

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08796

研究課題名(和文) COPDマウスモデルの生体肺イメージングによるリンパ球リクルーティング解析

研究課題名(英文) Lymphocyte recruitment analysis by intravital imaging in COPD mouse model

研究代表者

上岡 裕治 (KAMIOKA, Yuji)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：50511424

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)：慢性炎症によって新生する三次リンパ組織(TLO)がリンパ球の分化・相互作用の場として機能し、病態に深く関与することが報告されている。しかし、TLOの形成メカニズムやTLOでのリンパ球リクルーティング(細胞動態)についてはこれまで免疫組織化学的手法を元に断片的にしかわかっていない。これらの疑問を解決するためには、TLOでの一つの細胞動態を詳細に解析する必要がある。本研究では慢性閉塞性肺疾患(COPD)マウスモデルの生体肺を二光子励起顕微鏡で直接観察し、細胞動態を解析することを目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COPD初期症状は風邪などと似ているため放置されるケースが多く、COPD初期の臨床データは不足している。またマウスを用いた基礎研究の場合、細胞レベルでのイメージングは呼吸運動による撮影ズレのためにこれまで困難であった。

申請者は、細胞レベルで生体組織を撮影できる二光子励起顕微鏡と、人口呼吸器、真空ポンプを組み合わせることによって、撮影ズレを極力抑えた生体肺イメージングシステムを構築した。本研究は、COPDの初期発生メカニズムおよび悪性化メカニズムを細胞レベルで解明し、COPDの早期発見や悪性化の抑制につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Tertiary lymphoid tissue (TLO) induced by chronic inflammation has been reported to function as a place for differentiation and interaction of lymphocytes and is deeply involved in pathological conditions in human diseases. However, the mechanism of TLO formation and the recruitment of lymphocytes in TLO have been partially understood based on conventional, immunohistochemical techniques. To solve these questions, it is necessary to analyze the cell dynamics of each TLO in detail. In this study, we aimed to analyze the cell dynamics by directly observing the living lung of a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease with a two-photon excitation microscopy.

研究分野：細胞生物学、蛍光イメージング

キーワード：COPD intravital imaging イメージング 炎症 細胞動態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リンパ球は血管系とリンパ組織の間を循環することで、免疫系の恒常性を保っている。Naïve T細胞や Central memory T細胞は高内皮細静脈 (High Endothelial Venule : HEV) という特殊な小静脈を経由して、血液中から二次リンパ組織 (Secondary Lymphoid Organs : SLO) である末梢リンパ節にリクルートされる。また急性炎症においては、血管内皮細胞側に発現した P/E-selectin への接着をきっかけとして、リンパ球が炎症部位へとリクルートされる。近年の研究では、慢性炎症によって三次リンパ組織 (Tertiary Lymphoid Organs : TLO) が新生されることが知られている (参考文献 )。TLO では HEV 類似血管のみならず、T-cell zone、B-cell zone も形成されており、TLO がリンパ球の分化・相互作用の場としても機能していると考えられる。しかし、TLO と慢性炎症疾患との関係性は未だ不明な点が多い。例えば、高齢者腎臓病では TLO が炎症を遷延化させる予後不良因子であると報告されている。一方で、一部の腫瘍では TLO はリンパ球のリクルーティングに寄与し、予後が良いことの指標となっている。慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease : COPD) で形成される TLO は inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (iBALT) と呼ばれており、COPD の悪性度と正の相関があるが、iBALT は感染防御の面では必要だと考えられている (参考文献 )。TLO 形成の分子メカニズムは近年精力的に研究されているものの、リンパ球がいつ、どのように TLO に到着し、そこから炎症部位に向かって行くのかは未だ明らかでない。また、急性炎症から慢性炎症にかけて TLO がどのように成熟していくのかは、これまで免疫組織化学的手法を元に断片的にしかわかっていない。これらの疑問を解決するためには、TLO および HEV 類似血管での一つの細胞動態を詳細に解析する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) で見られる TLO の一種「iBALT」をマウスモデルで再現し、iBALT 内での HEV 類似血管を通るリンパ球のリクルーティングメカニズムを明らかにすることを目的とした。二光子励起顕微鏡を用いたマウス生体肺イメージングシステム (図 1) によって、細胞動態、細胞間相互作用、分子活性を測定できる点がこれまでにない新しいアプローチである。本研究成果によって、COPD 初期から悪性化までのプロセスが分子レベル、細胞レベルでわかるとともに、TLO を介した高効率リンパ球リクルーティング法またはリクルーティング阻害法の開発が期待できると考えている。

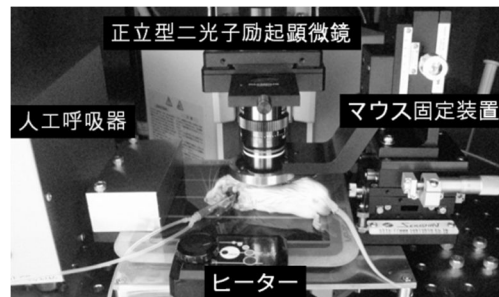


図 1 申請者が開発したマウス肺イメージングシステム (真空ポンプの吸引力で肺が吸引部に固定される。)

### 3. 研究の方法

本研究課題では、COPD (肺気腫) マウスモデル (参考文献 ) を用いて、TLO (iBALT) における HEV 類似血管を介したリンパ球リクルーティングを生体イメージング、FACS などの手法で解析する。本研究課題は以下 3 点である。

- 生理的な条件下 (SLO) での HEV と、慢性炎症によって誘導される iBALT での HEV 類似血管ではリンパ球の細胞接着、血管外遊走がどのように違うのか? (Selectin や Integrin リガンドなどの接着分子の発現の違いを調べる。)
- iBALT やその近傍に存在する免疫担当細胞 (T細胞、B細胞、単球、顆粒球、樹状細胞など) が炎症過程のいつ頃、どのようにリクルートされるのか? また、それらのリクルート過程で Rap1 シグナルの関与はあるのか?
- 免疫反応の場として TLO 内のどこで、どのような細胞間相互作用が起こっているのか?  
申請者が現在所属している研究室では、細胞動態を制御する低分子量 Gタンパク質 Rap1 の交換因子 (RapGEF1, RasGRP2)、不活化因子 (Sipa1, Rasa3)、エフェクター分子である RAPL, Mst1/Mst2 等の各種変異体や遺伝子組換えマウス、ロックアウトマウス、各種阻害剤 (阻害抗体) を所有している。これらの研究資材を活用して実験を行う。

### 参考文献

- Nat Rev Immunol.* 6(3):205-17 (2006)  
*JCI Insight.* 21;1(11):e87680 (2016)  
*Front Immunol.* 22;7:244. doi: 10.3389/fimmu.2016.00244 (2016)  
*Mucosal Immunol.* 3(6):537-44 (2010)  
*Am J Respir Cell Mol Biol.* 49(6):971-7 (2013)

#### 4. 研究成果

COPDモデルマウス作製に関しては多数の報告があるものの、ヒト疾患を正確に再現するには限界がある。今回は簡便性を優先し、エラストラーゼとLPSの投与によるCOPDモデル(参考文献)を本研究で行う方針であった。しかし、気管内投与に用いるスプレー MicroSprayer (Penn-Century社)が製造中止で入手できなくなったため、スプレーの自作から検討した。噴霧ムラや粒径制御などの細かい点は十分な確認ができていないが、自作スプレーでもマウス肺に薬液噴霧できることを確認した(図2)。当初予定していたタバコ煙吸引装置やタバコ煙溶液のネブライザーによる薬液投与は動物実験施設内排気の問題等で導入を断念した。経鼻投与による薬液投与は気管肥厚や細胞数増加(気管支肺胞洗浄液(BALF)解析による)は認められたが、マウス肺表面(外観)での顕著な病態は認められなかったため、自作スプレーによる気管内薬液投与を本研究で採用した。

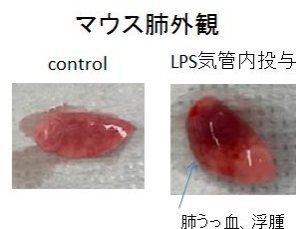


図2 気管内LPS投与による肺炎モデル作製

二光子励起顕微鏡下でマウス肺の生体蛍光観察を行うため、赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現する遺伝子組換えマウスの骨髓細胞を移植することで血球細胞のみで tdTomato を発現する TdTomato BMT (Bone Marrow Transplant) マウスを作製した。

TdTomato BMT マウスに気管内投与することで肺での炎症を惹起し、炎症細胞の増加を二光子顕微鏡観察およびBALFのFACS解析で確認した(図3)。興味深いことに、後述の細胞接着制御因子のひとつ Talin-1 を好中球特異的に遺伝子欠損(以下、KO)させたマウスでは、急性期におけるBALF細胞数はコントロールと大きな差が見られなかった(図4)。Talin-1 KO マウスではバラつきが大きい点もあり、今後の詳細な解析が必要であるが、急性期の細胞動員には細胞接着に依存しないメカニズムの可能性が示された。

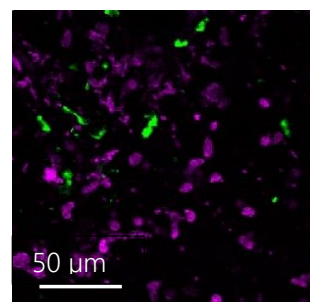


図3 TdTomato BMT マウス生体肺の二光子顕微鏡観察(LPS 100 μg 気管内投与 24時間後)  
好中球、M、血小板  
Netosis (DNA)+その他の細胞死

急性期の肺炎モデルを確認できたが、10週以上経過させた慢性炎症モデルを確認できず、本研究課題の一つである iBALT の生体観察は達成できなかった。原因としては、強い薬液投与条件ではマウスが1-2週間程度で死んだこと、弱い薬液投与では病態が見られなかった、または完治してしまったことが挙げられる。現在は、中長期実験向けの条件検討を行っているが、二光子顕微鏡観察では露出できる肺領域が限られているため、その狭い領域内で iBALT を生体観察することは困難である。今後は iBALT の誘導条件検討を行う上でも、蛍光/発光イメージングシステム IVIS (パーキンエルマー社)のようなマウス1個体を長期的に解析できる非侵襲的測定系が必要だと考えている。

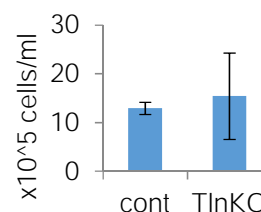


図4 好中球特異的 Talin-1 ノックアウトマウスのBALF

慢性炎症によるTLOとしては今回観察対象とした iBALT だけでなく、腸では inducible gut-associated lymphoid tissue (iGALT)の研究が盛んに進められている。しかし、細胞動態を含めた iGALT 解析は未だ手つかずの部分が多い。観察の技術的難易度については腸が肺より低く、本研究課題にも合うことから腸の慢性炎症モデル、Lamina propria および Peyer's patch の生体観察にも着手した(図5)。

Naïve T細胞のリンパ節 HEV へのリクルーティングは多段階で起こるモデルが提唱されている。まず、血流中を流れている T細胞表面の L-Selectin (CD62L) と HEV 上の PNA<sub>d</sub> (peripheral node addressin) と総称される糖鎖結合タンパク質との比較的弱い相互作用により Rolling (回転) が起こる。Rolling により減速した T細胞は HEV 上のケモカインによって接着分子 Integrin の活性化を起こし、HEV に発現する ICAM-1 に強く接着することで Arrest (停止) する。この一連の Integrin 活性化は低分子 G タンパク質 Rap1 とその下流因子 Kindlin-3、Talin-1 に制御されている(図6)。CD4-Cre による T細胞特異的な Rapシグナル分子の KO マウスを作出し、細胞接着能を in vitro と in vivo の両面から検討した。Rap1a, Rap1b double KO(以下、Rap1DKO)および Talin-1KO マウスのリンパ節においては T細胞が野生型と比較して 10%以下に減少していたが、Kindlin-3 KO マウスではリンパ節における T細胞の細胞数は 30 - 40%程度の減少であった。リンパ節内の HEV における移入 T細胞の分布にも注目し、リンパ節スライスを共焦点顕微鏡で詳細に解析した結果、Rap1DKO T細胞、Talin-1KO 細胞は HEV への集積が 10%



図5 Peyer's patch に集積した移入細胞の生体観察

以下に低下していた一方で、Kindlin-3 KO T細胞は太いHEVへの残留が認められた。ケモカイン依存的な接着能を評価する *in vitro* flow assay 系を構築し、Rap1DKO T細胞、Kindlin-3 KO T細胞および Talin-1 KO T細胞を定量的に評価する解析系も構築した(図7)。ICAM-1、VCAM-1、MAdCAM-1 に対する接着能を失っていたが、ICAM-1 と VCAM-1 の共存条件下においては Kindlin-3KO T細胞で接着能が回復することが示された。より詳細に Rap1 シグナルを解析するため、Rap1 の上流に位置する活性化因子 GEF( グアニンヌクレオチド交換因子) の C3G、RasGRP2 それぞれの KO マウスおよびダブル KO マウスを作出した。C3G KO T細胞、RasGRP2 KO T細胞では ICAM-1、VCAM-1、MAdCAM-1 に対する接着能が shear stress 依存的に低下し、C3G/RasGRP2 DKO T細胞においては接着能がさらに低下した。C3G、RasGRP2 の違いについても興味深い結果が得られたため、炎症モデル共に解析を進めている。  
(学会発表済み、論文作成中)

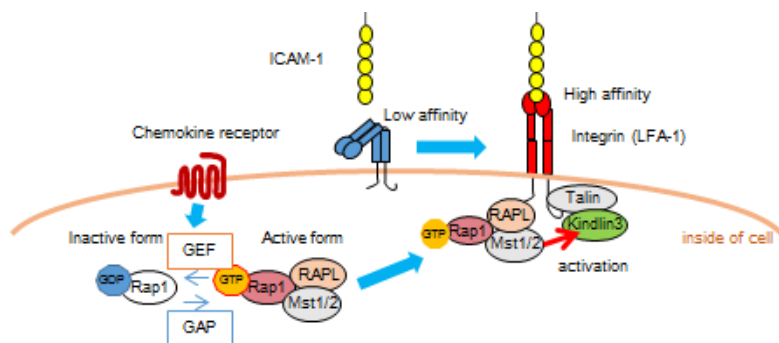
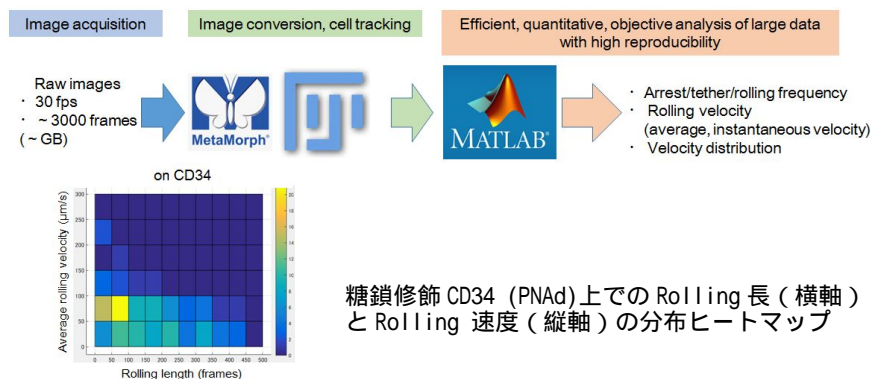


図6 低分子量 G タンパク質 Rap1 が制御する細胞接着シグナル



糖鎖修飾 CD34 (PNAd) 上での Rolling 長 (横軸) と Rolling 速度 (縦軸) の分布ヒートマップ

図7 本研究で構築した画像データの定量的解析フロー(上)および解析例(下)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 1件）

1. 著者名 Y. Konagaya, K. Terai, Y. Hirao, K. Takakura, M. Imajo, Y. Kamioka, N. Sasaoka, A. Kakizuka, K. Sumiyama, T. Asano, M. Matsuda.	4. 巻 28
2. 論文標題 A Highly Sensitive FRET Biosensor for AMPK Exhibits Heterogeneous AMPK Responses among Cells and Organs.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2628-2638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2017.10.113.	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 T. Hiratsuka, T. Sano, H. Kato, N. Komatsu, M. Imajo, Y. Kamioka, K. Sumiyama, F. Banno, T. Miyata, M. Matsuda.	4. 巻 15
2. 論文標題 Live imaging of extracellular signal regulated kinase and protein kinase A activities during thrombus formation in mice expressing biosensors based on Foerster resonance energy transfer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 1487-1499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jth.13723	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 Komatsu N, Terai K, Imanishi A, Kamioka Y, Sumiyama K, Jin T, Okada Y, Nagai T, Matsuda M.	4. 巻 8
2. 論文標題 A platform of BRET-FRET hybrid biosensors for optogenetics, chemical screening, and in vivo imaging.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8984
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-27174-x.	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kamioka Y, Ueda Y, Kondo N, Kinashi T
2. 発表標題 Roles of Rap1 signaling in lymphocyte homing to peripheral and mucosal lymph nodes
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kamioka Y, Ueda Y, Kondo N, Kinashi T
2. 発表標題 Roles of Rap1, Talin-1 and Kindlin-3 in lymphocyte homing to peripheral and mucosal lymph nodes
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ueda Y, Kondo N, Kamioka Y, Kinashi T
2. 発表標題 Regulation of cell polarization by Rap1 via NDR/Rab8 axis upon chemokine stimulation
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kinashi T, Kondo N, Ueda Y, Kamioka Y
2. 発表標題 Rap1 signaling to NDR1 kinase regulate immune synapse formation and cell polarity.
3. 学会等名 The 9th Xiamen Winter Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kamioka Y, Ueda Y, Kondo N, Kinashi T
2. 発表標題 Roles of Rap1 and Kindlin-3 in lymphocyte homing to peripheral lymph nodes
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

関西医科大学生命医学研究所分子遺伝学部門  
<http://www3.kmu.ac.jp/molgent/>

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