

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20689011
 研究課題名（和文）2光子励起顕微鏡法によるB細胞応答における分化選択機構の研究
 研究課題名（英文）Two-photon microscopic analysis of B cell differentiation in the antibody response
 研究代表者
 岡田 峰陽 (Okada Takaharu)
 独立行政法人理化学研究所・免疫細胞動態研究ユニット・ユニットリーダー
 研究者番号：50452272

研究成果の概要（和文）：

抗体を産生する免疫応答において、B細胞の分化状態をモニターするために、胚中心B細胞のホールマーク転写因子 BCL6 のタンパク質発現を蛍光シグナルで追跡するレポーターマウスを開発した。2光子イメージング実験の結果から、BCL6の機能減弱により、分化途上のB細胞とヘルパーT細胞の胚中心への移入が阻害されることが分かった。また、免疫応答中のリンパ節におけるB細胞とT細胞の接合における、インテグリンの役割が明らかとなり、さらにB細胞とT細胞の接合体の移動には、リンパ節間質細胞ネットワークが重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In order to track germinal center B cell differentiation in antibody responses, a reporter mouse was established to quantify BCL6 protein expression in live cells. Two-photon imaging experiments revealed that migration of differentiating B cells and helper T cells into the germinal center was impaired by attenuated function of BCL6. In addition, integrins were shown to be involved in conjugation of cognate antigen-engaged B cells and T cells in the lymph node, and the stromal cell network was suggested to be important for migration of the B-T conjugates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2009年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 ・免疫学

キーワード：免疫学、細胞・組織、イメージング

1. 研究開始当初の背景
 免疫応答中の抗原特異的B細胞が、親和性成

熟を担う胚中心B細胞や、抗体を産生する形質細胞へと分化するための細胞内分子機構は、その中

核を司ると目される転写制御因子などの発見によって解明が進みつつある。しかしながら、胚中心B細胞への分化（もしくは分化状態維持）と形質細胞への分化、さらに記憶B細胞への分化という運命決定の調節機構は未知である。また多くの抗体産生反応におけるB細胞増殖と分化には、ヘルパーT細胞との相互作用が不可欠であるが、この相互作用のB細胞分化経路決定における役割は不明であった。

研究代表者は研究開始当初までに、米国で行った研究において、二光子励起蛍光顕微鏡を用いて、B細胞やT細胞の組織内動態解析を行い、抗体産生反応における細胞間相互作用動態を明らかにしていた。その中で、同じ抗原に対して親和性をもつB細胞とT細胞は、接合を持続しながら（5分～1時間以上）B細胞を先頭に動き回るといふ、独特の相互作用動態を示すことを見出していた。しかしながら、B細胞とT細胞の接合のメカニズムや、接合体の細胞移動のメカニズムは全く不明であった。

また、この持続的相互作用のB細胞分化調節における役割を解明するために、B細胞を分化段階特異的に追跡するイメージングシステムの開発が求められていた。特に胚中心B細胞の特異的転写制御因子BCL6の発現を、生きた細胞中で検出できれば、胚中心B細胞への分化過程や、胚中心B細胞から形質細胞・記憶B細胞への分化過程を追跡するための、強力な実験システムになると考えられた。また研究開始後に、抗体産生応答において最も重要なヘルパーT細胞サブセットと考えられている、濾胞ヘルパーT細胞の分化にもBCL6が必須であることが、他のグループにより報告された。このことから、BCL6発現追跡はヘルパーT細胞分化メカニズムを研究する上でも、重要なツールとなると考えられた。

2. 研究の目的

抗原特異的B細胞の胚中心B細胞への分化を、転写制御因子BCL6の発現を検出することにより追跡するシステムを構築する。これを用いて、B細胞の運命決定と、B細胞とヘルパーT細胞の組織内ダイナミクスを明らかにする。また、応答中のB細胞とT細胞の接合体の形成と移動のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

胚中心B細胞の特異的転写制御因子BCL6が、蛍光タンパク質との融合タンパク質になるように、マウスの遺伝子ターゲティングを行った。黄色蛍光タンパク質（YFP）が、BCL6のN末端側に付加された遺伝子産物が出来

るように、YFP遺伝子を導入した。

抗原に応答するB細胞やヘルパーT細胞におけるBCL6発現を追跡するために、作成されたYFP-BCL6マウスを、トリ卵白リゾチーム特異的B細胞受容体遺伝子導入マウス（Hy10）や、トリ卵白アルブミン（OVA）特異的T細胞受容体遺伝子導入マウス（OT-II）と交配した。この交配により得られたYFP-BCL6/Hy10マウス由来のB細胞と、YFP-BCL6/OT-II由来のCD4陽性T細胞を、野生型C57BL/6マウスに共移植した。細胞を移植されたマウスに、ニワトリ卵白リゾチーム（HEL）とOVAの共役タンパク質（HEL-OVA）を皮下投与することにより、移植されたB細胞とヘルパーT細胞の応答をリンパ節中に惹起した。リンパ節中のこれらの細胞のYFPシグナルを、様々な表面抗原発現とともに、フローサイトメトリーで解析を行った。またYFPシグナルをもとにソーティングした細胞を、ウェスタンブロットや、DNAマイクロアレイ解析に用いた。

Bcl6YFPマウスの作成と平行して、研究代表者が米国で確立した抗原特異的B細胞とT細胞の2光子顕微鏡観察システムの構築を行った。これを用いて、上記の免疫応答中のリンパ節内の移植B細胞とヘルパーT細胞の動態の解析を行った。移植リンパ球の可視化は、蛍光色素によるラベル化や蛍光タンパク質遺伝子導入により行い、リンパ節間質細胞の可視化は、蛍光タンパク質発現マウスの骨髄移植キメラマウスを移植レシビエントとして用いることにより行った。またB細胞とT細胞の接合メカニズムにおける接着分子インテグリンの役割を明らかにするために、alphaLインテグリンとalpha4インテグリンの阻害抗体を投与し、B細胞とT細胞の接合への影響を、2光子イメージングにより解析した。

4. 研究成果

（1）作成したYFP-BCL6マウスは、そのパイエル板組織内の胚中心細胞や、上記方法の移植リンパ球の解析から、胚中心B細胞や濾胞ヘルパーT細胞に選択的なYFPシグナルを示した。またheterozygousマウスにおいてYFP-BCL6遺伝子産物は、野生型BCL6遺伝子産物と、同じレベルのタンパク質量で発現していることが判り、YFP-BCL6マウスがBCL6タンパク質の発現のレポーターとして、有用であることが示された。リンパ球移植実験の結果から、免疫応答初期段階では、従来の細胞表面抗原のプロファイルから胚中心B細胞とされてきた細胞群のなかにも、BCL6を発現しているものと、まだ発現していないものの集団があることが明らかとなった。これらの細胞群をセルソーターで分画することにより、胚中心B細胞とその前段階の活性化B細胞の遺伝子発現プロファイルのより詳細な差が明らかとなった。

（2）上記のようにフローサイトメトリーにおい

ては、Bc16YFP マウスは有用な BCL6 レポーターマウスであるのに対して、イメージングにおいては YFP シグナル強度が十分ではなかった。一方、YFP-BCL6 の homozygous マウスは、B 細胞やヘルパー T 細胞の分化の観点では、Bcl6 遺伝子ノックアウトマウスに近い表現型を示す一方で、ノックアウトマウスで見られる致死性の炎症性疾患を起こさないことが分かった。そのため、homozygous マウスに B 細胞受容体や、T 細胞受容体遺伝子と、蛍光タンパク質遺伝子を容易に導入することが出来た。このマウスを用いた二光子イメージングによって、BCL6 機能不全が胚中心 B 細胞の分化だけでなく、ヘルパー T 細胞の胚中心への移入と保持を阻害することが明らかとなった。

(3) B 細胞と T 細胞の動態を、リンパ節間質細胞と同時に 2 光子イメージングによって解析することにより、B-T 接合体は間質細胞ネットワークの上を移動することが明らか

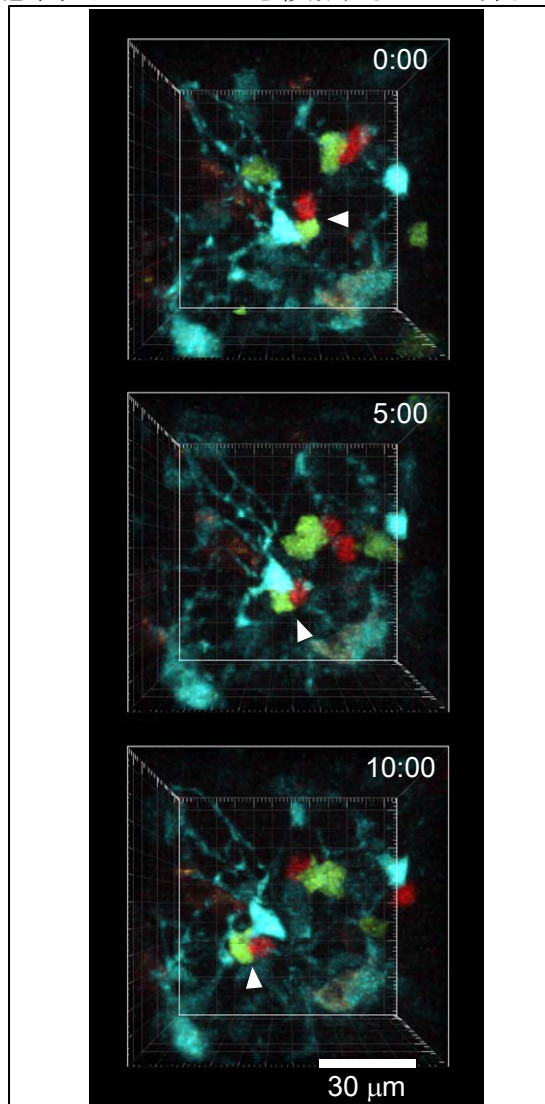


図1 リンパ節内間質細胞ネットワーク上を移動する応答中の B 細胞と T 細胞の接合体

かとなった (図 1)。また、インテグリン阻害抗体を用いたイメージング実験の結果、alphaL インテグリンと alpha4 インテグリンが、B 細胞と T 細胞の 10 分から 20 分間の接合を、選択的に阻害することが明らかとなった。また、フローサイトメトリーの結果から、接合を阻害するこれらのインテグリンは、B 細胞と T 細胞の増殖・分化に必須であることが明らかとなった。

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 5 件)

- ① Okada T.; Two-Photon Microscopy Analysis of Leukocyte Trafficking and Motility. *Semin. Immunopathol.*, 査読有、in press.
- ② Ebisuno Y., Katagiri K., Katakai T., Ueda Y., Nemoto T., Inada H., Nabekura J., Okada T., Kannagi R., Tanaka T., Miyasaka M., Hogg N., and Kinashi T.; Rap1 controls lymphocyte adhesion cascade and interstitial migration within lymph nodes in RAPL-dependent and -independent manners. *Blood*, 査読有、115巻、804-814, 2010.
- ③ Katagiri K., Katakai T., Ebisuno Y., Ueda Y., Okada T., and Kinashi T.; Mst1 controls lymphocyte trafficking and interstitial motility within lymph nodes. *EMBO J.*, 査読有、28 巻、1319-1331, 2009.
- ④ Grigороva I. L., Schwab S. R., Phan T. G., Pham T. H., Okada T., and Cyster J. G.; Cortical sinus probing, S1P1-dependent entry and flow-based capture of egressing T cells. *Nat. Immunol.*, 査読有、10 巻、58-65, 2009.
- ⑤ Yamamoto S., Shimizu S., Kiyonaka S., Takahashi N., Wajima T., Hara Y., Negoro T., Hiroi T., Kiuchi Y., Okada T., Kaneko S., Lange I., Fleig A., Penner R., Nishi M., Takeshima H., and Mori Y.; TRPM2-mediated Ca^{2+} influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat. Med.*, 査読有、14 巻、738-747, 2008.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 岡田 峰陽、リンパ節における T 細胞と B 細胞の相互作用、第 115 回日本解剖学会総会、2010 年 3 月 28 日、発表場所：盛岡市 (岩手県民会館)
- ② 岡田 峰陽、獲得免疫応答における免疫細胞の

組織内ライブイメージング、第32回日本
分子生物学会年会、2009年12月12日、
横浜市（パシフィコ横浜）

- ③ 岡田 峰陽、二光子レーザー顕微鏡を用
いた細胞動態のEx vivoイメージング、第
98回日本病理学会総会、2009年5月2
日、京都市（国立京都国際会館）

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・免疫細胞動態研
究ユニット・ユニットリーダー

研究者番号：50452272