

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。对该领域的主要贡献包括: 2006年, 在《Science》上证明B细胞在体内受树突状细胞活化的过程; 2008年, 在《Nature》上揭示SAP分子调控T-B细胞相互作用; 2013年, 在《Nature》上鉴定ICOS分子调控滤泡辅助T细胞运动能力的新机制; 2014年, 在《Nature》上揭示生发中心B细胞亲和力成熟筛选的新机制。祁海教授是国家“杰出青年”基金获得者、科技部“973”项目首席科学家、国家“中青年科技创新领军人才”和教育部“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Nature、Science、Journal of Experimental Medicine的审稿人, 也是Scientific Reports编委。

协同刺激分子配体ICOSL参与高亲和力抗体筛选生成的新机制

刘丹 徐和平 祁海*

(清华大学医学院, 清华大学免疫学研究所, 动态免疫生物学实验室, 北京 100084)

摘要 生发中心(germinal center, GC)支持B细胞竞争与亲和力成熟的过程。滤泡辅助T细胞通过与B细胞长时程互作来传递辅助信号并促进生发中心形成。然而, 当生发中心形成以后, T细胞如何调控B细胞间的竞争及选择尚不明确。借助骨髓嵌合体和活体成像研究发现, GC里T-B互作短暂而重复, 由ICOS-ICOSL分子以一种正反馈的方式调控, 而这种正反馈对于迅速、有效地筛选出高亲和力抗体至关重要。这些结果使我们更进一步理解了生发中心亲和力选择的机制。

关键词 生发中心; 滤泡辅助T细胞; 免疫突触; 体液免疫; 抗体

A New ICOSL-driven Mechanism for Germinal Center Selection

Liu Dan, Xu Heping, Qi Hai*

(Laboratory of Dynamic Immunobiology, School of Medicine, Institute for Immunology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract The germinal center (GC) reaction supports affinity-based B cell competition and generation of high-affinity plasma cells. Follicular T-helper (Tfh) cells promote GC formation by delivering help through long-lasting,

*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

网络出版时间: 2015-02-28 14:44 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150228.1444.003.html>

stable conjugation with antigen-specific B cells, but how they regulate GC B cell competition and selection is not clear. Here we show that GC T-B interactions are short and reiterative in nature and controlled by ICOSL-ICOS interactions between the B and T cells in a feedforward manner so that high-affinity B cells can be rapidly selected into the PC (plasma cell) compartment. These new findings represent an important leap forward in our understanding of the GC selection.

Keywords germinal center; follicular helper T cells; immunological synapse; humoral immunity; antibody

免疫系统是机体抵抗感染、维护自身健康的重要屏障。以产生高亲和力抗体为主要效应的体液免疫应答,是免疫系统清除外界抗原物质的重要生理过程。B淋巴细胞在外周淋巴组织中进行增殖和分化,然后进入B细胞区识别抗原,与T淋巴细胞发生相互作用,从而出现增殖性原发灶,继而形成生发中心(germinal center, GC)^[1-2]。被抗原激活的B淋巴细胞在此发生克隆性增殖、Ig可变区基因的体细胞高频突变、Ig类型转换、高亲和力B淋巴细胞克隆的阳性选择以及无关或自身反应性B淋巴细胞克隆的阴性选择,最终生成记忆性B淋巴细胞和浆细胞^[3-4]。在这个过程中, T淋巴细胞给予B淋巴细胞的辅助信号是筛选高亲和力抗体生成B细胞的决定性因素之一,而滤泡辅助T细胞(follicular T-helper cells, Tfh细胞)则可专一地给B淋巴细胞提供帮助,促进B淋巴细胞免疫应答及生发中心的产生和维持的T细胞亚群^[5-6]。

Tfh细胞选择性地高表达其特有的表面分子,如CXCR5(C-X-C chemokine receptor type 5)、PD-1(programmed cell death protein-1)、SAP(SLAM-associated protein)、IL-21(interleukin-21)、SLAM家族成员CD84、CD40L和ICOS(inducible co-stimulatory molecule)以及低表达Blimp-1(B-lymphocyte-induced maturation protein-1)^[7-8]。这个特有的表达谱反映了Tfh细胞两大关键特点:独特的解剖定位和通过接触性互作为抗原特异性B淋巴细胞提供帮助。在免疫反应过程中,B淋巴细胞上表达的CXCR5使其对CXCL13(C-X-C motif chemokine 13)产生响应并运动到一定区域从而形成滤泡区。继而,表达CXCR5的CD4+ T淋巴细胞也能对CXCL13产生响应并定位到B淋巴细胞形成的滤泡区,成为Tfh细胞^[9-10]。这种T淋巴细胞与B淋巴细胞共定位的关系对于T-B细胞之间的相互作用以及TCR与MHC之间的结合都起到了非常关键的作用,直接影响T淋巴细胞在这一过程中对抗原特异性B淋巴细胞的帮助。

比如, SAP的缺失或突变会导致T淋巴细胞与B淋巴细胞之间无法形成紧密的长时间的相互作用,从而影响生发中心和Tfh细胞的生成,进而影响高亲和力抗体的形成,造成X-连锁淋巴细胞增生症等疾病的发生^[11-13]。之所以Tfh-B细胞间抗原特异的长时程接触性作用很重要,是因为B细胞所需的重要辅助因子多是膜表面分子。比如, Tfh细胞表达的CD40L结合B细胞表面CD40受体,从而刺激B细胞增殖及分化。CD40或者CD40L的缺失均会导致生发中心及Tfh细胞的缺失,并且当用抗体来封闭CD40L的活性时,已发育成熟的GC会也迅速萎缩^[14]。有趣的是,尽管Tfh细胞与抗原特异性的B淋巴细胞在滤泡区进行长时程的相互作用,它们在生发中心里往往以很快的速度穿梭,两者间的相互作用大部分是短暂的(一般小于5 min)^[4,13]。那么,在这些短暂的相互作用过程中,Tfh细胞是如何来调节生发中心反应并筛选高亲和力B细胞的?这是我们一直希望回答的问题。

协同刺激分子ICOS及其配体ICOSL均对GC的形成与发育起到重要作用。在小鼠模型中,ICOS或者ICOSL的缺失均会导致生发中心和Tfh细胞的缺失^[15-17],而在ICOS的抑制基因Roquin突变情况下,ICOS的持续表达会增加Tfh细胞的比例,从而引发自身免疫疾病狼疮^[18]。临床研究也发现,在ICOS突变的情况下,人类会出现IgG、IgM和浆细胞缺失的免疫缺陷病,并且这些病人易被细菌和病毒感染^[19-21]。在细胞水平上,ICOS和ICOSL这对分子至少有两方面重要作用:一方面,T细胞能够从树突状细胞的ICOSL上获得ICOS的信号刺激来维持并促进其分化成Tfh细胞,同时ICOS缺陷的T细胞不能上调CXCR5的表达,从而缺失了迁徙进入滤泡区的能力^[17];另一方面,最新的研究表明,独立于协同刺激信号以外,ICOS信号可以通过PI3K通路来诱导T淋巴细胞伪足的产生,直接控制T淋巴细胞在体内迁移运动能力,从而决定其在滤泡区组织中的迁移和分布^[22]。在这

个过程中, 抗原非特异的滤泡旁观B淋巴细胞表面表达的ICOSL至关重要。然而, 抗原激活的B细胞以及GC B细胞都表达ICOSL, ICOS-ICOSL在抗原特异GC B-Tfh细胞互作中起何种作用并不明确。我们猜测, ICOS-ICOSL信号或许参与调控了那种短暂的GC B-Tfh细胞间互作, 进而影响生发中心反应。

为了检验ICOS-ICOSL信号是否调控生发中心反应, 我们使用50%的ICOSL^{+/+}骨髓细胞和50%的ICOSL^{-/-}骨髓细胞构建了混合骨髓重建模型, 在免疫反应的不同时间点检测两种B细胞在生发中心及浆细胞中所占据的比例。我们发现, 在这种竞争条件下, ICOSL^{-/-} B细胞在维持生发中心反应以及发育成浆细胞方面存在缺陷。这些结果说明, ICOS-ICOSL信号确实会调控生发中心反应。那么, 这是否是通过调控GC B细胞与T细胞之间的互作而实现的呢? 对此, 我们利用了双光子显微成像技术来观测ICOSL^{+/+}与ICOSL^{-/-} B淋巴细胞与T淋巴细胞生发中心附近相互运动。我们发现, ICOSL^{-/-} B淋巴细胞与T细胞的接触多是“擦肩”而过的形式, 即两种细胞相互接触的面积很小; 而ICOSL^{+/+} B淋巴细胞却更加倾向于与T淋巴细胞以“交互纠缠”模式进行相互作用, 两者接触表面积很大很充分。另外, 实验发现, T淋巴细胞分别与抗原非特异性的ICOSL^{+/+}和ICOSL^{-/-} B淋巴细胞的相互作用形式没有区别, 均倾向于“擦肩”模式。由此可见, 抗原特异性ICOS-ICOSL的信号能够促进T-B细胞的胞膜接触面积, 使得T细胞能够通过这个接触面更好、更迅速地向B淋巴细胞传递B细胞生存增殖分化所需要的辅助信号, 并且这种“纠缠”般的接触是T细胞受体刺激产生的。

那么, 这种“纠缠”般的T-B细胞间的互作形式对于生发中心反应的发生具体有什么功能性的作用呢? 已有的研究结果表明, 与抗原特异性B淋巴细胞相互作用时, T细胞能够产生钙信号^[23], 所以我们构建了体内基于FRET(fluorescence resonance energy transfer)的钙信号报告系统^[24-25], 能够实时监测T淋巴细胞产生的钙信号。我们发现, T-B细胞间短暂而频繁地“纠缠”般的相互作用能够促使T细胞产生大量的钙信号, 而即使在这种充分地T-B细胞接触下, ICOSL^{-/-} B淋巴细胞依然不能刺激T细胞产生钙响应。同时我们还关注到, 当共刺激T细胞受体和ICOS时, T细胞能够产生更多的钙响应。CD40信号是B

淋巴细胞生存增殖所必需的, 活化的T淋巴细胞内有着大量的CD40L, 但T细胞膜表面的CD40L量是被严格控制的, 其主要是通过外排的过程表达于细胞膜上, 从而跟B细胞接触来给予CD40信号刺激^[26-28]。通过共刺激ICOS增强钙信号, T细胞就可以在与B细胞纠缠互作过程中通过胞吐过程给B淋巴细胞传递的更多的CD40信号。而更加有趣的是, 接收了更多CD40信号的B淋巴细胞会进一步上调其ICOSL的表达量, 从而能够更容易与T淋巴细胞进行“纠缠”互作, 产生更多的钙信号, 进而得到更多的辅助信号, 这就形成了一个正反馈调节。于是我们猜想, T-B细胞之间的这种正反馈调节可能会在生发中心B细胞群相互竞争中构成一种“马太效应”: 高亲和力B细胞将通过更有优势的抗原受体获取更多的抗原, 从而能与Tfh细胞更好地“纠缠”互作; 这会导致B细胞获得更多的CD40L辅助信号进而表达更多ICOSL; ICOSL升高会促进这些B细胞更有效地与T细胞“纠缠”互作, 从而在竞争T细胞帮助的过程中更容易获胜。如此, 正反馈调节可能是高亲和力B细胞能从生发中心被有效选择出来的一个重要保证。

为了进一步验证上述我们的假说, 我们从B细胞定位分化及亲和力成熟两方面进行了实验。获得足够T细胞帮助的B细胞会离开生发中心而分化成浆细胞。所以, 我们将ICOSL^{+/+}和ICOSL^{-/-} B细胞与T细胞共同回输到小鼠体内并免疫, 利用双光子活体成像显微技术来观测两种B细胞与T细胞的分布及运动。结果发现, ICOSL^{+/+} B细胞与Tfh细胞在主要由ICOSL^{+/+} B细胞构成的生发中心里均匀分布, 而当生发中心主要是由ICOSL^{-/-} B细胞构成时, Tfh细胞与ICOSL^{+/+} B细胞共定位在生发中心的外周边缘。边缘分布显示, 这些ICOSL^{+/+} B细胞可能即将离开生发中心, 而少量ICOSL^{+/+} B细胞在与多数ICOSL^{-/-} B细胞竞争时仍能“纠缠”住Tfh细胞, 暗示正反馈循环的存在使得ICOSL^{+/+} B细胞更受Tfh细胞的“青睐”。

选择高亲和力B细胞是生发中心反应的主要功能。为了直接检验B细胞亲和力成熟的过程, 我们使用了NP(4-hydroxy-3-nitrophenyl hapten)半抗原系统, 由此我们可以通过克隆结合NP的B细胞受体然后测序来检测亲和力谱^[29-31]。实验结果显示, 在GC B细胞群里高表达ICOSL的细胞多为高亲和力B细胞; 在ICOSL^{+/+}:ICOS^{-/-}骨髓嵌合小鼠中, 无论是在GC B细胞还是骨髓浆细胞中, ICOSL^{-/-} GC B细胞都

有更高的相对抗原亲和力, 说明ICOSL分子缺失导致的竞争缺陷需要由更高亲和力的B细胞受体来弥补; 当我们选择性地从GC B细胞上去掉ICOSL从而打破这种正反馈循环时, 生发中心的形成不受影响, B细胞受体随机突变频率不变, B细胞间对抗原和T细胞的竞争也仍然存在, 唯一改变的是这种生发中心不能再有效地选择出高亲和力B细胞。由此可见, ICOSL驱动的正反馈循环对生发中心里亲和力B细胞的选择及分化至关重要。

总结起来, 我们的研究显示, 在生发中心T-B细胞间短暂而反复的互作中, ICOSL能够促进T-B细胞以更大的胞膜接触面积进行相互作用, 通过刺激ICOS促进T细胞钙响应, 从而进一步增大“纠缠”互作及传递辅助信号给B细胞; 而获得更多辅助信号的B细胞会进一步上调ICOSL, 更容易与T细胞“纠缠”互作, 从而获得更多的T细胞帮助。这种ICOSL分子驱动的T-B细胞间正反馈调节是机体免疫应答中有效提高抗体亲和力的新机制, 是看似随机、混乱的细胞间竞争过程的内在调节规律。更重要的是, 过去我们几乎不可能人为地在疫苗诱导保护性抗体过程中对亲和力进行干预, 而这项研究为改善抗体疫苗的研发提供了一个可操控的重要靶点, 为开发更有效的抗病毒中和抗体疫苗指明了潜在的新方向。

参考文献 (References)

- 1 Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 1991; 67(6): 1121-9.
- 2 Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intralonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 1991; 354(6352): 389-92.
- 3 MacLennan IC. Germinal centers. *Ann Rev Immunol* 1994; 12: 117-39.
- 4 Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007; 27(2): 190-202.
- 5 King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Ann Rev Immunol* 2008; 26: 741-66.
- 6 Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 621-63.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 Schaefer P, Willimann 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.
- 11 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.
- 12 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.
- 13 Qi H, Kersh EN, Cannons J, Schwartzberg PL, Ahmed R. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 2008; 455(7214): 764-9.
- 14 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.
- 15 Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, et al. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 2001; 409(6816): 105-9.
- 16 Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Usui Y, Harada N, Yamazaki T, et al. The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance *in vivo*. *J Immunol* 2005; 175(4): 2340-8.
- 17 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.
- 18 Vinuesa CG, Cook MC, Angelucci C, Athanasopoulos V, Rui L, Hill KM, et al. A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* 2005; 435(7041): 452-8.
- 19 Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 2003; 4(3): 261-8.
- 20 Salzer U, Maul-Pavicic A, Cunningham-Rundles C, Urschel S, Belohradsky BH, Litzman J, et al. ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2004; 113(3): 234-40.
- 21 Bossaller L, Burger J, Draeger R, Grimbacher B, Knoth R, Plebani A, et al. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+ CD4 germinal center Th cells. *J Immunol* 2006; 177(7): 4927-32.
- 22 Xu H, Li X, Liu D, Li J, Zhang X, Chen X, et al. Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature* 2013; 496(7446): 523-7.
- 23 Negulescu PA, Krasieva TB, Khan A, Kerschbaum HH, Cahalan MD. Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity* 1996; 4(5): 421-30.
- 24 Horikawa K, Yamada Y, Matsuda T, Kobayashi K, Hashimoto M, Matsu-ura T, et al. Spontaneous network activity visualized

- by ultrasensitive Ca^{2+} indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nat Methods* 2010; 7(9): 729-32.
- 25 Mues M, Bartholomäus I, Thestrup T, Griesbeck O, Wekerle H, Kawakami N, *et al.* Real-time *in vivo* analysis of T cell activation in the central nervous system using a genetically encoded calcium indicator. *Nat Med* 2013; 19(6): 778-83.
- 26 Koguchi Y, Thauland TJ, Slifka MK, Parker DC. Preformed CD40 ligand exists in secretory lysosomes in effector and memory CD4+ T cells and is quickly expressed on the cell surface in an antigen-specific manner. *Blood* 2007; 110(7): 2520-7.
- 27 Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 2009; 229(1): 152-72.
- 28 Koguchi Y, Buenafe AC, Thauland TJ, Gardell JL, Bivins-Smith ER, Jacoby DB, *et al.* Preformed CD40L is stored in Th1, Th2, Th17, and T follicular helper cells as well as CD48 thymocytes and invariant NKT cells but not in Treg cells. *PLoS One* 2012; 7(2): e31296.
- 29 Allen D, Simon T, Sablitzky F, Rajewsky K, Cumano A. Antibody engineering for the analysis of affinity maturation of an anti-hapten response. *EMBO J* 1988; 7(7): 1995-2001.
- 30 McHeyzer-Williams MG, Nossal GL, Lalor PA. Molecular characterization of single memory B cells. *Nature* 1991; 350(6318): 502-5.
- 31 Smith KG, Light A, Nossal GJ, Tarlinton DM. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *EMBO J* 1997; 16(11): 2996-3006.