

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24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700901

研究課題名（和文） 癌免疫誘導機構の生体内二光子イメージング解析

研究課題名（英文） Two-photon imaging analysis of cytotoxic T cell-mediated anti-tumor immune responses

研究代表者

北野 正寛 (KITANO MASAHIRO)

独立行政法人理化学研究所・免疫細胞動態研究ユニット・研究員

研究者番号：40549010

研究成果の概要（和文）：生きたマウスのリンパ節と腫瘍内における、細胞障害性 T 細胞と内在性樹状細胞の挙動を二光子顕微鏡により観察する実験系を確立した。それをを用いて細胞障害性 T 細胞がリンパ節にて内在性樹状細胞から抗原提示を受け活性化する一連の過程を可視化し、生体内で細胞障害性 T 細胞へ選択的に抗原提示を行う樹状細胞サブセットを同定した。さらに活性化した細胞障害性 T 細胞が腫瘍部位に移行した後、腫瘍周囲の樹状細胞と抗原特異的に相互作用することを発見し、腫瘍内における T 細胞の増殖・分化を誘導する新たなメカニズムが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have established the intravital multi-photon imaging system for monitoring the cell behavior of antigen-specific cytotoxic T cells and endogenous dendritic cells in living mouse lymph node and tumor. By using this system, we have visualized the entire process of T cell activation through interactions with endogenous dendritic cells, and identified a dendritic cell subset responsible for antigen presentation selectively to cytotoxic T cells. Furthermore, we have found antigen-specific interactions between tumor-infiltrating effector-cytotoxic T cells and tumor-surrounding dendritic cells, suggesting a new mechanism for inducing T cell proliferation and differentiation not only at the secondary lymphoid organs, but also at the effector sites such as tumor lesion.

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	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：二光子、イメージング、癌免疫

1. 研究開始当初の背景

腫瘍抗原特異的な細胞障害性 T 細胞を活性化し、その機能を発揮するエフェクター細胞へと分化させ生体内で維持することは、癌に対する免疫応答を確立する上で必須である。この細胞障害性 T 細胞の分化には樹状細胞による抗原提示が重要な役割を果たすことが知られている。近年の二光子励起蛍光イメージング技術の進歩によって、生きたマウスにおける T 細胞と樹状細胞の相互作用動態が可視化されるようになり、生体内における T 細胞活性化メカニズムの一端が明らかになりつつある。しかしながらその知見の多くは、精製した樹状細胞を抗原タンパク質由来のペプチドで細胞表面をコーティングし、それを皮下に移植するという、きわめて人工的な条件下で行われた実験結果をもとに得られたものであり、実際に生体内において細胞障害性 T 細胞が、内在性の樹状細胞から活性化を受けるメカニズムはほとんど明らかになっていない。さらに、活性化した細胞障害性 T 細胞が、その後長期的な抗癌効果を維持したメモリー T 細胞へと分化することが、腫瘍を根絶するうえで重要であると考えられているが、そのような細胞集団が生体内でどのような過程を経て生成するのかは不明である。とりわけ細胞障害性 T 細胞がエフェクター機能を発揮する腫瘍部位における細胞間相互作用の細胞分化への関わりはほとんど調べられていない。したがって、癌免疫応答過程における免疫細胞動態を調べ、その役割を明らかにすることは、癌免疫細胞療法のさらなる改善を考える上で急務であると言える。

2. 研究の目的

本研究では、生きたマウスのリンパ節と腫瘍において内在性の樹状細胞サブセットと抗原特異的な細胞障害性 T 細胞を可視化するためのイメージングシステムを構築し、それを用いて生体内における T 細胞の分化様式を詳細に調べる。その結果から、生体内で癌抗原ワクチンを投与したときに、その抗原提示を担う内在性の細胞を同定する。また活性化した T 細胞の腫瘍内における挙動を観察し、エフェクター細胞の更なる分化に重要な細胞間相互作用を同定することによって、癌免疫細胞療法に役立つ新たな知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

生体組織における T 細胞、樹状細胞、癌細胞

の動態を二光子顕微鏡で可視化するために、まず還流チャンバーを用いた **Explant** 法によるリンパ節イメージングシステムを確立し、その上で同様の二光子顕微鏡光学系を用いて **Intravital** 法によるリンパ節と腫瘍のイメージングシステムをセットアップした。**Explant** 法では酸素 95%と二酸化炭素 5%の混合ガスで飽和した **RPMI** 培地を、リンパ節を接着したヒートチャンバー中に循環し、培地の温度を 37°C に保ちながらリンパ節実質中における免疫細胞動態の観察を行った。**Intravital** 法では 37°C ヒートプレート上にてマウスをイソフルランにより吸入麻酔した状態で、外科手術により露出させたリンパ節もしくは腫瘍部位の免疫細胞動態を観察した。

イメージング実験には、内在性の樹状細胞サブセットにおいて蛍光蛋白質 **Venus** が発現する新規レポーターノックインマウスをレシピエントマウスとして用いた。抗原特異的 **CD8+** T 細胞として、卵白アルブミン (**OVA**) 特異的 T 細胞受容体トランスジェニック **OT-I** マウスと **ubiquitin-GFP** マウスを掛け合わせて得られたマウスより精製した **GFP+** **OT-I CD8+** T 細胞を用い、同時に抗原非特異的ポリクローナル **CD8+** T 細胞を観察するために **Rosa-CAG-LSL-tdTomato-WPRE** マウス (**CAG-Cre** マウスと交配し **Stop-cassette** を取り除いたもの) より精製した **Tomato+** ポリクローナル **CD8+** T 細胞を用いた。

リンパ節における T 細胞と樹状細胞の相互作用を可視化するために、先述のレポーターマウスに **GFP+** **OT-I CD8+** T 細胞と **Tomato+** **CD8+** T 細胞を静脈注射により移入し、続けて **OVA** とアジュバント **Poly (I:C)** 混合溶液を皮下注射により投与した。その後様々なタイムポイントで **Intravital** 法によりマウスのリンパ節二光子イメージングを行った。

腫瘍内の観察を行うために、**CFP-OVA** 融合タンパク質を安定発現する **B16F10**メラノーマ細胞株 (**B16F10/CFP-OVA**) を樹立した。この細胞を上記レポーターマウスに皮下移植し、その約 1 週間後に腫瘍が形成されたのを確認し、**Dynabeads (Invitrogen)** と **IL-2** によって **in vitro** で活性化した **OT-I** T 細胞を静脈内投与した。まず予備検討として細胞移入後の **B16F10/OVA** 腫瘍内において T 細胞が増殖するタイムコースをフローサイトメトリーにより評価し、イメージングを行う実験条件を設定した。その後 **B16F10/CFP-OVA** を担癌したレポーターマウスに、**in vitro** で活性化した **GFP+** **OT-I** T 細胞、**Tomato+** ポリクローナル **CD8+** T 細胞

を移入し、腫瘍内における抗原特異的な細胞間相互作用の有無を評価した。

4. 研究成果

まず、リンパ節における T 細胞と B 細胞の動きが二光子顕微鏡で観察でき、これらの細胞間相互作用の解析ができる Explant 法の二光子イメージングシステムを確立した（発表論文①、②）。次に、これと同様の顕微鏡光学系を用いて試行錯誤を行った結果、Explant 法とほぼ同等に安定な Intravital 法のリンパ節イメージングと腫瘍イメージングのシステムを確立することができた。以下に示す二光子イメージング実験の結果は全てこの Intravital 法によるものである。

GFP+ OT-I CD8+ T 細胞と Tomato+ポリクローナル CD8+ T 細胞を静脈注射により移入したレポーターマウスに OVA タンパク質をアジュバントとともに皮下注射により投与し、その後様々なタイムポイントにおいて所属リンパ節のイメージングを行った。その結果、抗原投与後 6 時間の時点では OT-I T 細胞とポリクローナル CD8+ T 細胞はともにナイーブの状態と同様のランダムな動きをしていたが、抗原投与後 1 2 時間後の時点で OT-I T 細胞のみが Venus+ の樹状細胞へ選択的に接触を開始し、20 時間後の時点では OT-I T 細胞が Venus+ の樹状細胞の上で動きをほぼ停止し、これらの細胞が非常に強く接着している様子が観察された。引き続きタイムポイントにおいてはこれらの細胞間相互作用は弱まり、OT-I T 細胞がリンパ節において細胞運動と細胞増殖を開始する様子が観察された。引き続き詳細なイメージング解析により、この抗原提示にはリンパ管を介しリンパ節に移動してくる樹状細胞が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

つぎに腫瘍内におけるエフェクター細胞障害性 T 細胞の挙動を観察した。研究開始当初 B16F10 メラノーマ由来腫瘍関連抗原 gp100 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス Pmel-1 由来 CD8+ T 細胞を用いて、内在性の腫瘍関連抗原特異的な免疫反応を調べる予定であったが、この細胞による B16 メラノーマへの顕著な細胞障害性を確認することができなかった。よって以降に示す実験は B16F10 メラノーマに OVA 遺伝子を導入した B16F10/OVA メラノーマに対する OT-I T 細胞の免疫応答を調べたものである。

はじめに、B16F10/OVA 細胞をマウスに移植し、そのマウスに OT-I T 細胞を移入して上記ワクチン投与により活性化した後のリン

パ節内と腫瘍内における OT-I T 細胞の細胞周期を評価したところ、ワクチン投与後 6 日目の時点では、ワクチン所属リンパ節や腫瘍所属リンパ節よりも、腫瘍内において細胞周期が活発に進んだ OT-I T 細胞が数多く検出された。この結果から腫瘍部位にて抗原特異的な細胞障害性 T 細胞の分裂を引き起こし、細胞分化を誘導するメカニズムが存在する可能性が示唆された。いっぽう臨床の免疫細胞療法においては、in vitro で活性化した細胞障害性 T 細胞を患者に移入する手法が一般的である。そこで同様に in vitro で活性化した OT-I T 細胞を B16F10/OVA 担癌マウスに移入したところ、先ほどのワクチン処理した場合と同様の結果が得られた。次にこの in vitro で活性化した OT-I T 細胞を用いて、腫瘍とリンパ節、脾臓における OT-I T 細胞増殖の詳細なタイムコースを調べたところ、活性化 OT-I T 細胞を移入した後 2 日目の時点で OT-I T 細胞が腫瘍部位に検出され、3 日目の時点で細胞周期が活発に進んだ OT-I T 細胞が腫瘍においてその他の臓器に比べ多数検出され、その後数日にわたり強い増殖が観察された。この結果から、活性化 OT-I T 細胞を移入してから、細胞が癌へと移行し増殖を行う前の時点イメージングにより観察することにした。

先述のレポーターマウスに B16F10/CFP-OVA 細胞を担癌し、そこに in vitro で活性化した GFP+ OT-I CD8+ T 細胞と Tomato+ポリクローナル CD8+ T 細胞を静脈注射により移入して 2 日後の時点で、腫瘍細胞、腫瘍抗原特異的細胞障害性 T 細胞、非特異的細胞障害性 T 細胞、樹状細胞サブセットを同時に二光子イメージングにて観察した。その結果、GFP+ OT-I CD8+ T 細胞と Tomato+ポリクローナル CD8+ T 細胞はともに腫瘍近傍まで到達していたが、Tomato+ポリクローナル CD8+ T 細胞が腫瘍辺縁を動き回る一方で、OT-I T 細胞は腫瘍周囲の樹状細胞と相互作用し動きを止めている様子が観察された。これより、腫瘍抗原特異的細胞障害性 T 細胞は、リンパ節などの二次リンパ器官においてのみならず、エフェクター部位である腫瘍近傍においても樹状細胞と相互作用し、その増殖と分化が誘導されている可能性が示唆された。

以上により、本研究では新規に作製されたトランスジェニックマウスを用いた二光子ライブイメージングを通じて、癌に対する細胞性免疫応答時における細胞間相互作用を同定することができた。今後は、これらの相互作用がもつ生理的意義を明らかにすることにより、癌免疫療法の新たなデザインに有用な知見がもたらされると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

①Kitano, M. and Okada, T. Four-dimensional tracking of lymphocyte migration and interactions in lymph nodes by two-photon microscopy. *Methods in Enzymology*, Vol.506, (2012), pp.437-454 (査読有)

②Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T., and Okada, T. (2011). Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity*, Vol.34, (2011), pp.961-972 (査読有)

〔学会発表〕（計2件）

①Kitano, M. BCL6 Protein Expression Shapes Pre-Germinal Center B Cell Dynamics and Follicular Helper T Cell Heterogeneity. ESF-JSPS Frontier Conferences for Young Researchers, March 1-6, 2011, Hulshorst, The Netherlands

②Kitano, M. BCL6 Expression Dynamics in the Lymph Node during the Antibody Response. The 16th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, December 1-2, 2010, Tokyo, Japan

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1)研究代表者

北野 正寛 (KITANO MASAHIRO)

独立行政法人理化学研究所・免疫細胞動態研究ユニット・研究員

研究者番号：40549010