

「生体防御のメカニズム」  
平成 8 年度採択研究代表者

谷口 克

(千葉大学大学院医学研究科 教授)

## 「自己免疫制御の分子基盤」

### 1. 研究実施の概要

これまでの研究で、免疫制御を専門とする新しい免疫細胞系列としてV $\alpha$ 14NKT細胞を同定し、その受容体構造とリガンド、分化機構、機能発現のメカニズムを明らかにした。その結果、1) V $\alpha$ 14NKT細胞受容体リガンドが $\alpha$ -GalCer糖脂質であること。2) V $\alpha$ 14NKT細胞受容体はNKT細胞だけに発現する受容体であること。3) V $\alpha$ 14NKT細胞前駆細胞を発見し、前駆細胞上のGM-CSF受容体からのシグナルによって、遺伝子再構成を起し、V $\alpha$ 14受容体を発現し、成熟型に分化することを見いだした。4) 流産、IgE抗体産生の抑制、自己免疫病発症阻止、がん転移阻止、移植拒絶抑制、エンドトキシンショックに必須の細胞であることを発見した。

### 2. 研究実施内容

#### (1) V $\alpha$ 14受容体構造研究グループ

可溶性V $\alpha$ 14受容体 $\alpha$ -GalCer可溶性CD1d分子の結晶化とその解析  
結晶化構造を知るために膜貫通領域および細胞質内領域を親水性ペプチドで置換した可溶性V $\alpha$ 14V/ $\beta$ 8 2受容体を大量に作出した。さらにCD1分子と $\alpha$ -GalCerリガンドとV $\alpha$ 14受容体とを結合した結晶化構造を知るために可溶性CD1分子の膜貫通領域および細胞質内領域を親水性ペプチドで置換した遺伝子を昆虫細胞に発現させて作出することができた。これら可溶性V $\alpha$ 14受容体 $\alpha$ -GalCer可溶性CD1d分子3分子を結晶化させその結晶構造を解析する。

#### [ V $\alpha$ 14, V $\beta$ 8 2 ] の結晶化

NKT-TCR[ V $\alpha$ 14, V $\beta$ 8 2 ]leucin-zipperを10mg ~ 20mg精製後、thrombin処理を行い、M2抗体によるzipper部分の除去後、ゲル濾過を行い、最終標品とし、結晶解析に供与した。

アメリカのグループとのcollaborationを考えてタンパク質を送ったが、結晶化は不成功であった。現在前回の反省も踏まえ、培養細胞をHigh Fiveに変えてpost transcriptional modificationの変化も試している。

#### [ V $\alpha$ 14, V $\beta$ 8 2 ] タンパク質の調製と抗体作成

V $\alpha$ 14に対する抗体作成は、数ミリグラムのNKT-TCR[ V $\alpha$ 14, V $\beta$ 8 2 ]タンパ

ク質を免疫したが、V $\beta$ 8 2に対してのみ抗体ができV $\alpha$ 14に対する抗体ができない。そこで現在、V $\alpha$ 14ホモダイマーを作成し、それを免疫し、引き続き抗体作成を試みる事とした。

(2) V $\alpha$ 14受容体遺伝子進化研究グループ

V $\alpha$ 14遺伝子の発現

V $\alpha$ 14遺伝子はマウスNKT細胞の唯一の受容体であり、RAG-KOマウスに遺伝子導入しても、T細胞を作ることができないことから、V $\alpha$ 14遺伝子の発現には何らかの条件が必要であると考えられた。そこでV $\alpha$ 14遺伝子の17番にはドメインを構成する以外のシステインがあり、それは他のT細胞抗原受容体には存在しないことから、V $\alpha$ 14固有の変異でありそれがNKT細胞のV $\alpha$ 14遺伝子の発現さらに分化、活性化、進化にとって重要である可能性が考えられた。そこで、HisタグをN末端に結合したV $\alpha$ 14遺伝子およびシステインをアラニンに置換した変異遺伝子をウイルスベクターに組み込みT細胞に感染させ、発現を調べたところいずれでもT細胞には発現できなかった。これらの実験から結論を導きだすことはできないため、実験の継続の必要性を認めた。

(3) NKT細胞機能研究グループ

サルコイドーシス

NKT細胞はTh1/Th2サイトカイン両方を産生するが、どのような時にどのようなシグナルがTh1/Th2シフトに関係するか、 $\alpha$ -GalCerを用いて、単一細胞レベルで調べた。とくにサルコイドーシス患者の中で、改善群ではNKT細胞からのIFN $\gamma$ の産生が良好であるのに対して、悪化群はIFN $\gamma$ の産生が殆どない事が判明し、引き続きその検証を行っている。

エンドトキシンショック

LPSによる細菌性ショックはNK細胞あるいはCD4T細胞による肝臓障害が原因であるともいわれていたが、NKT細胞がその本体であることをNKT細胞欠損マウスをもちいて証明した。さらに、LPSは最初マクロファージに働きIL-12を産生させ、それがNKT細胞を活性化するとTLR-4受容体を発現しLPS刺激を直接受けるようになり、IFN $\gamma$ を大量に産生し、再びマクロファージを活性化して、TNF $\alpha$ を産生させて、肝傷害を引き起こす事が判明した。これらの結果から、シュワルツマン反応の責任細胞がNKT細胞である事も判明した。

臓器移植の寛容維持機構

免疫寛容維持機構はこれまで不明であったが、NKT細胞が存在しないNKT細胞欠損マウスでは肝臓へのラットあるいは同種マウス膵臓移植は不成功で、NKT細胞の移入によって寛容が回復することから、NKT細胞が必須の細胞であることが証明された。これはきわめて重要な発見である。

#### (4) NKT細胞初期分化研究グループ

##### 前駆細胞から成熟型への分化

GM-CSFRがNKT前駆細胞の分化誘導に際し、V $\alpha$ 14受容体遺伝子の再構成を誘導するサイトカインであることを明らかにしたので、この細胞の分化誘導に必要なシグナルを捜す。すなわち、サブトラクション法、デフェレンシャルディスプレイ法を用いて候補遺伝子を検索した結果、5つの分化特異的遺伝子を単離することに成功した。

##### GFP遺伝子ノックインマウスを用いたNKT細胞分化の研究

リンパ球前駆細胞だけが発現するRAG遺伝子の代わりに蛍光色素遺伝子をその下流に結合した遺伝子を遺伝子相同組み替え法でマウスES細胞に導入しマウス個体を作る事に成功した。リンパ球前駆細胞だけが蛍光を発しFACS装置により簡単にリンパ球前駆細胞だけを集めることが可能となった。このマウスを用いて、胸腺外組織であるパイエル板ですでに受容体を発現している成熟型T細胞が再び遺伝子再構成を起し、受容体レパトリーを変換している事が確認された。この発見はT細胞では初めてのことである。

#### 3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Nishimura, T., Kitamura, H., Iwakabe, K., Yahata, T., Ohta, A., Sato, M., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., Kawano, T., Taniguchi, M., Nakui, M., Sekimoto, M., and Koda, T. The interface between innate and acquired immunity : glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* 12 : 987-994,2000.

Kimura, M., Yamashita, M., Kubo, M., Iwashima, M., Shimizu, C., Tokoyoda, K., Chiba, J., Taniguchi, M., Katsumata, M., and Nakayama, T., Impaired Ca/calcineurin pathway in in vivo anergized CD4 T cells. *Int. Immunol.* 12 : 817-824,2000.

Ishikawa, H., Hisaeda, H., Taniguchi, M., Nakayama, T., Sakai, T., Maekawa, Y., Nakano, Y., Zhang, M., Zhang, T., Nishitani, M., Takashima, M., and Himeno, K. CD4+ V $\alpha$ 14NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*. *Int. Immunol.* 12 : 1267-1274,2000.

Honma, N., Koseki, H., Akasaka, T., Nakayama, T., Taniguchi, M., Serizawa, I., Akahori, H., Osawa, M., and Mikayama, T. Deficiency of the macrophage migration inhibitory factor gene has no significant effect on endotoxaemia. *Immunology* 100 : 84-90,2000.

Maki, T., Yasunami, Y., Ikehara, Y., Kodama, S., Nakano, M., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Ikeda S. Prolongation of rat islet xenograft survival in the liver of INF- $\gamma$ -deficient mice. *J. Surg. Res.* 93 : 101-107,2000.

Assarsson, E., Kambayashi, T., Sandberg, J. K., Hong, S., Taniguchi, M., Van Kaer, L., Ljunggren, H-G., and Chambers, B. J. CD8<sup>+</sup> T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 165 : 3673-3679,2000.

Makowska, A., Kawano, T., Taniguchi, M., and Cardell, S. Differences in the ligand specificity between CD1d-restricted T cells with limited and diverse T-cell receptor repertoire. *Scand. J. Immunol.* 52 : 1-79,2000.

Kitamura, H., Ohta, A., Sekimoto, M., Sato, M., Iwakabe, K., Nakui, M., Yahata, T., Meng, H., Koda, T., Nishimura, S., Kawano, T., Taniguchi, M., and Nishimura, T.  $\alpha$ -galactosylceramide induces early B-cell activation through IL-4 production by NKT cells. *Cell. Immunol.* 199 : 37-42,2000.

Dieli, F., Taniguchi, M., Asherson, G. L., Sireci, G., di Sano, C., Cigna, D., and Salerno, A. Whole body irradiation induces IFN-gamma production in BALB/c mice by preventing the appearance of a V $\alpha$ 14<sup>+</sup> NKT downregulatory population. *Cytokine* 12 : 1307-1311,2000.

Smyth, M. J., Taniguchi, M., and Street, S. E. The anti-tumor activity of IL-12 : Mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J. Immunol.* 165 : 2665-2670,2000.

Andrews, K. J., Ribas, A., Butterfield, L. H., Vollmer, C. M., Eilber, F. C., Dissette, V. B., Nelson, S. D., Shintaku, P., Mekhoubad, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Glaspy, J. A., McBride, W. H., and Economou, J. S. Adenovirus-interleukin-12-mediated tumor regression in a murine hepatocellular carcinoma model is not dependent on CD1-restricted natural killer T cells. *Cancer Res.* 60 : 6457-6464,2000.

Dieli, Sireci, G., Russo, D., Taniguchi, M., Ivanyj, J., Fernandez, C., Troye-Blomberg, M, De Leo, G., and Salerno, A. Resistance of NKT-deficient mice to systemics Shwartzman reaction. *J. Exp. Med.* 192 : 1645-1652,2000.

Gonzalez-Asequinolaza, G., de Oliveira, C., Tomaska, M., Hong, S., Bruna-Romero, O., Nakayama, T., Taniguchi, M., Bendelac, A., Van Kaer, L., Koezuka, Y., and Tsuji, M.  $\alpha$ -Galactosylcerami-activated V $\alpha$ 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 8461-8466,2000.

Yamashita, M., Katsumata, M., Iwashima, M., Kimura, M., Shimizu, C., Kamata, T.,

Shin, T., Seki, N., Suzuki, S., Taniguchi, M., and Nakayama, T. T cell receptor-induced calcineurin activation regulates T helper type 2 cell development by modifying the interleukin 4 receptor signaling complex. *J. Exp. Med.* 191 : 1869-1879,2000.

Ikehara, Y., Yasunami, Y., Kodama, S., Maki, T., Nakano, M., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Ikeda, S. CD4+V $\alpha$ 14 natural killer T cells are essential for acceptance of rat islet xenografts in mice. *J. Clin. Invest.* 105 : 1761-1767,2000.

Matsuda, J. L. Naidenko, O. V., Gapin, L., Nakayama, T., Taniguchi, M., Wang, C.-R., Koezuka, Y., and Kronenberg, M. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J. Exp. Med.* 192 : 741-75,2000.

Smyth, M. J., Thia, K. Y. T., Street, S. E. A., Cretney, E., Trapani, J. A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S. B., Crowe, N. Y., and Godfrey, D. I. Differential tumor surveillance by Natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. Med.* 191 : 661-668,2000.

Kaneko, Y., Harada, M., Kawano, T., Yamashita, M., Shibata, Y., Gejyo, F., Nakayama, T., and Taniguchi, M. Augmentation of V $\alpha$ 14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J. Exp. Med.* 191 : 105-114,2000.

Shi, F.-D., Wang, H.-B., Li, H., Hong, S., Taniguchi, M., Link, H., Van Kaer, L., and Ljunggren, H.-G. Natural killer cells determine the out-come of B cell-mediated autoimmunity. *Nature Immunol.* 1 : 245-251,2000.

Ito, K., Karasawa, M., Kawano, T., Akasaka, T., Koseki, H., Akutsu, Y., Kondo, E., Sekiya, S., Sekikawa, K., Harada, M., Yamashita, M., Nakayama, T., and Taniguchi, M. Involvement of decidual V $\alpha$ 14 NKT cells in abortion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 740-744,2000.