

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07085

研究課題名（和文）長期抗体産生を誘導する機能的NKT細胞の発生機序の解明

研究課題名（英文）The differentiation mechanism of functional NKT cells that induce long-term antibody production

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々が樹立した新規肺炎球菌ワクチンは、ナチュラルキラーT（NKT）細胞のエフェクターサブセットである濾胞性ヘルパーNKT（NKTFH）細胞の分化誘導を介して、ワクチン抗原特異的抗体を強力に産生させる。しかし、NKTFH細胞の分化誘導機序はこれまで不明であった。本研究により、Gr-1陽性細胞由来のインターロイキン-27（IL-27）が、NKTFH細胞の分化誘導に必須であることがわかった。IL-27は活性化NKT細胞のミトコンドリア代謝を制御することで効率的なエネルギー産生に寄与していること、そして、この制御は活性化NKT細胞の産生するIFN γ が起点となることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症予防としてワクチンは極めて効果的であるが、その効果はワクチン抗原に特異的な抗体産生の誘導能、および産生維持能に依存する。我々はより効果的な予防ワクチンを目指し、NKT細胞の活性化をワクチンに応用することを考えた。しかし、NKT細胞はその分化機序や機能獲得に関して未だ明らかになっていない点が多かった。本研究は、機能的NKT細胞が効果基盤となるワクチンの作用機序を明らかにすることを目的として実施し、その機序の一端を明らかにすることができた。本成果は効果的な感染症ワクチン開発に繋がることが期待され、免疫学としての学術的側面の解明できた点も合わせ、極めて意義のある研究であったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In our novel pneumococcal vaccine, the production of vaccine antigen-specific antibodies is produced via differentiation of follicular helper NKT (NKTFH) cells, an effector subset of natural killer T (NKT) cells. However, the mechanism of NKTFH cell differentiation has been unclear. The present study reveals that interleukin-27 (IL-27) derived from Gr-1+ cells is essential for the induction of NKTFH cell differentiation. And, IL-27 contributes to meet energetic demand in activated NKT cells by regulating mitochondrial metabolism. In addition, this regulation is mediated by NKT cell-derived IFN γ .

研究分野：感染免疫学

キーワード：ワクチン NKT細胞 NKTFH細胞 IL-27 Gr-1+細胞

1. 研究開始当初の背景

種々の病原性微生物に対する感染予防対策としてワクチンは極めて重要である。我々は、とりわけ急性の肺炎球菌感染症に対して、現行のワクチンよりもより効果的なワクチンを樹立すべく、生体内のナチュラルキラーT (NKT) 細胞の活性化を利用した新規肺炎球菌ワクチンを作成した。当該ワクチンは、NKT 細胞を特異的に活性化する糖脂質 α -ガラクトシルセラミド (α GalCer) をワクチンアジュバントとして含有しており、マウスへの投与後、所属リンパ節の NKT 細胞を強力に活性化させ、ワクチン抗原特異的な抗体産生を促す。当研究開始当初までの研究成果により、当該ワクチンは従来のアジュバント含有ワクチンと比較して強力な抗体産生応答が誘導されること、そしてその産生抗体が長期維持されることを明らかにしていた。そして、この強力なワクチン効果の作用基盤としてエフェクターNKT 細胞サブセットである濾胞性ヘルパーNKT (NKT_{FH}) 細胞が誘導されることが極めて重要であることが示唆されていた。しかしながら、NKT_{FH} 細胞がどのようにして誘導されるかその機序は不明であった。

2. 研究の目的

NKT 細胞は通常の T 細胞とは異なり胸腺にて既に種々のエフェクター細胞へと分化することが知られており、故に末梢組織において活性化後迅速に応答することが可能である。しかし、NKT_{FH} 細胞は他の NKT サブセットとは異なり、胸腺では分化せず末梢組織にてその機能を獲得することが報告されている。また、末梢組織から単離した NKT 細胞を *in vitro* 条件下で刺激しても既存の NKT サブセット由来のサイトカイン産生は認められるものの、NKT_{FH} 細胞への分化は誘導されない。よって末梢組織に存在する周囲の環境が、NKT_{FH} 細胞分化に極めて重要であることが示唆された。

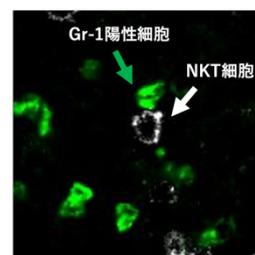


図1. NKT細胞と共局在するGr-1陽性細胞

我々は、NKT_{FH} 細胞の誘導初期において NKT 細胞と共局在する細胞を明らかにすべくイメージング解析を実施したところ、Gr-1 陽性細胞が NKT_{FH} 細胞の誘導初期に高頻度で共局在していることがわかった (図1)。Gr-1 陽性細胞が NKT_{FH} 細胞の誘導に寄与していると予想し、特異的抗体を用いて Gr-1 陽性細胞を除去したところ NKT_{FH} 細胞分化が著しく損なわれることが明らかとなった。本研究では Gr-1 陽性細胞がどのような作用機序に基づき NKT_{FH} 細胞分化を制御するかについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Gr-1 陽性細胞の作用時期の絞り込みと遺伝子発現変動解析

ワクチン投与1日後に Gr-1 陽性細胞除去抗体を投与した際に分化障害が認められた。そこで、ワクチン投与前、投与1日後、3日後と、それぞれ投与時期を変え Gr-1 陽性細胞を除去した際の影響を解析した。また、定まった作用時期の脾臓より Gr-1 陽性細胞をセルソーターで単離し、どのような機能遺伝子が高発現しているか RNA シークエンス解析を実施した。

(2) 同定した作用因子の阻害による NKT_{FH} 細胞分化への影響についての解析

RNA シークエンス解析で同定した候補因子の Gr-1 陽性細胞による発現解析と中和抗体による阻害による NKT_{FH} 細胞分化への影響を解析した。また、Gr-1 陽性細胞除去抗体投与時に候補因子を投与することで阻害効果がキャンセルされるかについて解析した。

(3) 同定した作用因子の NKT 細胞に与える影響についての解析

同定因子が NKT 細胞にどのような影響を与えるかについて、同定因子の中和抗体を投与したマウスより NKT 細胞を単離し、RNA シークエンス解析を実施した。遺伝子オントロジー解析や遺伝子エンリッチメント解析により作用点を同定した。同定した作用点を種々の蛍光プローブを用いて詳細に解析するとともに細胞への影響を電子顕微鏡解析により詳細に分析した。

(4) Gr-1 陽性細胞のリプログラミング因子の解析

ワクチン投与によって Gr-1 陽性細胞が同定因子の産生細胞へとリプログラムする因子を Gr-1 陽性細胞の RNA シークエンス解析データセットを用いて再解析した。ついで、NKT 細胞によるリプログラミング因子の発現の有無について解析した。また、リプログラミング因子の中和抗体投与によって Gr-1 陽性細胞からの同定因子産生が阻害されるかについて解析した。

(5) 作用因子阻害による感染防御効果への影響についての解析

Gr-1 陽性細胞が産生する NKT_{FH} 細胞分化誘導因子を中和抗体によって阻害した際のワクチン抗原特異的抗体産生への影響とそれに伴った感染防御効果への影響を解析した。

4. 研究成果

研究開始当初までの研究成果により、ワクチン投与後の抗 Gr-1 抗体投与による Gr-1 陽性細胞の除去は、NKT_{FH} 細胞の誘導を阻害することがわかっていった。我々は、Gr-1 陽性細胞が NKT 細胞と相互作用する時期を同定する為、抗 Gr-1 抗体投与時期をワクチン投与 1 日前、1 日後、3 日後と変え、NKT_{FH} 細胞誘導のピークであるワクチン投与 5 日後に誘導の有無を解析した。結果、1 日前および 1 日後に除去抗体を投与した際に NKT_{FH} 細胞誘導が顕著に阻害され、3 日後ではその影響が認められなかった。よって、Gr-1 陽性細胞はワクチン投与 3 日までに NKT_{FH} 細胞の分化誘導を制御していることが示唆された。次いで、ワクチン投与によって Gr-1 陽性細胞が特異的に産生する制御因子を同定するためにワクチン投与前、投与 1 日後、3 日後の脾臓より Gr-1 陽性細胞をセルソーターにて単離し、RNA シークエンス解析を実施した。得られたデータをもとに主成分解析を実施したところ、ワクチン投与前、そして 3 日後の Gr-1 陽性細胞と比較して投与 1 日後の Gr-1 陽性細胞は特徴的な遺伝子プロファイルを持つことがわかった。とりわけサイトカイン関連遺伝子に着目して高発現遺伝子を抽出したところ、インターロイキン-27 (IL-27) がワクチン投与 1 日後の Gr-1 陽性細胞にて高発現していることがわかった。また、タンパク質レベルでも Gr-1 陽性細胞から産生していることがわかり、IL-27 産生はワクチン投与早期に一過性に認められた。

IL-27 が実際に NKT_{FH} 細胞の分化誘導を制御しているか明らかにするため、IL-27 に対する中和抗体をワクチン投与マウスに投与したところ、NKT_{FH} 細胞誘導が Gr-1 陽性細胞除去時と同程度阻害された (図 2)。また、IL-27 中和は NKT_{FH} 細胞誘導に先行して活性化 NKT 細胞数も顕著に低下しており、チミジン類縁体の取り込み実験により IL-27 中和によって活性化 NKT 細胞の細胞増殖が損なわれていることがわかった。Gr-1 陽性細胞由来の IL-27 の重要性を確かめるため、Gr-1 陽性細胞を除去したワクチン投与マウスに IL-27 組換えタンパク質を投与したところ、NKT_{FH} 細胞誘導が部分的に回復した。これらの結果より、Gr-1 陽性細胞由来の IL-27 が活性化 NKT 細胞の増殖と NKT_{FH} 細胞の分化誘導を制御していることが明らかになった。

NKT 細胞における IL-27 の作用機序を明らかにするために IL-27 中和抗体を投与したマウス脾臓より NKT 細胞を単離し、RNA シークエンス解析を実施した。コントロール抗体投与群と比較し遺伝子発現変動を解析したところ、ミトコンドリア代謝制御に関与する遺伝子がワクチン投与マウス由来の NKT 細胞で発現上昇しており、IL-27 中和抗体を投与したマウス由来 NKT 細胞では有意に低下していることがわかった。IL-27 が活性化 NKT 細胞のミトコンドリア機能を制御しているかについて数種の蛍光プローブを用いてミトコンドリアサイズ、膜電位、活性酸素種の産生を解析したところ、IL-27 中和抗体を投与したマウス由来の NKT 細胞では全ての機能パラメータが有意に低下していた。逆に、*in vitro* 培養系で活性化させた NKT 細胞に IL-27 組換えタンパク質を加えたところ、上述のパラメータが一様に増加していた (図 3 A)。電子顕微鏡を用いてミトコンドリアの構造体をより詳細に分析したところ、非添加群と比較して IL-27 添加群ではミトコンドリア数が低下傾向にある一方で、ミトコンドリア面積は有意に増加していた。この結果はミトコンドリア融合の促進を示唆しており、細胞のエネルギー代謝の一つである酸化リン酸化が亢進している際に観察される現象である。実際に IL-27 添加群の NKT 細胞では ATP 産生が促進していた (図 3 B)。以上の結果より、IL-27 は活性化 NKT 細胞のミトコンドリア代謝を制御することで適切な細胞増殖と NKT_{FH} 細胞分化に必要なエネルギー供給に寄与していることが示唆された。

Gr-1 陽性細胞は定常時には IL-27 を産生しておらず、ワクチン投与後に一過性に産生される。当該ワクチン応答では NKT 細胞がその応答の起点となっていることから、活性化 NKT 細胞が産生する因子によって周囲の Gr-1 陽性細胞が IL-27 産生細胞へとリプログラムされる可能性を考えた。ワクチン投与 1 日後の Gr-1 陽性細胞の RNA シークエンスデータを再解析し、遺伝子セット全体でどのような変化が起きているか解析した。遺伝子エンリッチメント解析により IFN γ 応答に関連する遺伝子が投与 1 日後の Gr-1 陽性細胞で多く発現変動していることがわかった。ワクチン投与により活性化した NKT 細胞は迅速に IFN γ を産生することから、次いで IFN γ 中和抗体を投与した際の Gr-1 陽性細胞による IL-27 産生を解析した。結果、IFN γ 中和により IL-27 産生は有意に減弱しており、Gr-1 陽性細胞は NKT 細胞由来の IFN γ により、NKT_{FH}

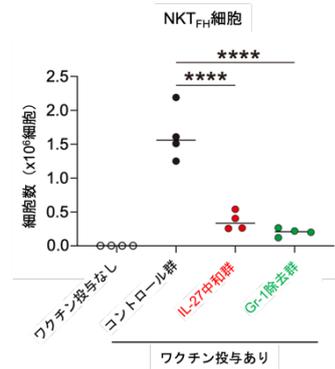


図2. IL-27中和によるNKT_{FH}細胞分化障害
**** P<0.0001

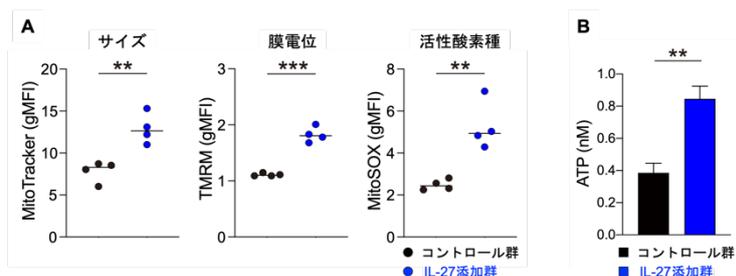


図3. IL-27添加によるNKT細胞中のミトコンドリア機能促進とATP産生促進
** P<0.01, *** P<0.001

細胞誘導に特化したヘルパー細胞へとリプログラムされることがわかった。実際に、IFN γ 中和抗体を投与したマウスではワクチン投与による NKT_{FH} 細胞誘導が顕著に阻害された。

最後に、ワクチン投与によって誘導されるワクチン抗原特異的抗体産生における Gr-1 陽性細胞由来 IL-27 の重要性について明らかにするため、ワクチン投与後に IL-27 中和抗体を投与したマウスより血清を回収し、ワクチン抗原特異的抗体を ELISA により解析した。結果、ワクチン投与によって誘導された特異的抗体産生が IL-27 中和によって有意に低下しており、産生抗体の Avidity も有意に低下した。また、それに伴い致死量の肺炎球菌を用いた敗血症モデルにおいて、IL-27 中和抗体群ではワクチン投与によって付与される感染防御効果が著しく低下していた。

以上の結果より、NKT 細胞が起点となる当該ワクチンの作用機序として、活性化 NKT 細胞による IFN γ を介して Gr-1 陽性細胞がヘルパー細胞へとリプログラミングされ、Gr-1 陽性細胞より IL-27 が産生されることで NKT 細胞の適切な細胞増殖と NKT_{FH} 細胞誘導に繋がることが明らかとなった。本研究成果は、米国科学誌「Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)」に掲載された (Kamii*, Hayashizaki* et al. PNAS 2024)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kamii Yasuhiro, Hayashizaki Koji, Kanno Toshio, Chiba Akio, Ikegami Taku, Saito Mitsuru, Akeda Yukihiro, Ohteki Toshiaki, Kubo Masato, Yoshida Kiyotsugu, Kawakami Kazuyoshi, Oishi Kazunori, Araya Jun, Kuwano Kazuyoshi, Kronenberg Mitchell, Endo Yusuke, Kinjo Yuki	4. 巻 121
2. 論文標題 IL-27 regulates the differentiation of follicular helper NKT cells via metabolic adaptation of mitochondria	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2313964121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kanno Toshio, Nakajima Takahiro, Kawashima Yusuke, Yokoyama Satoru, Asou Hikari K., Sasamoto Shigemi, Hayashizaki Koji, Kinjo Yuki, Ohara Osamu, Nakayama Toshinori, Endo Yusuke	4. 巻 37
2. 論文標題 Acsbg1-dependent mitochondrial fitness is a metabolic checkpoint for tissue Treg cell homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109921 ~ 109921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109921	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kanno Toshio, Nakajima Takahiro, Yokoyama Satoru, Asou Hikari K., Sasamoto Shigemi, Kamii Yasuhiro, Hayashizaki Koji, Ouchi Yasuo, Onodera Taishi, Takahashi Yoshimasa, Ikeda Kazutaka, Hasegawa Yoshinori, Kinjo Yuki, Ohara Osamu, Nakayama Toshinori, Endo Yusuke	4. 巻 4
2. 論文標題 SCD2-mediated monounsaturated fatty acid metabolism regulates cGAS-STING-dependent type I IFN responses in CD4+ T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02310-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yokoyama Masaya, Kimura Motoko Y., Ito Toshihiro, Hayashizaki Koji, Endo Yukihiro, Wang Yangsong, Yagi Ryoji, Nakagawa Tomoo, Kato Naoya, Matsubara Hisahiro, Nakayama Toshinori	4. 巻 11
2. 論文標題 Myosin Light Chain 9/12 Regulates the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.594297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7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, 榑木俊聡, 遠藤裕介, 金城雄樹.
2. 発表標題 IL-27はミトコンドリア代謝促進を介して濾胞性ヘルパー-NKT細胞分化を制御する
3. 学会等名 第32回 Kyoto T cell conference
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林崎浩史, 上井康寛, 菅野俊生, 遠藤裕介, 川上和義, 金城雄樹.
2. 発表標題 濾胞性ヘルパー-NKT細胞の分化誘導機構の解明
3. 学会等名 第34回 日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hayashizaki K, Kamii Y, Kanno T, Kubo M, Ohteki T, Kawakami K, Endo Y, Kinjo Y.
2. 発表標題 The metabolic adaptation is necessary for iNKT cells to differentiate into the follicular subset, which is regulated by Gr-1+ cells.
3. 学会等名 第52回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 林崎 浩史
2. 発表標題 肺炎球菌蛋白・糖脂質ワクチンによる濾胞性ヘルパー-NKT 細胞の誘導機構の解析
3. 学会等名 第33回日本生体防御学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koji Hayashizaki
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 第50回日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Hayashizaki
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 第3回アジア肺炎球菌シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林崎 浩史
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

〔図書〕 計3件

1. 著者名 林崎浩史, 金城雄樹	4. 発行年 2023年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科 第80巻第3号	

1. 著者名 林崎 浩史, 上井 康寛, 桑野 和善, 金城 雄樹	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 呼吸器内科	

1. 著者名 日本食品免疫学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 492
3. 書名 食品免疫学事典	

〔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
---------	---------