

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590575

研究課題名(和文) 記憶B細胞の維持・活性化機構の解析

研究課題名(英文) maintenance and activation mechanisms of memory B cells

研究代表者

安達 貴弘 (ADACHI, Takahiro)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50222625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞系譜特異的にカルシウムバイオセンサーYC3.60を発現するマウスを樹立した。B細胞特異的にカルシウムバイオセンサーを発現するマウスを作製し、B細胞の動態のみならずカルシウムシグナルも可視化できるマウス個体レベルの生体イメージングシステムを構築した。免疫したマウスや自己免疫疾患モデルマウスでは、カルシウムシグナルが亢進したB細胞の増加が見られ、生理条件下の免疫反応が可視化できることを示した。

研究成果の概要(英文)：Ca²⁺ signaling is one of the typical phenomenon mediated through immune receptors. Analyses of their signaling together with dynamics in vivo is required for understanding of the precise immune responses. I established stable transgenic mice with the genetically encoded Ca²⁺ indicator yellow cameleon 3.60 (YC3.60) based on the Cre/loxP system. We successfully generated the specific YC3.60 expression mice in immune cells or nerve cells, as well as the ubiquitous expression mice. After crossing with CD19-Cre mice, most B cells exhibited robust YC3.60 expression without significantly altering B-cell function. Intravital imaging of spleen, Peyer's patches, and bone marrow of the CD19-Cre/YC3.60 mice revealed Ca²⁺ flux in B cells. B cells exhibiting high Ca²⁺ were drastically increased in autoimmune-prone CD22 deficient mice. Furthermore, in another autoimmune-prone model C57BL/6-lpr/lpr mouse, lymphocytes of high Ca²⁺ concentration were increased.

研究分野：免疫

キーワード：B細胞 カルシウムシグナル シグナル伝達 生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

B細胞やT細胞をはじめとした免疫担当細胞でのシグナル伝達機構は、その下流の代表的なカルシウムシグナリングやMAPキナーゼの活性化などを指標におもに *in vitro* で解析が行われてきた。しかし、生体内では免疫細胞は移動しながら他の細胞や環境と相互作用しながら活性化を受け、分化・増殖、細胞死などの運命決定がなされている。そこでこの複雑な免疫系を正確に理解するためには、生体内での生理的な条件下でのシグナル伝達解析が不可欠である。生理的条件下での免疫細胞の動態解析は蛍光タンパク質を利用した可視化マウスの生体イメージングにより随分わかってきた。しかし、細胞内シグナル伝達まで可視化して、活性化をリアルタイムでモニターできる系はあまりない。そこで、免疫細胞のシグナル伝達の主要な一つで、かつ検出感度がよいカルシウムシグナリングを生体で可視化することを目指してきた。分子内に2つの発色団を持ち、動きによる計測値の変化を補正できる Yellow Cameleon(YC3.60)のようなカルシウムバイオセンサーは活発に動く免疫細胞のモニターに適しているが、それらを用いたマウスの作製は困難を極めており、トランスジェニックマウスができて免疫系の細胞では発現せず(Direnberger et al. Nat Commun 2012)、ウイルスベクターを使って発現させた細胞をマウスに移入する方法くらいしかなかった(Mues et al. Nat Med 2013)。YC3.60においても、複数の研究機関で試みられたにもかかわらず、なかなか成功しなかった。私はYC3.60が免疫系の細胞のシグナル解析に使えることを確認(安達ら、BBRC, 2008)後、生体内で免疫系のシグナル伝達を明らかにすべく、トランスジェニックマウスの作製にとりかかり、Cre/LoxPの誘導系と組み合わせたところ、細胞系譜特異的にYC3.60を発現できるカルシウムレポーターマウスの作製に

成功した。CD19-Creマウスを交配させ、B細胞特異的 YC3.60 発現マウスでは、麻酔したマウス個体での生体イメージングによって、B細胞の動態のみならず、カルシウムシグナリングもきれいに検出できる5D生体イメージングシステム(x、y、z、時間、シグナリング)を構築している

2. 研究の目的

生体内での複雑な免疫応答における免疫担当細胞の生理的条件下での動態は随分わかってきたが、その時の活性化まで解析できるシステムはほとんどない。私は生体イメージングによりカルシウムシグナリングも細胞系譜特異的にモニターできるマウスを樹立している。この5D生体イメージング(x、y、z、時間、シグナリング)システムを利用し、各種免疫細胞の動態およびカルシウムシグナリングを可視化して、正常マウスでの生理的条件下の免疫応答をリアルタイムで詳細に解明するとともに、自己免疫疾患やアレルギーモデルマウスなどにおいても5D生体イメージングを取り入れ、病態・病因解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

マウス

蛍光タンパク質カルシウムプローブ

Cameleonを条件的に発現するトランスジェニックマウス(Floxed Cameleonトランスジェニックマウス)はCAGプロモーター(サイトメガロウイルス/チキン アクチン)を持ち、プロモーター下流に並列にLoxP配列で挟んだネオマイシン耐性遺伝子、そのさらに下流にYC3.60遺伝子を持つ(図1)。このfloxed CameleonマウスとそれぞれB細胞特異的に、樹状細胞特異的にCre組換え酵素を発現するCD19-Creマウス、CD1c-Creマウスと交配し、B細胞特異的、樹状細胞特異的にCameleonを発現するマウスを用いた。マウス

は本研究所・組換えマウス実験室の SPF の環境で飼育した。遺伝子組換えマウスは東京医科歯科大学動物実験委員会および組換え DNA 安全委員会の承認を得て、指針に従って実験に用いた。

細胞

細胞は B 細胞特異的あるいは樹状細胞特異的に Cameleon を発現するマウス脾臓を、ACK 溶解バッファー(0.15 M 塩化アンモニウム、10 mM 炭酸カリウム)で赤血球を溶解後、in vitro の刺激実験に用いた。

カルシウムイオンの測定

蛍光タンパク質カルシウムプローブ

Cameleon を用いた。図 1 に示すように Cameleon は CFP と YFP の間にカルモジュリンのカルシウム結合ドメインを持ち、カルシウム結合状態では分子内の CFP と YFP が隣接し、CFP から YFP へのエネルギー移動 (Föster resonance energy transfer : FRET) が起こる。このエネルギー移動の効率を測定し、細胞内のカルシウム濃度の変化を検出した。B 細胞特異的 Cameleon マウスより調製した脾臓細胞 (1×10^5) をフェノールレッド不含の RPMI1640 培地 (10%FCS) に懸濁後 35 mm ガラスボトムディッシュに移し、イオノマイシン (1 mM) を最終濃度が 0.01 mM になるように添加した。あるいは樹状細胞特異的 Cameleon マウスより調製した脾臓細胞 (1×10^5) を RPMI1640 培地 (10%FCS) に懸濁後、35 mm ガラスボトムディッシュに移し、2-5 日間培養後、ディッシュに接着している細胞を樹状細胞各分として実験に用いた。接着した細胞を剥がして 35 mm ガラスボトムディッシュに移してさらに 1 日培養後、培地をフェノールレッド不含のものに換え、共焦点顕微鏡で観察しながら、リン酸緩衝液に懸濁したプロポリス (10 mg/ml) を最終濃度が 0.1 mg/ml になるように添加した。FRET の測定は共焦点顕微鏡

(ニコン社製共焦点レーザー顕微鏡 A1 システム) を用いた。

生体イメージング

マウスを麻酔後、腹部あるいは脇腹の一部を外科的に切開して腸管を取り出し、マウスを観察台に固定し、臓器の動きを最小限にとどめるようにして生体イメージングを、ニコン社製共焦点レーザー顕微鏡 A1 システムを用いておこなった。励起波長 458 nm で YFP と CFP の蛍光波長を測定し、YFP/CFP の比をとることによって FRET を検出した。

4. 研究成果

(1) 細胞系譜特異的 YC3.60 マウスを用いた生体イメージングの確立

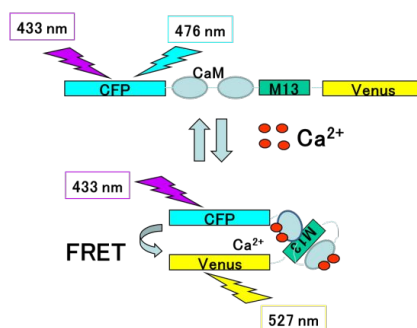


図 1 . Cameleon の構造 433nm 付近の励起波長では通常は CFP の蛍光がみられるが、カルシウム存在下では立体構造変化し、CFP と Venus が近接し、CFP から Venus にエネルギーが転移し CFP の代わりに Venus の蛍光波長を発する。

樹立した細胞系譜特異的 YC3.60 マウスを CD4-Cre マウス、CD11c-Cre マウスあるいは IgG1-Cre マウスと交配して、それぞれ T 細胞特異的、樹状細胞特異的、あるいは IgG1 陽性 B 細胞特異的に YC3.60 を発現するマウスを作製した。小腸パイエル板では CD19-Cre/YC3.60 マウスが B 細胞濾胞全体で YC3.60 が発現しているが、CD4-Cre/YC3.60 あるいは CD11c-Cre/YC3.60 マウスで B 細胞濾胞間や濾胞の下部で発現が見られた(下図を参照)。IgG1-Cre/YC3.60 マウスでは B 細胞濾胞の中心部の 2 次濾胞で発現が見られた。

フローサイトメーターを用いた解析と合わせ、それぞれ細胞特異的な発現が確認された。

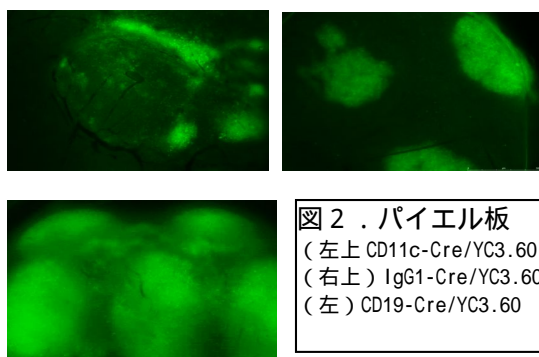


図2 . パイエル板
(左上 CD11c-Cre/YC3.60
(右上) IgG1-Cre/YC3.60
(左) CD19-Cre/YC3.60

麻酔下のそれぞれのマウスを用いて脾臓の生体イメージングを行った。SPF 環境下のマウスで一部の細胞で散発的なカルシウムシグナリングが検出できた。

(2) CD19-Cre/YC3.60 マウスにおいて、パイエル板について生体イメージングを2光子顕微鏡を用いて行ったところ、B細胞濾胞間や濾胞上部の辺縁部にカルシウムシグナルを起こしている細胞が見られた(図3)。一次リンパ組織である骨髄においても頭頂部について生体イメージングでカルシウムシグナルを検出するのに成功した。

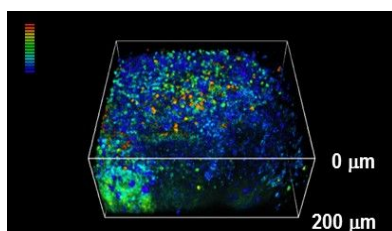


図3 . マウス個体を用いた小腸パイエル板の生体イメージングによるB細胞Ca²⁺濃度の3D解析 Ca²⁺濃度の高いB細胞は表面近くにいる。

(3) 生体イメージングによる自己免疫疾患モデルマウスの解析

ヒトの全身性エリスマトーデス(SLE)の自己免疫疾患モデルマウスと考えられるMRL/lprに4代戻し交配をしたCD19-Cre/YC3.60マウスの脾臓について生体

イメージングを行った。その結果、恒常的に細胞内カルシウム濃度が上昇した細胞が多数存在することが確認され、自己反応性B細胞ではカルシウムシグナルにも異常が見られることが判明した。

またC57BL/6バックグラウンドのlprマウスやB細胞の抑制性共受容体であるCD22欠損マウスでは6ヶ月令でも自己免疫疾患を発症しないが、その状態でも脾臓の生体イメージングによりB細胞のカルシウムシグナルに異常があることが判明した(図4)。この結果はB細胞のカルシウムシグナルをモニターすれば、自己免疫疾患の発病前の超早期に診断することが可能であることを示唆している。

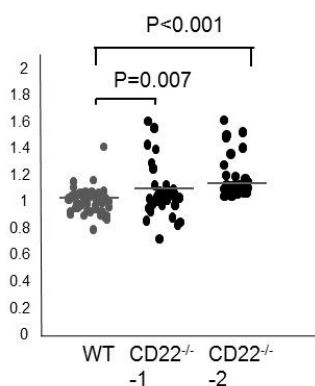


図4 .CD22欠損マウスマの生体イメージング 脾臓B細胞のCa²⁺濃度を示す。野生型(WT)に比べ、CD22欠損B細胞ではCa²⁺濃度の高い細胞の頻度が高い。

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 1件)
Yoshikawa, S., Usami, T., Kikuta, J., Ishii M., Sasano, T., Sugiyama, K., Furukawa, T., Nakasho, E., Takayanagi, H., Tedder, T.F., Karasuyama, H., Miyawaki, A., and Adachi, T.: Intravital imaging of Ca²⁺ signals in lymphocytes of Ca²⁺ biosensor transgenic mice: indication of autoimmune diseases before the pathological onset. Sci. Rep. 6;6:18738. doi: 10.1038/srep18738. 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Intravital imaging of Ca²⁺ signals in lymphocytes of the Ca²⁺ biosensor YC3.60 transgenic mice

ADACHI Takahiro, YOSHIKAWA Soichiro, KARASUYAMA Hajime, ONODERA Taishi, TAKAHASHI Yoshimasa, KIKUTA Junichi, ISHII Masaru, TEDDER F. Thomas

日本免疫学会学術集会 2015.11.18-20 札幌 (札幌コンベンショナルセンター)

2. In vivo imaging of calcium signaling in B cells of mice expressing the genetically encoded YC3.60 calcium indicator

ADACHI Takahiro, YOSHIKAWA Soichiro, ONODERA Taishi, TAKAHASHI Yoshimasa, KARASUYAMA Hajime

日本免疫学会学術集会 2014.12.10-12 京都 (京都国際会館)

3. In vivo imaging of calcium signaling in B cells of mice expressing the genetically encoded YC3.60 calcium indicator

ADACHI Takahiro, YOSHIKAWA Soichiro, ONODERA Taishi, TAKAHASHI Yoshimasa, KARASUYAMA Hajime

日本分子生物学会 2014.12.3 6 横浜 (みなとみらい121)

4. 免疫細胞の活性化可視化マウスによるプロポリスの免疫系への影響の評価

安達貴弘

日本食品免疫学会 2014.10.17-18 東京 (東京大学)

5. *In vivo* imaging of calcium signaling in B cells of mice expressing the genetically encoded YC3.60 calcium indicator

Takahiro Adachi, Soichiro Yoshikawa, Hajime Karasuyama

国際免疫学会 2014.8.25-28 ミラノ (MiCo Milano Congressi)

6. *In vivo* imaging of calcium signaling in B cells of mice expressing the genetically encoded calcium indicator

Takahiro ADACHI, Soichiro YOSHIKAWA, Hajime KARASUYAMA, Taishi ONODERA

日本免疫学会学術集会 2013.12.11-13 千葉 (幕張メッセ)

7. 生体イメージングによる腸管免疫細胞の動態・活性化の解析

安達貴弘

日本食品免疫学会 2013.10.16-17 東京 (東

京大学)

8. *In vivo* imaging of B cell activity in a genetically encoded calcium indicator YC3.60 reporter mouse line

Takahiro Adachi, Soichiro Yoshikawa, Hajime Karasuyama

日本免疫学会学術集会 2012.12.5-7 千葉 (幕張メッセ)

9. 腸管免疫細胞の活性化モニターリングマウスの樹立

安達貴弘

日本食品免疫学会 2012.10.16-17 東京 (ヤクルトホール)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 安達 貴弘 (ADACHI, Takahiro)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号: 50222625

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号：