

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2015

課題番号：23229005

研究課題名(和文)NK T細胞系列決定・機能発現メカニズム

研究課題名(英文)The mechanisms of development and differentiation in Valpha14 NKT cells

研究代表者

谷口 克(Taniguchi, Masaru)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・グループディレクター

研究者番号：80110310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 82,600,000円

研究成果の概要(和文)：NKT細胞はCD1d分子に提示された糖脂質抗原を認識する特殊なリンパ球である。強い抗腫瘍作用およびアジュバント作用を有し、がん免疫治療の標的細胞として有用である。しかしながら、NKT細胞分化・機能制御メカニズムは十分に理解されていない。

本研究において我々は、新規のNKT細胞分化経路としてDN経路を見出した。また、NKT細胞分化初期段階のpreNKT細胞に発現する転写制御因子として、Ringファミリーを含む15候補遺伝子を同定した。さらに、エピゲノム解析によってNK T細胞分化に伴うエピゲノム変化を捉えることに成功し、任意の機能を持つNKT細胞の生産にエピゲノム解析が利用可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Natural killer T (NKT) cells are characterized by the expression of the single invariant Va14 receptor recognizing glycolipid antigens in the association with monomorphic CD1d molecule. However, their developmental pathway and molecular basis of their development remain unclear. Here, we identified the novel developmental pathway for NKT cells directly generated from late DN stage precursors bypassing through DP stage and mainly migrated to the liver, but not to the fat, mesenteric lymphnode and lamina propria, where DP-derived NKT cells are migrated. We also found that 15 transcription factors, including Ring family proteins, were selectively expressed in DN-derived preNKT cells without surface Va14 receptor. Some of these TFs were shown to be responsible for NKT cell development in their knock-out mice. In addition, we succeeded to detect alteration of epigenetic modification responsible gene loci that regulate NKT cell development and function during NKT cell development.

研究分野：医歯薬学

キーワード：NKT細胞サブタイプ NKT細胞特異的転写因子 NKT細胞新規分化経路 エピゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

NKT 細胞は、唯一種類の多様性がない均一な V α 14J α 18 受容体によって糖脂質を認識する特殊なリンパ球である。腫瘍や感染に対する防御反応の中心的な役割を担っており、がん免疫治療における標的細胞の一つとして注目されている。NKT 細胞の分化・機能を操作し、試験管内で任意の機能を持つ NKT 細胞を大量に分化誘導することができれば、その効果をさらに強めることができると期待される。

しかしながら、NKT 細胞の細胞系列決定・機能獲得については未だ不明点が多い。これまでの通説では、NKT 細胞は T 細胞と同様の分化経路をたどり、胸腺 CD4/CD8 ダブルポジティブステージで CD1d 分子によるポジティブセレクションを受けることで T 細胞から分岐し、NKT 細胞に分化するというものである。しかし、本研究において、DP ステージの前段階である DN ステージにおいて既に NKT 細胞への系列決定がなされている事を見出した。

2. 研究の目的

本研究においては、(1)NKT 細胞分化プロセスを明らかにすることに加え、(2) NKT 細胞系列を決定する遺伝子を同定し、(3) NKT 細胞分化の各ステージにおける遺伝子発現とエピゲノム状況を確認することにより、任意の機能を持つ NKT 細胞を生産するための基盤技術の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) NKT 分化プロセスの検証

通説である NKT 細胞分化の DP 経路とは異なる分化経路の存在を検証するために、ここでは胸腺 DP ステージに特異的に Cre リコンビナーゼを発現する E8_{III}-Cre マウスを用いた RAG2 遺伝子欠損マウスあるいは YFP 色素を発現する ROSA-YFP マウスを用い、各種解析を実施する。

遺伝子再構成に必要な Rag2 遺伝子を DP ステージ特異的に欠損させ、DP ステージでの分化阻害を誘導し、NKT 細胞の分化への影響を確認する。

Rosa-YFP マウスを用い、DP ステージの通過を確認すると YFP 色素を発現する Fate mapping を実施する。

DP ステージを経ない DN 経路由来 NKT 細胞の特徴を解析する目的で、細胞表面分子発現、遺伝子発現プロファイル、細胞機能を検証する。

(2) NKT 細胞系列決定に関与する遺伝子同定

NKT 細胞、およびそのステージ特異的に発現している転写因子を探索すべく、次の観点からの解析を実施した。

NKT 細胞を欠損する CD1d 欠損マウスの DN ステージ DN4 細胞よりランダムに単一細胞分離を行ったのち、BioMark

(Fluidigm 社)を用いた high throughput qPCR を実施し、発現転写因子を解析する。

一方、NKT 細胞の核移植によって樹立したクローン ES 細胞を利用し、T 細胞受容体 C α 領域に蛍光タンパク質 Venus 遺伝子を挿入した ES 細胞およびマウスを作成した (NKT-Venus)。この ES 細胞およびマウスの未熟胸腺細胞では、NKT 細胞への系列決定がなされ V α 14J α 18 の発現が開始されると同時に蛍光を発することから、NKT 細胞への系列決定時期を判定することが可能である。これを用い、系列決定時期に発現する転写因子群を次の手法にて検出する。

NKT-Venus ES 細胞を OP9/D11 システムにて *in vitro* で分化誘導し、NKT 細胞への系列決定がなされる前後の細胞に対し単一細胞分離を実施する。転写因子の発現を Single cell RT-PCR にて検証し、系列決定時期に発現する転写因子を探索する。

NKT-Venus マウス胸腺において、細胞表面上の NKT 細胞受容体が陰性かつ Venus 陽性の細胞を NKT 細胞への系列決定直後の細胞と規定し、細胞分取後に RNA-seq 解析にて遺伝子発現プロファイルを確認する。

また、V α 14 遺伝子の発現は、NKT 細胞を規定する因子として極めて重要である。これを制御する因子は NKT 細胞の系列決定に寄与する因子である可能性があるため、次の形で制御因子の同定を試みる。

NKT 細胞を規定する遺伝子である V α 14 について、プロモーター配列解析を実施し、結合可能な転写因子・転写制御因子を抽出する。

以上の解析で得られた候補転写因子について、次の手法にて遺伝子機能を検証する。

NKT-ES 細胞細胞に対し、shRNA を利用した遺伝子ノックダウンにて NKT 細胞分化・機能へ寄与する転写因子を選別する。

候補転写因子に対し、ES 細胞を用いた gene-targeting、あるいは CRISPR/Cas9 技術を用いたゲノム編集を実施し、ノックアウトマウスを作成し NKT 細胞分化・機能への関与を解析する。

(3) NKT 細胞におけるエピゲノム解析

NKT-Venus ES 細胞を用い、*in vitro* における NKT 細胞分化に伴うエピゲノムの変動を、修飾ヒストンを対象としたクロマチン免疫沈降法にて検出する。

4. 研究成果

(1) NKT 細胞分化プロセスの検証 E8_{III}-Cre マウスを用い、胸腺 DP ステージにて Rag2 遺伝子を欠損させた結果、DP ステージにおける V α 14J α 18 遺伝子再構成は消失し、NKT 細胞数

は減少した。このことは通説である DP 経路の存在を示している。しかしながら、DP 経路を抑制した本マウスにおいて、成熟 NKT 細胞の存在が確認された。これは DN 経路由来であることを強く示唆している(図 1)。

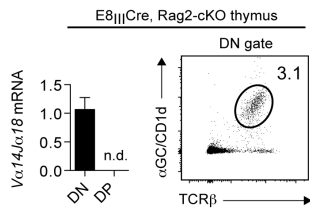


図 1 .DN 段階における NKT 細胞分化

E8_{III}-Cre マウスを用い、Rosa-YFP と組み合わせた Fate mapping の結果、DP ステージを経ていない YFP 陰性の NKT 細胞の存在が確認され、DN 経路の存在が明確化された(図 2)。

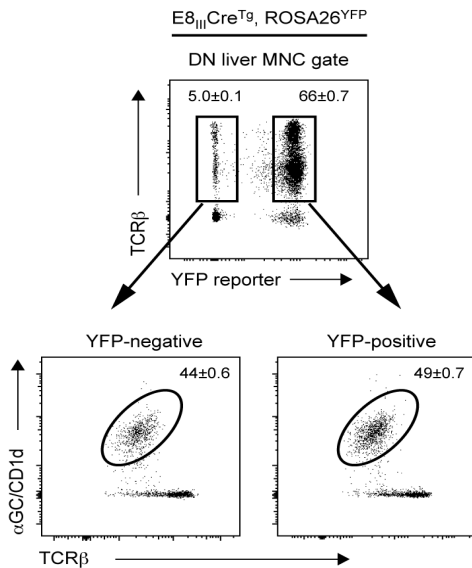


図 2 .DP を経ると YFP 陽性になる Fate mapping 実験で YFP 陰性 NKT を検出

DN 経路由来 NKT 細胞の特徴を解析した結果、Th1 サイトカインの発現が高いことが確認された。遺伝子発現解析の結果、パーフォリン/グランザイム系の細胞障害におけるエフェクター分子の高発現が認められ、実際に本 DN

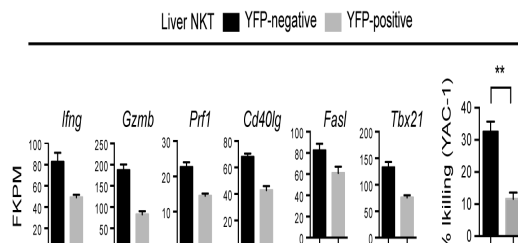


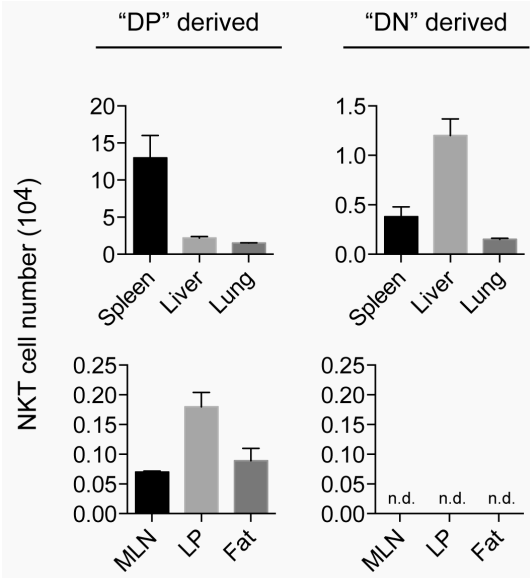
図 3 .DN 由来 NKT 細胞は細胞傷害活性を有し DP 経路由来 NKT 細胞は高い細胞障害活性を有し

ていることが確認された。(図 3)

興味深いことに、DP 由来 NKT 細胞は脾臓に集積するのに対して、DN 由来 NKT 細胞は主として肝臓に集積したが、DP 由来 NKT 細胞が存在する消化管、腸間膜リンパ節、脂肪組織には検出できなかった。

このことは、分化経路の相違によって細胞機能および生体内での役割の違いを示している(図 4)

図 4 .DN 由来 NKT 細胞と DP 由来 NKT 細胞は異なる組織分布をする



異なる組織分布をする

これらの事実は、通説であった DP 経路に加え、新しい分化経路である DN 経路の存在を証明するものである。加えて、分化経路の違いによって生体内での役割が異なる可能性に言及するものであり、今後、NKT 細胞研究に新しい視点を提示した。

(2) NKT 細胞系列決定に関する遺伝子同定
Biomark、Single-cell RT-PCR、RNA-seq 解析、プロモーター配列解析によって、系列決定に関する候補転写因子を同定した。また、shRNA を用いた機能スクリーニングによって、系列決定・機能への関与が疑われた遺伝子群(表 1)について、KO マウスを作出・あるいは導入し、解析した。

(注) RNA-seq による遺伝子選択基準:

表 1. 候補転写制御因子群

一細胞分析によって得られた候補転写制御因子
Prp13, Zbtb10, Fhl2, Rbpms, Plac8, Npas2
RNA-seq によって得られた候補転写制御因子
Pax5, Bcl11a, Ebf1, SpiB
Vα14 プロモーターへの結合から得られた候補転写制御因子
Nfya, Lxrb, Rxra, Atf4, Ring1A/B

Tet-Venus+>Tet+Venus+ (>10倍) (preNKTにて高

発現), Tet-Venus+>NKT-KO thymocytes (>10倍) (preNKT細胞に高発現)のうち、転写因子・転写制御因子として考えられるものを抽出

現在、抽出した全ての転写因子で解析中であるが、その1例として、 $V\alpha 14$ プロモーターに結合し、転写制御に寄与する Ring ファミリー分子の欠損マウスにおいて、NKT 細胞の消失が確認され、Ring ファミリー分子が NKT 細胞分化に極めて重要であることが確認された(図5)。

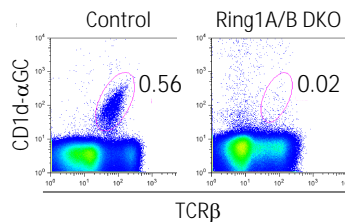


図5 .Ring ファミリー-KO マウスにおける NKT 細胞の消失

(3) NKT 細胞におけるエピゲノム解析

NKT 細胞分化に伴うエピゲノムの変動を、修飾ヒストンを標的としたクロマチン免疫沈降法で検出した。NKT 細胞に特異的な受容体 $V\alpha 14J\alpha 18$ プロモーター領域におけるヒストン修飾を検証した結果、NKT 細胞への系列決定 (NKT-Venus ES における Venus 発現) の亢進時期において、 $V\alpha 14J\alpha 18$ プロモーター部ヒストン H3 の K9Ac 修飾の増加および K27Me3 の減少が確認された(図6)。このことは、エピゲノム状況がヘテロクロマチン状態からユークロマチンへの転換がなされていることを示唆し、エピゲノム状況によって NKT 細胞の分化を捉えることが可能であることを示している。

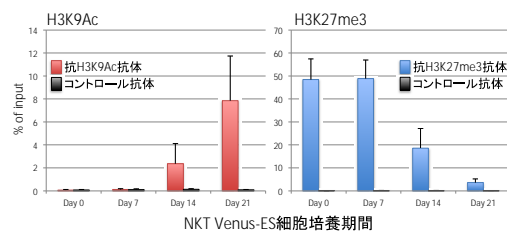


図6 . NKT 細胞分化に伴う $V\alpha 14J\alpha 18$ プロモーター領域エピゲノム変化

また、NKT 細胞の機能として重要な $IFN\gamma$ のプロモーター部におけるエピゲノム状況を検索したところ、NKT 細胞の系列決定に遅れる形で H3K9 のアセチル化が亢進することが確認された(図7)。

このように、NKT 細胞の分化に伴うエピゲノム状態を検証することにより、NKT-iPS や NKT-ES 細胞における NKT 細胞の性状を標的とした選別法の確立に寄与すると期待される。

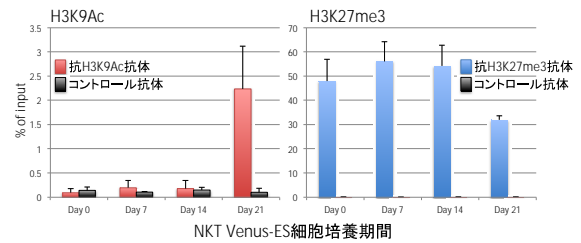


図7 .NKT 細胞分化に伴 $IFN\gamma$ プロモーター領域エピゲノム変化

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30件)

1. Nyambayar Dashtsoodol, Tomokuni Shigeura, Ritsuko Ozawa, Michishige Harada, Satoshi Kojo, Takashi Watanabe, Haruhiko Koseki, Manabu Nakayama, Osamu Ohara, Masaru Taniguchi. PLOS ONE, 11(4):e0153347, 2016. 査読有

2. Ren Y, Dashtsoodol N, Watarai H, Koseki H, Quan C, Taniguchi M. Generation of induced pluripotent stem cell-derived mice by reprogramming of a mature NKT cell. Int Immunol.26:551-61, 2014. 査読有

3. Fujii S, Shimizu K, Okamoto Y, Kunii N, Nakayama T, Motohashi S, Taniguchi M. NKT Cells as an Ideal Anti-Tumor Immunotherapeutic. Front. Immunol. 4:409, 2013. 査読有

4. Oh-Hora M, Komatsu N, Pishyareh M, Feske S, Hori S, Taniguchi M, Rao A, Takayanagi H. Agonist-Selected T Cell Development Requires Strong T Cell Receptor Signaling and Store-Operated Calcium Entry. Immunity, 38:881-95, 2013. 査読有

5. Watarai H, Sekine-Kondo E, Shigeura T, Motomura Y, Yasuda T, Satoh R, Yoshida H, Kubo M, Kawamoto H, Koseki H, Taniguchi M. Development and Function of Invariant Natural Killer T cells Producing TH2- and TH17-cytokines PLoS Biology,10:e1001255, 2012. 査読有

[学会発表](計31件)

海外

1. Masaru TANIGUCHI, Alternative developmental pathway of a $V\alpha 14+$ NKT

cell subset bypassing CD4+CD8+ double positive stage, CD1-MR1 2015, Nov16, 2015, Mantra, Lorne (AUS).

2. Masaru TANIGUCHI, NKT cell-mediated adjuvant cell therapy on lung cancer and head and neck cancer, FOCIS2014, June 27, 2014, Chicago (USA).

3. Masaru TANIGUCHI, 12th International Symposium on Sjögren's Syndrome, Discovery of NKT cells and their clinical application, Oct 9, 2013, Kyoto (JAPAN).

4. Masaru TANIGUCHI, Characterization of the cell with NKT cell potential in DN1 thymic fraction, 7th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CD1 AND NKT CELLS, Sep 14, 2013, Tours (FRANCE).

5. Masaru TANIGUCHI, NKT cells as an ideal target for anti-tumor Immunotherapy, 15TH INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY, Aug 25, 2013, Milan (ITALY).

6. Masaru TANIGUCHI, Early NKT Precursor, 6th International Symposium on CD1 and NKT Cells, Sep 24, 2011, Chicago (USA).

7. Masaru TANIGUCHI, NKT Cell-mediated Adjuvant Activity on Antitumor Responses, FOCIS2012, June 22, 2012, Vancouver (Canada).

国内

1. 谷口克, NKT細胞の発見から臨床応用まで, 第17回免疫サマースクール 2015 in 淡路島, 2015/7/22, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫)

2. 谷口克, NKT細胞の発見から臨床応用まで, 第16回免疫サマースクール in 小豆島, 2014/7/28, オリビアン小豆島(香川)

3. 谷口克, 新しい概念に基づくがん治療標的-NKT細胞-, 第28回日本整形外科学会基礎学術集会, 2013/10/16, 幕張メッセ(千葉)

4. 谷口克, 新しい概念に基づく難治性疾患の治療標的, 全身性炎症疾患の病因・病態の解明に関する研究助成第2回研究発表会, 2013/01/11, 霞山会館(東京)

5. 谷口克, "SY-3 アログラフトは再生医療の起爆剤となるか? NKT細胞-新しい免疫療法の標的, 第11回日本再生医療学会総会, 2012/06/12, パシフィコ横浜(神奈川)

6. 谷口克, iPS細胞-その臨床応用に向けて, 第39回日本臨床免疫学会総会, 2011/09/16, 京王プラザホテル(東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 3 件)

1. 名称: アロ NKT 細胞を用いた免疫療法およびそのための T 細胞抗原受容体 (TCR) 遺伝子の鎖領域が均一な V-J に再構成されている細胞および該細胞由来 NKT 細胞のバンキング

発明者: 谷口克、古関明彦、渡会浩志、藤井眞一郎

権利者(出願人): 国立研究開発法人理化学研究所

種類: 特許

番号: 出願番号 13/991059

出願年月日: 2011 年 12 月 2 日

国内外の別: 国外

2. 名称: 新規カルバメート糖脂質およびその用途

発明者: 田代卓哉、森謙治、汐崎正生、谷口克、渡会浩志、重浦智邦

権利者(出願人): 国立研究開発法人理化学研究所

種類: 特許

番号: 出願番号 14/397184

出願年月日: 2013 年 4 月 26 日

国内外の別: 国外

3. 名称: 水酸化 K R N 7 0 0 0 類縁体及びその用途

発明者: 汐崎正生、田代卓哉、森謙治、重浦智邦、渡会浩志、谷口克

権利者(出願人): 国立研究開発法人理化学研究所

種類: 特許

番号: 出願番号 14/419198

出願年月日: 2013 年 8 月 2 日

国内外の別: 国外

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

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

谷口 克 (TANIGUCHI, Masaru)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医
科学研究センター・グループディレクター

研究者番号：80110310

(2)研究分担者

香城 諭 (KOJO, Satoshi) H26～H27 年度

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医
科学研究センター・上級研究員

研究者番号：70360542

原田 通成 (HARADA, Michishige) H23～26
年度

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医
科学研究センター・研究員

研究者番号：20333487