

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08526

研究課題名(和文)5D生体イメージングによる免疫応答の可視化解析

研究課題名(英文)Visualization of immune responses by 5D intravital imaging

研究代表者

安達 貴弘 (ADACHI, Takahiro)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50222625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：独自に樹立したカルシウムバイオセンサーYC3.60を細胞系譜特異的に発現するマウスを利用して、生体内で免疫細胞特異的にカルシウムシグナルの可視化を行った。免疫応答時におけるB細胞のカルシウムシグナルを明らかにし、さらに自己免疫疾患やアレルギーなどの病態モデルにおいて発症前からB細胞のカルシウムシグナルに異常があることを見出し、超早期の未病が検出できることを示した。

研究成果の概要(英文)：Calcium ion ( $Ca^{2+}$ ) signaling is a typical phenomenon mediated through immune receptors, and it is important for their biological activities. To analyze their signaling together with their in vivo dynamics, we generated a stable transgenic mouse line with the calcium indicator Yellow Cameleon 3.60 (YC3.60). We obtained mice with the specific YC3.60 expression in immune cells. We established five-dimensional (5D) (x, y, z, time,  $Ca^{2+}$ ) intravital imaging of various lymphoid tissues including the spleen, bone marrow and Peyer's patches. Furthermore, in autoimmune-prone model mice,  $Ca^{2+}$  fluxes were augmented, although they did not induce autoimmune disease. Intravital imaging of  $Ca^{2+}$  signaling in lymphocytes may improve assessment of the risk of autoimmune diseases in model animals. These results suggest that intravital imaging of  $Ca^{2+}$  signaling may enable to evaluate immune responses under pathological and physiological conditions.

研究分野：免疫学

キーワード：イメージング カルシウムシグナル B細胞 シグナル伝達 未病 アレルギー 自己免疫

## 1. 研究開始当初の背景

B細胞やT細胞をはじめとした免疫担当細胞でのシグナル伝達機構は、その下流の代表的なカルシウムシグナリングやMAPキナーゼの活性化などを指標におもに *in vitro* で解析が行われてきた。しかし、生体内では免疫細胞は移動しながら他の細胞や環境と相互作用しながら活性化を受け、分化・増殖、細胞死などの運命決定がなされている。そこでこの複雑な免疫系を正確に理解するためには、生体内での生理的な条件下でのシグナル伝達解析が不可欠である。生理的条件下での免疫細胞の動態解析は蛍光タンパク質を利用した可視化マウスの生体イメージングにより随分わかってきた。しかし、細胞内シグナル伝達まで可視化して、活性化をリアルタイムでモニターできる系はあまりない。そこで、免疫細胞のシグナル伝達の主要な一つで、かつ検出感度がよいカルシウムシグナリングを生体で可視化することを目指してきた。分子内に2つの発色団を持ち、動きによる計測値の変化を補正できる Yellow cameleon (YC3.60) のようなカルシウムバイオセンサーは活発に動く免疫細胞のモニターに適しているが、それらを用いたマウスの作製は困難を極めており、トランスジェニックマウスができて免疫系の細胞では発現せず (Direnberger et al. Nat Commun 2012)、ウイルスベクターを使って発現させた細胞をマウスに移入する方法くらいしかなかった (Mues et al. Nat Med 2013)。YC3.60 においても、複数の研究機関で試みられたにもかかわらず、なかなか成功しなかった。私は YC3.60 が免疫系の細胞のシグナル解析に使えることを確認 (安達ら、BBRC, 2008) 後、生体内で免疫系のシグナル伝達を明らかにすべく、トランスジェニックマウスの作製にとりかかり、Cre/LoxP の誘導系と組み合わせたところ、細胞系譜特異的に YC3.60 を発現できるカルシウムレポーターマウスの作製に成功した。CD19-Cre マウスを交配させ、B細胞特異的 YC3.60 発現マウスでは、麻酔したマウス個体での生体イメージングによって、B細胞の動態のみならず、カルシウムシグナリングもきれいに検出できる 5D 生体イメージングシステム (x、y、z、時間、シグナリング) を構築している。

## 2. 研究の目的

- (1) 細胞系譜特異的カルシウムレポーターマウスを使った解析を中心に B細胞、T細胞、樹状細胞を中心に、各種免疫担当細胞の動態および活性化をモニターし、生理的条件下の免疫反応を解明すること、
- (2) 上記(1)と同様の方法で、記憶細胞に焦点を当て、記憶免疫応答の活性化の機序解明、
- (3) 自己免疫疾患やアレルギー疾患モデルマウス生体内での免疫細胞の動態および活性化を調べることで、それらの病因・病態解

明を行うこと  
の3つを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス

カルシウムバイオセンサー YC3.60 を条件的に発現するトランスジェニックマウス (Floxed YC3.60 トランスジェニックマウス) は CAG プロモーター (サイトメガロウイルス/チキン アクチン) を持ち、プロモーター下流に並列に LoxP 配列で挟んだネオマイシン耐性遺伝子、そのさらに下流に YC3.60 遺伝子を持つ。この floxed YC3.60 マウスとそれぞれ B細胞特異的に、樹状細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現する CD19-Cre マウス、CD1c-Cre マウスと交配し、B細胞特異的、樹状細胞特異的に YC3.60 を発現するマウスおよび CAG-Cre マウスと交配して全身性に YC3.60 を発現するマウスを用いた。マウスは本研究所・組換えマウス実験室の SPF の環境で飼育した。遺伝子組換えマウスは東京医科歯科大学動物実験委員会および組換え DNA 安全委員会の承認を得て、指針に従って実験に用いた。

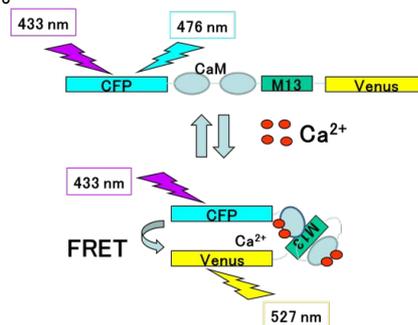


図1. YC3.60 の構造 433nm 付近の励起波長では通常は CFP の蛍光がみられるが、カルシウム存在下では立体構造変化し、CFP と Venus が近接し、CFP から Venus にエネルギーが転移し CFP の代わりに Venus の蛍光波長を発する。

### (2) カルシウムイオンの測定

蛍光タンパク質カルシウムプローブ YC3.60 を用いた。YC3.60 は CFP と YFP の間にカルモジュリンのカルシウム結合ドメインを持ち、カルシウム結合状態では分子内の CFP と YFP が隣接し、CFP から YFP へのエネルギー移動 (Fösterresonance energy transfer: FRET) が起こる (図1)。このエネルギー移動の効率を測定し、細胞内のカルシウム濃度の変化を検出した。FRET の測定は共焦点顕微鏡 (ニコン社製共焦点レーザー顕微鏡 A1 システム) を用いた。

### (3) 生体イメージング

マウスを麻酔後、腹部あるいは脇腹の腹膜の一部を外科的に切開して脾臓、あるいは腸管表面に出し、マウスを観察台に固定し、臓器の動きを最小限にとどめるようにして生体

イメージングを、ニコン社製共焦点レーザー顕微鏡 A1 システムを用いておこなった。励起波長 458nm で YFP と CFP の蛍光波長を測定し、YFP/CFP の比をとることによって FRET を検出した。

#### 4. 研究成果

これまでに Cre/LoxP システムを利用して細胞系譜特異的にカルシウムバイオセンサー YC3.60 を発現するマウスを樹立し、マウス個体を用いた生体イメージングを行ってきた。

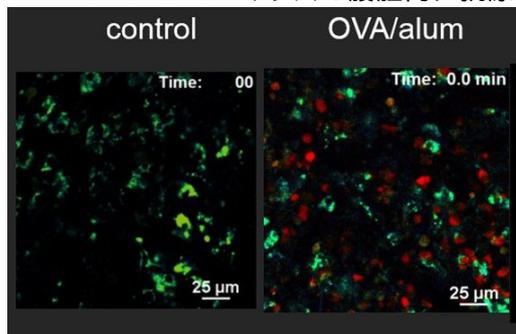
##### (1) 細胞特異的 YC3.60 発現マウス

CD19-Cre マウス、CD4-Cre マウス、Nestin-Cre マウスと交配して B 細胞、T 細胞、神経細胞特異的に YC3.60 を発現するマウスを作製した。B 細胞特異的 YC3.60 発現マウスを用いて、YC3.60 の発現を B 細胞の分化段階で調べた。Cre ドライバー特異的に発現が確認された。

##### (2) 自己免疫疾患モデル

自己免疫疾患は発症しないが遺伝的素因を持つ B 細胞抗原受容体の抑制性経受容体 CD22 欠損マウス、あるいはアポトーシスにかかわる Fas の変異マウスで C57BL/6lpr マウスにおいて、脾臓 B 細胞のカルシウムシグナルの亢進がみられた。また T 細胞特異的に YC3.60 を発現する C57BL/6lpr マウスにおいても脾臓 T 細胞でのカルシウムシグナルの亢進がみられた。これらのことは、自己免疫疾患において自己抗体産生以前の超早期に B 細胞のカルシウムシグナルに異常がみられることを示しており、カルシウムシグナルを指標とすれば、臨床的な病態の発症以前(未病の状態)に異常を検出できることを示唆している。

(3) 腹腔内免疫による樹状細胞の活性化  
腸管パイエル板においても生体イメージングシステムを構築しており、CD11c-Cre/YC3.60 マウスの腹腔内に抗原投



Intracellular  $Ca^{2+}$  conc.  
(low) (high)

図2 .PBS のみを腹腔投与したコントロールマウスのパイエル板(左)。OVA/alum を腹腔投与したマウスのパイエル板。投与2時間後、生体イメージングにて観察した。

与後2時間程度で、樹状細胞の細胞内カルシウム濃度の上昇が見られ、動きも活発になっていることが明らかになった(図2)。

##### (4) 無菌マウス

無菌マウスでは免疫が未熟でアレルギーになりやすいとされるので、無菌 YC3.60 発現マウスを作製し、生体イメージングで脾臓を観察したところ、恒常的に細胞内カルシウムが上昇した細胞が存在していることが認められ、炎症が蓄積していることが推測された。

##### (5) 腸炎モデル

腸炎と免疫細胞のカルシウムシグナリングの関連を調べるために、CRISPR/Cas9 のシステムを利用して作製した IgA 欠損マウスでは、小腸で炎症が自然発症し、パイエル板の B 細胞でもカルシウムシグナルが亢進していることがわかっていたので、さらに解析を行った。また、IA 欠損マウスを作製したところ、小腸で軽い炎症が見られ、子のマウスの小腸

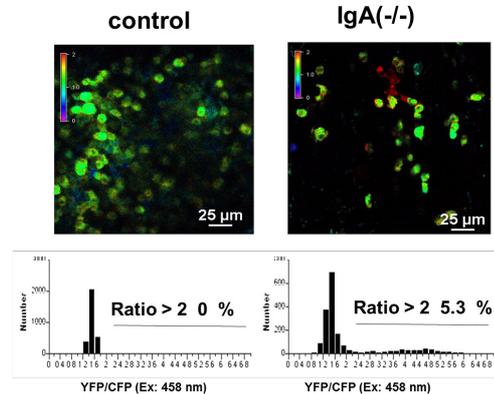


図3 .コントロールマウス(左) IgA 欠損マウス(右)。麻酔下のマウスを用いた生体イメージングにて小腸パイエル板を観察した。下記は個々の細胞の ratio の値をグラフ化した。Ratio が2以上を細胞内カルシウム濃度の高い細胞とし、その割合を示した。

パイエル板を解析したところ(図3)、B 細胞のカルシウムシグナリングが亢進していることが判明した。炎症性腸炎モデルである DSS 腸炎を誘導した YC3.60 マウスではパイエル板 B 細胞のカルシウムシグナリングが著しく亢進していた。これらのことより、炎症性の腸炎での B 細胞の異常な活性化があることが強く示唆された。このマウスの腸内細菌叢の解析から、炎症を誘導する細菌が小腸で増加していることを見出し、抗生物質投与により小腸での炎症が見られなくなり、小腸の炎症は腸内細菌に起因していることが示唆された。また、炎症性大腸炎のモデルであるオキサゾロン投与による腸炎モデルマウスの盲腸で、B 細胞の活性化が起こっていることがわかった。

##### (6) アレルギーモデル

アレルギーを発症しやすい高 IgE 産生の IgE ノックインマウスでも、YC3.60 発現マウスと交配し、脾臓の免疫細胞を調べたところ、無処理のアレルギーを発症しないマウスでも恒常的に活性化している細胞が増加していることが示唆された(図4)。

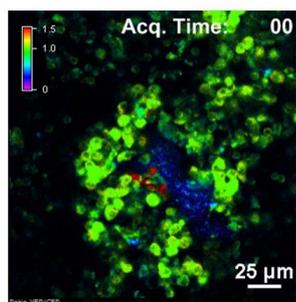


図4 .IgE ノックインマウスの脾臓を生体イメージングにて観察した。

#### (7) まとめ

これらのことより病態発症に先立って免疫細胞の異常な活性化があることが明らかになった。さらに腸管での食シグナルの可視化にも成功した。

さらに、肺の生体イメージング系も確立した。

これまでの自己免疫疾患モデル、炎症性腸炎など疾患モデルのB細胞を解析した結果より、免疫細胞のカルシウムシグナリングの kinetics と病態の重症度に相関があることを見出し、シングルセルレベルでの解析による病態解析方法を提唱した。この解析方法により、病態の超早期が検出できることが強く示唆された。

#### 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 5件)

Watabe T, Nagaiishi T, Tsugawa N, Kojima Y, Jose N, Hosoya A, Onizawa M, Nemoto Y, Oshima S, Nakamura T, Karasuyama H, Adachi T, Watanabe M. B cell activation in the cecal patches during the development of an experimental colitis model. *Bioch Biophys Res Commun* 496:367-373 2018. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.053

安達貴弘「生体イメージングによる食シグナルおよび超早期未病の可視化解析」*科学と生物* 2017. doi: 10.1271/kagakutoseibutsu56.345

Adachi T, Kakuta S, Aihara Y, Kamiya T, Watanabe Y, Osakabe N, Hazato N,

Miyawaki A, Yoshikawa S, Usami T, Karasuyama H, Kimoto-Nira H, Hirayama K, Tsuji NM. Visualization of Probiotic-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in intestinal epithelial cells *in vivo*. *Front Immunol.* 7:601. 2016. doi: 10.3389/fimmu.2016.00601.

Yoshikawa, S., Usami, T., Kikuta, J., Ishii M., Sasano, T., Sugiyama, K., Furukawa, T., Nakasho, E., Takayanagi, H., Tedder, T.F., Karasuyama, H., Miyawaki, A., and Adachi, T. Intravital imaging of Ca<sup>2+</sup> signals in lymphocytes of Ca<sup>2+</sup> biosensor transgenic mice: indication of autoimmune diseases before the pathological onset. *Sci. Rep.* 6:6:18738. 2016. doi:10.1038/srep18738.

##### [学会発表](計 23件)

安達貴弘 「生体イメージングによる食シグナルの可視化解析」日本農芸化学会シンポジウム 2018年 名古屋

安達貴弘. 食シグナルおよび未病の生体イメージング解析 第5回先進イメージング医学研究会 2018年 有馬グランドホテル

Takahiro Adachi. Intravital imaging of cellular signaling in immune cells. The 3<sup>rd</sup> International Symposium on Stem Cell Traits and Developmental Systems. KEY Forum 2018. 2018. Kumamoto.

安達貴弘.「腸管免疫細胞および食シグナルの可視化解析」第26回内毒素・LPS研究会 2017年 東京

ADACHI Takahiro, YOSHIKAWA Soichiro, KARASUYAMA Hajime. Intravital imaging of Ca<sup>2+</sup> signals in lymphocytes of the Ca<sup>2+</sup> biosensor YC3.60 transgenic mice. 日本免疫学会 2017年 仙台

ADACHI Takahiro, KARASUYAMA Hajime, YOSHIKAWA Soichiro, Visualization of immune responses by intravital imaging of Ca<sup>2+</sup> signals. 日本免疫学会 2016年 宜野湾、沖縄

ADACHI Takahiro, YOSHIKAWA Soichiro, KARASUYAMA Hajime, ONODERA Taishi, TAKAHASHI Yoshimasa, KIKUTA Junichi, ISHII Masaru, TEDDER F. Thomas.

Intravital imaging of Ca<sup>2+</sup> signals in lymphocytes of the Ca<sup>2+</sup> biosensor YC3.60 transgenic mice. 日本免疫学会 2015年 札幌

##### [図書](計 2件)

辻典子、平山和宏、安達貴弘 **食と炎症・**

**免疫**：乳酸菌と免疫恒常性 炎症と免疫 25(1) 34 41 2016年12月  
**安達貴弘 食と炎症・免疫**：B細胞のカルシウムシグナル 炎症と免疫 24(1) 67 73 2015年12月

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授  
研究者番号：50222625

〔産業財産権〕

出願状況（計 3件）

名称：耐塩性乳酸菌、耐塩性乳酸菌の培養方法、及び免疫賦活剤

発明者：熊澤利彦・西村篤寿・浅井紀之・安達貴弘

権利者：イチビキ株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学

種類：特許

番号：特願 2017-175169、PCT/JP2017/32933

出願年月日：2017年9月12日

国内外の別：国内・国外

名称：乳酸菌

発明者：熊澤利彦・西村篤寿・浅井紀之・安達貴弘

権利者：イチビキ株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学

種類：特許

番号：特願 2018-026443

出願年月日：2018年2月16日

国内外の別：国内

名称：バチルス属細菌

発明者：熊澤利彦・西村篤寿・浅井紀之・安達貴弘

権利者：イチビキ株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学

種類：特許

番号：特願 2018-026444

出願年月日：2017年9月12日

国内外の別：国内

取得状況（計 1件）

名称：耐塩性乳酸菌、耐塩性乳酸菌の培養方法、及び免疫賦活剤

発明者：熊澤利彦・西村篤寿・浅井紀之・安達貴弘

権利者：イチビキ株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学

種類：特許

番号：特許第 6337262号

取得年月日：2018年5月18日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/news/p1/17/01/27/02211/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達貴弘 (ADACHI, Takahiro)