かった。これらの結果から、腫瘍内の CD103 陽性樹状細胞との相互作用による CTL の増殖・分化の調節機構を明らかにすることが出来れば、より効率的な抗腫瘍免疫を促す方法の開発につながると考えられた。

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 10 件)

Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, Kusuba N, Otsuka A, Kitoh A, Honda T, Nakajima S, Tsuchiya S, Sugimoto Y, Ishii KJ, Tsutsui H, Yagita H, Iwakura Y, Kubo M, Ng Lg, Hashimoto T, Fuentes J, Guttman-Yassky E, Miyachi Y, Kabashima K (2014) Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol* 15:1064-1069, 査読有
DOI: 10.1038/ni.2992

Ise W, Inoue T, McLachlan JB, Kometani K, Kubo M, Okada T, Kurosaki T (2014) Memory B cells contribute to rapid Bcl6 expression by memory follicular helper T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:11792-11797, 査読有
DOI: doi: 10.1073/pnas

Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, Suda W, Atarashi K, Doi Y, Tsutsui Y, Qin H, Honda K, Okada T, Hattori M, Fagarasan S (2014) Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* 41:152-165, 査読有

DOI: 10.1016/j.immuni

Moriyama S, Takahashi N, Green JA, Hori S, Kubo M, Cyster JG, Okada T (2014) Sphingosine-1-phosphate receptor 2 is critical for follicular helper T cell retention in germinal centers. *J Exp Med* 211:1297-1305, 査読有
DOI: doi: 10.1084/jem.20131666

Okada T, Moriyama S, Kitano M (2012) Differentiation of germinal center B cells and follicular helper T cells as viewed by tracking Bcl6 expression dynamics. *Immunol Rev* 247: 120-132, 査読有
DOI: 10.1111/j.1600-065X.2012.01120.x

Hirata E, Yukinaga H, Kamioka Y, Arakawa Y, Miyamoto S, Okada T, Sahai E, Matsuda M (2012) In vivo fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion. *J Cell Sci* 125: 858-868, 査読有
DOI: 10.1242/jcs.089995

Baumjohann D, Okada T, Ansel KM (2011) Cutting Edge: Distinct waves of BCL6 expression during T follicular helper cell development. *J Immunol* 187: 2089-2092, 査読有
DOI: 10.4049/jimmunol.1101393

Kitano M, Moriyama S, Ando Y, Hikida M, Mori Y, Kurosaki T, Okada T (2011) Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* 34: 961-972, 査読有
DOI: 10.1016/j.immuni.2011.03.025

[学会発表](計 15 件)

Takaharu Okada, Imaging of cellular dynamics during adaptive immune responses, International Symposium on Multi-dimensional Fluorescence Live Imaging of Cellular Functions and Molecular Activities, 2015 年 1 月 27 日、京都国際会館(京都府京都市)
Takaharu Okada, Cellular dynamics of adaptive immune responses in the lymph node, Australasian Society for Immunology Annual Scientific Meeting 2014, 2014 年 12 月 2 日、Wollongong, Australia

Takaharu Okada, Imaging of adaptive immune responses in the lymph node, 第 37 回内藤コンファレンス Bioimaging-a paradigm shift for the life sciences, 2014 年 7 月 17 日、ヒルトンニセコビレッジ(北海道ニセコ町)
岡田峰陽, イメージングで解析する免疫細胞ダイナミクスの制御メカニズム, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 4 日

Takaharu Okada, Imaging of dendritic cells important for cytotoxic T cells, The 3rd International Symposium by JSPS Core-to Core Program: Cooperative International Framework in TGF-beta Family Signaling, 2013 年 10 月 29 日、大和屋本店(愛媛県松山市)

Takaharu Okada, Imaging of cross-presenting dendritic cells in the lymph node, カリフォルニア大学サンフランシスコ校 Immunology Seminar Series, 2012 年 10 月 8 日、San Francisco, CA, USA

Takaharu Okada, Imaging of cellular dynamics underlying the immune tissue organization, 25th Annual Mouse Molecular Genetics Conference, 2012 年 10 月 5 日、Pacific Grove, USA

Takaharu Okada, Imaging of cellular dynamics during the adaptive immune response, 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012 年 08 月 28 日、京都国際会館(京都府京都市)

Takaharu Okada, Imaging of lymphocyte dynamics during the germinal center formation, 第 40 回日本免疫学会学術集会 国際シンポジウム 5, 2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

岡田峰陽, 胚中心形成におけるリンパ球ダイナミクス, 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会シンポジウム 82011 年 11 月 10 日グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都港区)

岡田峰陽, 免疫応答におけるリンパ球移動と相互作用のイメージング, 第 63 回日本細胞生物学会大会サテライトシンポジウム 1, 2011 年 6 月 29 日、北海道大学クラーク会館(北海道札幌市)

[図書](計 2 件)

Kitano M, Okada T (2012) Four-dimensional tracking of lymphocyte migration and interactions in lymph nodes by two-photon microscopy. *Methods Enzymol* 506: 437-454

DOI: 10.1016/B978-0-12-391856-7.00047-0

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.imaging.lif.kyoto-u.ac.jp/organization/okada.html>

http://www.riken.jp/research/labs/ims/tissue_dyn/

<http://www.riken.jp/pr/press/2011/20110603/>

http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140609_1/

アウトリーチ活動

2011年12月9日(金)14:40~15:00 に放送されたNHK(Eテレ)の高校講座「生物」体液と生体防御～体を守る細胞のネットワーク～」のために、本研究課題の成果を紹介する免疫細胞イメージング動画の提供

2011年10月8日(土)に行われた(独)理化学研究所横浜研究所の一般公開イベントにおいて、本研究課題の成果をポスターや動画を用いて紹介

2012年8月19日(日)に行われた日本免疫学会のアウトリーチ活動イベント「免疫ふしぎ未来2012」(日本科学未来館)において、本研究課題の成果に関連するアトラクションを開催

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田 峰陽 (OKADA, Takaharu)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50452272

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当なし