

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19509

研究課題名(和文) 生体イメージングによるヒト免疫細胞の動態評価系の確立

研究課題名(英文) Establishment of the system for evaluating the dynamics of human immune cells by intravital imaging techniques

研究代表者

菊田 順一(Kikuta, Junichi)

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：60710069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：免疫システムは生命にとって必要不可欠な生体防御機構であり、免疫システムの破綻は、感染症、自己免疫疾患、アレルギー、がんなど多くの疾病が関与する。本研究では、これまで開発してきた生体二光子励起イメージング技術と、マウスの細胞の一部をヒトの細胞に置き換えたヒト化マウス技術を融合させ、生体内におけるヒト免疫細胞の動態・機能を評価する新たな生体イメージング系を開発した。本技術を用いて、従来のマウスモデルでは解析が困難であったウイルス感染症に対するヒト免疫応答を可視化し、その制御メカニズムを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生体二光子励起イメージング技術をさらに発展させ、ヒト免疫細胞の動態・機能を細胞レベルで可視化する点で独創性が高く、個々の免疫細胞が如何にしてヒト疾患の病態形成に関与するのかというコンセプトで解析する新規性の高い研究である。本研究で確立した新規生体イメージング評価系は、感染症だけでなく、アレルギー反応時の免疫応答や腫瘍に対する免疫応答の理解にも役立つと考えられ、その社会的意義も極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：The immune system is an essential biological defense mechanism for life, and many diseases such as infectious diseases, autoimmune diseases, allergies, and cancer are associated with a failure of the immune system. In this study, we developed a novel imaging system to evaluate the dynamics and function of human immune cells in vivo by intravital imaging techniques with the humanized mice. By means of this technology, we visualized the human immune responses to viral infections, which have been difficult to analyze in conventional mouse models, and analyzed their regulatory mechanisms.

研究分野：免疫学、細胞生物学

キーワード：生体イメージング 二光子励起顕微鏡 ヒト免疫学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫システムは、病原微生物からわれわれの体を守るために作られた、生命にとって必要不可欠な生体防御機構である。近年、次世代シーケンサーを用いたシングルセル遺伝子発現解析など解析技術が急速に進歩し、免疫応答に関わる数多くの細胞や分子が次々と同定されている。さらに最近、生きた細胞の挙動を観察する生体イメージング技術が発展し、生体内の様々な免疫現象が明らかになってきた。本研究者もこれまで、最新の光学観察技術を駆使して、動物個体が生きた状態で様々な生体組織内の免疫細胞の動態を可視化し、その制御メカニズムを解析してきた。

一方で、マウスを中心とした疾患モデル動物で見出された多くの知見がヒトの病態の全てを反映することはできない。例えば、疾患モデルマウスではどの個体も同じように病気を発症し、薬剤に対しても画一的な反応を示すのに対して、実際の患者の症状や臨床経過、薬剤への反応性は患者によってばらつきがある。また、同じ抗原(病原微生物、スギ花粉など)がヒトの体に入っても、それらに対して起こる免疫応答は個人によって様々であり、同一人物であっても、その時の生体内の環境の変化によって免疫応答は千差万別である。ヒトの免疫疾患の病態を理解し、より理想的な治療法を開発するためには、マウスとヒトの免疫システムの共通点と相違点を明らかにするとともに、個々のヒトの免疫応答の違いを正しく評価する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、これまで開発してきた生体二光子励起イメージング技術と、マウスの細胞の一部をヒトの細胞に置き換えたヒト化マウス技術を融合させ、生体内でヒト免疫細胞の動態・機能を評価する新たな生体イメージング系を開発し、ヒト免疫応答の制御メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

本研究では、従来のマウスモデルでは解析が困難であった B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染に対する免疫応答の解析を行った。健常者の末梢血から採取したヒトリンパ球を用いて、*in vitro* でウイルス抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導した。セルソーターで抗原特異的なヒト細胞傷害性 T 細胞を精製し、蛍光色素による標識後、ウイルス感染させたヒト化マウスに移植した。マウスを生かしたまま生体肝組織内を二光子励起顕微鏡で可視化し、ヒト細胞傷害性 T 細胞とウイルス感染細胞の相互作用を解析した。

(1) 抗原特異的ヒト細胞傷害性 T 細胞の誘導

健常者から末梢血を採取し、単核細胞を単離した後、ディッシュ上に播種した。2 時間後、非接着細胞を取り除き、IL-4 と GM-CSF 存在下で 5 日間培養し、樹状細胞 (DC) へ分化させた。その後、LPS を添加して DC を活性化させた後、各ディッシュに HLA-A*24:02 HBV core peptide を添加し、2 時間培養した。

次に、ヒト末梢血単核細胞から CD8⁺T 細胞を単離した。上記で作製した DC と CD8⁺T 細胞が 1:10 の割合になるように播種し、IL-2 存在下で 7 日間培養した。培養 8 日目に、DC と CD8⁺T 細胞が 1:10 の割合になるように、DC を再度追加し、さらに 7 日間培養した。

培養 15 日目に、HBV 抗原特異的 CD8⁺T 細胞と HBV 抗原非特異的 CD8⁺T 細胞を単離し、それぞれ蛍光色素 (Cell Tracker™ Red CMTPX、Cell Tracker™ Green CMFDA) で染色した。

(2) 生体肝組織内におけるヒト免疫細胞の動態の可視化

本実験では、免疫不全肝障害 (cDNA-uPA/SCID) マウスを宿主として作製したヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス) を使用した。生体イメージング実験の 4 週間前に、HBV (genotype A) 感染ヒト肝細胞キメラマウスの血清を静脈内投与し、PXB マウスに HBV を感染させた。生体イメージング当日、上記(1)で作製した蛍光標識 CD8⁺T 細胞を PXB マウスに移植した。移植 2 時間後、イソフルラン吸入麻酔管理下で、腹部を剃毛し、剣状突起より約 2 mm 程下の皮膚と腹膜を切開した。その後、肝臓を体外に露出させ、生体用ボンドで肝臓をスライドガラスに貼り付け、自作の固定台にマウスを固定した。血管腔は Qtracker 655 を静脈内投与して可視化した。その後、倒立型二光子励起顕微鏡を用いて、生体肝組織の内部を経時的に観察した。

4. 研究成果

(1) 抗原特異的ヒト細胞傷害性 T 細胞の誘導

DC 培養 5 日目に LPS を添加して 40 時間後、LPS 刺激による DC の成熟化をフローサイトメトリーで解析した。その結果、成熟 DC のマーカーである CD83 陽性細胞の割合は、LPS 刺激群で 95%、非刺激群で 52% であり、LPS 刺激により DC が成熟していることが確認できた。

次に、HBV 抗原特異的 CD8⁺T 細胞を効率的に誘導するため、DC と CD8⁺T 細胞の *in vitro* 共培養の条件を検討した。DC と CD8⁺T 細胞を 1:10 の割合で共培養した結果、全 CD8⁺T 細胞に対して 0.7% の HBV 抗原特異的 CD8⁺T 細胞が得られた。次に、共培養における DC と CD8⁺T 細胞の比率を条件検討した結果、DC と CD8⁺T 細胞を 1:5 の割合で共培養した際、HBV 抗原特異的 CD8⁺T 細胞の割合が最も高くなり、全 CD8⁺T 細胞に対して 7.9% の HBV 抗原特異的

CD8⁺ T 細胞が得られた。

(2) 生体肝組織内におけるヒト免疫細胞の動態の可視化

生体内において、HBV に感染したヒト肝細胞に対して、HBV 抗原特異的ヒト CD8⁺ T 細胞がどのような動態を示すのか検証した。PXB マウスに HBV を感染させて 4 週間後に、上記(1)で作製した蛍光標識ヒト CD8⁺ T 細胞を移植し、二光子励起顕微鏡で肝臓の生体イメージングを行った。その結果、HBV 抗原非特異的ヒト CD8⁺ T 細胞は、生体肝組織内を動き回っていたのに対し、HBV 抗原特異的ヒト CD8⁺ T 細胞は HBV 感染ヒト肝細胞に直接接触し、相互作用する様子が観察された。さらに、肝細胞と CD8⁺ T 細胞の接触時間を解析した結果、HBV 抗原特異的ヒト CD8⁺ T 細胞は、HBV 抗原非特異的ヒト CD8⁺ T 細胞と比較して、接触時間が有意に長いことが分かった。

本研究で確立した生体イメージング系を用いて、様々な提供者から調整したヒト細胞傷害性 T 細胞がウイルスに感染した細胞に対してどのような反応を示し相互作用し得るのかを可視化することで、生体内における個々のヒト免疫細胞の動態の違いを定量的に解析することが可能となった。今後、臨床経過の異なる劇症肝炎患者と慢性肝炎患者の間で、ウイルス排除を担う免疫細胞の動態にどのような違いがあるのか解析を行い、個々の患者間での免疫応答の機能的な違いを時空間的に明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 菊田順一, 石井優
2. 発表標題 Intravital imaging technology dissecting cellular dynamics in inflammation and bone destruction in vivo
3. 学会等名 23rd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊田順一, 石井優
2. 発表標題 ゼロから始める生体イメージング研究～病態解明と新たな治療を目指して～
3. 学会等名 第31回日本リウマチ学会近畿支部学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊田順一, 石井優
2. 発表標題 生体多光子励起イメージングによる免疫疾患の病態解明
3. 学会等名 第50回日本臨床免疫学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊田順一, 石井優
2. 発表標題 生体イメージング技術による免疫疾患治療薬のin vivo薬理作用の解明
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------