

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861400

研究課題名(和文) ヒトT(FH)細胞分化モデルによる免疫アレルギー治療の研究

研究課題名(英文) Study of the allergic treatment of immunity with human TFH cells differentiation model

研究代表者

長屋 朋典 (Nagaya, Tomonori)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60517902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Tfh細胞の解析を通じてALOX5関連脂質メディエーターの機能的役割について検討した。ALOX5関連脂質メディエーターであるロイコトリエンB4(LTB4)とリポキシンA4(LXA4)がナイーブT細胞のTfh細胞への分化を促進させる作用をもっていた。また、ヒト扁桃組織中のCD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>B細胞はIL-10を高発現していた。ヒト扁桃組織中のCD24<sup>lo</sup>CD27<sup>-</sup>B細胞はrestingナイーブB細胞であると考えられた。さらにTfh細胞がCD24<sup>lo</sup>CD27<sup>-</sup>B細胞のIL-10産生を促進させた。これらの結果から今後、Tfh関連疾患の病態解明がさらに発展することが期待された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to determine the functional significance of Alox5-related lipid mediators during the processes of acquired humoral responses. The results of in vitro experiments using lymphocytes in tonsils and blood specimens showed that lipoxin A4 (LXA4) and, to a lesser extent, leukotriene B4 (LTB4) have the capacity to differentiate naïve CD4<sup>+</sup> T cells into T follicular helper (Tfh) cells, which activate naïve B cells to form germinal centers. Such a function of LXA4 was further supported by results of in vitro studies using BML-111 and BOC-2, which are an agonist and antagonist to FPR2 of an LXA4-specific cell-surface receptor. Preferential expression of Alox5 in naïve B cells further lead to evidence indicating that Tfh cells can promote naïve B cells to secrete IL-10. Given that IL-10 stimulates and enhances the proliferation of B cells, such lipid mediators would have a potential role in the presentation of integrities of lymphoid follicles.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：Tfh細胞 脂質メディエーター Breg細胞

### 1. 研究開始当初の背景

濾胞ヘルパーT細胞(Tfh細胞)は特異的な抗体産生機構に関わるヘルパーT細胞サブセットで、IL-21の存在下にナイーブヘルパーT細胞から排他的誘導がなされて分化し、リンパ濾胞胚中心の形成を促す。免疫病態形成の背景にヘルパーT細胞サブセットの機能異常が数多く報告されている一方で、Tfh細胞と免疫病態との関連については未だ不明な点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

ロイコトリエンやリポキシンといった脂質メディエーターは広く自然免疫や獲得免疫を調節しており、これらの機能障害は様々な免疫介在性疾患の原因となり得る。我々は以前に脂質メディエーターの産生を担う5-リポキシゲナーゼ(Alox5)の生体内での高親和性抗体の調節における顕著な特徴を報告した。本研究では、胚中心におけるB細胞の活性化に重要な役割を果たす濾胞ヘルパーT細胞(Tfh細胞)の解析を通して、抗原特異的液性免疫の成立過程におけるAlox5関連脂質メディエーターの機能的な重要性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

1) 手術検体の扁桃組織や末梢血液から、セルソーターを用いてリンパ球、ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞、Tfh細胞、非Tfh細胞、B細胞を単離し、Real time PCR法により各遺伝子の発現について解析した。

2) 単離したナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞をサイトカイン、抗体、脂質メディエーターの存在下で培養しFACSで解析した。

3) 単離したTfh細胞、ナイーブB細胞を抗体、脂質メディエーター存在下に共培養しFACSで解析した。

4) 単離したTfh細胞を脂質メディエーター存在下で培養しannexin V-FITCと7-AADを用いて細胞生存率を測定した。

### 4. 研究成果

1) セルソーターで単離した総リンパ球、各種T細胞における脂質メディエーター受容体の遺伝子レベルにおける発現をReal time PCR法により解析した。リポキシンA4(LXA4)の受容体であるFPR2がナイーブT細胞において高発現していた。セルソーターで単離したCD3-CD19<sup>+</sup>B細胞をCD24とCD27で展開したところCD24<sup>lo</sup>CD27<sup>+</sup>B細胞、CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>-</sup>B細胞、CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>B細胞の3つの分布を得られた。それぞれのB細胞についてReal time PCR法を用いてIL-10、Alox5、TCL1Aの発現を解析したところCD24<sup>lo</sup>CD27<sup>-</sup>B細胞はIgD、Alox5、TCL1Aを高発現しており、CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>B細胞は

IL-10を高発現していた。

2) セルソーターで単離したナイーブT細胞をサイトカイン、抗体、脂質メディエーターの存在下で培養し解析した。リポキシンA4(LXA4)とやや程度は落ちるがロイコトリエンB4(LTB4)が、ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞のTfh細胞への分化を促進することが示された。この結果はLXA4特異的な細胞表面受容体であるFPR2のアゴニストBML-111およびアンタゴニストBOC-2を用いた実験においても確認された。

3) セルソーターで単離したTfh細胞、非Tfh細胞とCD24<sup>lo</sup>CD27<sup>-</sup>B細胞を共培養し解析をしました。Tfh細胞は非Tfh細胞と比較し優位にCD24<sup>lo</sup>CD27<sup>-</sup>B細胞のIL-10産生を促進した。一方、LTB4およびLXA4はCD24<sup>lo</sup>CD27<sup>-</sup>B細胞のIL-10産生に影響を与えなかった。

4) セルソーターで単離したTfh細胞を培養し4日目、7日目の細胞生存率をannexin V-FITCと7-AADを用いて測定した。抗CD3抗体の存在下、非存在下のいずれにおいてもLTB4、LXA4はTfh細胞の生存率に影響を与えなかった。

以上より、Tfh細胞への分化促進環境下でナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞を培養することでナイーブT細胞からTfh細胞への分化における脂質メディエーターの新しい役割が明らかとなった。また、脂質メディエーターはTfh細胞の存在下でのB細胞のIL-10産生に影響を及ぼさなかったものの、Tfh細胞がB細胞にIL-10を分泌させる作用を有しており、Tfh細胞とB細胞がその分化、機能発現に対して相互に作用している可能性が示された。これらの研究の結果はTfh細胞関連疾患の病因解明に貢献するかもしれない。

### 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 10件)

1. Nagaya T, Kawata K, Kamekura R, Jitsukawa S, Kubo T, Kamei M, Ogasawara N, Takano K, Himi T, Ichimiya S. Lipid mediators foster the differentiation of T follicular helper cells. *Immunol Lett.* 2017 Jan;181:51-57. doi: 10.1016/j.imlet.2016.11.006. Epub 2016 Nov 10. (査読あり)

2. Kamekura R, Yamashita K, Jitsukawa S, Nagaya T, Ito F, Ichimiya S, Himi T. Role of Crosstalk between Epithelial and Immune Cells, the Epimicrobiome, in Allergic Rhinitis Pathogenesis. *Adv Otorhinolaryngol.* 2016;77:75-82. doi:

10.1159/000441878. Epub 2016 Apr 26. Review. (査読あり)

3.Yamashita K, Ichimiya S, Kamekura R, Nagaya T, Jitsukawa S, Matsumiya H, Takano K, Himi T. Studies of Tonsils in Basic and Clinical Perspectives: From the Past to the Future. Adv Otorhinolaryngol. 2016;77:119-24. doi: 10.1159/000441902. Epub 2016 Apr 26. Review. (査読あり)

4.Kamekura R, Imai R, Takano K, Yamashita K, Jitsukawa S, Nagaya T, Ito F, Hirao M, Tsubota H, Himi T. Expression and Localization of Human Defensins in Palatine Tonsils. Adv Otorhinolaryngol. 2016;77:112-8. doi: 10.1159/000441888. Epub 2016 Apr 26. (査読あり)

5.Yamashita K, Kawata K, Matsumiya H, Kamekura R, Jitsukawa S, Nagaya T, Ogasawara N, Takano K, Kubo T, Kimura S, Shigehara K, Himi T, Ichimiya S. Bob1 limits cellular frequency of T-follicular helper cells. Eur J Immunol 46(6):1361-1370, 2016. (査読あり)

6.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. Clin Immunol. 158: 204-11, 2015. (査読あり)

7.Asakura K, Honma T, Keira T, Nagaya T, Himi T. Outcomes of antireflex therapy for the treatment of laryngeal granuloma. Pract Otol (Kyoto) Suppl. 140:84-85, 2014. (査読あり)

8.朝倉光司, 本間朝, 計良宗, 長屋朋典, 氷見徹夫: 喉頭肉芽腫に対する制酸薬治療 耳鼻臨床 107: 317-321, 2014 (査読あり)

9.朝倉光司, 本間朝, 計良宗, 長屋朋典, 氷見徹夫: 副神経再建手術の術後機能評価 日本耳鼻咽喉科学会会報 117: 20-25, 2014 (査読あり)

10.一宮慎吾, 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巻5号: 576-580, 2014(査読あり)

〔学会発表〕(計 18件)

1.亀倉隆太, 實川純人, 長屋朋典, 伊藤史恵, 坪松ちえ子, 一宮慎吾, 氷見徹夫: 活性化濾胞ヘルパー T 細胞によるシラカバ花粉症の病態形成のメカニズムの解明, 第 55 回日本鼻科学会総会・学術講演会, 平成 28 年 10 月 13~15 日, 栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)

2.亀倉隆太, 高野賢一, 長屋朋典, 實川純人, 伊藤史恵, 坪松ちえ子, 一宮慎吾, 氷見徹夫: IgG4 関連涙腺・唾液腺炎における活性化濾胞ヘルパー T 細胞の IgG4 産生への関与, 第 29 回日本口腔・咽頭科学会総会ならびに学術講演会, 平成 28 年 9 月 8~9 日, 松江テルサ(島根県松江市)

3.百島尚樹, 長屋朋典, 坪田大, 小柴茂: 甲状腺腫瘍との鑑別を要した頸部 Desmoplastic fibroblastoma の 1 例, 第 78 回耳鼻咽喉科臨床学会・学術講演会, 平成 28 年 6 月 23~24 日, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

4.長屋朋典, 亀倉隆太, 山下恵司, 實川純人, 川田耕司, 一宮慎吾, 氷見徹夫: 濾胞ヘルパー T 細胞の分化と機能における脂質メディエーターの役割, 第 117 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 平成 28 年 5 月 18~21 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

5.Kamekura R, Kawata K, Jitsukawa S, Nagaya T, Yamashita K, Ito F, Takano K, Shigehara K, Himi T, Ichimiya S. Role of circulating ICOS<sup>+</sup> follicular helper T cells in the pathogenesis of birch pollen allergy. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (AAAAI) Annual Meeting 2016. 平成 28 年 3 月 5~8 日, ロサンゼルス(アメリカ)

6.亀倉隆太, 實川純人, 長屋朋典, 川田耕司, 重原克則, 一宮慎吾, 氷見徹夫: シラカバ花粉症の病態形成における血液濾胞ヘルパー T 細胞の役割, 第 34 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 平成 28 年 2 月 4~6 日, 鳥羽国際ホテル(三重県鳥羽市)

7.Katsunori Shigehara, Ryuta Kamekura, Koji Kawata, Tomonori Nagaya, Tetsuo Himi, Shingo Ichimiya: The analysis of follicular helper T cell in the patients with chronic obstructive pulmonary disease, 第 44 回日本免疫学会学術集会, 平成 27 年 11 月 18-20 日 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

8.Ryuta Kamekura, Katsunori Shigehara, Sumito Jitsukawa, Tomonori Nagaya, Koji Kawata, Tetsuo Himi, Shingo Ichimiya:

Relative decrease in regulatory B cells is associated with the progression of allergic rhinitis to bronchial asthma under the unique skewing of type 2 follicular helper T cells, 第 44 回日本免疫学会学術集会 (平成 27 年 11 月 18-20 日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市))

9.重原克則, 亀倉隆太, 川田耕司, 長屋朋典, 實川純人, 宮島さつき, 高橋弘毅, 氷見徹夫, 一宮慎吾: アトピー型気管支喘息およびアレルギー性鼻炎における末梢血濾胞ヘルパー T 細胞と制御性 B 細胞の検討, 第 19 回北海道アレルギー研究会, 平成 27 年 6 月 27 日, 札幌医科大学 (北海道札幌市)

10.山下恵司, 川田耕司, 實川純人, 長屋朋典, 松宮 弘, 亀倉隆太, 一宮慎吾, 氷見徹夫: ヒト扁桃に存在する濾胞ヘルパー T 細胞の制御機構の解明, 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 平成 27 年 5 月 20-23 日, 東京国際フォーラム (東京都千代田区)

11.長屋朋典, 光澤博昭, 黒瀬 誠, 氷見徹夫: 当科における小児気道確保手術の検討, 第 10 回日本小児耳鼻咽喉科学会学術講演会, 平成 27 年 5 月 8-9 日, 軽井沢プリンスホテル・ウエスト (長野県北佐久郡)

12.高橋 希, 黒瀬 誠, 光澤博昭, 長屋朋典, 高野賢一, 氷見徹夫: 頸部と背部に発生した多発脂肪芽腫の 1 例, 第 10 回日本小児耳鼻咽喉科学会学術講演会, 平成 27 年 5 月 8-9 日, 軽井沢プリンスホテル・ウエスト (長野県北佐久郡)

13.實川純人, 亀倉隆太, 川田耕司, 熊谷綾子, 佐藤明紀, 長屋朋典, 山下恵司, 氷見徹夫, 一宮慎吾: 甲状腺癌発生におけるソーティングネキシン 5 の機能的意義, 第 104 回日本病理学会総会, 平成 27 年 4 月 30-5 月 2 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

14.長屋朋典, 亀倉隆太, 山下恵司, 實川純人, 三橋由佳梨, 関伸彦, 川田耕司, 一宮慎吾, 氷見徹夫: 濾胞ヘルパー T 細胞の分化誘導機構と疾患関連性の検討, 第 27 回日本口腔・咽頭科学会総会・学術講演会, 平成 26 年 9 月 11 - 12 日, ホテルライフフォート札幌 (北海道札幌市)

15.Yamashita K, Mitsuhashi Y, Nagaya T, Jitsukawa S, Kamekura R, Seki N, Kumagai A, Kawata K, Himi T, Ichimiya S. POU2AF1 arranges systemic distribution of follicular helper T cells. Immunology 2014, AAI Annual Meetin, 平成 26 年 5 月 2-6 日, ピッツバーグ(アメリカ)

16.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 回日本病理学会総会, 平成 26 年 4 月 24-26 日, 広島国際会議場他 (広島県広島市)

17.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 回日本病理学会総会, 平成 26 年 4 月 24-26 日, 広島国際会議場他 (広島県広島市)

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, 平成 26 年 2 月 6-8 日, ホテルクレメント徳島 (徳島県徳島市)

〔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:  
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  
長屋朋典 (NAGAYA TOMONORI)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 60517902

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )