

平成23年5月31日現在

機関番号： 82401
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)
NK T細胞の発生分化機構メカニズム
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)
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

研究成果の概要(和文)：

新しいリンパ球として同定したナチュラルキラーT (NKT) 細胞は、CD1dに提示される糖脂質を認識するTリンパ球亜群で、自然免疫系と獲得免疫系の橋渡しをする重要な細胞である。本研究では、NKT細胞系の発生・分化様式を明らかにするために、クローンV α 14 NKT細胞マウス及びNKT細胞由来ES細胞ならびにiPS細胞を創出(世界で初めて成功)し、試験管内及び生体内における詳細な解析を行うことで、NKT細胞がT細胞決定系列とは異なる仕組みによって生まれることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：

CD1d-restricted invariant natural killer T (NKT) cells bridge innate and acquired immunity and play an important role in both protective and regulatory responses. However, the developmental progression of NKT cells remains unclear. In the present study, we have demonstrated that NKT cell precursors that express invariant V α 14-J α 18 transcripts, but are devoid of surface expression of the invariant V α 14 receptor, have the potential to generate mature NKT cells both in vitro and in vivo. Our findings have provided new insights into the early development of NKT cells prior to surface expression of the invariant V α 14 antigen receptor and suggest a possible alternative developmental pathway of NKT cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	23,600,000	7,080,000	30,680,000
2007年度	20,400,000	6,120,000	26,520,000
2008年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
2009年度	13,600,000	4,080,000	17,680,000
2010年度	12,800,000	3,840,000	16,640,000
総計	86,600,000	25,980,000	112,580,000

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、ES細胞、iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

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 $V\alpha 14J\alpha 18$ 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かった。

2. 研究の目的

世界で初めて成功したクローン $V\alpha 14$ NKT 細胞マウス及びそれ由来 ES 細胞、iPS 細胞を用いて NKT 細胞系の発生・分化様式を解析し、その仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) NKT 細胞の分化のプロセスについて、試験管内、生体内における NKT 細胞分化過程を FACS 解析し、各分化段階の細胞を分子生物学的手法により明らかにする。
- (2) NKT 細胞が光るマウスを創出し、発生初期の NKT 細胞動態を観察する。
- (3) CD1d 欠損 NKT クローンマウスを創出し、幼弱型 NKT 細胞を解析する。

4. 研究成果

(1) NKT 細胞分化のプロセスの研究

- 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。
- 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。
- 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 ($Lin^- CD44^+ CD25^-$) 中に 2 つの前駆細胞集団を見出し、表現型が $Lin^- CD45^+ CD11b^- CD44^+ CD25^- c-kit^{int} HSA^{lo}$ (Day11 に出現；ステージ 1) および $Lin^- CD45^+ CD11b^- CD44^+ CD25^- c-kit^{lo} HSA^{hi}$ (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。
- NKT-ES 細胞から、全ての体細胞が NKT の T 細胞抗原受容体に遺伝子再構成を完了しているマウス (NKT クローンマウス) の創出に成功した。このマウスにおいては胸腺及び末梢 (特に、肝臓、脾臓) で著しい NKT 細胞の増加が認められた (野生型マウスの

10-100 倍)。

- NKT クローンマウスの体細胞及び野生型マウスの NKT 細胞から KSOM 強制発現によって iPS 細胞 (NKT-iPS 細胞) を樹立することに成功した。
- NKT-iPS 細胞は NKT-ES 細胞と同様に試験管内で成熟型の NKT 細胞を分化誘導することが可能であった。実際、NKT-iPS 細胞由来あるいは NKT-ES 細胞由来 NKT 細胞は生体内で強力な抗腫瘍アジュバント活性を発揮する。
- NKT-ES 細胞および NKT-iPS 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。
- 生体内にも機能的に異なる NKT 細胞のサブセットが複数存在することを明らかにした。
- 生体内に存在する Th2 様の NKT 細胞は、IL-17RB 遺伝子の特徴的なマーカーとして発現し、気道過敏症発症、延いては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。

(2) NKT 細胞の分化の場の研究

- NKT-ES 細胞の T 細胞抗原受容体 $C\alpha$ 下流に IRES-Venus を挿入した「NKT 細胞が光る ES 細胞」NKT-ES- V 細胞の樹立に成功した。
- NKT-ES- V 細胞と対立遺伝子の $C\alpha$ 下流に IRES-Venus を挿入した ES- V 細胞の樹立に成功した。
- NKT-ES- V 細胞及び ES- V 細胞由来 $C\alpha$ -IRES-Venus ノックインマウスを創出することに成功した。前者は「NKT 細胞が光るマウス」であり、後者は「T 細胞が光るマウス」である。

(3) NKT 細胞前駆細胞の同定

- 野生型マウス胸腺内の未分化な所謂 DN4 ($CD44-CD25^-$) に既に $V\alpha 14-J\alpha 18$ 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。
- 再構成を終えた $V\alpha 14-J\alpha 18$ は解析した全てのクローンにおいて in frame であり、 $J\alpha$ 鎖と再構成も 80%を超える頻度で $J\alpha 18$ が使われていた。 $V\alpha 14-J\alpha 18$ 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。
- 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。
- 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。CD1d 欠損の NKT クローンマウスにおいても、 $V\alpha 14$ 受容体を発現する CD1d 拘束性の NKT 前駆細胞と考えられる細胞集団が胸腺に存在することから、NKT 細胞は CD1d による選択前に分化発生することが直接的に示された。また、この NKT 前駆細胞は、NKT 細胞の特徴である IFN- γ 、IL-4 といったサイトカイン産生能を有しておらず、CD1d は NKT 細胞のサイトカイン産生能を付与する機能を有する

ことが明らかとなった。

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64件)

- ① Watarai H, Fujii SI, Yamada D, Rybouchkin A, Sakata S, Nagata Y, Iida-Kobayashi M, Sekine-Kondo E, Shimizu K, Shozaki Y, Sharif J, Matsuda M, Mochiduki S, Hasegawa T, Kitahara G, Endo T, Toyoda T, Ohara O, Harigaya KI, Koseki H, Taniguchi M. Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. *J Clin Invest* 120:2610-2618, 2010. 査読有
- ② Fujii S, Motohashi S, Shimizu K, Nakayama T, Yoshiga Y, Taniguchi M. Adjuvant activity mediated by iNKT cells. *Semin Immunol* 22:97-102, 2010. 査読有
- ③ 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 α gene. *Blood* 115: 230-237, 2010. 査読有
- ④ Taniguchi M, Tashiro T, Dashtsoodol N, Hongo N, Watarai H. The specialized iNKT cell system recognizes glycolipid antigens and bridges the innate and acquired immune systems with potential applications for cancer therapy. *Int Immunol* 22:1-6, 2010. 査読有
- ⑤ Burrows P, Kronenberg M, Taniguchi M. NKT cells turn ten. *Nat Immunol* 10:669-671, 2009. 査読有
- ⑥ 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
- ⑦ 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
- ⑧ 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

- ⑨ Shimizu K, Kurosawa Y, Taniguchi M, Steinman RM, Fujii S. Cross-presentation of glycolipid from tumor cells loaded with α -galactosylceramide leads to potent and long-lived T cell-mediated immunity via dendritic cells. *J Exp Med* 204:2641-2653, 2007. 査読有
- ⑩ Harada M, Magara-Koyanagi K, Watarai H, Nagata Y, Ishii Y, Kojo S, Horiguchi S, Okamoto Y, Nakayama T, Suzuki N, Yeh WC, Akira S, Kitamura H, Ohara O, Seino K, Taniguchi M. IL-21-induced B ϵ cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses. *J Exp Med* 203,2929-2937, 2006. 査読有

[学会発表] (計19件)

- ① Masaru Taniguchi, iPS-derived NKT cells with adjuvant activity. World Immune regulation Meeting-V, Davos, Switzerland, Mar 25, 2011.
- ② Masaru Taniguchi, iPS-Derived NKT Cells and their Adjuvant Effects. 2011 Keystone Symposia on NK and NKT Cell Biology, Breckenridge, Colorado, USA, Jan 12, 2011.
- ③ Masaru Taniguchi, iPS-derived NKT cells. 8th German-Japan Symposium, Cuxhaven, Germany, Sep 27, 2010.
- ④ Masaru Taniguchi, iPS-derived NKT cells. 40th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Leipzig, Germany, Sep 23, 2010.
- ⑤ Masaru Taniguchi, NKT cell-targeted adjuvant cell therapy—from basic to clinic. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, Aug 31, 2010.
- ⑥ Masaru Taniguchi, Discovery of NKT cells with adjuvant activity and their clinical application in patients with advanced lung cancer. Second International Conference—Current Advances in Microbiology, Immunology and Allergology, Ulaanbaatar, Mongolia, June 24, 2010.
- ⑦ Masaru Taniguchi, A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. 2nd European Congress of Immunology, Berlin, Germany, Sep 14, 2009.
- ⑧ Masaru Taniguchi, Role of NKT cells in innate and acquired immunity. Japan-German Immunology Seminar 2008: Immune Regulation in Health and Disease, Fukuoka, Japan, Nov 11, 2008.
- ⑨ Masaru Taniguchi, Identification of IL-17RB+ NKT cells preferentially producing

IL-13 as a novel subset responsible for development of AHR. Collegium Internationale Allergologicum 2008, Curacao, Netherlands, May 4, 2008.

- ⑩ Masaru Taniguchi, Generation of NKT cells in vitro from cloned ES cell line. The 5th International Symposium on CD1/NKT Cells. The 5th International Symposium on CD1/NKT Cells, Kamakura, Japan, Mar 24, 2008.

〔図書〕(計1件)

「見えてきたがんを治す免疫－アレルギーとがんの治療最前線」 谷口 克著、技術評論社、2010年

〔産業財産権〕

○出願状況(計10件)

①名称：iPS細胞由来アロNKT細胞を用いた免疫療法およびそのためのNKT細胞由来iPS細胞および該iPS由来NKT細胞のバンキング
発明者：渡会浩志、藤井眞一郎、古関明彦、谷口克

権利者：理化学研究所

種類：米国仮出願

番号：61/419064

出願年月日：2010/12/2

国内外の別：国外

②名称：NKT細胞由来iPS細胞およびそれ由来のNKT細胞

発明者：谷口克、渡会浩志、古関明彦、藤井眞一郎

権利者：理化学研究所

種類：PCT

番号：JP2009/065695

出願年月日：2009/9/8

国内外の別：国内

③名称：B細胞由来iPS細胞およびその用途
発明者：谷口克、渡会浩志、伊川友活、石川文彦、河本宏、古関明彦

権利者：理化学研究所

種類：PCT

番号：JP2009/065534

出願年月日：2009/9/4

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 克 (TANIGUCHI MASARU)

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

(2) 研究分担者

渡会 浩志 (WATARAI HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・免疫制御研究グループ・上級研究員

研究者番号：70415339

(H20→H22：連携研究者)