

研究報告書

「免疫・炎症研究におけるオプトジェネティクスの創生」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 岡田 峰陽

1. 研究のねらい

免疫応答の異常は多種多様な炎症性疾患の原因となる。例えば、自己の身体の組織や細胞を構成する分子（自己抗原）や、生活環境に存在する無害な物質（環境抗原）を標的とする抗体が異常に産生されると、自己免疫性疾患や、アレルギー性疾患の発症につながる事が知られている。しかしこのような免疫疾患の発症が、どこで開始し、どのように進行するかについては、詳細が分かっていない場合が多い。これを理解するためには、疾患の原因となる免疫細胞の臓器間移動を追跡することが重要となるが、この追跡を可能にする手段がないのが現状である。

一方、制御性 T 細胞と呼ばれる T 細胞の亜集団には、自己抗原や環境抗原に対する免疫応答を抑制する重要な働きがある。遺伝子変異によって、制御性 T 細胞に必須の転写因子である FoxP3 の機能が損なわれると、皮膚、脾臓、肝臓、肺、腸などの様々な臓器に重篤な炎症が起こり、死に至ることが知られている。制御性 T 細胞は FoxP3 に加えて様々な別の転写因子を発現し、これらの転写因子の種類によって、抑制する炎症の種類や場所が異なると言われている。しかしその実態やメカニズムについては、まだ不明な部分が多い。

近年、抗体産生応答に深く関わる事が知られている転写因子が、制御性 T 細胞の一部にも発現していることが明らかとなってきた。本研究では、この転写因子を発現する制御性 T 細胞の自己免疫疾患の発症抑制における役割を明らかにしたい。また増殖する免疫細胞を、光を用いて特定の場所で永続標識する方法を構築し、自己応答性の免疫細胞の臓器間移動を追跡することで自己免疫疾患の開始点と進行機序を理解することを狙う。

2. 研究成果

(1) 概要

抗体産生応答に深く関わる事が知られている転写因子を、制御性 T 細胞において選択的に欠損させたマウスを作製して解析した。その結果、このマウスは生後9週前後から致死性の疾患を発症することが明らかとなった。解析を進めていくと、少なくとも一部のマウスにおいては、ある血球細胞に結合する自己抗体が産生されていることが分かった。また驚いたことに、活性化した T 細胞が脾臓および骨髄で異常に増殖し、骨髄で血球前駆細胞を破壊している可能性が示唆された。この活性化 T 細胞の増殖は脾臓でまず起こり、それに続いて骨髄で起こっているようであった。脾臓における細胞局在を調べたところ、制御性 T 細胞が B 細胞濾胞に見られなくなっているだけでなく、T 細胞領域においても制御性 T 細胞の局在変化が見られた。さらにこの炎症疾患の発症には、上記の転写因子の欠損だけでなく、制御性 T 細胞のホールマーク転写因子である FoxP3 の、部分的な発現減弱が重要な役割を果たしていると示唆された。これらの結果から、上記の転写因子は脾臓における制御性 T 細胞の局在を制御しており、この局在制御の異常と FoxP3 発現の部分的減弱が同時に起こると、血球細胞抗原に

対して応答性を持つ T 細胞や B 細胞が活性化され、自己抗体産生や骨髄炎が引き起こされることが考えられた。

また、炎症性疾患を引き起こす T 細胞などのリンパ球の、脾臓から骨髄へ移動を検証するために、光によって細胞に改変を加える方法(オプトジェネティクス)を用いて、生体内細胞追跡法を確立することを目指した。植物由来の光反応性タンパク質と融合させた Cre recombinase 断片(Opt-Cre)を、レトロウイルスによってリンパ球に発現させ、生きたマウスに光照射を行うことによって、特定のリンパ節において増殖しているリンパ球の一部を永続標識することが可能であることを確認した。この方法を疾患モデルマウスに適用するために、Opt-Cre を全身性に発現するノックインマウスを作製した。残念ながら、このノックインマウスでは、リンパ球の光標識の効率が非常に低く、リンパ球において Opt-Cre の発現を高めることが課題として残った。一方、このノックインマウスでは上皮細胞系において発現が高く、表皮角化細胞の光標識はある程度安定して達成できることが分かり、皮膚炎症モデルにおける角化細胞の分化追跡を可能にすると考えられた。

(2) 詳細

研究テーマ A「新規の自己免疫性炎症疾患モデルの確立」

制御性 T 細胞のホーミング転写因子 FoxP3 の遺伝子座に Cre 遺伝子を挿入したマウスと、抗体産生応答において重要なことが知られている転写因子の遺伝子に loxP を導入したマウスを交配することにより、制御性 T 細胞で選択的にこの転写因子を欠損するマウスを作製した。こ

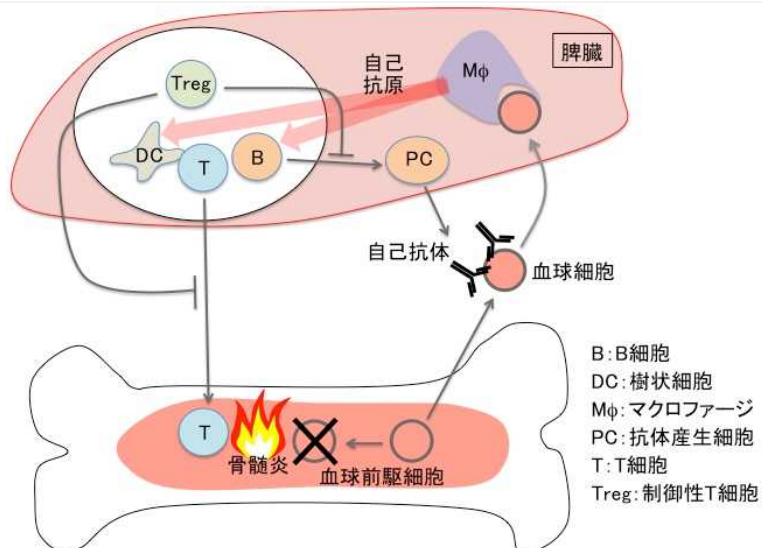


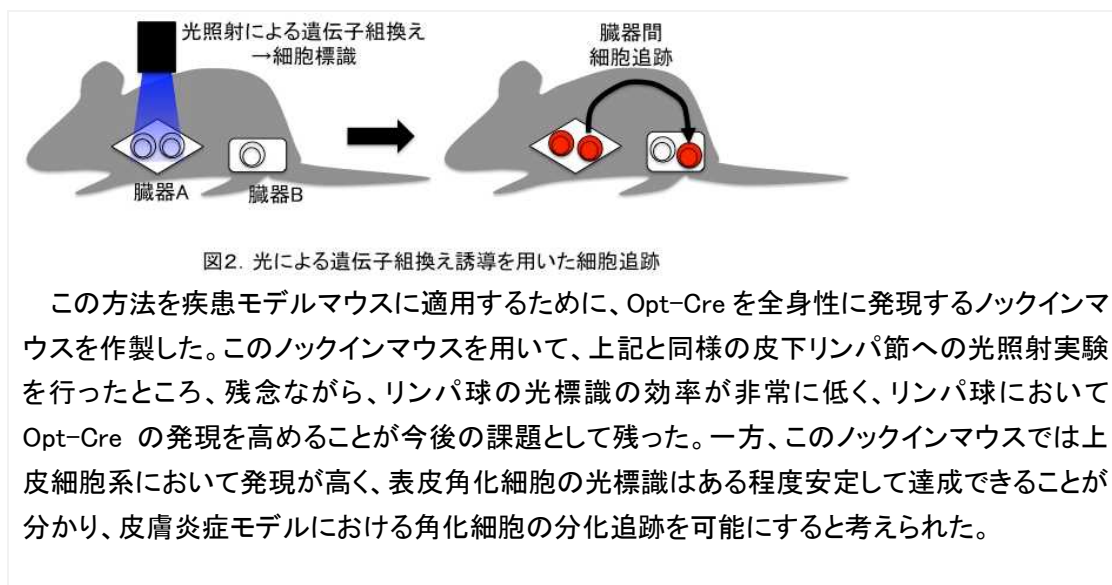
図1. 脾臓の制御性T細胞による自己免疫性炎症の制御

のマウスの脾臓等の細胞を解析したところ、制御性 T 細胞の総数はほとんど野生型と変わらなかったが、B 細胞濾胞にホーミングするタイプの制御性 T 細胞が、期待通り消失していた。このマウスは、生後6週齢以降に致死性の疾患を発症する事が分かった。各臓器の病理切片解析を行ったところ、殆どの組織においては異常が観られなかったが、脾腫と骨髄炎が顕著に起こっていることが分かった。またある血球細胞のみが激減しており、これが死因であることが示唆された。この血球細胞に対する自己抗体の産生が検出されたマウスも見出され、病態形成メカニズムの一部は自己抗体産生による血球細胞の傷害であることが示唆された。しかしながら半数以上のマウスは、自己抗体が検出されないにも関わらず死に至ることが分かり、それ以外のメカニズムも病態形成に関わっていることが示唆された。これについて調べるために、遺伝学的手法で B 細胞を欠損させたところ、発症の遅れと生存期間の延長が見ら

れたが、最終的には同様の病態を形成してしまうことが明らかとなった。つまり、やはりB細胞や抗体に依存しない病態形成メカニズムがあることが強く示唆された。そこで次に、損傷される血球細胞の形成の場である骨髄において、様々な分化段階の前駆細胞をコロニー形成アッセイ等により解析し、どの分化段階において損傷を受けているか特定することが出来た。骨髄と脾臓の炎症細胞を詳細に解析したところ、発症したマウスではある種のエフェクターT細胞が特に増加していることが明らかとなった。さらに発症する前のマウスの脾臓でもこのエフェクターT細胞の増加は見られたが、骨髄では顕著ではなかった。このエフェクターT細胞に対する中和抗体を生後3～4週齢のマウスに投与し続けると、発症がほぼ完全に抑制されることが分かり、このエフェクターT細胞が病態形成において重要な役割を果たしている事が示唆された。脾臓における細胞局在を調べたところ、制御性T細胞がB細胞濾胞に見られなくなっているだけでなく、T細胞領域においても上記のエフェクターT細胞の分化を促す場所から、制御性T細胞が減っていることが分かった。さらにこの炎症疾患の発症には、上記の転写因子の欠損だけでなく、制御性T細胞のホールマーク転写因子であるFoxP3の、部分的な発現減弱が重要な役割を果たしているとし唆された。これらの結果から、上記の転写因子は脾臓などのリンパ性組織における制御性T細胞の局在を制御しており、この局在制御の異常とFoxP3発現の部分的減弱が同時に起こると、血球細胞抗原に対して応答性を持つT細胞やB細胞が活性化され、特定の血球細胞に発現する自己抗原に応答する抗体の産生やエフェクターT細胞の活性化が起こり、この血球細胞やその前駆細胞を傷害するという病態形成メカニズムが示唆された。

研究テーマ B「光を用いた組織選択的な遺伝子組換え法の確立」

光活性化型 Cre (シロイヌナズナの光感受性タンパク質 CRY2 と、その光依存的結合相手のタンパク質 CIB の断片を、分割した Cre 断片に融合させたタンパク質)について、これまで報告されたものに、スパーサーや核移行シグナル配列の挿入など様々な改変を試み、培養細胞における発現系で試験した。その結果、SV40 由来の核移行シグナル配列を N 末に核移行配列を挿入したものが、これまで報告されていたものに比べて、1.5 倍程度高い効率で光依存的遺伝子組換えを示した。この光活性化型 Cre の遺伝子を、Rosa-flox-stop-tdTomato マウスの骨髄細胞にレトロウイルスによって導入し、γ線照射したコンジェニックマウスに移植することで骨髄キメラを作製した。得られた骨髄キメラマウスに皮下免疫をして、10 日後に皮下リンパ節を露出させて光照射を行い、縫合して 2 日後にイメージングおよびフローサイトメリーを行ったところ、胚中心 B 細胞において約 5%の細胞が光刺激依存的に tdTomato を発現していた。一方、胚中心 B 細胞に比べると、ナイーブリンパ球での光刺激依存的な tdTomato 発現率は低かった。このことから光活性化型 Cre を強く発現させれば、増殖中の細胞においては、遺伝子組換えが in vivo においても光によって誘導できることが分かった。



3. 今後の展開

ヒトゲノム研究者との連携を深め、今回注目した転写因子と FoxP3 転写因子の両方の発現減弱が起きているような、遺伝子多型について探索する。今回の研究に用いたものよりも、光誘導組換え効率の高いオプトジェネティクスツールの開発や、生体内導入を継続して進めていく。今回可能となった生体内での皮膚角化細胞の光誘導遺伝子組換え技術を用いて、皮膚慢性炎症における、角化細胞の分化異常の追跡を行う。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

一部の制御性 T 細胞は抗体産生応答に重要な転写因子を発現しているが、これらの制御性 T 細胞は自己抗体産生を抑制しているだけでなく、抗体非依存的な病態形成も抑制していることを明らかにすることができた。この病態は、ヒトで知られている稀少疾患に非常に類似しており、この疾患の初めてのモデルマウスとなる可能性があることから、非常に重要な成果であると考えている。しかし、この病態形成メカニズムは、予想外な種類のエフェクター T 細胞が関与し、また FoxP3 の発現減弱という追加条件があることなど、非常に複雑であることが明らかになった。そのため、その解析に当初の想定よりもはるかに長い時間を要してしまった。また、光誘導組換えの効率を向上させるための in vitro の試験に多くの時間を費やしたが、最終的に、生体内でリンパ球の光誘導組換えを安定して行えるトランスジェニックマウス等の樹立を、研究期間内に達成できなかったことが残念である。しかし、生体内で皮膚角化細胞の光誘導組換えが可能となったことや、領域内の他の研究者との交流を契機に、生体イメージングを用いた慢性痒痒皮膚炎の研究を開始し、これについて国立医療研究開発機構の免疫アレルギー疾患実用化研究分野の事業に採択された。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

リンパ濾胞にホーミングする制御性T細胞(Treg細胞)を選択的に消失する遺伝子改変マウスを独自に作出した。そのマウスでは、生後6週齢以降に脾腫と骨髄炎を伴う致死性の血球細胞が減少し、それが原因が自己抗体産生とT細胞の活性化に起因することを見出している。リンパ濾胞にホーミングするTreg細胞による抗体産生の制御は理解しやすいが、T細胞の活性化制御にどのようなタイプのTreg細胞が関与するのか現在追求中である。本研究成果は自己免疫性の血球細胞破壊性疾患の理解につながる知見である。また、免疫・炎症研究に利用可能な光照射によって細胞に遺伝子改変を加える方法(オプトジェネティクス)で、生体内細胞追跡法を確立することを目指し、光依存的遺伝子組換え配列(Opt-Cre)に各種改良を重ねて骨髄細胞に導入し、その細胞により骨髄キメラマウスを作製した。その結果、in vivoにおいてこの方法が一定程度成功することを確認した。しかしながら、全身性にOpt-Creを発現するノックインマウスではリンパ球の光標識が低効率であるため実用的ではなく、Opt-Creの発現を高めることが今後の課題として残った。一方、このノックインマウスの上皮細胞系においてはOpt-Creの発現が高く、表皮角化細胞の光標識は安定して達成できることが分かり、皮膚炎症モデルにおける角化細胞の分化追跡を可能にすると考えられた。

以上のように、本研究においてリンパ濾胞にホーミングするTreg細胞の新たな役割として、抗体依存/非依存性の慢性炎症性の血球細胞破壊性自己免疫疾患を制御する可能性が示された。現在そのメカニズムの詳細を解析中であり、今後成果を早期に論文化することが期待される。一方、オプトジェネティクスによる生体内細胞追跡法については、当初予定した免疫系細胞における光照射依存的遺伝子改変・標識が実用化までに至らなかった。しかしながら、表皮角化細胞分化の追跡に道が開けたことから、国立医療研究開発機構で免疫アレルギー疾患実用化研究分野の事業に採択されている。何れも、当初想定しなかった問題に阻まれる局面もあったが、粘り強い様々な工夫を重ねて成果を上げることができたと評価する。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Okada T, Takahashi S, Ishida A, Ishigame H. In vivo multiphoton imaging of immune cell dynamics. Pflugers Arch (2016) Epub ahead of print.
2. Shinnakasu R, Inoue T, Kometani K, Moriyama S, Adachi Y, Nakayama M, Takahashi Y, Fukuyama H, Okada T, Kurosaki T. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. Nat Immunol (2016) 17, 861-869.
3. Kitano M, Yamazaki C, Takumi A, Ikeno T, Hemmi H, Takahashi N, Shimizu K, Fraser SE, Hoshino K, Kaisho T, Okada T. Imaging of the cross-presenting dendritic cell subsets in the skin-draining lymph node. Proc Natl Acad Sci USA (2016) 113, 1044-1049.
4. Moriyama S, Takahashi N, Green JA, Hori S, Kubo M, Cyster JG, and Okada T. Sphingosine-1-phosphate receptor 2 is critical for follicular helper T cell retention in germinal centers. J Exp Med (2014) 211, 1297-1305.
5. Okada T, Moriyama S, and Kitano M. Differentiation of germinal center B cells and follicular

helper T cells as viewed by tracking Bcl6 expression dynamics. Immunol Rev (2012) 247, 120-132.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表:

日本免疫学会総会・学術集会(2011、2013、2015)、日本分子生物学会年会(2012)、日本アレルギー学会学術大会(2011)、日本細胞生物学会大会(2015、2016)、International Congress of Histochemistry and Cytochemistry(2012)、Annual Mouse Molecular Genetics Conference(2012)、Gordon Research Conference: T follicular helper cells(2013)、RIKEN IMS-JSI International Symposium on Immunology(2014)、Naito Conference: Bioimaging—a paradigm shift for the life sciences(2014)、Australasian Society for Immunology Annual Scientific Meeting(2014)等、20 件。

著作物:

1. Kitano M, Okada T. Four-dimensional tracking of lymphocyte migration and interactions in lymph nodes by two-photon microscopy. Methods Enzymol 506:437-54, 2012.
2. 岡田峰陽、免疫学 Update: 分子病態の解明と治療への展開(編集: 審良静男、熊ノ郷敦、竹田潔): 第 19 章 ライブイメージングによる免疫動態の解明、南山堂
3. 岡田峰陽、標準免疫学 第 3 版(監修: 谷口克、編集: 宮坂昌之、小安重夫): 第 8 章 外来性抗原に対する反応: D 免疫細胞の動態免疫細胞の動態、医学書院

プレスリリース:

1. 抗体を産生する免疫応答に重要な T 細胞の動きを制御する仕組みを解明
—脂質メディエーターの受容体(S1PR2)による T 細胞の局在(2014 年 6 月 9 日)
http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140609_1/
2. キラーT 細胞に重要な樹状細胞の生体内可視化に成功(2016 年 1 月 12 日)
http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160112_1/