

## NKT細胞系列決定・機能発現メカニズム

The mechanisms of development and differentiation in  
V $\alpha$ 14 NKT cells

谷口 克 (TANIGUCHI MASARU)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・  
グループディレクター



### 研究の概要

従来、NKT細胞は胸腺内でDNからDPステージに分化するとT細胞と分岐し、CD1d分子による選択後、段階的にTh2/Th17機能それからTh1機能を獲得するlinear modelが定説であった。しかし、本研究で、1) Th1型NKT細胞だけに分化するNKT前駆細胞を、DPステージ以前、CD1d選択以前のDN1ステージに存在すること、2) 前駆細胞の頻度・分化実証実験からDP経路とは異なりDN経路がNKT細胞分化の主経路であることを発見した。さらに、NKT前駆細胞特異的転写因子も発見し、NKT細胞分化・機能の人為的制御を可能にした。

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：プレNKT細胞，転写因子，iPS，単一細胞PCR，RNA-sequence

#### 1. 研究開始当初の背景

NKT細胞は唯一種類の抗原受容V $\alpha$ 14Ja18 (マウス)/V $\alpha$ 24Ja18 (ヒト)を発現し、免疫応答を制御する。IFN $\gamma$ 産生Th1型NKT細胞を標的にした肺がん治療第2相臨床試験では、現行の分子標的療法に比べて平均生存期間は数倍に延長する成果を挙げ先進医療Bに採択された。NKT細胞の分化発生を明らかにし、試験管内で任意の機能を持つNKT細胞を大量に分化誘導できれば、さらなる治療効果を期待できる。

#### 2. 研究の目的

NKT細胞系列を決定する遺伝子を同定し、各分化ステージのゲノムワイドな遺伝子発現やエピゲノム状況との関連性を明らかにすることで、分化と機能獲得機構を解明する。

#### 3. 研究の方法

プレNKT細胞を同定し、分化プロセスを分子生物学的な手法、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドな遺伝子発現・エピゲノム解析により明らかにする。これらを純度の高い前駆細胞で行なうため、単一細胞RT-PCR法でプレNKT細胞特異的表面分子を同定し、濃縮方法を開発する。さらに、NKTクローンES/iPS細胞を用いた分化実験でNKT細胞系列決定に関与する遺伝子をshRNAで検証する。さらに遺伝子改変マウスの解析を行なう。

#### 4. これまでの成果

##### 1) 機能を異にするNKT細胞サブセットの

**発見**：胸腺内でのNKT細胞機能獲得は、従来考えられてきたTh2/Th17機能獲得ステージからTh1機能獲得ステージへと分化するlinear modelと異なり、10%を占めるTh2/Th17型NKT細胞群と、90%を占めるIFN $\gamma$ を産生するTh1型NKT細胞が存在し、機能を決定する転写因子の発現により分類できることを明らかにした。これは、機能の異なるNKT前駆細胞(プレNKT細胞)が存在する可能性を示唆している。

**2) 新規“プレNKT細胞”とこれまでと異なるNKT細胞分化経路の発見**：プレNKT細胞が、T細胞前駆細胞とは異なるDN1e分画(DN1eP)に存在することを発見した。NKT細胞分化に重要なPLZFやSAP遺伝子欠損マウスではDN1ePは消失した一方、従来言われていたDP分画のプレNKT細胞は存在した。これは、DN1ePプレNKT細胞の分化はPLZF/SAP依存の新経路で、DP経路を経ずにNKT細胞に分化できること、一方これまで言われていた分化経路はPLZF/SAP非依存的であった。単一細胞RT-PCR解析を用いたプレNKT細胞の存在頻度の測定では、DN1e分画では3%、DP分画で0.04%以下と大きな違いがあり、DN1eP経路がNKT細胞の主要分化経路であることが判明した。

プレNKT細胞特異的な遺伝子解析のために、DN1eP特異的表面分子の同定に成功した。これらの抗体を用いて、プレNKT細胞の存在率を80%以上に濃縮する方法を開発した。

3) DN1eP プレ NKT 細胞は Th1 型機能を発現する NKT 細胞固有の前駆細胞 : RNA-seq 法を用いたゲノムワイドな遺伝子発現プロファイリングを行なった。DN1eP プレ NKT 細胞と成熟 NKT 細胞間での主成分分析は、Th1/2 型 NKT 細胞および Th1 型 NKT 細胞と DN1eP 細胞は異なる細胞集団であることを示した。DN1eP プレ NKT 細胞に発現が認められた 546 遺伝子のうち、特異的遺伝子 25 遺伝子を抽出。一方、DN1eP プレ NKT 細胞から分化誘導した NKT 細胞と成熟 NKT 細胞との比較では、Th1 型 NKT 細胞に類似性が高く、実際に DN1eP 細胞からの分化誘導で IFN $\gamma$  だけを産生する NKT 細胞に成熟した。この事実から、今回発見した DN1eP プレ NKT 細胞は、Th1 型 NKT 細胞固有の前駆細胞であり、これまで常識であった DP ステージを経ることなく、異なる経路で分化することが証明された。

前駆細胞で機能関連遺伝子に注目すると、すでに DN1eP プレ NKT 細胞は Th1 型 NKT 細胞に類似しており、CD1d 分子で運命決定される前からすでに IFN $\gamma$  産生細胞への分化が決定づけられていることが示唆された。通常の T 細胞と異なり、受容体発現がない前駆細胞の段階で機能決定がなされているという点は、免疫細胞機能決定に重大な問題提起をすることになった。

4) DN1eP プレ NKT 細胞の分化制御遺伝子の解析: DN1eP 細胞に発現する遺伝子群の中から NKT 細胞分化に関わる遺伝子を調べるために、shRNA を用いた機能阻害実験を行った。プレ NKT 前駆細胞で発現する複数の遺伝子が NKT 細胞分化に強く影響することが明らかになった。特定の遺伝子欠損マウスを用いたキメラマウス解析では、DN1eP 細胞の分化とサイトカイン産生パターンは Th1 型 NKT 細胞から Th2 型、Th17 型に変化した。このことから、この遺伝子は Th1 型 NKT 細胞系列決定に重要な転写因子であることが示された。

#### 5. 今後の計画

プレ NKT 細胞特異的発現遺伝子について、継続して系列決定と機能獲得に関わる遺伝子同定と制御機構解析を行う。また、現在までに見出したプレ NKT 細胞および NKT 細胞特異的な発現遺伝子・分化/機能制御遺伝子に関して時系列的発現解析・エピゲノム解析を実施し、NKT 細胞の系列決定と機能獲得について遺伝子レベルでの理解を目指す。これら遺伝子情報プロファイリングから想定される NKT 細胞機能予測システムを構築し、iPS の選別、人為的 NKT 細胞生産に応用する。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Dashtsoodol N, Taniguchi M et al. Identification of murine cells with natural killer T cell developmental potential in the CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative thymic fraction before

CD1d selection. *Nat. Immunol.* Revised 2014

2. Hirai T, Taniguchi M, Tanabe K et al. A novel approach inducing transplant tolerance by activated invariant natural killer T cells with costimulatory blockade. *Am J Transplant.* 14: 1-14, 2014

3. Fujii S, Taniguchi M et al. NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Front. Immunol.* 4:1-7, 2013

4. Tashiro T, Taniguchi M, Mori K et al. RCAI-84, 91, and 105-108, ureido and thioureido analogs of KRN7000: Their synthesis and bioactivity for mouse lymphocytes to produce Th1-biased cytokines. *Bioorg Med Chem.* 20:4540-8, 2012

5. Watarai H, Taniguchi M, et al. Induced pluripotency as a potential path towards iNKT cell-mediated cancer immunotherapy. *Int J Hematol.* 95:624-31, 2012

6. Nagato K, Taniguchi M, Nakayama T et al. Accumulation of Activated Invariant Natural Killer T Cells in the Tumor Microenvironment after  $\alpha$ -Galactosylceramide-Pulsed Antigen Presenting Cells. *J Clin Immunol.* 32:1071-81, 2012

7. Satoh M, Taniguchi M, Iwabuchi K et al. Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS One* 7:e30568, 2012

8. Watarai H, Taniguchi M, et al. Development and Function of Invariant Natural Killer T cells Producing TH2- and TH17-cytokines. *PLoS Biology* 10:e1001255, 2012

9. Tashiro T, Taniguchi M, Mori K et al. RCAI-39, 41, 53, 100, 127 and 128, the analogues of KRN7000, activate mouse natural killer T cells to produce Th2-biased cytokines by their administration as liposomal particles. *MedChemComm.* 2:620-625, 2011

10. Yamasaki K, Taniguchi M, Okamoto Y et al. Induction of NKT cell-specific immune responses in cancer tissues after NKT cell-targeted adoptive immunotherapy. *Clin Immunol.* 138:255-65, 2011

11. Motomura Y, Taniguchi M, Kubo M et al. The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL-13 in CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature Immunol.* 12:450-9, 2011

ホームページ等

[http://www.riken.jp/research/labs/ims/immune\\_reg/](http://www.riken.jp/research/labs/ims/immune_reg/)