

濾胞性ヘルパーT細胞 (Tfh) の制御機構の解明

東京理科大学薬学部生命創薬科学科

原田 陽介

1. 背景 目的

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超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、この役割を濾胞性ヘルパー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細胞は他のヘルパー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細胞は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、体細胞超突然変異を誘導する。その後Tfh細胞はメモリー細胞に分化し、生体内で長期維持されると考えられているが、このメモリーTfh細胞がどのようなメカニズムにより生み出されるのか、2次抗体産生応答に対してどれだけ寄与しているか、また他のヘルパーT細胞由来のメモリーT細胞と何が違うのかという点についてはよくわかっていない。

これまでの研究からTfh細胞はメモリー細胞として維持されること、そしてこれらのメモリー細胞は2次応答において非常に効率的にB細胞による抗体産生を誘導することが示されてきた。しかしながらTfh細胞のマーカであるケモカインレセプターCXCR5やマスター転写因子であるBcl6はTfh細胞がメモリー細胞になった段階ではその発現が激減してしまう。そのため生体内でTfh細胞を継続的に追跡し、その機能を調べることは非常に困難であり、Tfh細胞からメモリー細胞への移行の過程やメモリー細胞の機能を正しく評価することはできなかった。そこで本研究ではTfh細胞を長期に渡り追跡可能な遺伝子改変マウスを作製し、Tfh細胞がどのような過程を経てメモリー細胞に変化していくのか、また他のメモリーT細胞と比べてどのような特徴を持っているのかを明らかにする。

2. 方法

Tfh細胞のメモリー細胞への移行を追跡し、それらの細胞機能を評価するためにTfh細胞の細胞表面マーカであるCXCR5の発現と同時にタモキシフェン誘導性Creリコンビナーゼ (CreERT2) を発現するマウス ($Cxcr5^{CreERT2}$) とTfh細胞のマスター転写因子であるBcl6の発現と同時に蛍光タンパク質tdTomatoとCreERT2を発現するマウス ($Bcl6^{Tomato-CreERT2}$) を作製した。さらに $Cxcr5^{CreERT2}$ マウスとCreリコンビナーゼの誘導により蛍光タンパク質tdTomatoを発現するマウス ($R26^{Tomato}$) をかけ合わせ、CXCR5を発現したTfh細胞にtdTomatoを持続的に発現させることができるシステム ($Cxcr5^{CreERT2} R26^{Tomato}$) を構築した。このマウスにタモキシフェンを投与し、CXCR5を発現したTfh細胞にtdTomatoを発現させ、tdTomatoの蛍光を指標に生体内でTfh細胞を継続的に追跡した。

3. 結果

$Cxcr5^{CreERT2} R26^{Tomato}$ マウスのCXCR5⁺細胞にtdTomatoを発現させることができるかを確かめるために $Cxcr5^{CreERT2} R26^{Tomato}$ マウスにタモキシフェンを投与し、その2日後にパイエル板に存在するリンパ球を解析した。パイエル板では腸内細菌叢などに由来する抗原刺激により、恒常的にTfh細胞の分化と胚中心の形成が観察される。CD4⁺ヘルパーT細胞をフローサイトメーターで解析したところ、CXCR5⁺細胞の約80%にtdTomatoの発現が誘導された。また、CXCR5^{hi}PD-1^{hi}Tfh細胞の約90%にtdTomatoの発現が観察された。Fas⁺GL7⁺胚中心B細胞では約90%の細胞でtdTomatoが発現したが、Fas⁺GL7⁻B細胞ではほとんどの細胞でCXCR5を発現しているにもかかわらず25%程度の細胞でのみtdTomatoの発現がみられた。これらの結果から $Cxcr5^{CreERT2} R26^{Tomato}$ マウスはCXCR5を発現するTfh細胞に効率的に蛍光タンパク質tdTomatoを発現させることができることが確認された。

次に抗原特異的なTfh細胞がメモリー細胞になるまでを継続的に観察するためにオボアルブミン(OVA) 特異的なT細胞レセプターを発現するOT2マウスと $Cxcr5^{CreERT2} R26^{Tomato}$ マウスをかけ合わせ、そのマウスからナイーブT細胞を取り出し野生型マウスに移入後、OVAで免疫した。免疫後4日目と6日目にタモキシフェンを投与し、5、6、7、8日目に脾臓中のドナーT細胞をフローサイトメーターにより解析した。5日目では約50%のCXCR5⁺ドナーT細胞でtdTomatoの発現がみられたが、8日目には約80%に達した。もう一つのTfh細胞マーカであるPD-1の発現はtdTomato⁻ドナーT細胞に比べ、tdTomato⁺ドナーT細胞の

方が常に高かった。一方、CCR7の発現はtdTomato⁻ドナーT細胞に比べ、tdTomato⁺ドナーT細胞の方が常に低かった。5日目と8日目の脾臓の切片を蛍光顕微鏡下で観察したところ、5日目では約40%tdTomato⁺ドナーT細胞がT細胞領域とB細胞領域の境界領域に存在し、同程度の細胞がB細胞領域の内部に存在した。8日目ではtdTomato⁺ドナーT細胞の約70%がB細胞領域およびGL7⁺の胚中心に存在した。これらの結果からOVA特異的なTfh細胞にtdTomatoの発現が誘導されたことが確認された。

免疫後28日目の脾臓中に存在するドナーT細胞のうち、60%程度がtdTomato⁺であった。これらのtdTomato⁺T細胞のCXCR5とPD-1の発現は大きく減少していた。一方、CCR7の発現は上昇していた。それに伴い、tdTomato⁺細胞はB細胞領域からT細胞領域に移行していることが観察された。これらの結果からTfh細胞特異的に蛍光タンパク質を発現させることで、Tfh細胞をエフェクター期からメモリー期まで長期的に追跡することが可能であることが示された。

Bcl6^{Tomato-CreERT2}マウスはBcl6の発現に伴い、tdTomatoとCreERT2を発現するマウスであり、Bcl6の発現をモニターしながら、Tfh細胞特異的にloxP配列に挟まれた遺伝子を欠損できるシステムである。そこでまずは*Bcl6*^{Tomato-CreERT2}マウスがBcl6遺伝子発現をモニターできるレポーターマウスとして機能するかを検討した。

Bcl6^{Tomato-CreERT2}マウスのパイエル板に存在するCD4⁺ヘルパーT細胞をフローサイトメーターで解析したところ、CXCR5⁺PD-1⁺Tfh細胞にtdTomatoの発現が観察された。

次に抗原特異的なTfh細胞でtdTomatoの発現が誘導されるかをOT2 *Bcl6*^{Tomato-CreERT2}マウスから精製したナイーブT細胞をホストマウスに移入後、OVAで免疫することで検討した。フローサイトメーターにより脾臓中のドナーT細胞のtdTomatoの発現を検討したところ、CXCR5の発現強度に比例してtdTomatoの発現が増加することが観察された。これらの結果から*Bcl6*^{Tomato-CreERT2}マウスはBcl6の発現をモニターできるレポーターマウスとして使用できることが示された。

4. 考察 まとめ

これまでTfh細胞特異的な遺伝子改変が可能なツールは報告されていなかったが、今回我々が作製した*Cxcr5*^{CreERT2}マウスと*Bcl6*^{Tomato-CreERT2}マウスは、それを可能とする世界初のツールである。これらのマウスを使うことで、上記の結果のように生体内でTfh細胞を継続的に追跡することが可能になった。今後はTfh細胞のメモリー細胞への分化やTfh由来メモリー細胞の維持のメカニズムを検討していく予定である。さらにTfh細胞特異的に様々な遺伝子を欠損させることで、Tfhの機能制御メカニズムにも迫っていきたいと考えている。

5. 発表論文

Takebe T, Sakamoto K, Higami Y, Harada Y. (2017) A novel mouse model for tracking the fate of CXCR5-expressing T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.029>