

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16687

研究課題名(和文) 2B4陽性新規iNKT細胞の分化・維持機構と機能の解析

研究課題名(英文) The developmental and functional analysis of 2B4+ iNKT cells

研究代表者

崔 广为 (Cui, Guangwei)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：70791276

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)：iNKT細胞はインターロイキン15(IL-15)によって分化、維持、機能が制御され、腫瘍や病原体に対する生体防御、慢性炎症や自己免疫疾患の発症などに関与している。本研究は胸腺上皮細胞特異的IL-15遺伝子破壊マウスを用い、胸腺内IL-15産生性免疫微小環境に強く依存するCD244(2B4)+ iNKT細胞(C2 iNKT細胞)を新たに同定した。C2 iNKT細胞が従来の組織常在性iNKT細胞とは異なり、末梢循環性iNKT細胞集団であることを明らかにした。さらに、C2 iNKT細胞は細胞傷害活性物質の発現が非常に高く、抗腫瘍免疫と抗ウイルス感染免疫において重要な役割を担っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、胸腺内IL-15産生性免疫微小環境に強く依存するCD244陽性C2 iNKT細胞を新たに同定した。C2 iNKT細胞は細胞障害活性が非常に高く、また、従来の組織常在型iNKT細胞ではなく、末梢循環型iNKT細胞であることを明らかにした。そのため、腫瘍の転移やウイルス感染などの病態における、IL-15産生性免疫微小環境と各iNKT細胞集団の役割に対する理解が進むと考えられる。よって、本研究で得られた知見は腫瘍の転移やウイルス感染に対するiNKT細胞とIL-15を標的とする治療薬や治療法の開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：IL-15 is a cytokine important for development, homeostasis and response of the immune system. We crossed IL-15-flox mice with FoxN1-Cre mice to generate IL-15 conditional knock out (cKO) mice with specific deletion of IL-15 in thymic epithelial cells. We found that a novel subset of iNKT cells, highly expressing natural killer cell receptor CD244(2B4), was disappeared in FoxN1-Cre IL-15 cKO mice. Next, we demonstrated that the CD244+ iNKT (C2 iNKT) cells are circulating iNKT cell subset, and showed significantly higher expression of the genes related to cytotoxicity, compare to tissue-resident 2B4- iNKT (C2 iNKT) cells. Furthermore, the C2 iNKT cells contributes to anti-tumor and anti-viral immunity in the lung.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫微小環境 NKT細胞 サイトカイン IL-15

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インバリアントナチュラルキラーT (iNKT) 細胞は可変性の乏しい TCR 鎖を発現し、MHC クラス I 様分子である CD1d により提示された糖脂質抗原を認識して活性化される。iNKT 細胞は短時間にサイトカインやケモカイン、細胞障害分子を大量に産生し、自然免疫と獲得免疫の両方の役割を併せ持っている。さらに、iNKT 細胞は腫瘍や病原体に対する生体防御、慢性炎症や自己免疫疾患の発症などに関与している。

サイトカインの一つである IL-15 が iNKT 細胞の分化・維持・機能に大きな役割を担っている。これまで私たちは、IL-15 遺伝子座に蛍光タンパク質をノックインしたマウス (IL-15-CFP ノックインマウス) (Cui et al, *PNAS*, 2014) と胸腺上皮細胞特異的 IL-15 遺伝子破壊マウス (FoxN1-Cre IL-15 cKO マウス) を作製し、胸腺髄質内の IL-15 産生性免疫微小環境が iNKT 細胞の分化に重要であることを明らかにした。さらに、申請者は成熟 iNKT 細胞 (CD1d tetramer⁺NK1.1⁺ iNKT 細胞) を NK 受容体 2B4 とケモカイン受容体 CXCR6 を用い、新たに 2B4⁻CXCR6⁻ iNKT 細胞 (C0 iNKT 細胞)、2B4⁻CXCR6⁺ iNKT 細胞 (C1 iNKT 細胞) および 2B4⁺CXCR6⁺ iNKT 細胞 (C2 iNKT 細胞) に分画できることを発見した。FoxN1-Cre IL-15 cKO マウスでは、胸腺内の C1 iNKT 細胞がある程度の減少が見られたが、末梢組織においてはほぼ正常まで回復した、一方、N2 iNKT 細胞が胸腺および末梢組織においてほぼ消失していた。しかし、この胸腺 IL-15 産生性免疫微小環境に強く依存する新規 C2 iNKT 細胞の分化・維持・機能はどこでどのように制御されているのかはまったく不明である。本研究では、サイトカイン依存性という観点から異なる成熟 iNKT 細胞を分類し、その分化経路や性質、生理的意義について探索する。

2. 研究の目的

これまでに胸腺内 IL-15 産生性免疫微小環境に強く依存する成熟 iNKT 細胞として、新たに C2 iNKT 細胞を同定した。本研究はその成果をさらに発展し、この C2 iNKT 細胞の分化・維持および機能の制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

C2 iNKT 細胞は、末梢組織では肺と脂肪組織に比較的によく存在する。肺上皮細胞特異的 SPC-Cre、樹状細胞特異的 CD11c-Cre、マクロファージ特異的 LysM-Cre などによる IL-15 遺伝子破壊マウスを用いて、C2 iNKT 細胞の細胞数、生存と増殖能などを解析し、維持における IL-15 の役割を検討する。さらに、末梢組織での C2 iNKT 細胞の維持および機能に関わる新規遺伝子を探索するため、肺の C2 iNKT 細胞と C1 iNKT 細胞の網羅的な遺伝子発現をデジタル RNA シークエンス法にて解析する。胸腺と末梢組織において、C2 iNKT 細胞の分化・維持の場を明らかにするため、IL-15 産生細胞との共局在を IL-15-CFP ノックインマウスを用いて免疫組織染色にて解析する。

iNKT 細胞は糖脂質アルファガラクトシルセラミド (α Gal-Cer) の刺激により活性化できる。抗原提示細胞および α Gal-Cer との共培養実験や、生体内への α Gal-Cer 投与または iNKT 細胞の移植実験を行い、C2 iNKT 細胞の活性化状態およびサイトカイン、ケモカイン、細胞障害分子の産生を他の iNKT 細胞と比較しながら検討する。また、マウスの週齢とともに授乳中または食餌中の脂肪酸の量や構成も異なることから、各時期の生体内における C2 iNKT 細胞の細胞数と局

在、活性化状態を解析する。

機能面では、まず C2 iNKT 細胞を抗原提示細胞およびがん細胞と共培養した際に、がん細胞への細胞傷害活性を評価する。続いて、肺がん細胞株 (LLC) や B16 メラノーマを移植する実験的肺転移モデルを用い、転移巣へ浸潤した免疫細胞数、C2 iNKT 細胞の活性化状態と局在、およびサイトカインやケモカイン、細胞傷害分子の産生を IFN- γ -Venus レポーターマウスなどを用いて解析する。同時に、C2 iNKT 細胞による NK 細胞と抗原提示細胞のリクルートや活性化への影響も検討する。さらに、インフルエンザウイルス感染系を用い、抗インフルエンザウイルス感染における C2 iNKT 細胞の機能を検討する。

4 . 研究成果

本研究で肺上皮細胞特異的、樹状細胞特異的、マクロファージ特異的など、様々な細胞特異的 IL-15 遺伝子破壊マウス (IL-15 cKO マウス) を作製した。胸腺上皮細胞特異的 IL-15 遺伝子破壊マウス (FoxN1-Cre IL-15 cKO マウス) では、C1 iNKT 細胞がほぼ正常でしたが、C2 iNKT 細胞が胸腺および末梢組織において完全に消失していたことから、C2 iNKT 細胞を調べるための良いツールであると考えた。網羅的な遺伝子解析や細胞培養実験などにより、C2 iNKT 細胞は強い細胞障害活性や高い細胞遊走能力を持っていることを見出し、細胞分化・維持・機能に重要な遺伝子群を同定した。同時に、Prabiosis 実験により、C2 iNKT 細胞は従来の組織常在型 C1 iNKT 細胞と異なり、新たな末梢循環型の iNKT 細胞集団であることを発見した。さらに、FoxN1-Cre IL-15 cKO マウスにて B16 メラノーマを移植する実験的肺転移モデルを用いた解析では、末梢組織におけるがん細胞の転移巣が著しく増加した。また、インフルエンザウイルス感染後の FoxN1-Cre IL-15 cKO マウスの肺では、ウイルス特異的な CD8 T 細胞が有意減少していた。以上の結果から、C2 iNKT 細胞が抗腫瘍免疫と抗ウイルス免疫に重要な役割を果たしている可能性を示唆した。

また、本研究と関連する IL-15 産生性免疫微小環境の解析を行った。肝臓において、肝細胞特異的 IL-15 cKO マウスを解析し、1 型自然リンパ球の分化に関与していることを示唆した。腸管において、腸上皮細胞特異的 IL-15 cKO マウスを解析し、腸管上皮細胞由来の IL-15 が腸上皮間リンパ球の成熟と疲弊を制御していることを明らかにした。リンパ節に関しては、Ludewig 博士らとの共同研究により、IL-15 を産生する細網線維芽細胞が ILC1 の維持と機能に重要であることを示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Cui Guangwei, Shimba Akihiro, Ma Guangyong, Takahara Kazuhiko, Tani-ichi Shizue, Zhu Yuanbo, Asahi Takuma, Abe Akifumi, Miyachi Hitoshi, Kitano Satsuki, Hara Takahiro, Yasunaga Jun-ichirou, Suwanai Hirotsugu, Yamada Hisakata, Matsuoka Masao, Ueki Kohjiro, Yoshikai Yasunobu, Ikuta Koichi	4. 巻 204
2. 論文標題 IL-7R-Dependent Phosphatidylinositol 3-Kinase Competes with the STAT5 Signal to Modulate T Cell Development and Homeostasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 844-857
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900456	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 -

1. 著者名 Zhu Yuanbo, Cui Guangwei, Miyauchi Eiji, Nakanishi Yuki, Mukohira Hisa, Shimba Akihiro, Abe Shinya, Tani-ichi Shizue, Hara Takahiro, Nakase Hiroshi, Chiba Tsutomu, Sebara-Fujisawa Atsuko, Seno Hiroshi, Ohno Hiroshi, Ikuta Koichi	4. 巻 32
2. 論文標題 Intestinal epithelial cell-derived IL-15 determines local maintenance and maturation of intra-epithelial lymphocytes in the intestine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 307-319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz082	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Cui Guangwei, Ikuta Koichi
2. 発表標題 Thymic IL-15 niche controls anti-tumor immunity by regulating a novel subset of iNKT cells
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部 真也、原 崇裕、崔 广为、生田 宏一
2. 発表標題 NK細胞の分化を支持するIL-15産生性骨髄微小環境の解明
3. 学会等名 Kyoto T Cell Conference
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			
英国	University of Oxford			