

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590098

研究課題名(和文)次世代ワクチンの開発を目指した抗体産生制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the antibody production mechanism for next-generation vaccine development

研究代表者

原田 陽介(Harada, Yohsuke)

東京理科大学・付置研究所・助教

研究者番号：20328579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：濾胞性ヘルパーT(TFH)細胞は、抗原が排除された後、メモリーT細胞として維持されることが知られているが、どのようなメカニズムでメモリー細胞の形成および維持が制御されているのかは、ほとんどわかっていない。我々はNotchシグナルの下流で働く転写因子RBP-Jを欠損したTFH細胞はメモリー細胞として維持されないことを見出した。またRBP-J欠損TFH細胞はCCR7の発現上昇が障害されており、その結果、T-B境界領域への移行が阻害されていた。これらの結果はNotchシグナルがTFH細胞の局在を制御することで、メモリーT細胞の形成に働いていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that memory T follicular helper (Tfh) cells are generated and contribute to a secondary humoral response. Thus, to clarify the mechanisms for generation of memory Tfh cells is relevant for effective vaccine design. Here we demonstrate that Notch signaling regulates generation of memory Tfh cells. During contraction phase, up-regulation of CCR7 and down-regulation of CXCR5 brings Tfh cells into the T-B border area, where they are maintained as memory cells. Lack of Notch signaling during initial antigen priming, but not at the contraction phase, led to a failure of memory T cell generation due to abnormal migration caused by defective CCR7 up-regulation. Notch signaling regulated CCR7 expression through suppression of Blimp-1 expression. Our findings indicate that Notch signaling is critical for the generation and function of memory Tfh cells and could be a future target for the vaccination strategy.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 B細胞 ワクチン 抗体 免疫記憶

### 1. 研究開始当初の背景

抗体の親和性成熟には胚中心と呼ばれる構造の中でB細胞の抗体遺伝子に体細胞突然変異が導入されることが必要である。B細胞による胚中心の形成にはヘルパーT細胞のヘルプが必須であることが以前から知られていたが、近年になり、この役割をFollicular helper T細胞 (TFH)と呼ばれる特別なサブセットが担っていることが明らかになってきた。TFHは他のヘルパーT細胞と違いマスター転写因子 Bcl6 とケモカインレセプターCXCR5 を発現することで、B細胞領域に局在しB細胞と持続的な相互作用を行う。また、TFHはIL-4やIL-21といったサイトカインを産生することでB細胞の増殖や抗体遺伝子のクラススイッチを誘導する。このTFHの制御を理解することは新たなワクチンの開発に非常に有用であると考えられる。

### 2. 研究の目的

TFHの分化や機能を制御するメカニズムは徐々に明らかになってきたが、TFHがメモリー細胞として維持されるのか、また維持されるとすればどのようなシグナルがメモリーTFHの分化に必要なのかはほとんどわかっていなかった。そこで本研究ではTFHのメモリー細胞への分化とそのメカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ニワトリ卵白アルブミン(OVA)に特異的なT細胞レセプターを発現させたナイーブOTII T細胞をLy5.1コンジェニックマウス移入し、レシピエントマウスをOVAで免疫後、CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>のTFHをマウスから単離し、未免疫マウスに移入した。移入後、1週間-2ヶ月後にドナーTFHがメモリーとして長期維持されているかをフローサイトメーターにより確認した。また、そのリンパ組織における局在を蛍光顕微鏡により確認した。メモリーTFHの形成におけるNotchシグナルの役割を検討するためにNotchシグナルの下流で働く転写因子RBP-Jを欠損したマウスからTFHを単離し、同様の検討を行った。

### 4. 研究成果

ナイーブOTII T細胞をLy5.1コンジェニックマウスに移入後、OVAで免疫すると、OTII T細胞はCXCR5、PD-1の発現上昇とCCR7の発現低下を伴ってT細胞領域からB細胞濾胞および胚中心(GC)へと移行した。これらのTFHをセルソーターにより単離し、未免疫マウスに移入すると、これらのTFH細胞は1週間後には脾臓中のT細胞領域とB細胞領域の境界付近に移行し、抗原のない状態で50日以上長期維持されていた。このときCCR7の発現はナイーブT細胞と同等のレベルに回復し、CXCR5の発現は低下する

もののナイーブT細胞より高いレベルで維持されていた。このマウスをOVAで免疫するとメモリーTFH細胞は再びCXCR5の発現を上昇させ、B細胞濾胞および胚中心へと移行した。このときのOVA特異的なIgG1およびIgE抗体を測定するとTFH細胞を移入していなかったマウスに比べ、優位に抗体価の上昇が観察された。これらの結果から、TFH細胞はメモリー細胞として長期維持され、2次免疫応答の際に抗体産生を素早く誘導することがわかった。また、これらのメモリーTFH細胞はT細胞領域とB細胞領域の境界領域で維持されることが示唆された。

つぎにメモリーTFH細胞がどのようなシグナルにより制御されているのかを解析した。NotchシグナルはT細胞の発生や様々なヘルパーT細胞の分化を制御していることが明らかとなっている。そこでNotchシグナルがメモリーTFHの分化を制御しているかどうかを検討した。Notchシグナルの役割を解析するためにNotchシグナルの下流で働く転写因子RBP-Jを欠損したマウスを使用した。Notchシグナルの非存在下で分化したTFHはWTと同様にGCへと移行したが、メモリー細胞として維持されなかった。またNotchシグナル欠損TFHは退縮期におけるCCR7とCXCR5の発現が障害されており、T-B境界領域への移行も阻害されていた。

つぎにNotchシグナルがどのようにしてTFH細胞のメモリーニッチへの局在を制御しているのかをさらに検討するためにWTとRBP-J欠損TFHの遺伝子発現量の時間変化をRNA sequenceにより比較した。その解析からRBP-J欠損TFHでは転写因子Blimp-1がTFHのエフェクター期から退縮期にかけてWTに比べ上昇していることがわかった。

Blimp-1はこれまでの他のグループの研究結果からCCR7の発現を抑制することが明らかになっていたことから、NotchシグナルがBlimp-1の発現調節を介してCCR7の発現を制御している可能性を検討した。レトロウイルスを用いてT細胞に活性化型Notchを発現させたところ、Blimp-1の遺伝子発現が抑制された。また、Blimp-1の強制発現によってCCR7の遺伝子発現の抑制が観察された。これらの結果からNotchシグナルは転写因子Blimp-1の発現を抑制することでCCR7の発現を制御していることが明らかになった。

以上の結果からNotchシグナルはTFH細胞のメモリーニッチへの局在を制御することで、メモリー細胞の形成に働いていること、そしてそのメカニズムの1つはBlimp-1の発現抑制を介したCCR7の発現上昇の誘導であることが示唆された。今回の研究成果は効果的なメモリーT細胞の誘導を基盤とした新たなワクチン開発を考える

上で重要な知見になると思われる。

## 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 2 件)

Higo K, Oda M, Morii H, Takahashi J, Harada Y, Ogawa S, Abe R. (2014) Quantitative analysis by surface plasmon resonance of CD28 interaction with cytoplasmic adaptor molecules Grb2, Gads and p85 PI3K. **Immunol. Invest.** 査読有. 2014, 43:278-291

DOI: 10.3109/08820139.2013.875039.

Harada Y, Tanaka S, Motomura Y, Harada Y, Ohno S, Ohno S, Yanagi Y, Inoue H, Kubo M. The 3' enhancer CNS2 is a critical regulator of interleukin-4-mediated humoral immunity in follicular helper T cells. **Immunity.** 査読有. 2012, 36:188-200

DOI: 10.1016/j.immuni.2012.02.002.

[学会発表](計 8 件)

原田陽介他 Notch signaling promotes T<sub>FH</sub> memory cell generation by facilitating migration into survival niche. 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 10 日~12 日 国立京都国際会館(京都府・京都市)

原田陽介他 Notch signaling promotes T<sub>FH</sub> memory cell generation by facilitating migration into survival niche. The 2nd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum (IIMVF) 2014 年 8 月 25 日~26 日 サンディエゴ(米国)

原田陽介他 Role of Notch signaling in the generation and function of T follicular (T<sub>FH</sub>) and memory T cells. 第 42 回日本免疫学会学術集会 2013 年 12 月 11 日~13 日 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

原田陽介他 Role of Notch signaling in the generation and function of T follicular (T<sub>FH</sub>) and memory T cells. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology 2013 年 8 月 22 日~27 日 ミラノ(イタリア)

原田陽介他 Role of Notch signaling in the generation and function of T follicular (T<sub>FH</sub>) and memory T cells. The 6th international workshop of Kyoto T cell conference 2013 2013 年 6 月 3 日~7 日 京都大学(京都府・京都市)

原田陽介他 Role of Notch signaling in the generation and function of T follicular (T<sub>FH</sub>) and memory T cells. The joint international meeting of the Japanese society of interferon and cytokine research and international symposium

on molecular cell biology of macrophages 2013、2013 年 5 月 20 日~21 日、都市センターホテル(東京都・千代田区)

原田陽介他 The 3' enhancer, CNS2 is a crucial regulator of IL-4 mediated humoral immunity in follicular helper T cells 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012 年 12 月 5 日~12 月 7 日 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

原田陽介他 The 3' enhancer, CNS2 is a crucial regulator of IL-4 mediated humoral immunity in follicular helper T cells. 第 22 回京都 T 細胞会議、2012 年 7 月 6 日~7 日、和順会館(京都府・京都市)

[図書](計 3 件)

原田陽介: Tfh 細胞と Th2 細胞における IL-4 産生の相違 臨床免疫・アレルギー科、科学評論社 Vol.59, p34-39, 2013

原田陽介・久保允人: 濾胞性 T 細胞の IL-4 産生制御と IgE 抗体産生 医学のあゆみ、医歯薬出版 Vol243 No.8 p689-690, 2012

原田陽介・久保允人: 胸腺内での T 細胞分化とサイトカイン 増刊号「サイトカインのすべて」 臨床免疫・アレルギー科、科学評論社 Vol.57 Suppl.21, p664-669, 2012

[産業財産権]

出願状況(計 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 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
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

原田 陽介(HARADA, Yohsuke)

東京理科大学・生命医科学研究所・助教

研究者番号：20328579

(2)研究分担者

久保 允人 (KUBO, Masato)

東京理科大学・生命医科学研究所・教授

研究者番号：40277281

(3)連携研究者

( )

研究者番号：