

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 1 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790490

研究課題名(和文) 胸腺ダブルネガティブ前駆細胞からのNK T細胞新規分化経路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of alternative developmental pathway of NKT cells from CD4/CD8 double-negative thymocytes

研究代表者

D NYAMBAYAR (DASHTSOODOL, Nyambayar)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：50443057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：NKT細胞は、V 14J 18受容体によって糖脂質を認識する特殊なリンパ球である。腫瘍や感染に対する防御反応の中心的な役割を担っており、がん免疫治療における標的細胞の一つとして注目されている。NKT細胞の細胞系列決定・機能獲得については未だ不明点が多い。これまでの定説では、NKT細胞はT細胞と同様の分化経路をたどり、胸腺CD4陽性CD8陽性(DP)ステージでT細胞分化経路から分岐し、NKT細胞に分化するというものである。しかし、本研究において、DPステージの前段階である胸腺CD4陰性CD8陰性(DN)ステージにおいて既にNKT細胞への系列決定されている事を見出した。

研究成果の概要(英文)：Currently it is thought that NKT cells are generated from CD4/CD8 double-positive (DP) thymocytes by selection on CD1d, a process termed the DP pathway. However, it is still unknown whether NKT cells develop exclusively by the DP pathway in a manner closely resembling that of conventional T cells, or some alternatives to this pathway exist. Here we provide genetic evidences demonstrating the presence of an alternative developmental pathway of NKT cells from CD4/CD8 double-negative (DN) stage thymocytes that is before the DP stage by using the DP-specific Rag2 deletion and genetic fate-mapping mouse models. Furthermore, we found that NKT cells generated by the DN pathway possess characteristics of Th1-biased cytotoxic effector cells suggesting this developmental pathway gives rise preferentially to Th1-type NKT cells. Our present findings provide new insights in understanding the development of NKT cells in the thymus, which seems to be different from that of conventional T cells.

研究分野：免疫学

キーワード：NKT 胸腺 分化経路 CD1d

1. 研究開始当初の背景

NKT細胞は、多様性がない均一な Vα14Ja18 受容体によって糖脂質を認識する特殊なリンパ球である。腫瘍や感染に対する防御反応の中心的な役割を担っており、がん免疫治療における標的細胞の一つとして注目されている。NKT細胞の分化・機能を操作し、試験管内で任意の機能を持つNKT細胞を大量に分化誘導することができれば、その効果をさらに強めることができると期待される。

しかしながら、NKT細胞の細胞系列決定・機能獲得については未だ不明点が多い。これまでの定説では、NKT細胞はT細胞と同様の分化経路をたどり、胸腺CD4陽性CD8陽性ダブルポジティブ(DP)ステージでCD1d分子によるポジティブセレクションを受けることでT細胞から分岐し、NKT細胞に分化するというものである。しかし、本研究において、DPステージの前段階である胸腺CD4陰性CD8陰性ダブルネガティブ(DN)ステージにおいて既にNKT細胞への系列決定がなされている事を見出した。

2. 研究の目的

本研究においては、NKT細胞分化プロセスを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

定説であるNKT細胞分化のDP経路とは異なる分化経路の存在を検証するために、ここでは胸腺DPステージに特異的にCreリコンビナーゼを発現するE8III-Creマウスを用いたRAG2遺伝子欠損マウス、あるいはYFP色素を発現するROSA-YFPマウスを作成し、各種解析を実施する。

(1) 遺伝子再構成に必要なRag2遺伝子をDPステージ特異的に欠損させ、DPステージでの分化阻害を誘導し、NKT細胞の分化への影響を確認する。

(2) E8III-Cre、ROSA-YFPリポーターマウスを用い、DPステージの通過を確認するとYFP色素を発現するfate mapping解析を実施する。

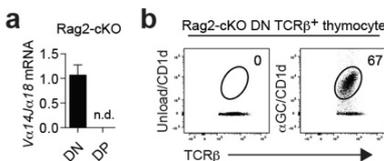
(3) DN経路由来NKT細胞の特徴を解析する目的で、細胞表面分子発現、遺伝子発現プロファイル、細胞機能を検証する。

4. 研究成果

NKT細胞分化プロセスの検証E8III-Creマウスを用い、胸腺DPステージにてRag2遺伝子を欠損させた結果、DPステージにおけるVα14Ja18遺伝子再構成

図1

は消失し、NKT細胞数は減少した。このことは通説であるDP経路の存在を示している。



しかしながら、DP経路を抑制した本マウスにおいて、成熟NKT細胞の存在が確認された。これはDN経路由来であることを強く示唆している(図1)。

E8III-Creマウスを用い、ROSA-YFPと組み合わせたFate mappingの結果、DPステージを抜けていないYFP陰性のNKT細胞の存在が確認され、DN経路の存在が明確化された(図2)。

DN経路由来NKT細胞の特徴を解析した結果、Th1サイトカインの発現が高いことが確認された。遺伝子

発現解析の結果、パーフォリン/グランザイム系の細胞障害におけるエフェクター分子の高発現が認められ、実際に本DN経路由来

NK T細胞は高い細胞障害活性

図2

を有していることが確認された(図3)。

興味深いことに、DN由来NKT細胞は主として肝臓に集積することが確認された。DP経路由来NKT細胞は脾臓へ集積することから、分化経路の相違によって細胞機能および生体内での役割にも違いが生

じている可能性が示唆される(図4)。

これらの事実は、定説であったDP経路に加え、新しい分化経路であるDN経路の存在を証明するものである。加えて、分化経路の違いによって生体内での役割が異なる可能性に言及するものであり、今後新しい観点からの研究の推進を可能とする。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Dashtsoodol N, Shigeura T, Aihara M, Ozawa R, Kojo S, Harada M, Endo TA,

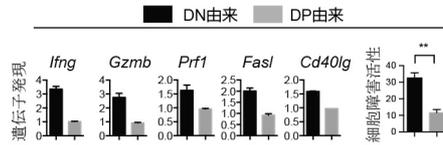
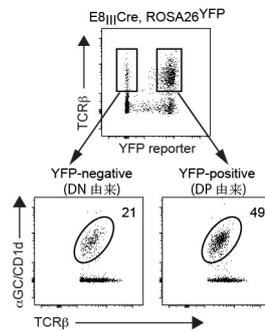


図3

を有していることが確認された(図3)。

興味深いことに、DN由来NKT細胞は主として肝臓に集積することが確認された。DP経路由来NKT細胞は脾臓へ集積することから、分化経路の相違によって細胞機能および生体内での役割にも違いが生

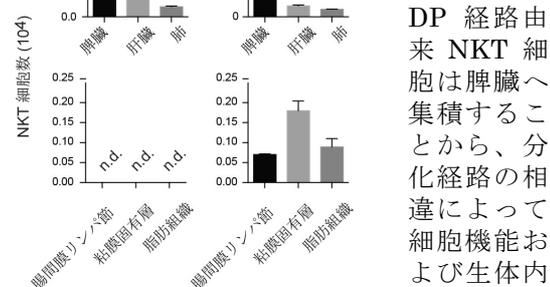


図4

じている可能性が示唆される(図4)。

これらの事実は、定説であったDP経路に加え、新しい分化経路であるDN経路の存在を証明するものである。加えて、分化経路の違いによって生体内での役割が異なる可能性に言及するものであり、今後新しい観点からの研究の推進を可能とする。

- Watanabe T, Ohara O, Taniguchi M, Alternative pathway for the development of V α 14⁺ NKT cells directly from CD4⁻CD8⁻ thymocytes that bypasses the CD4⁺CD8⁺ stage, *Nature Immunology* ジャーナル、査読有、2017、 DOI: 10.1038/ni.3668
- ② Dashtsoodol N, Shigeura T, Ozawa R, Harada M, Kojo S, Watanabe T, Koseki H, Nakayama M, Ohara O, Taniguchi M, Generation of novel Traj18-deficient mice lacking V α 14 natural killer T cells with an undisturbed T cell receptor α -chain repertoire, *PLOS One* ジャーナル、査読有、11 巻、2016、pp. 1–10、 DOI: 10.1371/journal.pone.0153347
- ③ Taniguchi M, Harada M, Dashtsoodol N, Kojo S, Discovery of NKT cells and development of NKT cell-targeted anti-tumor immunotherapy, *Proceedings of the Japan Academy Ser. B Physical and Biological Sciences* ジャーナル、査読有、91 巻、2015、pp. 292–304、 DOI: 10.2183/pjab.91.292
- ④ Ren Y, Dashtsoodol N, Watarai H, Koseki H, Quan C, Taniguchi M, Generation of induced pluripotent stem cell-derived mice by reprogramming of a mature NKT cell, *International Immunology* ジャーナル、査読有、26 巻、2014、pp. 551–561、 DOI: 10.1093/intimm/dxu057
- double-negative thymocytes, 日本免疫学会総会、2016 年 12 月 5 日、沖縄コンベンションセンター、那覇（沖縄）
- ② Dashtsoodol N, Shigeura T, Watanabe T, Harada M, Kojo S, Endo T, Ohara O, Koseki H, Taniguchi M, A validation of the requirement for V α 14 NKT cells for tumor rejection using newly generated Traj18-deficient mice with undisturbed T cell receptor repertoire, CD1-MR1 2015 国際学会、2015 年 11 月 16 日、Mantra Lorne, Victoria（オーストラリア）
- ③ Dashtsoodol N, Ren Y, Harada M, Ishige A, Aihara M, Shigeura T, Ozawa R, Yamanaka H, Seino K, Taniguchi M, Transcription factor c-Maf is indispensable for the development of Interleukin-17 producing ROR γ t-positive invariant NKT cells, 7th International Symposium on CD1 and NKT cells 国際学会、2013 年 9 月 14 日、Tours（フランス）
- ④ Dashtsoodol N, Harada M, Endo T, Ren Y, Seino K, Ohara O, Carey J, Germany-Partarrieu M, Taniguchi M, Characterization of the cell with Th1-type NKT cell potential in the DN1 thymic fraction, 7th International Symposium on CD1 and NKT cells 国際学会、2013 年 9 月 13 日、Tours（フランス）
- 〔学会発表〕（計 4 件）
- ① Dashtsoodol N, Endo T, Ohara O, Taniguchi M, Identification of an alternative developmental pathway of V α 14⁺ NKT cells from

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

統合生命医科学研究センター 免疫制御戦略
研究グループ 研究紹介

http://www.riken.jp/research/labs/ims/immune_reg/

6. 研究組織

(1)研究代表者

ダシツオードル・ニヤムバヤル
(DASHTSOODOL, Nyambayar)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医
科学研究センター・研究員

研究者番号：50443057