

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16704

研究課題名(和文) 感染免疫応答における骨髄局在性uncommitted NKT細胞の機能解明

研究課題名(英文) A role of bone marrow resident-uncommitted NKT cells under the infectious immune responses

研究代表者

林崎 浩史 (Hayashizaki, Koji)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：50779907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：NKT細胞は胸腺における分化成熟の過程で既にエフェクター機能を獲得(エフェクター分化)しており、活性化に伴い迅速かつ多量のサイトカインを産生する。一方で、一部のNKT細胞は未分化なまま末梢組織へと移り、環境の変化に応じて種々のNKTサブセットへと組織で分化する可能性が示唆されていた。しかし、未分化NKT細胞に関する研究は乏しく、そのような細胞の局在や維持機構は不明であった。本研究では未分化能を有する可能性がある骨髄NKT細胞に着目し、その特徴や機能について解析を実施した。骨髄環境への依存度の高さに起因するとされる事象から解析が難航したが、その生理的重要性の解明につながる基盤を構築することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NKT細胞は活性化に伴い迅速かつ多量のサイトカインを産生することで強力な免疫不活化作用をもつ。このことから、抗腫瘍免疫の分野や感染症ワクチン分野における臨床応用に注目が集まっている。本研究で詳細に解析を進めた骨髄NKT細胞の未分化能についての解析結果は、未分化な状態での末梢NKT細胞の維持や増殖手法の手がかりになることが期待され、治験やトランスレーショナル研究として推進されているNKT細胞研究を強くサポートする。よって当研究は学術的にも社会的にも有意義な成果を残すことができたといえる。

研究成果の概要(英文)：NKT cells acquire the effector function during thymic development and thus rapidly produce high amount of cytokine under activation. A previous report suggested that peripheral NKT pool contains "uncommitted NKT cells" which differentiate into functional subsets depending on the environment. However, the detail about uncommitted NKT cells still remain unknown. In this study, we have focused on bone marrow (BM)-resident NKT cells which be expected to carry the uncommitted potential, and analyzed for specific marker and function. Although our project has been difficult because BM-NKT cells more highly sensitive for the environment change, we could successfully gain several data which lead to the elucidate for physiological importance of uncommitted NKT cells.

研究分野：免疫学

キーワード：NKT細胞 骨髄 未分化

1. 研究開始当初の背景

NKT細胞はT細胞の亜集団であり、多様性に乏しい固有のT細胞抗原受容体(TCR)を発現する。通常のT細胞がペプチドを認識するのに対し、NKT細胞はTCRを介して糖脂質を認識しており、外来微生物の含有する外来性糖脂質やストレス応答により産生される内因性糖脂質によって活性化することが知られている。NKT細胞はT細胞と同様、胸腺にて分化成熟するが、胸腺で既にエフェクター細胞へと分化しており、末梢で活性化した際は迅速に特異的サイトカインを産生することができる。エフェクターT細胞であるTh1、Th2、Th17細胞と同様にNKT細胞もNKT1、NKT2、NKT17細胞と呼ばれ、特異的な転写因子制御下でサブセット特異的サイトカインを産生する。NKT1細胞はT-bet、NKT2細胞はPLZF、そしてNKT17細胞はROR γ tであり、それぞれIFN γ (NKT1)、IL-4、IL-13(NKT2)、そしてIL-17(NKT17)を産生する。

近年の研究成果により、NKT細胞は種々の末梢組織において異なったサブセットバランスで存在することがわかってきた。例えば、肝臓や脾臓ではNKT1細胞が大部分を占めるのに対し、肺やリンパ節では他の組織と比較してNKT17細胞の割合が高いことがわかっている。また、腸間膜リンパ節ではNKT2細胞が多い。一方で、ひとたび炎症応答が引き起こると、免疫応答のタイプに応じてこのサブセットバランスに乱れが生じることがわかっており、既にサブセット分化したNKT細胞群でバランスの乱れが生じるメカニズムについては不明であった。

我々は一部のNKT細胞は胸腺にて成熟する前に未分化NKT細胞として末梢組織に移行する可能性について報告している(Kimura Y. M et al. *Nature comm.* 2018)。また、末梢のNKT細胞集団の中には上述したサブセットを規定する転写因子の発現が全て低い集団が存在することを見出しており、未分化NKT細胞が環境変化にตอบสนองしてサブセットバランスに変化を促していることが考えられた。しかし、転写因子の低発現集団は極々少数であり、各々のサブセットが既に組織に存在するという背景から、未分化能の有無について迫ることが非常に困難であった。

2. 研究の目的

組織常在性NKT細胞の解析を進める中、骨髄に存在するNKT細胞が上述のNKTサブセットと異なり、種々の特異的転写因子群の発現が軒並み低いことを見出していた。我々は骨髄が未分化NKT細胞のリザーバーとして機能していると仮定し、その機能と重要性について明らかにすることを目的とした。NKT細胞の未分化能についてのアプローチとしては、NKT細胞が糖脂質である α ガラクトシルセラミド(α GalCer)で活性化した際に特異的に分化する濾胞性ヘルパーNKT(NKT_{FH})細胞に着目した。NKT_{FH}細胞は上述のNKT1、NKT2そしてNKT17細胞とは異なるNKTサブセットであり、他のサブセットと異なり胸腺内ではNKT_{FH}細胞は認められない。よってNKT_{FH}細胞は末梢NKT細胞の分化成熟の指標となり、NKT細胞の未分化能について明らかにすることが可能となる。本研究では未分化NKT細胞として骨髄NKT細胞を用い、分化成熟の有無に関するパラメータとしてNKT_{FH}細胞分化能に着目した。

3. 研究の方法

(1) 骨髄NKT細胞の特徴に関する解析

骨髄NKT細胞のRNAシーケンス解析と特異的分子の探索
骨髄NKT細胞のサイトカイン産生

(2) 骨髄NKT細胞の細胞動態についての解析

骨髄NKT細胞の骨髄定着時期とその後の細胞数変動
 α GalCer投与後の骨髄NKT細胞数の変動

(3) 骨髄NKT細胞の欠失による影響についての解析

骨髄NKT細胞の特異的細胞膜分子を標的とした抗体介在性細胞除去による影響

(4) 骨髄NKT細胞の分化能についての解析

骨髄NKT細胞養子移入マウスへのワクチン投与とNKT_{FH}細胞分化能の有無について

4. 研究成果

本研究成果により、骨髄NKT細胞は脾臓NKT細胞とは遺伝子プロファイルが大きく異なることが明らかとなった。特異的分子としてはLy-6cやCD81といった膜分子が高発現しており、他の組織NKT細胞にはない表現系を有していた。また、転写因子群も骨髄環境に適応する特異的遺伝子の発現が認められた。一方で、タンパク質レベルで低発現であった各々のNKTサブセットを規定する転写因子群はRNAレベルではさほど低発現ではなく、脾臓NKT細胞との有意な差はなかった。その点に関して、骨髄NKT細胞の刺激に伴うサイトカイン産生を調べたところ他の組織NKT細胞と同様に産生したことから、骨髄NKT細胞における転写因子発現制御には骨髄の環境が深く関与している可能性が示唆された。また、RNAシーケンス解析結果の多

面的解析により骨髄 NKT 細胞が機能的亜集団に分けられ、各々の集団で機能が異なる可能性が示唆された。

骨髄 NKT 細胞の個体発生を詳細に解析する為、生後のマウス骨髄における NKT 細胞数の変動を解析した。結果、生後間もなく骨髄へ集積を始めおおよそ 5 週齢前後には骨髄細胞中の割合が安定することがわかった。また、 α GalCer 投与後の骨髄 NKT 細胞は末梢 NKT 細胞と同様、一時的な減少を示した。この結果は NKT 細胞の性質として一般的に認知されている TCR のダウンレギュレーションが原因と考えられる。一方で、投与後の骨髄は NKT 細胞によって産生される過剰なサイトカインが原因とみられる一時的な造血異常が認められた。よって骨髄 NKT 細胞の活性化に伴った機能解析にはワクチンおよび α GalCer 投与後を標的とするのは困難であるという結論に至った。

次に骨髄 NKT 細胞を欠損するマウスを解析する為、抗 Ly-6c 抗体、ならびに抗 CD81 抗体を投与することで骨髄 NKT 細胞の除去を試みた。しかしながら、両者とも投与によって骨髄 NKT 細胞を除去することはできなかった。特異的除去が困難であった為、骨髄 NKT 細胞を NKT 細胞欠損マウスへ移入することで骨髄 NKT 細胞再構築マウスの作成を試みた。しかし移入骨髄 NKT 細胞は移入翌日には全身より消失しており、移入細胞を検出することができなかった。対象で移入した脾臓 NKT 細胞は少ないながらも検出されたことから、上述の骨髄環境が骨髄 NKT 細胞の生存や維持において必須である可能性が示唆された。

本研究期間内に骨髄 NKT 細胞の生体における重要性を明らかにすることができなかったが、今後の研究・解析の基盤となる基礎データを得ることができた。今後は NKT 細胞の機能解析の為の *in vitro* NKT_{FH} 細胞分化培養系を樹立することで、骨髄 NKT 細胞の未分化能および重要性について研究を推進させる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林崎浩史, 上井康寛, 菅野俊生, 遠藤裕介, 金城雄樹
2. 発表標題 糖脂質アジュバントで誘導される濾胞性ヘルパーNKT細胞の分化機構の解明
3. 学会等名 第6回糖鎖免疫研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koji Hayashizaki, Yukihiro Akeda, Bin Chang, Kazuyoshi Kawakami, Kazunori Oishi, Yuki Kinjo
2. 発表標題 Pneumococcal surface protein A and glycolipid vaccine augments generation of long-lived plasma cells that produce antigen-specific IgG
3. 学会等名 The third Asian pneumococcal symposium
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Kamii, Koji Hayashizaki, Toshio Kanno, Yusuke Endo, Yoshimasa Takahashi, Yuki Kinjo
2. 発表標題 Gr-1+ cells influence on the differentiation of follicular helper Natural killer T cells
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Hayashizaki, Shogo Takatsuka, Yasuhiro Kamii, Makoto Tsuiji, Masato Kubo, Yoshimasa Takahashi, Yuki Kinjo
2. 発表標題 NKT-mediated vaccine induces affinity maturation of BCR and supply antibody dependent protection against Streptococcus pneumoniae
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上井康寛、林崎浩史、桑野和善、金城雄樹
2. 発表標題 新規肺炎球菌ワクチンにおける機能的ナチュラルキラーT細胞分化機構の解明
3. 学会等名 第32回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林崎浩史、高塚翔吾、川久保俊、竹山春子、川上和義、大石和徳、宮崎義継、金城雄樹
2. 発表標題 新規肺炎球菌ワクチンの免疫学的作用機序の解析
3. 学会等名 第31回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hayashizaki K, Takatsuka S, Kawakubo S, Kami Y, Takahashi Y, Kawakami K, Kubo M, Kinjo Y.
2. 発表標題 The protein and glycolipid vaccine induce long-term protection against pneumococcal infection through differentiation of follicular helper NKT cells.
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林崎 浩史、高塚 翔吾、川久保 俊、大石 和徳、宮崎 義継、金城 雄樹
2. 発表標題 糖脂質アジュバントを用いた肺炎球菌ワクチンの抗体産生誘導及び感染防御機構の解明
3. 学会等名 第30回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------