

NKT細胞の発生分化機構メカニズム

The mechanisms of development and differentiation in Valpha14 NKT cells

谷口 克 (Masaru TANIGUCHI)

独立行政法人理化学研究所・免疫制御研究グループ・グループディレクター



研究の概要

新しいリンパ球として同定した NKT 細胞は、これまで知られていた獲得免疫系と自然免疫系の橋渡しをする重要な細胞である。本研究では、世界で初めて成功した cloned V α 14 NKT 細胞マウス及び ES 細胞を用いて NKT 細胞系の発生・分化様式を解析し、T 細胞とは異なる仕組みを明らかにする。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：NKT 細胞、クローンマウス、初期分化、前駆細胞、NKT 細胞-GFP マウス

1. 研究開始当初の背景

新しいリンパ球として同定された NKT 細胞は感染症防御、発癌制御、癌転移制御などの生体防御と、アレルギー制御、自己免疫疾患発症制御、移植免疫寛容の維持等の免疫制御に必須であり、これまで未解決であった免疫現象の根幹にかかわる多くの事項がこの新しい免疫系によって担われている。NKT 細胞は T 細胞には使用されていない唯一の抗原受容体である V α 14J α 18 でコードされる受容体を使用し、その発現は NKT 細胞の分化・選択に必須である。しかしながら、NKT 前駆細胞ならびにその受容体発現様式と選択の機構は明らかではない。

2. 研究の目的

世界で初めて成功した cloned V α 14 NKT 細胞マウス及び ES 細胞を用いて NKT 細胞系の発生・分化様式を解析し、その仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

- NKT 細胞の分化のプロセスについて、試験管内、生体内における NKT 細胞分化過程を FACS 解析し、各分化段階の細胞を分子生物学的手法により明らかにする。
- NKT 細胞が光るマウスを創出し、発生初期の NKT 細胞動態を観察する。

- CD1d 欠損 NKT クローンマウスを創出し、幼弱型 NKT 細胞を解析する。

4. これまでの成果

- ① NKT 細胞分化のプロセスの研究
- NKT-ES 細胞から成熟型 NKT 細胞を試験管内分化誘導する系を構築し、前駆細胞と考えられる細胞集団の同定に成功した。
- NKT 細胞への初期分化には、Notch シグナルが必須であることを明らかにした。
- NKT 細胞に分化し得る未分化な細胞集団の同定に成功した。所謂 DN1 (Lin⁻ CD44⁺ CD25⁻) 中に2つの前駆細胞集団を見出し、表現型が Lin⁻ CD45⁺ CD11b⁻ CD44⁺ CD25⁻ c-kit^{int} HSA^{lo} (Day11 に出現；ステージ1) および Lin⁻ CD45⁺ CD11b⁻ CD44⁺ CD25⁻ c-kit^{lo} HSA^{hi} (Day14 に出現；ステージ2) である未分化な細胞集団であることを突き止めた。
- NKT-ES 細胞から、機能的に異なる成熟型 NKT 細胞が分化し得ることを明らかにし、その試験管内培養法を確立した。
- 生体内にも機能的に異なる NKT 細胞のサブセットが複数存在することを明らかにした。
- 生体内に存在する Th2 様の NKT 細胞は、

[4. これまでの成果 (続き)]

IL-17RB 遺伝子の特徴的なマーカーとして発現し、気道過敏症発症、延いては喘息を引き起こすアレルギー気道炎症の引き金となる IL-13 産生性の細胞集団であることを、試験管内生体内両面から証明した。

②NKT 細胞の分化の場の研究

- NKT-ES 細胞の T 細胞抗原受容体 C α 下流に IRES-Venus を挿入した「NKT 細胞が光る ES 細胞」NKT-ES-V 細胞の樹立に成功した。
- NKT-ES-V 細胞と対立遺伝子の C α 下流に IRES-Venus を挿入した ES-V 細胞の樹立に成功した。
- C α -IRES-Venus ノックインマウスを創出することに成功した。

③NKT 細胞前駆細胞の同定

- 野生型マウス胸腺内の未分化な所謂 DN4(CD44-CD25-)に既に V α 14-J α 18 に in frame で再構成を終えた NKT 細胞前駆細胞が存在することを突き止めた。
- 再構成を終えた V α 14-J α 18 は解析した全てのクローンにおいて in frame であり、J α 鎖と再構成も 80%を超える頻度で J α 18 が使われていた。V α 14-J α 18 は選択的かつ挿入なしに再構成を起こしやすく、NKT 細胞は CD1d 分子による選択前に前駆細胞として出現していることを証明した。
- CD1d 欠損マウス胸腺においてもわずかながらの CD1d 拘束性 NKT 細胞が存在することを見出した。
- NKT クローンマウス及び CD1d 欠損 NKT クローンマウスの樹立に成功した。

5. 今後の計画

- 同定した NKT 細胞前駆細胞のマイクロアレイ解析を行ない、発現が確認された NKT 細胞特異的遺伝子について、遺伝子導入、RNAi によるノックダウン、ノックアウトマウスの作製を通じて、NKT 細胞特異的転写因子など分化決定に関わる責任遺伝子の同定並びに機能解析を進める。
- NKT 細胞の分化経路を可視化し、胸腺形成前の胎生初期にフォーカスし、免疫系発生所期 AGM 領域、Splanchnopleura

における NKT 細胞の発生を時間に沿って観察し、発生初期の NKT 細胞動態を観察する。

- CD1d 欠損 NKT クローンマウスの胸腺内各分化段階における NKT 細胞の遺伝子発現プロファイル、糖脂質リガンド応答性、in vivo における CD1d による選択・増殖メカニズムを比較検証することにより、CD1d の NKT 細胞に対する役割を明らかにする。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- Watarai H, Rybouchkin A, Nagata Y, Hongo N, Sakata S, Sekine E, Dashtsoodol N, Tashiro T, Fujii S, Shimizu K, Mori K, Kawamoto H, Koseki H, **Taniguchi M**. Generation of functional NKT cells in vitro from embryonic stem cells bearing rearranged invariant V α 14-J α 18 TCR α gene. *Blood* in submission.
- Dashtsoodol N, Watarai H, Sakata S, **Taniguchi M**. Identification of CD4 CD8 double-negative natural killer T cell precursors in the thymus. *PLoS ONE* 3:e3688, 2008.
- Terashima A, Watarai H, Inoue S, Sekine E, Nakagawa R, Hase K, Iwamura C, Nakajima H, Nakayama H, and **Taniguchi M**. A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B contributes to the development of airway hyperreactivity. *J Exp Med* 205:2727-2733, 2008.
- Watarai H, Nakagawa R, Omori-Miyake M, Dashtsoodol N, **Taniguchi M**. Methods for detection, isolation, and culture of mouse and human invariant NKT cells. *Nat Protoc*, 3:70-78, 2008.
- Shimizu K, Kurosawa Y, **Taniguchi M**, Steinman RM, Fujii S. Cross-presentation of glycolipid from tumor cells loaded with α -galactosylceramide leads to potent and long-lived T cell - mediated immunity via dendritic cells. *J Exp Med*, 204:2641-2653, 2007.

ホームページ等

<http://web.rcai.riken.jp/en/labo/regulation/index.html>