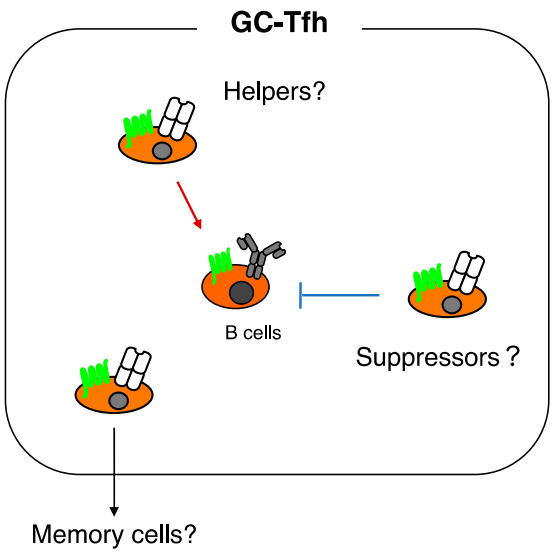
142　濾胞性ヘルパーT細胞の記憶細胞分化の分子基盤の解明	森　大輝

【目的】免疫応答を活性化する場所であるリンパ節は、感染などが起こり、その抗原がリンパ節に流入すると、一部の活性化した T 細胞が B 細胞領域に進入する。この B 細胞領域に進入した T 細胞は濾胞性 T ヘルパー細胞（T follicular helper cells：Tfh 細胞）と呼ばれ、その後、胚中心（Germinal center：GC）と呼ばれる構造に入り、B 細胞の活性化を助け、抗体の親和性成熟や形質細胞分化に重要な役割を果たす。この Tfh 細胞への分化には Bcl6 と呼ばれる転写因子が重要であることなどが明らかとなっているが、Tfh 細胞が胚中心に進入する機序や、胚中心に入った Tfh 細胞（GC-Tfh 細胞）がどのような運命をたどるのか、その詳細はこれまでにあまり明らかではない。本研究ではこの機序を明らかにすることを目的とし、GC-Tfh 細胞の詳細な遺伝子発現の解析や、GC-Tfh 細胞が記憶細胞へと分化するメカニズムの解明を目指して研究を実施した。

【方法】Influenza A virus によるマウス感染実験モデルを用いた。また、抗原特異的 T 細胞を解析するために、pMHC-Ⅱ tetramer を作製し、感染モデルにおける抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞集団の遺伝子発現解析や TCR レパトア解析を行った。GC-Tfh 細胞を解析するために、以前に理化学研究所の岡田峰陽博士の研究室で樹立された S1PR2-Venus knock-in mice を用い、Venus の発現を基に GC-Tfh 細胞の解析及び採取をマルチカラーフローサイトメトリー及びセルソーティングで行った。

【結果】感染実験モデルから採取した抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の scRNAseq の結果、Tfh 細胞型、記憶細胞型、Th1 細胞型などの細胞集団が検出できた。また、これらの細胞が発現する TCR クローン解析の結果、TCR レパトアによって Tfh 細胞型に分化しやすいものや Th1 細胞型に分化しやすいものが存在することが明らかとなった。また、GC に局在する T 細胞にも遺伝子発現、TCR クローンの双方において scRNAseq 解析を行った。その結果、GC-Tfh 細胞は特徴的な遺伝子発現プロファイルを持つ幾つかのサブセットに分類できる可能性が明らかとなった。

GC-Tfh 細胞は不均一性があり、幾つかの役割の異なるサブセットに分類できる



142. 濾胞性ヘルパーT 細胞の記憶細胞分化の分子基盤の解明

森　大輝

大阪大学 感染症総合教育研究拠点 感染症・生体防御研究部門 生体応答学チーム

Key words：T 細胞，感染免疫，液性免疫

緒　言

ウイルスなどの病原菌感染に対する免疫応答やワクチンによる予防には、T 細胞や B 細胞を効率良く記憶細胞へ分化させることが重要である。T 細胞サブセットの一つ濾胞性ヘルパーT 細胞（Tfh 細胞）は B 細胞をヘルプし抗体産生を促進する。この T 細胞－B 細胞の相互作用は、主に胚中心（Germinal Center：GC）と呼ばれる免疫応答に伴いリンパ組織に誘導される構造で行われる［1］。胚中心の誘導には Tfh 細胞が重要であることや、この Tfh 細胞が B 細胞を効率よくヘルプすることが良質な抗体の産生に重要であることが報告されている[2]。つまり Tfh 細胞が B 細胞をヘルプし胚中心反応を持続させるメカニズムの詳細を明らかにすることで、効率の良い免疫応答を誘導する方法の開発などに役立つ可能性もある。この Tfh 細胞への分化には Bcl6 と呼ばれる転写因子が重要であることなどが明らかとなっているが、Tfh 細胞が胚中心に進入する機序や、胚中心に入った Tfh 細胞（GC-Tfh 細胞）がどのような運命をたどるのか、記憶細胞に分化することができるのか？という疑問に関してはこれまであまり明らかにされていない。とりわけ、GC に進入した Tfh 細胞を見分ける手法はいくつか提唱されているものの、現状では統一された手法が存在しない。そこで本研究では、GC B 細胞を GC に留める為に必須の受容体として同定され、以前に Tfh 細胞でも同様の役割を果たすと報告されている受容体 S1PR2 の発現を基に、GC-Tfh 細胞を定義した［3］。この S1PR2 を発現する GC-Tfh 細胞の遺伝子発現解析・TCR レパトア解析を行い、GC-Tfh 細胞の成熟過程を明らかにすることを目的とした。また、T 細胞の抗原認識による活性化が GC-Tfh 細胞分化に及ぼす役割を解析するために、pMHC-Ⅱ Tetramer を作製し、抗原特異的な T 細胞が Tfh 細胞、GC-Tfh 細胞に分化する機序の解明を目指した。

方　法

本研究では S1PR2 の発現をモニターするために、理化学研究所の岡田峰陽博士の研究室で樹立された S1PR2-Venus knock-in mice を用いた。このマウスと Influenza A virus によるマウス感染実験モデルを用いて、GC-Tfh 細胞の解析及び採取をマルチカラーフローサイトメトリー及びセルソーティングで行った。また、抗原特異的 T 細胞を検出するために、James J Moon 博士らの論文［4］を参考にして Influenza A virus 由来の T 細胞抗原エピトープを搭載した pMHC-Ⅱ Tetramer を作製し、抗原特異的 T 細胞の採取を行った。ソーティングで分離した GC-Tfh 細胞および抗原特異的 T 細胞を single cell RNA sequencing 法（scRNAseq）に供し、個々の細胞の遺伝子発現・TCR レパトア解析を行った。

結　果

1. 作製した pMHC-tetramer の確認

今回使用した抗体パネルには、抗原特異的な T 細胞を検出するために、2 種類の異なる pMHC-Ⅱ tetramer を新たに作製し、導入した。この作製した pMHC-Ⅱ tetramer が使用可能かどうかを検討するために Influenza A

virus 感染マウスと非感染マウスから縦隔リンパ節を採取し、細胞染色後、マルチカラーフローサイトメトリーで解析を行った（図 1）。今回作製した pMHC-Ⅱ tetramer#1、pMHC-Ⅱ tetramer#2 で染色される細胞が、感染マウス由来の縦隔リンパ節で増殖していることが確認できた。

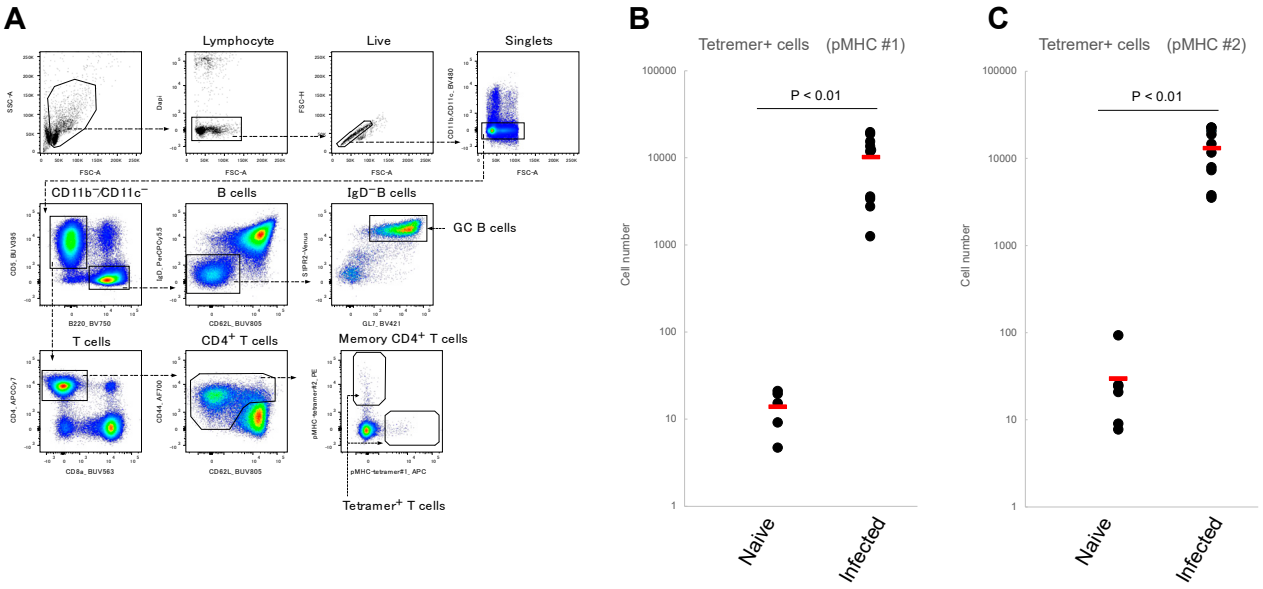


図 1. 作製した pMHC-Ⅱ tetramer を使用した抗原特異的 T 細胞の解析

A) フローサイトメーター解析に使用した gating strategy。

B、C) Influenza A virus 感染マウス、非感染マウスにおける抗原特異的 T 細胞の解析。感染マウスは感染後 2 週間のものを使用した。それぞれの縦隔リンパ節を採取し、細胞を計数しフローサイトメーター解析で明らかとなった pMHC-tetramer 陽性細胞の割合をもとに抗原特異的 T 細胞の細胞数を計算した。P 値は t 検定を用いて解析した。

2. 抗原特異的 T 細胞の scRNAseq による遺伝子発現・TCR レパトア解析

インフルエンザ感染モデルにおける pMHC-Ⅱ tetramer 陽性 CD4 陽性 T 細胞を採取し、scRNAseq 解析を行った。遺伝子発現を基にしたクラスタリングや UMAP を用いた次元圧縮などにより、採取した抗原特異的 T 細胞を、CXCR5 や S1PR2 を発現する Tfh 細胞、KLF2 などを発現する記憶細胞、CXCR6 を発現する Th1 細胞などのクラスターに分類した。その後、これらの細胞集団の TCR レパトア解析を行った（図 2）。それぞれの集団に属する細胞が持つ TCR レパトアを解析したところ、Tfh 細胞では優位に増殖しているクローンが大多数を占めていること、一方、Th1 細胞では、いくつかのクローンが優位に増殖しているものの、母集団に比べるとクローンの多様性が高い傾向があった。また、それぞれの細胞集団で検出されたクローンの特異性と冗長性を検討したところ、Th1 細胞、Tfh 細胞、記憶細胞の集団で共通するクローンは 14 個存在した。また、この 14 個のクローンのいずれかをもつ T 細胞は、全体の 90%以上を占めることが明らかとなった。一方で、共通するクローンの中でも、均一に分化しているもの、Tfh 細胞に分化しやすいもの、Th1 細胞に分化しやすいものなどが存在することが明らかとなった。

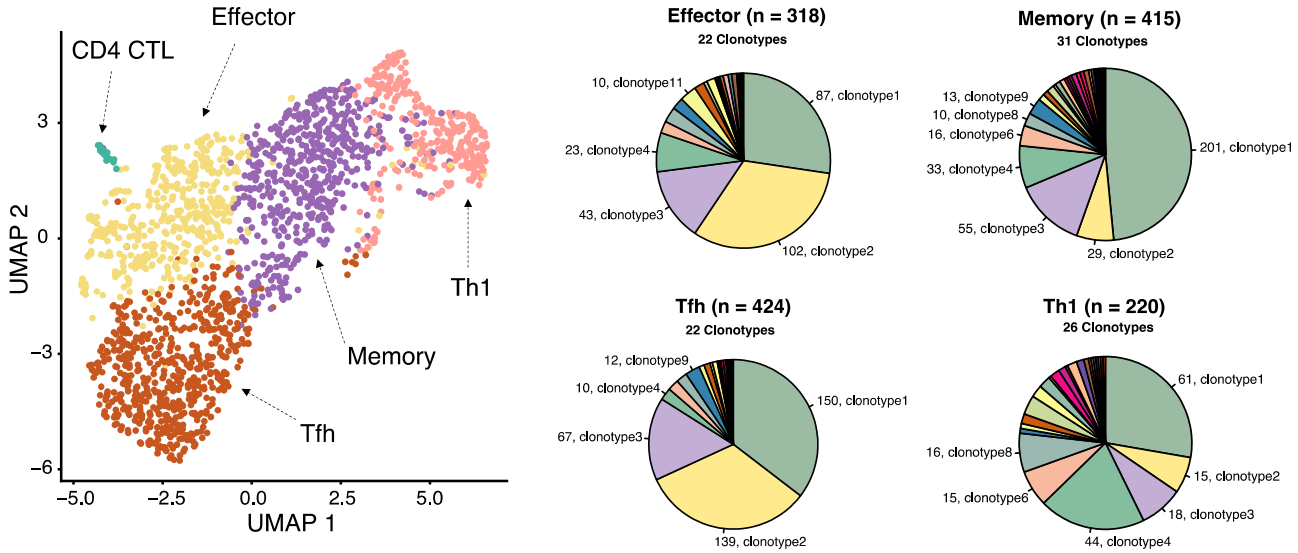


図 2. 抗原特異的 T 細胞 scRNAseq 結果の UMAP 解析

Influenza A virus 感染後 2 週間のマウスから縦隔リンパ節を採取し、抗原特異的 T 細胞を採取後、scRNAseq 解析を行った。遺伝子発現解析をもとに細胞のクラスタリングを行い、その中に含まれる細胞の TCR レパトア解析を行った。

3. GC-Tfh 細胞の scRNAseq による遺伝子発現・TCR レパトア解析

次に、GC-Tfh 細胞を採取し、scRNAseq での遺伝子発現解析と TCR レパトア解析を行った。遺伝子発現解析を基にしたクラスタリングの結果、C1、C2、C3、C4 の 4 つのクラスターに分類できる可能性が明らかとなった。これらの細胞の TCR レパトア解析を行ったところ、それぞれのクラスター全てで共通する TCR レパトアはほとんどないことが明らかとなった（図 3）。一方、C2 のクラスターにはそれぞれ、C1 もしくは C3 と共通の TCR クローンが存在することが明らかとなった。以上の結果より、胚中心 Tfh 細胞はいくつかのサブセットに分かれており、その分化は TCR もしくは抗原特異性によって制御されている可能性が考えられる。

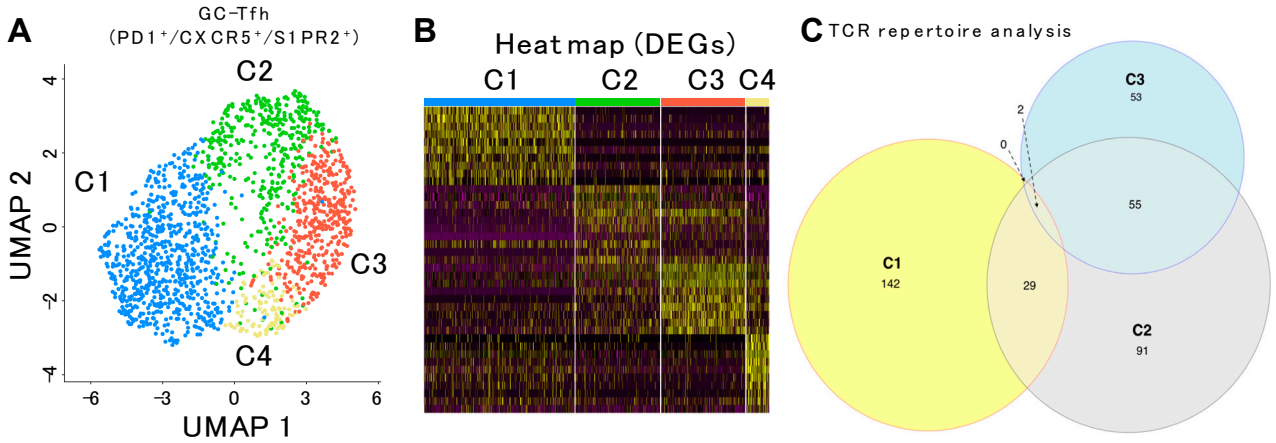


図 3. GC-T 細胞での scRNAseq 解析

A) 遺伝子発現をもとにした GC-Tfh 細胞の UMAP を用いたクラスタリング解析。

B) 異なる発現様式を示す遺伝子の heat map plot。

C) クラスタリングごとの TCR レパトアの解析。

考　察

今回の結果により、感染応答に伴って優位に増殖する T 細胞クローンは、異なるサブセットに分化する能力を持ち、免疫応答の多様性を担保していると考えられる。また GC-Tfh 細胞は 4 つのクラスターに分類できることが明らかとなった。GC-Tfh 細胞には様々なクローンを持つ T 細胞が進入してくるが、それぞれのクローンによって GC-Tfh 細胞の遺伝子発現が制御されている可能性も示唆された。このうち C2 に分類された細胞には、C1 に共通する TCR を発現するものと、C3 に共通する TCR を発現するものが存在することが明らかとなった。この結果より、（i）C2 は C1 と C3 へ分化する細胞の前駆細胞である可能性、（ii）C2 は記憶細胞プールであり C1 や C3 から分化している可能性、が考えられた。この GC-Tfh 細胞の heterogeneity は、免疫応答の持続や、記憶細胞を樹立し再感染に備えるために重要な役割を果たしていることが推察される。

共同研究者・謝辞

本研究は、大阪大学感染症総合教育研究拠点感染症・生体防御研究部門生体応答学チーム教授である伊勢渉博士の協力・助言のもと実施することができた。

文　献

1） Victora VD and Nussenzweig MC, Germinal Centers., *Annu. Rev. Immunol.*, 2022, Apr 26:40:413-442. doi: 10.1146/annurev-immunol-120419-022408. Epub 2022 Feb 3., PMID: 35113711

2） Kelsoe G and Haynes BF, Host controls of HIV broadly neutralizing antibody development, *Immunol. Rev.*, 2017, 2017 Jan;275(1):79-88. doi: 10.1111/imr.12508, PMID: 28133807

3） Moriyama S, Takahashi N, Green JA, Hori S, Kubo M, Cyster JG, Okada T ., Sphingosine-1-phosphate receptor 2 is critical for follicular helper T cell retention in germinal centers., *J. Exp. Med.*, 2014., Jun 30;211(7):1297-305., doi: 10.1084/jem.20131666. Epub 2014 Jun 9, PMID: 24913235

4） Moon JJ and Pepper M, Generation of Allergen-Specific Tetramers for a Murine Model of Airway Inflammation., *Methods. Mol. Biol.*, 2018, 1799:165-181. doi: 10.1007/978-1-4939-7896-0_14. PMID: 29956152