

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07624

研究課題名(和文) iNKT細胞消失マウスの発見に基づくiNKT細胞分化の新規分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel molecular mechanism of iNKT cell differentiation based on the discovery of mice deficient in iNKT cells

研究代表者

石川 絵里 (ISHIKAWA, Eri)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20546478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：iNKT細胞のみが消失するT細胞特異的のプロテインキナーゼD (PKD) 欠損マウスの発見に基づき、iNKT細胞分化の新規分子機構の解明を目指し本研究を行なった。

PKD欠損iNKT細胞では分化に必須の転写因子PLZFの発現が減弱しており、PKD欠損マウスへのPLZF Tgの導入によりiNKT細胞が回復した。また、PKDの基質として別の転写因子を同定し、当該分子のリン酸化不能型変異体ノックインマウスではiNKT細胞が有意に減少することが明らかとなった。以上の結果から、PKDは直接転写因子を制御し、PLZFの発現誘導を介してiNKT細胞分化に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iNKT細胞の分化には転写因子PLZFの発現が必須であることが知られているが、TCRからPLZF発現に至るシグナル経路の詳細は未だ明らかになっていない。また、PKDは細胞質のみでなく核にも局在することが知られているが、核における機能に関しては未だ不明な点が多い。

本研究で得られた成果は、核におけるPKDの重要性を明らかにすると共に、PKDがTCR下流で転写因子のリン酸化を介してPLZFの発現を誘導しiNKT細胞分化を制御するという、iNKT細胞分化の新たな分子機構の存在を強く示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：We established CD4-Cre-mediated T cell specific PKD-deficient mice and found that iNKT cells were almost absent in the mice. On the basis of this finding, we tried to reveal the novel molecular mechanism of iNKT cell development.

Expression of a transcription factor PLZF, which is necessary for the specification of iNKT cells, was decreased in PKD-deficient cells. Introduction of PLZF transgene in PKD-deficient mice restored the generation of iNKT cells, suggesting that PKD contributes to the induction of PLZF to regulate iNKT cell development. To investigate the molecular link between PKD and PLZF, we searched for PKD substrates by phosphoproteomics and identified a candidate transcription factor. This factor was associated with and phosphorylated by PKD upon TCR stimulation. These results unveiled the novel role of PKD in iNKT development through the regulation of nuclear factors.

研究分野：免疫学

キーワード：iNKT細胞分化 セリンスレオニンキナーゼ TCRシグナル

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T細胞とNK細胞の特徴を併せ持つ亜集団で、抗原として糖脂質を認識して速やかに活性化し、病原体や腫瘍の排除に寄与することが知られている。通常の $\alpha\beta$ T細胞 (CD4⁺T、CD8⁺T細胞)の分化機構はかなりの部分が明らかにされてきたが、胸腺でのiNKT細胞分化を司るシグナルの詳細はほとんど分かっていない。

我々は以前、胸腺の未熟T細胞を抗原刺激した際にセリンスレオニンキナーゼ、プロテインキナーゼD (PKD) がリン酸化され活性化することを見出した。T細胞で発現する2つのアイソフォーム PKD2 と PKD3 を T細胞特異的に欠損させたマウスを作製し解析を進める過程で (Ishikawa, et al. *Nat. Commun.* 2016)、CD4-Cre Tg を用いた PKD2/3 二重欠損マウスでは胸腺および末梢で iNKT 細胞のみが消失することを見出した。そこで、iNKT 細胞における PKD 基質を TMT (Tandem Mass Tag) を用いた大規模リン酸化プロテオミクスにより探索したところ、TCR 刺激かつ PKD 依存的にリン酸化を受ける分子として、転写因子を含むいくつかの候補分子が同定された。

2. 研究の目的

PKD 欠損マウスの表現型および基質候補分子から、PKD は iNKT 細胞分化を司る主要なシグナル経路を担う可能性が高いと考えた。そこで本研究では、シグナル分子の欠損により iNKT 細胞のみが消失するユニークな本マウスを用いて、PKD が寄与するシグナル経路を同定し iNKT 細胞消失のメカニズムを解明することにより、iNKT 細胞分化に至る未解明な部分を明らかにすることを目的とした。特に以下の問いに焦点を当て本研究を行った。

(1) PKD は iNKT 細胞の分化成熟のどの段階に寄与しているか。

(2) PKD の iNKT 細胞における基質は何か。また、本経路依存的に誘導される遺伝子は何か。つまり、PKD の活性化から基質を介して iNKT 細胞分化に至る分子機構はどのようなものか。

(3) PKD は iNKT 細胞の分化のみでなく、末梢での活性化・維持にも寄与するのか。

3. 研究の方法

(1) iNKT 細胞消失のメカニズムを調べるにあたり、まず胸腺における iNKT 細胞分化において抗原提示細胞として働く胸腺細胞側と iNKT 細胞側どちらで PKD が重要かを調べるため、野生型と PKD 欠損骨髓細胞の混合キメラマウスを作成し、解析を行った。次に、T細胞特異的 PKD 欠損マウスからわずかに得られる胸腺 iNKT 細胞について、TCR 遺伝子再構成、生存、分化成熟段階、サブタイプの詳細な解析を行った。また、野生型と PKD 欠損マウスより胸腺選択を受け直前の胸腺細胞を採取し、TCR および SALM 抗体で刺激し、遺伝子発現の変動を比較した。その結果 PKD 欠損細胞で発現が減弱している分子を見出したため、当該分子のトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、PKD 欠損マウスと交配することにより、iNKT 細胞が回復するか否かを検討した。

(2) 大規模リン酸化プロテオミクスにより同定された iNKT 細胞における PKD 基質候補分子が、PKD により直接リン酸化される基質であるかを *in vitro* kinase assay により検証した。また、*in vitro* kinase assay により得られたリン酸化フォームのマススペクトル解析を行い、リン酸化部位を同定した。さらに、実際に当該基質分子が生体内の iNKT 細胞においても TCR 刺激かつ PKD 依存的にリン酸化されるかを明らかにするため、PRM (parallel reaction monitoring) 法を用いたターゲット質量分析を試みた。

基質となりうるものが明らかとなった分子については、PKD 下流での iNKT 細胞分化における重要性を検証するため、セリンをアラニンに置換したリン酸化不能型変異体のノックインマウスを作製し、解析を行った。

さらに、PKD によるリン酸化が基質分子にどのような機能変化をもたらすかを明らかにするため、リン酸化によって制御される相互作用分子の大規模同定を試みた。

(3) PKD 欠損マウスからは iNKT 細胞がごく少数しか得られないため、PKD 欠損 iNKT 細胞株を樹立し、iNKT 細胞の活性化における PKD の役割を調べた。また、iNKT 細胞の分化に影響を与えることなく末梢 iNKT 細胞の維持・活性化における PKD の役割を明らかにするため、本研究室で樹立した末梢 T細胞特異的 Cre 発現マウスを用いて PKD 欠損マウスを樹立し、解析を行った。

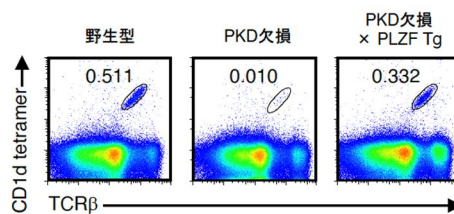
4. 研究成果

(1) PKD は iNKT 細胞分化に必須の転写因子の発現を誘導することで、分化成熟に寄与する

T細胞欠損マウスに PKD 欠損マウス由来骨髓細胞を移入したマウスでは iNKT 細胞が認められず、野生型と PKD 欠損骨髓細胞の混合キメラマウスでも PKD 欠損由来の iNKT 細胞は認められなかった。また、iNKT 細胞のインバリアント TCR の遺伝子再構成は PKD 欠損マウスで

も正常だったことから、抗原提示細胞として働く胸腺細胞側ではなく、iNKT細胞側でTCR遺伝子再構成以降にPKDが欠損していることがiNKT細胞消失の原因と考えられた。PKD欠損マウスに生存分子Bcl2 Tgを導入してもiNKT細胞は回復せず、PKDはiNKT細胞の生存よりむしろ分化に寄与していると考えられた。さらに、PKDはiNKT細胞の分化のみでなく成熟にも寄与し、とりわけNKT1、NKT2の分化に重要であることが明らかとなった。

胸腺選択を受ける直前の胸腺細胞を採取し、TCRおよびSALM抗体で刺激し遺伝子発現の変動を解析したところ、PKD欠損細胞ではSALM共刺激による転写因子PLZFの遺伝子発現増強が減弱していた。実際、PKD欠損マウスのiNKT細胞では分化成熟に伴うPLZFの発現誘導が低下していた。そこで、T細胞特異的PLZF Tgマウスを作製しPKD欠損マウスに導入したところ、iNKT細胞が野生型の半分程度に回復することが明らかとなった(図1)。以上の結果から、PKDはTCRおよびSLAMの下流でiNKT細胞分化に必須の転写因子PLZFの発現誘導に働くことで、iNKT細胞分化に寄与すると考えられた。



(図1) PKD欠損マウスではiNKT細胞がほぼ消失するが、この消失は転写因子PLZFの導入により回復する。

(2) PKD基質分子のリン酸化不能型変異体ノックインマウスではiNKT細胞分化が減弱する。大規模リン酸化プロテオミクスにより挙がってきたiNKT細胞におけるPKDの基質候補分子のいくつかは、*in vitro* kinase assayによりPKDの直接の基質となり得ることが明らかとなった。また、リン酸化フォームのマススペクトル解析を行なったところ、大規模リン酸化プロテオミクス解析で検出された部位と同じ部位がリン酸化されていることが確認できた。そこで、これら分子のPKDによりリン酸化されるセリンをアラニンに置換したリン酸化不能型変異体ノックインマウスを作製し、解析を行った。その結果、このうち一つの転写因子のノックインマウスにおいてiNKT細胞の割合が野生型の半分程度となる結果が得られており、PKD下流でiNKT細胞分化へと繋がる基質分子である可能性が高いと考えられた。

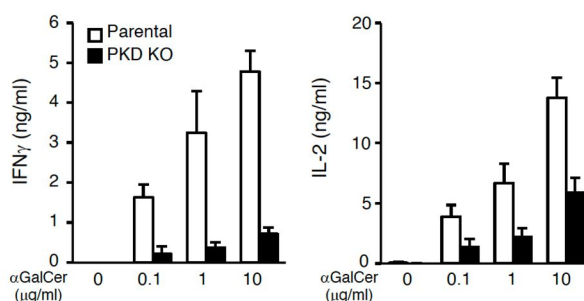
次に、PRM法を用いたターゲット質量分析により、この転写因子が実際に生体内のiNKT細胞においてもリン酸化されているかを検証した。しかし、TMTのようなタグが無い状態ではリン酸化ペプチドの検出が難しく、検出することができなかった。さらに、基質のリン酸化によって制御される相互作用分子の同定を試みたが、免疫沈降後のマススペクトル解析ではリン酸化依存的な結合分子の変化がほとんど認められず、現在はBioIDを用いた手法を試みている。

(3) PKDはiNKT細胞の分化成熟のみでなく活性化にも寄与する

PKD欠損iNKT細胞株を用いて、iNKT細胞活性化におけるPKDの役割を調べた。TCR刺激によるErkのリン酸化はPKD欠損細胞でも遜色なく認められたが、IFN γ とIL-2の産生は欠損細胞で顕著に低下していた(図2)。つまりPKDは分化成熟のみでなく、末梢iNKT細胞の活性化にも重要な役割を果たすことが示唆された。

本研究室で樹立した末梢T細胞特異的Cre発現マウスを用いてPKD欠損マウスを樹立し、末梢iNKT細胞の解析を行った。

ところが、このCreマウスのiNKT細胞では遺伝子欠損の指標として用いたRFPの発現が10%程度と低く、全ての末梢iNKT細胞ではPKDを欠損できていないと考えられた。しかしながら、RFP⁺iNKT細胞の割合は野生型とPKD欠損マウスで変わらなかったため、PKDは末梢iNKT細胞の維持には重要ではないと考えられた。



(図2) PKD欠損iNKT細胞では、 α GalCer刺激によるサイトカイン産生が減弱する。

本研究から、PKDはiNKT細胞分化に必須の転写因子PLZFの発現誘導を介してNKT細胞分化に寄与することが示唆された。また、iNKT細胞におけるPKDの基質として転写因子を見出し、この分子のリン酸化不能型変異体ノックインマウスではiNKT細胞の減少が認められたことから、PKDによる当該基質のリン酸化がiNKT細胞分化へと繋がる経路の一つであると考えられた。PKDは細胞質のみでなく核にも局在することが知られているが、核における機能の詳細は明らかになっていない。本研究で得られた結果は、これまで不明であったPKDの核における役割を明らかにすると共に、PKD-基質分子-PLZFというiNKT細胞分化を担う新たな経路の存在を強く示唆するものである。今後、iNKT細胞分化に至る転写プログラムの新規誘導機構として本経路の詳細を明らかにするため、PKD基質分子のリン酸化の意義を明らかにすることが重要であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shuya Zhang, Huan Liu, Meimei Yin, Xiuying Pei, Angelika Hausser, Eri Ishikawa, Sho Yamasaki, Zheng Gen Jin	4. 巻 72
2. 論文標題 Deletion of Protein Kinase D3 Promotes Liver Fibrosis in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 1717-1734
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep.31176	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 該当する

〔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 石川絵里、山崎晶
2. 発表標題 セリンスレオニンキナーゼPKDによるiNKT細胞分化制御機構の解析
3. 学会等名 第30回Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ISHIKAWA Eri, YAMASAKI Sho
2. 発表標題 Deciphering molecular link between kinases and transcription factors during iNKT cell development
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------