

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26890028

研究課題名(和文) 光遺伝学を用いた細胞追跡法の確立と腸管由来CD4T細胞の動態解析

研究課題名(英文) Development of a new optogenetic system for tracking the dynamics of immune cells

研究代表者

石亀 晴道 (Ishigame, Harumichi)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：70729227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：組織から組織への細胞移動の可視化やその調節機構を解明するためには、局在特異的に細胞を蛍光標識する技術が有効である。本研究は、光遺伝学的手法を用いて光照射部位特異的に生体内で細胞を不可逆的に蛍光標識し、長期に渡りその後の標識細胞を追跡できるシステムを確立することを目指した。樹立した光照射部位特異的蛍光標識マウスを用いて皮膚への光照射実験を行ったところ、一部の表皮細胞は光照射依存的に蛍光標識されたが、免疫細胞ではその効果は認められなかった。以上のことより、本研究で確立した光遺伝学的手法を用いた細胞標識法は表皮細胞などの一部の細胞種の動態の追跡に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Optogenetic approaches using a photo-activatable Cre recombinase to manipulate the expression of specific gene is an ideal tool to understand the regulation of cellular dynamics as well as the underlying molecular mechanisms. Here we tried to develop a new mouse strain (Opt-Cre) that allows permanent and spatiotemporal labeling of immune cells in vivo. We found that blue light illumination in the skin of OptCre mice induced a light-dependent DNA recombination in the keratinocytes, albeit at a low efficiency. However, we could not observe DNA recombination in immune cells after light exposure. These results suggest that this system may allow light-dependent permanent gene modification and live-cell tracing in specific cell types such as keratinocytes.

研究分野：実験動物

キーワード：光遺伝学 細胞動態

1. 研究開始当初の背景

近年、定常時において常在性腸内細菌が CD4⁺ヘルパーT 細胞の分化や IgA 産生を調節することで、腸管での免疫応答を厳密に制御していることが分かってきた。興味深いことに、この腸内細菌による宿主免疫応答の調節は腸管局所に限らず、中枢神経組織、肺、関節、膵臓などの炎症応答にも影響を与え、ウイルス感染、アレルギー、臓器特異的の自己免疫疾患の発症にも深く関与していることが明らかとなっている。さらに最近では、腸内細菌による宿主の生理機能の調節が、2型糖尿病や動脈硬化といった慢性炎症を伴う生活習慣病の発症にも深く関与していることも分かってきた。

常在性腸内細菌が全身性の免疫応答に影響を与える機構として、1. 腸管で分化した Th17 細胞や Treg 細胞が他の組織に移動することで局所での炎症応答を調節する、2. 腸内細菌構成成分が血中に流出することにより全身性に自然・獲得免疫応答を調節する、3. 腸内細菌による代謝産物が細胞に作用し免疫応答を調節する、ということが考えられているが詳細は明らかとなっていない。そのため、腸内細菌による全身性の炎症応答調節機構は不明であり、腸管で分化した T 細胞が実際に他の末梢組織に遊走し、臓器特異的な炎症を誘導・抑制しているのかについては分かっていない。

組織から組織への細胞移動の可視化やその調節機構を解明するためには、局在特異的に細胞を蛍光標識する技術が有効である。これまで報告されている照射により緑から赤に蛍光色に変換される蛍光タンパク質 Kaede や KiKGR を用いた標識システムは、炎症誘導時に T 細胞のようなターンオーバーの早い細胞集団では蛍光変換した赤色蛍光色が減弱・消失してしまうという欠点があった。そのため、特定の組織に存在する細胞集団を不可逆的に標識し、長期に渡りその後の挙動解析を可能とする手法は未だ確立されていない。一方で、最近では光遺伝学的に遺伝子発現を制御する手法が開発され、培養細胞において照射刺激により Cre リコンビナーゼの発現を誘導することで細胞を蛍光標識できるシステムが報告されている。しかしながら、生体内においてこの技術が利用可能であるかについては不明である。

2. 研究の目的

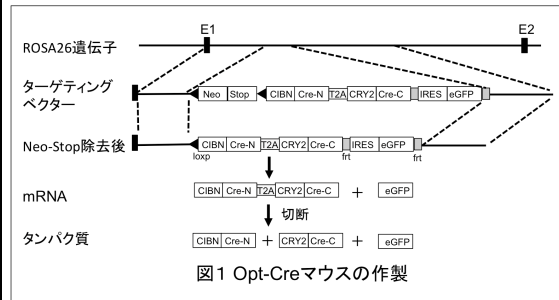
本研究は、光遺伝学的手法を用いて生体内において特定の組織に存在する免疫細胞を不可逆的に標識し、長期に渡りその後の挙動を追跡できるシステムを確立することを

目的とした。さらに、このシステムを用いて腸管由来 T 細胞が他の組織へ移動する過程の可視化を目指した。

3. 研究の方法

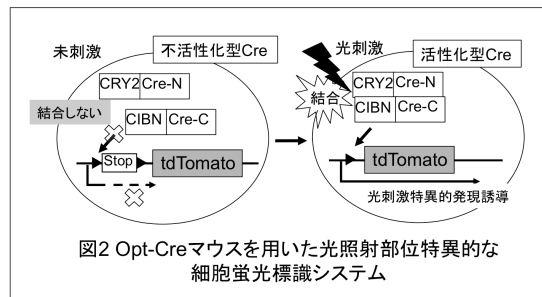
(1) 光遺伝学的手法を用いた細胞追跡法の確立

照射依存的に Cre リコンビナーゼの発現を誘導できるマウス(オプトジェネティクス Cre:Opt-Cre マウス)を発生工学的的手法により作製した(図 1)。



(2) Opt-Cre マウスを用いた細胞追跡法の有用性の評価

樹立した Opt-Cre マウスと Cre 依存的に赤色蛍光タンパク質(Tomato)が発現誘導されるマウスを掛け合わせた(Opt-Cre-Tomato)。このマウスに照射し、Tomato 陽性細胞が誘導されるかについて検討し、この実験系が細胞動態の解析に有用であるかについて評価を行った(図 2)。



4. 研究成果

(1) 光遺伝学的手法を用いた細胞追跡法の確立

照射依存的に Cre リコンビナーゼの発現を誘導できる Opt-Cre マウスを確立するために、照射により2つの不活性化型 Cre 断片の会合・活性化を誘導できる CIBN/CRY2 システム(Liu et al, Science 2008, Kennedy et al, Nat Method 2010)を用いた。まず、不活性化型である N 末端 Cre 断片と CIBN の融合タンパク(CIBN-CreN)と、不活性化型 C 末端 Cre 断片と CRY2 の融合タンパク(CRY2-CreC)の翻訳フレームを自己消化性ペプチドである T2A 配列で結合したベクターを作成した。次に、恒常的にこれら2つの融合タンパクを発現させるために、この配列

を ROSA26 遺伝子座に目的遺伝子の発現誘導が可能なノックインベクター (CTV; Addgene より購入) に挿入した。このベクターを用いて ES 細胞培養法により相同組換え体を獲得後、キメラマウスを作製することで Opt-Cre マウスを樹立することに成功した (図 1)。Neo-Stop カセットを除去した Opt-Cre マウスを用いてフローサイトメトリーによる解析を行ったところ、ほぼ全ての免疫細胞が GFP 陽性であることを確認した。

次に、OptCre マウスが実際に Cre リコンビナーゼを発現しているかを確認するために、Opt-Cre マウスの脾臓細胞を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、CIBN-CreN(40kDa)と CRY2-CreC(77kDa)のどちらの Cre 断片も発現していることを確認した。一方で、CreN と CreC が会合したタンパク質(117kDa)は検出されなかった。

(2)Opt-Cre マウスを用いた細胞追跡法の有用性の評価

Opt-Cre-Tomato マウスを用いて、光照射刺激により CIBN-Cre と CRY2-CreC が会合し、実際に光照射依存的なリコンビネーションが誘導されるかについて検討を行った。未処理の Opt-Cre-Tomato マウスの脾臓やリンパ節より分離した免疫細胞では、フローサイトメトリーにより Tomato 陽性細胞は検出されなかった。この結果は、上記のウェスタンブロッティングの解析において CreN と CreC が会合したタンパク質が検出できなかったことと一致しており、定常時において非特異的な Cre 断片の結合・活性化は認められないと考えられた。

次に、Opt-Cre-Tomato マウスに光照射処置を行った後に Tomato 陽性細胞の検出を試みた。光照射はマウス腹部・背部を除毛後に皮膚に行い、蛍光タンパク質 KiKGR を発現するマウスにおいて緑から赤への蛍光色変換が可能な光照射条件を用いた。しかしながら、この光照射条件においても、光照射時に皮膚に局在しリンパ節へ遊走してくる免疫細胞には Tomato 陽性細胞は存在しなかった。一方で、光照射した皮膚を 2 光子顕微鏡で観察してみたところ、一部の表皮細胞において Tomato 陽性細胞が確認され、表皮細胞では効率は低い光照射依存的なリコンビネーションが誘導可能であった。

In vivo において免疫細胞では光照射刺激後においてもリコンビネーションが誘導されなかったことから、Opt-Cre-Tomato マウスの脾臓細胞を分離し、ex vivo において光照射実験を行った。脾臓細胞は anti-CD3/anti-CD28 刺激存在下で培養し、光照射は CIBN-Cre と CRY2-CreC をトランスフェクションした細胞株においてリコンビネーション活性を誘導可能な条件で培養 2

日目と 3 日目に行ったが、培養 4 日目においてもフローサイトメトリーにより Tomato 陽性細胞は確認できなかった。

以上の結果、本研究で作製した Opt-Cre マウスは光遺伝学的手法を用いて免疫細胞を蛍光標識することは困難であることが判明した。一方で、一部の皮膚表皮細胞では光刺激による蛍光標識が可能であった。この原因として、免疫細胞では CIBN-CreN と CRY2-CreC の発現量が表皮細胞に比べて低く、光照射後に両者が効率良く会合できていないことが考えられる。今後、異なる組織・細胞種間で Cre 断片の発現量を比較し、高発現している組織に光照射することで細胞蛍光標識の効率を確認する必要がある。

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 3 件)

1. Murayama M, Kakuta S, Inoue A, Umeda N, Yonezawa T, Maruhashi T, Tateishi T, Ishigame H, Yabe R, Ikeda S, Seno A, Chi H, Hashiguchi Y, Kurata R, Tada T, Kubo S, Sato N, Liu Y, Hattori M, Saijo S, Matsushita M, Fujita T, Sumida T and Iwakura Y. CTRP6, a novel complement regulator, effectively treats induced arthritis. *Nat Commun*.6:8483. doi: 10.1038/ncomms9483, 2015. (査読有)
2. Akitsu A, Ishigame H, Kakuta S, Chung SH, Ikeda S, Shimizu K, Kubo S, Liu Y, Umemura M, Matsuzaki G, Yoshikai Y, Saijo S, Iwakura Y. IL-1 receptor antagonist-deficient mice develop autoimmune arthritis due to intrinsic activation of IL-17-producing CCR2⁺Vγ6⁺γδ T cells. *Nat Commun*. 6:7464. doi: 10.1038/ncomms8464, 2015. (査読有)
3. Yabe R, Shimizu K, Shimizu S, Azechi S, Choi BI, Sudo K, Kubo S, Nakae S, Ishigame H, Kakuta S, Iwakura Y. CCR8 regulates contact

hypersensitivity by restricting cutaneous dendritic cell migration to the draining lymph nodes. *Int Immunol.* 27:169-81, 2015. (査読有)

〔学会発表〕(計 1件)

1. 石亀晴道, 新中須亮, 田汲明子, 黒崎知博, 岡田峰陽. 転写因子 Bach2 による CD8 T細胞分化制御機構の解明. 第80回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 2015. 7.17-7.18. 東工大蔵前会館 (東京都 大田区).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

〔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 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石亀 晴道 (ISHIGAME HARUMICHI)

理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号 : 70729227

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし