

研究シーズ探索プログラム 研究課題別評価書

1. 研究課題名

全身の *in vivo* 免疫細胞動態、機能可視化プロジェクト

2. 研究代表者

戸村 道夫（理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター 上級研究員）(H23.1-3)
（同 脳科学総合研究センター 細胞機能探索技術開発チーム 研究員）(H23.4-6)
（東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室 特任助教）(H23.7-12)

3. 研究シーズ探索成果の概要

免疫系は全身に分布する高次複雑系である。従ってその理解のためは、免疫細胞の動態及び機能発現の全身レベルでの時間・空間・数量的な制御情報の取得及び考察のための、異分野を融合した新しい方法論の確立が必須である。そこで本研究では、申請者が実験によって得ている細胞動態情報を用い、免疫細胞動態の経時的な変化を画面上で視覚化するプロトタイプを作成し、全身の免疫細胞動態の 3D 視覚化の方法論と今後の開発方向性、及び視覚化の重要性を示した。更に、腸管免疫系から全身に移行する免疫細胞動態を評価できるシステムを確立し、実際に確立した評価系を用い、「腸管からの免疫細胞移動は想定されていたものよりも非常に早い」という生物学的に重要な新知見の取得にも成功した。以上、「免疫細胞の時間・空間・数量的な制御メカニズムの解明に基づく免疫システムの理解」に基づいて推進している本研究の有意性と可能性を示すことで、将来的に推進すべき研究シーズである事を確認できた。

4. 研究シーズ探索のねらい

免疫恒常性維持のメカニズム解明が試みられてきたが、免疫システムの全体像は未だ不明である。生体は時間・空間・数量的にも緻密に制御された統合システムと考えられ、免疫系も 10^{11} 個もの多彩な免疫細胞が全身を移動しながら機能発現する緻密に制御され動的平行を保った一つの統合システムである。従って、個々の免疫細胞が全身の中でどのように時間・空間・数量的に制御されているかという、全身レベルでの時間・空間・数量的な制御情報を加えた免疫システムの考察が必須である。そこで私は、「免疫細胞の時間・空間・数量的な制御メカニズムの解明に基づく免疫システムの理解」を基盤とした「全身の *in vivo* 免疫細胞動態、機能可視化プロジェクト」を推進している。本研究を更に前進するためには、全身の免疫細胞動態情報の取得法とそれを考察するための方法論を確立すると共に、本研究の有用性、重要性を示す必要がある。

そこで、本研究では、

1. 免疫細胞動態、機能のモデル化・視覚化のプロトタイプの作成により、全身の免疫細胞動態のモデル化、視覚化の基礎を築き、免疫細胞の全身動態に基づいた免疫応答の理解を深める基礎を作る。
2. 申請者の確立した Kaede-Tg マウスを用いた免疫細胞動態評価系において、腸管免疫系から移行する細胞の評価システムを確立し、確立した評価系によって得られた新知見を示す。以上 2 点の達成することで、「全身の *in vivo* 免疫細胞動態、機能可視化プロジェクト」の有意性と可能性を示す。そして、これらの研究成果を研究シーズとし、免疫研究における新しいアプローチ法として一般化、定着のために共同研究を拡げ免疫学全体の現況のブレークスルーを目指す研究シーズとなることを目指す。

5. 研究シーズ探索の方法と成果

5.1 方法

1. 免疫細胞動態、機能のモデル化・視覚化のプロトタイプ作成

共同研究者である理化学研究所・基幹研究所・生体シミュレーション研究チームの横田リーダーは、今までに3次元(3D)内部構造顕微鏡により獲得した2次元情報を、コンピューターによって3D視覚化して表示する方法を確立している。マウスについても、凍結したマウスを数 μm の単位で切除しながら、切断面を撮影していく方法により2次元連続切片情報を取得後、これらのデータから3D視覚化を行っている。そして、内部構造の全て、あるいは特定の臓器だけを操作しながら画面上に表示可能なアプリケーションを開発している。そこで、本研究では全身のリンパ球動態の視覚化のプロトタイプ作成を、このマウス3D像表示アプリケーションに組み込む形で行うことにした。細胞動態のデータはCD4⁺T細胞の鼠径リンパ節での入れ替わり、鼠径リンパ節から下流の腋窩リンパ節へのリンパ管を介した移行、更に、血液を介した他のリンパ節への移行のデータ(図1(Tomura et.al. PNAS, 2008))を用いた。皮膚

や腸管などの臓器から所属リンパ節、そして、全身への細胞移行の可視化にも、今後そのまま適応出来るプロトタイプを作成することを念頭に研究を推進した。

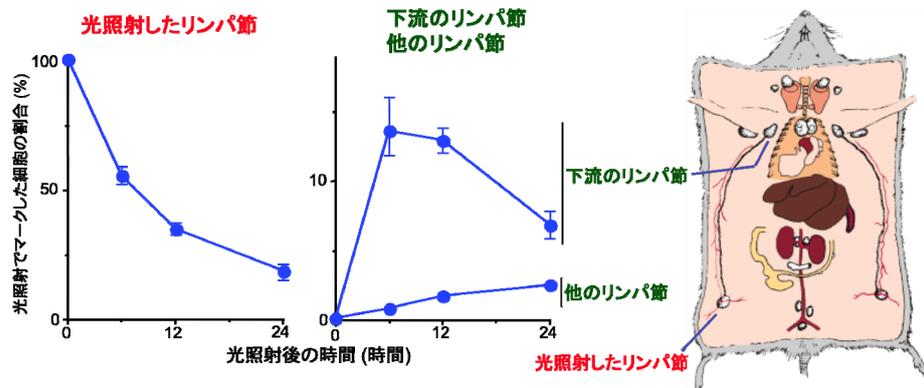


図1 CD4⁺T細胞の1個のリンパ節→下流のリンパ節→全身への細胞移動の追跡

2. Kaede-Tg マウスを用いた腸管免疫系から移行する細胞の評価システムの確立

Kaede に比べ約 1/5 の時間の照射で緑色から赤色に光変換できる、Kaede の次世代型の Kikume-ishi green-red (Kik-GR)を発現するマウスを作製したので、当評価系に導入して使用した。腸管は生体内器官のため、照射中の腸管温度を維持するために、38°Cに暖めた PBS(-)を露出した腸管に連続的に滴下する装置を、恒温槽、ペリスタポンプ、温度コントローラー、加温用のインラインヒーターで構築して使用した。一方、麻酔中のマウス体温を維持する為に、板型のヒーターとスライダックを組み合わせて、マウス本体を保温する装置を構築し使用した。システム確立の確認は、腸管を照射して12及び24時間後に腸管における細胞の入れ替わりの割合と、腸管から腸間膜リンパ節、そして他のリンパ器官に移行する細胞の再現性によって行った。

5.2 成果

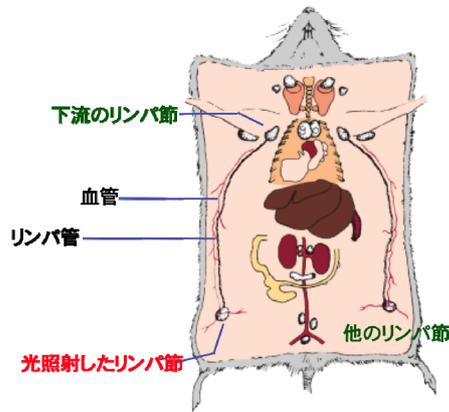
1. 免疫細胞動態、機能のモデル化・視覚化のプロトタイプ作成

1) 2D 連続切片像から、皮下リンパ節(顎下, 上腕, 腋窩, 鼠径, 膝下)及び脾臓領域を抽出した。他のリンパ節については、2D 画像からの領域抽出が困難であったため今回は無視した。抽出した領域を、照射した鼠径リンパ節、その下流のリンパ節となる、同側の腋窩リンパ節、その他の3群にグループ分けを行った(図2)。

2) 鼠径リンパ節に照射した後の、マークされたリンパ球の各グループでの分布の時間変化を、各リンパ系器官に色付けし、その色変化で示すことにした。マークしたリンパ球の頻度変化をより認識し易い色変化によって行う必要がある。そこで、カラー表示に使用するための256諧調のカラーバーを10種類以上試作した。そして、3D 画像に当てはめる前に、色変化の時間経過の確認及び、3D 表示時の補助のために作成したアプリケーション(図3)に当てはめ、一番効果的に示せるカラーバーを選定した。

3) マウス 3D 像のアプリケーションに選定したカラーバーを適応させることで、表示したリンパ節、脾臓

の色変化によって、各臓器のマークした細胞の頻度を表示できるようにした。このアプリケーションでは、3D マウス像の回転、拡大縮小、断面の作成によるリンパ系器官の表示や時間経過の表示などを、その場で操作しながら表示でき、3D めがねの着用により立体的に見ることが可能である。操作例とし



リンパ節は白抜きの球系で示している。リンパ節を、光照射したリンパ節、下流のリンパ節、他のリンパ節の3つグループ分けした。

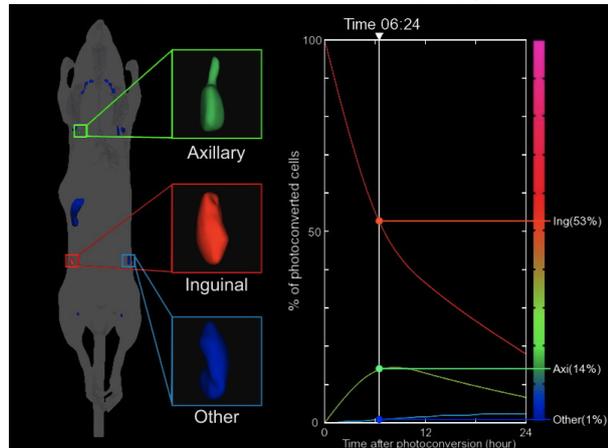


図3 色変化によるマークした細胞頻度の経時変化の表示

図2 一つのリンパ節→下流のリンパ節→全身への細胞移動の可視化のためのリンパ節のグループ分け

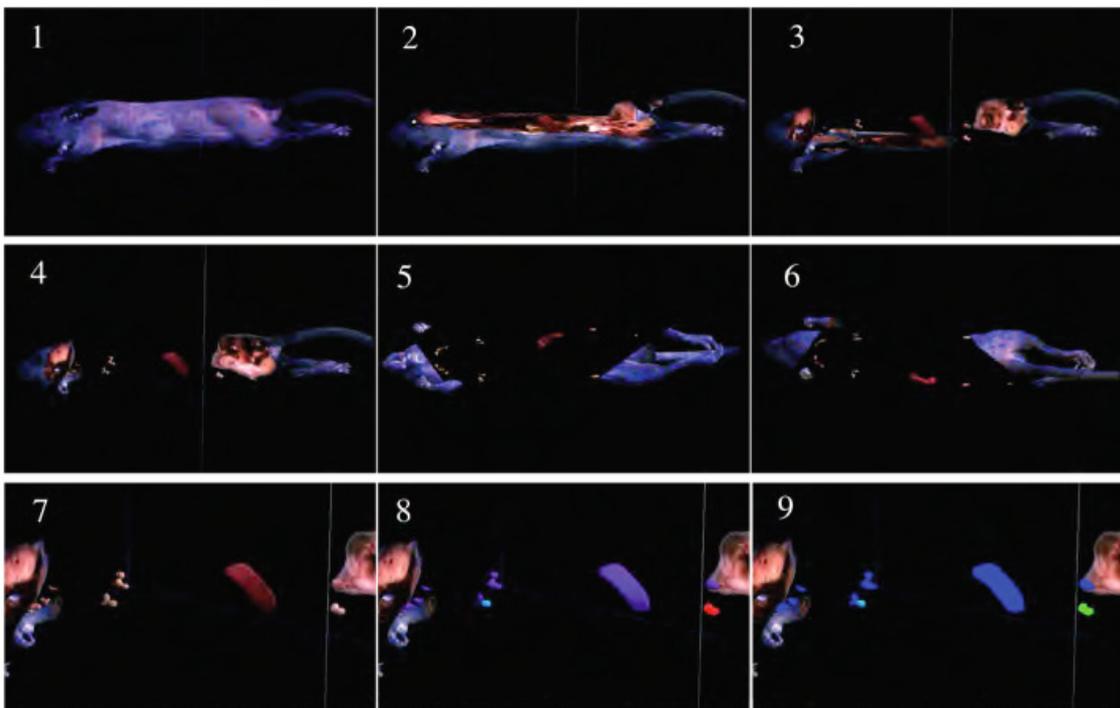


図4 リンパ節、脾臓の抽出3次元表示と、マークしたCD4⁺T細胞の頻度変化の色変化による表示で、マウス3D像からリンパ節及び脾臓を抽出して表示している過程(図4上段)、回転(図4中段)、その後、ズームイン、色変化によりマークしたリンパ球の頻度変化を表示した(図4下段)。

以上の検討により、免疫細胞動態、機能のモデル化・視覚化の3Dマウス像によるプロトタイプの実現に成功した。さらに、作成過程で用いてきた二次元マウス像・グラフの3D像マウスとの同時表示は、色変化による細胞動態の理解を助ける有用な手段になることが分かった(図5)。図5左は、臓器抽出の状態、中及び右はマークした細胞の頻度を臓器の色変化とグラフで示している。

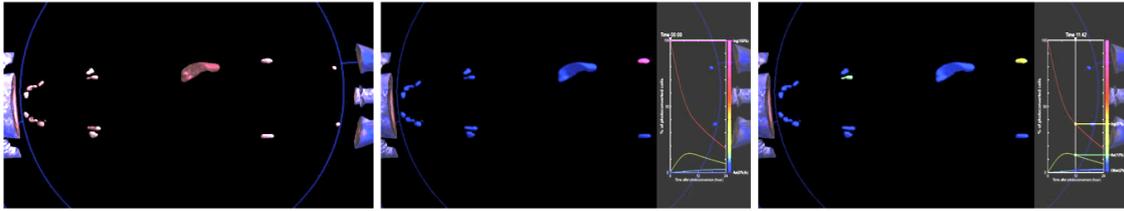


図5 マウス3D像と細胞動態変化のグラフの同時表示

一方で独立して存在する領域のはっきりした主要な内臓臓器(心臓、肺、肝臓、膵臓、腎臓、胃、小腸、大腸)などに対し、全身に分散して存在するリンパ節、そして、免疫系器官である脾臓、胸腺、骨髄のイメージは一般的に薄くあいまいである。従って、これら臓器を視覚化して3D的に示すことは、全身に広がる免疫系という概念を把握してもらう方法として、免疫系の研究者も含め重要なツールになると考えられる。今後、リンパ器官間を結ぶ脈管系(血管、リンパ管)の表示を組み合わせることで、より、一目瞭然に免疫細胞動態を理解出来るツールとして育てていくことで、免疫系の理解の促進に貢献できると考えている。

2. Kaede-Tg マウスを用いた腸管免疫系から移行する細胞の評価システムの確立

KikGRマウスの腸管を光照射し、腸管から移出する細胞について解析した。KikGR発現マウスでは、光変換にかかる照射時間は短時間で済み、腸管を温度管理する必要な時間も Kaede-Tg マウスに比べ 1/3 以下に短縮できた。その結果、今まで Kaede-Tg マウスで行っていた時に低頻度ながら認められた腸管が太くなるような症状は認められなかった。腸管に存在する免疫細胞を光変換によりマークして、6、12 及び 24 時間後に、腸管及び腸管の所属リンパ節である腸管リンパ節の樹状細胞サブセット、T 細胞サブセット、B 細胞を解析し、腸管組織内での入れ替わりと所属リンパ節への移行の情報を取得した。更に腸間膜リンパ節を光照射する検討も加えた結果、腸管から所属リンパ節である腸間膜リンパ節に移行する特定細胞は、腸管から所属リンパ節に移行した後、非常に速い速度で入れ替わっていることが明らかとなり、この入れ替わり速度は、通常想定されていた速度に比べ非常に早く、免疫システムの恒常性を理解する上で重要な情報を得ることが出来た。

以上、「全身の *in vivo* 免疫細胞動態、機能可視化プロジェクト」という本研究の有意性と可能性を示すことにより、将来的に推進すべき研究シーズである事を確認できた。

6. 自己評価

1. 免疫細胞動態、機能のモデル化・視覚化は、3D マウス像と組み合わせたプロトタイプの実成に成功したが、それを理解するためには、免疫器官・血管・リンパ管・免疫細胞の全身循環という知識・概念を持っていることが前提となってしまう、誰でも一目瞭然で全身に移動する免疫細胞の動態を理解してもらう方法の難しさを実感した。しかし一方で、一般になじみの低い免疫器官を可視化して表示するだけでも、全身に広がる免疫系という概念を把握してもらう方法の第一歩になったと考えている。正常及び免疫応答時の皮膚や腸管からの免疫細胞移動の可視化を加えた全身細胞動態の視覚化は、今後、免疫系理解のための重要な一つの方法論になりうると実感した。2. Kaede-Tg マウスを用いた腸管免疫系から移行する免疫細胞動態評価系の確立は、腸管が繊細な組織であるため確立が遅れていたが本研究を通し確立できたことで、今後の免疫学の発展に寄与できると考えている。更に新知見が得られたことから、「免疫細胞の時間・空間・数量的な制御メカニズムの解明に基づく免疫システムの理解」という研究の方向性の有用性と可能性を更に確認できたことは大きな収穫であった。

7. PO の見解

本研究は全身の in vivo レベルで免疫細胞の動態及び機能発現の時間・空間・数量的な制御機構を視覚化し、評価するシステムの構築を目指したものである。全身のリンパ節の働きを一定程度、可視化を可能とし、腸管からのリンパ球の流出についても新たな知見を得ている。しかし、これを3次的に表示することの難しさ、マイナーな細胞集団を追跡することの難しさから、全身の免疫細胞の機能の可視化するまでには至っていない。

最終的な目標である「免疫系を緻密に制御された一つの統合された高次機能システムとして理解」までには、標識法と検出法の飛躍的向上が必要とされるが、現状では難しい。血管、リンパ管の同時可視化により、リンパ球などの生体移動が観察可能となり、リンパ球のマスとしての流れではなく、免疫反応に伴って発生する流れを検出可能となれば免疫学への貢献は大きい。

8. 研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

該当無し。

(2)特許出願

該当無し。

(3)口頭発表

①学会

国内 2件, 海外 0件

第22回 高遠・分子細胞生物学シンポジウム (2010年8月19日-20日)
カエデマウスを用いた全身レベルでの免疫細胞動態解明による免疫システムの理解

第16回武田科学振興財団生命科学シンポジウム (2010年12月1日-2日)
Understanding of immune system based on visualization of spatiotemporal regulation of immune cells in the whole body by “Kaede”-transgenic mice.

The 2nd Workshop of Synthetic Immunology (2010年12月17-18日)
Understanding of immune system based on visualization of spatiotemporal regulation of immune cells in the whole body by “Kaede”-transgenic mice.

②その他

該当無し。

(4)その他の成果(受賞、著書、招待講演、特記事項等)

第20回日本サイトメトリー学会学術集会 2010年6月26-27日
カエデマウスを用いた全身レベルでの免疫細胞動態解明による免疫システムの理解

Max Planck Institute, Berlin 2010年9月24日

Understanding of immune system based on visualization of spatiotemporal regulation of immune cells in the whole body.

第5回千葉大学G-COEシンポジウム「Development and Maintenance of Immune Memory」22年12月4日

Revealing of spatiotemporal regulation of memory T cell generation and maintenance in the whole body by Kaede-Tg mice