

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293115

研究課題名(和文)濾胞性ヘルパーT細胞(TFH細胞)の分化・機能制御の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular mechanisms underlying the development and function of follicular helper T cells

研究代表者

伊勢 渉(Ise, Wataru)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授

研究者番号：70323483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：濾胞性ヘルパーT細胞の分化制御、ホメオスタシス制御機構を明らかにすることを目的とし、以下のことを行った。1) In vitro TFH様細胞の分化誘導培養系を樹立した。2) TFH細胞が記憶T細胞として長期生存可能であること、また記憶B細胞による抗原提示により速やかに活性化されることを明らかとした。3) 転写因子BATFのコンディショナルノックアウト・レポーターマウスを作製し、BATFがTFH細胞に強く発現することを明らかとした。4) 転写因子BATFを誘導性に除去すると、胚中心が消失することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the molecular mechanisms of development and maintenance of follicular helper T cells (TFH cells), the followings have been demonstrated or shown in three years. 1) In vitro culture to induce TFH-like cells with high levels of Bcl6 was established. 2) TFH cells were able to survived as long-term memory T cells. Antigen-specific memory B cells serves as antigen-presenting cells during secondary activation of memory TFH cells. 3) The conditional knock-out/GFP-reporter mice of the transcription factor BATF were generated. TFH cells express high levels of BATF. 4) Inducible deletion of BATF after germinal center has been established elicited the collapse of germinal center.

研究分野：免疫学

キーワード：ヘルパーT細胞 抗体産生 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

濾胞性ヘルパーT細胞 (TFH細胞) は抗原刺激により分化誘導され、抗原特異的B細胞を活性化し胚中心B細胞へと分化させる。さらに胚中心B細胞と相互作用することで長期生存記憶細胞やプラズマ細胞への分化も誘導する。つまりTFH細胞は液性免疫応答の誘導に必須のT細胞である。TFH細胞のマスター遺伝子としてBcl6が同定され、TFH細胞の分化誘導や機能に関する理解は飛躍的に進んだ。しかしその分化機構をより詳細に解析するための実験系が存在せず、TFH細胞の分化制御の分子機構には不明な点が多く残されていた。またエフェクターTFH細胞の重要性は示されていたものの、エフェクターTFH細胞が記憶T細胞として長期に渡って生存可能かどうか不明であった。

## 2. 研究の目的

濾胞性ヘルパーT細胞 (TFH細胞) は生体内液性免疫応答に必須のT細胞である。その分化・機能異常は自己免疫疾患につながることから、分化・機能の分子基盤を理解する必要がある。TFH細胞のマスター遺伝子としてBcl6が同定されているが、申請者は転写因子BATFがTFH細胞の分化に必須であることを独自に見出した。しかしTFH細胞が分化する過程でBcl6が誘導される機構、TFH細胞がエフェクター細胞としての機能を果たした後の運命、生体内でBATFがTFH細胞のホメオスタシスをどのように制御しているかは不明である。本研究では以上の疑問に答えることを目標として、以下のことを行う。1) in vitro TFH様細胞の誘導培養系の樹立、2) 記憶TFH細胞の生存維持・活性化機構、3) 転写因子BATFのTFH細胞生存制御機構の解析。

## 3. 研究の方法

1) T細胞抗原レセプタートランスジェニック (TCR Tg) マウスからCD4陽性T細胞を分離し、抗原タンパク質の存在下、B細胞レセプターノックインマウス由来B細胞とともに培養する。2-4日後にT細胞のBcl6, Batf, CXCR5等の発現を調べる。  
2) TCR Tgマウス由来T細胞をレシピエントマウスに移入後に抗原タンパク質で免疫を行う。7日後にエフェクターTFH細胞を分離し、ナイーブマウスに移入する。1カ月後のドナーT細胞の生存率や表現系を調べる。またTFH細胞を樹状細胞を欠損させられるマウスや記憶B細胞の存在しないマウスに移入し、抗原の再投与による活性化がどのような影響を受けるかについても調べる。  
3) 転写因子BATFのコンディショナルノックアウト・GFPレポーターマウスを製し、抗原特異的な免疫応答を誘導した際の生体内BATFの発現を観察する。  
4) 抗原特異的な免疫応答を誘導した後に、BATFを誘導性にノックアウトし、それが胚中心応答に及ぼす影響を調べる。

## 4. 研究成果

1) In vitro TFH細胞の分化誘導培養系の樹立

これまで in vitro の培養系においてTFH細胞に必要な転写因子であるBcl6を高レベルで発現し、TFH細胞と同様の表現系を持つT細胞を誘導することは困難であった。このためTFH細胞の分化誘導機構の解明が遅れていた。従来の方法はT細胞を抗TCR抗体およびサイトカイン (IL-6やIL-21) の存在下で培養するものであったが、本研究では抗原特異的なT細胞とB細胞を抗原の存在下で培養することを試みた。その結果、T細胞を抗TCR抗体で刺激した場合や樹状細胞と培養した場合と比較して、抗原特異的B細胞と培養した際にT細胞にBcl6発現を高効率に誘導できることを見出した。この時TFH細胞の表面マーカーの一つであるCXCR5も高レベルで誘導されていた。したがってこの実験系を用いることでTFH細胞の分化誘導機構の詳細を解析することが可能となった。

2) 記憶TFH細胞の生存維持、活性化機構

TFH細胞は胚中心の形成を誘導し、高親和性抗体を持つB細胞の選択を行うが、時間の経過とともに胚中心は縮小し、やがて消滅する。この時TFH細胞が他のT細胞と同じように記憶T細胞として長期にわたって生存可能なのか、またもし生存するのであればどのようなフェノタイプを持つT細胞として生存するのかが不明であった。そこで抗原特異的TFH細胞を分離しナイーブなマウスに移入することで長期生存可能かどうかを検討した。その結果、TFH細胞は抗原の非存在下で記憶T細胞として生存可能であることが明らかとなった。この記憶TFH細胞はT細胞領域のみならず、T細胞-B細胞領域の境界やB細胞領域にも存在していた。

エフェクターTFH細胞と比較して、記憶TFH細胞が発現するBcl6のレベルは非常に低いものであった。Bcl6を誘導的にノックアウトすると記憶TFH細胞数が著しく減少したことから、Bcl6は記憶TFH細胞の維持に必要であることが判明した。記憶TFH細胞は再刺激後速やかにBcl6を高発現し、Bcl6の発現のkineticsは一次応答時よりもはるかに速いものであった。記憶TFH細胞の再活性化は一次応答時とは異なり、樹状細胞の非存在下でも起こり得ることが樹状細胞を誘導性に除去する実験系で明らかとなった。また記憶TFH細胞の効率良い活性化には抗原特異的記憶B細胞による抗原提示が必要であった。

以上のことから抗原特異的記憶TFH細胞と記憶B細胞の効率の良い相互作用が、記憶抗体産生応答を制御していることが示唆された。

3) 転写因子BATFのコンディショナルノックアウトマウスの樹立

AP-1 ファミリー転写因子 BATF は TFH 細胞分化や胚中心誘導に必須の転写因子である。しかしその詳細な分子機構や生体内での発現制御などは不明であった。生体内における BATF の役割を明確に示す目的で BATF のコンディショナルノックアウトおよびレポーターマウスを作製した。すなわち BATF の exon3 を loxp 配列で挟んだマウスを作製した。またこの exon3 のストップコドンの下流に GFP を挿入することで BATF の発現をモニターできるようにした。

#### 4) 転写因子 BATF の胚中心リンパ球における発現の解析

樹立した BATF-GFP ノックインマウスを用いて生体内リンパ球 (T 細胞、B 細胞) 特に胚中心リンパ球における BATF の発現を解析した。ナイーブ T 細胞、B 細胞における BATF の発現は低いものであったが、抗原刺激によりその発現は上昇した。抗原の投与から 7 日後に抗原特異的 T 細胞の BATF の発現を観察したところ、TFH 細胞において非常に強い発現が認められた。このことから BATF が TFH 細胞の誘導のみならず、TFH 細胞の維持や機能にも重要である可能性が考えられた。また BATF の発現は TFH 細胞のみならず、胚中心 B 細胞の一部においても認められた。このことから BATF が胚中心の機能に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

#### 5) 誘導性 BATF ノックアウトマウスを用いた胚中心維持・TFH 細胞維持における BATF の機能解析

胚中心の維持における BATF の役割を解析する目的で、タモキシフェンの投与により BATF を誘導性にノックアウトできるマウス (Batf1/f1 x ERT2-cre マウス) を作製した。このマウスに抗原を免疫し、胚中心が十分に形成された時期 (免疫から 7-10 日後) にタモキシフェンを投与したところ、胚中心 B 細胞がほぼ完全に消失した。このことから BATF が胚中心の維持に必須であることが明らかになった。現在 BATF が胚中心 B 細胞、あるいは TFH 細胞のどちらに発現することが大事なのかを明らかにする目的で、このコンディショナルノックアウトに T 細胞レセプターあるいは B 細胞レセプターのトランスジェニックマウスを交配させ、解析を行っているところである。

### 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 5 件)

1: Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, Yasutomi Y, Wijaya E,

Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandenbon A, Standley DM, Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin spikes local inflammation that induces Th2 cell and T follicular helper cell responses to the coadministered antigen. **J Immunol**. 2015 Mar 15;194(6):2673-82.

2: Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. **Nat Rev Immunol**. 2015 Mar;15(3):149-59.

3: Ise W. Development and function of follicular helper T cells. **Biosci Biotechnol Biochem**. 2015;80(1):1-6.

4: Wing JB, Ise W, Kurosaki T, Sakaguchi S. Regulatory T cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4. **Immunity**. 2014 Dec 18;41(6):1013-25.

5: Ise W, Inoue T, McLachlan JB, Kometani K, Kubo M, Okada T, Kurosaki T. Memory B cells contribute to rapid Bcl6 expression by memory follicular helper T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2014 Aug 12;111(32):11792-7.

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

[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：  
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  
伊勢 渉 (Ise, Wataru)  
大阪大学免疫学フロンティア研究センター・特任准教授  
研究者番号：70323483

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：