

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05071

研究課題名(和文) 記憶ナチュラルキラー細胞分化におけるマスター制御因子の同定

研究課題名(英文) Identification of a master regulator of the differentiation of memory natural killer cells

研究代表者

鍋倉 宰 (Nabekura, Tsukasa)

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教

研究者番号：80550095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：ナチュラルキラー(NK)細胞はウイルスやがんの制御に必須の免疫細胞である。NK細胞は標的を傷害して死滅する細胞だと考えられていた。しかし近年、NK細胞は長期生存出来、優れた細胞傷害活性を持つ記憶NK細胞に分化する事が示された。しかし記憶NK細胞分化を制御する因子は同定されていない。本研究において我々は、記憶NK細胞の分化と機能の制御因子を同定した。この成果は、NK細胞を用いた難治性ウイルス感染症に対するワクチンや、がん免疫療法の開発において非常に有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NK細胞はウイルスやがんの制御に必須の免疫細胞である。記憶NK細胞はその長期生存能・増殖能・ウイルス感染細胞やがん細胞に対する強い細胞傷害活性などにより、難治性ウイルス感染症に対する新規のワクチン開発や、高い抗がん効果を持つ新しい免疫療法の開発に非常に有用である。従って、本研究で記憶NK細胞の分化とその機能の制御因子を同定できた事は、記憶NK細胞の人為的制御法の開発に繋がる可能性が高く、基礎研究だけでなく臨床的にも非常に重要な意義を持つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Natural killer (NK) cells play an essential role in controlling viral infections and cancers. NK cells are believed to be short-lived immune cells and immediately die after when they kill their target cells. However, it has been recently reported that NK cells can differentiate into long-lived memory NK cells with enhanced cytotoxicity. However, a critical factor which regulates the differentiation into memory NK cells has not been identified. In this study, we identified the critical regulator of the differentiation and the function of memory NK cells. These findings encourage us to develop vaccines for incurable viral infections and cancer immunotherapies.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 ナチュラルキラー細胞 免疫記憶 ウイルス感染

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナチュラルキラー (NK) 細胞はウイルス感染細胞やがん細胞の排除に必須の免疫細胞である。NK 細胞はその発見以来、標的を傷害して死滅する短寿命の細胞だと考えられていた。しかし近年、マウスサイトメガロウイルス (MCMV) の感染後、活性化受容体 Ly49H を発現する NK 細胞は感染細胞の MCMV タンパク質 m157 を認識して特異的に増殖し、長期に生存する記憶 NK 細胞に分化することが示された。記憶 NK 細胞は強いエフェクター機能と二次増殖能を示す為、抗ウイルス免疫療法や抗腫瘍免疫療法の開発において極めて有用である。しかし、記憶 NK 細胞分化の分子機序は殆ど明らかにされていない。しかしながら、記憶 NK 細胞分化におけるマスター制御因子は未だ同定されていない。

記憶 NK 細胞と記憶 CD8+ T 細胞は二次増殖能や優れたエフェクター機能など、その機能的特性が酷似している。Blimp-1 は CD8+ T 細胞活性化後に発現が上昇し、記憶 CD8+ T 細胞で高発現が維持され、記憶 CD8+ T 細胞の二次増殖・エフェクター機能・接着因子及び転写因子発現変化・アポトーシス感受性制御に必須の役割を果たして記憶 CD8+ T 細胞の「量」と「質」の両方を制御し、記憶 CD8+ T 細胞分化のマスター制御転写因子として知られている。一方、NK 細胞は、エフェクター分子や発生に必須の転写因子を CD8+ T 細胞と共有し、Ly49H+記憶 NK 細胞の二次増殖能・優れたエフェクター機能・接着因子発現変化・未感染宿主でのアポトーシス感受性は記憶 CD8+ T 細胞が持つ特性と極めて酷似している。しかし MCMV 感染において、Blimp-1 欠損 NK 細胞は野生型 NK 細胞と同様の存在比率で優れた機能を持つ正常な記憶 NK 細胞に分化出来る事から、Blimp-1 とは異なる未知の転写因子が記憶 NK 細胞の「量」と「質」を調節するマスター制御因子として機能している事が強く示唆される。しかし、記憶 NK 細胞分化におけるマスター制御因子は未だ同定されていない。

MCMV 感染実験において記憶 NK 細胞を定義する為には、野生型マウス由来 Ly49H+ NK 細胞を Ly49H 欠損マウスへ移入する必要がある、これら少数のドナー Ly49H+ NK 細胞の長期的・経時的な検出が困難であった。この技術的問題点を解決する為申請者は、マウス Ncr1 遺伝子支配下で CreERT2 を発現し、タモキシフェン投与後に NK 細胞のみが YFP を発現する時期特異的 YFP 発現トランスジェニック (NKp46-CreERT2-Tg-Rosa26-YFP) マウスを世界に先駆けて開発した。これらマウスに対し、MCMV 感染直後にタモキシフェンを投与する事で MCMV に応答する NK 細胞を YFP で標識し、その NK 細胞の運命を高感度且つ長期的に追跡する事が可能になった。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が世界に先駆けて作出した NK 細胞特異的・時期特異的 YFP 発現トランスジェニックマウスを用い、記憶 NK 細胞の分化とその機能におけるマスター制御因子を同定する事を研究目的とした。

3. 研究の方法

上記 NKp46-CreERT2-Tg-Rosa26-YFP マウスに MCMV を感染させた後タモキシフェンを投与し、MCMV に応答する NK 細胞を YFP にて標識した。YFP を指標に Ly49H+記憶 NK 細胞・Ly49H-記憶様 NK 細胞、活性化 NK 細胞及びナイーブ NK 細胞をフローサイトメーターにて純化し、RNA-seq 解析を行った。活性化 Ly49H+ NK 細胞で発現が上昇し、且つ Ly49H+記憶 NK 細胞で特異的に高発現が維持される転写制御因子を記憶 NK 細胞分化のマスター制御因子の候補として選択した。その後マスター制御因子欠損 NKp46-CreERT2-Tg-Rosa26-YFP マウスにて記憶 NK 細胞の分化・二次増殖能・エフェクター機能等を評価した。

(1) 上記マウスに対し MCMV を感染後にタモキシフェンを投与し、MCMV に応答する NK 細胞を YFP にて標識した。感染 30 日後のマウス脾臓から Ly49H+記憶 NK 細胞と Ly49H-記憶様 NK 細胞をフローサイトメーターにて高度に純化した。同様に感染 10 日後のマウスから活性化 Ly49H+ NK 細胞・活性化 Ly49H- NK 細胞を、未感染マウスからナイーブ NK 細胞を単離した。各 NK 細胞サブセット由来 RNA サンプルを用い、RNA-seq データを取得した。

(2) RNA-seq 解析を行い、ナイーブ NK 細胞と比較して活性化 Ly49H+ NK 細胞で発現が上昇し、Ly49H+記憶 NK 細胞特異的に高発現が維持されている因子を選択した。核内移行シグナルを持つ因子を抽出し、バイオインフォマティクス解析とパスウェイ解析から、記憶 NK 細胞分化のマスター制御因子 (遺伝子 X) の候補とした。

(3) 遺伝子 X 欠損マウスを入手し、マスター制御因子遺伝子を欠損する NKp46-CreERT2-Tg-Rosa26-YFP マウスを作出した。

(4) 野生型及び遺伝子 X 欠損 NKp46-CreERT2-Tg-Rosa26-YFP マウスに対し、MCMV 感染後にタモキシフェンを投与し、記憶 NK 細胞の存在比率と表現型解析から、マスター制御因子の記憶 NK 細胞分化における影響を評価した。

(5) 未感染及び MCMV を感染させた野生型及び遺伝子 X 欠損 NKp46-CreERT2-Tg-Rosa26-YFP マウスから、それぞれナイーブ NK 細胞及び記憶 NK 細胞を単離し、in vitro で腫瘍細胞株と共培養

後、細胞傷害活性と IFN-g 産生能を評価した。

(6) Ly49H を過剰発現するヒト NK 細胞株に遺伝子 X を発現させ、遺伝子 X がコードするタンパク質の細胞内局在を評価した。加えて、同ヒト NK 細胞株を Ly49H で刺激し、遺伝子 X がコードするタンパク質の細胞内局在の変化を評価した。

4. 研究成果

本研究から以下の成果が得られた。

(1) MCMV を感染させた後タモキシフェンを投与し、MCMV に応答する NK 細胞を YFP にて標識した。感染マウスの脾臓において、活性化 Ly49H⁺ NK 細胞及び活性化 Ly49H⁻ NK 細胞、Ly49H⁺ 記憶 NK 細胞及び Ly49H⁻ 記憶様 NK 細胞を可視化した。これら MCMV に応答した NK 細胞サブセットと、未感染マウス由来ナイーブ Ly49H⁺ NK 細胞及び Ly49H⁻ NK 細胞をフローサイトメーターを用いて高度に純化した後、RNA-seq データを取得した。その後、バイオインフォマティクス解析によってマスター制御因子候補として遺伝子 X を特定した。

(2) バイオインフォマティクス解析の結果から、遺伝子 X は以下の特徴を持つことが示された。核内移行シグナルを持ち、細胞質と核内に存在し、刺激によって細胞活性化にて核内移行する可能性がある。

Ly49H 活性化シグナルを担うシグナル伝達分子 DAP12 及び DAP10 の下流のシグナル伝達分子と結合する。

記憶 NK 細胞分化に重要な役割を果たす活性化受容体 DNAM-1 の下流シグナル伝達分子によりリン酸化される。

パスウェイ解析において NK 細胞機能への寄与が強く示唆される。

(3) 定量的 RT-PCR にて、遺伝子 X は活性化 Ly49H⁺ NK 細胞にてナイーブ Ly49H⁺ NK 細胞と比較して発現が上昇し、Ly49H⁺ 記憶 NK 細胞にて高発現が維持されることが発現が確認された。

(4) 海外共同研究者から遺伝子 X 欠損マウスを入手した。遺伝子 X 欠損マウスの NK 細胞は、正常状態では野生型 NK 細胞と同様の正常な発生や表現型を示した。

(5) 野生型及び遺伝子 X 欠損マウスから Ly49H⁺ NK 細胞を単離し、DAP12 欠損マウスへ共移入した後に MCMV を感染させた。その結果、遺伝子 X が MCMV 特異的 Ly49H⁺ NK 細胞の増殖及び記憶 NK 細胞分化を制御する事を確認した。

(6) 遺伝子 X 欠損マウスと Nkp46-CreERT2-Tg-Rosa26-YFP マウスを交配して遺伝子 X 欠損 Nkp46-CreERT2-Tg-Rosa26-YFP マウスを作出した。野生型 Nkp46-CreERT2-Tg-Rosa26-YFP マウスと遺伝子 X 欠損 Nkp46-CreERT2-Tg-Rosa26-YFP マウスに MCMV を感染させた。その結果、遺伝子 X が MCMV 特異的 Ly49H⁺ NK 細胞の増殖及び記憶 NK 細胞分化を制御する事を確認した。

(7) 未感染の野生型及び遺伝子 X 欠損マウスからナイーブ NK 細胞を、MCMV を感染させた野生型及び遺伝子 X 欠損マウスから記憶 NK 細胞を単離し、*in vitro* において標的細胞に対する細胞傷害活性とインターフェロン- γ 産生を評価した。その結果、遺伝子 X はナイーブ及び記憶 NK 細胞の標的細胞に対する細胞傷害活性とインターフェロン- γ 産生を制御することが明らかになった。

(8) 遺伝子 X がコードするタンパク質の大部分は NK 細胞の細胞質に多く局在するが、Ly49H 刺激に応じて核内移行することが示された。従って、遺伝子 X は記憶 NK 細胞への分化において転写制御或いはエピジェネティック修飾に寄与する事が示唆された。

以上から、本研究において記憶 NK 細胞の分化と機能の制御因子が同定された。記憶 NK 細胞はその長期生存能・二次増殖能・強いエフェクター機能により、NK 細胞を用いた難治性ウイルス感染症に対するワクチンや、がん免疫療法の開発において非常に有用である。従って、本研究で我々が記憶 NK 細胞の分化とその機能のマスター制御因子を同定できた事は、基礎的・臨床的に極めて重要な意義を持つ。今後我々は、この制御因子による記憶 NK 細胞の分化と機能の分子機構について、詳細に解明する予定である。

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 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nabekura Tsukasa, Riggan Luke, Hildreth Andrew D., O' Sullivan Timothy E., Shibuya Akira	4. 巻 52
2. 論文標題 Type 1 Innate Lymphoid Cells Protect Mice from Acute Liver Injury via Interferon- Secretion for Upregulating Bcl-xL Expression in Hepatocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 96 ~ 108.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2019.11.004	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 該当する
1. 著者名 Yoshida H, Lareau CA, Ramirez RN, Rose SA, Maier B, Wroblewska A, Desland F, Chudnovskiy A, Mortha A, Dominguez C, Tellier J, Kim E, Dwyer D, Shinton S, Nabekura T, Qi Y, Yu B, Robinette M, Kim KW, Wagers A, Rhoads A, Nutt SL, Brown BD, Mostafavi S, Buenrostro JD, Benoist C; Immunological Genome Project.	4. 巻 176
2. 論文標題 The cis-Regulatory Atlas of the Mouse Immune System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 897 ~ 912.e20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2018.12.036	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 該当する
1. 著者名 Nabekura Tsukasa, Chen Zhiying, Schroeder Casey, Park Taeju, Vivier Eric, Lanier Lewis L., Liu Dongfang	4. 巻 200
2. 論文標題 Crk Adaptor Proteins Regulate NK Cell Expansion and Differentiation during Mouse Cytomegalovirus Infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3420 ~ 3428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1701639	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 該当する
1. 著者名 Tsukasa Nabekura, Dagmar Gotthardt, Kouta Niizuma, Tihana Trsan, Tina Jenus, Stipan Jonjic, and Lewis L. Lanier	4. 巻 199
2. 論文標題 Cutting Edge: NKG2D signaling enhances Ly49H+ natural killer cell responses but alone is insufficient to drive expansion during mouse cytomegalovirus infection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Immunol	6. 最初と最後の頁 1567-1571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1700799	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tsukasa Nabekura
2. 発表標題 Protective role of type 1 innate lymphoid cells in acute liver injury
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsukasa Nabekura
2. 発表標題 Tracking the Fate of Antigen-specific Versus Cytokine-activated Natural Killer Cells after Cytomegalovirus Infection
3. 学会等名 The 3rd International Conference of Innate Lymphoid Cells (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsukasa Nabekura
2. 発表標題 Tracking the fate of antigen-specific versus cytokine-activated natural killer cells after cytomegalovirus infection
3. 学会等名 RIKEN Center for Integrative Medical Sciences (IMS)-Japanese Society of Immunology (JSI) International Symposium on Immunology 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsukasa Nabekura
2. 発表標題 NKG2D signaling enhances Ly49H+ natural killer cell responses but alone is insufficient to drive expansion during mouse cytomegalovirus infection
3. 学会等名 The 6th Retreat of University of Tsukuba and Tokyo University of Science
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsukasa Nabekura
2. 発表標題 Tracking the fate of antigen-specific versus cytokine-activated natural killer cells after cytomegalovirus infection
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsukasa Nabekura
2. 発表標題 Activating receptors for self-MHC class I enhance effector functions and memory differentiation of NK cells during mouse cytomegalovirus infection
3. 学会等名 The 9th Annual Meeting of Society of Immunotherapy for Hematological Disorders
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsukasa Nabekura
2. 発表標題 Costimulatory molecule DNAM-1 is essential for optimal differentiation of memory natural killer cells during mouse cytomegalovirus infection
3. 学会等名 The 9th Annual Meeting of Society of Immunotherapy for Hematological Disorders
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsukasa Nabekura
2. 発表標題 Activating receptors for self-MHC class I enhance effector functions and memory differentiation of NK cells during mouse cytomegalovirus infection
3. 学会等名 The 26th Molecular Immunology Forum Tokyo (招待講演)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----