

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 30 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791793

研究課題名(和文)濾胞ヘルパーT細胞を介したIgE産生のマスタープランとその抑制経路の研究

研究課題名(英文)The research for the novel role of follicular helper T cells in the regulation of IgE production and the suppressive pathway

研究代表者

関 伸彦 (SEKI, Nobuhiko)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：30404693

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)：濾胞ヘルパーT細胞(Tfh細胞)は、リンパ濾胞胚中心の形成を促して抗原特異的な抗体産生を調節するヘルパーT細胞である。本研究では、扁桃組織から分離したTfh細胞に特異的に発現している遺伝子を抽出し、リンパ濾胞胚中心の形成と免疫グロブリン産生に必要な転写因子であるBOB1を見いだした。アレルギー性鼻炎患者の血液を解析し、total Tfh細胞に占めるTfh2細胞の割合が有意に増加していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Follicular helper T (Tfh) cells, a distinctive subset of effector CD4+ T cells, have important roles in generation of germinal center (GC) and antigen-specific humoral immune responses. In this study, we found that Tfh cells specifically expressed the transcriptional co-activator BOB1, which is required for GC formation and immunoglobulin production. We also showed that percentage of Tfh2 cells in total Tfh cells was significantly higher in peripheral blood from patients with allergic rhinitis. Further investigation focusing on BOB1 and polarization of Tfh cell subsets would lead to a better understanding of the pathogenesis of allergy rhinitis.

研究分野：耳鼻咽喉科学，アレルギー学，免疫学

キーワード：濾胞ヘルパーT細胞 免疫アレルギー疾患 IgE

## 1. 研究開始当初の背景

免疫アレルギー疾患の有病率は増加の一途を辿り、その克服に向けた抜本的な予防法や治療法の確立は今や解決すべき国民的課題である。I 型アレルギーの病態には、IgE 抗体が重要な役割を演じているが、その産生にはヘルパー T 細胞が必要であり、末梢域におけるエフェクターヘルパー T 細胞の多様性は排他的な分化プロセスにより担保されていることや免疫病態との関連が示されている。

CD4<sup>+</sup> ヘルパー T 細胞は、その産生するサイトカインの違いから Th1 細胞、Th2 細胞に分類され、アレルギー疾患においては、Th2 優位の Th1/Th2 バランスになっていることが明らかになっている。また、ヘルパー T 細胞の新たなサブセットとして、Th17 細胞、Treg 細胞、Tfh 細胞が報告された。

濾胞ヘルパー T 細胞 (Tfh 細胞) はリンパ濾胞胚中心の形成を促して抗原特異的な抗体産生を調節し、免疫アレルギー疾患との関連が注目されているが、マウスモデルを用いた機能解析の報告が多く、ヒト Tfh 細胞の機能的特徴、抗原特異的 IgE 産生における意義については不明である。さらに、ケモカイン受容体の発現パターンにより Tfh 細胞のサブセットとして Tfh1、Tfh2、Tfh17 が報告され、免疫アレルギー疾患の素因、発症が論じられている。

## 2. 研究の目的

(1) 抗原特異的 IgE は免疫アレルギー疾患の病態形成に重要な働きを示すが、その産生機構に関しては未だ不明な点が多い。本研究では扁桃や胸腺のヒトリンパ球を用いて濾胞ヘルパー T 細胞の機能特性と抗原特異的

IgE 産生のメカニズムとの関連を明らかにするとともに、濾胞ヘルパー T 細胞を制御する新規制御因子を検索し、その機能を解明する。

(2) アレルギー性鼻炎における Tfh 細胞の関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 手術により得られた扁桃組織や胸腺組織を用いて解析した。それぞれの組織から密度勾配遠心法にてリンパ球を回収し、細胞表面抗体を染色した上で、セルソーターを用いて扁桃組織からは Tfh 細胞 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>) と胸腺組織からはナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) を単離した。それぞれの細胞から抽出した RNA を用いて、マイクロアレイ法により各々のトランスクリプトームを比較検討した。得られた遺伝子より Tfh 細胞に特異的に発現する遺伝子を抽出した。

(2) 対象とした遺伝子については、ヒト扁桃から得られた Tfh 細胞を用いて、定量 RT-PCR 法やウェスタンロッキング法、免疫沈降法、蛍光免疫組織染色にて、Tfh 細胞に特異的に発現している遺伝子を検証した。コントロールとしてナイーブ T 細胞、non-Tfh 細胞、B 細胞サブセット (ナイーブ B 細胞、胚中心 B 細胞、メモリー B 細胞) についても検討し、またこれまでに Tfh 細胞に発現しているとされる遺伝子について確認した。

(3) アレルギー性鼻炎患者と健常者の末梢血からリンパ球を分離し、フローサイトメトリーにてリンパ球サブセットの解析を行った。さらに Tfh 細胞サブセット (Tfh1 (CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>), Tfh2 (CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>), Tfh17 (CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>)) 解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) トランスクリプトームの解析から 642 遺伝子が抽出された .その中で発現の程度が高い遺伝子を抽出し RT-PCR で確認した .その中で , B 細胞分化や特異的抗体産生に与る B-cell-specific octamer binding protein 1 ( BOB1 ) を認めた .

(2) 定量 RT-PCR 法やウェスタンブロッティング法などの結果より , BOB1 は Tfh 細胞に特異的に高発現しており ,その他のエフェクターヘルパー T 細胞には発現していなかった .

(3)

アレルギー性鼻炎群は 29 名で ,平均年齢 39.5 歳 ,男性 13 名 ,女性 16 名 ,血清総 IgE は  $401.6 \pm 840.1$  IU/ml であった .対象の健常群は 12 名で ,平均年齢 41.0 歳 ,男性 4 名 ,女性 8 名 ,血清総 IgE は  $31.6 \pm 26.8$  IU/ml であった .アレルギー性鼻炎群における感作は ,ダニ・ハウスダスト 25 例 (89 % ) ,カモガヤ 17 例 (61 % ) ,シラカバ 16 例 (56 % ) で陽性であった .

アレルギー性鼻炎群と健常群で ,末梢血中の Tfh 細胞の割合に有意差を認めなかった ( $p = 0.3561$ ) が , Tfh サブセット解析においては ,アレルギー性鼻炎群では ,コントロール群と比較して total Tfh 細胞に占める Tfh2 細胞の割合が有意に増加 (skewing) していた ( $p = 0.002$ ) (図 1) .

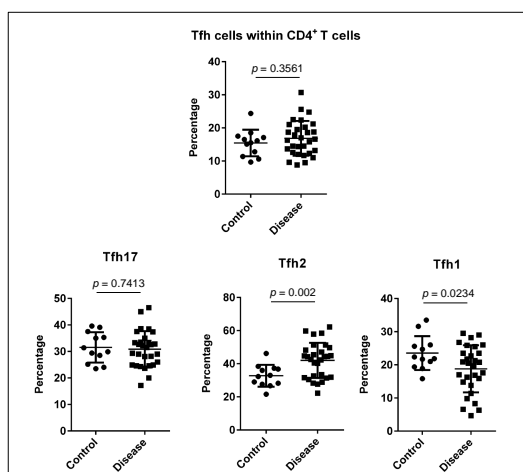


図 1 末梢血中の Tfh サブセット解析結果

本研究では , Tfh 細胞が比較的多く得られる扁桃組織からセルソーターを用いてヘルパー T 細胞を分離し , トランスクリプトーム解析を行って Tfh 細胞に特異的に発現している遺伝子を抽出した . その中に , リンパ濾胞胚中心の形成と免疫グロブリン産生に必要な転写因子である BOB1 を見いだした . 今後 BOB1 に着目した Tfh 細胞の機能解析を行うことにより , Tfh 細胞を介した免疫アレルギー疾患の新たな病態解明が期待される .

また , アレルギー性鼻炎患者を対象にした末梢血中 Tfh 細胞の解析では , 末梢血中の Tfh 細胞の割合には有意差を認めなかったが , total Tfh 細胞に占める Tfh2 細胞の割合が有意に増加していた . Tfh2 細胞は B 細胞 , 形質細胞からの IgE 抗体産生を特異的に制御することを考えると , Tfh2 細胞がアレルギー性鼻炎の発症に関与している可能性があり , Tfh2 増加機構の解明はアレルギー発症予防に応用されよう .

#### 参考文献

1. Nagashima T, et al.: 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.

2. Morita R, et al.: Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. Immunity 34: 108–21, 2011.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kamekura R, Shigehara K, Miyajima S, Jitsukawa S, Kawata K, Yamashita K, Nagaya T, Kumagai A, Sato A, Matsumiya H, Ogasawara N, Seki N, Takano K, Kokai Y, Takahashi H, Himi T, Ichimiya S: Alteration of circulating type 2 follicular helper T cells and regulatory B cells underlies the comorbid association of allergic rhinitis with bronchial asthma. Clinical Immunology, 2015 [in press] (査読有)

一宮慎吾, 山下恵司, 長屋朋典, 三橋由佳梨, 松宮弘, 長島勉, 関伸彦, 氷見徹夫: TFH 細胞とメモリー B 細胞. 臨床免疫・アレルギー科 60(5): 576-580, 2013 (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

Keiji Yamashita, Yukari Mitsuhashi, Tomonori Nagaya, Sumito Jitsukawa, Ryuta Kamekura, Nobuhiko Seki, Ayako Kumagai, Koji Kawata, Tetsuo Himi, Shingo Ichimiya: POU2AF1 arranges systemic distribution of follicular helper T cells. The American association of Immunologist 2014, May 2–6, 2014, Pittsburg (USA)

山下恵司, 長屋朋典, 三橋由佳梨, 實川純人, 亀倉隆太, 熊谷綾子, 関伸彦, 氷見

徹夫, 一宮慎吾: 濾胞ヘルパー T 細胞による抗体産生プログラムの制御機構. 第 103 回日本病理学会, 2014 年 4 月 24–26 日, 広島国際会議場 (広島県・広島市)

亀倉隆太, 長屋朋典, 山下恵司, 三橋由佳梨, 長島勉, 熊谷綾子, 関伸彦, 川田耕司, 氷見徹夫, 一宮慎吾: 濾胞ヘルパー T 細胞の分化機構と免疫病態との関連. 第 103 回日本病理学会, 2014 年 4 月 24–26 日, 広島国際会議場 (広島県・広島市)

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: POU2AF1 による扁桃濾胞ヘルパー T 細胞の機能調節機構. 第 32 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2014 年 2 月 4–6 日, ホテルクレメント徳島 (徳島県・徳島市)

Keiji Yamashita, Yukari Mitsuhashi, Tomonori Nagaya, Ryuta Kamekura, Nobuhiko Seki, Ayako Kumagai, Tetsuo Himi, Shingo Ichimiya: Functional significance of POU2AF1 in the regulation of follicular helper T cells. 第 42 回日本免疫学会, 2013 年 12 月 11–13 日, 幕張メッセ (千葉県・千葉市)

Keiji Yamashita, Yukari Mitsuhashi, Terufumi Kubo, Tomonori Nagaya, Nobuhiko Seki, Noriko Ogasawara, Tsuyoshi Okuni, Kenichi Takano, Shingo Ichimiya, Tetsuo Himi: POU2AF1 regulates T follicular helper cells of human tonsils. 8th International symposium on Tonsils and Mucosal Barriers, July 17–19, 2013, Zurich (Switzerland)

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, 2013 年 6

月 6-8 日, ロイトン札幌 (北海道・札幌市)

〔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:

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

関 伸彦 (SEKI, Nobuhiko)

札幌医科大学 耳鼻咽喉科 助教

研究者番号: 30404693