免疫応答とイメージング

名古屋市立大学薬学部 中 西 守

Fluorescence techniques are uniquely suitable for probing cells because their sensitivity and specificity. Since fluorescence from a single cell can be detected with a microscope as an image, fluorescence microscopy has great potential for qualitative and quantitative studies on the structure and function of cells. Here, we have studied the receptor-mediated signal transduction in B cells, T cells and basophilic leukemia cells by confocal fluorescence microscopy. The results gave new insights for the molecular mechanisms in immune response.

confocal microscopy/immune response/calcium signal/fluoro-3/fluorescence molecular rotor
B cell/rat basophilic leukemia cell

はじめに

フックが光学顕微鏡で細胞を観察したのは、300年も前のことである。それ以来、光学顕微鏡は生物学の研究にはなくてはならないものとなってきた。しかし、今世紀後半になり分子生物学が台頭すると、分子レベルでの化学的分析法が生物学研究の主流になり、光学顕微鏡に対する研究者の関心は薄れていった。

ところが、近ごろ生物学の研究手段として、光学顕微鏡が見直されるようになってきた。「光学顕微鏡のルネッサンス」という言葉がささやかれたりしている¹⁾。どうしてそのような状況になったのであろうか。私には次の三つの事柄が大きな原因だと思える。(1)新しい光学顕微鏡の開発、(2)コンピュータ画像処理技術の進歩、(3)新規の蛍光試薬の開発である。

一方、ここ数年、われわれは免疫系の分子認識と情報伝達に関心を持ち研究を進めてきた。それらの研究において、光学顕微鏡の画像処理技術は有力な研究手段の一つと考えられた。そこで、光学顕微鏡の画像処理法を活用して免疫応答機構を追究しようと企てた。本文ではこのような免疫細胞の画像処理の実験からどのようなことが明らかになってきたか記述したい^{2),3)}。

1. カルシウムイメージング

(1)細胞間相互作用

カルシウムイオンは細胞内情報伝達のセカンドメッセンジャーの一つであり、細胞の活性化にともなうカルシウムイオンの細胞内動態は多くの研究者の注目するところであった⁴⁾。なかでも、Dr. Tsien らによるカルシウムイオンに特異的な蛍光試薬の開発は、この分野の研究を飛躍的に発展させた^{5),6)}。彼らの開発した蛍光試薬と蛍光分光器を用いると、刺激応答にともなう細胞内カルシウムイオンの濃度を容易に測定できた⁶⁾。しかし、蛍光分光器では免疫細胞の細胞間相互作用を追究することはできなかった。そこで、われわれは蛍光ストップフロー法を用いて細胞間相互作用を追究することを企てた^{7),8)}。

その結果を整理して示す前に、免疫細胞の細胞間相互作用の一例を図1に模式的に示した。図1はB細胞が外来の抗原蛋白質を細胞内に取り込み、抗原蛋白質を細胞内でペプチド断片とし(抗原処理)、T細胞に提示(抗原提示)するようすを示している⁹⁾。抗原ペプチドはB細胞内でMHC抗原(クラスII)と複合体を形成し、B細胞膜表面に移行し、ヘルパーT細胞の抗原レセプターと特異的な相互作用をする。MHC抗原は免疫系での、自己と非自己の識別に関与する膜蛋白質であり、図1のようなB細胞との特異的相互作用によりT細胞は活性化される。

さて、このような細胞間相互作用におけるカルシウムシグナルの動態を追究するのにストップフロー法は有用であった。T細胞とB細胞の細胞間相互作用

Confocal fluorescence microscopy for studying immune responses

Mamoru NAKANISHI

Faculty of Pharmaceutical Science, Nagoya City University

表1 T-B 細胞間相互作用とカルシウムシグナル

細胞	項目	文献
T 細胞	① B 細胞膜上の外来抗原と MHC 抗原の複合体に応答	10), 11)
	② リボソーム膜上の外来抗原と MHC 抗原に応答	12)
	③ キラー細胞の活性化初期過程にプロテアーゼが関与	13)
	④ クラス II の MHC 抗原に応答するキラー T 細胞がある	14)
	⑤ 活性化サプレッサー細胞はキラー細胞のシグナルを抑制	15)
	⑥ カルシウムシグナルが核に伝達	16)
B 細胞	① 外来抗原蛋白質のみに応答	17), 18)
	② 非特異抗原のエンドサイトーシスでは応答しない	17), 18)
	③ 蛋白質抗原の抗原処理に1-2時間かかる	11), 15), 19)
	④ 活性化 T 細胞に応答	20)
	⑤ カルシウムシグナルが核に伝達	18), 21), 22)

図1 B細胞の抗原処理とT細胞とB細胞の細胞間相互作用の模式図。

の測定により、どのようなことが明らかになったかを表1に一覧表で示した^{10)~22)}。

(2)細胞の個性

ところで、上で述べた蛍光分光法や蛍光ストップフロー法は細胞の浮遊液を用いて実験を行う。実験結果は多数の細胞の平均値を観測している。そのため、①個々の細胞の機能解析ができない、②細胞内の三次元分布が解析できないという問題点がある。そこで、光学顕微鏡の画像処理装置を組立て、これらの問題を解決しようとした。

まず、従来型の蛍光顕微鏡に超高感度テレビカメラを接続し、細胞の蛍光像を画像処理装置を用いて解析した。即時型アレルギー反応に関与する好塩基球の細胞株 (RBL-2H3) を抗原で刺激し、細胞内カルシウムイオン動態を単一細胞レベルで解析したところ、カルシウムシグナルの応答時間 (lag-time) が個々の細胞で大きく違っており、同じクローンの細胞間でも、カルシウムシグナルの応答時間 (lag-time) に顕著な違いのあることが明らかになった^{23), 24)}。これは、ク

ローン細胞でも細胞間で既に個性があり、カルシウムシグナルの応答時間が違っていると考えられた。このような我々の発見は、その後、Millard らによっても確認されている²⁵⁾。これらの実験は細胞機能の解析には、多数の細胞の平均値の測定だけでなく、①個々の細胞の機能解析をすることが重要なことを示していた。

さて、免疫細胞は大きさが数 μm 程度である。それゆえ、従来型の光学顕微鏡の画像解析では、個々の細胞の機能解析はできても、②細胞内の三次元分布の解析までは困難である。そこで、従来型の光学顕微鏡より分解能の格段に優れた共焦点レーザー顕微鏡を使用して²⁶⁾、画像解析を進めることにした。一例として、共焦点レーザー顕微鏡で好塩基球のカルシウムイオン動態を観察した結果を図2に示した²⁷⁾。ここでは、好塩基球に蛍光試薬 fluo-3 を標識し抗原で刺激した。先に述べたように、クローン化した好塩基球 (RBL-2H3) でも、カルシウムシグナルの待ち時間 (lag-time) が個々の細胞で著しく違っていることがわかる^{27), 28)}。

図2 好塩基球の抗原刺激にともなうカルシウムシグナルの蛍光画像。左上は抗原刺激直前のもの、刺激後8秒ごとの画像を、左から順に示した。

図3 好塩基球の偽足部分のカルシウムシグナルの画像。抗原刺激後、下部と上部の偽足でカルシウムイオン濃度が上昇する。

(3)カルシウムシグナルの局在化

さて、好塩基球を顕微鏡の観察用チャンバーを用いて一晩培養していると、細胞は偽足を出してチャンバーに接着するようになる。そのような偽足を出した細胞に抗原を添加し、共焦点レーザ顕微鏡で観察した蛍光画像を図3に示した²⁷⁾。図3からは、カルシウムイオンの濃度上昇が好塩基球の偽足の部分（下側）で最初に取り、次に、上部偽足でカルシウムイオン濃度が上昇し、最後は、細胞の中心部へと順に伝わっていることがわかる。このようなカルシウムシグナルの局在化の観察は従来型の顕微鏡では困難であるが、共焦点レーザ顕微鏡を用いると、比較的に観察することができる。

2. 核のカルシウムシグナル

(1)核のイメージング

共焦点レーザ顕微鏡でT細胞、B細胞ならびに好塩基球のカルシウムシグナルの局在化を追究していたところ、興味深い結果が見いだされてきた。それは、カルシウムシグナルが細胞質だけでなく核にまで伝達されているらしいということである^{18), 27)}。一例として、B細胞クローン (TP67.21) を抗原で刺激したときの結果を図4に示した¹⁸⁾。このB細胞は細胞膜上にトリニトロフェノール (TNP) に特異的に抗原レセプター (IgM) を持った細胞株であり、TNPを結合させた卵白アルブミンを抗原として添加した。抗原で刺激すると数十秒の待ち時間 (lag-time) の後に、B細胞内のカルシウムイオンの濃度が急速に上昇した。抗原刺激後のカルシウムイオンの濃度上昇までの待ち時間 (lag-time) は、個々の細胞で著しく違っており、先的好塩基球の結果とよく対応した¹⁸⁾。

図4 B細胞の抗原刺激にともなうカルシウムシグナルの画像と核の画像を比較したもの。B細胞ハイブリドーマ (TP67.21) を抗原で刺激した。右下は核の画像で、それ以外はカルシウムシグナルの画像。

さて、図4を見ると、活性化にともなうB細胞のカルシウムイオンの濃度分布が著しく不均一である。抗原刺激にともない著しく蛍光強度が増大する部分は、形態学的には核に相当していると考えられた。そこで、核のイメージングを行いそれを確かめることにした。核のイメージングには蛍光試薬 Hoechst33342を用い²⁹⁾、励起光源として、He-Cd レーザ (325nm) を使用した。ただし、Hoechst33342のイメージングだけでは細胞内のどこに核があるかを決定できないので、細胞膜に特異的に結合する蛍光色素 (TMA-DPH) で細胞膜を染色した。B細胞の核の蛍光画像を図4の写真の右下に示した¹⁸⁾。この写真からは、B細胞が活性化されたときのカルシウムイオンの蛍光画像と核の蛍光画像がよく一致していることがわかる。これにより、B細胞の抗原刺激により、カルシウムイオンが細胞質内のセカンドメッセンジャーとして働いているだけでなく、核内のサードメッセンジャーとしても働いている可能性が示された。また、このような核へのカルシウムシグナルの伝達はB細胞に特有の現象ではなく、T細胞や好塩基球の活性化の際にも観察できることが明らかになった²⁷⁾。

(2)核のカルシウムイオン

さて、核のカルシウムイオンはどのような機構で誘導されるのだろうか。核には細胞質と類似の自律的なイノシトールリン脂質のシグナル伝達システムが存在しているといわれている⁴⁾。それゆえ、核内のカルシウムイオンの濃度上昇機構としては、①細胞質内から核内への移送、②核内の貯蔵部位からの遊離の二つの可能性が考えられた。そこでこの二つの可能性を検

証することにした。実験としては、細胞の活性化に、細胞内 Ca^{2+} -ATPase の阻害剤である thapsigargin を用いた。また、蛍光試薬 (fura-2, fluo-3) との結合により、蛍光の消光を引き起こすマンガンイオンをカルシウムイオンの代わりに用いた。実験の詳細は省くが、カルシウムイオンは、①細胞質内から核内へ移送されると判断できる結果が得られた³⁰⁾。

さて、このような核内のカルシウムイオンはどのような役割を果たしているのであろうか。これは今後検討しなければならない課題であるが、カルシウムイオンは核内のサードメッセンジャーとして働き、転写調節にも密接に関与しているのではないかと考えている。

3. リンパ球の負のシグナル

これまで述べてきたリンパ球の抗原認識後のカルシウムシグナルは、細胞を活性化し細胞増殖を誘導する正のシグナルであった。ところが、リンパ球が抗原を認識すると、負のシグナルが伝達し、細胞死やアナジーに至る場合がある³¹⁾。このようなリンパ球の細胞死をアポトーシス (プログラム細胞死) と呼んでいる。なぜ、抗原を認識しておきながら、一方では、細胞の増殖 (正のシグナル) につながり、また、一方では、細胞死やアナジー (負のシグナル) に至るのであろうか。また、これは、T 細胞の自己・非自己の識別能の形成とも関連していると考えられている。

そこで、アポトーシスと T 細胞のカルシウムシグナルとの関連についても追究を行っている。現在のところ、未だ十分な結論を出すに至っていないが、アポトーシスを起こす T 細胞の場合、しばしば、核のカルシウムシグナルの著しい抑制が起こることが観察されている³²⁾。この核のカルシウムシグナルの抑制がアポトーシスと直接関係したものなのかどうかについては、さらに検討しなければならないが、核のカルシウムシグナルが顕著に抑制される実験結果は興味深い。

4. 蛍光プローブの開発

序論で述べたように、光学顕微鏡の画像解析においては、適切な蛍光プローブを開発することが重要である。カルシウムイオン、膜電位、pH、Caged-化合物などに関しては、種々の蛍光試薬が市販されている。しかし、それら以外の細胞機能の解析に適した蛍光試薬は未だ十分には知られていない³³⁾。そこで、われわれは新規の蛍光プローブの開発にも取りかかっている。その一つが、蛍光性分子ロータと呼ばれている化合物である³⁴⁾。

蛍光性分子ロータは、励起一重項状態での分子内電荷移動の性質を持っており、分子内のドナーとアクセプターの内部回転により急速に消光される性質を持っている。この蛍光性分子ロータをアレルギー反応に関与する肥満細胞に標識し、肥満細胞を活性化させると、細胞骨格構成蛋白質の重合と脱重合をイメージング法によって追跡できる³⁵⁾。肥満細胞の IgE レセプターを抗体で架橋したり、Compound48/80 を添加すると、カルシウムイオンの急激な濃度上昇に付随して、核の周りの骨格構成蛋白質の弱い脱重合が起こり、その後、骨格構成蛋白質が再び重合を起こすことが観察された^{35), 36)}。その一方では、蛍光性分子ロータに対するモノクローン抗体を作製し、分子ロータの蛍光特性を明らかにする試みも行っている³⁷⁾。このような新規の蛍光性プローブも免疫応答のイメージングによる研究に大いに利用できるのではないかと考えている。

おわりに

本文では光学顕微鏡の画像処理による免疫細胞の機能解析について述べてきた。ここでは、免疫応答機構の詳細な説明は省き、免疫細胞の機能を可視化してどこまで解析できるかを中心に記述した。免疫応答機構の解明には、このような細胞の画像解析による研究以外にも、個体、細胞、分子のレベルで種々の研究を行わなければならないことは言うまでもない。しかし、その際にも、画像解析により生きたままの細胞の機能を解析する研究は重要な情報を提供してくれるものと考えている。

文 献

- 1) Taylor, D. L., Nederlof, M., Lanni, F., Waggoner, A. S. (1992) *American Scientist*, **80**, 322-335.
- 2) 中西守 (1990) 細胞工学, **9**, 1079-1083.
- 3) 中西守 (1992) 代謝 (臨時増刊, 免疫 '92) **29**, 1-3.
- 4) Berridge, M. J. (1993) *Nature*, **361**, 315-325.
- 5) Grynkiewicz, M., Poenie, M., Tsien, R. Y. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450.
- 6) Tsien, R. W., Tsien, R. Y. (1990) *Annu. Rev. Cell Biol.*, **6**, 715-760.
- 7) Utsunomiya, N., Tsuboi, M., Nakanishi, M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1877-1880.
- 8) Utsunomiya, N., Tsuboi, M., Nakanishi, M. (1986) *Biochemistry*, **25**, 2582-2584.
- 9) Delovitch, T. L., Lazarus, A. H., Phillips, M. L., Semple, J. W. (1989) *Cold Spring Harbor Sym. on Quant. Biol.*, **54**, 333-343.
- 10) Utsunomiya, N., Nakanishi, M., Arata, Y., Yasuda, T.,

- Tadakuma, T. (1988) *J. Immunol.* **141**, 1471-1475.
- 11) Asano, Y., Nakayama, T., Kishimoto, H., Komuro, T., Sano, K., Utsunomiya, N., Nakanishi, M., Tada, T. (1989) *Cold Spring Harbor Sym. on Quant. Biol.* **54**, 683-688.
 - 12) Odaka, C., Utsunomiya, N., Nakanishi, M. (1990) *International Immunol.*, **2**, 509-514.
 - 13) Utsunomiya, N., Nakanishi, M. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 16514-16517.
 - 14) Nagao, Y., Yamada, H., Nakanishi, M. (1992) *Immunol. Lett.*, **34**, 151-154.
 - 15) Utsunomiya, N., Nakanishi, M., Asano, Y., Tada, T. (1990) *International Immunol.*, **1**, 460-463.
 - 16) 中西守, 長尾陽子 (1993) 蛋白質核酸酵素, **38**, 1201-1209.
 - 17) Ohya, N., Hamano, T., Nakanishi, M. (1991) *Biochemistry*, **30**, 11154-11156.
 - 18) Furuno, T., Hamano, T., Nakanishi, M. (1993) *Biophys. J.*, **64**, 665-669.
 - 19) Utsunomiya-Tate, N., Nakanishi, M., Arata, Y., Sakato, N. (1992) *Microbiol. immunol.*, **36**, 407-418.
 - 20) 長尾陽子, 古野忠秀, 鳥越智香子, 浅野喜博, 浜野照明 (1992) 日本免疫学会要旨集 (熊本) p578.
 - 21) Yamada, H., Mizuguchi, J., Nakanishi, M. (1991) *FEBS Lett.*, **284**, 249-251.
 - 22) Furuno, T., Hamano, T., Nakanishi, M. (1993) *Bioimages*, **1**, 9-12.
 - 23) Kato, K., Nakanishi, M., Arata, Y., Teshima, R., Terao, T., Miyamoto, H. (1987) *J. Biochem.*, **102**, 1-4.
 - 24) 中西守 (1989) 細胞工学, **8**, 271-274.
 - 25) Millard, P. J., Gross, D., Webb, W. W., Fewtrell, C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1854-1858.
 - 26) Brakenhoff, G. J., van Spronsen, E. A., van del Voort, H. T. M., Nanninga (1989) *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture*, part B. Academic Press, New York pp. 379-398.
 - 27) Nakato, K., Furuno, T., Inagaki, K., Teshima, R., Terao, T., Nakanishi, M. (1992) *Eur. J. Biochem.*, **209**, 745-749.
 - 28) Teshima, R., Ikebuchi, H., Terao, T., Miyagawa, T., Arata, Y., Nakanishi, M. (1990) *FEBS Lett.*, **270**, 115-118.
 - 29) Arndt-Jovin, D. J., Jovin, T. M. (1989) *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture*, part B. Academic Press, New York pp. 417-448.
 - 30) 岡本有紀子, 古野忠秀, 中西守 (1993) 第66回日本生化学会要旨集 (東京) p815.
 - 31) Williams, G. T. (1991) *Cell*, **65**, 1097-1098.
 - 32) 鳥越智香子, 竹内賢一郎, 多田隅卓史, 中西守 (1992) 日本免疫学会要旨集 (名古屋) p. 405.
 - 33) Waggoner, A., DeBiasio, R., Conrad, P., Bright, G. R., Ernst, L., Ryan, K., Nederlof, M. & Taylor (1989) *Fluorescence Microscopy of Living cells in Culture*, part B. Academic Press, New York. pp. 449-478.
 - 34) Kung, C. E., Reed, J. K. (1989) *Biochemistry*, **28**, 6678-6686.
 - 35) Furuno, T., Isoda, R., Inagaki, K., Iwaki, T., Noji, M., Nakanishi, M. (1992) *Immunol. Lett.*, **33**, 285-288.
 - 36) 西村多美子, 古野忠秀, 内田幸宏, 中西守 (1993) 第66回日本生化学会要旨集 (東京) p996.
 - 37) Iwaki, T., Torigoe, C., Noji, M., Nakanishi, M. (1993) *Biochemistry*, **32**, 7589-7592.

なかにし まもる

1974年東京大学大学院博士課程 (薬学系) 修了。同年より東京大学薬学部助手, 助教授を経て, 1989年より名古屋市立薬学部教授。画像処理法を中心にした免疫応答の分子機構の研究。

趣味はテニスと生物物理学会の新会員を作ること。

〒467 名古屋市瑞穂区田辺通3-1 名古屋市立大学薬学部

TEL052-836-3411 FAX052-836-3414