

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591093
 研究課題名（和文） アレルギー性喘息肺での浸潤リンパ球のリアルタイムイメージング解析
 研究課題名（英文） Color-coded real-time cellular imaging of lung T-lymphocyte in a mouse asthma model
 研究代表者
 長谷川 明洋 (HASEGAWA AKIHIRO)
 山口大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：80376376

研究成果の概要（和文）：本研究では申請者が独自に開発したリアルタイム可視化モニタリング系を用いて喘息肺での Th2 細胞の集積と focus 形成を制御する因子の同定を行ったところ、ICAM-1 や VCAM-1 の関与が明らかとなった。また、Th2 細胞以外の機能的 T 細胞サブセットについて、炎症巣でのそれぞれの細胞の分布やその挙動、細胞間相互作用について解析を行ったところ、Th1 細胞は Th2 細胞のような明瞭な focus を形成しないなど、T 細胞サブセットによる集積様式の違いが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We developed a color-coded real-time imaging model of cell migration into the lung in a mouse model of asthma, and identify the cellular process required for the initiation of the asthma phenotype. Selective accumulation of antigen-specific CD4 T cells in the lung was quantitatively imaged. Accumulating Th2 cells, but not Th1 cells, formed foci in the lung after antigen inhalation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー・喘息・炎症・細胞イメージング

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまでにアレルギー性炎症疾患の発症に深く関与する Th2 細胞や Tc2 細胞の分化制御機構の研究（Omori et al., *Immunity*, 2003）およびメモリー Th2 細胞の機

能維持機構の研究（Yamashita et al., *Immunity*, 2006）を行ってきた。また、アレルギー性気道炎症モデルを使って、シグナル伝達経路や制御因子（Ras/MAPK, ROG, LEF-1 など）の生体レベルでの機能を解析してきた

(Hasegawa et al., *J. Immunol.* 2006, Hirahara et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008, Hossain et al., *Immunology*, 2008)。このアレルギー性気道炎症モデルはTh2細胞依存的でありTh2細胞の分化に障害のあるマウス (STAT6 ノックアウトマウスなど) では炎症が抑制される。しかし、肺胞洗浄液や細気管支周囲の浸潤細胞にCD4T細胞は存在するものの、CD4T細胞は数の上では浸潤細胞の数パーセント程度である。Th2細胞が、実際の肺の炎症の場でのような機能を果たしているのか、特にTh2細胞が浸潤するタイミングや浸潤の様式、浸潤したTh2細胞の活性化状態などのダイナミックな細胞動態はほとんど明らかになっていなかった。

最近、申請者は気道炎症を起こしたマウスの肺でTh2細胞の浸潤を定量的に解析するためのリアルタイム可視化モニタリング系を独自に開発し (国際特許出願済)、さらにマウスが生きた状態のまま麻酔下に人工呼吸器で片肺を換気しながら、もう一方の肺を共焦点顕微鏡を用いて観察し、肺の内部をビデオ撮影するイメージングシステムを独自に確立した。

2. 研究の目的

申請者らは、アレルギー性炎症疾患 (花粉症、アレルギー性喘息など) の発症の要であるタイプ2のT細胞 (Th2細胞) の体内動態を明らかにするために、蛍光を発するTh2細胞を移入するシステムを使って、気道炎症を起こしたマウスの肺でTh2細胞の浸潤を定量的に解析するためのリアルタイム可視化モニタリング系を独自に開発した (国際特許出願済)。また、さらに研究を進め、マウスが生きた状態のまま麻酔下に人工呼吸器で片肺を換気しながら、もう一方の肺を共焦点顕微鏡を用いて観察し、肺の内部をビデオ撮影するイメージングシステムを独自に確立した。そしてこのイメージングシステムを用いて、マウス喘息モデルで抗原吸入後に起こるTh2細胞の浸潤の動態を時空間的に解析して明らかにしてきた (Hasegawa et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010)。そこで本研究ではこのシステムを用いてTh2細胞の集積とfocus形成を制御する因子の同定を行う。またTh2細胞以外の機能的T細胞サブセットについて、炎症巣でのそれぞれの細胞の分布やその挙動、細胞間相互作用について解析する。

3. 研究の方法

(1) Th2細胞の集積とfocus形成を制御する因子の同定

OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス (OT-II) のナイーブ CD4T細胞を *in vitro* で培養して分化させた Th2細胞を正常マウスに移入し、抗原吸入後に肺に集積してく

る Th2細胞を蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、Th2細胞は抗原吸入後に肺に集積し focus を形成してその後の好酸球浸潤や炎症巣形成を制御していることが明らかになった。そこで次に Th2細胞集積や focus 形成を制御する分子の同定を行った。気道炎症誘導前後に接着分子やケモカインに対する抗体を投与して Th2細胞集積や focus 形成に対する効果を調べた。また、ステロイド剤を投与するとこのマウス喘息モデルでも炎症が抑制されることが分かっていることから、OVA吸入と同時にステロイド剤を投与して、GFP陽性Th2細胞の浸潤を比較検討した。

(2) T細胞サブセットの浸潤様式の比較

抗原特異的 Th2細胞のほか、Th1、Th17、NKT、regulatory T細胞などの違った機能サブセットを用いて実験を行い、浸潤様式の差異を解析した。OVA吸入後3時間、6時間、12時間、18時間、24時間とタイムコースを追った実験を行い、浸潤の動態を解析した。

(3) ライブマウス肺内イメージングシステムによる喘息肺でのTh2細胞の動的挙動解析

申請者は、マウスが生きた状態のまま肺の内部をビデオ撮影するイメージングシステムを独自に確立した。麻酔下にベンチレーターをつないだカニューレを気管に挿入、左肺の気管支を結紮し、右肺だけの換気や呼吸管理を行った。左肺の血流は遮断しない。その状態で左肺の辺縁部分を2光子顕微鏡で解析した。この系において左右の肺で血流量や細胞流入数に差がないことをはじめに基礎実験で確認した。定常状態の肺と抗原吸入後の肺内での抗原特異的蛍光Th2細胞をビデオ撮影し、動的解析を行った。また抗原特異的Th2細胞のほか、Th1、Th17、NKT、iTreg細胞などの違った機能サブセットを用いて移入実験を行い、浸潤様式の差異を解析した。さらにステロイド剤を投与した場合の効果を検討した。

(4) 遺伝子操作マウスのT細胞を用いた実験

これまでの解析により、マウス喘息モデルで気道炎症が起きないまたは増悪することが示唆されている CD69 ノックアウトマウスの CD4T細胞を用いて実験を行った。我々が樹立した CD69 ノックアウトマウスでは喘息が抑制される (Miki-Hosokawa et al., *J. Immunol.* 2009)。これらのノックアウトマウスの CD4T細胞を用いて肺の炎症巣での活性化状態や集積を解析し、システムの検証を進めた。

(5) 樹状細胞の抗原分子取り込み過程の時間的定量的解析

抗原分子が肺組織内に取り込まれ、そこで

炎症が誘導されるためには、まず抗原分子が樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれてプロセッシングを受ける必要がある。蛍光標識した抗原分子を用いると吸入して肺組織内に取り込まれた抗原分子を共焦点顕微鏡で観察することができる。そこで GFP 陽性の樹状細胞を移入し、抗原を取り込む過程の時間的定量的解析を行った。

(6) ナイーブ T 細胞とエフェクター T 細胞の浸潤の動態比較

OVA プライミングの必要性に関して、OVA 免疫した GFP トランスジェニックマウスと OVA 免疫しなかった RFP トランスジェニックマウスからそれぞれ CD4T 細胞を調製し、抗原吸入後の浸潤の動態を比較検討した。また、免疫していない OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス (OT-II) のナイーブ CD4T 細胞とそれを *in vitro* で培養して分化させた Th2 細胞を用いて実験を行い、浸潤の動態を比較検討した。

(7) ライブマウス肺内イメージングシステムを用いた樹状細胞の抗原分子取り込み過程の動的挙動解析

GFP 陽性の樹状細胞を移入し、抗原吸入後に樹状細胞が抗原を取り込む過程をビデオ撮影して、抗原取り込み過程の動的挙動解析を行った。

4. 研究成果

本研究では申請者が開発したりアルタイム可視化モニタリング系を用いて Th2 細胞の集積と focus 形成を制御する因子の同定を行った。また Th2 細胞以外の機能的 T 細胞サブセットについて、炎症巣でのそれぞれの細胞の分布やその挙動、細胞間相互作用について解析し、以下の結果を得た。

(1) Th2 細胞の集積と focus 形成を制御する因子の同定

OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス (OT-II) のナイーブ CD4T 細胞を *in vitro* で培養して分化させた Th2 細胞の移入実験から、Th2 細胞は抗原吸入後に肺に集積し focus を形成してその後の好酸球浸潤や炎症巣形成を制御していることが明らかになった。次に Th2 細胞集積や focus 形成を制御する分子の同定を行ったところ、気道炎症誘導前に ICAM-1 や VCAM-1 に対する抗体を投与しておく、Th2 細胞集積や focus 形成が抑制されることが明らかとなった。また、ステロイド剤を投与した場合にも Th2 細胞の浸潤が用量依存的に抑制された。

(2) T 細胞サブセットの浸潤様式の比較

GFP や RFP トランスジェニックマウスなどの細胞を用いて Th2 細胞以外の機能的 T 細胞サブセットについて抗原吸入後の肺への集積を調べたところ、Th1 細胞、Th17 細胞、Th9 細胞なども肺に集積することが明らか

となった。またこれら Th2 細胞以外の T 細胞サブセットの肺への浸潤様式は Th2 細胞とは異なっていた。

(3) ライブマウス肺内イメージングシステムによる喘息肺での Th2 細胞の動的挙動解析

抗原特異的な種々の Th 細胞分画について喘息肺での浸潤様式の差異を解析したところ、Th1、Th17 細胞などは肺組織内で Th2 細胞のような明瞭な細胞集団を形成しにくいことが明らかとなった。さらに Th1 や Th2 細胞について抗原吸入後の肺組織内での動的挙動解析を行って差異を検討した。またステロイド剤を投与すると Th2 細胞の肺への流入数が減少することが明らかとなった。

(4) 遺伝子操作マウスの T 細胞を用いた実験

申請者のグループのこれまでの解析により、マウス喘息モデルで気道炎症が起きないまたは増悪することが示唆されている分子のノックアウトマウスの CD4T 細胞を用いて実験を行い、イメージング解析によりその浸潤様式を調べた。その結果、喘息の発症が抑制される CD69 ノックアウトマウスの CD4T 細胞は抗原吸入後の肺への集積が抑制されることが明らかとなった。

(5) 樹状細胞の抗原分子取り込み過程の時間的定量的解析

抗原分子が肺組織内に取り込まれ、そこで炎症が誘導されるためには、まず抗原分子が樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれてプロセッシングを受ける必要がある。そこで GFP 陽性の樹状細胞を移入し、蛍光標識した抗原分子を吸入させて肺組織内に取り込まれた抗原分子を取り込む過程の時間的定量的解析を行った。その結果、樹状細胞は抗原吸入 20 分後には抗原分子を取り込みはじめることが明らかとなった。

(6) ナイーブ T 細胞とエフェクター T 細胞の浸潤の動態比較

ナイーブ T 細胞とエフェクター T 細胞の浸潤様式を比較したところ、抗原吸入後エフェクター T 細胞のみが肺に集積し、抗原特異的 CD4T 細胞であってもナイーブ T 細胞の場合には肺に集積しないことが明らかとなった。

(7) ライブマウス肺内イメージングシステムを用いた樹状細胞の抗原分子取り込み過程の動的挙動解析

GFP 陽性の樹状細胞を移入し、抗原吸入後に樹状細胞が抗原を取り込む過程をビデオ撮影し、抗原取り込み過程の動的挙動解析を行った。また、マルチカラーイメージングにより Th2 細胞の focus 形成との関わりを解析した。

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 13 件)

- ① Hasegawa, A., Iwamura, C., Kitajima, M., Hashimoto, K., Otsuyama, K., Ogino, H., Nakayama, T. and Shirai, M.: Crucial role for CD69 in the pathogenesis of dextran sulphate sodium-induced colitis. *PLoS ONE* in press (2013). (査読有)
- ② Hosokawa, H., Tanaka, T., Suzuki, Y., Iwamura, C., Ohkubo, S., Endoh, K., Kato, M., Endo, Y., Onodera, A., Tumes, D. J., Kanai, A., Sugano, S., and Nakayama, T.: Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish T helper 2 (Th2) cell identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110(12):4691-4696 (2013). (査読有)
10.1073/pnas.1220865110
- ③ Shinoda, K., Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Hayashizaki, K., Zehentmeier, S., Hosokawa, H., Iwamura, C., Koseki, H., Tumes, D. J., Radbruch, A., and Nakayama, T.: Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(19):7409-7414 (2012). (査読有)
10.1073/pnas.1118539109
- ④ Kuwahara, M., Yamashita, M., Shinoda, K., Tofukuji, S., Onodera, A., Shinnakasu, R., Motohashi, S., Hosokawa, H., Tumes, D., Iwamura, C., Lefebvre, V., and Nakayama, T.: The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF- β and suppresses T_H2 differentiation. *Nat. Immunol.* 13(8): 778-786 (2012). (査読有)
10.1038/ni.2362
- ⑤ Iwamura, C., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Tumes, D. J., Motohashi, S., Kawahara, K., Kinjo, Y., and Nakayama, T.: Regulation of memory CD4 T-cell pool size and function by natural killer T cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(42):16992-16997 (2012). (査読有)
10.1073/pnas.1203494109
- ⑥ Yamashita, J., Iwamura, C., Sasaki, T., Mitsumori, K., Ohshima, K., Hada, K., Hara, N., Takahashi, M., Kaneshiro, Y., Tanaka, H., Kaneko, K., and Nakayama, T.: Apolipoprotein A-II suppressed concanavalin A-induced hepatitis via the inhibition of CD4 T cell function. *J. Immunol.* 186:3410-3420 (2011). (査読有)
10.4049/jimmunol.1002924
- ⑦ Hayashi, K., Kimura, H., Yamauchi, K., Yamamoto, N., Tsuchiya, H., Tomita, K., Kishimoto, H., Hasegawa, A., Bouvet, M. and Hoffman, R.M.: Comparison of cancer cell seeding, viability and deformation in the lung, muscle and liver, visualized by subcellular real-time imaging in the live mouse. *Anticancer Res.* 31: 3665-3672 (2011). (査読有)
- ⑧ Ogino, H., Azuma, Y., Hosoyama, A., Nakazawa, A., Matsutani, M., Hasegawa, A., Otsuyama, K., Matsushita, K., Fujita, N. and Shirai, M.: Complete genome sequence of NBRC 3288, a unique cellulose-nonproducing strain of *Gluconacetobacter xylinus* isolated from vinegar. *J. Bacteriol.* 193(24): 6997-6998 (2011). (査読有)
10.1128/JB.06158-11
- ⑨ Horiuchi, S., Onodera, A., Hosokawa, H., Watanabe, Y., Tanaka, T., Sugano, S., Suzuki, Y., and Nakayama, T.: Genome-wide analysis reveals unique regulation of transcription of Th2-specific genes by GATA3. *J. Immunol.* 186:6378-6389 (2011). (査読有)
10.4049/jimmunol.1100179
- ⑩ Kitajima, M., Ito, T., Tumes, D. J., Endo, Y., Onodera, A., Hashimoto, K., Motohashi, S., Yamashita, M., Nishimura, T., Ziegler, F. S., and Nakayama, T.: Memory type 2 helper T cells induce long-lasting anti-tumor immunity by activating natural killer cells. *Cancer Res.* 71:4790-4798 (2011). (査読有)
10.1158/0008-5472.CAN-10-1572
- ⑪ Endo, Y., Iwamura, C., Kuwahara, M., Suzuki, A., Sugaya, K., Tumes, D. J., Tokoyoda, K., Hosokawa, H., Yamashita, M., and Nakayama, T.: Eomesodermin controls interleukin-5 production in memory T helper 2 cells through inhibition of activity of the transcription factor GATA3. *Immunity* 35:733-745 (2011). (査読有)
10.1016/j.immuni.2011.08.017
- ⑫ Hasegawa, A. and Nakayama, T.: Role of CD69 in the pathogenesis of inflammation. *Jpn. J. Clin. Immunol.* 33(4): 189-195 (2010). (査読無)
- ⑬ Hasegawa, A., Hayashi, K., Kishimoto, H., Yang, M., Tofukuji, S., Suzuki, K., Nakajima, H., Hoffman, R. M., Shirai, M. and Nakayama, T.: Color-coded real-time cellular imaging of T-lymphocyte accumulation and focus formation in a mouse asthma model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125: 461-468 (2010). (査読有)
10.1016/j.jaci.2009.09.016

[学会発表] (計 16 件)

- ① Hasegawa, A., Ogino, H., Shirai, M. and

- Nakayama, T. Real-time cellular imaging of T lymphocyte accumulation in a mouse asthma model. 23th CDB Meeting, 2013 Jan 22-23,RIKEN Center for Developmental Biology (Kobe).
- ② 長谷川明洋、荻野英賢、大津山賢一郎、中山俊憲、白井睦訓 腸炎の発症における CD69 分子の役割 第 86 回日本細菌学会総会 2013 年 3 月 18-20 日、幕張メッセ (千葉)
- ③ 知識麻友子、林将大、宇治家武史、荻野英賢、大津山賢一郎、長谷川明洋、宮下修行、江崎孝行、白井睦訓 10 種類の肺炎原因菌を検出する Multiplex NASBA-核酸クロマト検出法 第 86 回日本細菌学会総会 2013 年 3 月 18-20 日、幕張メッセ (千葉)
- ④ 荻野英賢、長谷川明洋、大津山賢一郎、白井睦訓 酢酸菌高温耐性株における細胞形態形成機構の解析 第 65 回日本細菌学会中国・四国支部総会 2012 年 10 月 20 日-21 日、徳島大学 (徳島)
- ⑤ 長谷川明洋、白井睦訓、中山俊憲 喘息肺での浸潤リンパ球の *in vivo* イメージング 第 40 回日本臨床免疫学会総会 2012 年 9 月 27-29 日、京王プラザホテル (東京)
- ⑥ 長谷川明洋、荻野英賢、大津山賢一郎、白井睦訓、中山俊憲 アレルギー性炎症反応におけるリンパ球浸潤の *in vivo* イメージング 第 21 回日本バイオイメージング学会学術集会 2012 年 8 月 26-28 日、国立京都国際会館 (京都)
- ⑦ 中山俊憲 免疫記憶を利用した難治性喘息と肺癌の新規免疫治療法開発のトランスレショナルリサーチ 特別講演 BIOtech 2012 第 11 回国際バイオテクノロジー展/技術会議 2012 年 4 月 25 日、東京ビッグサイト (東京)
- ⑧ 長谷川明洋、白井睦訓、中山俊憲 喘息肺での浸潤リンパ球のリアルタイムイメージング 第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月 27-29 日、長崎ブリックホール (長崎)
- ⑨ Hasegawa, A. and Nakayama, T. Crucial role for CD69 in the pathogenesis of DSS-induced colitis. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会 2011 年 11 月 27-29 日、幕張メッセ (千葉)
- ⑩ Nakayama, T., and Iwamura, C.: NKT cell-mediated regulation of antigen-specific memory Th2 cell function. 6th International Symposium on CD1 and NKT Cells, 2011 Sep 25, Chicago, USA
- ⑪ 長谷川明洋 炎症の誘導にともなうリンパ球浸潤のバイオイメージング 第 20 回日本バイオイメージング学会学術集会 シンポジウム 2011 年 8 月 31-9 月 2 日、千歳科学技術大学 (北海道)
- ⑫ Nakayama, T.: Epigenetic regulation of GATA3 expression and its target genes in Th2 cells. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases, 2011 June 20, CA, USA
- ⑬ Nakayama, T., and Onodera, A.: Regulation of memory Th2 cell function and allergic airway inflammation via polycomb and trithorax molecules. 30th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2011 June 15, Istanbul, Turkey
- ⑭ Nakayama, T., and Onodera, A.: Epigenetic control of memory Th2 cell function via Polycomb and Trithorax molecules. EUThyme-Rolduc Meeting, 2011 May 24, Leeuwenhorst, Netherland
- ⑮ 長谷川明洋、中山俊憲、白井睦訓 喘息肺での浸潤リンパ球のリアルタイムイメージング 第 19 回日本バイオイメージング学会学術集会 2010 年 9 月 9 日-11 日、慶應義塾大学 (東京)
- ⑯ Hasegawa, A., Shirai, M. and Nakayama, T. Real-time cellular imaging of T lymphocyte accumulation in a mouse asthma model. 14th International Congress of Immunology 2010 Aug 22-27, Kobe International Exhibition Hall (Kobe).

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- 名称: CD69 アンタゴニストを含む肝炎治療用組成物
発明者: 中山俊憲、長谷川明洋、白井睦訓
権利者: 国立大学法人千葉大学、国立大学法人山口大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-247036 号
出願年月日: 平成 23 年 11 月 11 日
国内外の別: 国内
- 名称: INHIBITION OF CD69 FOR TREATMENT OF INFLAMMATORY CONDITIONS
発明者: Toshinori Nakayama, Akihiro Hasegawa, Mutunori Shirai
権利者: 国立大学法人千葉大学、国立大学法人山口大学
種類: 特許
番号: US12/945153
出願年月日: 平成 22 年 11 月 12 日
国内外の別: 国外

○取得状況 (計 1 件)

1. 名称：Imageable rodent model of asthma
発明者：Akihiro Hasegawa, Toshinori Nakayama, Meng Yang
権利者：AntiCancer Inc.
種類：特許
番号：12/681348
取得年月日：平成 23 年 2 月 10 日
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ：

http://www.med.yamaguchi-u.ac.jp/medicine/chair/basic_09.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 明洋 (HASEGAWA AKIHIRO)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80376376

(2) 連携研究者

中山 俊憲 (NAKAYAMA TOSHINORI)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：50237468