

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460583

研究課題名(和文)長期抗腫瘍効果を示すNKT細胞サブセットの同定

研究課題名(英文)Characterization of memory invariant NKT cells

研究代表者

藤井 眞一郎 (Fujii, Shin-ichiro)

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・チームリーダー

研究者番号：10392094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：NKT細胞は、感染や発癌過程において、自然免疫として初期生体防御機能を果たすリンパ球であり、CD1d上の糖脂質リガンドを認識してIFN- $\gamma$ を強発現し、抗腫瘍効果を示す。これまでのリンパ組織における解析では、NKT細胞の免疫応答は短期的応答に留まると考えられてきた。我々はNKT細胞の中で、肺内に抗腫瘍効果を示すKLRG1陽性NKT細胞サブセットが長期に存在することをつきとめ、KLRG1陽性NKT細胞が、特徴的な接着分子、ケモカインレセプター、NKレセプターの発現、高いIFN- $\gamma$ 産生能を有することを明らかにした。遺伝子解析の結果からKLRG1陽性NKT細胞に特異的な分子の候補を同定できた。

研究成果の概要(英文)：Invariant (i)NKT cells recognize a complex of the antigen-presenting MHC-like molecule CD1d and a glycolipid and play a key role at the initial immunological defense in infection and cancer. After the activation, the fate of iNKT cells toward memory has not been identified. Here we show the presence of effector memory-like KLRG1+iNKT cells in the lung. They express the distinct expression of adhesion molecules, chemokine receptors and NK receptors and can produce high amount of IFN- $\gamma$ . In addition, we identified the specific molecules, of KLRG1+ iNKT cells by RNA-seq analysis.

研究分野：免疫学

キーワード：NKT細胞 樹状細胞 記憶免疫 抗腫瘍免疫

## 1. 研究開始当初の背景

NKT 細胞は、T 細胞のように胸腺内で成熟し、胸腺細胞よりランダムな TCR の再構成がおこり、その結果 CD1d - 内因性糖脂質に結合する TCR を持った胸腺細胞が NKT 細胞系統へと選択され、末梢に移行するものとして考えられている。機能的には、NKT 細胞は、感染や発癌過程において、自然免疫として初期生体防御機能を果たす CD1d 拘束性のリンパ球であり、糖脂質リガンドを認識して IFN- $\gamma$  を強発現し、抗腫瘍効果を示す。現在、定常状態における NKT 細胞は、CD4T 細胞の場合と同様にそのサイトカイン産生パターンから、NKT1, NKT2, NKT17 サブセットに分化すると考えられている。しかし、NKT リガンドによる活性化刺激後にこれらの NKT サブセットがどのような挙動を示すかは検証されておらず、その免疫応答は自然リンパ球として短期的応答に留まると考えられてきたが、詳細は不明であった。

末梢へ移行した NKT 細胞は、NKT 細胞の糖脂質リガンドである  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GalCer) を CD1d 発現提示細胞に *ex vivo* で提示させ投与すると、脾臓中にリガンド特異的に IFN- $\gamma$  産生 NKT 細胞が 4 日をピークに増幅、抗腫瘍効果が得られる (Fujii et al Nat Immunol 2002, PNAS 2006, Uldrich AP et al J Immunol 2005, Parekh J Clin Invest 2005)。この場合でも活性化 7 日後には、脾臓中の NKT 細胞はほぼ定常状態の特性に戻ると考えられてきた。本研究ではこの NKT 細胞のサブセットの細胞学的特徴と分子機構を解明することを目的とする。

## 2. 研究の目的

我々はこれまで NKT 細胞の中で、肺内に抗腫瘍効果を示す NKT 細胞サブセットが長期に存在することを報告してきた。本研究では、このような抗腫瘍効果を示す肺内 NKT 細胞のサブセットを詳細に解析し、脾臓内、及び肝臓内 NKT 細胞との細胞の局在、更に細胞寿命と機能の評価、及び長期抗腫瘍効果を発

揮する分子機構の解明を行う。

## 3. 研究の方法

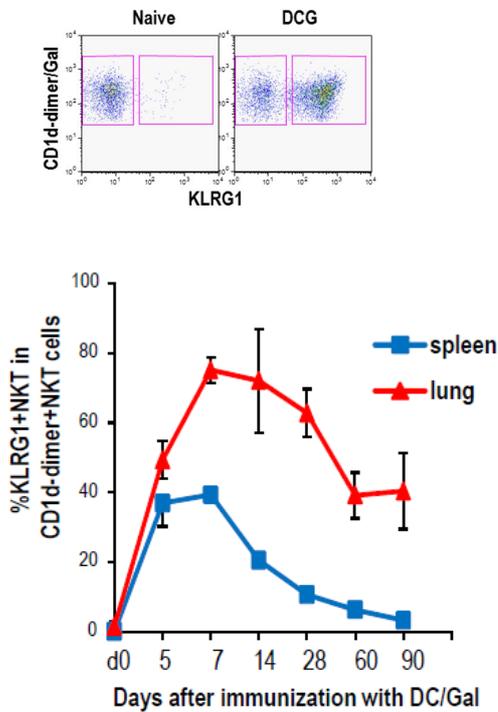
「KLRG1 陽性 NKT 細胞が、活性化後に肺内において顕著に増殖持続する」ことを手掛かりに、細胞の特性を明らかにする。第一に KLRG1 陽性 NKT サブセットの臓器分布に関する経時的検討を行うと共に、増殖する場が、肺内のみであるかどうか解析する。更には、野生型マウスに存在する NKT のみならず、KLRG1 陽性 T 細胞や NK 細胞と表現型を比較し明らかにする。次には、KLRG1 陽性 NKT サブセットが記憶免疫に該当するかどうかを検討する。特に KLRG1 陽性 NKT 細胞が長期維持されているかを標識して検証する必要がある、更に同一抗原で再刺激した 2 次応答を評価する。以上のように細胞学的特徴を把握したうえで、KLRG1 陽性 NKT 細胞の特異的発現分子の検索・同定を目指す。

## 4. 研究成果

### (1) KLRG1 陽性 NKT 細胞の初期活性化部位と臓器分布に関する経時的検証

我々のこれまでの研究結果では、 $\alpha$ -GalCer を DC に提示させた細胞 (DC/Gal) を免疫後に肺内の NKT 細胞の IFN- $\gamma$  産生能は 1 週間以上に渡り継続することを明らかにした。これは前述したような従来のエビデンスである「IFN- $\gamma$  産生性 NKT は、活性化後 1 週間で収束する」という免疫動態から考えると予想外の結果である。

NKT 細胞は定常状態では、肺、肝臓、脾臓に比較的多く存在する。今回同定した KLRG1 陽性 NKT 細胞は、活性化後に脾臓内にも存在するが、1 か月ほど経過後は、ほぼ消失する。それに対して肺内 KLRG1 陽性 NKT 細胞は、90 日経過後も確認できた。(下図参照)



## (2) KLRG1 陽性 NKT 細胞の免疫学的表現型の解析

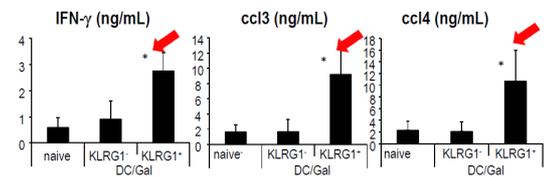
NKT細胞は、無刺激の状態ではCD44、CD62L等が、既に発現していることが他のT細胞との相違点である。活性化分子、接着分子、ケモカインレセプター、NKレセプターなど、どのような表現型での特徴があるか明らかにした。KLRG1陽性で尚且つIFN- $\gamma$ が高産生性である以外に、メモリーNK細胞や、short-lived effector(SLEC) CD8T細胞の細胞表現型と同様のIL7R1<sup>lo</sup>CD43<sup>hi</sup>CD49d<sup>hi</sup>NKG2D<sup>hi</sup>LYy6<sup>hi</sup>表現型を示すことが判明した。

## (3) KLRG1陽性NKTサブセットの免疫学的機能の特性の評価

### NKT細胞の機能的評価：

肺に存在するKLRG1陽性NKT細胞について、リガンド再刺激後のサイトカイン産生能、ケモカイン産生能、抗腫瘍細胞傷害活性などの機能的特性を検討した。KLRG1陽性NKT細胞は下記のとおり、リガンド特異的にIFN- $\gamma$ 、ccl3、ccl4の有意な産生を示した(下図)。また、4ヶ月後にB16メラノーマを静

脈内投与したところ、KLRG1陽性NKT細胞は即座に反応し、IFN- $\gamma$ を産生した。



## KLRG1 陽性 NKT サブセットの抗原記憶しているかどうかの評価

DC/Gal を投与することにより誘導されるこのサブセットが記憶NKT細胞といえるかどうか、について、下記の点に着目して解析を進めた。

(ア) KLRG1 陽性 NKT 細胞の長期維持：

Venus 陽性 NKT 細胞を用いて、この細胞が一細胞レベルで長期維持されることを示した。

(イ) 同一リガンド( $\alpha$ -GalCer)で再刺激(boosting)後に、二次的活性化を示すが、他のリガンド(GSL)をパルスしたDCで再刺激した場合2次応答を示さなかった。

(ウ) **KLRG1 陽性 NKT 細胞の CDR3 V $\beta$  レパトワ** 解析：DC/Gal 免疫後経時的(2週間, 1ヶ月)にKLRG1陽性NKTサブセットと免疫していないマウス由来NKTとRNA-Seqで比較し、CDR3V $\beta$ レパトワを解析したところ、KLRG1陽性NKT細胞に再度抗原刺激をした場合に、強力な2次応答が起こることを示した。

## 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 9件)

1. Shimizu K, Yamasaki S, Shinga J, Sato Y, Watanabe T, Ohara O, Kuzushima K, Yagita H, Komuro Y, Asakura M, and Fujii S\*. Systemic DC activation modulates the tumor microenvironment and shapes the long-lived tumor-specific memory mediated by CD8+ T cells. *Cancer Res* 2016, 76:3756-66. (査読有)

2. Yamada D, Iyoda T, Vizcardo R, Shimizu K, Sato Y, Endo TA, Kitahara G, Okoshi M, Kobayashi M, Sakurai M, Ohara O, Taniguchi M, Koseki H, **Fujii S\***. Efficient regeneration of Human V $\alpha$ 24<sup>+</sup> invariant NKT cells and their anti-tumor activity in vivo. **Stem Cells** 2016, 34:2852-2860. ( 査読有 )
  3. Yamasaki S, Shimizu K, Kometani K, Sakurai M, Kawamura M, and **Fujii S\***. *In vivo* dendritic cell targeting cellular vaccine induces CD4<sup>+</sup> Tfh cell-dependent antibody against influenza virus. **Sci Rep** 2016, 6:35173 ( 査読有 )
  4. Li Y, Takahashi Y, **Fujii S**, Zhou Y, Hong R, Suzuki A, Tsubata T, Hase K, Wang JY. EAF2 mediates germinal centre B-cell apoptosis to suppress excessive immune responses and prevent autoimmunity. **Nat Commun**. 2016, 3:10836. ( 査読有 )
  5. Sato Y, Shimizu K, Shinga J, Hidaka M, Kawano F, Kakimi K, Yamasaki S, Asakura M, **Fujii S**. Characterization of the myeloid-derived suppressor cell subset regulated by NK cells in malignant lymphoma. **Oncoimmunology** 2015, 4(3):e995541. ( 査読有 )
  6. Shimizu K, Shinga J, Yamasaki S, Kawamura M, Dörrie J, Schaft N, Sato Y, Iyoda T, **Fujii S**. Transfer of mRNA Encoding Invariant NKT Cell Receptors Imparts Glycolipid Specific Responses to T Cells and  $\gamma\delta$ T Cells. **PLoS One** 2015, 10(6):e0131477. ( 査読有 )
  7. Hosoi A, Matsushita H, Shimizu K, **Fujii S**, Ueha S, Abe J, Kurachi M, Maekawa R, Matsushima K, Kakimi K. Adoptive cytotoxic T lymphocyte therapy triggers a counter-regulatory immunosuppressive mechanism via recruitment of myeloid-derived suppressor cells. **Int. J. Cancer** 2014, 134:1810-1822. ( 査読有 )
  8. Hasegawa H, Yamashita K, Otubo D, **Fujii S**, Kamigaki T, Kuroda D, Kakeji Y. Allogeneic DCG promote lung NK cell activation and antitumor effect after invariant NKT cell activation. **Anticancer Res.** 2014, 34:3411-3417. ( 査読有 )
  9. Shimizu K, Sato Y, Shinga J, Watanabe T, Endo T, Asakura M, Yamasaki S, Kawahara K, Kinjo Y, Kitamura H, Watarai H, Ishii Y, Tsuji M, Taniguchi M, Ohara O, **\*Fujii S**. KLRG1+invariant natural killer T cells are long-lived effectors. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2014, 111:12474-12479. ( 査読有 )
- [学会発表](計 20 件)
1. **藤井真一郎**.「自然免疫と獲得免疫の両者を賦活させる新規がん細胞ワクチン「人工アジュバントベクター細胞」の開発」第 12 回広島肝胆膵研究会 (2016/11/8 ホテルグランヴィア、広島県広島市)
  2. **藤井真一郎**.「自然免疫系を利用したがんワクチンの開発」千葉大学大学院 臨床腫瘍額持論 特別講義 (2016/8/8 千葉大学、千葉県千葉市)
  3. **藤井真一郎**.「多機能性がんワクチン「人工アジュバントベクター細胞」の開発」第 20 回日本がん免疫学会総会 (2016/7/29 大阪国際交流センター、大阪府大阪市)
  4. **藤井真一郎**. 腫瘍免疫 –自然免疫を利用したがんワクチンの開発・創薬への挑戦–獨協医科大学 免疫学特別講義 (2016/6/20 獨協医科大学、栃木県下都

- 賀郡)
5. Fujii S. "Systemic DC activation modulates the tumor microenvironment and shapes the long-lived tumor-specific memory mediated by CD8+ T cells" IMS-JSI International Symposium on Immunology 2016 (2016/6/17 Pacifico Yokohama, Kanagawa)
  6. **藤井眞一郎**. 「生体内樹状細胞を標的とした新規がんワクチン『人工アジュバントベクター細胞』の開発」第5回皮膚科・免疫学合同リサーチセミナー名古屋市立大学医学部 (2016/5/23 名古屋市立大学、愛知県名古屋市)
  7. **藤井眞一郎**. 「癌に立ち向かう免疫の仕組み」健康学習セミナー (2016/4/17 神奈川県民ホール、神奈川県横浜市)
  8. **藤井眞一郎**. 「革新的がん治療の展開～免疫細胞治療～」バイオ関連技術の共同研究に関わる説明会 (2015/11/26 三菱東京UFJ銀行JPタワー、東京都千代田区) [invited]
  9. **藤井眞一郎**. 「がんに立ち向かう免疫へかじ取りをする新しい薬を創る」理研百年へ科学の力 理化学研究所科学講演会 (2015/11/15 東京丸ビルホール、東京都千代田区) [invited]
  10. **藤井眞一郎**. 「多能性免疫を誘導するがん細胞ワクチン製剤「人工アジュバントベクター細胞」の開発」免疫細胞治療学講座セミナー 三重大学 (2015/10/28 三重大学、三重県津市) [invited]
  11. **Fujii S.** "Development of Novel Type of Cancer Vaccine "aAVC" in RIKEN Drug Discovery and Medical Technology Platforms" The 74th Annual Meeting of The Japanese Cancer Association (2015/10/10 Nagoya Congress Center, Nagoya, Aichi) [invited]
  12. **藤井眞一郎**. 「悪性リンパ腫に伴うNK細胞依存性骨髄由来抑制細胞サブセットの同定と免疫制御機構」第7回血液疾患免疫療法研究会学術集会 (2015/9/26 東京大学伊藤国際学術研究センター伊藤謝恩ホール、東京都文京区)
  13. **藤井眞一郎**. 「新たな多機能性がんワクチン製剤「人工アジュバントベクター細胞」の開発」京都大学 DSK プロジェクトセミナー (2015/7/15 京都大学、京都府京都市) [invited]
  14. **藤井眞一郎**. 「樹状細胞研究の軌跡」の開発」和歌山県立医科大学 血液内科講演会 (2015/7/3 和歌山県立医科大学、和歌山県和歌山市) [invited]
  15. **Fujii S.** "Strong antitumor response and immunological memory elicited by NKT cell-licensed, tumor antigen captured DCs in situ as a new type of cancer vaccine" Cell Symposia: Cancer and Inflammation and Immunity (2015/6/15 Hotel Melia Sitges, Sitges, Spain) (poster)
  16. **Shimizu K.** "KLRG1+iNKT are long-lived effectors" The 43rd Annual Meeting of Japanese Society of Immunology (2014/12/10 Kyoto International Conference Center, Kyoto, Kyoto) [oral presentation]
  17. **藤井眞一郎**. 新規がんワクチン製剤「人工アジュバントベクター細胞」の開発. 第2回細胞加工・細胞治療研究会 (2014/12/6 東京大学、東京都文京区) [invited]
  18. **Fujii S.** Immunological memory and antitumor immunity elicited by artificial adjuvant vector cells for cancer immunotherapy. The 43rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (JSI) (2014/12/10-12 Kyoto International Conference Center, Kyoto, Kyoto) [invited]
  19. **Fujii S.** The functional analyses of induced pluripotent stem cell (iPSCs)-derived human invariant NKT cells. The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (2014/10/31-11/2 Osaka International Convention Center, Osaka, Osaka)
  20. **藤井眞一郎**. NKT細胞による生体内樹状細胞活性化を利用した新規がんワクチ

ン「人工アジュバントベクター細胞」の  
開発. 第6回血液疾患免疫療法研究会学  
術集会(2014/9/6 京都大学医学部 芝  
蘭会館、京都府京都市)

〔図書〕(計 8件)

1. **藤井 眞一郎**、「自然免疫と獲得免疫療法  
を誘導する画期的ながん免疫療法の開  
発」臨床免疫・アレルギー科  
2017,67(3):316 (査読無)
2. **藤井 眞一郎**、「樹状細胞の生物学的特長  
と樹状細胞標的療法の進歩」がんと免疫  
(南山堂)2016, 76-80. (査読無)
3. **藤井 眞一郎**、「多機能性がんワクチン細胞  
製剤「人工アジュバントベクター細胞」  
実験医学 2016, 34(12):2048-2051.  
(査読無)
4. **藤井 眞一郎**、「樹状細胞の種類と作用」  
分子リウマチ治療 2016. 9(4) (査読  
無)
5. **藤井 眞一郎**「多機能性がんワクチン細  
胞製剤「人工アジュバントベクター細  
胞」 実験医学 2016,  
34(12):2048-2051. (査読無)
6. **Fujii S**, Shinga J, Yamsaki S, Sato Y,  
Asakura M, Shimizu K. In vivo  
targeting of dendritic cells with  
artificial adjuvant vector cells (aAVC)  
as a novel cancer immunotherapy. In  
Seya T, Udaka K, Matsumoto M, and  
Sato N (eds), Inflammation and  
Immunity in Cancer Springer Japan  
KK, Tokyo 2015, p159-164 (査読有)
7. **藤井 眞一郎**、清水 佳奈子「自然免疫  
と獲得免疫の両方を活性化する新規が  
ん細胞療法 人工アジュバントベクタ  
ー細胞の開発」細胞 2014,46(9):22-26.  
(査読無)
8. **藤井 眞一郎**、「多発性骨髄腫に向け  
た人工アジュバントベクター細胞免疫

治療の開発」血液フロンティア  
2014,24(11):71-78. (査読無)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
藤井 眞一郎 (FUJII Shin-ichiro)  
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・チームリーダー  
研究者番号:10392094

(2)研究分担者  
清水 佳奈子 (SHIMIZU Kanako)  
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・上級研究員  
研究者番号: 20391980

(3)連携研究者  
( )

研究者番号:

(4)研究協力者  
( )