

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20764

研究課題名（和文）転写共役因子Bob1による濾胞ヘルパーT細胞の免疫記憶制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of immune memory regulation of follicular helper T cells by Bob1

研究代表者

池上 一平（Ikegami, Ippei）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80837021

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：自己免疫疾患やアレルギー疾患などの免疫難病の背景として抗原特異的抗体の産生異常があり、これらの理解を深めるべく本研究では濾胞ヘルパーT（Tfh）細胞に着目した。Tfh細胞は二次リンパ組織胚中心内でB細胞機能を調節し、抗原特異的抗体産生に寄与する。このTfh細胞に高発現するBob1転写共役因子の機能について検討したところ、Tfh細胞の数的制御や免疫チェックポイント分子の発現を制御し、液性免疫応答を調節している事実が明らかとなった。さらにBob1は免疫記憶型（メモリー）Tfh細胞の発生に関与しており、メモリーTfh細胞の制御機構に必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトおよびマウスTfh細胞にBob1が高発現する事実はこれまで報告があったが、本研究にてBob1によるTfh細胞の機能制御機構の詳細が初めて明らかになった。特に、Bob1がメモリーTfh細胞の数的制御を調節することから、自己免疫疾患やアレルギー疾患など、これまでメモリーTfh細胞との関係が報告されていた疾患について、Tfh細胞におけるBob1の多寡が診断マーカーや治療標的分子となり得る可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Abnormalities in the production of antigen-specific antibodies are the background of immune intractable diseases such as autoimmune and allergic diseases. To better understand these diseases, I focused on follicular helper T (Tfh) cells. Tfh cells regulate B cell function within secondary lymphoid tissue germinal centers and contribute to antigen-specific antibody production. In this study, I investigated the mechanism of Bob1, which is highly expressed in Tfh cells. It is revealed that Bob1 regulates the number of Tfh cells and the expression of immune checkpoint molecules, thereby modulating the humoral immune response. Furthermore, Bob1 is involved in the development of memory Tfh cells, suggesting that it is required for the regulatory mechanism of memory Tfh cells.

研究分野：免疫学

キーワード：Tfh細胞 Bob1 メモリーTfh細胞 免疫記憶 液性免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫システムは感染に対する必須の防御機構であり、細胞性免疫応答や液性免疫応答によりウイルス、細菌、寄生虫など様々な病原体を特異的に排除する。このうち液性免疫応答ではB細胞が産生する抗原特異的抗体により病原体の補足、排除を行う。そのため、抗原特異的抗体産生機構の破綻は感染症、アレルギー疾患や自己免疫疾患などの病態に深く関与しており、この制御機構に対する研究が多角的に行われている。

本研究課題では、抗原特異的抗体産生を司る濾胞ヘルパーT (follicular helper T, Tfh) 細胞に焦点を当てた。Tfh細胞はCD4陽性ヘルパー(CD4⁺)T細胞サブセットのひとつであり、二次リンパ組織内でB細胞に作用して抗原特異的抗体の産生を制御する重要な細胞として近年同定された(Nurieva RI, et al. *Science*. 2009)。パンデミックとなったSARS-CoV2感染患者では二次リンパ組織中Tfh細胞が減少しており、B細胞調節に影響を及ぼしている可能性が示されている(Kaneko N, et al. *Cell*. 2020)。また、組織から全身循環血中に移行した免疫記憶型(メモリー)Tfh細胞の数的差異やエフェクター機能異常は、アレルギー疾患や自己免疫疾患などの免疫難病の発症や病態への関与が報告されている(Crotty S. *Immunity*. 2019)。このためTfh細胞への注目は非常に高まっており、Tfh細胞の機能制御機構を明らかにすることは、液性免疫応答が病因となる疾病の理解に深くつながると考えた。

研究代表者は、このTfh細胞に高発現するB-cell Oct-binding protein-1(Bob1、遺伝子名Pou2af1)転写共役因子に注目した(Yamashita K, et al. *Eur J Immunol*. 2016)。Bob1は全身性に発現するOct1転写因子とリンパ球に発現するOct2転写因子の共役因子であり、B細胞でのクラススイッチを調節する分子として同定された(Schubart DB, et al. *Nature*. 1996)。CD4⁺T細胞でもBob1が発現しIL-17産生を調節することが報告されているが(Ikegami I, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019)、Tfh細胞におけるBob1の機能は依然として不明なままであった。その理由として、ナイーブCD4⁺T細胞からTfh細胞への多段階な分化様式が挙げられる。Tfh細胞はナイーブCD4⁺T細胞が抗原提示細胞により活性化され、未熟Tfh細胞となる。この未熟Tfh細胞は、同じ抗原を認識するB細胞と会合し、二次リンパ組織胚中心内で成熟Tfh細胞としてB細胞に作用し、抗原特異的抗体の産生を促す(Read KA, et al. *Immunology*. 2016)。そのため、B細胞とTfh細胞の両細胞でBob1が欠損している全身性Bob1欠損マウスでは、Tfh細胞の機能を正確に解析できなかった。そこで本研究では、Bob1の遺伝子領域をIoxP配列で挟み込むBob1-flxedマウスをCRISPR/Cas9システムにより作出し、このマウスとCD4⁺T細胞にCreリコンビナーゼが発現するCD4-CREマウスとを交配することで、CRE/IoxPシステムによりCD4⁺T細胞特異的Bob1欠損(Bob-CD4KO)マウスを作出した。つまり、B細胞におけるBob1発現は正常なまま、Bob1欠損Tfh細胞の機能を一個体内で評価する実験系を世界に先駆けて構築した。

2. 研究の目的

本研究の目的は液性免疫応答を司るTfh細胞でのBob1の機能を明らかにすることである。Tfh細胞にBob1が発現している事実は複数報告されているものの(Matsumiya H, et al. *Immunol Lett*. 2017, Vella LA, et al. *J Clin Invest*. 2019)、Tfh細胞におけるBob1の機能制御機構は未だ解明されていない。そこで、ナイーブCD4⁺T細胞からTfh細胞への分化や、B細胞制御機能に対するBob1の関与を検討した。さらに、その制御機構が明らかとなっていないメモリーTfh細胞におけるBob1の機能的意義も検討を進めた。

3. 研究の方法

(1) FoxP3(DTR/GFP)CD4 特異的 Bob1 欠損マウスの作出

Tfh 細胞には FoxP3 陽性となる濾胞制御性 T (follicular regulatory T, Tfr) 細胞の存在が報告されている。Tfh 細胞と Tfr 細胞を区別して Bob1 の機能的意義を評価した報告はこれまでないため、FoxP3(GFP/DTR)レポーターマウスと Bob-CD4K0 マウスを交配し、FoxP3(DTR/GFP)Bob-CD4K0 の作出を作出した。マウスの作出は得られた 4~6 週齢の産仔の体組織(尾または指)からゲノムを抽出し、PCR 法にて遺伝子改変様式を確認した。

(2) Bob1 欠損 Tfh 細胞による B 細胞制御の解析

Bob-CD4K0 マウスまたは同腹子の Bob1-floxed マウス(Bob1 が CD4 細胞に発現する比較対照群)に対して、NP-CGG を Complete Freund's adjuvant(CFA)と混合した NP-CGG/CFA を投与した。解析は、未免疫状態、外来抗原投与後 7 日目から 14 日目の初期免疫応答、外来抗原投与後 30-50 日後の免疫記憶期、NP-CGG を PBS に懸濁した NP-CGG/PBS 投与後の再免疫応答について経時的に行った。各免疫時相で血清を尾静脈採血により回収し、ELISA 法により IgM や IgG1 抗体価を測定した。また、所属リンパ組織における抗体産生細胞を FACS Canto フローサイトメーターにて解析した。(1)で得られた FoxP3(DTR/GFP)Bob-CD4K0 マウスについても同様のスケジュールで外来抗原を投与し、Tfh 細胞(GFP⁺CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺)と Tfr 細胞(GFP⁺CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺)の数的差異や機能的差異を検討した。

(3) メモリーTfh 細胞の機能解析

CD45.1、CD45.2 コンジェニックマウスを用いた養子免疫モデルで、免疫応答後に長期生存するメモリーTfh 細胞の解析を行った。CD45.2-Bob-CD4K0 マウスに卵白アルブミン(OVA)と CFA 混合した OVA/CFA を投与し、30-50 日後の免疫記憶期における T 細胞サブセットを FACS Aria セルソーターで単離精製し、コンジェニックマウスである CD45.1-TCRβ鎖欠損マウスに尾静脈注射で養子免疫を行った。養子免疫 1 日後に、OVA と Incomplete Freund's adjuvant (IFA)を混合した OVA/IFA を投与した。その後、OVA/IFA 投与後 7 日目の CD45.2 陽性 T 細胞サブセットの再活性化様式を FACS Canto で解析した。

4. 研究成果

(1) FoxP3(DTR/GFP)CD4 特異的 Bob1 欠損マウスの作出

Bob1 は B2 細胞に高発現しており、全身性 Bob1 欠損マウスを用いた研究では、Tfh 細胞での Bob1 の機能を解析するのは困難であったため、新たに Bob-CD4K0 マウスを樹立した。さらに、FoxP3(DTR/GFP)レポーターマウスと交配し作出された FoxP3(DTR/GFP) Bob-CD4K0 マウスを樹立した。このマウスにより、制御性 T(regulatory T, Treg)細胞や Tfr 細胞をホルマリン固定操作せずに生細胞のまま分画することができるため、Tfh 細胞における Bob1 の機能をより明確に個体レベルで解析可能となった。

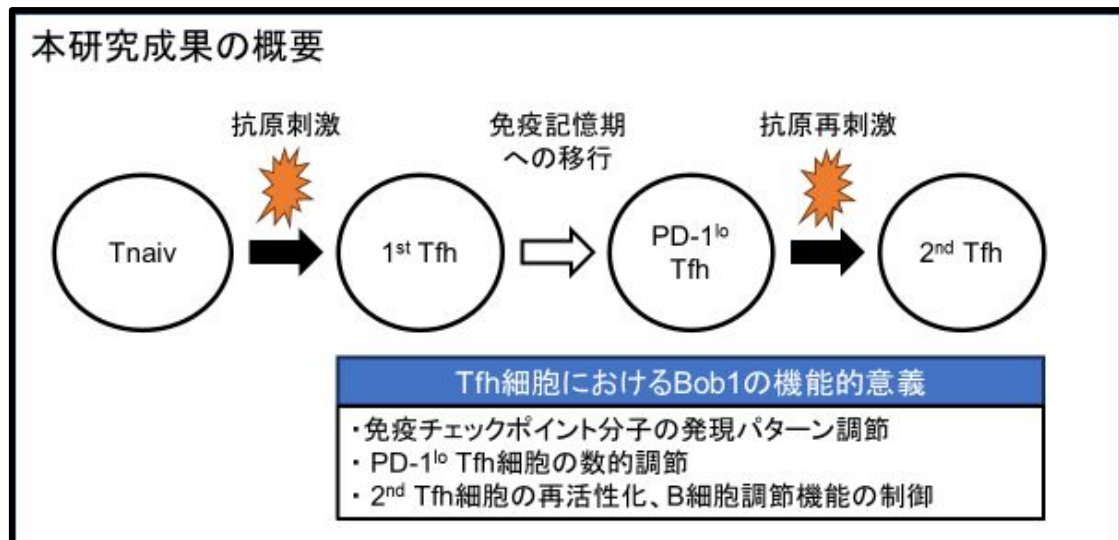
(2) Bob1 欠損 Tfh 細胞による B 細胞制御の解析

NP-CGG/CFA を Bob-CD4K0 マウスに投与すると、対照群の Bob1-floxed マウスに比べ NP 特異的 IgG 抗体価の減少が一部の免疫時相で認められた。NP 特異的 IgG1 抗体価の減少を認めた時相は初回免疫後 42 日目の免疫記憶期と NP-CGG/PBS 投与後の再免疫応答で、未免疫状態ならびに初期免疫応答では両群に差が認められなかった。NP 特異的 IgM 抗体価についてはどの免疫時相でも差異が認められなかった。(1)で樹立した FoxP3(DTR/GFP)Bob-CD4K0 欠損マウスを用いて、同様の時相を解析したところ、Tfh 細胞に発現する免疫チェックポイント分子発現の変化を認めた。また、Tfh 細胞の数的差異は免疫記憶期-再免疫応答は対照群の FoxP3(GFP/DTR)Bob1-floxed マ

ウスと差はなかったものの、組織メモリーTfh 細胞の可能性が示唆されている PD-1^{lo}Tfh 細胞 (GFP-CD4⁺CXCR5⁺PD-1^{lo}) が免疫記憶期に FoxP3(DTR/GFP)Bob-CD4K0 マウスで減少を認めた。末梢血液中の循環メモリーTfh 細胞も、所属リンパ組織と同様に免疫記憶期の FoxP3(DTR/GFP)Bob-CD4K0 マウスで減少を認めた。

(3) メモリーTfh 細胞の機能解析

FoxP3(DTR/GFP)Bob-CD4K0 で減少を認めた、免疫記憶期の PD-1^{lo}Tfh 細胞について、CD45.1-コンジェニック TCRβ鎖欠損マウスへ養子免疫を実施し、CD45.2-PD-1^{lo}Tfh 細胞の再活性化機構を検討した。その結果、Bob1 欠損 CD45.2-PD-1^{lo}Tfh 細胞は CD45.2-Tfh 細胞へ分化する頻度が低下していた。



(1,2,3)の研究成果から、Bob1 は Tfh 細胞のメモリー細胞化ならびに再活性化機構を調節し、液性免疫応答を制御する可能性が示唆された(下図)。本研究成果に基づき、アレルギー疾患や自己免疫疾患患者の Tfh 細胞における Bob1 発現と病態との関係を解析し、Tfh 細胞における Bob1 が新規診断標的分子または治療標的分子になり得るかなど、臨床への応用について検討したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayato Yabe, Ryuta Kamekura, Motohisa Yamamoto, Kosuke Murayama, Shiori Kamiya, Ippei Ikegami, Katsunori Shigehara, Hiromi Takaki, Hirofumi Chiba, Hiroki Takahashi, Kenichi Takano, Hiroki Takahashi, Shingo Ichimiya	4. 巻 31
2. 論文標題 Cytotoxic Tph-like cells are involved in persistent tissue damage in IgG4-related disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 249 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1719576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kosuke Murayama, Ippei Ikegami, Ryuta Kamekura, Hiroshi Sakamoto, Masahiro Yanagi, Shiori Kamiya, Taiki Sato, Akinori Sato, Katsunori Shigehara, Motohisa Yamamoto, Hiroki Takahashi, Ken-ichi Takano, Shingo Ichimiya	4. 巻 13
2. 論文標題 CD4+CD8+ T follicular helper cells regulate humoral immunity in chronic inflammatory lesions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 941385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.941385	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shiori Kamiya, Ippei Ikegami, Masahiro Yanagi, Hiromi Takaki, Ryuta Kamekura, Taiki Sato, Keiju Kobayashi, Takafumi Kamiya, Yuka Kamada, Takaya Abe, Ken-ichi Inoue, Tokimasa Hida, Hisashi Uhara, Shingo Ichimiya	4. 巻 142
2. 論文標題 Functional Interplay between IL-9 and Peptide YY Contributes to Chronic Skin Inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 3222 ~ 3231.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2022.06.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Taiki Sato, Ippei Ikegami, Masahiro Yanagi, Shiori Kamiya, Ryuta Kamekura, Mihoko Ohashi, Atsushi Watanabe, Shingo Ichimiya
2. 発表標題 IL-9 regulates Tfh cells to control humoral memory responses
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masahiro Yanagi, Ippei Ikegami, Shiori Kamiya, Taiki Sato, Hiroshi Sakamoto, Mihoko Ohashi, Ryuta Kamekura, Hirofumi Chiba, Shingo Ichimiya
2. 発表標題 Bob1 regulates memory T follicular helper cells to control antigen-specific humoral immunity
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shiori Kamiya, Ippei Ikegami, Ryuta Kamekura, Shingo Ichimiya, Hisashi Uhara
2. 発表標題 IL-9 contributes to DNFB-induced contact hypersensitivity
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒本 博史, 亀倉 隆太, 池上 一平, 一宮 慎吾, 高野 賢一
2. 発表標題 IgA腎症の病態形成における濾胞性ヘルパーT細胞サブセットの機能的役割
3. 学会等名 第35回日本口腔・咽頭科学会総会ならびに学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 太軌, 石井 大智, 大湯 岳, 千葉 慶宜, 高橋 有毅, 鶴田 航大, 榎 龍之輔, 高瀬 貴章, 池上 一平, 宮島 正博, 一宮 慎吾, 渡辺 敦
2. 発表標題 前縦隔発生骨外性形質細胞腫におけるAireの発現と胸腺局在B細胞との関連について
3. 学会等名 第75回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 太軌, 池上 一平, 石井 大智, 大湯 岳, 千葉 慶宜, 鶴田 航大, 高橋 有毅, 榎 龍之輔, 高瀬 貴章, 宮島 正博, 一宮 慎吾, 渡辺 敦
2. 発表標題 原発性肺癌浸潤CD4陽性T細胞組成と浸潤メカニズムの解析
3. 学会等名 第48回日本肺癌学会北海道支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒本 博史, 亀倉 隆太, 池上 一平, 一宮 慎吾, 高野 賢一
2. 発表標題 IgA腎症における口蓋扁桃リンパ球中の濾胞ヘルパーT細胞の機能解析
3. 学会等名 第39回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masahiro Yanagi, Ippei Ikegami, Shiori Kamiya, Taiki Sato, Ryuta Kamekura, Hirofumi Chiba, Shingo Ichimiya
2. 発表標題 Bob1 regulates T follicular helper cells to establish specific humoral immunity.
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taiki Sato、Ippei Ikegami、Masahiro Yanagi、Shiori Kamiya、Ryuta Kamekura、Atsushi Watanabe、Shingo Ichimiya
2. 発表標題 A role of IL-9 signaling in Tfh cells to establish humoral immune responses.
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shiori Kamiya、Ippei Ikegami、Ryuta Kamekura、Keijyu Kobayashi、Takafumi Kamiya、Shingo Ichimiya、Hisashi Uhara
2. 発表標題 IL-9 promotes skin inflammation via Pyy in imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重原克則、亀倉隆太、池上一平、柳昌弘、山本圭祐、一宮慎吾
2. 発表標題 鼻炎合併喘息患者におけるダニ舌下免疫療法の濾胞ヘルパー及び濾胞制御性T細胞を中心とした解析
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷詩織、池上一平、亀倉隆太、小林景樹、一宮慎吾、宇原 久:
2. 発表標題 イミキモド誘発性乾癬様皮膚炎におけるIL-9の役割の検討
3. 学会等名 第85回日本皮膚科学会東部支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 亀倉隆太、池上一平、山本圭祐、山本元久、高橋裕樹、高野賢一、一宮慎吾
2. 発表標題 末梢ヘルパーT細胞とIgG4関連疾患
3. 学会等名 第29回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------