

「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

本研究は、免疫制御を専門とする新しい免疫細胞系列として同定したV α 14NKT細胞の受容体構造とそのリガンド、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 α 14NKT細胞受容体リガンドが糖脂質である α -GalCerであること。2) V α 14NKT細胞受容体はNKT細胞だけに発現する受容体でNKT細胞の分化に必須であること。3) GMCSF受容体からのシグナルによって、遺伝子再構成を起し、V α 14受容体を発現するV α 14NKT細胞前駆細胞を発見した。4) 流産、IgE抗体産生の抑制、自己免疫病発症阻止、がん転移阻止する機能があることを発見した。

今後最も重要かつ成果の期待できる研究を述べる。

1) V α 14NKT細胞抗原受容体の結晶構造解析

V α 14NKT細胞抗原受容体はNKT細胞が持っている唯一の抗原受容体であり、NKT細胞の機能を決定する重要な分子であることから、その構造を知る事は極めて重要である。

そこで既に、われわれは構造解析に必要な2つの可溶性分子を作ることに成功した。

イ) 可溶性V α 14受容体の作出

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 α 14/V β 8.2受容体を昆虫細胞において大量に作出することに成功した。

ロ) 可溶性CD1d分子の作出

CD1分子と α -GalCerリガンドとV α 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した。

これらの物質を用いて現在結晶化の予備実験段階に入っている。

2) GFP遺伝子ノックインマウスを用いたNKT細胞分化の研究

通常分化の研究にはリンパ球前駆細胞を必要とするが、その数は極めて少ない。

そこでこの問題を解決するために、リンパ球前駆細胞だけが発現するRAG遺伝子の代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と、リンパ球前駆細胞だけが蛍光を発することになりFACS装置により簡単に前駆細胞だけを集めることができ、免疫系分化の研究を可能にする。

イ) GFP遺伝子をRAG遺伝子部位にバックインするためのコンストラクトを作成し、この遺伝子をES細胞に導入置換し、キメラマウスを作成した。すでにホモ動物も得られている。キメラマウス、ホモマウスではGFP遺伝子の発現が見られた。とくに胸腺では皮質と髄質の境界領域で認められT細胞の分化している場所を同定できた。

これらのマウスを用いて次の研究のステップに進む。

それは蛍光で光る前駆細胞に今一度RAG遺伝子を導入し分化させることである。そのためにはレトロウイルスに遺伝子を組み込み前駆細胞に感染させ分化させる。そこですでに下記の遺伝子を持つベクターを作り実験系を確立した。

ロ) pMFG-hCD2, pMFG-rasVal12, pMFG-hCD2RAG1WT, pMFG-hCD2-RAG1 mutants, pMSCV-hCD2-V α 14WTの構築は終了し、レトロウイルスをベクターとしてこれら遺伝子を導入する実験系はできた。

3) NKT 細胞特異的遺伝子の検索

サブトラクション法を用いてNKT細胞に特異的に発現している遺伝子を単離する。すでに30個のNKT細胞に特異的な新しい遺伝子の単離に成功している。これらはNKT細胞研究の新しい展開を予感させる。

2. 研究実施内容

(1) V α 14受容体構造研究グループ

イ) V α 14NKT細胞抗原受容体リガンドが α -ガラクトシルセラミド(α -GalCer)であることを証明し、構造的な特徴であるスフィンゴ脂肪の3位のOH基がCD1d分子 α 2ヘリックスの153Aspへの結合および糖鎖2位のOH基179Argあるいは180Aspとの結合に重要であることが、CD1d分子変異体作成実験およびコンピュータグラフィックスからも確められた。

ロ) 可溶性V α 14受容体の作出

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 α 14/V β 8.2受容体を昆虫細胞に発現させて大量に作出した。

ハ) 可溶性CD1d分子の作出

CD1分子と α -GalCerリガンドとV α 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した。

二) 抗原認識に係る構造を調べるため、 α -GalCer糖脂質によって2週間、抗原刺激を受けた $V\alpha 14$ NKT細胞のベーター鎖遺伝子塩基配列を調べたところ、CDR3領域の長さに関係なく、95番は必ずセリン残基でそのあとに荷電を帯びたアミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸の順に配列されることが特徴であったが、その他のアミノ酸配列には特徴は見られなかった。

(2) $V\alpha 14$ 受容体遺伝子進化研究グループ

イ) $V\alpha 14$ 受容体塩基配列

哺乳類21純系マウス、野生マウス(M.m.mus, M.m.dom., M. m. mol., M.spretoides, M. spicilegus, M. m. cas., M. caroli., M. spretus, M.leggada, M. platythrix, Apodemus) ラット、ハムスター、ヒトなどにおける $V\alpha 14$ 受容体遺伝子の塩基配列を決定し、変異部位を特定するとともにfamily treeを書き、祖先 $V\alpha 14$ 受容体の配列を調べた。その結果、ApodemusとMusの間およびRattusとHamsterとの間で $V\alpha 14$ 受容体がダーウィンの選択仮説に当てはまる分子進化を遂げていることを証明した。

(3) NKT細胞機能研究グループ

活性化

イ) NKT細胞のリガンドである α -GalCer糖脂質はDCに取り込まれるとエンドソームに運ばれ、CD1d分子と会合し、細胞膜に表出される。それを $V\alpha 14$ NKT細胞受容体によって認識し、活性化する。その様式は通常のT細胞活性化機序とほぼ同じくCD40・CD40L, CD28・B7などの補助受容体相互作用を必要とした。 α -GalCer糖脂質によって活性化された $V\alpha 14$ NKT細胞はTh1とTh2サイトカインを分泌し免疫系を制御するとともに、Fasリガンドやパーフォリン/グランザイムBを放出し標的細胞をアポトーシスに導く。

ロ) ヒト $V\alpha 24$ NKT細胞もマウス $V\alpha 14$ NKT細胞と同様、 α -GalCer糖脂質によって特異的に活性化されることが判明した。これによりヒトへの臨床応用の可能性がでてきた。ヒトでは臍帯血中に $V\alpha 24$ NKT細胞が多く存在し、成人末梢血よりも数倍多い。

がん

イ) 極めて強力な抗腫瘍活性を出し、ほぼ完全に肝臓や肺臓へのがんの転移を抑制した。この抗腫瘍活性はNK様の非特異的細胞傷害によって誘導されるため、種々のリンフォーマ、肺癌(扁平上皮がん、小細胞がん、腺がん、大細胞がんなど組織系を問わず)、メラノーマなど多くのがんに対して傷害効果を認めた。

ロ) 樹上細胞にリガンドをパルスし、担がん動物に投与すると、すでに成長したがん塊(直径0.5-1mm)にも効果を発揮し、治療法開発への期待ができた。

ハ) ヒトV α 24NKT細胞が α -GalCerをパルスしたマウスのDCと反応した。さらに、マウスV α 14NKT細胞は α -GalCerをパルスしたヒトDCと反応した。この結果、治療前のがん患者のDC機能およびV α 24NKT細胞機能を調べる事ができる実験システムを確立することができた。

流産

イ) 胎盤にはV β 7を持つV α 14NKT細胞が選択的に存在し、胎生初期から妊娠末期まで特徴的に増え続ける。

ロ) このNKT細胞をリガンドで刺激すると流産をほぼ100%惹起することを発見した。

二) 流産はNKT細胞がectoplacental coneを傷害するためであることが判明した。この傷害にはパーフォリンとインターフェロンガンマ、TNFアルファが必須であった。

アレルギー制御

イ) 活性化されたNKT細胞はインターフェロンガンマを分泌して、IgE抗体産生を抑制すること、それは活性化NKT細胞がTh2細胞の分化を抑制することによるものであることを証明した。

自己免疫病制御

イ) SLEをはじめとする患者において特異的にV α 24NKT細胞数が減少することを見いだした。自己免疫マウスで、自己免疫発症とNKT細胞減少との因果関係が認められているのでヒトでも多いに可能性がある。

ロ) ヒト自己免疫性肝炎モデルといわれているコンカナバリンA肝炎はNKT細胞によって引き起こされることを証明した。これまでCD4T細胞が定説であったがそれを覆した。

二) コンカナバリンA肝炎を惹起する分子はNKT細胞から分泌されるIL-4分子がキーの分子でオートクリン的にNKT細胞に働き、FasLおよびグランザイムBなどの細胞傷害分子を増強させ肝臓細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにした。

(4) NKT細胞初期分化研究グループ

NKT細胞前駆細胞の同定

イ) CD3 ϵ -V β 8TCR⁺ NKT細胞前駆細胞を同定した。NKT細胞前駆細胞はGM-CSF受容体を細胞表面に持つことを発見したが、これはNK細胞やT細胞と区別する重要なマーカーとなった。

ロ) この前駆細胞から成熟型NKT細胞へ分化させる最終段階にはGM-CSF受容体からのシグナルによってアルファ鎖遺伝子再構成が起こる事を証明した。これまでリンパ球受容体遺伝子再構成の引きがねがどのようなものか不明で

あったが、この研究によって初めて、GM-CSF受容体からのシグナルが必須の経路である事が判明した。

GFP遺伝子ノックインマウス

イ) GFP遺伝子をRAG遺伝子部位にバックインするためのコンストラクトを作成した。この遺伝子をES細胞に導入置換し、キメラマウスを作成した。すでにホモ動物も得られている。キメラマウス、ホモマウスではGFP遺伝子の発現が見られた。とくに胸腺では皮質と髄質の境界領域で認められT細胞の分化している場所を同定できた。

ロ) pMFG-hCD2, pMFG-rasVal12, pMFG-hCD2RAG1WT, pMFG-hCD2-RAG1 mutants, pMSCV-hCD2- V α 14WTの構築を終了し、レトロウイルスをベクターとしてこれら遺伝子を導入して、NKT細胞初期分化システムを作成する。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Sato, H., Nakayama, T., Tanaka, Y., Yamashita, M., Shibata, Y., Kondo, E., Saito, Y., and Taniguchi, M. Induction of differentiation of pre-NKT cells to mature V α 14NKT cells by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 7439-7444, 1999.
- Apostolou, I., Takahama, Y., Belmant, C., Kawano, T., Huerre, M., Marchal, G., Cui, J., Taniguchi, M., Nakuchi, H., Fournie, J.-J., Kourilsky, P., and Gachelin, G. Murine natural killer cells contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5141-5146, 1999.
- Keino, H., Matsumoto, I., Okada, S., Kurokawa, M., Kato, T., Tokuhisa, T., Usui, M., Taniguchi, M., Nishioka, K., and Sumida, T. A single cell analysis of TCRA V24AJ18⁺ DN T cells. *Microbiol. Immunol.* 43:577-584, 1999.
- Eberl, G., Lees, R., Smiley, S. T., Taniguchi, M., Grusby, M. J., and MacDonald, H. R. Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NKT cells. *J. Immunol.* 162: 6410-6419, 1999.
- Kawano, T., Tanaka, Y., Shimizu, E., Kaneko, Y., Kamata, N., Sato, H., Osada, H., Sekiya, S., Nakayama, T., and Taniguchi, M. A novel recognition motif of human NKT antigen receptor for a glycolipid ligand. *Int. Immunol.* 11: 881-887, 1999.
- Kitamura, H., Iwakabe, K., Yahata, T., Nishimura, S., Ohta, A., Ohmi, Y., Sato, M., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., Kawano, T., Taniguchi, M., and Nishimura, T. The natural killer T (NKT) cell ligand α -galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J. Exp. Med.* 189: 1121-1127, 1999.

- Toura, I., Kawano, T., Akutsu, Y., Nakayama, T., Ochiai, T., and Taniguchi, M. Inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with α -galactosylceramide. *J. Immunol.*, 163: 2387-2391, 1999.
- Kawano, T., Nakayama, T., Kamada, N., Kaneko, Y., Harada, M., Ogura, Y., Akutsu, Y., Motohashi, S., Endo, H., Fujisawa, T., Shinkai, H., and Taniguchi, M. Anti-tumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V α 24NKT cells. *Cancer Res.*, 59: 5102-5105, 1999.
- Cui, J., Watanabe, N., Kawano, T., Yamashita, M., Kamata, T., Shimizu, C., Kimura, M., Shimizu, E., Koike, J., Koseki, H., Tanaka, Y., Taniguchi, M., and Nakayama, T. Inhibition of Th2 cell differentiation and IgE response by ligand-activated V α 14NKT cells. *J. Exp. Med.*, 190: 783-792, 1999.
- Shirakata, Y., Ishii, K., Yagita, H., Okumura, K., Taniguchi, M., and Takemori, T. Distinct subcellular localization and substrate specificity of extracellular signal-regulated kinase in B cells upon stimulation with IgM and CD40. *J. Immunol.*, 163: 6589-6597, 1999.
- Zeng, D., Gazit, G., Dejbakhsh-Jones, S., Balk, S. P., Snapper, S., Taniguchi, M., and Strober, S. Heterogeneity of NK1.1⁺ T cells in the bone marrow: Divergence from the thymus. *J. Immunol.* 163: 5338-5345, 1999.
- Shimamura, M., Huang, Y.-Y., Suda, Y., Kusumoto, S., Sato, K., Grusby, M. J., Sato, H., Nakayama, T., and Taniguchi, M. Positive selection of NKT cells by CD1⁺, CD11c⁺ non-lymphoid cells residing in the extrathymic organs. *Eur. J. Immunol.*, 29: 3962-3970, 1999.