

機関番号：82112

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2011

課題番号：20780213

研究課題名 (和文) ブタNK T細胞の増殖・分離方法の確立およびその性状解析

研究課題名 (英文) Isolation and characterized of the porcine NKT cells

研究代表者

小川 智子 (OGAWA TOMOKO)

独立行政法人農業生物資源研究所 家畜ゲノム研究ユニット 任期付研究員

研究者番号：90466011

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、自然免疫と獲得免疫の両方の機能を合わせ持ち、かつCD1d分子で特異的に活性化することが報告されているNKT細胞について、ブタ末梢血からの分離ならびに機能的特徴を明らかにし、活性化の条件を決定することを目的とした。フローサイトメトリーの解析からブタ末梢血中のNK細胞 (CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>リンパ球) 画分の中にCD3発現細胞 (T細胞) が存在することを確認した。また、マウスのCd1dテトラマーと反応する細胞集団を検出した。さらに、ヒトの一部のNKT細胞 (type I NKT細胞= iNKT細胞) において発現しているTCR配列 (TCRV $\alpha$ 24/TCRV $\beta$ 11) と高い相同性を持つブタの配列を得た。この配列には $\alpha$ -GalCerと反応するアミノ酸が保存されていたことから、ブタ末梢血中のNKT細胞の存在が強く示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

In human and mouse, NKT cells are characterized as a population that can be stimulated by glycolipid antigen, such as  $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer), which is presented by CD1d molecule. Activated NKT cells can produce both cytokines (IFN- $\gamma$  and IL-4) and cytolytic protein (perforin), suggesting that this cell population have an important role in both innate and acquired immunity. In this study, we tried to conduct isolation, culture and functional analysis of porcine NKT cells. Flow cytometry analysis showed that there are T cell marker (CD3<sup>+</sup>)-expressing cells in porcine NK cell (CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) population. In addition, we detected mouse CD1d tetramer-reactive cells in porcine CD3<sup>+</sup> cell population. Furthermore, we obtained the homologous sequence of human NKT cell markers, TCRV $\alpha$ 24 and TCRV $\beta$ 11 from pig PBMC. The amino acid sequences that are important for NKT cell binding to  $\alpha$ -GalCer and CD1d were conserved in the obtained porcine TcR sequences. These results strongly suggested the existence of porcine NKT cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	334,108	100,232	434,340
2010年度	1,065,892	319,767	1,385,659
年度			
年度			
総計	3,300,000	989,999	4,289,999

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：免疫学・獣医学・ブタ・NKT細胞・CD1

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、細胞性免疫における自己・非自己の認識は、ペプチドを抗原として MHC が T 細胞に提示する系によってのみ行われていると考えられてきていた。しかし、近年新たな抗原認識システムとして脂質を認識する CD1-T 細胞の系が存在することが判明してきた。MHC 分子が限られた T 細胞、すなわち MHC クラス I 分子が CD8<sup>+</sup>T 細胞を、MHC クラス II 分子が CD4<sup>+</sup>T 細胞を選択的に活性化するのは異なり、CD1 分子は CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 細胞以外にも  $\gamma\delta$  や NKT などの幅広い T 細胞をも活性化することが知られている。このうち、NKT 細胞は 1997 年、Kawano らにより、海綿由来の  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GalCer) と呼ばれる糖脂質を抗原として CD1d 拘束的に活性化されることが明らかとなった細胞集団である。この NKT 細胞は、獲得免疫応答を担当する T 細胞や B 細胞の活性化を促す一方で、自然免疫に関わる樹状細胞の成熟化を促す働きを有する。また、NKT 細胞自身も、パーフォリンを産生し、標的細胞のアポトーシスを誘導することから、自然免疫と獲得免疫両方の機能を有する細胞として注目を浴びている細胞である。さらに、強力な抗腫瘍活性、ならびに日和見感染症の原因菌の一つである *Cryptococcus* に対する増殖抑制を持つことも知られており、感染防御などに重要な役割を担っていると考えられている。しかし、NKT 細胞は末梢血中には通常 0.5~1.0% 程度しか存在せず、それ故、分離や発現遺伝子の解析などが非常に難しかった。上述したヒト・マウスの NKT 細胞の研究が飛躍的に進んだのは  $\alpha$ -GalCer という抗原の発見とそれぞれの種における CD1d の機能解析の進歩によるところが大きい。ブタに関しては、2006 年 Denyer らが、 $\alpha$ -GalCer 添加条件下で PBMC を培養すると、パーフォリンを産生する細胞の割合が増加することを示した。しかし、当初 CD1 分子に関する報告はヒト CD1a のホモログである pCD1.1 に限られていたことから、ブタでの NKT 細胞の存在は疑問視されていた。しかしながら、申請者らは、ゲノム配列解読および EST 解析から、ブタゲノム上には pCD1.1 をコードする *CD1A1* 以外にも *CD1A2*、*CD1B*、*CD1C*、*CD1D*、*CD1E* の 5 種類の *CD1* 遺伝子が存在することを明らかにした。さらにこれら *CD1* 遺伝子のうち、*CD1A2*、*CD1C* 以外はすべて機能遺伝子と考えられることを示した。機能的な *CD1D* 遺伝子を持つことから、ブタにおいても他の哺乳動物と同様に NKT 細胞が存在していることが想定された。

## 2. 研究の目的

本研究では申請者がゲノム解析的手法より明らかにした CD1 分子の研究結果をもとに、

ヒト・マウスの感染防御・腫瘍拒絶において重要な役割を担っている NKT 細胞のブタにおける存在と、その機能的特徴を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

ブタについては NKT 細胞の存在自体が不明であることから、まずフローサイトメトリー (FCM) を用い、その存在を確認することとした。マウスやヒトの  $\alpha$ -GalCer で活性化される NKT 細胞では特定の T 細胞レセプター (TcR) のみが発現しており (マウス CD1d : V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281/V $\beta$ 8、ヒト CD1d : V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q/V $\beta$ 11) それぞれが iNKT 細胞のマーカーとして利用されている。そこで、ブタについてはこれらのホモログ配列を得ることをまず目的とした。一方で、NKT 細胞の末梢血に占める割合は、ヒトでは 1%前後と非常に少なく、分離や遺伝子発現の解析などが困難となることが予測されたため、NKT 細胞を特異的に増幅する系の確立を目指した。また、得られた NKT 細胞についてはサイトカインの発現を基にした性状解析を行うことを目標とした。

## 4. 研究成果

当初、NKT 細胞は、ヒトやマウスの解析結果から、末梢血中に存在したとしても非常にその割合は少ないことが予測された。そこでまず、ブタ NKT 細胞を増幅する培養条件について検討した。NKT 細胞の確認については、ヒト NKT 細胞の検出で使用している抗体 (hTRA24、hTRB11) を用いて行うこととした。しかし残念ながら、ブタ PBMC 中にこれら抗体と反応する細胞集団を検出することは出来なかった。このため、ブタにおける NKT 細胞のマーカーの確立が必須と考え、ブタにおけるヒト hTRA24、hTRB11 のホモログ配列の決定を行うこととした。得られたホモログ配列の推定アミノ酸配列と、ヒト・マウスの iNKT 細胞で利用されている TcR の配列との間で配列を比較した。その結果、得られたブタの TcR 配列には  $\alpha$ -GalCer の認識に関わる領域が保存されていることが確認された。得られた配列の情報を元に、ウサギを用いて、ヒト TCRV $\alpha$ 24 のブタホモログならびに pCD1d のポリクローナル抗体を作製した。

一方で、Cd1d テトラマーを用いた NKT 細胞の検出についても検討した。この結果、抗ブタ CD3<sup>+</sup>陽性の細胞集団中にマウス CD1d テトラマーと反応する集団を検出した。

残念ながら、期間内には NKT 細胞を特異的に検出・増幅する系の確立には至らなかったが、検出する際のマーカーの基礎データ並びに抗体等を得ることが出来たので、今後これらのツールを用い、さらにブタ NKT 細胞についての検証が進めることが可能になると思

われる。

また、ブタ TCRV $\beta$ 11 のホモログ配列の決定は、本遺伝子を含む領域のゲノムを解読することにより行った。この遺伝子の近傍には TRB の定常領域 (C 領域) がコードされており、ヒト・マウスでは、TcR $\beta$ 鎖の C 領域には D (Diversity) 遺伝子分節、J (Joining) 遺伝子分節および C 領域からなる TRBD-J-C クラスタが 2 つ存在する。しかし、ゲノム解読の結果、ブタでこのクラスタが 3 つ存在し、いずれも機能していることが明らかとなった。また、この新しい D-J-C クラスタは、偶蹄目への進化の過程で出現したことを明らかとした。このゲノム解読の結果は論文としてまとめ発表した。

#### (1) 培養条件の検討

ブタ末梢血から Ficoll-paque plus を用いて、末梢血リンパ球 (PBMC) を回収した。得られた PBMC をヒトの iNKT 細胞の培養条件を参考に、pIL2 (50 unit/ml) ならびに  $\alpha$ -GalCer (100ng/ml) を添加した RPMI1640 培地で 37°C、4 日間培養した。培養後の細胞について RT-PCR によりサイトカイン (IL-4, IFN- $\gamma$ ) の産生量の変化を検証したが有意な値の上昇は確認されなかった。 $\alpha$ -GalCer は、ヒト、マウスの NKT 細胞に対しては有効な抗原であるが、ブタ NKT 細胞は認識出来ない可能性も否定できない。そこで、直接的にブタ NKT 細胞を検出する系を確立することが重要であると考え、(2)以降のブタ NKT 細胞の検出方法やマーカーとなる遺伝子配列の決定を行うこととした。

#### (2) フローサイトメトリー (FCM) を用いたブタ NKT 細胞の検出について

ヒト NKT 細胞は、iNKT 細胞で特異的に発現している TcR を認識する抗体 (hTCRV $\alpha$ 24; Immunotech:1589 もしくは hTCRV $\beta$ 11; Immunotech:1586) と hCD3 抗体との 2 重染色で検出される。現在、TCRV $\alpha$ 24 および TCRV $\beta$ 11 のブタホモログに特異的に反応する抗体は存在しないため、前述のヒト NKT 細胞を検出する抗体がブタの NKT 細胞検出に利用可能かを検証した。ブタ PBMC をヒト TCRV $\alpha$ 24 ならびに TCRV $\beta$ 11 抗体で染色したが、抗体特異的なシグナルを得ることは出来なかった。そこで、ブタ NK 細胞に対して、T 細胞受容体を発現している細胞集団が存在するかについて検討した。ブタ NK 細胞は CD8 ならびに CD16 の両方を発現している細胞集団と特徴づけられることから、まず、ブタ PBMC を抗ブタ CD8 (BD: 559584) ならびに抗ブタ CD16 (BD: 551395) で染色し、CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>の細胞のみを磁気ビーズ法 (MACS 法) により回収した。得られた細胞集団について、さらに T 細胞のマーカーである抗ブタ CD3 (BD: 559582) で染色

し、蛍光強度を測定した。この結果、ブタ NK 細胞中に抗ブタ CD3<sup>+</sup>陽性の細胞集団が存在することを確認した。得られた NK 細胞 (CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) については totalRNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作製した。現在、これらライブラリーから T 細胞受容体に関係するクローンの選出を行い、NK 細胞で発現している TcR 配列のレパトアについて検討しているところである。

一方で、NKT 細胞のもう一つの検出法である CD1d テトラマーを用いた方法についても検討した。現在、MBL 社からマウスの CD1d テトラマーを入手することが可能である。そこで、ブタ PBMC をマウスの CD1d テトラマー (MBL: TS-MCD-1) と抗ブタ CD3 抗体で染色し、それぞれの蛍光強度を測定した。この結果、抗ブタ CD3<sup>+</sup>陽性細胞の一部にマウス CD1d テトラマーと反応する細胞集団があることを確認した。よってマウス CD1d テトラマーの系を用いた、ブタ NKT 細胞の検出が可能であることが示唆された。

#### (3) ブタにおけるヒト TRV $\alpha$ 24、TRV $\beta$ 11 のホモログ遺伝子の配列決定

ヒト、マウスで  $\alpha$ -GalCer で活性化される NKT 細胞では特定の TcR のみが発現しており (マウス CD1d: V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281/V $\beta$ 8、ヒト CD1d: V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q/V $\beta$ 11) これらが iNKT 細胞のマーカーとして利用されている。そこで、これらのホモログを得れば、ブタ NKT 細胞のマーカーとすることが出来ると考え、ブタにおけるヒト TRV $\alpha$ 24、TRV $\beta$ 11 のホモログ配列のクローニング並びにその配列決定を行った。TRV $\alpha$ 24 に関しては、Beeck FA et al. らが様々な動物種からヒト TRV $\alpha$ 24 のホモログをクローニングした結果をまとめている。(Mol Immunol. 2009)。この中で、ブタの TRV $\alpha$ 24 のホモログ配列に、 $\alpha$ -GalCer との結合に必要な CDR1 領域の Pro28、Ser30 (ブタでは Asn に置換)、CDR3 の Arg95 および Gly96 が保存されていることが報告されている。一方、TRV $\beta$ 11 のホモログについては申請者らが配列を決定し、特に CD1d との結合に必要な CDR2 領域の Tyr48 ならびに Try50 が保存されていることを確認した。以上のことから、これらブタにおけるヒト TRV $\alpha$ 24、TRV $\beta$ 11 のホモログの配列は、ブタ NKT 細胞で利用されている可能性が高いと推察された。

次に、ブタのヒト TRA24 のホモログ並びにブタ CD1d 分子を認識するポリクローナル抗体を、ウサギを用いて作製した。ブタ末梢血より PBMC を分離し、作製したポリクローナル抗体で染色した。染色した細胞を抗ウサギ IgG-PE 抗体を 2 次抗体として検出しようとしたが、抗体特異的なシグナルを得ることは出来なかった。そこで、ブタにおけるヒト TRV $\alpha$ 24 のホモログ並びにブタ CD1d 遺伝子を

HEK 細胞に導入した形質転換体を作製し、これらの形質転換体を用いて各分子を検出するための条件検討を行っている。

(4) 本研究に派生して得られた成果について

今回、ブタにおけるヒト TRVβ11 ホモログ遺伝子の配列決定は、本遺伝子を含むゲノム領域を解読することで行った。これは、cDNAを用いた方法ではNKT細胞自身が末梢血にあまり存在せず、使用されている TcR の発現頻度が低いために配列を得ることが困難であると予測されたことと、TcR の V 領域は特に重複が多く、PCR によるクローニングでは V 遺伝子の相同性の高い領域間でのミスアニーリングが起り、鋳型の乗換えが起こる危険性が高いためである（実際、免疫グロブリンの V 領域などでは PCR を行った際の鋳型の乗り換えが確認されている）。そこで、BAC ライブラリーより、ヒト TRVβ11 ホモログ遺伝子を含む領域をカバーするクローンを選出し、その BAC クローンの内部配列を決定した。用いた BAC クローンには TRVβ11 ホモログ遺伝子を含む V 領域だけではなく、D-J-C のクラスター領域も完全にコードされていた。そこで、定常領域も含めて解析したところ、ヒト、マウスでは *TRBD-J-C* クラスターは 2 つ並んだ状態で存在しているのに対し、ブタでは *TRBD-J-C* クラスターが 3 つタンデムに並んでいることが明らかとなった。さらに、検出された遺伝子のほぼすべてが発現し、機能的な TCRβ 鎖遺伝子としてとして使用されていることを明らかとした。更に、ブタで新たに出現したクラスターは、偶蹄目への進化の過程でこれらのクラスター間で交差組み換えを起こして出現したものであることを明らかとした。これら TRB のゲノム解析の結果は、*Developmental & Comparative Immunology* 誌に発表した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Eguchi-Ogawa T, Toki D, Uenishi H (2009)  
Genomic structure of the whole *D-J-C* clusters and the upstream region coding V segments of the *TRB* locus in pig.  
*Developmental & Comparative Immunology*  
33:1111-1119.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小川 智子 (OGAWA TOMOKO)

農業生物資源研究所 動物科学研究領域  
家畜ゲノム研究ユニット・任期付研究員  
研究者番号：90466011

##### (2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者 ( )

研究者番号：