

平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな		おのえ かずのり		所属研究機関・部局・職		北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授	
研究代表者氏名		小野江 和則					
研究課題名	和文	NK-T 細胞の分化と免疫系制御で働く分子の同定					
	英文	Identification of molecules involved in differentiation and immune regulation by NK-T cells					
研究経費		平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計
16年度以降は内約額 金額単位：千円		37,200	18,100	11,200	10,200	9,000	85,700
研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）	
小野江 和則		北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授		免疫学		総括、骨髄移植、胸腺移植、NK-T細胞の抗原認識分子の解析、自己免疫モデルによるNK-T細胞機能解析 マクロファージ、NK、NK-T細胞、T細胞系列特異的に発現されるPTK分子の解析、サイトカインメッセージ解析 樹状細胞、NK-T細胞の機能解析、NK-T細胞・APC間相互反応解析	
岩淵 和也		北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教		免疫学			
柳川 芳毅		北海道大学・遺伝子病制御研究所・助手		免疫学			
当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>申請者は、厳密な特異レセプターを持たないナチュラルキラー(NK)細胞と、多様な抗原と自己MHC分子に対するレセプター(TCR)を持つT細胞を進化学的に繋ぐ位置にあると考えられるNK-T細胞を同定した(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992)。そして、主として胸腺内、骨髄内のNK-T細胞の機能を示してきた(Eur.J. Immunol. 1993; J. Immunol. 1993; J. Exp. Med. 1994)。またNK-T細胞の分化に胸腺内上皮が重要な働きをすることを世界で始めて発見、報告した(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; Cell. Immunol. 2000)。また、最近NK-T細胞の直接の前駆細胞をZAP-70^{-/-}、RAG^{-/-}マウス胸腺、脾内に同定した(Blood, 2001; Immunol. Letters, 2000)。さらに申請者は、NK-T細胞が従来考えられて来たより多様な亜群により構成されることを示してきた(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, Cell. Immunol. 2001)。</p> <p>本プロジェクトでは、(1)NK-T細胞の分化におけるMHCおよびMHC様分子の役割、および分化を促す胸腺ストローマ細胞由来分子同定と、リンパ組織構造の関係を明らかにする(小野江、岩淵)。(2)非特異免疫からNK細胞、NK-T細胞を経て、多形性MHCとペプチド抗原を特異的に認識するメインストリームのT細胞が進化してきたメカニズムを、抗原認識に関与する分子、およびその遺伝子と、効果因子、そして抗原認識後のシグナル伝達に関するPTK等の分子発現と機能に焦点をあて、解明する(岩淵)。(3)NK-T細胞の生体内における役割、特に樹状細胞との関係を解析し、この特異的な細胞ポピュレーションの機能欠損、あるいは失調によって生ずる疾病病態の基盤を解明し、NK-T細胞の機能制御による疾病の治療法を開発する(柳川)。(4)NK-T細胞の自己反応制御機能をin vitroで証明する。</p> <p>多様な亜群により構成されるNK-T細胞の免疫系における位置付け、機能を明確にすることにより、免疫応答の方向性を決定する非特異免疫系と特異免疫系のクロストークの詳細が解明される。また、人類にとってその克服が緊急の課題となっている癌免疫、感染免疫、アレルギーなどに対して、NK-T細胞の機能解析に基づく免疫応答の正、負の制御を応用した治療法の開発が可能となる。</p>							

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

NK-T 細胞の中には、自己抗原反応性レセプター(TCR)を発現する亜群が存在する。まず NK-T 細胞の示す自己抗原反応性の詳細を解明するため、同系樹状細胞に対する混合リンパ球反応(syngeneic mixed lymphocyte reaction, SMLR)を用い、反応性に増殖するリンパ球亜群を解析した。その結果、SMLR の始動には CD4⁺T 細胞が必要だが、NK-T 細胞も SMLR で増殖すること、NK-T 細胞の増殖は CD8⁺T 細胞のものと拮抗することを明らかにした (Cell Immunol, 2002)。次に、NK-T 細胞が異種の補体に対して、特異的に感受性亢進を示すことが判明した。抗体を持たない TCR トランスジェニック DO10/RAG^{-/-}マウスでは、NK-T 細胞は補体感受性を示さないこと、正常マウスの NK-T 細胞上に自己抗体分子が検出されたことから、そのメカニズムとして、生体内において既に NK-T 細胞上に自己抗体が結合しており、そのため強力な異種補体の存在下で、NK-T 細胞が融解すると考えられた (Immunobiol, 2002)。他のリンパ球にこのような現象が認められないのは、NK-T 細胞のみが自己反応性を示し、近傍の抗体産生細胞を巻き込んだ形で自己抗体産生を誘導するためと考えられる。この現象は、自己免疫自然発症系マウスで加齢とともに認められる NK-T 細胞減少とも関連した。従って、自己免疫との関連からも NK-T 細胞特異自己抗体の同定は重要課題と考えられる。

自己抗体の結合は、DO10 マウスでも認められた。DO10 は我々が報告した、NK-T 細胞が MHC クラス II 拘束性 TCR (KJ1-26⁺) を発現する世界で唯一のマウス系である。従って、KJ1-26⁺NK-T 細胞特異的自己抗体産生を単純に NK-T 細胞の自己反応性で説明できない。

この一見不思議な現象のメカニズムを解明するために、KJ1-26⁺NK-T 細胞と、KJ1-26⁺メインストリーム T 細胞の反応性を比較・解析した。その結果、驚くべきことに KJ1-26⁺NK-T 細胞が、OVA と同時に CD1d 分子にも反応性を示すことが判明した(図 1)。またこれらの反応性を KJ1-26⁺メインストリーム T 細胞のもの比べると、NK-T 細胞は CD1d にはより強く、OVA と α -A^d には弱く反応した。これらの結果は、非多形性 CD1d に対する自己反応性によって、NK-T へ分化するか、メインストリーム T 細胞に分化するかが決定されることを示す。実際、DO10 マウスと種々の H-2 タイプ、クラス II^{-/-}、クラス II^{-/-}マウスをドナー、またはホストにした骨髄キメラの解析から、KJ1-26⁺NK-T 細胞は造血細胞上の CD1d 分子によって正の選択を受けることが判明した(論文投稿中)。KJ1-26⁺NK-T 細胞と、メインストリーム T 細胞の反応差を規定する分子の解明は、今後の重要課題である。

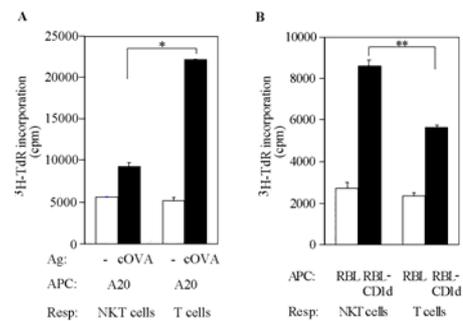


図 1. NK-T, T 細胞の OVA および CD1d 反応性

次に、NK-T 細胞が動脈硬化促進的に働くことを明らかにした。V α 14NK-T 細胞が産生されない CD1 ノックアウト (CD1^{-/-}) マウスとワイルドタイプ B6(WT)マウスに動脈硬化食を与えると、CD1^{-/-}マウスでは有意に病巣が小さかった(図 2)。 α -GalCer 刺激後のサイトカイン産生パターンから NK-T 細胞が Th1 型にシフトしていることが判明した。また ApoE^{-/-}マウスに α -GalCer を投与すると動脈硬化促進的に働いた。次に NK-T 細胞の動脈硬化促進性を直接証明するために、LDL レセプターノックアウトマウス(Ldlr^{-/-})に CD1^{-/-}マウス

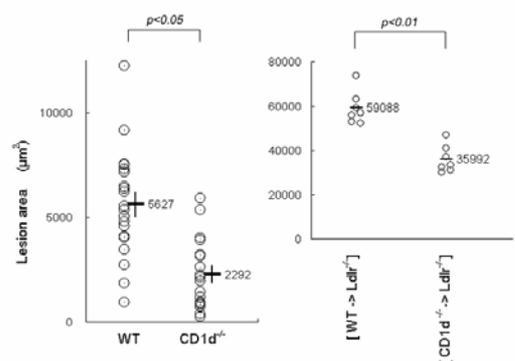


図 2. NK-T 欠損マウスにおける動脈硬化病巣軽減

または WT マウス骨髄細胞を移植してキメラを作成したところ、[CD1^{-/-} Ldlr]は[WT Ldlr]キメラより有意に動脈硬化病変が縮小することが判明した(図 2)。さらに、動脈硬化病巣に V α 14 メッセージを同定した。即ち、NK-T 細胞が病巣にリクルートされることが証明された。NK-T 細胞は脂質抗原に反応する唯一のリンパ球亜群である。しかし、今日まで NK-T 細胞の生理的リガンドは不明であった。今回の実験で、NK-T 細胞が酸化 LDL をパルスしたマクロファージに反応して IFN γ を産生することを証明している。これらの結果より、NK-T 細胞の認識分子と生体内機能解明に一步近づいたと考えられる (Blood, in press)。

NK-T 細胞と樹状細胞 (DC) 間の相互反応を解析するため、DC 機能修飾を行い、その過程でケモカインが DC の遊走のみならず、樹状突起伸張、貪食増強を誘導することを初めて発見した (Immunology, 2003 a,b,c, Blood, 2002, 2003)。また貪食促進に関与する分子メカニズムも明らかにした。さらに最近 DC を用い、 α -GalCer プラス CD1 分子提示による NK-T 細胞の in vitro 活性化系を構築し、あらかじめ DC をサイトカインで処理することにより、NK-T 細胞反応の方向性 (Th1, Th2 型) を制御することに成功した。この方法はサイトカインによるネガティブフィードバックを応用するもので、世界的にも全く報告がない、新規領域の開拓に繋がる。従って、機能修飾を行った DC を用い、NK-T 細胞の反応性を制御する方法開発に、今回の研究で一步近づいたと考えられる。

特記事項（これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。）

NK-T 細胞が第 4 のリンパ球亜群として認定される過程で、我が国の研究者が果たした役割は大きい。NK-T 細胞に関して我々がこれまで世界で初めて明らかにした事実としては、

1. CD4⁺胸腺細胞中に NK-T 細胞を同定
2. NK-T 細胞が超急性に IFN- γ 、IL-4 産生することを発見
3. NK-T 細胞が Fas 媒介性に未熟胸腺細胞を殺すことを発見
4. NK-T 細胞の positive selection に対する胸腺上皮細胞の関与を発見
5. NK-T 細胞の分化における ZAP-70 分子の必要性を報告
等が挙げられる。

今回の基盤 S の研究により、さらに明らかになった点は、

1. NK-T 細胞特異抗体が生体内で産生されること（論文発表）
2. NK-T 細胞分化には非多形性の自己 MHC クラス II 様分子(CD1)に対する反応性が関与すること（論文投稿中）。特にこの発見は、MHC クラス II 拘束性 TCR(KJ1-26)を発現する NK-T 細胞が、CD1 分子に交叉反応性を示すという、驚くべき実験事実から明らかにされたもので、NK-T 細胞の分化メカニズムの本質に関わるものと考えている。
3. これまで NK-T 細胞は糖脂質、脂質蛋白を認識すると考えられており、実際海綿より抽出した α -GalCer に対して反応することは千葉大の谷口克博士のグループが明らかにした。しかし、生体内における NK-T 細胞の生理学的リガンドは不明であった。しかし今回、3 種の動脈硬化症モデルを用い、NK-T 細胞の役割を解析する研究により、NK-T 細胞が酸化低比重リポタンパク質 (LDL) によって活性化され、IFN- γ を産生し、動脈硬化症を進展させることが判明した（論文印刷中）。近年、動脈硬化症の病態が、血管内皮周辺における炎症によって形成されることが確立されつつあるが、我々は初めて NK-T 細胞の関与を解明し、さらに NK-T 細胞が生体内で形成されるであろう酸化 LDL によって活性化されることを明らかにした意義は大きい。高齢化が進む我が国において、動脈硬化症の進展メカニズムの解明は、新規の有効治療法開発につながると期待される。特に今後、NK-T 細胞を治療標的とし、これらの機能を制御することにより動脈硬化症進展の抑制が出来るようになると考えられる。
4. 実際、NK-T 細胞-樹状細胞相互反応を利用し、NK-T 細胞の機能をコントロールするための戦略として、樹状細胞の機能修飾法を種々開発し（論文発表）、樹状細胞上の CD1d 分子発現を制御する戦略を確立した（論文準備中）。これはサイトカインネットワークを利用し、ネガティブフィードバックにより樹状細胞による NK-T 細胞活性化機能を修飾する新規の方法で、世界的には全く報告が見られない。
5. NK-T 細胞に抗原を提示する樹状細胞の機能修飾を試みる実験から、ケモカイン(CCL19、CCL21)が成熟樹状細胞の走化性亢進のみならず、形態変化、抗原取り込みを著明に増加させることを発見した。従来、成熟樹状細胞は抗原取り込み能が低下するとされてきたが、今回の発見はこのドグマを覆すものである（論文発表）。
6. 我が国で樹立された SL/Kh マウスにおいて、NK-T 細胞産生が低下していることを発見した。この産生低下は、*cd1d1* の $\alpha 3$ 領域における遺伝子変異によることが判明した。遺伝子変異の詳細については、次項で触れる。
7. ヒト NK-T 細胞の機能を解明する目的で、臨床との協力で種々の疾患における NK-T 細胞の動態を解析している。平成 15 年度ではウェゲナー肉芽腫症、慢性萎縮性多発軟骨炎患者において NK-T 細胞の免疫制御機能異常を発見した（論文印刷中）。また習慣性流産患者における NK-T 細胞機能を解析したが、現在のところ流産に NK-T 細胞が関与する結果は得られていない（論文発表）。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文 (発表予定のものを記入することも可能。) の全著者名、論文名、学協会誌名、巻 (号)、最初と最後のページ、発表年 (西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

学術誌等

1. Yanagawa, Y. and Onoé, K.: CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells. **Blood**, 100, 1948-1956, 2002.
2. Kizaki, T., Suzuki, K., Hitomi, Y., Onoé, K., Day, N. K., Good, R. A., Taniguchi, N. and Ohno, H.: Uncoupling protein 2 plays an important role in nitric oxide production of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 99, 9392-9397, 2002.
3. Onoé, K., Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Tone, S., Konishi, J., Kawakami, Y., Nishimura, M. and Onoé, K.: Enhanced complement sensitivity of NK-T cells in murine thymus and spleen associated with presence of serum immunoglobulin. **Immunobiology**, 206, 377-391, 2002.
4. Aranami, T., Iwabuchi, K. and Onoé, K.: Syngeneic mixed lymphocyte reaction (SMLR) with dendritic cells: Direct visualization of dividing T cell subsets in SMLR. **Cell. Immunol.** 217, 67-77, 2002.
5. Izutsu, Y., Tochinal, S., Maeno, M., Iwabuchi, K. and Onoé, K.: Larval antigen molecules recognized by adult immune cells of inbred xenopus laevis; Partial characterization and implication in metamorphosis. **Dev. Growth Differ.** 44, 477-488, 2002.
6. Zierhut, M., Mizuki, N., Ohno, S., Inoko, H., Gül, A., Onoé, K. and Isogai, E.: Immunology and functional genomics of Behçet's disease. **Cell. Mol. Life Sci.** 60, 1903-1922, 2003.
7. Kikuchi, K., Yanagawa, Y., Aranami, T., Iwabuchi, C., Iwabuchi, K. and Onoé, K.: Tumour necrosis factor- α but not lipopolysaccharide enhances preference of murine dendritic cells for Th2 differentiation. **Immunology**, 108, 42-49, 2003.
8. Onoé, K., Gotohda, T., Nishihori, H., Aranami, T., Iwabuchi, C., Iclozan, C., Morohashi, T., Ogasawara, K., Good, R.A. and Iwabuchi, K.: Positive and negative selection of T cell repertoires during differentiation in allogeneic bone marrow chimeras. **Transplant Immunol.** 12, 79-88, 2003.
9. Shimada, S., Iwabuchi, K., Watano, K., Shimizu, H., Yamada, H., Minakami, H. and Onoé, K.: Expression of allograft inflammatory factor-1 in mouse uterus and poly (I: C)-induced fetal resorption. **Am. J. Repro. Immunol.** 50, 104-112, 2003.
10. Shimada, S., Iwabuchi, K., Kato-Hirayama, E., Morikawa, M., Sakuragi, N., Onoé, K., Minakami, H. and Yamada, H.: No difference in natural-killer-T cell population, but Th2/Tc2 predominance in peripheral blood of recurrent aborters. **Am. J. Repro. Immunol.** 50, 334-339, 2003.
11. Yanagawa, Y. and Onoé, K.: CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant up-regulation of Cdc42 and Rac activities. **Blood**, 101, 4923-4929, 2003.
12. Tosa, N., Murakami, M., Jia, W. Y., Yokoyama, M., Masunaga, T., Iwabuchi, C., Inobe, M., Iwabuchi, K., Miyazaki, T., Onoé, K. and Uede, T.: Critical function of T cell death-associated gene 8 in glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. **Int. Immunol.** 15, 741-749, 2003.
13. Nakayama, K., Hatakeyama, S., Maruyama, S., Kikuchi, A., Onoé, K., Good, R. A. and Nakayama, K.: Impaired degradation of I β and β -catenin as a result of targeted disruption of the TrCP1 gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 100, 8752-8757, 2003.
14. Kikuchi, K., Yanagawa, Y., Iwabuchi, K. and Onoé, K.: Differential role of mitogen-activated protein kinases in CD40-mediated IL-12 production by immature and mature dendritic cells. **Immunol. Lett.** 89, 149-154, 2003.
15. Morohashi, T., Iwabuchi, K., Watano, K., Nyambayar, D., Mishima, T., Nakai, Y., Shimada, S., Nishida, R., Fujii, S. and Onoé, K.: Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) regulates trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis. **Immunology**, 110, 112-119, 2003.
16. Pavlinkova, G., Yanagawa, Y., Kikuchi, K., Iwabuchi, K. and Onoé, K.: Effects of histamine on functional maturation of dendritic cells. **Immunobiology**, 207, 315-325, 2003.
17. Iijima, N., Yanagawa, Y., Iwabuchi, K. and Onoé, K.: Selective regulation of CD40 expression in murine dendritic cells by thiol antioxidants. **Immunology**, 110, 197-203, 2003.
18. Iijima, N., Yanagawa, Y. and Onoé, K.: Role of early and late phase activation of p38 MARK induced by TNF- α or 2,4-dinitrobenzene during maturation of dendritic cells. **Immunology**, 110, 322-328, 2003.

19. Yamada, H., Shimada, S., Kato, E., Morikawa, M., Iwabuchi, K., Kishi, R., Onoé, K. and Minakami, H.: Decrease in a specific killer cell immunoglobulin-like receptor on peripheral natural killer cells in women with recurrent miscarriage of unexplained etiology. **Am. J. Reprod. Immunol.** 50, 149-154, 2003.
20. Nagafuku, M., Kabayama, K., Oka, D., Kato, A., Tani-ichi, S., Shimada, Y., Ohno-Iwashita, Y., Yamasaki, S., Saito, T., Iwabuchi, K., Hamaoka, T., Inokuchi, J. and Kosugi, A.: Reduction of glycosphingolipid levels in lipid rafts affects the expression state and function of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins but does not impair signal transduction via the T cell receptor. **J. Biol. Chem.** 278: 51920-51927, 2003.
21. Onoé, K., Kitaichi, N., Ohno, S., Iwabuchi, C. and Iwabuchi, K.: 「NK and NK⁺ T cells possibly involved in Behçet's Disease」, Eds. by Zierhut, M. and Ohno, S. "Immunology of Behçet's Disease". Swets & Zeitlinger, Lisse, The Netherlands. (63-72, 2003)
22. Nagashima, T., Aranami, T., Iclozan, C. and Onoé, K.: Analysis of T cell responses to a superantigen, staphylococcal enterotoxin B. **J. Clin. Exp. Hematopathol.** (in press)
23. Onoé, K., Iwabuchi, K. and Good, R.A.: T cell differentiation in allogeneic bone marrow chimeras. **Cancer Detection and Prevention**, Symposium Vol. S-153-154, 2004.
24. Takagi, D., Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Nakamaru, Y., Maguchi, S., Ohwatari, R., Furuta, Y., Fukuda, S., Joyce, S. and Onoé, K.: Immuno-regulatory defects of V β 24⁺V β 11⁺ NKT cells in development of Wegener's granulomatosis and relapsing polychondritis. **Clin. Exp. Immunol.** (in press)
25. Aranami, T., Iclozan, C., Iwabuchi, K., and Onoé, K.: IL-7 dependent homeostasis proliferation in the presence of a large number of T cells in *gld* mice. **Microbiol. Immunol.** (in press)
26. Nakai, Y., Iwabuchi, K., Fujii, S., Ishimori, N., Watano, K., Mishima, T., Iwabuchi, C., Tanaka, S., Dashtsoodol, N., Nakayama, T., Taniguchi, M., Miyake, S., Yamamura, T., Kitabatake, A., Joyce, S., Van Kaer, L., and Onoé, K.: Natural killer T cells accelerate atherosclerosis in mice. **Blood**, (in press)

国際会議、学会等

1. Kikuchi, K., Yanagawa, Y., Iwabuchi, K. and Onoé, K.: Workshop TNF⁻ but not LPS enhances preference of murine DC for Th2 differentiation. The 3rd International Workshop of KTCC Meeting, 2002. (at Kyoto)
2. Yanagawa, Y. and Onoé, K.: CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells. The Awaji International Forum of Infection and Immunity. 2002. (at Awaji)
3. Shimada, S., Iwabuchi, K., Yamada, H., Minakami, H. and Onoé, K.: Allograft inflammatory factor-1 expressed in non-pregnant and pregnant mouse uteri. 8th Meeting International Federation of Placenta Associations 2002. (at Melbourne, Australia)
4. Nakai, Y., Iwabuchi, W., Fujii, S., Mishima, T., Iwabuchi, C., Dashtsoodol, N., Nakamaya, T., Taniguchi, M., Miyake, S., Yamamura, T., Van Kaer L. and Onoé, K.: Natural killer T cells aggravate atherosclerosis in mice. KTCC, 2003. (at Kyoto)
5. Yanagawa, Y. and Onoé, K.: CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant upregulation of Cdc42 and Rac activities. 8th International Workshop on Langerhans Cells, 2003. (at Tokyo)
6. Yanagawa, Y. and Onoé, K.: CCR7 ligands induce vigorous antigen-acquisition by mature dendritic cells. The Awaji International Forum of Infection and Immunity. 2003. (at Awaji)
7. Onoé, K.: Plenary Symposium "T cell differentiation in allogeneic bone marrow chimeras." "Robert A. Good Memorial Program on Tumor Immunology." 7th International Symposium on Molecular Basis of Predictive Oncology Intervention Strategies. 2004. (at Nice)
8. Iwabuchi, K.: Symposium "A possible role of NKT cells in the development of atherosclerosis." Recent Progress in Neuroimmunology and NKT Cell Research. 2004. (at Tokyo)
9. Onoé, K.: Symposium "Central tolerance by negative selection and its abrogation by GVHR." "Second Japan-Australia Symposium on Biomedical Sciences: Drug Discovery for Infectious Diseases and Mutual Collaboration". 2004. (at Kiroro)
10. 小野江和則：宿題報告「T細胞免疫系の成立と生体内役割」，第94回日本病理学会総会，2005(予定)