

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22790479

研究課題名(和文) 胚中心B細胞の維持における濾胞性BヘルパーT細胞の機能解析

研究課題名(英文) Analysis for the role of follicular B helper T cells in the maintenance of germinal center B cells

研究代表者

鈴木 敬一郎 (Suzuki, Keiichiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90391995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：大部分の腸管IgA<sup>+</sup>B細胞はパイエル板の胚中心で濾胞性BヘルパーT細胞(TFH細胞)の働きにより誘導される。TFH細胞の表面に高発現する抑制性分子PD-1が欠損すると性質の異なるTFH細胞(IFN- $\gamma$ の過剰産生とIL-21の産生減弱)が過剰増殖し、胚中心B細胞のレパトア形成に異常が認められた。この結果、PD-1欠損マウスでは親和性成熟の不完全なIgA陽性細胞が誘導され、IgA抗体の腸内細菌への結合減弱、腸内細菌構成の異常とそれに伴う全身免疫系の異常な活性化を認めた。以上より、パイエル板の胚中心B細胞の維持と全身の免疫恒常性の維持においてTFH細胞が重要な役割を果たす事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Majority of IgA<sup>+</sup>B cells are induced in germinal centers (GCs) of Peyer's patches (PPs) depend on the function of follicular B helper T cells (TFH cells). TFH cells express high amount of the inhibitory receptor PD-1. The absence of PD-1 led to the expansion of PP TFH cells with different properties (over production of IFN- $\gamma$  and less production of IL-21) that caused disturbed repertoire of GC B cells. Thus, PD-1<sup>-/-</sup> mice had reduced affinity maturation of IgA producing plasma cells, and less binding capacity of secreted IgA on the surface of commensal bacteria in the gut, which led to the disturbed gut microbial communities in PD-1<sup>-/-</sup> mice. The dysbiosis induced over-activation of the systemic immune system with lymphocyte hyperplasia. Thus, TFH cells play critical roles to sustain GC B cells in PPs and to maintain the homeostasis of the immune system in our whole body.

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：6913

キーワード：濾胞性BヘルパーT細胞 IgA パイエル板

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) リンパ濾胞の胚中心は高親和性の抗体を産生する B 細胞の誘導に必須の構造である。濾胞性 B ヘルパー T 細胞 ( $T_{FH}$  細胞) が胚中心の形成誘導に重要な役割を果たしている事が知られていたが、 $T_{FH}$  細胞が B 細胞の維持に対してどのような役割を果たしているのかは不明であった。
- (2) 我々の研究により、主要な腸管免疫組織である小腸パイエル板の胚中心では、 $T_{FH}$  細胞が  $Foxp3^+T$  細胞から分化して腸管 IgA 産生に重要な役割を果たしている事が明らかとなった。 $T_{FH}$  細胞がどのように B 細胞の機能と腸管における IgA 産生に影響を及ぼすのか、また、この効果がどのように生体恒常性の維持に寄与するのかについては未解明であった。

## 2. 研究の目的

抗原に対して高い親和性を持つ抗体は、病原菌などから生体を防御する為に重大な役割を果たしている。高親和性抗体を産生する B 細胞は、胚中心内で  $T_{FH}$  細胞や濾胞樹状細胞 (FDC) との細胞間相互作用によって誘導される。胚中心自体は T 細胞非依存的にも誘導されるが、このような胚中心は高親和性抗体を産生する B 細胞が選択される時期に急速に消失する事から、 $T_{FH}$  細胞が胚中心 B 細胞の維持と高親和性抗体の産生に重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。 $T_{FH}$  細胞が胚中心 B 細胞の維持にどのように関わるのかを明らかにする事は、高親和性抗体の産生機序とそれによる生体防御機構に関する理解を得る為の重要な項目である。

高親和性抗体は病原菌に対して防御的に働くだけでなく、常在菌に対する生体反応の調節にも重要な役割を果たしている。腸管には体細胞の 10 倍を上回る膨大な数の常在菌が生理的に存在し、粘膜上に分泌される IgA 抗体の働きによって恒常性が維持されている。腸管における IgA 産生 B 細胞の大部分は小腸パイエル板の胚中心で誘導されるが、興味深い事にパイエル板の  $T_{FH}$  細胞は脾臓などの全身免疫組織の  $T_{FH}$  細胞とは異なり、 $Foxp3^+T$  細胞から分化転換する。腸管免疫反応の特殊性に関しては、パイエル板の胚中心で主に IgA<sup>+</sup>B 細胞が誘導され、全身免疫組織の胚中心では主に IgG<sup>+</sup>B 細胞が誘導されるという事によっても示されている。しかし、なぜ腸管で全身免疫組織とは異なる反応が生じるのかについては未だ十分な理解が得られていない。また、パイエル板の胚中心において誘導された高親和性抗体が腸管の恒常性維持にどのような役割を負っているのかについても不明である。腸管でどのように IgA 抗体が誘導され、その抗原親和性が腸内常在菌に対してどのような効果を及ぼすのかについて理解を得る事は、炎症性腸疾患や

自己免疫疾患などを制御する新たな方法を開発する為の重要な土台となる事が期待される。

## 3. 研究の方法

- (1)  $T_{FH}$  細胞の生体内での働きを観察する目的で、 $T_{FH}$  細胞に高発現する抑制性分子の PD-1 (programmed cell death-1) に注目した。PD-1 欠損マウスのリンパ組織中の免疫細胞を採取してフローサイトメーター (FACS) を用いた細胞構成の解析や、免疫染色を用いた組織構造の観察などを行った。また、腸管 IgA の機能を明らかにする目的で、糞便中の常在細菌構成の解析を培養法や次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA の塩基配列同定法により行った。
- (2) 胚中心 B 細胞の挙動を観察する目的で、胚中心 B 細胞に発現する activation-induced cytidine deaminase (AID) のレポーターマウスを作製した。ここでは、AID 遺伝子の exon に cre-IRES-human CD2 (hCD2) コンストラクトを導入した AID-Cre-hCD2 BAC transgenic (Tg) マウスと、cre を発現した細胞でストップ配列が削除され、赤色蛍光蛋白 (RFP) を発現するようになる RFP reporter マウスを交配させて AID-RFP マウスを作製した。
- (3) 胚中心内で T/B 細胞と相互作用して重要な働きを持つとされる FDC の影響を観察する目的で、FDC の単離方法を確立した。まず、マウス個体に致死量の放射線照射を行い大部分のリンパ球を除去した後にリンパ組織を摘出して、コラゲナーゼなどの酵素処理により単細胞浮遊液を得た。次に、FDC 特異的に発現する FDCM1 などのマーカーを用いて磁気ビーズと高速フローサイトメーターの両方を用いて FDC の単離を行った。

## 4. 研究成果

- (1)  $T_{FH}$  細胞には抑制性分子である PD-1 が高発現する。小腸パイエル板の  $T_{FH}$  細胞を観察した所、PD-1 欠損マウスでは正常マウスと比較して  $T_{FH}$  細胞の数が有意に増加している事が明らかとなった。しかし、 $T_{FH}$  細胞の機能として重要なサイトカインである IL-21 の産生は PD-1 欠損マウスで低下していた。さらに、炎症性サイトカインである IFN $\gamma$  の産生が PD-1 欠損マウスの  $T_{FH}$  細胞で増加していた。以上より、 $T_{FH}$  細胞上の PD-1 は  $T_{FH}$  細胞の機能を保つ為に重要な役割を果たしている事が示唆された。次に、 $T_{FH}$  細胞の働きによりパイエル板の胚中心で誘導された IgA 抗体の機能について調べ

る為に、腸内細菌の構成を解析した。PD-1 欠損マウスでは、正常マウスと比較して Bacteroidaceae や Bifidobacterium などが減少し Enterobacteriaceae が増加する腸内細菌異常(dysbiosis)が観察された。これにより PD-1 欠損マウスでは IgA 抗体に異常が存在する事が示唆された。そこで、腸管 IgA 産生細胞の免疫グロブリン(Ig)遺伝子について解析を行うと、PD-1 欠損マウスの腸管 IgA 産生細胞では V-D-J のレパトア構成に異常が認められる事が明らかとなった。この異常が T<sub>FH</sub> 細胞による胚中心 B 細胞の維持の異常に由来するのかを調べる目的で、B 細胞の生存期間について解析を行った。BrdU は細胞の分裂期に取り込まれて DNA と結合するので、BrdU 陽性細胞の割合を追跡する事によって細胞の生存期間を知る事ができる。PD-1 欠損マウスと正常マウスに BrdU を投与して、BrdU 陽性細胞の追跡を行った所、PD-1 欠損マウスではパイエル板の胚中心 B 細胞と小腸粘膜固有層中の形質芽細胞の生存期間が有意に短縮している事が明らかとなった。しかし、PD-1 欠損マウスのパイエル板胚中心 B 細胞の数は T<sub>FH</sub> 細胞と同様にむしろ増加しており、PD-1 欠損マウスのパイエル板では胚中心 B 細胞の動態が過剰に促進されている可能性が考えられた。PD-1 欠損マウスにおける T/B 細胞の増加は抗生物質の投与によって解消されたので、不完全な IgA 抗体によって生じる異常な腸内細菌から受ける過剰刺激がその原因であると考えられた。次に、T<sub>FH</sub> 細胞の異常が PD-1 欠損マウスの腸管における異常の原因であるのかについて直接調べる目的で、PD-1 欠損マウスのパイエル板の T<sub>FH</sub> 細胞を全ての T 細胞を欠損する CD3e<sup>-/-</sup>マウスに移入した。PD-1 欠損マウスの T<sub>FH</sub> 細胞を移入したマウスでは、パイエル板の胚中心 B 細胞の過剰な活性化と、腸管粘膜固有層の IgA 産生形質細胞の著しい減少が認められた。以上より、T<sub>FH</sub> 細胞は PD-1 の働きを介してパイエル板の胚中心 B 細胞の維持と選択に重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

- (2) AID-RFP マウスの詳細な解析を行った所、AID を発現する CD4<sup>+</sup>T 細胞(exAID CD4<sup>+</sup>T 細胞)の存在が偶然に明らかとなった。exAID CD4<sup>+</sup>T 細胞はメモリータイプの表面形質を持ち、末梢リンパ組織に存在するが胸腺中には存在しなかった。また、exAID CD4<sup>+</sup>T 細胞は加齢と共に増加し、全体の CD4<sup>+</sup>細胞の中で 25%程度を占めるにまで至った。B 細胞欠損マウス( $\mu$ MT マウス)においても正常マウスと同程度の exAID CD4<sup>+</sup>T 細胞が存在する事から、T<sub>FH</sub> 細胞とは異なり、胚中心の

形成とは無関係に誘導される T 細胞であると考えられた。exAID CD4<sup>+</sup>T 細胞の機能について手がかりを得る為に、免疫染色法を用いて小腸パイエル板における局在の検討を行った。RFP<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>の細胞はパイエル板で特定の局在を示さずに、胚中心、T-B 細胞境界領域、T 細胞領域の全てにおいて散在していた。次に、AID-RFP マウスの脾臓/末梢リンパ節から単離した RFP のナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞あるいはメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞を CD3 欠損マウスに移入する実験を行った。移入後に exAID CD4<sup>+</sup>T 細胞の誘導を観察した所、RFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>の細胞は、メモリー T 細胞を移入した場合に特に効率良く誘導される事が明らかとなった。また、腸間膜リンパ節と小腸の粘膜固有層で特に RFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞の割合が高く、腸管免疫組織における環境下で exAID CD4<sup>+</sup>T 細胞が誘導されるのではないかと考えられた。また、サイトカイン産生について検討した所、exAID CD4<sup>+</sup>T 細胞は IFN $\gamma$  と IL10 を産生する事が明らかとなった。以上より、これまでは B 細胞特異的に働くと考えられて来た AID が T 細胞でも何らかの重要な役割を果たしている事が示唆された。

- (3) 胚中心の間質細胞である FDC の機能について調べる目的で、正常マウスの様々な組織から FDC を単離して、遺伝子アレイを用いた包括的な遺伝子発現解析を行った。その結果、小腸パイエル板の FDC と末梢リンパ節の FDC では遺伝子発現プロファイルが大きく異なる事を見出した。遺伝子アレイのデータを詳しく解析した所、FDC は TLR とレチノイン酸レセプター(RAR)を共に強く発現している事が明らかになった。これは、腸内細菌やビタミン A 代謝物などの腸管内の外部環境を FDC が認識できるという事を示唆している。そこで、末梢リンパ節の FDC を単離/培養して、LPS やレチノイン酸などによる刺激を行った所、両者の刺激が同時に入った場合にパイエル板の FDC における遺伝子発現が効率良く再現される事が明らかとなった。パイエル板あるいは上記の刺激を受けた FDC では TGF $\beta$  や BAFF といった IgA 誘導に関するサイトカインが大量に分泌されている事が観察された。実際、FDC と B 細胞を共培養する実験では、パイエル板あるいは刺激後の FDC は効率良く IgA+B 細胞を誘導した。この事は、FDC が腸管 IgA の産生に重要な役割を果たしている事を示唆している。実際、Rag 欠損マウスに Lta 欠損マウスの骨髄を移植すると、FDC を欠損するマウスを作製できる事が知られているが、FDC を欠損したマウスでは、正常マウスと比較して腸管にお

ける IgA 陽性細胞数が有意に低下していた。以上の結果は、FDC が腸内細菌や食餌成分などの環境因子を認識する事によって IgA 陽性細胞の誘導に重要な役割を果たしている事を示している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Kawamoto S, Tran TH, Maruya M, Suzuki K, Doi Y, Tsutsui Y, Kato LM, Fagarasan S: The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science* **336**:485-489,2012
2. Qin H, Suzuki K, Nakata M, Chikuma S, Izumi N, Huong le T, Maruya M, Fagarasan S, Busslinger M, Honjo T, Nagaoka H: Activation-induced cytidine deaminase expression in CD4+ T cells is associated with a unique IL-10-producing subset that increases with age. *PloS one* **6**:e29141,2011
3. Maruya M, Suzuki K, Fujimoto H, Miyajima M, Kanagawa O, Wakayama T, Fagarasan S: Vitamin A-dependent transcriptional activation of the nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) is critical for the development and survival of B1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:722-727,2011
4. Suzuki K, Maruya M, Kawamoto S, Sitnik K, Kitamura H, Agace WW, Fagarasan S: The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* **33**:71-83,2010
5. Suzuki K, Kawamoto S, Maruya M, Fagarasan S: GALT: organization and dynamics leading to IgA synthesis. *Adv Immunol* **107**:153-185,2010
6. Suzuki K, Maruya M, Kawamoto S, Fagarasan S: Roles of B-1 and B-2 cells in innate and acquired IgA-mediated immunity. *Immunol Rev* **237**:180-190,2010

7. Fagarasan S, Kawamoto S, Kanagawa O, Suzuki K: Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu Rev Immunol* **28**:243-273,2010

8. Tran TH, Nakata M, Suzuki K, Begum NA, Shinkura R, Fagarasan S, Honjo T, Nagaoka H: B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress Aicda by overcoming the effects of silencers. *Nat Immunol* **11**:148-154,2010

[学会発表](計 4 件)

1. Keiichiro Suzuki: Sensing of gut environmental factors by follicular stromal cells in Peyer's patches. ISAPP workshop 2011.10.24. Berkeley, California
2. Keiichiro Suzuki: Gut IgA; Dynamic interactions between host and environmental factors. 4<sup>th</sup> HKU-Pasteur Immunology Course 2011.11.14. Hong Kong
3. 中島啓、松山めぐみ、鈴木敬一朗: Mechanism and function of non-specific binding of intestinal IgA to commensal microbiota. 日本免疫学会 2013.12.11.-12.13. 幕張メッセ
4. 鈴木敬一朗: 腸管 IgA の産生メカニズムとその機能. 獣医アトピー・アレルギー・免疫学会 2014.1.19. 国際ファシオンセンターKFC ホール

[図書](計 1 件)

1. 鈴木敬一朗, 丸谷美香子, 河本新平, シドニア ファガラサン IgA免疫応答における B-1/B-2細胞の役割. 臨床粘膜免疫学 シナジー 2010

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 敬一郎 (Suzuki, Keiichiro)  
京都大学医学研究科・次世代免疫制御を  
目指す創薬医学融合拠点(AK プロジェクト)・特  
定准教授

研究者番号：90391995

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：