

食物が腸管免疫に及ぼす影響の評価システム構築と 食物アレルギーの機序解明

安達 貴弘

東京医科歯科大学難治疾患研究所免疫疾患 准教授

諸言

腸管には多数の免疫担当細胞が存在し、食物に対しては寛容を誘導するが、食物摂取に付随して摂取される病原微生物に対しては生体防御に働く。しかし、この精巧な免疫系も時として破綻し、食物により免疫系が始動され、食物アレルギーを引き起こすことはよく知られている。同じく IgE を介する花粉症では、花粉が飛散しない時期でも抗体が産生され続け、免疫記憶が成立している。本来、この免疫記憶による抗体産生は、インフルエンザなどに対するワクチン効果を発揮し、生体防御に必須なものであるが、同時にアレルギーや自己免疫疾患の原因ともなっている。食物アレルギーに関しても一旦感作されると疾患が継続することから、免疫記憶が深く関わっていると推測される。しかし、食物アレルギーに対して、その原因となる IgE の産生機序や産生細胞の動態はほとんど解明されておらず、その発症の全容はよくわかっていない。食物は多くの成分を含み、摂取後、消化、吸収、さらには代謝され、様々な物理的・化学的变化を受けるため、*in vivo* での正確な評価システムが必要であるが、現在のところいい解析系はない。これらの問題点を解決すべく、食物が免疫系に及ぼす影響を正確に解明することを目指し、マウスをモデルとして、その解析系の確立を行った。

実験方法

マウス

蛍光タンパク質カルシウムプローブ Cameleon¹⁾ 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βアクチン) を持つ pCXN2 ベクターを用いた。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を挿入し、そのさらに下流に Cameleon 遺伝子を挿入した。このコンストラクトを直鎖化した後、マウス卵母

細胞に導入し、トランスジェニックマウスを作製した。この floxed Cameleon マウスとそれぞれ IgG1 陽性 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 IgG1-Cre マウス、CD11c-Cre マウスと交配し、IgG1 陽性 B 細胞特異的に、樹状細胞特異的に Cameleon を発現するマウスを作製した。また、floxed Cameleon トランスジェニックマウスを CAG-Cre マウスと交配させ、全身性に Cameleon を発現させたマウスを作製した。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 SPF 下で飼育し、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 (Förster 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。

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あるいは脾臓を取り出し、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²⁾。励起波長 458nm 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。

細胞集団の解析

マウスより脾臓、骨髄、腸間膜リンパ節、小腸パイエル板を取り出し、それらリンパ組織から細胞を調製した。

細胞を蛍光標識された抗 CD4 抗体、抗 CD3 抗体、抗 B220 抗体、抗 CD138 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CXCR4 抗体で染色し、フローサイトメーター CyAnADP™(コールター社製)を用いて解析した。

結果

I 食物の免疫系へ及ぼす影響の *in vivo* 評価システムの構築

免疫細胞特異的 Cameleon 発現マウスの作製

蛍光蛋白質カルシウムセンサー Cameleon (図 1) を用いて B 細胞のカルシウムシグナリングを測定できることを我々は既に示している。そこで本研究では各種免疫担当細胞特異的に、リアルタイムで生体イメージングが行える *in vivo* の系を Cameleon を用いて構築することにした。既に DNA 組換え酵素 Cre を利用して誘導的に Cameleon を発現するマウス (floxed Cameleon マウス) を樹立し、B 細胞特異的に Cre を発現するマウス (CD19-Cre マウス) と交配した B 細胞特異的 Cameleon 発現マウスでは、図 2 に示すように、B 細胞が集団を形成しているリンパ組織で Cameleon の発現がみられた。また、これまで自家蛍光が高く観察が難し

かった腸管でも B 細胞が容易に観察できる。

CD19-Cre マウスと交配した floxed Cameleon マウスでは B 細胞のマーカーである CD19 陽性細胞特異

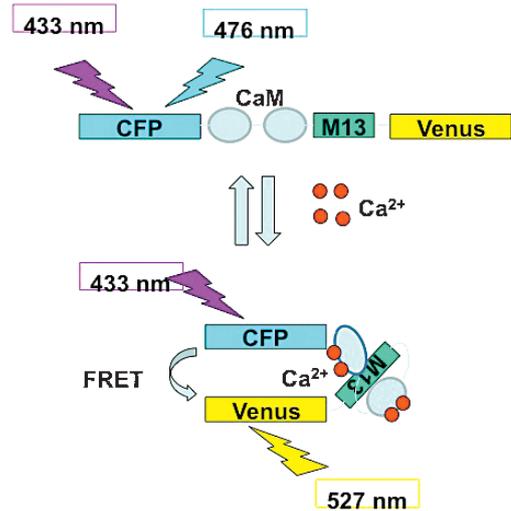
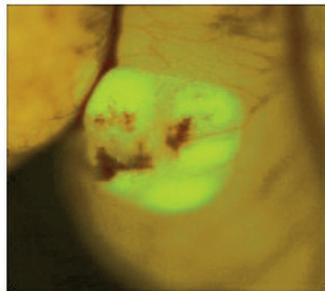


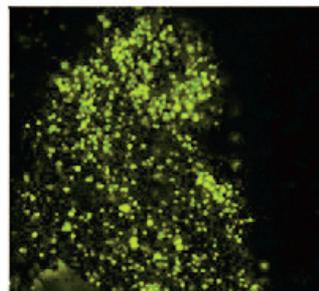
図 1 蛍光蛋白質カルシウムセンサー Cameleon の構造

CFP と YFP の蛍光蛋白質の間にカルモジュリンのカルシウム結合部位を持っている。カルシウムの有無により構造変化を伴い、カルシウム結合状態では CFP と YFP が隣接し、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が起こり、Cameleon を励起波長 433nm 付近を用いた場合、蛍光波長がシフトする。

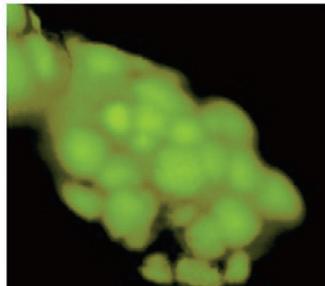
パイル板



骨髄



腸間膜リンパ節



脾臓

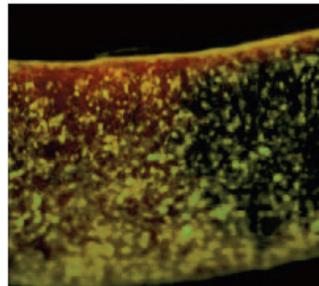


図 2 マウスの各リンパ組織での B 細胞特異的 Cameleon の発現

CD19-Cre マウスと交配した floxed Cameleon マウスの各リンパ組織をについて蛍光顕微鏡により観察した。緑色に見えるのが Cameleon 発現細胞の集団。

的に Cameleon の発現がみられる (図 3 上段左)。また IgG1-Cre マウスと交配したものでは B 細胞のマーカである B220 陽性細胞のうち、約 1% ほどの細胞で Cameleon の発現がみられた。さらに、樹状細胞、T 細胞特異的 Cameleon 発現マウスを得る目的で、CD11c-Cre マウス、CD4-Cre マウスと交配した。末梢血を採血し、T 細胞特異的に、あるいは樹状細胞特異的に Cameleon が発現していることを確認した。CD4-Cre マウスと交配した floxed Cameleon (CD4-Cre/Cameleon) マウスでは末梢血中のリンパ球の約 10% (CD19 陰性) が、また CD11c-Cre マウスと交配したもの (CD11c-Cre/Cameleon) では脾臓細胞の約 5% が Cameleon 陽性であった (図 3 中段)。CD11c は一部の B 細胞にも発現していることが知られており、IgM 陽性細胞の一部でも Cameleon の発現がみられた。細胞系譜特異的 Cameleon 発現マウスが交配では得られない細胞系譜については、CAG-Cre マウスとの交配により胚細胞レベルで組換えを起こし、全身性に Cameleon を発現するマウスも作製した。図 3(下段)に示すとおり、ほとんどの脾臓の細胞で Cameleon の発現がみられた。

生体イメージングによるパイエル板 B 細胞のカルシウムシグナリングの検出

B 細胞あるいは IgG1 陽性 B 細胞特異的に蛋白性のカルシウムイオン蛍光プローブ Cameleon を発現するマウスを利用して、生体イメージングにより、腸管での免疫細胞の動態およびその活性化をリアルタイムで詳細に観察し、免疫細胞を直接調べた。

小腸パイエル板の生体イメージングを行った。麻酔したマウスより腸管を取り出し、腸管の蠕動運動を抑制するために腸管内をアガロースを含むリン酸緩衝液で満たし、共焦点顕微鏡でパイエル板を観察した。腸の動きは完全に抑えるのは不可能であるが、FRET センサーを用いたことにより、蛍光輝度の減衰や動きによる変化を補正し、細胞内カルシウムシグナリングを検出するのに成功した。しかし、食物の影響を評価するため、腸管にリン酸緩衝液を満たすための穴を腸管に開けることなく、観察することが望ましいので観察方法の改良を行った。腸管をガラスボトムシャーレに乗せ、スポンジで上から腸管を押さえ、固定した。この方法で共焦点顕微鏡による観察に耐える程度の固定ができ、生体イメージングができることが確かめられた。細胞内のカルシウム濃度は図 4 に示すように疑似カラーによって示されており、

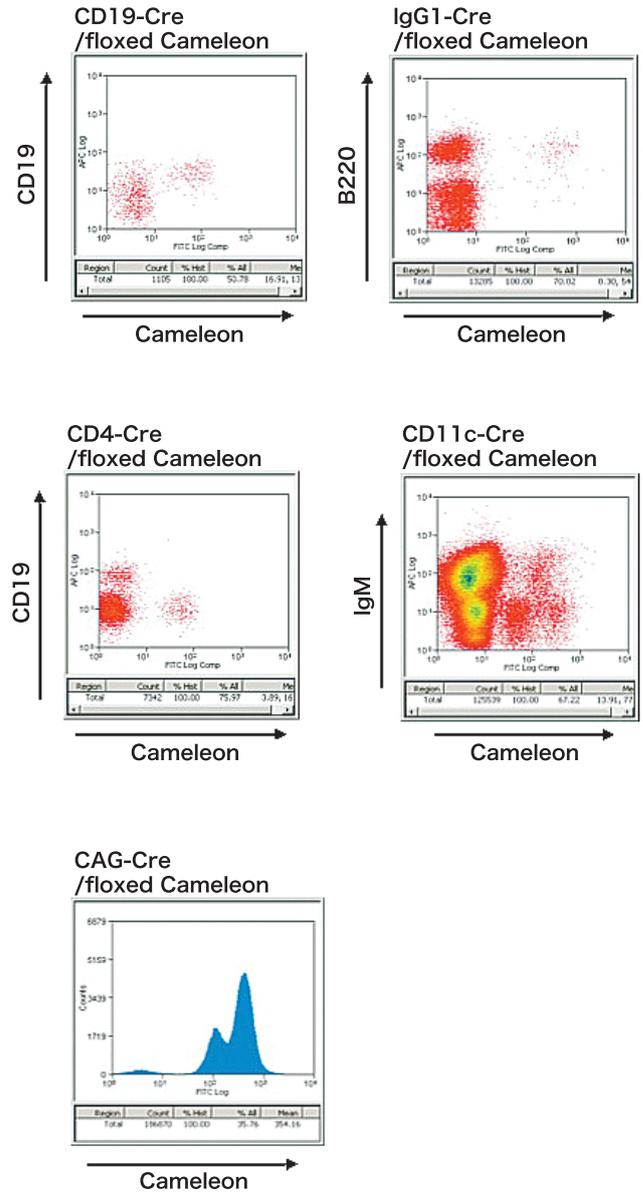


図 3 各種 Cre マウスと交配した floxed Cameleon マウスの脾臓での Cameleon 発現細胞

フローサイトメーターによりマウス脾細胞での Cameleon 発現細胞を細胞表面マーカーを用いて解析した。CD19 あるいは B220 は B 細胞のマーカーである。IgM はクラススイッチを起こす前の B 細胞のマーカーである。

赤い細胞が高いことを示している。この方法を用いて、小腸パイエル板を生体イメージングによって観察した。FRET を起こしている細胞が多く見られた。複数のマウスで再現性よくカルシウムシグナリングをモニターできた。

IgE B 細胞特異的 Cameleon 発現マウスの作製

アレルギーの影響を調べるため、IgE 発現細胞特異

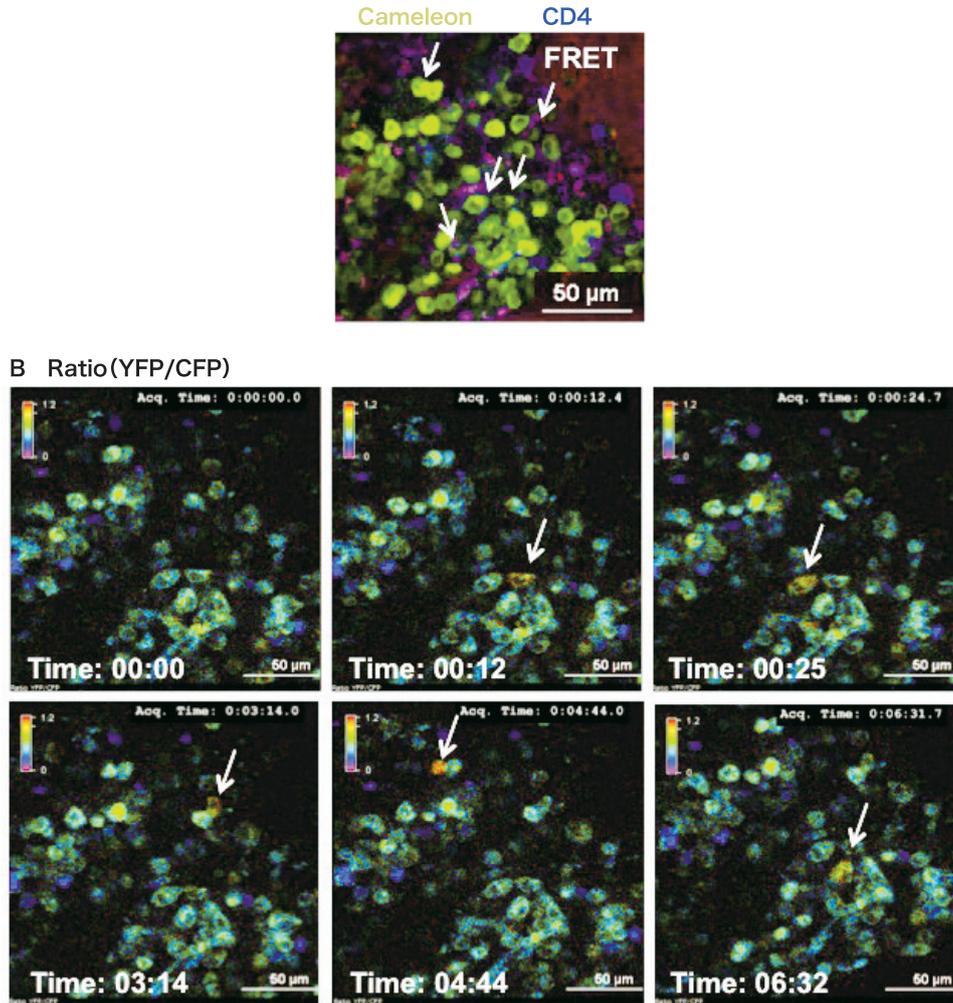


図4 生体イメージングによるパイエル板でのカルシウムシグナリングの検出

CD19-Cre/floxed Cameleon マウスを麻酔し、小腸パイエル板を共焦点顕微鏡により観察した。(上) CD4 陽性 T 細胞 (青) と Cameleon 発現細胞 (緑) を示す。(下) 10 分間観察した YFP と CFP の比 (高いほど細胞内カルシウム濃度が高い) のイメージを経時的に示した。疑似カラーで赤が細胞内カルシウム濃度が高い。

的に Cameleon を発現するマウスを IgE-Cre マウスと交配することによって作製した。

考 察

全身性に Cameleon を発現させるマウスも作製でき、また我々が作製した条件的 Cameleon 発現マウスにおいても種々の Cre マウスとの交配により、細胞系譜特異的 Cameleon を発現し、蛍光輝度が高く、腸管など自己蛍光が高い組織でも Cameleon 発現細胞を容易に検出できる。本研究により腸管でもリアルタイムで免疫細胞の動態のみならず、活性化もモニターできることを示した。しかし、腸管は蠕動運動をしており、観察はい

まだ困難である。安定した解析系のためには腸管を傷つけないように固定することが必要である。実際に食物の影響を評価するまでには至らなかったが、本研究で構築したマウスのモデル系で食物の違いによる免疫細胞の変化を詳細に検討できると思われる。

要 約

B 細胞や T 細胞の抗原受容体やその他の受容体からのカルシウムシグナリングを含むシグナリングは増殖、分化、アポトーシスといった機能に重要である。しかし *in vivo* でのこれらのシグナリングを観察するのはこれまで困難であった。我々は B 細胞や T 細胞での代表

的な細胞内シグナリングであるカルシウムシグをモニターできるマウスを作製し、生体で細胞の動態と細胞内シグナリングを生体で見られるシステムを構築した。Cameleon はそれぞれ細胞系譜特異的に発現していた。*in vivo* イメージングで腸管のパイエル板での B 細胞の活性化状態をリアルタイムで見られるシステムを構築した。さらに免疫記憶の実体となる長期の抗体産生を起こす骨髄で長寿命形質細胞についても *ex vivo* のイメージングによりカルシウムシグナリングを検出できることを示した。本研究により、食物摂取やアレルギーなどの疾患による免疫細胞の動態、活性化を詳細に調べるマウス実験系が構築できた。

謝 辞

蛍光蛋白質カルシウムセンサー YC3.60 遺伝子をいただきました理研・宮脇博士、生体イメージングの実験を支援していただいた東京医科歯科大学烏山教授、CAG-Cre マウスをいただきました大阪大学岡部教授、CD11c-Cre マウスをいただきました東京医科歯科大学

樗木教授、手塚助教、IgG1-Cre マウスをいただきましたハーバード大学 Rajewsky 教授、CD4-Cre マウスを使わせていただいた東京医科歯科大学（現・東京大学）高柳教授、IgE-Cre マウスをいただきました東京理科大学久保教授、マウスを作製していただいた難治疾患研究所・組換えマウス実験室・宇佐美技術職員、ソーティングにご助力いただいた幹細胞支援室・齋藤技術専門職員、山崎技術補佐員に感謝いたします。また本研究を支援していただきました公益財団法人三島海雲記念財団に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Nagai, T., et al, : *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 10554-9, 2004.
- 2) 実験医学別冊 最強のステップ UP シリーズ *in vivo* イメージング実験プロトコル原理と導入のポイントから 2 光子顕微鏡の応用まで、(石井 優/編)、羊土社、2013.
- 3) Adachi, T. & Tsubata, T., : *Biochem Biophys Res Commun* 367, 377-82, 2008.