

领域前沿 · 中国



祁海, 清华大学医学院教授、博士生导师。2003年毕业于德克萨斯州加尔维斯顿医学院, 获病理学博士学位; 主要从事免疫寄生虫学研究。2003年6月至2009年4月在美国国立卫生研究院从事博士后研究; 参与完善了基于双光子显微镜的在体免疫组织动态成像技术, 主要关注体液免疫调节、多细胞在体交互作用机制、细胞与组织动态对免疫反应及记忆的影响。对其领域的主要贡献包括: 2006年, 在《科学》证明B细胞在体内受树突状细胞活化的过程; 2008年, 在《自然》揭示SAP分子调控T-B细胞相互作用; 2013年, 在《自然》鉴定ICOS分子调控滤泡辅助T细胞运动能力的新机制。祁海教授是教育部“跨世纪优秀人才”, 曾获得《科学新闻》与Elsevier “Scopus未来科学之星”金奖, 是 *Science*、*Journal of Experimental Medicine* 的审稿人, 是 *Immunity*、*Inflammation and Disease* 杂志和 *Nature.com* 在线杂志 *Scientific Reports* 编委。

协同刺激信号分子ICOS在滤泡性 辅助T细胞分化中的作用

徐和平 祁海*

(清华大学医学院动态免疫生物学实验室, 北京 100084)

高亲和力、同种型转换过的抗体是机体长效抵抗微生物感染、维持自身健康的重要机制之一。抗体成熟过程发生在次级淋巴器官中一个主要由活化B细胞组成的特殊区域, 称之为生发中心(germinal center, GC)^[1-2]。生发中心反应是B细胞向记忆性细胞和骨髓中长期存活的浆细胞分化的重要选择阶段, 而这两群B细胞对于迅速的体液免疫反应都是不可或缺的^[3-4]。因此, 生发中心反应是获得性免疫应答过程中最为关键的步骤。但是生发中心反应不仅仅只有B细胞的参与, 还需要一部分CD4⁺ T细胞从T细胞区域迁移到B细胞区(又称之为滤泡区), 去辅助GC B细胞的存活与克隆增殖^[1,5-6]。由于这群具有很强辅助能力的CD4⁺ T细胞特异的在滤泡区发挥功能, 因此被命名为滤泡性辅助T细胞(follicular helper T cells, Tfh cells)^[7-8]。

Tfh细胞有其独特的基因表达谱, 如高表达Bcl-6、

CXCR5、ICOS、PD-1、IL-21、SLAM-associated protein(SAP), 以及SLAM家族成员CD84^[9-10]。然而, 相对于其他诸如Th1、Th2、Th17等CD4⁺辅助T细胞亚型而言, 定位于滤泡区域是Tfh细胞最重要的特征^[11-12]。这种特异的定位不仅仅是Tfh细胞的分化特征, 更为重要的是Tfh细胞与抗原特异B细胞在滤泡区域的共定位接触是其辅助B细胞的主要途径^[13-14]。例如Tfh细胞需要通过CD40L与GC B细胞上的CD40结合来给GC B细胞提供存活信号, CD40L-CD40信号传递就依赖于Tfh细胞与GC B细胞的直接物理性接触^[6,15-17]。而T细胞与B细胞的共定位接触一旦出现问题, 就会导致严重的免疫缺陷症状。如SAP分子的缺陷会导致T细胞与抗原特异B细胞之间的稳定结合能力下降, 进而影响生发中心形成和高亲和力抗体的产生, 最终导致XLP(X-linked lymphoproliferative disease)等疾病的发生^[18-20]。同时, 已有很多的研究表明, Tfh细胞与自身免疫疾病、艾滋病、淋巴瘤等重大疾病防治都有密切关系^[21-25]。然而, T细胞具体是如何迁移到滤泡区域分化形成

*通讯作者。Tel: 010-62796757, E-mail: qihai@mail.tsinghua.edu.cn

*Corresponding author. Tel: +86-10-62796757, E-mail: qihai@mail.tsinghua.edu.cn

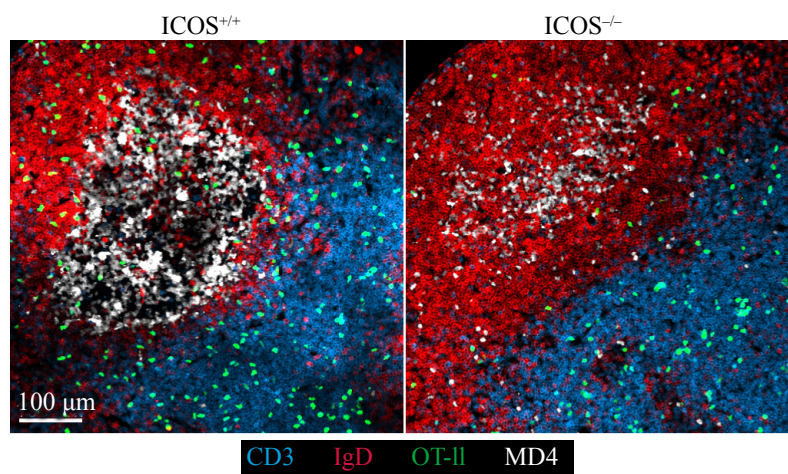
Tfh细胞还不明确。

目前,根据已有的研究结果建立的T细胞迁移模型完全以趋化因子受体CXCR5为主体^[26]。在T细胞处于未活化状态时,T细胞会高表达趋化因子受体CCR7,而不表达CXCR5。CCR7能够响应T细胞区域基质细胞分泌的趋化因子CCL21/19,从而使T细胞定位于T细胞区。当T细胞被抗原活化后会下调CCR7,同时上调Tfh细胞的转录调控因子Bcl6,进而促进CXCR5表达。由于CXCR5是滤泡区域趋化因子BLC的受体,所以T细胞会在BLC的诱导下向滤泡区迁移,进而最终分化成为Tfh细胞^[27-29]。同时有研究发现,协调刺激信号分子ICOS(inducible co-stimulatory molecule)能够从树突状细胞上通过ICOSL(ICOS的配体)获取上调Bcl6和CXCR5的信号^[30]。所以,树突状细胞通过ICOSL作用于T细胞上的ICOS,进而上调转录因子Bcl6,最后再促进CXCR5的表达是目前已知的Tfh细胞分化的主要通路。然而,依然存在着与该分化通路不一致的研究结果,比如最近发现CXCR5最开始的上调并不依赖转录因子Bcl6的表达^[31];并且CXCR5缺陷的T细胞依然能够迁移到滤泡区支持生发中心反应^[32]。因此,T细胞具体是如何迁移到滤泡区域分化形成Tfh细胞的目前并不明确。

在分析以上研究背景的基础上,协同刺激信号分子ICOS成为了我们主要的关注对象。因为ICOS

缺陷会导致T细胞完全丧失向滤泡区域迁移的能力,同时ICOS缺陷T细胞也不能上调CXCR5的表达,不能支持生发中心的形成(图1)。因此,在ICOS缺陷T细胞上过表达CXCR5能否提高T细胞向滤泡区内迁移的能力是首先要验证的问题。利用逆转录病毒系统在ICOS^{-/-}T细胞上过表达CXCR5分子后,再通过尾静脉注射的方式将T细胞回输到小鼠体内,最后利用特异性抗原在体内诱导免疫反应。通过组织切片检测T细胞的定位发现,ICOS^{-/-}T细胞中过表达CXCR5只是促进T细胞迁移到T-B交界区(T细胞区和滤泡区域的交界重叠区域),但是并不能使ICOS^{-/-}T细胞完全进入到滤泡区内。

由于ICOS是经典的协调共刺激信号分子,T细胞在与树突状细胞或者抗原特异B细胞进行抗原特异相互作用时,可以通过ICOS-ICOSL的相互作用获取共刺激信号。并且已有研究证明,抗原呈递细胞上的ICOSL对于Tfh细胞分化和维持都有重要作用^[30-33]。同时,Bcl6被认为是Tfh细胞分化转录调控因子,它的缺失或者高表达会直接影响体内Tfh细胞的分化^[27-28,34]。然而,在建立不同组合的细胞共回输动物实验的基础上,我们发现Bcl6和来源于抗原呈递细胞上的ICOSL对于ICOS依赖型的T细胞向滤泡区迁移的过程都不是必须的。因此,ICOS调节滤泡区招募辅助T细胞的过程并不完全需要特异性的抗原信号存在。进一步通过检测T细胞在无关抗原免



野生型或ICOS缺陷型OT-II T细胞与MD4 B细胞过继转移到B6小鼠体内后,用HEL-OVA偶联蛋白免疫。五天后通过组织切片染色观察OT-II细胞的位置和MD4生发中心的大小。

Wild-type or ICOS-deficient OT-II T cells were co-transferred with MD4 B cells into normal B6 hosts before HEL-OVA immunization. Five days later, the OT-II T cell location and MD4 germinal center were visualized on sections of the draining lymph node.

图1 ICOS缺陷T细胞无法进入滤泡区、不支持生发中心的产生

Fig.1 ICOS-deficient T cells fail to enter the follicle and support germinal center development

疫或者完全没有免疫的宿主小鼠体内的归巢能力, 我们发现过表达CXCR5的野生型T细胞就能够运动到滤泡区域, 而ICOS^{-/-} T细胞不能向滤泡区域归巢。这一实验结果直接说明了ICOS可以在抗原信号之外调节T细胞向滤泡区内运动。

接下来的问题是, 滤泡区内什么细胞可以通过ICOS为活化T细胞提供信号来促进T细胞向滤泡区内迁移, 并且这群细胞还不参与抗原信号的呈递? 我们关注到, 滤泡区内大量未活化B细胞能够持续表达ICOSL。那么, 当活化T细胞运动到T-B交界区域时, T细胞就会“浸没”在未活化B细胞中, 这些未活化B细胞就有可能通过ICOSL来持续性刺激ICOS, 进而促进T细胞向滤泡内迁移。为了验证这个假设, 我们首先利用 μ MT小鼠来源的干细胞不能分化形成成熟B细胞这一特性, 建立了 μ MT:ICOSL^{-/-}骨髓重建小鼠模型。在该小鼠嵌合体模型内, 所有B细胞都来源于ICOSL^{-/-}干细胞, 因此B细胞上都特异地缺失了ICOSL表达。当将抗原特异T细胞回输到这种嵌合体小鼠体内, 发现免疫后的T细胞都不能迁移到滤泡区域。因此, 未活化B细胞上的ICOSL是ICOS调节T细胞向滤泡区域运动的必要条件。

然而, ICOSL-ICOS相互作用具体是如何在独立于抗原信号之外调节T细胞定向运动的还不明确。目前, 已知T细胞向滤泡区域的定向运动主要是靠CXCR5和CCR7感知不同的趋化因子来控制的^[26,29]。CXCR5过表达实验说明, 趋化因子受体的表达量并不影响ICOS这种直接调节T细胞运动的能力。同时, 利用体外细胞穿孔迁移实验发现, 刺激ICOS也不能改变T细胞对不同趋化因子的响应敏感度。因此, 仅仅依靠趋化运动并不能解释ICOS调节T细胞定向迁移的能力。细胞定向迁移的效率取决于两个因素: 一是细胞感知趋化因子受体的浓度梯度; 二是细胞的持续随机运动能力^[35-36]。细胞的形态极化和伪足形成是细胞持续性随机运动的特征, 持续性随机运动能够使细胞在短时间内维持一定方向上的运动持续性, 进而提高细胞感知趋化因子浓度的效率, 最终促进细胞定向运动的能力^[37-38]。因此, 我们首先利用TIRF显微镜在磷脂双分子层膜上检测T细胞的形态和运动能力, 发现ICOS刺激可以使T细胞发生极化, 并不停地形成伪足, 进而维持一定的运动迁移能力。因此, ICOS促进滤泡区域招募辅助T

细胞的机制可能是ICOS可以提高T细胞的持续性随机运动。根据体外的实验数据, 我们采用活体内双光子显微镜观测了ICOS野生或者缺陷型T细胞在体内T-B交界区域的运动能力。与野生型T细胞相比, ICOS^{-/-} T以更高的频率出现在无伪足的未极化状态, 进而导致T细胞在运动速度、运动持续性上都有非常显著的下降。当利用滤泡区域没有ICOSL表达的 μ MT:ICOSL^{-/-}骨髓嵌合体小鼠作为抗原特异T细胞回输受体时, 研究发现野生型的T细胞在伪足形成、运动速度和持续性上都表现出与ICOS^{-/-} T细胞相同的缺陷。该实验结果进一步说明了ICOSL的确直接通过ICOS来调节T细胞的随机运动能力。

我们的研究工作发现, ICOS可以在独立于协同刺激信号之外, 通过促进T细胞的随机运动能力来直接控制T细胞向淋巴器官滤泡区迁移, 进而决定T细胞的分化方向。ICOS的这种作用依赖于非抗原呈递B细胞上表达的ICOSL。因此, 非抗原呈递B细胞不仅可以作为个体来提供识别抗原的受体库, 同时还可以通过相互合作的方式来为抗原特异的B细胞招募辅助性T细胞。这些结果为理解滤泡辅助T细胞分化通路提供了新线索。同时, ICOS分子在共刺激信号之外对T细胞运动的直接调节作用, 是其发现以来首次在体内得到证明的新功能。这对于理解ICOS以至其它共刺激分子在病理及生理炎症过程中所起的作用会有新的启发。

参考文献 (References)

- 1 MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 117-39.
- 2 Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 429-57.
- 3 Coico RF, Bhogal BS, Thorbecke GJ. Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin. *J Immunol* 1983; 131(5): 2254-7.
- 4 Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 1991; 67(6): 1121-9.
- 5 Fuller KA, Kanagawa O, Nahm MH. T cells within germinal centers are specific for the immunizing antigen. *J Immunol* 1993; 151(9): 4505-12.
- 6 Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, *et al*. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 881-922.
- 7 Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, *et al*. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor

- 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 2000; 192(11): 1545-52.
- 8 Schaarli P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* 2000; 192(11): 1553-62.
- 9 Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Frank N, Hodge MR, Rolph MS, *et al.* T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol* 2004; 173(1): 68-78.
- 10 Kim CH, Lim HW, Kim JR, Rott L, Hillsamer P, Butcher EC. Unique gene expression program of human germinal center T helper cells. *Blood* 2004; 104(7): 1952-60.
- 11 Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 621-63.
- 12 Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 445-89.
- 13 Garside P, Ingulli E, Merica RR, Johnson JG, Noelle RJ, Jenkins MK. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 1998; 281(5373): 96-9.
- 14 Allen CD, Okada T, Tang HL, Cyster JG. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* 2007; 315(5811): 528-31.
- 15 Lane P, Traunecker A, Hubele S, Inui S, Lanzavecchia A, Gray D. Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1992; 22(10): 2573-8.
- 16 Foy TM, Laman JD, Ledbetter JA, Aruffo A, Claassen E, Noelle RJ. gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *J Exp Med* 1994; 180(1): 157-63.
- 17 Han S, Hathcock K, Zheng B, Kepler TB, Hodes R, Kelsoe G. Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. *J Immunol* 1995; 155(2): 556-67.
- 18 Sayos J, Wu C, Morra M, Wang N, Zhang X, Allen D, *et al.* The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 1998; 395(6701): 462-9.
- 19 Crotty S, Kersh EN, Cannons J, Schwartzberg PL, Ahmed R. SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* 2003; 421(6920): 282-7.
- 20 Qi H, Cannons JL, Klauschen F, Schwartzberg PL, Germain RN. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 2008; 455(7214): 764-9.
- 21 Zhang X, Ing S, Fraser A, Chen M, Khan O, Zakem J, *et al.* Follicular helper T cells: New insights into mechanisms of autoimmune diseases. *Ochsner J* 2013; 13(1): 131-9.
- 22 Streeck H, D'Souza MP, Littman DR, Crotty S. Harnessing CD4(+) T cell responses in HIV vaccine development. *Nat Med* 2013; 19(2): 143-9.
- 23 Perreau M, Savoye AL, De Crignis E, Corpataux JM, Cubas R, Haddad EK, *et al.* Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med* 2013; 210(1): 143-56.
- 24 Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, Perreau M, van Grevenynghe J, Metcalf T, *et al.* Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med* 2013; 19(4): 494-9.
- 25 Hu S, Young KH, Konoplev SN, Medeiros LJ. Follicular T-cell lymphoma: A member of an emerging family of follicular helper T-cell derived T-cell lymphomas. *Hum Pathol* 2012; 43(11): 1789-98.
- 26 Vinuesa CG, Cyster JG. How T cells earn the follicular rite of passage. *Immunity* 2011; 35(5): 671-80.
- 27 Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, *et al.* Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 2009; 325(5943): 1001-5.
- 28 Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, *et al.* Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 2009; 325(5943): 1006-10.
- 29 Haynes NM, Allen CD, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1 high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol* 2007; 179(8): 5099-108.
- 30 Choi YS, Kageyama R, Eto D, Escobar TC, Johnston RJ, Monticelli L, *et al.* ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* 2011; 34(6): 932-46.
- 31 Liu X, Yan X, Zhong B, Nurieva RI, Wang A, Wang X, *et al.* Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program *in vivo*. *J Exp Med* 2012; 209(10): 1841-52, S1-24.
- 32 Arnold CN, Campbell DJ, Lipp M, Butcher EC. The germinal center response is impaired in the absence of T cell-expressed CXCR5. *Eur J Immunol* 2007; 37(1): 100-9.
- 33 Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, *et al.* Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 2008; 29(1): 138-49.
- 34 Yu D, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, *et al.* The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* 2009; 31(3): 457-68.
- 35 Iglesias PA, Devreotes PN. Biased excitable networks: How cells direct motion in response to gradients. *Curr Opin Cell Biol* 2012; 24(2): 245-53.
- 36 van Haastert PJ, Devreotes PN. Chemotaxis: Signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(8): 626-34.
- 37 Insall RH. Understanding eukaryotic chemotaxis: A pseudopod-centred view. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(6): 453-8.
- 38 Kay RR, Langridge P, Traynor D, Hoeller O. Changing directions in the study of chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(6): 455-63.