

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2006～2010

課題番号：18109006

研究課題名(和文) NKT細胞の発生分化メカニズム

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

独立行政法人理化学研究所・免疫制御研究グループ・グループディレクター

研究者番号：80110310

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：NKT細胞、クローンマウス、初期分化、前駆細胞、NKT細胞-GFPマウス

### 1. 研究計画の概要

新しいリンパ球として同定された NKT 細胞は感染症防御、発癌制御、癌転移制御などの生体防御と、アレルギー制御、自己免疫疾患発症制御、移植免疫寛容の維持等の免疫制御に必須であり、これまで未解決であった免疫現象の根幹にかかわる多くの事項がこの新しい免疫系によって担われている。NKT 細胞は T 細胞には使用されていない唯一の抗原受容体である Va14Ja18 でコードされる受容体を使用し、その発現は NKT 細胞の分化・選択に必須である。しかしながら、NKT 前駆細胞ならびにその受容体発現様式と選択の機構は明らかではない。

### 2. 研究の進捗状況

NKT細胞分化のプロセスの研究

1) NKT-ES細胞から成熟型 NKT細胞を試験管内分化誘導する系を構築し、前駆細胞と考えられる細胞集団の同定に成功した。

2) NKT細胞への初期分化には、Notchシグナルが必須であることを明らかにした。

3) NKT細胞に分化し得る未分化な細胞集団の同定に成功した。所謂DN1(Lin<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>)中に2つの前駆細胞集団を見出し、表現型がLin<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>c-kit<sup>int</sup>HSA<sup>lo</sup>(Day11に出現;ステージ1)およびLin<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>c-kit<sup>lo</sup>HSA<sup>hi</sup>(Day14に出現;ステージ2)である未分化な細胞集団であることを突き止めた。

4) NKT-ES細胞から、機能的に異なる成熟型 NKT細胞が分化し得ることを明らかにし、その試験管内培養法を確立した。

5) 生体内にも機能的に異なる NKT細胞の亜集団が複数存在することを明らかにした。

6) 喘息を引き起こすアレルギー気道炎症の引き金となる IL-13 産生性の細胞集団であることを、試験管内生体内両面から証明した。

NKT細胞の分化の場の研究

1) NKT-ES細胞のT細胞抗原受容体Ca及びその対立遺伝子下流に IRES-Venus を挿入した「NKT細胞が光るES細胞」NKT-ES- $\gamma$ 細胞の樹立並びにES- $\gamma$ 細胞の樹立に成功した。

3) Ca $\alpha$ -IRES-Venusノックインマウスを創出することに成功した。

NKT細胞前駆細胞の同定

1) 野生型マウス胸腺内の未分化な所謂DN4(CD44-CD25-)に既にVa14-Ja18にin frameで再構成を終えたNKT細胞前駆細胞が存在することを突き止めた。

2) 再構成を終えたVa14-Ja18は解析した全てのクローンにおいてin frameであり、Ja鎖と再構成も80%を超える頻度でJa18が使われていた。Va14-Ja18は選択的かつ挿入なしに再構成を起こしやすく、NKT細胞はCD1d分子による選択前に前駆細胞として出現していることを証明した。

2) CD1d欠損マウス胸腺においてもわずかながらのCD1d拘束性NKT細胞が存在することを見出した。

3) NKTクローンマウス及びCD1d欠損NKTクローンマウスの樹立に成功した。

### 3. 現在までの達成度

当初の計画以上に進展している。

当初想定していたNKT細胞分化発生メカニズムの解析から派生して、最終分化したNKT細胞には複数の亜集団が含まれていることを見出し、特にIL-17RB遺伝子をマーカーとする新しいTh2様のNKT細胞の同定と、気道過

敏症発症に関与する亜集団であることを見出したため。

#### 4. 今後の研究の推進方策

同定したNKT細胞前駆細胞のマイクロアレイ解析を行ない、発現が確認されたNKT細胞特異的遺伝子について、遺伝子導入、RNAiによるノックダウン、ノックアウトマウスの作製を通じて、NKT細胞特異的転写因子など分化決定に関わる責任遺伝子の同定並びに機能解析を進める。

NKT細胞の分化経路を可視化し、胸腺形成前の胎生初期にフォーカスし、免疫系発生所期AGM領域、SplanchnopleuraにおけるNKT細胞の発生を時間に沿って観察し、発生初期のNKT細胞動態を観察する。

CD1d欠損NKTクローンマウスの胸腺内各分化段階におけるNKT細胞の遺伝子発現プロファイル、糖脂質リガンド応答性、in vivoにおけるCD1dによる選択・増殖メカニズムを比較検証することにより、CD1dのNKT細胞に対する役割を明らかにする。

#### 5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕(計4件)

Watarai H, Rybouchkin A, Nagata Y, Hongo N, Sakata S, Sekine E, Dashtsoodol N, Tashiro T, Fujii S, Shimizu K, Mori K, Kawamoto H, Koseki H, **Taniguchi M.** Generation of functional NKT cells in vitro from embryonic stem cells bearing rearranged invariant V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 TCR $\alpha$  gene. *Blood* in submission. 査読有

Dashtsoodol N, Watarai H, Sakata S, **Taniguchi M.** Identification of CD4 CD8 double-negative natural killer T cell precursors in the thymus. *PLoS ONE* 3:e3688, 2008. 査読有

Terashima A, Watarai H, Inoue S, Sekine E, Nakagawa R, Hase K, Iwamura C, Nakajima H, Nakayama H, and **Taniguchi M.** A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B contributes to the development of airway hyperreactivity. *J Exp Med* 205:2727-2733, 2008. 査読有

Watarai H, Nakagawa R, Omori-Miyake M, Dashtsoodol N, **Taniguchi M.** Methods for detection, isolation, and culture of mouse and human invariant NKT cells. *Nat Protoc*, 3:70-78, 2008. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

Taniguchi M. Regulatory mechanisms of iNKT cells in the immune system. 13th International Congress of Immunology. Rio de Janeiro, Brazil. August 2007

Taniguchi M. Identification of IL-17RB+ NKT cells preferentially producing IL-13 as a

novel subset responsible for development of AHR. Collegium Internationale Allergologicum 2008, Curacao, May 2008.

Taniguchi M. Role of NKT cell in innate and acquired immunity. Japan-German Immunology Seminar 2008: Immune Regulation in Health and Disease. Fukuoka, Japan. November 2008.

Taniguchi M. Case study: Establishing a translational platform for development of novel therapeutics to allergy in Japan. Biomedical Asia 2009-Translational Research Asia Summit. March 2009.

〔図書〕(計2件)

中川竜介、谷口克、NKT細胞によるアレルギー反応調節、実験医学(羊土社)25(2007)

渡会浩志、田代卓哉、千葉朋希、谷口克、CD1dによる糖脂質抗原提示と免疫調節機構、蛋白質核酸酵素(共立出版)、53:1584-1589(2008).

〔産業財産権〕

出願状況(計5件)

新規糖脂質及びその用途、谷口克他、独立行政法人理化学研究所、2007-042873、2007/2/22、国内

IL-17RB陽性NKT細胞を用いたアレルギー性気道炎症及び/又は気道過敏症の治療薬のスクリーニング法、谷口克他、独立行政法人理化学研究所、2007-307981、2007/11/28、国内

新規糖脂質及びその用途、谷口克他、独立行政法人理化学研究所、2008-079265、2008/3/25、国内

B細胞由来iPS細胞およびそれ由来のB細胞、谷口克他、独立行政法人理化学研究所、2008-227325、2008/9/4、国内

NKT細胞由来iPS細胞およびそれ由来のNKT細胞、谷口克他、独立行政法人理化学研究所、2008-230932、2008/9/4、国内

〔その他〕

1. 新聞掲載

日刊工業新聞、化学工業新聞、毎日新聞、朝日新聞(2006/12/19); 日経産業新聞(2006/12/20); AERA(2007/7/16); 東京新聞(2008/2/8); 東京新聞、読売新聞、日本経済新聞、毎日新聞(2008/11/18); 朝日新聞、フジサンケイビジネス、夕刊フジ(2008/11/21); 日経産業新聞(2008/11/25); 日刊工業新聞、科学新聞(2008/11/28); 産経新聞(2008/12/1); 毎日新聞(2009/3/17); 日経産業新聞(2009/4/15)

2. アウトリーチ活動

理研科学講演会(2008/2/2); 理研サイエンスセミナー(2008/3/21)

3. ホームページ

<http://web.rcai.riken.jp/en/lab/regulation/index.html>