

Twenty-four hours later, bone marrow was harvested from the long bones, stained with anti-CD8 and analyzed by flow cytometry. A. Three individual recipients are shown for each treatment. No inhibition of migration of OT-1-TCM cells resulted from blocking CXCR4 or deleting IL7. Note that the IL-7^{-/-} recipient lacked endogenous CD8 cells. B. The data is shown in numerical form representing the total number of OT-1-TCM cells recovered per individual mouse.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007637.s003 (1.14 MB TIF)

Table S1 OT-1-TCM association with ECFP producers. Data are corrected by removing OT-1 whose center overlies a stromal cell (probable spill-over artifact).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007637.s004 (0.03 MB DOC)

Movie S1 Central memory cells (TCMs) were obtained by in vitro differentiation of T cells from OT-1xRAG^{-/-} mice. TCMs were labeled with CFSE and injected intravenously twice (-24 hr and -2 hr) into IL7promECFP mice. Bone marrow was visualized by intravital microscopy. CFSE labeled TCMs (green) exit the blood stream (red) and some interactions with ECFP producing cells (blue) were observed. The video spans a 40 minute time.

References

- Khaled AR, Durum SK (2002) Lymphocyte: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2: 817–830.
- Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, et al. (1994) Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180: 1955–1960.
- von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, et al. (1995) Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181: 1519–1526.
- Puel A, Ziegler SF, Buckley RH, Leonard WJ (1998) Defective IL7R expression in T(-)B(+)/NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet* 20: 394–397.
- Puel A, Leonard WJ (2000) Mutations in the gene for the IL-7 receptor result in T(-)B(+)/NK(+) severe combined immunodeficiency disease. *Curr Opin Immunol* 12: 468–473.
- Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, Wignall J, Mochizuki DY, et al. (1988) Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* 333: 571–573.
- Goodwin RG, Lupton S, Schmierer A, Hjerrild KJ, Jerzy R, et al. (1989) Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 302–306.
- Montgomery RA, Dallman MJ (1991) Analysis of cytokine gene expression during fetal thymic ontogeny using the polymerase chain reaction. *J Immunol* 147: 554–560.
- Montgomery RA, Dallman MJ (1997) Semi-quantitative polymerase chain reaction analysis of cytokine and cytokine receptor gene expression during thymic ontogeny. *Cytokine* 9: 717–726.
- Wiles MV, Ruiz P, Imhof BA (1992) Interleukin-7 expression during mouse thymus development. *Eur J Immunol* 22: 1037–1042.
- Murray AM, Simm B, Beagley KW (1998) Cytokine gene expression in murine fetal intestine: potential for extrathymic T cell development. *Cytokine* 10: 337–345.
- Gunji Y, Sudo T, Suda J, Yamaguchi Y, Nakauchi H, et al. (1991) Support of early B-cell differentiation in mouse fetal liver by stromal cells and interleukin-7. *Blood* 77: 2612–2617.
- Golden-Mason L, Kelly AM, Traynor O, McEntee G, Kelly J, et al. (2001) Expression of interleukin 7 (IL-7) mRNA and protein in the normal adult human liver: implications for extrathymic T cell development. *Cytokine* 14: 143–151.
- de Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, Gaillard C, Vanbervliet B, et al. (1998) The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol* 160: 1666–1676.
- Moore NC, Anderson G, Smith CA, Owen JJ, Jenkinson EJ (1993) Analysis of cytokine gene expression in subpopulations of freshly isolated thymocytes and thymic stromal cells using semiquantitative polymerase chain reaction. *Eur J Immunol* 23: 922–927.
- Witte PL, Frantsve LM, Hergott M, Rahbe SM (1993) Cytokine production and heterogeneity of primary stromal cells that support B lymphopoiesis. *Eur J Immunol* 23: 1809–1817.
- Heuffer C, Topar G, Grasseger A, Stanzl U, Koch F, et al. (1993) Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J Exp Med* 178: 1109–1114.
- Matsue H, Bergstresser PR, Takashima A (1993) Keratinocyte-derived IL-7 serves as a growth factor for dendritic epidermal T cells in mice. *J Immunol* 151: 6012–6019.
- Matsue H, Cruz PD, Jr., Bergstresser PR, Takashima A (1993) Profiles of cytokine mRNA expressed by dendritic epidermal T cells in mice. *J Invest Dermatol* 101: 537–542.
- Roye O, Delhem N, Trottein F, Remoue F, Nutten S, et al. (1998) Dermal endothelial cells and keratinocytes produce IL-7 in vivo after human Schistosoma mansoni percutaneous infection. *J Immunol* 161: 4161–4168.
- Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, et al. (1995) Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest* 95: 2945–2953.
- Madrigal-Estebas L, McManus R, Byrne B, Lynch S, Doherty DG, et al. (1997) Human small intestinal epithelial cells secrete interleukin-7 and differentially express two different interleukin-7 mRNA transcripts: implications for extrathymic T-cell differentiation. *Hum Immunol* 58: 83–90.
- Kroncke R, Loppnow H, Flad HD, Gerdes J (1996) Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction. *Eur J Immunol* 26: 2541–2544.
- Sorg RV, McLellan AD, Hock BD, Fearnley DB, Hart DN (1998) Human dendritic cells express functional interleukin-7. *Immunobiology* 198: 514–526.
- Soslau G, Morgan DA, Jaffe JS, Brodsky I, Wang Y (1997) Cytokine mRNA expression in human platelets and a megakaryocytic cell line and cytokine modulation of platelet function. *Cytokine* 9: 405–411.
- He W, Zhang Y, Deng Y, Kabelitz D (1995) Induction of TCR-gamma delta expression on triple-negative (CD3-4-8-) human thymocytes. Comparative analysis of the effects of IL-4 and IL-7. *J Immunol* 154: 3726–3731.
- Zamisch M, Moore-Scott B, Su DM, Lucas PJ, Manley N, et al. (2005) Ontogeny and regulation of IL-7-expressing thymic epithelial cells. *J Immunol* 174: 60–67.
- Mertsching E, Burdet C, Ceredig R (1995) IL-7 transgenic mice: analysis of the role of IL-7 in the differentiation of thymocytes in vivo and in vitro. *Int Immunol* 7: 401–414.
- Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, Waldmann TA (1996) IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 4: 329–336.
- Takeuchi T, Yamanouchi H, Yue Q, Ohtsuki Y (1998) Epithelial component of lymphoid stroma-rich Warthin's tumour expresses interleukin (IL)-7. *Histopathology* 32: 383–384.
- Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, Schmidt D, De Rosa SC, et al. (2001) Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med* 7: 73–79.
- Funk PE, Stephan RP, Witte PL (1995) Vascular cell adhesion molecule 1-positive reticular cells express interleukin-7 and stem cell factor in the bone marrow. *Blood* 86: 2661–2671.
- Tsuda S, Rieke S, Hashimoto Y, Nakauchi H, Takahama Y (1996) IL-7 supports D-J but not V-DJ rearrangement of TCR-beta gene in fetal liver progenitor cells. *J Immunol* 156: 3233–3242.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007637.s005 (3.42 MB AVI)

Movie S2 Central memory cells (TCMs) were obtained by in vitro differentiation of T cells from OT-1xRAG^{-/-} mice. TCMs were labeled with CFSE and injected intravenously twice (-24 hr and -2 hr) into IL7promECFP mice. Bone marrow was visualized by intravital microscopy. CFSE labeled TCMs (green) exit the blood stream (red) and some interactions with ECFP producing cells (blue) were observed. The video spans a 40 minute time.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007637.s006 (2.82 MB AVI)

Acknowledgments

We thank R. Wyles, J. Waters, L. Scheetz and S. Stull for animal technical assistance; K. Noer, R. Matthai and S. Bauchiero for flow cytometry assistance; F. Klauschen for analysis of bone marrow images; R.L. Boyd for MTS-12 and MTS-15 antibodies and J.J. Oppenheim for comments on the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RIM AVW DWM RNG NAJ NGC SKD. Performed the experiments: RIM SW SML MI MA LF ACW DJS JAH MM JC DN LRS AGF KR. Analyzed the data: RIM WQL MRA AGF SKD. Contributed reagents/materials/analysis tools: DHGD BER. Wrote the paper: RIM SKD.

34. Kitazawa H, Muegge K, Badolato R, Wang JM, Fogler WE, et al. (1997) IL-7 activates alpha4beta1 integrin in murine thymocytes. *J Immunol* 159: 2259–2264.
35. Terszowski G, Muller SM, Bleul CC, Blum C, Schirrnbeck R, et al. (2006) Evidence for a functional second thymus in mice. *Science* 312: 284–287.
36. Dooley J, Erickson M, Gillard GO, Farr AG (2006) Cervical thymus in the mouse. *J Immunol* 176: 6484–6490.
37. Kondrack RM, Harbertson J, Tan JT, McBreen ME, Surh CD, et al. (2003) Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med* 198: 1797–1806.
38. Mazo IB, Honczarenko M, Leung H, Cavanagh LL, Bonasio R, et al. (2005) Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells. *Immunity* 22: 259–270.
39. Bradley LM, Haynes L, Swain SL (2005) IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. *Trends Immunol* 26: 172–176.
40. Ariel A, Hershkovitz R, Cahalon L, Williams DE, Akiyama SK, et al. (1997) Induction of T cell adhesion to extracellular matrix or endothelial cell ligands by soluble or matrix-bound interleukin-7. *Eur J Immunol* 27: 2562–2570.
41. Zhu J, Garrett R, Jung Y, Zhang Y, Kim N, et al. (2007) Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood* 109: 3706–3712.
42. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L (2000) Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1: 426–432.
43. Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, et al. (2001) IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8732–8737.
44. Li WQ, Jiang Q, Aleem E, Kaldis P, Khaled AR, et al. (2006) IL-7 promotes T cell proliferation through destabilization of p27Kip1. *J Exp Med* 203: 573–582.
45. Mazzucchelli R, Durum SK (2007) Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol* 7: 144–154.
46. Williams IR, Rawson EA, Manning L, Karaoli T, Rich BE, et al. (1997) IL-7 overexpression in transgenic mouse keratinocytes causes a lymphoproliferative skin disease dominated by intermediate TCR cells: evidence for a hierarchy in IL-7 responsiveness among cutaneous T cells. *J Immunol* 159: 3044–3056.
47. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, et al. (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68: 869–877.
48. Gray DH, Chidgey AP, Boyd RL (2002) Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J Immunol Methods* 260: 15–28.
49. Gray DH, Fletcher AL, Hammett M, Seach N, Ueno T, et al. (2008) Unbiased analysis, enrichment and purification of thymic stromal cells 3. *J Immunol Methods* 329: 56–66.
50. Warming S, Costantino N, Court DL, Jenkins NA, Copeland NG (2005) Simple and highly efficient BAC recombining using galK selection. *Nucleic Acids Res* 33: e36.

A case of Mikulicz's disease with Th2-biased cytokine profile: possible feature discriminable from Sjögren's syndrome

Eriko Kudo-Tanaka · Shinichi Nakatsuka · Toru Hirano · Mari Kawai · Yoshinori Katada · Masato Matsushita · Shiro Ohshima · Masaru Ishii · Kunio Miyatake · Toshio Tanaka · Yukihiko Saeki

Received: 26 March 2009 / Accepted: 8 July 2009 / Published online: 21 August 2009
© Japan College of Rheumatology 2009

Abstract This article concerns a male patient with Mikulicz's disease (MD) accompanied with marked elevation of serum immunoglobulin (Ig)G4 and IgE levels. His peripheral blood mononuclear cells (PBMC) showed markedly enhanced *in vitro* production of interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13, but not interferon gamma (IFN- γ) compared with patients with Sjögren's syndrome (SS) and healthy donors, suggesting distinct Th2 bias in this MD patient. Besides the prominent infiltration of IgG4-producing plasma cells, the enhanced expression of both CD40 and CD40 ligand (CD40L) were observed in the

swollen salivary gland of the MD patient, suggesting enhanced signaling pathways for the induction of IgG4 and IgE switching. Possible differences between MD and SS in light of their underlying pathogenesis are discussed.

Keywords Mikulicz's disease · Immunoglobulin G4 (IgG4) · CD40 ligation · Th2 · Sjögren's syndrome

Introduction

Mikulicz's disease (MD) is a unique condition in which idiopathic, bilateral, painless, and symmetrical swelling of the lacrimal, parotid, and submandibular glands. Because MD and Sjögren's syndrome (SS) are histologically similar, MD has been considered as a variant of SS [1]. However, there are some clinical differences between MD and typical SS. In MD, the enlargement of lacrimal and salivary glands is persistent, and secretory dysfunction is either not detectable or moderate. Further, MD shows good responsiveness to corticosteroid treatment. Serologically, MD patients exhibit normal or hyper gammaglobulinemia and normo- or hypocomplementemia but lack anti-SS-A and anti-SS-B antibodies. Recently, it has also been reported that MD patients show marked serum immunoglobulin G4 (IgG4) elevation and infiltration of plasmacytes expressing IgG4 in the enlarged lacrimal and salivary glands. However, the specimens from SS patients show no IgG4-producing plasmacytes, and serum IgG4 elevation is currently thought to be one of the prominent characteristics of MD [2–4]. In addition, systemic IgG4-related plasmacytic syndrome, such as autoimmune pancreatitis and sclerosing cholangitis, occur frequently in MD, and its association has been

E. Kudo-Tanaka (✉) · M. Matsushita · S. Ohshima · M. Ishii · Y. Saeki
Department of Rheumatology, NHO Osaka-Minami Medical Center, 2-1 Kidohigashi-machi, Kawachinagano, Osaka 586-8521, Japan
e-mail: 04rher@ommc-hp.jp

S. Nakatsuka
Department of Pathology, NHO Osaka-Minami Medical Center, Kawachinagano, Osaka, Japan

T. Hirano · M. Kawai · T. Tanaka
Department of Respiratory Medicine Allergy and Rheumatic Diseases, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

Y. Katada
Department of Allergy, NHO Osaka-Minami Medical Center, Kawachinagano, Osaka, Japan

S. Ohshima · Y. Saeki
Department of Clinical Research, NHO Osaka-Minami Medical Center, Kawachinagano, Osaka, Japan

K. Miyatake
NHO Osaka-Minami Medical Center, Kawachinagano, Osaka, Japan

attractive in the field of rheumatology and clinical immunology [5, 6].

Case report

In October 2006, a 61-year-old man presented with malaise, mild dry mouth, morning finger stiffness, and bilateral swelling around the eyelids and submandibular regions. He was suspected of having SS or malignant lymphoma and was admitted to our hospital for further examination in November 2006. He had past histories of bronchial asthma and allergic rhinitis. On physical examination, the bilateral lacrimal glands, parotid, and submandibular glands were markedly swollen, but there was no pain. He had no skin lesions. The cardiovascular and respiratory systems were both normal. Hepatosplenomegaly, lymphadenopathy, and neurological abnormalities were not observed. In the blood test results, a normal complete blood cell count was observed except for severe eosinophilia (2,782/ μ l). Laboratory tests revealed hypocomplementemia [C3, 51 mg/dl (normal, 86–160); C4, 9 mg/dl (17–45); CH50, 22 U/ml (30–40)] and elevated C1q immune complex [4.1 IU/ml (<3.0)]. C-reactive protein was positive (0.39 mg/dl). Antibodies, including rheumatoid factor, anticyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibody, myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA), antinuclear antibody (ANA), anti-SS-A, and anti-SS-B, were negative. Serum total IgG and IgE were markedly elevated at 7,319 mg/dl and 1,629 IU/ml, respectively. Characteristically, IgG4 increased polyclonally (3,073 mg/dl, 42% of total IgG). Hepatobiliary and pancreatic enzymes were normal, except for impaired glucose tolerance by 75 g oral glucose tolerance test (75 g OGTT) [blood glucose level at 120 min of 75 g OGTT, 210 mg/ml; hemoglobin (Hb) A1c, 6.1%]. Urinary concentration test and renal function was normal, and he had no renal tubular dysfunction. Neither lacrimal nor salivary function was disturbed (gum test 15 ml/10 min; Schirmer's test, right eye 12 mm/5 min, left eye 25 mm/5 min). Ophthalmologic examination was negative for keratoconjunctivitis sicca (KCS). Computed tomography (CT) scans revealed remarkable diffuse enlargement with wedge-shaped contour of the bilateral parotid, submandibular, and lacrimal glands. Abdominal ultrasonography and CT scans revealed a diffuse swelling of the pancreas. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) showed segmental irregular narrowing of the main pancreatic duct and cholangiectasis, suggesting the presence of autoimmune pancreatitis and its related sclerosing cholangitis. Gallium-67 scintigram showed abnormal accumulation in bilateral lacrimal and submandibular glands and the center of the epigastrium. One of the swollen submandibular glands was biopsied, and

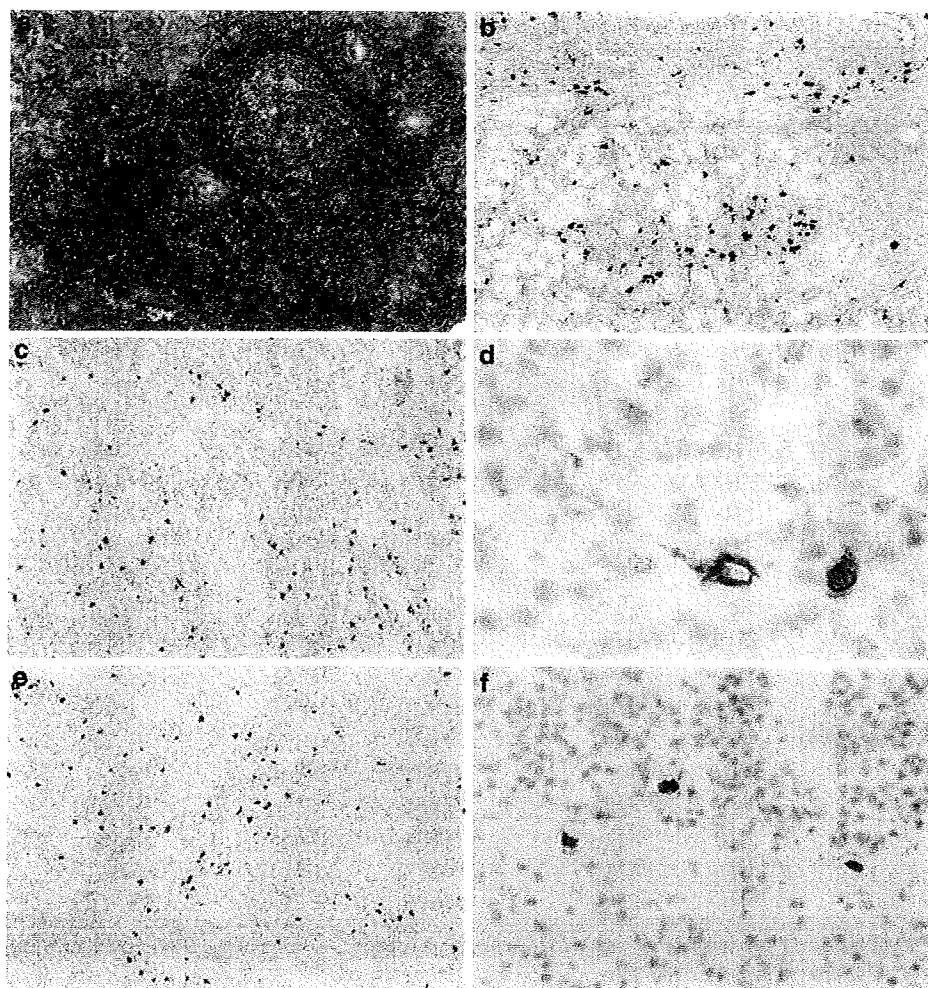
subsequent histopathological examination revealed diffuse infiltration of predominantly mononuclear cells and plasmacytes expressing IgG4 (anti-IgG4 antibody; clone HY6025, Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA) (Fig. 1a, b). We diagnosed the patient as having MD on the basis of the serological and histopathological features. High-dose oral corticosteroid administration (prednisolone 50 mg/day) was initiated. After this treatment, the enlargement of the lacrimal and salivary glands rapidly regressed and severe eosinophilia diminished. Elevated serum IgG, IgG4, and IgE were remarkably decreased (IgG, 1,534 mg/dl; IgG4, 788 mg/dl, 51% of total IgG; IgE 314 IU/ml) within 4 weeks. Pancreatitis and sclerosing cholangitis evaluated by ERCP had substantially improved 2 months later.

To further examine the pathophysiology underlying the clinical symptoms in MD, fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were collected from this MD patient, two primary SS patients diagnosed by the criteria of SS [7] before treatment, and three normal healthy donors. Levels of interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13, and interferon gamma (INF- γ) production from PBMCs with or without T-cell stimulation, antihuman CD3 antibody or phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) plus calcium ionophore A23187, were compared. Culture supernatants were collected at 6 and 48 h, and cytokines (IL-4, IL-5, IL-13, INF- γ) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). As shown in Table 1, levels of IL-4 and IL-5 production of the MD patient were remarkably high compared with those of the SS patients and healthy donors. The levels of IL-13 in the MD patient were also significantly higher than in the healthy donors. In contrast, levels of INF- γ were not significantly altered among the group. In addition to IgG4, the expressions of CD40 and CD40L were also evaluated on sections from fresh-frozen blocks of a submandibular gland from the patient. Immunohistochemistry using anti-CD40 (clone EA-5, Ancell, Bayport, MN, USA) and anti-CD40 L antibodies (24-31, Ancell) showed a significant number of positive strong staining cells, and these looked like lymphocytes or plasmacytes morphologically (Fig. 1c–f).

Discussion

Since Morgan and Castleman concluded on the basis of histopathological similarity that MD and SS were the same entity in 1953 [1], MD has been thought to be a variant of SS. However, recent reports have pointed out differences in the clinical and histopathologic findings. In SS, the disturbed salivary function rarely recovers with corticosteroid treatment, whereas in MD, it may recover well. In addition, the infiltrating cells in affected glands are mainly CD4⁺ T

Fig. 1 Specimens of submandibular glands in a Mikulicz's disease (MD) patient. **a** H&E staining, $\times 1:400$. There is massive lymphocytic and plasmacytic infiltration forming lymphoid follicle into the interacinar region of submandibular glands. **b** Anti-IgG4 monoclonal antibody staining, $\times 1:200$. It exhibits abundant infiltration of plasmacytes with IgG4 between two acinar cells or around lymphofollicles. **c** Anti-CD40 antibody staining, $\times 1:200$, **d** $\times 1:1000$. It exhibits infiltration of lymphocytes or plasmacytes stained with CD40 between acinar cells. **e** Anti-CD40 ligand (*L*) antibody staining, $\times 1:200$, **f** $\times 1:400$. It exhibits infiltration of lymphocytes or plasmacytes stained with CD40L between acinar cells



cells in SS, whereas plasma cells are normally present and glandular damage is less severe. It has also been reported that glandular cell apoptosis is less often observed in MD [8]. In addition, elevated serum IgG4 levels and prominent infiltration of IgG4-producing plasma cells have been considered to be a characteristic of MD [2–4], leading to a high incidence of systemic IgG4-related plasmacytic syndrome, such as autoimmune pancreatitis and sclerosing cholangitis and allergic disease in this kind of disease. In fact, the case presented here had a history of bronchial asthma and allergic rhinitis, showed severe eosinophilia and elevated serum IgE, and high levels of IL-5 in PBMC. IL-5 is important for eosinophilic infiltration and activation [9]. In this report, we first demonstrated the CD40 ligation on submandibular glands and high levels of IL-13 in PBMC of the MD patient. Levels of IL-4 production of the MD patient were also remarkably high compared with those of the SS patients and healthy donors. IL-4 or IL-13 and CD40L have been suggested to use common signaling pathways for the induction of IgG4 and IgE switching

[10–12]: the first, furnished by IL-4 or IL-13, induces the expression of the sterile and transcript; the second, provided by the B/T-cell interaction and mimicked in vitro by CD40 triggering, induces expression of the mature and transcript [13]. In submandibular glands of our MD patient, expression of CD40 or CD40L was identified with lymphocytes and also plasmacytes. The result showed clear contrast to the previous study by Dimitriou et al. demonstrating the presence of CD40 or CD40L identified with B cell or CD4⁺ T cells in salivary gland of the SS patient [14]. In our MD patient, plasmacytes also participated in CD40 ligation that different from SS. Recently, Azuma et al. reported a case of SS with a Th2-biased property, such as elevation of serum IgE, IL-5, and eosinophil counts; the patient was later rediagnosed as having MD [15]. Miyake et al. reported peripheral CD4⁺ T cells from an MD patient who showed a Th2-predominant phenotype and elevated Th2 cytokine (IL-4, IL-5, and IL-10) but INF- γ as Th1 cytokine similarly to our results, in his salivary glands compared with healthy donors. The patient also

Table 1 In vitro cytokine production from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with or without T-cell stimulation

Cytokine	Object	Incubation 6 h			Incubation 48 h		
		Stimulation (-)	Anti-CD3	PMA + A23187	Stimulation (-)	Anti-CD3	PMA + A23187
IL-4 (pg/ml)	M	1.43	31.00	610.00	0.35	63.50	3,113.00
	S1	n.d.	9.14	16.16	n.d.	0.99	17.70
	S2	<0.39	<0.39	33.40	<0.39	6.11	61.80
	H1	<0.39	3.09	105.60	<0.39	3.08	173.90
	H2	2.74	2.43	106.90	<0.39	3.08	46.20
	H3	<0.39	3.05	102.40	<0.39	4.31	115.40
IL-5 (pg/ml)	M	<11.7	16.45	427.10	<11.7	1369.00	5,444.00
	S1	n.d.	<11.7	<11.7	n.d.	<11.7	<11.7
	S2	<11.7	<11.7	<11.7	<11.7	<11.7	<11.7
	H1	<11.7	<11.7	<11.7	<11.7	183.20	130.30
	H2	<11.7	<11.7	29.04	<11.7	381.80	437.50
	H3	<11.7	<11.7	20.90	<11.7	245.00	140.90
IL-13 (pg/ml)	M	<1.56	10.74	107.1	<1.56	343.20	817.00
	S1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	S2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	H1	<1.56	5.32	29.53	<1.56	209.10	95.12
	H2	<1.56	5.45	34.36	<1.56	198.80	108.10
	H3	<1.56	3.74	24.88	11.82	154.90	74.01
IFN- γ (pg/ml)	M	76.76	731.25	4,377.96	<15.6	28,478.10	53,559.10
	S1	n.d.	4,097.40	2,570.20	n.d.	5,281.90	32,804.00
	S2	<15.6	143.30	587.10	<15.6	18,203.00	21,498.00
	H1	<15.6	343.38	2,665.10	27.6	77,834.40	22,419.10
	H2	<15.6	865.74	1,771.17	22.4	38,402.90	12,030.80
	H3	<15.6	686.26	5,525.40	5,525.5	215,180.60	39,086.30

PMA phorbol-12-myristate-13-acetate, A23187 calcium ionophore, IL interleukins, IFN interferon, M the present MD patient; S1, S2 SS patients; H1–3 healthy donors, n.d. not done

had elevated eosinophils and IgE levels in his serum [16]. Moreover, Zen et al. showed increased Th2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-13) in situ using fresh and formalin-fixed specimens of IgG4-related sclerosing pancreatitis and cholangitis [autoimmune pancreatocholangitis (AIPC)] compared with controls, such as primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis [17]. These results are in line with our results in which Th2-biased cytokine was shown not only in MD but also in AIPC. It is possible that IgG4-positive multiorgan lymphoproliferative syndrome (IgG4⁺ MOLPS) by Masaki [6] has common pathogenesis related to Th2 bias.

Here we found a distinct Th2 bias in the MD patient, which has not been detected in SS or healthy donors, whereas a couple of past reports indicated the Th1 bias in definite SS [18–20]. The bulk of this literature, as well as analysis of our own case, may suggest that the pathogenesis and resultant clinical manifestation of MD would be distinguishable from those of SS, and therefore it should be proposed that MD and SS are similar but definitely distinct disease entities.

Conflict of interest statement None.

References

1. Morgan WS, Castleman B. A clinicopathologic study of 'Mikulicz's disease'. *Am J Pathol.* 1953;29:471–503.
2. Yamamoto M, Takahashi H, Ohara M, Suzuki C, Naishiro Y, Yamamoto H, et al. A new conceptualization for Mikulicz's disease as an IgG4-related plasmacytic disease. *Mod Rheumatol.* 2006;16:335–40.
3. Yamamoto M, Ohara M, Suzuki C, Naishiro Y, Yamamoto H, Takahashi H, et al. Elevated IgG4 concentrations in serum of patients with Mikulicz's disease. *Scand J Rheumatol.* 2004; 33:432–3.
4. Yamamoto M, Harada S, Ohara M, Suzuki C, Naishiro Y, Yamamoto H, et al. Clinical and pathological differences between Mikulicz's disease and Sjögren syndrome. *Rheumatology (Oxford).* 2005;44:227–34.
5. Kamisawa T, Funata N, Hayashi Y, Eishi Y, Koike M, Tsuruta K, et al. A new clinicopathological entity of IgG4-related autoimmune disease. *J Gastroenterol.* 2003;38:982–4.
6. Masaki Y, Dong L, Kurose N, Kitagawa K, Morikawa Y, Yamamoto M, et al. Proposal for a new clinical entity, IgG4-positive multi-organ lymphoproliferative syndrome: analysis of

- 64 cases of IgG4-related disorders. *Ann Rheum Dis*. 2008. doi: 10.1136/ard.2008.089169.
7. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1993; 36:340–7.
 8. Tsubota K, Fujita H, Tsuzaka K, Takeuchi T. Mikulicz's disease and Sjögren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41:1666–73.
 9. Romagnani S. Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr Opin Immunol*. 1994;6:838–46.
 10. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:3730–4.
 11. Gascan H, Gauchat JF, Aversa G, Van Vlasselaar P, de Vries JE. Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4 T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. *J Immunol*. 1991;147:8–13.
 12. Spriggs MK, Armitage RJ, Strockbine L, Clifford KN, Macduff BM, Sato TA, et al. Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *J Exp Med*. 1992;176:1543–50.
 13. Jeannin P, Delneste Y, Lecoanet-Henchoz S, Gretener D, Bonnefoy JY. Interleukin-7 (IL-7) enhances class switching to IgE and IgG4 in the presence of T cells via IL-9 and sCD23. *Blood*. 1998;91:1355–61.
 14. Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. CD40 on salivary gland epithelial cells: high constitutive expression by cultured cells from Sjögren's syndrome patients indicating their intrinsic activation. *Clin Exp Immunol*. 2002;127:386–92.
 15. Azuma N, Katada Y, Harada Y, Arimoto H, Kimura Y, Terada H, et al. Case of primary Sjögren's syndrome with hypereosinophilia and elevation of serum IgE: measurements of serum IL-4, IL-5 and the IgG subclass. *Arerugi*. 2005;54:646–51.
 16. Miyake K, Moriyama M, Aizawa K, Nagano S, Inoue Y, Sadanaga A, et al. Peripheral CD4+T cells showing a Th2 phenotype in a patient with Mikulicz's disease associated with lymphadenopathy and pleural effusion. *Mod Rheumatol*. 2008; 18:86–90.
 17. Zen Y, Fujii T, Harada K, Kawano M, Yamada K, Takahira M, et al. Th2 and regulatory immune reactions are increased in immunoglobulin IgG4-related sclerosing pancreatitis and cholangitis. *Hepatology*. 2007;45:1539–46.
 18. Mitsias DI, Tzioufas AG, Veiopoulou C, Zintzaras E, Tassios IK, Koqopoulou O, et al. The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2002;128:562–8.
 19. Kontinen YT, Kempainen P, Koski H, Li TF, Jumppanen M, Hietanen J, et al. T(H)1 cytokines are produced in labial salivary glands in Sjögren's syndrome, but also in healthy individuals. *Scand J Rheumatol*. 1999;28:106–12.
 20. Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Pisa E. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol*. 1994;152:5532–9.

THE BONE 別刷

(株)メディカルレビュー社

〒541-0045 大阪市中央区道修町1-5-18 朝日生命道修町ビル TEL 06-6223-1469
〒113-0034 東京都文京区湯島3-19-11 湯島ファーストビル TEL 03-3835-3049

8. 破骨細胞前駆細胞の遊走・位置決め —二光子励起顕微鏡を用いた骨免疫イメージングより—

Migration and localization of osteoclast precursors
visualized by living bone imaging using intravital two-photon microscopy

石井 優

Masaru Ishii (主任研究者・准教授) / 大阪大学免疫学フロンティア研究センター生体イメージング研究室

key words

単球系の破骨細胞前駆細胞がいかんして骨表面に到達するか、また、その遊走がどのように制御されているかは長い間不明であった。我々は最近、二光子励起顕微鏡を用いて生きたままのマウス骨組織内を可視化することに成功し、前駆細胞の遊走・接着が、脂質メディエーターの一種であるスフィンゴシン1リン酸や種々のケモカインによって動的に制御されていることを解明した。本稿ではこの研究成果に加え、我々が開発した骨のライブイメージングの方法論や応用について概説する。

破骨細胞
ケモカイン
脂質メディエーター
ケモタキシス(走化性)
イメージング

はじめに

硬い石灰質に囲まれた骨組織の内部は、従来、生きたままでの観察が極めて困難であると考えられていた。実際にこれまでの骨や骨髄に関する研究では、固定して摘出した骨を、カルシウムキレート剤に1週間ほど漬け込んで脱灰し、切片にして観察していた。この従来法でも、骨組織内の細胞の「形態」や「分子発現」(免疫染色による)を解析することはできたが、決定的な情報が欠落していた。それは細胞の「動き」である。細胞の動きを見るためには、どうしても生きた細胞を生きた組織の中で観察する必要がある。特に骨髄腔のように、豊富な血管床による血流を保ったまま、そこで流入する細胞

の動きを捉えることが重要な場所では、「摘出して生かした」骨組織ではなく、「生きたままの個体中」の骨組織を観察する必要がある。

我々は最近、二光子励起顕微鏡を駆使してマウスを生かしたまま骨組織内を観察するイメージング方法を確立させた(図1)。この方法を用いると、骨組織のリモデリングにかかわる破骨細胞や骨芽細胞、骨髄内で分化・成熟を遂げる単球・顆粒球・リンパ球、その他の間葉系細胞や血液幹細胞などの生きた動きを、リアルタイムで観察することができる。我々は特に、骨を破壊・吸収する動きをもつ破骨細胞の動きと機能に注目して解析を行い、この前駆細胞の骨への遊走・位置決めが、種々のケモカインや脂質メディエ

ター(スフィンゴシン1リン酸)によって動的に調節されていることを明らかにした。

本稿では、これらの研究成果の解説に加えて、骨組織内の二光子励起ライブイメージングの方法論や、その今後の応用と将来性について、実際の画像を紹介しながら概説したい。

イントロダクション:

破骨細胞は「どこから来たのか、
何者か、どこへ行くのか」

骨組織は、古い骨を壊して吸収する「破骨細胞」と、骨を新生する「骨芽細胞」のバランスの取れた働きにより新陳代謝が繰り返されているが、加齢や炎症により破骨細胞の機能が亢進す

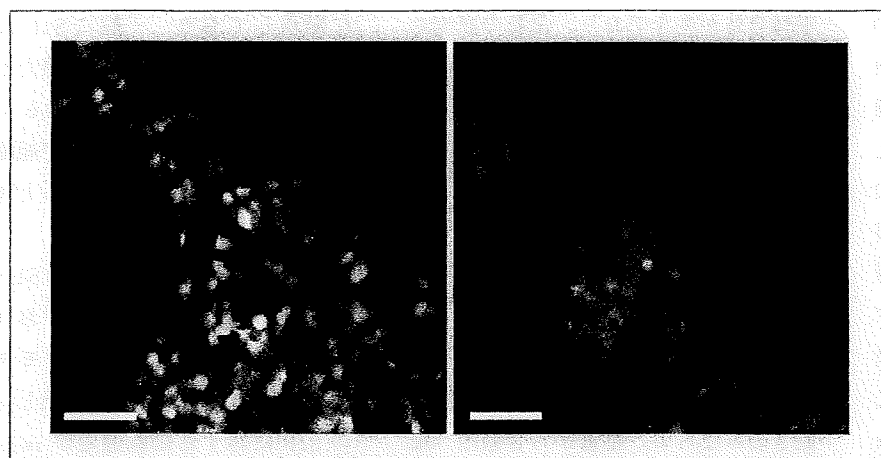


図1 骨組織(骨髄内)のライブイメージング

LysM-EGFP 遺伝子組み換えマウス(左側)および CSF1R-EGFP 遺伝子組み換えマウス(右側)の骨髄腔の生体二光子励起顕微鏡による観察像。骨髄内の血管構造を、Texas Red を結合した高分子デキストランの静脈注射にて可視化している。実際の実験ではこれを一定時間間隔で撮影し、動画を作成する(筆者HPなどを参照)。

スケールバー: 30 μ m

LysM: lysozyme M

CSF1R: コロニー刺激因子受容体(colony stimulating factor 1 receptor)

EGFP: enhanced green fluorescent protein (巻頭カラーグラビア3参照)

るとバランスが骨吸収側に傾き、骨粗鬆症の発症につながる。また関節リウマチでは、関節炎局所に活性化破骨細胞が多数誘導され、骨破壊に関与している¹²⁾。

破骨細胞は単球系血液細胞から分化・成熟する多核巨細胞であるが、これまでの研究成果により、骨髄間質細胞や骨芽細胞などによって産生される M-CSF (macrophage colony stimulating factor) や RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) が、破骨細胞の分化・成熟に必須であること、RANKL 刺激は NF- κ B や NFAT などの転写因子群を介して破骨細胞の分化を誘導すること、などの知見が確立している³⁴⁾。その一方で、長らく解決されていなかった重要な謎があった。

それは「破骨細胞(およびその前駆細胞)はどうやって骨表面に到達するのか」である。すなわち、「どのような分子機構が破骨細胞の遊走を調節しているのか」「一旦、骨表面に達した破骨前駆細胞はすべて最終分化するのか(再び戻っていくことはあるのか)」など、ほとんど明らかにされてこなかった。

我々は、破骨前駆細胞がいかにして骨表面へ到達するのか、またその遊走・位置決めがどのように制御されているのかについて解明するために、まず、種々のケモカインや脂質メディエーターについて、破骨前駆細胞を動かすことができるかどうか *in vitro* の実験系でスクリーニングを行った。その結果、スフィンゴシン1リン酸をはじめとし

た、いくつかの候補分子を得た。しかしながら、次の研究段階として、「これらの候補分子が実際に *in vivo* で破骨前駆細胞を動かすのかどうか」を解決する必要があった。このため、我々は二光子励起顕微鏡を用いて生きた骨組織内部を観察することに挑戦した。

骨組織の生体二光子励起顕微鏡観察

1. 二光子励起顕微鏡はなぜ生きた組織の観察に適しているか?

二光子励起顕微鏡では、通常の蛍光顕微鏡観察(共焦点レーザー顕微鏡も含む)で用いる励起光の半分のエネルギー(=2倍の波長)をもったレーザー光を細かいパルス状に放出させて励起光源に用いる。パルス状の光子はフォーカスで一点に集められ密度が高い状態となるため、焦点平面でのみ二光子励起 [=通常(一光子励起)では光子1個で励起する蛍光分子を、光子2個分で励起すること] が起こり得る⁵⁾。このため、二光子励起顕微鏡観察の特長として、以下の2点が挙げられる⁶⁾⁾。

①高いZ軸分解能: 焦点平面のみでしか励起が起らない [その他のZ軸平面では(通常の励起に必要な半分のエネルギーの)光子が当たっているものの励起には至らない]。

②高い組織透過性: 励起光として通常の半分のエネルギー(2倍の波長)の近赤外光(通常は波長が780~1,000 nm)を用いるため、組織の深部まで励起光を到達させることができる。

固定した組織・臓器は、薄切してプレパラートを作成すれば、あらゆる断

面を観察することができるが(物理的スライス), 生きた丸ごとの組織の内部を観察するには, 二光子励起顕微鏡を用いて, 深部組織でz軸平面を変えて観察することが有用である(光学的スライス)。このため, 生組織の観察手段として, 二光子励起顕微鏡の有用性が国内外で示されてきた。たとえば, 動物の脳や分泌腺など臓器・組織を摘出して, 培養液中で生かしながら二光子励起観察されてきた(tissue-explant two-photon imaging)⁸⁾⁻¹⁰⁾。

2. 「生体」二光子励起観察の メリット

免疫系は, 特に細胞の動きが重要なシステムである。好中球やリンパ球が全身をくまなく遊走し, 免疫組織内の微小環境で会合し互いに相互作用を行うことにより, 適切な機能が維持されている。この細胞遊走は時空間的に精緻にコントロールされており, 各細胞が適切な場所に適切な時間に存在しなければ, 機能を十分に発揮できない。このような免疫系における統率された細胞遊走システムは, 神経系での固定した軸索システム(“hard-wired”)と比較して, “soft-wired”と形容される¹¹⁾。このsoft-wiredネットワークの解析のために, 二光子励起観察をさらに一歩進めて, 実験動物を生かしたまま顕微鏡に乗せて, 注目する組織を観察する“intravital two-photon microscopy (生体二光子励起顕微鏡観察)”の手法が, 2002年頃より海外の複数の研究者によって開発された¹²⁾⁻¹⁵⁾。この方法論では, 注目する組織のみならず,

個体自身が生きており, 全身の血流や代謝が完全にインタクトに保たれた状態で観察できるため, 極めて情報量が多い。

骨組織内での破骨前駆細胞の遊走・位置決めを観察するために, 我々は骨内・骨髓腔の“intravital” imaging に取り組んだ¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。この方法では, 骨髓腔内を流れる豊富な血流が保たれているため, 骨組織に定着している細胞の動きのみならず, 血管から骨髓内へ細胞が流入したり, 逆に血中へ還流していく様子を観察することができる。さらには, 薬剤を尾静脈などから全身投与すると血流を通して速やかに観察部位に到達させることができる。このような長所から, 我々は骨のintravital imagingを行ったが, そもそも骨のように血流が豊富な組織は, 取り出して観察することはかなり難しい。

生体二光子骨組織観察によって見えた, 脂質メディエーターSIPによる 破骨前駆細胞の遊走と 位置決めの制御

種々のケモカイン・脂質メディエーターを*in vitro*の実験系でスクリーニングした結果, 破骨前駆細胞の遊走を刺激するいくつかの分子を得ていたが, なかでも我々が注目したのは, 現在リンパ球の遊走制御について重要な知見が得られているスフィンゴシン1リン酸(SIP)である¹⁹⁾²⁰⁾。SIPは主に赤血球や血小板によって作られるため血中に豊富に存在する。一方, 組織にはSIPを分解するSIPリアーゼが広範

に発現しており, 一般にSIPは血中で高く, 組織で低い濃度に保たれている。このため, SIPに対するケモタキシスは, 基本的には細胞が組織から血中へ還流する際に作用すると考えられている。

我々は, 破骨前駆細胞がSIPに対する受容体(SIP₁)を発現しており, *in vitro*でSIPに対して強いケモタキシスが惹起されることを見出した。このSIPに対する細胞遊走が*in vivo*でもみられるかどうかを確認するために, 二光子励起顕微鏡を用いて骨組織内部の生体観察を行った¹⁶⁾¹⁷⁾。骨組織に存在する破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CSF1R-EGFP⁺またはCX₃CR1-EGFP⁺)は, 定常状態ではほとんど動かなかったが, SIP₁に対する強力なアゴニストであるSEW2871を経静脈的に投与すると, 急速に動きが大きくなり, 血管へと移行していく様子が観察された(文献17の supplementary videos や, 筆者の研究室 HP 参照)。これにより, *in vivo*の骨組織内でも, 破骨細胞は確かにSIP受容体刺激に反応して遊走能が亢進することが証明された。

さらに我々は, この「SIPに対する破骨前駆細胞の遊走」の生理意義を解明するために, 破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CD11b⁺)に特異的にSIP受容体(SIP₁)を欠損させたマウスの解析を行った。SIP₁を欠損した破骨前駆細胞は骨組織に留まりやすくなり, その結果として骨表面に接着する成熟破骨細胞の数が増加し, 骨吸収側へと傾くことがわかった。SIPの濃度が血中で高く, SIPに対する遊走が一般

に組織から血中への還流に寄与していることを考慮すると、以下の結論を得ることができる。

単球系の破骨前駆細胞は、血管から骨内部に流入するだけでなく、血中のS1Pに対して遊走することにより血中へ再還流するシステムが存在する。この流出入のバランスの上に骨表面に存在する前駆細胞数が決められており、一定数がRANKLの刺激を受け成熟する(図2)。これまで、RANKLなどの分化誘導因子やその下流にある転写制御機構の解明が破骨細胞研究の主要な課題であったが、この研究はその前の段階、すなわち破骨前駆細胞が最終分化を遂げる場所(骨)へと遊走・位置決めを行うシステムが、破骨細胞分化・骨代謝の新たな制御点であるという新概念を提唱するものである。

今後の展開

1. 破骨前駆細胞の遊走・位置決めを標的とした新しい創薬

この新しい調節点は、骨吸収疾患に対する創薬ターゲットとしても極めて魅力的である。我々は骨粗鬆症の動物モデル(卵巣摘出マウス)を用いて、S1P受容体に対する強力なアゴニストの投与が、破骨前駆細胞を骨表面から引き剥がし血中へ再還流させ(結果として骨表面上の破骨細胞の数を減らし)、骨吸収を抑制することを示した。この結果は、S1Pによる破骨前駆細胞の遊走制御が、治療標的としても有望なものであることを示している¹⁷⁾。これは、ビスフォスフォネート製剤など成熟破骨細胞を標的とした従来の骨吸収抑制剤とは異なった作用機序を

もっていることから、併用投与による相乗効果も期待でき、今後の臨床応用が期待される。

2. 破骨前駆細胞を骨表面に引き寄せる因子は何か?

我々は、S1Pが単球系破骨前駆細胞を骨表面から血中へ再還流させる因子“circulation-attractant”であることを明らかにした。それでは逆に骨へと引き寄せる因子“bone-attractant”は何であろうか?過去の研究からその候補はすでに挙げられており、たとえば、骨髄ストローマ細胞が発現するCXCL12は*in vitro*において破骨前駆細胞のケモタキシスを刺激することが示されている²¹⁾²²⁾。しかしながら、*in vivo*においてこれらが実際に機能しているかどうかについては不明である。

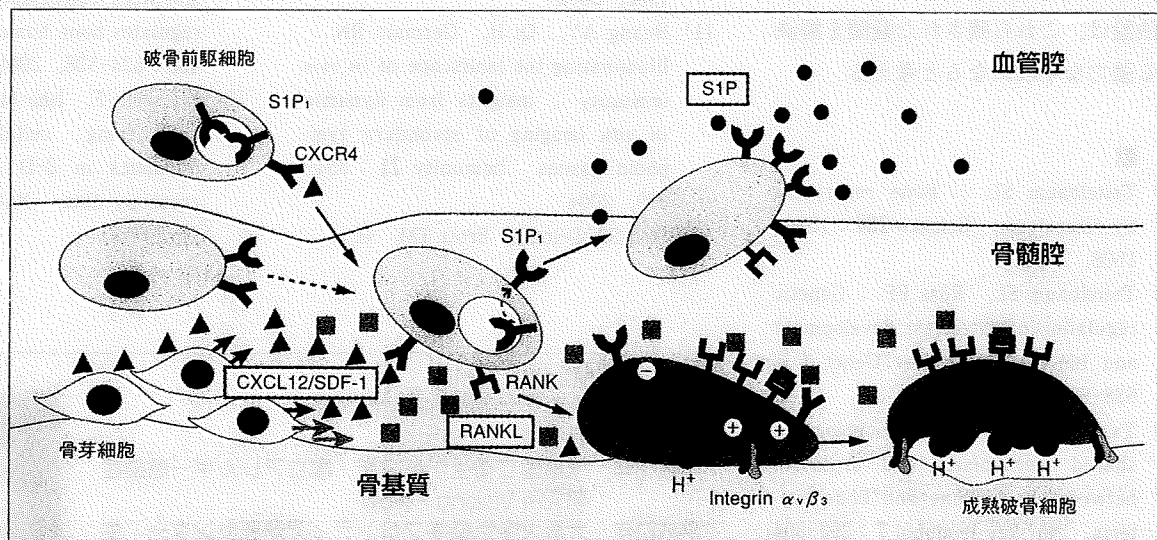


図2 破骨前駆細胞の遊走と位置決め機構

単球系破骨前駆細胞は、骨髄内にあるケモカイン SDF-1/CXCL12によって骨髄内へ引き寄せられ、逆に血中のS1Pによって血管内へと再還流する。この流出入のバランスの上に骨表面に存在する破骨前駆細胞の数が決められており、一定数がRANKLの刺激を受け成熟破骨細胞へと分化する。

我々は現在、骨の生体イメージング系を用いて、CXCL12やその他の候補のケモカインを中心に、生理的なbone-attractantの検索を行っている。

3. 骨組織の生体二光子励起観察の応用

骨組織は、破骨細胞や骨芽細胞による骨代謝制御の場であるばかりでなく、Bリンパ球をはじめとして種々の血液系細胞の発生・機能分化にとって重要な部位である。骨髄腔内での各細胞の挙動・位置決めとその分化制御や、血液系幹細胞が多能性を維持する特殊な環境(ニッチ)の同定、さらには癌の骨転移のように、本来骨にいない細胞が如何にして骨に到達するのか(誰が手助けするのか)など、骨組織・骨髄腔に関しては解明されるべき課題が数多くある。我々が開発した二光子励起顕微鏡を用いた骨の生体イメージングの方法論は、これら残された疑問を解決する強力な手段になると考える。

文 献

- 1) Teitelbaum SL : Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289** : 1504-1508, 2000
- 2) Teitelbaum SL, Ross FP : Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* **4** : 638-649, 2003
- 3) Takayanagi H : Osteoimmunology ; shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* **7** : 292-304, 2007
- 4) Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y : Osteoimmunology ; interactions of

- the bone and immune system. *Endocr Rev* **29** : 403-440, 2008
- 5) Goeppert-Mayer M : Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys* **9** : 273-295, 1931
 - 6) Denk W, Strickler JH, Webb WW : Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248** : 73-76, 1990
 - 7) Denk W, Svoboda K : Photon upmanship ; why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* **18** : 351-357, 1997
 - 8) Helmchen F, Denk W : Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* **2** : 932-940, 2005
 - 9) Takahashi N, Kasai H : Exocytic process analyzed with two-photon excitation imaging in endocrine pancreas. *Endocr J* **54** : 337-346, 2007
 - 10) Takahashi N, Kishimoto T, Nemoto T, et al : Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet. *Science* **297** : 1349-1352, 2002
 - 11) Huang AY, Qi H, Germain RN : Illuminating the landscape of *in vivo* immunity ; insights from dynamic *in situ* imaging of secondary lymphoid tissues. *Immunity* **21** : 331-339, 2004
 - 12) Stoll S, Delon J, Brotz TM, et al : Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* **296** : 1873-1876, 2002
 - 13) Miller MJ, Wei SH, Parker I, et al : Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* **296** : 1869-1873, 2002
 - 14) Bousso P, Bhakta NR, Lewis RS, et al : Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* **296** : 1876-1880, 2002
 - 15) von Andrian UH : Immunology. T cell activation in six dimensions. *Science* **296** : 1815-1817, 2002
 - 16) Germain RN, Bajenoff M, Castellino F, et al : Making friends in out-of-the-way places ; how cells of the immune system get together and how they conduct their business as revealed by intravital imaging. *Immunol Rev* **221** : 163-181, 2008
 - 17) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, et al : Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* **458** : 524-528, 2009
 - 18) Klauschen F, Ishii M, Qi H, et al : Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. *Nat Methods*, 2009 (in press)

石井 優(Masaru Ishii)

平成10年 大阪大学医学部医学科卒業
 平成17年 医学博士(大阪大学)
 平成18年 米国国立衛生学研究所・国立アレルギー感染症研究所 Visiting Fellow
 平成21年 大阪大学免疫学フロンティア研究センター・生体イメージング研究室・主任研究者(准教授)



8. 破骨細胞前駆細胞の遊走・局在制御—二光子励起顕微鏡を用いた骨免疫イメージングより—

- 19) Rosen H, Goetzl EJ : Sphingosine 1-phosphate and its receptors ; an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* **5** : 560-570, 2005
- 20) Cyster JG : Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* **23** : 127-159, 2005
- 21) Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, et al : Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner Res* **18** : 1404-1418, 2003
- 22) Kollet O, Dar A, Shvitiel S, et al : Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* **12** : 657-664, 2006

Visual
Review
ビジュアルレビュー

脂質メディエーターによる破骨細胞 前駆細胞の遊走・位置決めへの制御

— 生体二光子励起顕微鏡を用いた骨組織の
*in vivo*イメージングより —

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 生体イメージング研究室

石井 優

感染・炎症・免疫 第39巻 第3号 別刷

平成21年10月10日発行

東京 医薬の門社

脂質メディエーターによる破骨細胞 前駆細胞の遊走・位置決めへの制御

— 生体二光子励起顕微鏡を用いた骨組織の
in vivo イメージングより —

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 生体イメージング研究室

石井 優

破骨細胞は単球系細胞から分化して骨を吸収する特殊な細胞である。

単球系破骨前駆細胞がいかんして骨表面に到達するか、

その遊走がどう制御されているかは長い間不明であった。

我々は最近、二光子励起顕微鏡を用いて生きたままのマウス骨組織内を可視化することに成功し、

破骨前駆細胞の遊走・接着が、脂質メディエーターの一種であるスフィンゴシン1リン酸や

種々のケモカインによって動的に制御されていることを解明した。

本稿ではこの研究成果に加え、我々が開発した骨の *in vivo* イメージングの
方法論や応用について概説する。

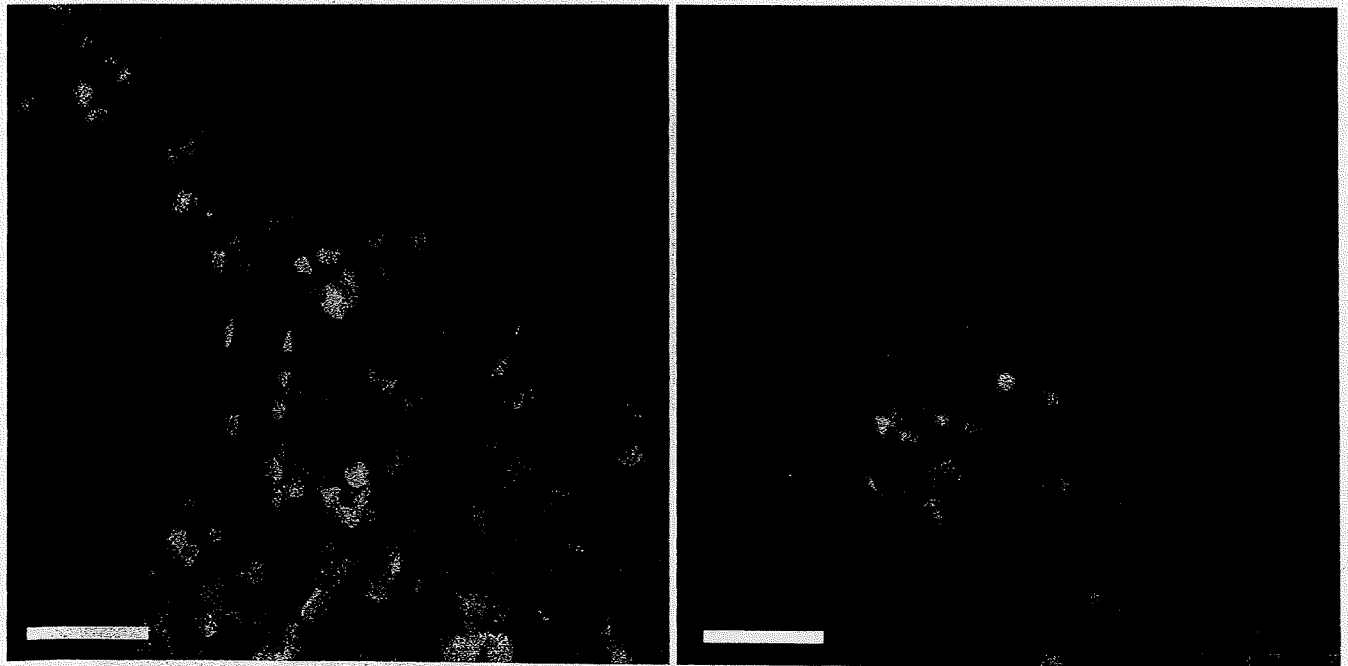


写真1 骨組織(骨髄内)のライブイメージング

LysM-EGFP transgenic mouse (左側)またはCSF1R-EGFP transgenic mouse (右側)の骨髄腔の生体二光子励起顕微鏡による観察像。Texas Redをconjugateした高分子デキストランを静脈注射することで骨髄内の血管構造を可視化している。実際の実験ではこれを一定時間間隔で撮影し、動画を作成する(筆者HPなどを参照)。スケールバー: 30 μ m。

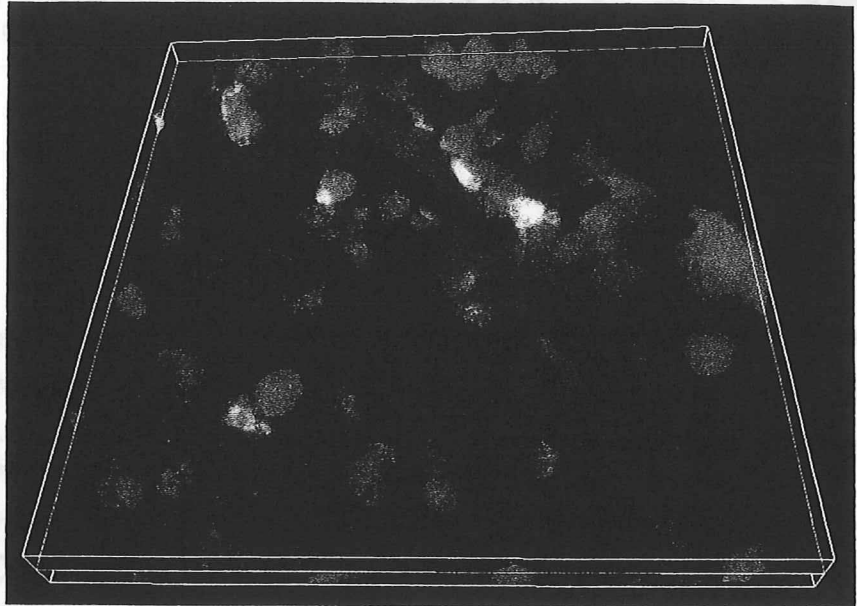


写真2 骨髄腔の3Dイメージ1

緑色：CSF1R-EGFP⁺細胞，赤色：微小血管壁の免疫染色。骨髄腔内には毛細血管床が網目のように存在している。

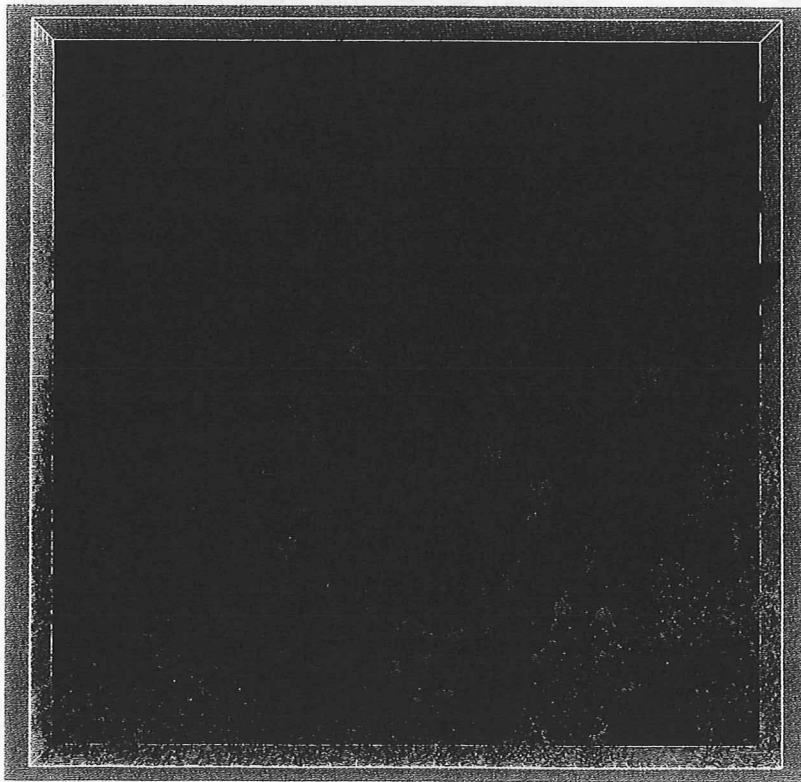


写真3 骨髄腔の3Dイメージ2

CSF1R-EGFP⁺細胞(緑色)と β -actin-DsRed2⁺細胞(赤色)からなる骨髄キメラマウスのイメージング。青色の部分は骨基質によるsecond harmonic generation。

脂質メディエーターによる破骨細胞前駆細胞の遊走・位置決め の制御 — 生体二光子励起顕微鏡を用いた骨組織の *in vivo* イメージングより —

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 生体イメージング研究室*

石井 優

はじめに

硬い石灰質に囲まれた骨組織の内部は、従来、生きたままでの観察が極めて困難であると考えられていた。実際にこれまで骨や骨髄の研究では、固定して摘出した骨を、カルシウムキレート剤に1週間ほど漬けて脱灰し、切片にして観察していた。この従来法でも、骨組織内の細胞の「形態」や「分子発現」(免疫染色による)を解析することはできたが、決定的な情報が欠落していた。それは細胞の「動き」である。細胞の動きを見るためには、どうしても生きた細胞を生きた組織の中で観察する必要がある。さらに、骨髄腔のように、豊富な血管床による血流を保ったまま、そこで流入・流出する細胞の動きを捉えることが重要な場所では、「摘出して生かした」骨組織ではなく、「生きたままの個体の中」の骨組織を観察する必要がある。

我々は最近、二光子励起顕微鏡を駆使してマウスを生かしたまま骨組織内を観察するイメージング方法を確立させた(写真1)。この方法を用いると、骨組織のリモデリングに関わる破骨細胞や骨芽細胞、骨髄内で分化・成熟を遂げる単球・顆粒球・リンパ球、その他の間葉系細胞や血液幹細胞などの生きた動きを、リアルタイムで観察することができる。我々は特に、骨を破壊・吸収する動きをもつ破骨細胞の動きと機能に注目して解析を行い、この前駆細胞の骨への遊走・位置決めが、種々のケモカインや脂質メディエーター(スフィンゴシン1リン酸)によって動的に調節されていることを明らかにした。

本稿では、これら最新の研究成果の解説に加えて、骨組織内の二光子励起ライブイメージングの

方法論や、その免疫学・細胞生物学分野における今後の応用と将来性について、実際の画像を紹介しながら概説したい。

イントロ：破骨細胞はどこから来て、何者で、どこへ行くのか？

骨組織では、日々、古い骨が「破骨細胞」によって壊され、「骨芽細胞」によって新しい骨が作られて、新陳代謝が維持されている。骨は硬そうで、一旦できたら変わらない組織に見えるが、厳密に言えば昨日の骨と今日の骨は別物である。加齢や炎症などによって破骨細胞の働きが異常に活性化し、破骨細胞と骨芽細胞の働きのバランスが崩れる骨吸収側に傾くと、骨粗鬆症や関節リウマチなど、いわゆる骨吸収性疾患の発症へとつながる。

骨芽細胞は骨内に恒常的に存在する間葉系由来の細胞であるが、破骨細胞は血液(単球)系の前駆細胞が、前駆細胞が骨表面に到達して、その場で最終分化を遂げて骨吸収能をもつ成熟破骨細胞となる。しかしながら、破骨細胞と骨芽細胞は単純なライバル関係ではなく、その働きは相互に緊密に関連している。例えば、骨表面で破骨前駆細胞が成熟破骨細胞へと分化するために必須の因子であるRANKL(Receptor activator of NF- κ B - ligand)は、骨芽細胞が発現している。この、RANKLの発見を始めとして、これまで国内外での精力的な研究の結果、破骨細胞の分化・成熟に関わる機構について多くの事実が解明されてきた。その一方で、未解明の大きな疑問が残されていた。それは「破骨細胞はどうやって骨表面に到達するのか」であった。

RANKLは骨組織以外の組織にも発現が見られるが、その他の組織では破骨細胞は見られない。ま

たRANKLを欠損したマウスでは、成熟破骨細胞の形成が完全に阻害されているが、このマウスに recombinant のRANKLを投与すると破骨細胞への分化がrescueされる。このとき興味深いことに、成熟破骨細胞は基本的に骨表面にしかできない。これは、骨表面には(骨芽細胞による)RANKLの発現以外に、破骨前駆細胞を引き寄せて、成熟させるのに適した特別な環境(破骨細胞ニッチとも呼ぶべき)が存在することを強く示唆している。

我々は、破骨前駆細胞がいかにして骨表面へ到達するのか、またその遊走・位置決めがどのように制御されているかについて解明するために、まず、種々のケモカインや脂質メディエーターについて、破骨前駆細胞を動かし得るかどうかが *in vitro* の実験系でスクリーニングを行った。その結果、スフィンゴシン1リン酸を始めとした、いくつかの候補分子を得た。しかしながら、次の研究段階として、「これらの候補分子が実際に *in vivo* で破骨前駆細胞を動かすかどうか」を解決する必要がある。このため、二光子励起顕微鏡を用いて生きた骨組織内部を観察することに挑戦した。

骨組織の生体二光子励起顕微鏡観察

1. 二光子励起顕微鏡はなぜ生きた組織の観察に適しているか?

二光子励起顕微鏡では、通常の蛍光顕微鏡観察(共焦点レーザー顕微鏡も含む)で用いる励起光の半分のエネルギー(=2倍の波長)をもったレーザー光を、細かいパルス状に放出したものを励起光源に用いる。パルス状の光子はフォーカスで一点に集められ密度が高い状態となり、二光子励起(=通常(一光子励起)では光子1個で励起する蛍光分子を、光子2個分で励起すること)が起こりうる。このため、二光子励起顕微鏡の特長として以下の2点が挙げられる。

①高いz軸解像度：フォーカス平面のみでしか励起が起こらない[その他のz軸平面では(通常の励起

に必要な半分のエネルギーの)光子が当たっているものの励起には至らない]。

②高い組織透過性：励起光として通常の半分のエネルギー(2倍の波長)の近赤外光(通常は波長が780~1,000nm)を用いるため、組織の深部まで光を到達させることができる(※「ホイヘンスの原理」：波長が長いほど障害物を越えて行きやすい。テレビの赤外線リモコンは障子を通すが、紫外線は紙一枚で容易にカットできる)。

固定した組織・臓器は、薄切してプレパラートにすれば、あらゆる断面を観察することができるが(物理的スライス)、生きた丸ごとの組織の内部を観察するには、二光子励起顕微鏡を用いて、深部組織でz軸平面を変えて観察することが極めて有用である(光学的スライス)。このため、生きた組織の観察手段として、二光子励起顕微鏡が最近国内外で多用されつつある。例えば、動物の脳や分泌腺など臓器・組織を摘出して、培養液中で生かしながら二光子励起観察されてきた(tissue-explant two-photon imaging)¹⁾。

2. 「生体」二光子励起観察のメリット

免疫系は、特に細胞の動きが重要なシステムである。好中球やマクロファージなどの抗原提示細胞や細胞性免疫を担うリンパ球が、感染局所や全身をくまなく遊走し、リンパ組織間内の微小環境で会合し、互いに信号を伝達することにより、免疫機能が維持されている。これら細胞遊走は時空間的に精緻にコントロールされており、各細胞が適切な場所に適切な時間に存在しなければ、機能を十分に発揮できない。これら免疫系における統率された細胞遊走システムは、神経系での固定した軸索システム(“hard-wired”)と比較して、“soft-wired”と形容される。このようなシステムの解析のため、二光子励起観察をさらに一歩進めて、実験動物を生かしたままで顕微鏡に乗せて、注目する組織を観察する“intravital two-photon microscopy(生体二光子励起顕微鏡観察)”の手法が、2002年頃より海外の複数の研究者によって開発された^{2, 3)}。この方

法論では、注目する組織のみならず、個体自体が生きており、全身の血流や代謝が保たれた状態で観察できるため、極めて情報量が多い。

骨組織内での破骨前駆細胞の遊走・位置決めを観察するために、我々は骨内・骨髄腔の“intravital” imagingに取り組んだ。この方法では、骨髄腔内を流れる豊富な血流が保たれているため、骨組織に定着している細胞の動きのみならず、血管から骨髄内へ細胞が流入したり、逆に血中へ還流していく様子を観察することができる。さらには、薬剤を尾静脈などから全身投与すると血流を通して速やかに観察部位に到達させることができる。このような長所から、我々は骨の tissue explant imaging では intravital imaging を行ったが、そもそも骨のように血流が豊富な組織は、取り出して観察することはかなり難しい。

3. 骨組織の生体イメージングの実際

骨基質に含まれるリン酸カルシウム結晶は、励起光を容易に散乱させるため、二光子励起に用いる近赤外線レーザーを用いても深部まで到達させることは難しい。現在の近赤外線レーザーでは軟部組織であれば表面から800~1,000 μm まで到達が可能であるが、骨組織の場合は、150~200 μm が限界である。このため我々は、骨基質が薄くて骨表面から骨髄腔まで80~120 μm で到達できる、マウスの頭頂骨をイメージングに用いた。

破骨前駆細胞のイメージングに関しては、その蛍光標識の方法にも難点があった。例えばリンパ球のリンパ節内などでの intravital imaging では、あるマウスから細胞を取り出して *ex vivo* で蛍光ラベル(細胞透過性の蛍光色素が各種存在する)して、これを別のマウスに adoptive transfer すると、リンパ節内に蛍光ラベルしたリンパ球が多数観察される。しかし、同様の手法は破骨前駆細胞などの骨髄球系の細胞に関しては、うまくいかない。このため、我々は可視化したい細胞に特異的に蛍光分子を発現させたトランスジェニックマウスを用いて実験を行った。例えば、破骨前駆細胞を含む単

球系細胞のイメージングには、CSF1R (M-CSF/CSF-1 の受容体) や CX₃CR1 (CX₃CL1/fractalkine の受容体) のプロモーター下に EGFP を発現するマウス、顆粒球系のイメージングには、Lysozyme M プロモーター下 EGFP 発現トランスジェニックマウス、などを用いた。これらの問題点としては、蛍光分子の発現が、完全に細胞系統特異的とはなっていないことである(例えば Lysozyme M-EGFP transgenic であれば、EGFP の発現は顆粒球以外にも、一部マクロファージやNK細胞などにも見られる)。長所は、adoptive transfer とは違って、元々その組織・臓器に居た状態での細胞を観察できるので、よりインタクトな細胞現象を観察できる点である。

脂質メディエーター S1P による破骨前駆細胞の遊走と位置決めの制御

種々のケモカイン・脂質メディエーターを *in vitro* でスクリーニングした結果、破骨前駆細胞の遊走を刺激するいくつかの分子を得たが、中でも我々が注目したものは、現在リンパ球の遊走制御について重要な知見が得られているスフィンゴシン1リン酸(S1P)である。S1Pは主に赤血球や血小板によって作られるため血中に豊富に存在する。一方、組織にはS1Pを分解するS1Pリアーゼがubiquitousに発現しており、一般にS1Pは血中で高く、組織で低い濃度に保たれている。このため、S1Pに対する細胞遊走(ケモタキシス)は、基本的には細胞が組織から血中へ還流する際に作用すると考えられている。

我々は、破骨前駆細胞がS1Pに対する受容体(S1P₁)を発現しており、*in vitro* でS1Pに対して強いケモタキシスが惹起されることを見出した。このS1Pに対する細胞遊走が *in vivo* でも見られるかどうかを確認するために、二光子励起顕微鏡を用いて骨組織内部の生体観察を行った^{4, 5}。骨組織にある破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CSF1R-EGFP⁺ または CX₃CR1-EGFP⁺) は、定常状態ではほとんど