

令和元年6月8日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08247

研究課題名(和文)メモリー濾胞性ヘルパーT細胞の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of memory Tfh cell generation

研究代表者

原田 陽介 (Harada, Yohsuke)

東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・講師

研究者番号：20328579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞による抗体産生には濾胞性ヘルパーT (Tfh)細胞と呼ばれるT細胞による助けが重要であることがわかってきた。Tfh細胞の生体内における動態を明らかにすることは、様々な感染症や自己免疫疾患の治療法の開発に非常に重要である。そこでTfh細胞がどのような過程を経てメモリー細胞に変化していくのかを明らかにするために、Tfh細胞の生体内における追跡が可能な2種類の遺伝子改変マウスを作成した。これらのマウスにタモキシフェンを投与することで、生体内に存在するTfh細胞に蛍光物質を発現させ、その動態を追跡することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでTfh細胞特異的な遺伝子改変が可能なツールは報告されていなかったが、今回我々が作製したCxcr5CreERT2マウスとBcl6Tomato-CreERT2マウスは、それを可能とする世界初のツールである。これらのマウスを使うことで、生体内でTfh細胞を継続的に追跡することが可能になった。これらのマウスの解析からTfh細胞のメモリー細胞への分化やTfh由来メモリー細胞の維持のメカニズムが明らかになれば、新たなワクチンやアレルギー、自己免疫疾患の治療薬の開発につながるだろう。

研究成果の概要(英文)：Although Tfh cells are crucial for the humoral immune response, there are no tools to track the fate of Tfh cells. In this study, we generated two reporter mice that enables Tfh cell tracking in vivo. Using these reporter mice, we demonstrated that Tfh cells could be tracked from the effector phase to the memory phase. During the contraction phase, the localization of Tfh cells changed from B cell follicles and GC areas to T-B border areas and T cell zones. These results indicate that these mice are useful tools for studying the cell fate of differentiated Tfh cells in vivo and therefore have implications for the development of therapeutic strategies for infectious and autoimmune diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 B細胞 抗体 免疫記憶 液性免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)由来のメモリー細胞は、効率的に抗体産生を誘導することが明らかになってきたが、Tfhメモリー細胞の形成、維持、および2次応答がどのようにコントロールされているのかはほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

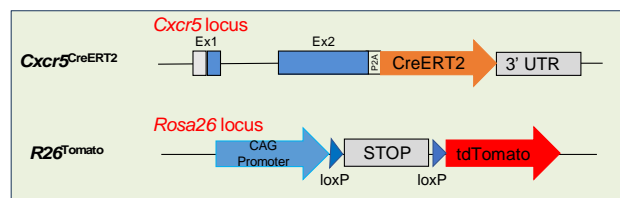
Tfh細胞の動態を生体内で追跡することでTfh細胞がどのような過程を経てメモリー細胞に変化していくのか、また他のメモリーT細胞と比べてどのような特徴を持っているのかを明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

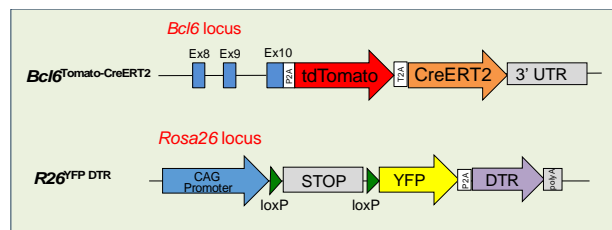
Tfh細胞のメモリー細胞への移行を追跡し、それらの細胞機能を評価するためにTfh細胞の細胞表面マーカーであるCXCR5の発現と同時にタモキシフェン誘導性Creリコンビナーゼ(CreERT2)を発現するマウス(*Cxcr5^{CreERT2}*)とTfh細胞のマスター転写因子であるBcl6の発現と同時に蛍光タンパク質tdTomatoとCreERT2を発現するマウス(*Bcl6^{Tomato-CreERT2}*)を作製した。さらに*Cxcr5^{CreERT2}*マウスとCreリコンビナーゼの誘導により蛍光タンパク質tdTomatoを発現するマウス(*R26^{Tomato}*)をかけ合わせ、CXCR5を発現したTfh細胞にtdTomatoを持続的に発現させることができるシステム(*Cxcr5^{CreERT2}R26^{Tomato}*)を構築した。また、ROSA26の遺伝子座にCreリコンビナーゼで誘導される蛍光タンパク質YFPおよびジフテリアトキシンレセプター(DTR)を挿入したマウス(*R26^{YFP 2A DTR}*)を作成し、*Bcl6^{Tomato-CreERT2}*マウスと交配することで、Bcl6を発現したTfh細胞にYFPとDTRを持続的に発現させることができるシステム(*Bcl6^{Tomato-CreERT2}R26^{YFP 2A DTR}*)を構築した。

4. 研究成果

(1)CXCR5を発現したTfh細胞にtdTomatoを持続的に発現させることができるシステム(*Cxcr5^{CreERT2}R26^{Tomato}*マウス)を作成し、tdTomatoを発現した抗原特異的なTfh細胞の動態をメモリー細胞まで追跡した。ニワトリ卵白アルブミン(OVA)特異的なT細胞レセプターの遺伝子を導入した*Cxcr5^{CreERT2}R26^{Tomato}*マウス由来T細胞をホストマウスに移入し、マウスをOVAで免疫した。免疫後、4日目と6日目でタモキシフェンを投与し、CXCR5発現T細胞にtdTomatoの発現を誘導した。免疫後5日目ではtdTomato発現細胞はT細胞領域とB細胞領域の境界領域に多く存在した。免疫後8日目にはそれらの細胞の多くがB細胞領域に存在し、その一部は胚中心領域に局在していることが観察された。メモリー期である免疫後28日目ではT細胞領域およびT-B境界領域にtdTomato陽性細胞の多くが存在していた。以上の結果から、Tfh細胞はB細胞領域および胚中心において、抗体のクラススイッチ、親和性成熟、プラズマ細胞の分化の促進を行った後、メモリー期ではT細胞領域に戻って維持されることが示唆された。



(2)ROSA26の遺伝子座にCreリコンビナーゼで誘導される蛍光タンパク質YFPおよびジフテリアトキシンレセプター(DTR)を挿入したマウス(*R26^{YFP 2A DTR}*)を作成し、*Bcl6^{Tomato-CreERT2}*マウスと交配した。このマウスのT細胞はCXCR5の発現強度に比例してtdTomatoの蛍光強度が上昇することが観察され、tdTomatoがBcl6遺伝子発現をモニターするレポーターとして機能することが確認された。このマウスにタモキシフェンを投与すると、tdTomato陽性のTfh細胞にYFPの発現が誘導された。さらにジフテリアトキシンを投与することにより、これらのYFP陽性細胞を体内から消去することに成功した。今回樹立した遺伝子改変マウスによって、生体内のTfh細胞のフェイトマッピングが可能になり、かつそれらの細胞を消去することで、生理的な役割を明らかにすることができるシステムが構築できた。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

Tai Y, Sakamoto K, Takano A, Haga K, Harada Y. (2019) Dysregulation of humoral immunity in Foxp3 conditional-knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 513, 787-793

DOI:10.1016/j.bbrc.2019.04.090、査読あり

Takebe T, Sakamoto K, Higami Y, Harada Y. (2018) A novel mouse model for tracking the fate of CXCR5-expressing T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495, 1642-1647
DOI:10.1016/j.bbrc.2017.12.029、査読あり

〔学会発表〕（計 14 件）

高野亜淑、原田陽介、他、制御性 T 細胞の機能異常における IgE 抗体産生のメカニズム、
日本薬学会第 139 年会、2019 年

田井優貴、原田陽介、他、The role of regulatory T cells in humoral immune responses、
第 47 回日本免疫学会学術集会、2018 年

坂元一樹、原田陽介、他、Dysregulation of humoral immunity in Foxp3 conditional
knockout mice、第 46 回日本免疫学会学術集会、2017 年

武部友、原田陽介、他、A novel mouse model for tracking the fate of follicular helper
T cells、第 46 回日本免疫学会学術集会、2017 年

武部友、原田陽介、他、濾胞性ヘルパー T 細胞の機能解析のための新たなマウスの作製、
日本薬学会第 137 年会、2017 年

〔図書〕（計 2 件）

原田陽介、他、丸善出版、理工系の基礎 薬学、2018 年、124-130

原田陽介、他、裳華房、ゲノム創薬科学、2017 年、132-158

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。