

令和元年6月5日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09577

研究課題名(和文)喘息肺における濾胞性ヘルパーT細胞の分化誘導の仕組みと喘息病態での役割の解明

研究課題名(英文) Differentiation of follicular helper T cells induced by lung dendritic cells in asthma

研究代表者

古橋 一樹 (Furuhashi, Kazuki)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70759935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ダニ抗原(HDM)と卵白アルブミン(OVA)によるマウス喘息モデルを用いて、肺組織、所属リンパ節、脾臓での濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)の誘導と特異的IgE/IgG1抗体産生を確認し、抗原提示細胞である肺樹状細胞(LDC)のサブセットを単離・同定した。次にOVA喘息モデルから単離したLDCの2つのサブセットとOVA特異的に反応するT細胞受容体を持ったOT- マウスから単離したナイーブT細胞を用いて共培養した結果、cDC2がcDC1と比較し、効率よくTfh細胞を分化誘導することが確認できた。さらに機能解析を行うため、誘導されたTfh細胞を単離し、ナイーブB細胞との共培養アッセイを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題によって、喘息肺における所属リンパ節におけるTfh細胞の増加やアレルゲン特異的IgE抗体産生を確認し、さらにTfh細胞は、抗原提示細胞である肺樹状細胞サブセットの中のcDC2によって、より効率よく誘導されていることが確認できた。これらの結果は、気管支喘息の病態にTfh細胞が深く関わっていることを示唆し、気管支喘息において従来から重要と考えられていたTh2細胞などのヘルパーT細胞の他に、Tfh細胞が関与する気管支喘息の新たな病態の解明につながると考えられる。また将来、Tfh細胞の誘導を制御するようなTfh細胞をターゲットにした治療戦略が開発できる可能性も考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that follicular helper T cells (Tfh) increased in mediastinal lymph node and spleen using asthma mouse model with house dust mite (HDM) and ovalbumin (OVA) antigen. The antigen specific IgE and IgG1 antibodies were produced in those asthma models. We identified and purely isolated two lung dendritic cells (LDCs) subsets, which were conventional DC1 (cDC1) and DC2 (cDC2). Subsequently, we established co-culture assay with each LDC subset from OVA asthma mouse model and naive T cells from OT-II mice having OVA specific T cell receptors. As a result, we found that cDC2 induced greater frequencies of Tfh than cDC1.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：濾胞性ヘルパーT細胞 マウス喘息モデル 肺樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

喘息の発症機序においては、従来は抗原提示細胞（特に樹状細胞）の刺激によって分化した Th2 細胞が、IL-4, IL-5, IL-13 などの Th2 サイトカインを産生し、好酸球や肥満細胞などのエフェクター細胞を気道に集積させ、また同時に B 細胞からアレルゲン特異的 IgE 抗体の産生を誘導することが重要と考えられてきた。とくに特異的 IgE 抗体は、肥満細胞や好塩基球の脱顆粒を誘導し、ヒスタミンやセロトニンなどの炎症性メディエーターを放出させ、症状の悪化や、時に致死的な大発作の原因となる重要な液性因子であり、実臨床でも最近ヒトにおいて抗 IgE 抗体製剤が難治性喘息に対して有用であることが示された。しかし近年、Th17 細胞、Th9 細胞をはじめとする新しいヘルパー T 細胞 (Th) サブセットが同定され (Nat Rev Immunol 2013)、これらの細胞が喘息の病態に関与していることがわかってきた。その中で、最近、リンパ濾胞に分布する濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh 細胞) が新たに発見され、抗体産生の機序に関するパラダイムシフトが起きている (Immunity 2009, 2011)。今まで抗体産生に関わる最も重要な T 細胞は Th2 細胞と考えられていたが、近年の Tfh 細胞の研究によって、驚くべきことにクラススイッチを含む抗体産生において中心的な役割を果たすのは Th2 細胞ではなく、Tfh 細胞であることが示されつつある (Immunity 2011 など)。現在、Tfh 細胞は、二次リンパ組織濾胞の胚中心において高親和性抗体をもつ B 細胞の選択と形質細胞や記憶 B 細胞への分化誘導を担う主たる Th 細胞と考えられている。

一般に特異的 IgE 抗体は、抗原刺激を受けた B 細胞に、Th2 細胞由来の IL-4 が作用して B 細胞表面の免疫グロブリンのクラススイッチ (IgD, IgM→IgE) が惹起され、最終的にこの表面 IgE 陽性 B 細胞が IgE 産生形質細胞へ分化し産生される。しかし最近、抗体産生の過程で Tfh 細胞が大量の IL-4 を産生することが報告され、Tfh 細胞由来の IL-4 がより重要であることがわかってきた (図 2)。実際、Tfh 細胞の IL-4 産生能を低下させた (Th2 細胞の IL-4 産生能は正常) *il4* 遺伝子の非転写制御領域 (CNS-2) 欠損マウスでは、ほとんど IgE 抗体が産生されないことが示されている (Immunity 2012)。特に Tfh 細胞から産生される IL-21 が IL-4 と相乗的に IgE 抗体産生を増加させることが明らかになった (Immunity 2011)。以上より、Tfh 細胞は、生体でもっとも強い IgE 抗体の産生誘導能をもつ免疫担当細胞であることが示唆されている。

しかし、Tfh 細胞の肺における役割については未だ解明されておらず、ウイルス感染において所属リンパ節の Tfh 細胞が増加することが確かめられているに過ぎなかった (J Virol 2014)。アレルゲン特異的 IgE 抗体が重要な役割を果たす喘息においては、前述した Tfh 細胞の機能を鑑みると Tfh 細胞がその病態に深く関わっている可能性が推測されるが、今まで全く研究が進んでいなかった。その中で、今年、はじめて IL-21 を産生する Tfh 様の細胞が、ダニ抗原を使った喘息モデルマウスにおいて肺の縦隔リンパ節に存在することが報告された (Immunity 2015)。しかしながら、アレルゲン特異的 Tfh 細胞が喘息肺でどのように誘導され、さらに特異的 IgE 抗体産生を含め喘息の病態でどのような役割を果たしているのかなどといった点については全くわかっていない。

Tfh 細胞や Th17 細胞などの Th 細胞の分化には、樹状細胞 (DC) をはじめとした抗原提示細胞の種類や、それらが産生するサイトカインなどが重要な役割を果たしている。例えば Th1 細胞への分化には、DC から産生される IL-12 を介して転写因子 T-bet の発現が必要である。一方、Tfh 細胞は、IL-6、IL-21 の存在下に転写因子 Bcl-6 の発現を経て誘導される。近年の研究によって、興味深いことに肺においては多様なサブセットの DC が存在し、それぞれが異なった機能-サイトカイン産生プロファイルなどをもつことがわかってきた (Annu Rev Immunol 2012)。申請者らはこれまでに、肺の DC (LDC) サブセットについての研究を行ってきており、CD103+CD11b-LDC が主として Th1 細胞を誘導し、一方、CD103-CD11b+LDC が Th2 反応を引き起こすことを明らかにした (Furuhashi, Am J Respir Cell Mol Biol 2012)。また、CD103-CD11b+LDC が B 細胞に対して IgA のクラススイッチを惹起し、その産生を誘導する能力が高いことを示した (Suzuki, Am J Respir Cell Mol Biol 2012 ; Naito, Am J Respir Cell Mol Biol 2008)。しかし、どのような LDC サブセットが Tfh 細胞を誘導できるのかはわかっていない。

以上より、喘息肺におけるアレルゲン特異的 IgE 抗体産生の中心的役割を果たすであろう Tfh 細胞の誘導や動態、機能などについて明らかにすることは、Tfh に着目した気管支喘息の新たな病態の解明と新規治療ターゲットの発見につながることで期待される。

2. 研究の目的

最近発見された新しいヘルパー T 細胞であり、アレルゲン特異的 IgE 抗体産生において中心的な役割を担う Tfh 細胞に着目して、肺において Tfh 細胞が分化誘導される仕組みを解明し、さらに喘息モデルマウスを用いて、Tfh 細胞がどのように喘息の病態に関わっているかを明らかにし、本疾患の新たな病態の解明と新規治療ターゲットを探索することである。

3. 研究の方法

本研究計画では、以下の研究を実施した。

- ① 正常マウスと卵白アルブミン (OVA) で感作した喘息モデルマウスの LDC サブセットをそれぞれ単離・同定し、OVA で感作した肺の LDC サブセットと OVA 特異的に反応する T 細胞受容体を持った OT-II トランスジェニック・マウスのナイーブ T 細胞との ex vivo 共培養アッセイを用いて、Tfh 細胞誘導能を比較した。
- ② OVA 喘息マウスに加え、ダニ抗原 (HDM) 喘息マウスを作成し、アレルゲンの異なる両喘息モデルを用いて、肺組織と所属リンパ節に誘導される Tfh 細胞の動態と局在を解析した。併せて、特異的 IgE 抗体産生についても検討した。
- ③ 喘息マウスで誘導された Tfh 細胞と正常マウスのナイーブ B 細胞との ex vivo 共培養アッセイを用いて Tfh 細胞の機能 - 特異的 IgE 抗体誘導能、サイトカイン産生能を検討した。

4. 研究成果

- ① 正常マウスを用いて conventional DC1 (cDC1) と DC2 (cDC2) の 2 種類の LDC サブセットの単離・同定を行った (図 1)。OVA で感作した肺の LDC サブセットでは感作後 7 日目に cDC2 の割合が増加した (図 2)。この OVA で感作した後に採取した各 LDC サブセットと OT-II トランスジェニック・マウスから採取したナイーブ T 細胞との共培養を行ったところ、cDC1 と比較し、cDC2 との共培養において、より多くの Tfh 細胞が誘導された (図 3)。

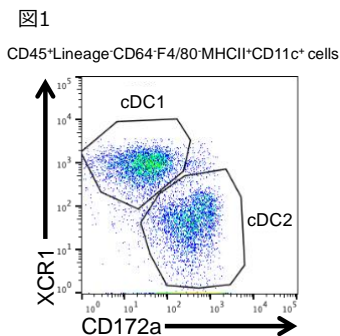


図2. 肺樹状細胞の経時的変化

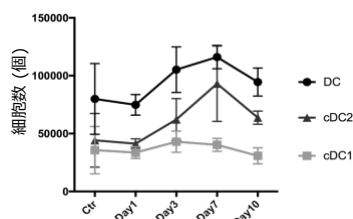


図3

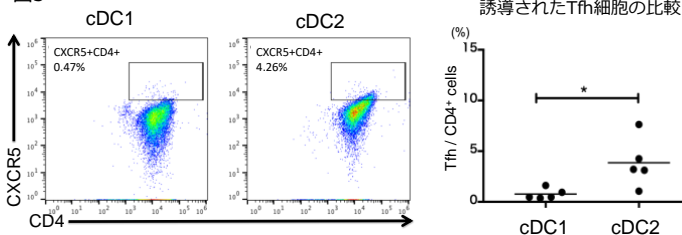
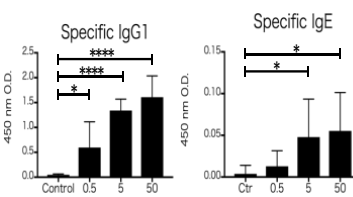


図4. HDM喘息モデルの特異的抗体産生



- ② OVA、HDM 喘息マウス共に、脾臓、所属リンパ節における Tfh 細胞の増加を認めたが、肺組織では増加を認めなかった。特に所属リンパ節では正常マウスと比較し、より多くの Tfh 細胞の増加を認めた。また同マウスの特異的 IgG1 及び IgE 抗体産生も確認した (図 4)。
- ③ OVA、HDM 喘息マウスで誘導された Tfh 細胞をそれぞれ単離し、正常マウスのナイーブ B 細胞と共培養し、Tfh 細胞から産生されたサイトカイン、誘導された特異的抗体の測定解析を現在行っている。さらに各 LDC サブセットの機能解析も同時に進行中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

Niwa M, Fujisawa T, Mori K, Yamanaka K, Yasui H, Suzuki Y, Karayama M, Hozumi H, Furuhashi K, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Suzuki T, Maekawa M, Suda T. IL-17A Attenuates IFN- λ Expression by Inducing Suppressor of Cytokine Signaling Expression in Airway Epithelium. J Immunol. 201: 2392-2402, 2018

Niwa M, Fujisawa T, Karayama M, Furuhashi K, Mori K, Hashimoto D, Yasui H, Suzuki Y, Hozumi H, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Suda T. Differences in airway structural changes assessed by 3-dimensional computed tomography in asthma and asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap. Ann Allergy Asthma Immunol. 121: 707-710, 2018

Karayama M, Inui N, Mori K, Kono M, Hozumi H, Suzuki Y, Furuhashi K, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Watanabe H, Suda T. Respiratory impedance is correlated with airway narrowing in asthma using three-dimensional computed tomography. Clin Exp Allergy. 48: 278-287, 2018

Lee DCP, Tay NQ, Thian M, Prabhu N, Furuhashi K, Kemeny DM. Prior exposure to inhaled allergen enhances anti-viral immunity and T cell priming by dendritic cells. *Plos One*. 13: e0190063, 2018

Yamanaka K, Fujisawa T, Kusagaya H, Mori K, Niwa M, Furuhashi K, Kono M, Hamada E, Suda T, Maekawa M. IL-13 regulates IL-17C expression by suppressing NF- κ B-mediated transcriptional activation in airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 495: 1534-1540, 2018

Suzuki Y, Oyama Y, Hozumi H, Imokawa S, Toyoshima M, Yokomura K, Nakamura H, Kuroishi S, Karayama M, Furuhashi K, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Koshimizu N, Yamada T, Mori K, Masuda M, Shirai T, Hayakawa H, Sumikawa M, Johkoh T, Suda T: Persistent impairment on spirometry in chronic eosinophilic pneumonia: a longitudinal observation study (Shizuoka-CEP study). *Ann Allergy Asthma Immunol*. 119: 422-428, 2017

Nishimoto K, Karayama M, Inui N, Mori K, Kono M, Hozumi H, Suzuki Y, Furuhashi K, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Watanabe H, Suda T: Relationship between fraction of exhaled nitric oxide and airway morphology assessed by three-dimensional CT analysis in asthma. *Sci Rep*. 7: 10187, 2017

Hozumi H, Fujisawa T, Enomoto N, Nakashima R, Enomoto Y, Suzuki Y, Kono M, Karayama M, Furuhashi K, Murakami A, Inui N, Nakamura Y, Mimori T, Suda T: Clinical Utility of YKL-40 in Polymyositis/dermatomyositis-associated Interstitial Lung Disease. *J Rheumatol*. 44: 1394-1401, 2017

Wong KH, Zhou Q, Prabhu N, Furuhashi K, Chua YL, Grotenbreg GM, Kemeny DM: Blomia tropicalis allergen 5 (Blo t 5) T-cell epitopes and their ability to suppress the allergic immune response. *Immunology*. 152: 344-355, 2017

Furuhashi K, Chua YL, Wong KH, Zhou Q, Lee DC, Liong KH, Teo GH, Hutchinson PE, Kemeny DM: Priming with high and low respiratory allergen dose induces differential CD4+Th2 cells and IgE/IgG1 antibody response in mice. *Immunology*. 151:227-238, 2017

Karayama M, Inui N, Mori K, Kono M, Hozumi H, Suzuki Y, Furuhashi K, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Watanabe H, Suda T: Respiratory impedance is correlated with morphological changes in the lungs on three-dimensional CT in patients with COPD. *Sci Rep*. 7: 41709, 2017

Enomoto Y, Suzuki Y, Hozumi H, Mori K, Kono M, Karayama M, Furuhashi K, Fujisawa T, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Suzuki D, Ogawa N, Nakashima R, Mimori T, Iwashita T, Suda T: Clinical significance of soluble CD163 in polymyositis-related or dermatomyositis-related interstitial lung disease. *Arthritis Res Ther*. 19: 9, 2017

Suzuki Y, Enomoto Y, Yokomura K, Hozumi H, Kono M, Karayama M, Furuhashi K, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Suda T: Soluble hemoglobin scavenger receptor CD163 (sCD163) predicts mortality of community-acquired pneumonia. *J Infect*. 73: 375-377, 2016

〔学会発表〕（計 2 件）

Furuhashi K, Fujisawa T, Hashimoto D, Kamiya Y, Niwa M, Karayama M, Kono M, Suzuki Y, Hozumi H, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Suda T: Comparison of the clinical effects between once-daily fluticasone furoate/vilanterole combination and twice-daily budesonide/formoterol combinations in stable asthma. American Thoracic Society International Conference. 2017.5. (Washington, DC)

Furuhashi K, Sakurai S, Kamiya Y, Yasui H, Karayama M, Suzuki Y, Hozumi H, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Suda T: Prognostic factors in patients with chronic pulmonary aspergillosis. American Thoracic Society International Conference. 2018.5. (San Diego)

〔図書〕（計 0 件）

〔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：鈴木勇三

ローマ字氏名：Suzuki Yuzo

所属研究機関名：浜松医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：00758435

研究分担者氏名：須田隆文

ローマ字氏名：Suda Takafumi

所属研究機関名：浜松医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：30291397

研究分担者氏名：榎本紀之

ローマ字氏名：Enomoto Noriyuki

所属研究機関名：浜松医科大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：50436961

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：櫻井章吾

ローマ字氏名：Sakurai Shogo

研究協力者氏名：David Michael Kemeny

ローマ字氏名 : David Michael Kemeny

※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。