

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590405

研究課題名(和文) ヒト抗体産生プログラムの解明と疾患制御への応用

研究課題名(英文) Analysis of antibody production program underlying immune-related disorders of human system

研究代表者

一宮 慎吾 (Ichimiya, Shingo)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：30305221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：濾胞ヘルパーT細胞(Tfh細胞)は高親和性抗体の産生に重要で、また可塑性を示す一方、ヒトTfh細胞の機能制御機構や疾患との関連については未だ不明な点が多い。本研究では臨床検体を用いてヒトTfh細胞の医学的意義や機能制御機構を探ることを目的とした。研究の結果、Tfh細胞は閉塞性睡眠時無呼吸症候群の原因である肥大扁桃に多く含まれ、またアレルギー性鼻炎や気管支喘息患者の末梢血液中のTfh細胞サブセットの構成比が健常人と比較して異なっていた。不均衡な分化を示すTfhシフトあるいはTfh2シフトに、ALOX5関連脂質メディエーターやPOU2AF1転写制御因子が関係している可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：Follicular helper T (Tfh) cells play a cardinal role in the production of high-affinity antibodies and their plasticity enables to become other effector helper T cells; however, regulatory mechanism of human Tfh cells is not fully elucidated. In this study we aimed to understand biomedical features of human Tfh cells. Results demonstrated that hypertrophic tonsils of the patients with obstructive sleep apnea syndrome preferentially possessed Tfh cells within enlarged lymphoid follicles. When examined blood Tfh cells of patients with immune-related disorders including allergic rhinitis or asthma, Tfh2 cells were predominantly observed. Thus far unusual manner of Tfh cell differentiation (named Tfh-shift or Tfh2-shift in this study) would be attributable for underlying conditions of such disorders. Further studies should be required, although ALOX5-related lipid mediators and/or POU2AF1 might be involved in the skewed differentiation of human Tfh cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：濾胞ヘルパーT細胞 免疫アレルギー疾患 感染症 ワクチン開発 POU2AF1 免疫組織 睡眠時無呼吸症候群

1. 研究開始当初の背景

抗原特異的な免疫応答は生体防御の基盤をなし、その異常は様々な疾患病態の形成に関係する。高親和性抗体の産生にはB細胞と濾胞ヘルパーT細胞(Tfh細胞)との協調が必要である一方で、ヘルパーT細胞の発達から末梢組織での分化プロセスについては未だ不明な点が多く残されている。免疫病理の理解を深めるために、ヒトTfh細胞の機能分化メカニズムの全容解明が待たれており、こうした観点から我々は、臨床材料を用いた中枢性ならびに末梢性免疫組織の基礎研究を現在まで続けてきた。

ナイーブヘルパーT細胞は胸腺で発達し選択され、末梢組織へと移行して局所の免疫制御にあたる。末梢組織ではナイーブヘルパーT細胞は抗原提示細胞やサイトカイン環境による排他的な分化プロセスを経て、種々のエフェクターヘルパーT細胞として機能を発揮する。Tfh細胞はエフェクターヘルパーT細胞として抗原特異的抗体の産生に与り、我々はアラキドン酸5-リポキシゲナーゼ(ALOX5)が関連する脂質メディエーターがTfh細胞の機能を調節していることを初めて明らかにした(Am J Pathol, 2011)。またTfh細胞は末梢血液の中ではCXCR3とCCR6の発現多寡によってTfh1細胞、Tfh2細胞、Tfh17細胞に分類されることから、こうしたTfh細胞サブpopulationの機能的、臨床的意義に興味を持たれる。

2. 研究の目的

我々の研究成果に基づき、本研究では臨床検体を用いてTfh細胞と免疫病態との関係性を明らかにし、またヒトTfh細胞の新たな表現型や機能制御機構について検討を重ねることを目的とする。具体的には、本学の臨床各科の協力を得て免疫関連疾患の血液中のTfh細胞サブセットを解析し、臨床的意義を探る。扁桃をヒト末梢免疫組織のモデルとしてTfh細胞の研究を行うことで、炎症反応の遷延化や免疫病態のメカニズムの解明に役立つ可能性があり、感染症、自己免疫疾患やアレルギーに関わる病態の理解に加えて、診断や治療、予防法に向けた全く新しい展開が期待される。

3. 研究の方法

(1) ヒト免疫組織や免疫細胞を用いた解析

臨床血液検体の血球成分については赤血球を除いた後にFACS解析を行い、細胞成分の一部と血清は凍結保存した。扁桃や胸腺などの手術組織からリンパ球を抽出し、各サブpopulationをFACS ARIA-II セルソーターを用いて分離し研究に用いた。定量PCRなどの遺伝子解析に加え、ELISAやウエスタンブロットなどの蛋白質解析を行った。Tfh細胞とB細胞との共培養の際は、SEBを添加した。ヒト試料を用いる場合は十分な説明による同意のもと、本学倫理審査委員会に従い

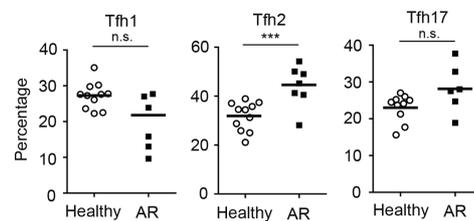
研究を行った。

(2) 遺伝子改変マウスを用いた解析

Alox5 遺伝子欠損マウス、Alox5 遺伝子欠損OT-IIマウス、Pou2af1 遺伝子欠損マウス、Pou2af1 遺伝子欠損 OT-II マウスを用いた。Tfh細胞の応答を観察する場合は、外来抗原としてヒツジ赤血球やOVAを用い、特異的抗体産生能はELISAにて評価した。免疫組織化学解析やFACS解析、またリンパ球をセルソーターを使って単離して機能解析を行った。

4. 研究成果

主として耳鼻咽喉科領域の疾患に注目しTfh細胞の機能的役割を検討したところ、興味深い結果が得られた。すなわち閉塞性睡眠時無呼吸症候群(OSAS)の背景にある著明に肥大した扁桃組織にはTfh細胞の優位な増加があり、構成する免疫細胞集団に特異性が認められた。さらにアレルギー性鼻炎患者の末梢血液を解析すると、Tfh細胞サブセット(Tfh1細胞、Tfh2細胞、Tfh17細胞)の構成比が健常人と比較して明らかに異なっており、Tfh2細胞が有意に増加していた。このように不均衡な分化を示すTfhシフトあるいはTfh2シフトを特徴としていた。気管支喘息患者でもほぼ同様の結果が得られた。



AR: Allergic rhinitis
n.s. not significant
*** P = 0.0002

それではヒトTfh細胞の機能制御機構はどのようなものであるか。以前に我々はアラキドン酸代謝酵素である5-リポキシゲナーゼ(ALOX5)がTfh細胞の機能分化に関与することを見出し、Tfh細胞の機能を制御する脂質メディエーターの新たな役割を示した。本研究では、ナイーブヘルパーT細胞からTfh細胞へ分化させるin vitroモデルにおいて、15-epi-lipoxin A4がTfh細胞への分化誘導に有利に働いていることが見出された。また胸腺ナイーブヘルパーT細胞と扁桃Tfh細胞とのトランスクリプトーム解析から、Tfh細胞にはPOU2AF1(BOB1、OBF1)転写制御因子が高発現していることが明らかとなった。Pou2af1 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較して、Tfh細胞の組織分布様式が異なっているため、POU2AF1はTfh細胞の分布や機能維持に関与している可能性が示唆された。その理由として、Pou2af1 遺伝子欠損マウスのTfh細胞はAnnexin Vの発現率が非常に高く、細胞死の亢進によって機能維持が困難となっていると考えられた。

今後はTfhシフトあるいはTfh2シフトが生じる機序について、本研究で得られた結果に基づいて、POU2AF1や機能性RNAの発現プ

口ファイルを含めた検討を深めたい。こうした研究は免疫アレルギー疾患や自己免疫疾患など全身疾患の病態解明につながり、新たな治療法の開発やより効果的なワクチンの樹立など、これまでにない展開も期待される。リンパ球が豊富に存在する口蓋扁桃組織は、Tfh 細胞の基礎的・臨床的な研究において極めて有用であり、今後も重要な知見が提供されることが考えられる。研究代表者は、平成 11-12 年度は本学保健医療学部にも所属し、平成 13 年度より本学の施設講座である医学部フロンティア医学研究所免疫制御医学部門へ異動となった。さらに研究推進する環境が整いつつあり、本研究を継続して遂行したい。

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 11 件)

- (1) Sugimoto K, Takasawa A, Ichimiya S, Murata M, Kimura H, Aoyama T, Gille JJ, Kuroda N, Shimizu H, Hasegawa T, Sawada N, Furuya M, Nagashima Y. Multifocal and microscopic chromophobe renal cell carcinomatous lesions associated with 'capsulomas' without FCLN gene abnormality. *Pathol Int*. 63:510-5, 2013. 査読有, doi:10.1111/pin.12099.
- (2) Takano K, Keira Y, Seki N, Abe A, Yamamoto M, Takahashi H, Himi T. Evaluation of submandibular versus labial salivary gland fibrosis in IgG4-related disease. *Mod Rheumatol*. 2013. 査読有, [Epub ahead of print]
- (3) 氷見徹夫, 高野賢一, 山下恵司, 小笠原徳子, 正木智之, 小幡和史, 堤裕幸, 小島隆, 一宮慎吾, 澤田典均, 横田伸一. 扁桃・アデノイドはなぜあるのか?鼻はなにをしているのか? 小児の粘膜免疫・粘膜防御最前線. *小児耳鼻咽喉科*. 34(3): 239-244, 2013. 査読無.
- (4) 一宮慎吾, 山下恵司, 長屋朋典, 三橋由佳梨, 松宮弘, 長島勉, 氷見徹夫. Tfh 細胞と B メモリー B 細胞. *臨床免疫・アレルギー科*. 60(4): 576-580, 2013. 査読無.
- (5) Ara S, Kikuchi T, Matsumiya H, Kojima T, Kubo T, Ye RC, Sato A, Kon S, Honma T, Asakura K, Hasegawa T, Himi T, Sato N, Ichimiya S. Sorting nexin 5 of a new diagnostic marker of papillary thyroid carcinoma regulates Caspase-2. *Cancer Sci*. 103:1356-62, 2012. 査読有, doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02296.x.
- (6) Kamekura R, Kojima T, Takano K, Go M, Sawada N, Himi T. The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 42:218-28, 2012. 査読有, doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03867.x.
- (7) Sakurai N, Nagai K, Tsutsumi H, Ichimiya S. Anti-CADM-140 antibody positive juvenile dermatomyositis with rapidly progressive interstitial lung disease and cardiac involvement. *J Rheumatol*. 38:963-4, 2011. 査読有, doi:10.3899/jrheum.101220.
- (8) Nagashima T, Ichimiya S, Kikuchi T, Saito Y, Matsumiya H, Ara S, Koshiba S, Zhang J, Hatate C, Tonooka A, Kubo T, Ye RC, Hirose B, Shirasaki H, Izumi T, Takami T, Himi T, Sato N. Arachidonate 5-lipoxygenase establishes adaptive humoral immunity by controlling primary B cells and their cognate T-cell help. *Am J Pathol*. 178:222-32, 2011. 査読有, doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.033.
- (9) Ogasawara N, Kojima T, Go M, Takano K, Kamekura R, Ohkuni T, Koizumi J, Masaki T, Fuchimoto J, Obata K, Kurose M, Shintani T, Sawada N, Himi T. Epithelial barrier and antigen uptake in lymphoepithelium of human adenoids. *Acta Otolaryngol*. 131:116-23, 2011. 査読有, doi:10.3109/00016489.2010.520022.
- (10) Kameshima H, Tsuruma T, Torigoe T, Takahashi A, Hirohashi Y, Tamura Y, Tsukahara T, Ichimiya S, Kanaseki T, Iwayama Y, Sato N, Hirata K. Immunogenic enhancement and clinical effect by type-I interferon of anti-apoptotic protein, survivin-derived peptide vaccine, in advanced colorectal cancer patients. *Cancer Sci*. 102:1181-7, 2011. 査読有, doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01918.x.
- (11) Ohkuni T, Kojima T, Ogasawara N, Masaki T, Fuchimoto J, Kamekura R, Koizumi J, Ichimiya S, Murata M, Tanaka S, Himi T, Sawada N. Poly(I:C) reduces expression of JAM-A and induces secretion of IL-8 and TNF- via distinct NF- B pathways in human nasal epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 250:29-38, 2011. 査読有, doi:10.1016/j.taap.2010.09.023.

[学会発表](計 24 件)

- (1) 長屋朋典, 亀倉隆太, 山下恵司, 三橋由佳梨, 熊谷綾子, 長島勉, 一宮慎吾, 氷見徹夫. 濾胞ヘルパー T 細胞の分化機構と免疫病態との関連. 第 32 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 徳島市. 2 月 6-8 日, 2014 年.
- (2) 山下恵司, 松宮弘, 三橋由佳梨, 長屋朋典, 亀倉隆太, 関伸彦, 一宮慎吾, 氷見徹夫. 扁桃濾胞ヘルパー T 細胞における POU2AF1 の機構解析. 第 32 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 徳島市. 2 月

- 6-8日, 2014年.
- (3) Yamashita K, Mitsuhashi Y, Nagaya T, Kamekura R, Seki N, Kumagai A, Himi T, Ichimiya S. Functional significance of POU2AF1 in the regulation of follicular helper T cells. Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology 2013. Chiba, Japan. December 11-13, 2013.
 - (4) Kubo T, Kumagai A, Yamashita K, Nagaya T, Mitsuhashi Y, Sato N, Yamashita T, Himi T, Ichimiya S. ΔNp63 controls a TLR3-mediated mechanism that abundantly provides thymic stromal lymphopoietin in atopic dermatitis. 6th p63/p73 Workshop. Chiba, Japan. September 15-18, 2013.
 - (5) Yamashita K, Mitsuhashi Y, Nagaya T, Seki N, Ogasawara N, Okuni T, Takano K, Ichimiya S, Himi T. POU2AF1 regulates follicular helper T cells of human tonsils. 8th International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways. Zurich, Switzerland. July 17-19, 2013.
 - (6) 山下恵司, 松宮弘, 三橋由佳梨, 関伸彦, 佐藤昇志, 氷見徹夫, 一宮慎吾. 濾胞ヘルパーT細胞を調節するPOU2AF1の機能的意義. 第102回日本病理学会総会. 札幌市. 6月6-8日, 2013年.
 - (7) 重原克則, 伊藤進, 井上祐二, 一宮慎吾. アトピー型気管支喘息患者における血清IL-9の検討. 第62回日本アレルギー学会秋期学術集会. 大阪市. 11月29日-12月1日, 2012年.
 - (8) 山下恵司, 関伸彦, 松宮弘, 三橋由佳梨, 荒志保子, 久保輝文, 一宮慎吾, 氷見徹夫. POU2AF1(+)濾胞ヘルパーT細胞による閉塞性睡眠時無呼吸症候群の病態形成. 第26回日本口腔・咽頭科学会総会. 熊本市. 9月11-12日, 2012年.
 - (9) 久保輝文, 三橋由佳梨, 山下恵司, 佐藤明紀, 小島隆, 佐藤昇志, 一宮慎吾. アトピー性皮膚炎の表皮におけるp63依存性TSLP-TSLP受容体経路. 第40回日本臨床免疫学会総会. 東京都. 9月27-29日, 2012年.
 - (10) 松宮弘, 荒志保子, 久保輝文, 一宮慎吾, 氷見徹夫. 閉塞性睡眠時無呼吸症候群の扁桃肥大メカニズムと濾胞ヘルパーT細胞との関連. 第113回日本耳鼻咽喉科学会総会. 新潟市. 5月10-12日, 2012年.
 - (11) 荒志保子, 松宮弘, 久保輝文, 一宮慎吾, 氷見徹夫. 甲状腺乳頭癌におけるSNX5の機能解析. 第113回日本耳鼻咽喉科学会総会. 新潟市. 5月10-12日, 2012年.
 - (12) 山内理香, 山本大輔, 岩原直敏, 津田玲子, 松村晃寛, 鈴木秀一郎, 津田笑子, 保月隆良, 林貴士, 齊藤正樹, 久原真, 川又純, 今井富裕, 下濱俊, 杉本幸太郎, 一宮慎吾, 長谷川匡. 進行性筋萎縮症(PMA)の1剖検例における異常TDP-43. 第53回日本神経学会学術大会. 東京. 5月22-25日, 2012年.
 - (13) 久保輝文, Ye RC, 松宮弘, 荒志保子, 小島隆, 佐藤昇志, 一宮慎吾. 表皮幹細胞因子p63はケラチノサイトにおけるTSLP受容体の発現を制御する. 第101回日本病理学会総会. 東京. 4月26-28日, 2012年.
 - (14) Kubo T, Ye RC, Ara S, Matsumiya H, Kojima T, Kikuchi T, Sato N, Ichimiya S. A novel autocrine-paracrine loop of TSLP in atopic dermatitis is regulated by p63. 99th Annual Meeting of the American Association of Immunologists. Boston, USA. May 4-8, 2012.
 - (15) Ichimiya S, Matsumiya H, Kubo T, Ara S, Ye RC, Sato A, Kikuchi T, Yamashita K, Mitsuhashi Y, Seki N, Shirasaki H, Kimura S, Yokoyama S, Sato N, Himi T. POU2AF1(+) follicular helper T cells in obstructive sleep apnea syndrome. 99th Annual Meeting of the American Association of Immunologists. Boston, USA. May 4-8, 2012.
 - (16) Kubo T, Ara S, Ye RC, Matsumiya H, Kojima T, Sato N, Ichimiya S. Epidermal stem cell factor p63 regulates thymic stromal lymphopoietin receptor (TSLPR): a putative role of TSLP in the pathogenesis of atopic dermatitis. Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology 2011. Chiba, Japan. November 27-29, 2011.
 - (17) Matsumiya H, Ara S, Kubo T, Ye RC, Himi T, Sato N, Ichimiya S. The regulatory mechanism of follicular helper T cells in humoral memory response. Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology 2011. Chiba, Japan. November, 27-29, 2011.
 - (18) 一宮慎吾. Lシリーズ抗ヒトリンパ球抗体の有用性とその抗原系の解析. 学術研究賞演説(A演説). 第57回日本病理学会秋期特別総会. 東京. 11月17-18日, 2011年.
 - (19) Ara S, Ichimiya S, Kubo T, Matsumiya H, Ye RC, Sato N, Kojima T, Hasegawa T, Himi T, Kikuchi T, Kon S. Functional significance of the expression of sorting nexin family in thyroid papillary cancer. 第70回日本癌学会総会. 名古屋市. 10月3-5日, 2011年.
 - (20) 松宮弘, 荒志保子, 久保輝文, Ye RC, 一宮慎吾, 氷見徹夫. 閉塞性睡眠時無呼吸症候群の扁桃組織における濾胞ヘルパーT細胞の機能解析. 第24回日本口腔咽頭科学会総会. 広島市. 9月8-9日, 2011

年.

- (21) 荒志保子, 一宮慎吾, 久保輝文, 松宮弘, Ye RC, 佐藤昇志, 小島隆, 長谷川匡, 氷見徹夫, 菊地智樹, 今信一郎. 甲状腺乳頭癌における SNX ファミリーの機能解析.(優秀ポスター賞). 第8回日本病理学会カンファレンス. 松本市. 8月5-6日, 2011年.
- (22) 久保輝文, 荒志保子, Ye RC, 松宮弘, 小島隆, 佐藤昇志, 一宮慎吾. 表皮ケラチノサイトに発現する TSLP 受容体がアトピー性皮膚炎病態に果たす役割の検討. 第8回日本病理学会カンファレンス. 松本市. 8月5-6日, 2011年.
- (23) 久保輝文, 一宮慎吾, Ye RC, 松宮弘, 荒志保子, 佐藤昇志. アレルギー疾患における免疫細胞としての上皮の役割. 第100回日本病理学会総会. 東京. 4月28-30日, 2011年.
- (24) 兵頭秀樹, 佐藤大志, 兵頭かずさ, 玉川光春, 山直也, 計良淑子, 一宮慎吾, 長谷川匡, 晴山雅人. 死後画像診断と病理解剖所見の比較. 第70回日本医学放射線学会総会 Web 開催. 東京. 5月9-20日, 2011年.

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 長島勉, 荒志保子, 一宮慎吾. B 細胞と脂質メディエーター. 上気道炎症における鼻粘膜の役割. 氷見徹夫編. アイワード札幌, p156-163. 2012.
- (2) 松宮弘, 三橋由佳梨, 山下恵司, 一宮慎吾. 粘膜関連リンパ組織と濾胞ヘルパーT 細胞. 氷見徹夫編. アイワード札幌, p194-204. 2012.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所免疫制御医学部門

<http://web.sapmed.ac.jp/immunology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一宮 慎吾 (ICHIMIYA, Shingo)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 30305221

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

氷見 徹夫 (HIMI, Tetsuo)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90181114

佐藤 昇志 (SATO, Noriyuki)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50158937