

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790485

研究課題名（和文） 胸腺におけるナチュラルキラーT細胞の新規分化経路の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the novel developmental pathway of NKT cells from thymic CD4, CD8-double-negative precursors.

研究代表者

D NYAMBAYAR (NYAMBAYAR DASHTSOODOL)

独立行政法人理化学研究所・免疫制御研究グループ・客員研究員

研究者番号：50443057

研究成果の概要（和文）： CD1d 拘束性のナチュラルキラーT（NKT）細胞は胸腺の CD4 陽性 CD8 陽性のダブルポジティブ（DP）から分化発生すると考えられている。我々は NKT 細胞前駆細胞が、野生型及びに CD1d 欠損マウス両方に、DP よりも未分化な CD4 陰性 CD8 陰性ダブルネガティブ（DN）のステージ4（DN4）に存在することを明らかにし、NKT 細胞の T 細胞抗原受容体である V α 14J α 18 受容体が細胞表面に発現する前に NKT 細胞の発生を特徴づける新しい概念を提唱した。

研究成果の概要（英文）： The presently held opinion, called “mainstream model of development”, proposes that the NKT cells are developed after CD4, CD8-double-positive (DP) thymocytes. However, we have reported previously about identification of NKT cell precursors in the double-negative 4 (DN4) stage of development that is before reaching DP stage, indicating NKT cells arise from earlier stage. Here, we characterized NKT precursor cells in DN4 stage by single cell sorting and qRT-PCR analysis, and also role of CD1d in the development of NKT cells by using NKT-cloned mice with CD1d-deficient background. Better understanding of developmental aspects of NKT cell lineage will hopefully lead to the development of more efficient clinical intervention methods to fight various immune-compromised diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：(1) ナチュラルキラーT（NKT）細胞、(2) 抗原提示分子 CD1d、(3) 胸腺、(4) 分化、(5) 前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

T細胞抗原受容体 (TCR) $\alpha\beta$ を発現する T 細胞は胸腺で分化し、MHC クラス I あるいはクラス II に提示されるペプチドを認識し、ポジティブセレクション、ネガティブセレクションの過程を経て、末梢に移行する。T 細胞が機能的に多様性に富んだクローンの集合体であるのに対して、所謂 iNKT 細胞は固有の TCR α すなわち V α 14-J α 18 の TCR α 鎖を唯一の抗原受容体として発現する均一な細胞であり、かつ多機能性に富むことを特徴とする。iNKT 細胞は MHC の代わりに MHC クラス I 様抗原提示分子 CD1d 拘束性であり、ペプチドの代わりに糖脂質を抗原として認識する特長を有する。その分化発生の場合は $\alpha\beta$ T 細胞と同様に胸腺であることが知られる。 $\alpha\beta$ T 細胞の場合、DN から DP を経て、CD4 シングルポジティブ (SP) あるいは CD8SP に分化するが、iNKT 細胞はこれまで DP から T 細胞分化決定系列と分岐して発生すると考えられていた (Gapin L et al, Nat Immunol 2:971, 2001)。しかしながら我々は胸腺 DN 細胞に既に V α 14-J α 18 に遺伝子再構成を終えた iNKT 細胞の前駆細胞と考えられる細胞集団が存在するを見出し、より未分化な段階で iNKT 細胞決定系列が分岐している示唆を得ていた。

2. 研究の目的

上述のように、NKT 前駆細胞はこれまで考えられていたステージよりも早い、すなわち未分化な段階で T 細胞分化決定系列から分岐すると考えられる。DN ステージのどの段階あるいはどのフラクシオンに NKT 前駆細胞が存在するかを明らかにすることは重要である。すなわち、NKT 細胞は多様かつ大量のサイトカインを即時的に産生することで免疫系全体を調節し得る重要な細胞であり、その分岐点を明らかにすることは T 細胞とは機能を異にする NKT 細胞の発生活源および発生メカニズムの明確化につながる。さらに、MHC 分子に代わる抗原提示分子 CD1d が NKT 細胞の分化発生において正あるいは負の選択に関与するのか、あるいは機能付与にも関与し得るのかなど、その役割についても明確にすることを目的とする。本研究においては最近進捗の著しい技術、多重染色法による FACS 解析、シングルセルソーティングや一細胞半定量 PCR による遺伝子プロファイル技術などの確立も同時に重要な課題である。

3. 研究の方法

DN 胸腺細胞は CD44 と CD25 の発現を指標に DN1~4 に細分化できる。このうち、CD44 陰性 CD25 陰性である DN4 などの胸腺細胞は大半が DP に分化する直前の不均一な細胞集団と捉えることができる。この細胞を高純度にシングルセルソートし、V α 14-J α 18 に遺伝子再構成を起こしている NKT 前駆細胞と考えられるクローンを選抜し、その遺伝子発現プロファイルを一細胞半定量 PCR 法によって責任遺伝子の抽出を行うとともに、Notch リガンドを強制発現させた骨髄由来ストローマ細胞 OP9/DLL1 細胞との共培養による分化発生システムを明らかにする。

一方、NKT 細胞の核を脱核した卵母細胞に移植して樹立した ES 細胞 (NKT-ES 細胞) からマウスを作製 (NKT クローンマウス) すると、生体内に存在する全ての細胞の TCR 領域が既に NKT-TCR に遺伝子再構成を起こしているため、通常のマウスに比して 5-50 倍の NKT 細胞が存在するようになる。CD1d 欠損マウスにおいては NKT 細胞を検出することはできないが、NKT クローンマウスを CD1d 欠損背景にすると、CD1d 拘束性の細胞が認められることから、本細胞 (特に胸腺に存在する集団) の機能を詳細に解析することで生体内 (特に胸腺における分化発生) における CD1d の役割を明らかにすることができる。

4. 研究成果

DN に存在する細胞をソートし、OP9/DLL1 との共培養によって NKT 細胞に分化するか否かを指標に NKT 前駆細胞が含まれる細胞集団を絞り込んだ。その結果、DN 中の CD44 陰性 CD25 陰性の所謂 DN4 フラクシオンのうち、CD24 陰性の細胞集団に約 0.05% の割合で NKT 前駆細胞が含まれていることを見出した。この出現頻度は野生型マウスと CD1d 欠損マウスの間で有意差がないことから、CD1d による賦活以前に V α 14-J α 18 陽性の NKT 前駆細胞に運命づけられる仕組みがあることが示唆された。さらに、試験管内での培養のみならず、この NKT 前駆細胞集団は Ly5.1 マウスに胸腺内移入することで末梢において Ly5.2 陽性 NKT 細胞に分化発生することから、この集団の中に前駆細胞が含まれていることが示された。さらにシングルセルソート後、V α 14-J α 18 陽性をポジティブコントロールとして、他の DN 集団や免疫担当細胞に発現する遺伝子群と比較することで、NKT 前駆細胞に有意に発現の高い遺伝子群の抽出に成功し、NKT 前駆細胞の発生に関与する遺伝子群の同定と機能解析を実施している。

CD1d 欠損 NKT クローンマウス由来胸腺 NKT 細

胞は CD1d による賦活直前の細胞集団と捉えることができる。CD1d 欠損 NKT クローンマウス由来胸腺 NKT 細胞は、NK1.1 陰性、CD122 陰性、CD44 低発現、CD62L 陽性で野生型マウスのそれ (NK1.1 陽性、CD122 陽性、CD44 高発現、CD62L 陰性) と大きく異なる細胞表面抗原プロファイルを有していた。さらに、野生型の NKT 細胞は糖脂質リガンドである α -ガラクトシルセラミドに反応して Th1 サイトカインである IFN- γ と Th2 サイトカインである IL-4 の両方を産生する能力を有することが知られるが、CD1d 欠損 NKT クローンマウス由来の胸腺 NKT 細胞は、IFN- γ の産生能は変化がないものの、IL-4 産生能が著しく減弱していた。この結果は CD1d 分子が NKT 細胞の分化や拡大のみならず、機能賦活、特に IL-4 産生能獲得にも重要な役割を担っていることを示唆する結果である。現在は、CD1d による NKT 細胞の IL-4 など、Th2 サイトカイン産生機能獲得メカニズムについて詳細に解析を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Watarai H, Rybochkin A, Hongo N, Nagata Y, Sakata S, Sekine E, Dashtsoodol N, Tashiro T, Fujii S, Shimizu K, Mori K, Masuda K, Kawamoto H, Koseki H, Taniguchi M. Generation of functional NKT cells in vitro from embryonic stem cells bearing rearranged invariant Valpha14-Jalpha 18 TCRalpha gene. *Blood* 115:230-237 (2010) 査読有.
2. Taniguchi M, Tashiro T, Dashtsoodol N, Hongo N, Watarai H. The specialized iNKT cell system recognizes glycolipid antigens and bridges the innate and acquired immune systems with the potential applications for cancer therapy. *Int. Immunol.* 22:1-6 (2010) 査読有.

[学会発表] (計 4 件)

1. Dashtsoodol N, Ren Y, Taniguchi M. 胸腺 CD4 CD8 両陰性中の NKT 前駆細胞の分化には IL-7 受容体 alpha 鎖と SAP 分子が必要である. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会, 幕張メッセ (千葉), 2011 年 11 月 27 日
2. Dashtsoodol N, Ren Y, Sekine-Kondo E, Watarai H, Taniguchi M. Interleukin-7 receptor alpha (IL7Ra), SLAM-associated protein (SAP) and PLZF-dependent development of CD4, 8

double-negative thymocytes with NKT cell lineage potential. 6th International Symposium on CD1 and NKT cells, Chicago, USA, 2011 年 9 月 25 日

3. Dashtsoodol N, Kurimoto K, Watarai H, Saitou M, Taniguchi M. Identification of NKT cell precursors in a subset of DN4 cells. 14th International Congress on Immunology, Kobe, Japan, 2010 年 8 月 22 日
4. Dashtsoodol N, Taniguchi M. Identification of CD4, CD8 DN precursors of the NKT cell lineage. Second International Conference "Current Advances in Immunology, Microbiology and Allergology", Ulaanbaatar, Mongolia, 2010 年 6 月 24 日

[図書] (計 1 件)

1. Taniguchi M, Fujii S, Nakayama T, Motohashi S, Dashtsoodol N, Watarai H, Harada M. Mechanisms of NKT-cell-mediated adjuvant activity and function of iPS-derived NKT cells. Springer, *Natural Killer T cells: Balancing the Regulation of Tumor Immunity*, 1-14 (2011).

[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

<http://www.riken.jp/r-world/research/la>

[b/rcai/regulation/index.html](http://web.rcai.riken.jp/en/labo/regulation/index.html)
<http://web.rcai.riken.jp/en/labo/regulation/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

D N Y A M B A Y A R (NYAMBAYAR
DASHTSOODOL)

独立行政法人理化学研究所・免疫制御研究グループ・客員研究員

研究者番号：50443057

(2) 研究分担者

なし