

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07071

研究課題名(和文)濾胞性ヘルパーT細胞の分化における生理的低酸素の役割

研究課題名(英文)Role of physiological hypoxia in follicular helper T cell differentiation

研究代表者

岩田 誠 (IWATA, Makoto)

早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・客員上級研究員(研究院客員教授)

研究者番号：50160122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：濾胞性ヘルパーT (Tfh)細胞は抗体産生の誘導制御に必須の役割を果たす。我々はTfh細胞の分化誘導機序解明を目指し、in vitroで他の細胞種の寄与なしにその分化を再現するモデル実験系を構築した。その過程で、Tfh細胞のマスター転写因子Bcl6とともに、炎症に関与するTh17細胞のマスター転写因子ROR γ tの発現誘導を観察した。しかし、T細胞受容体刺激の持続時間を制限し、芳香族炭化水素受容体の活性を抑制することにより、ROR γ t発現のみを抑制し、Tfh細胞に重要なケモカイン受容体CXCR5の発現促進に成功した。この実験系を用いて、Tfh細胞分化に影響する複数の因子を見出すことにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

濾胞性ヘルパーT (Tfh)細胞は抗体産生の誘導と制御に必須の役割を果たしており、その分化の乱れは、感染症、アレルギー、自己免疫、発がんなどのリスクを増大させる。そして、本研究開始後ほどなくして広がったSARS-CoV-2感染によるCOVID-19の重症化にもTfh細胞の分化異常が関与していることが明らかとなった。これらの問題を解決するためには、in vitroでTfh細胞を分化誘導できるモデル実験系が必要だったが、満足できる実験系は存在しなかった。本研究で構築したモデル実験系は、Tfh細胞分化の分子機序の解明に留まらず、その分化を左右する要因のスクリーニングにも有力な基盤を提供する。

研究成果の概要(英文)：Follicular helper T (Tfh) cells are crucial for humoral immunity. To elucidate the molecular mechanisms underlying their differentiation, an in vitro mouse model of the differentiation has been required. We found that stimulating naive CD4+ T cells with antibodies to CD3 and costimulatory molecules in the presence of IL-6, TGF- β , and antibodies that block IL-2 signaling induced the expression of Bcl6 and Ror γ t, master regulator genes of Tfh and Th17 cells, respectively. An additional culture without immobilized antibodies upregulated Bcl6 expression but downregulated Ror γ t expression. Adding an aryl hydrocarbon receptor (AhR) antagonist upregulated expression of a key Tfh marker, CXCR5, and further downregulated Ror γ t expression. These findings suggest that AhR activity and the duration of T cell receptor stimulation regulate the balance between Tfh and Th17 cell differentiation. This in vitro system will be useful for elucidating the mechanisms of Tfh cell differentiation.

研究分野：免疫学

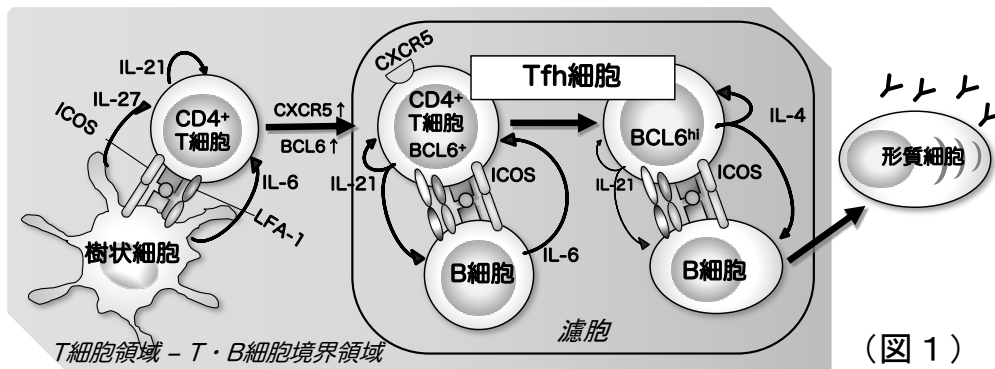
キーワード：濾胞性ヘルパーT細胞 サイトカイン インテグリン Th17 アリルハイドロカーボン受容体

1. 研究開始当初の背景

ナイーブ CD4⁺ T 細胞はリンパ系組織で主に樹状細胞による抗原提示を受けて活性化し、種々のヘルパーT 細胞に分化する。ヘルパーT 細胞は、タイプ毎に異なる性質・機能を持ち、それぞれ免疫反応の司令塔として重要な役割を果たす。抗体産生を統御する司令塔は、長年、2 型ヘルパーT (Th2) 細胞だと考えられてきた。しかし、近年、その役割が主に濾胞性ヘルパーT (follicular helper T; Tfh) 細胞に担われていることが明らかになった。Tfh 細胞は、リンパ系組織の B 細胞領域である濾胞に存在し、B 細胞の抗体産生細胞 (形質細胞) への分化成熟、抗体親和性成熟 (抗原に対してより高親和性の抗体の産生)、抗体クラススイッチなどをコントロールする。そして、その乱れは感染症に対する抵抗性の減弱を招くばかりでなく、アレルギー、自己免疫疾患、さらには発がんの可能性を高める。そして、本研究の開始後間もなく広がった SARS-CoV-2 感染による COVID-19 の重症化にも Tfh 細胞分化の攪乱が関与していることが示された。

Tfh 細胞は、表面に PD-1 (programmed cell death protein 1, CD279)、ICOS (inducible T-cell co-stimulator, CD278) などの共刺激受容体と濾胞への移入に必要なケモカイン受容体 CXCR5 (C-X-C chemokine receptor type 5, CD185) を発現し、IL-21 を産生する。さらに分化の進展に伴い IL-4 など産生すると考えられていた。

ナイーブ CD4⁺ T 細胞から Tfh 細胞への分化誘導には、まず濾胞外の樹状細胞、ついで濾胞内の B 細胞による抗原提示による T 細胞受容体 (TCR) 刺激および ICOS からの共刺激が必須であり、LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1, αL82, CD11a/CD18)、CD40L (CD40 ligand, CD154) などからの共刺激の関与も示唆されている (図 1)。サイトカインとしては IL-6 (ヒトでは IL-12) をはじめとして、IL-21、IL-27 などが関与する。また、分化マスター遺伝子として転写因子をコードする *Bcl6* が知られている。しかし、Tfh 細胞分化の分子機序には未だに不明の点が多く、特にマウスにおけるナイーブ CD4⁺ T 細胞から Tfh 細胞への分化を忠実に再現する *in vitro* 実験系の確立に至っていない。マウスを用いる場合、遺伝学および栄養学的な背景などを均一にした条件下で解析することが可能であり、ヒトでの Tfh 細胞分化の理解を進める上でも重要である。In vitro での Tfh 細胞分化誘導系が確立されていない背景には、*in vivo* Tfh 細胞分化を支える重要な要因が見落とされている可能性があった。逆に、一定レベルの精度で *in vitro* Tfh 細胞分化誘導系を構築できれば、それを用いて容易にさらに多くの関与因子や条件をスクリーニングすることができ、それによって *in vitro* 分化誘導系の精度をさらに高めることができる可能性がある。それに基づき、*in vivo* へのフィードバックも可能となると考えられた。当初、我々はリンパ系組織の酸素濃度が生理的に低いことにまず注目した。B 細胞では、リンパ系組織の濾胞中心 (germinal center; GC) の低酸素微小環境が、抗体クラススイッチと形質細胞への分化に寄与することが示唆されていた (J Immunol 197:4014, 2016)。これらの反応を制御する Tfh 細胞の分化・機能発現にも、低酸素が生理的役割を果たす可能性が考えられた。



2. 研究の目的

マウスナイーブ CD4⁺ T 細胞から、他の細胞種の非存在下で Tfh 細胞への分化を誘導する *in vitro* 実験系を構築することにより、Tfh 細胞の分化誘導および機能発現の分子機序の解明とそれに関わる生理的因子の同定のための基盤、さらにはその分化の乱れに起因する疾患治療に向けた創薬のための基盤を形成することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 正常 C57BL/6 マウスの脾臓または腸間膜リンパ節からナイーブ CD4⁺ T 細胞を精製する。この細胞に、これまでに報告されている種々の Tfh 細胞分化誘導要因、例えば、TCR シグナル、ICOS、LFA-1、CD40L などからの補助シグナル、IL-6、IL-21 などのサイトカインによるシグナルを、様々な組合せ、様々なタイミングで加えて、まずは Tfh 細胞のマスター制御因子 *Bcl6* 発現の誘導を試みる。

(2) さらに Tfh 細胞の表面マーカー分子である PD-1、ICOS、CXCR5 などの発現を誘導する条件についても探索する。

(3) ある程度の分化誘導に成功したら、その分化誘導系を用いて、Tfh 細胞分化を促進または抑制する生理的または薬理的因子をスクリーニングするとともに、結果をフィードバックして、これらの因子を Tfh 細胞分化誘導系に組み込み、そのモデル実験系としての精度向上を図る。

4. 研究成果

(1) 抗 CD3 抗体とともに ICOS、LFA-1 などに対する抗体を固相化し、ナイーブ CD4⁺ T 細胞を刺激、培養する際、IL-6 添加とともに IL-2 シグナルをブロックする抗体を添加しておくこと、Tfh 細胞のマスター遺伝子 *Bcl6* の発現が促進され、Tfh 細胞のマーカー分子 PD-1 と ICOS の発現も誘導された。しかし、Th17 細胞のマスター遺伝子である *Rorc*(yt) の発現も同時に促進された。また、Tfh 細胞にとって重要な表面分子である CXCR5 発現はこの時点では低かった。

(2) 上記の条件で一定時間刺激した後、固相化抗体からの刺激なしでさらに培養すると、*Bcl6* 発現は上昇するのに対し、*Rorc*(yt) 発現は低下することを見出した。しかし、*Cxcr5* および CXCR5 発現については、やはり上昇が見られなかった。

(3) サイトカイン TGF- β と IL-6 の組合せは、Th17 細胞分化を誘導することが知られている。一方、TGF- β はヒト Tfh 細胞の分化誘導には関与することが知られているが、マウス Tfh 細胞分化における役割は不明瞭だった。我々は、上記(2)の実験系に TGF- β を添加した場合、*Bcl6*、*Rorc*(yt)、および *Cxcr5* の発現が促進され、培養後の細胞数も上昇することを見出した。IL-21 産生も観察した。Flow cytometry (FCM) による解析では、ほとんどの培養細胞が *Bcl6* を発現していた。しかし、約半数の細胞が RORyt も同時に発現していた。そこで、さらに RORyt 発現を低下させる条件を探索した。

(4) In vitro で T 細胞を活性化すると、一過性に aryl hydrocarbon receptor (AhR) の活性化が起こること、そして、AhR 活性化は Th17 細胞分化を促進することが知られている。そこで、我々は、それまで用いていた培地 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) を、AhR リガンドへと変換しうるトリプトファンなど芳香族アミノ酸の含量のより少ない RPMI 1640 培地に変更して、上記(3)の条件で培養してみた。その結果、*Rorc*(yt) および RORyt 発現が低下し、*Bcl6* 発現にはほとんど影響がないことが判明した。そればかりでなく、予想外に *Cxcr5* および CXCR5 発現が上昇することを見出した。

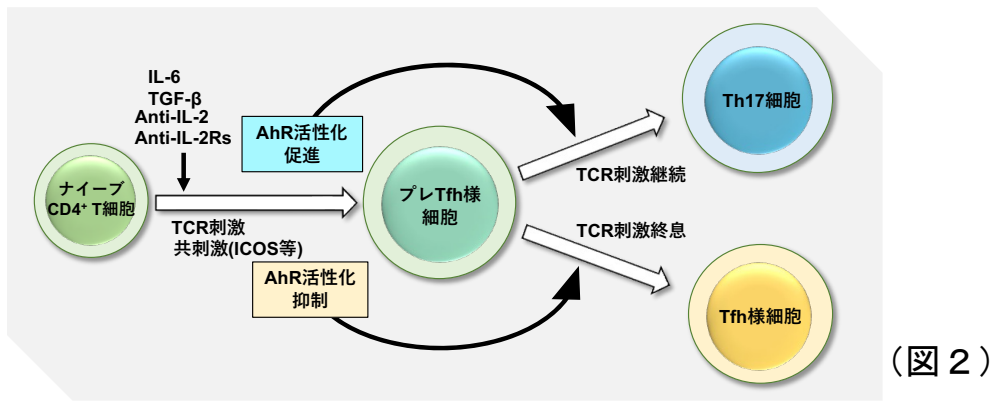
(5) AhR 活性をさらに抑制するため、AhR アンタゴニストを添加したところ、*Rorc*(yt) および RORyt 発現がさらに低下し、*Cxcr5* および CXCR5 発現はさらに上昇した。得られた Tfh 様細胞は、CXCR5 のリガンド CXCL13 に対してケモタクシスを起こす能力を有しており、機能的な CXCR5 を発現していることが判明した。これらの細胞は、in vivo で誘導された Tfh 細胞と似たマーカー分子発現をしていた。

(6) AhR 活性は低酸素によって抑制されることが知られている。実際、我々は本研究で構築した Tfh 様細胞の in vitro 分化誘導系を低酸素下で行うことによっても CXCR5 発現が上昇することを見出した。

(7) 本研究で構築した in vitro Tfh 細胞分化誘導モデル実験系を用いて、その分化誘導を促進または抑制する少数の生物学的因子を見出すことにも成功し、このモデル実験系の有用性を確認した。

以上より、マウスナイーブ CD4⁺ T 細胞から、他の細胞種の非存在下、in vitro で Tfh 様細胞を分化誘導することができた。この実験系構築の過程で、TCR 刺激の一定期間持続とその終息、そして、TCR 刺激による活性化に伴う AhR シグナルレベルが Th17 細胞と Tfh 様細胞分化のバランスに重要であることを見出した。(図2)

また、近年、末梢血に Tfh 細胞に類似の末梢循環型 Tfh (cTfh) 細胞が存在し、Th 細胞サブセットに対応するサイトカインを産生する cTfh1、cTfh2、cTfh17 細胞など分類しうることが報告された。同様に、Tfh 細胞自体にも Tfh1、Tfh2、Tfh17 細胞などのサブセットが存在することが示唆され、本研究で見出された *Bcl6* と RORyt を同時に発現する Tfh 様細胞も Tfh17 細胞に似た細胞である可能性も考えられる。これらの Tfh 細胞サブセットの分化誘導機序には不明な点が多く、その解明にも本研究で得られたモデル実験系が役立つ可能性がある。



(図2)

ただし、現在、原著論文としてリバイス中のもの、投稿準備中のものなど複数あり、本報告書では詳細データを割愛している。その知見については、できるだけ早い時期に公開すべく準備している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩田 誠
2. 発表標題 免疫におけるレチノイドの役割
3. 学会等名 レチノイド研究会 第30回記念学術集会 特別講演会「レチノイド研究：平成から令和へ」（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 日本ビタミン学会（岩田 分担執筆）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 672
3. 書名 ビタミン・バイオフィクター総合事典	

1. 著者名 日本食品免疫学会（岩田 分担執筆）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 492
3. 書名 食品免疫学事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>免疫細胞の機能分化の制御メカニズム http://www.f.waseda.jp/eito/main-ja/about09.html</p> <p>Regulatory mechanism of Functional differentiation of immune cells http://www.f.waseda.jp/eito/main-en/about09-en.html</p>
--

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
研究分担者	伊藤 悦朗 (ITO Etsuro) (80203131)	早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授 (32689)	タンパク質等の微量解析

	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
研究協力者	坂本 玲 (SAKAMOTO Rei)		
研究協力者	高田 有由美 (TAKADA Ayumi)		
研究協力者	山角 薪之介 (YAMAKADO Shinnosuke)		
研究協力者	柘植 春希 (TSUGE Haruki)		

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
---------	---------