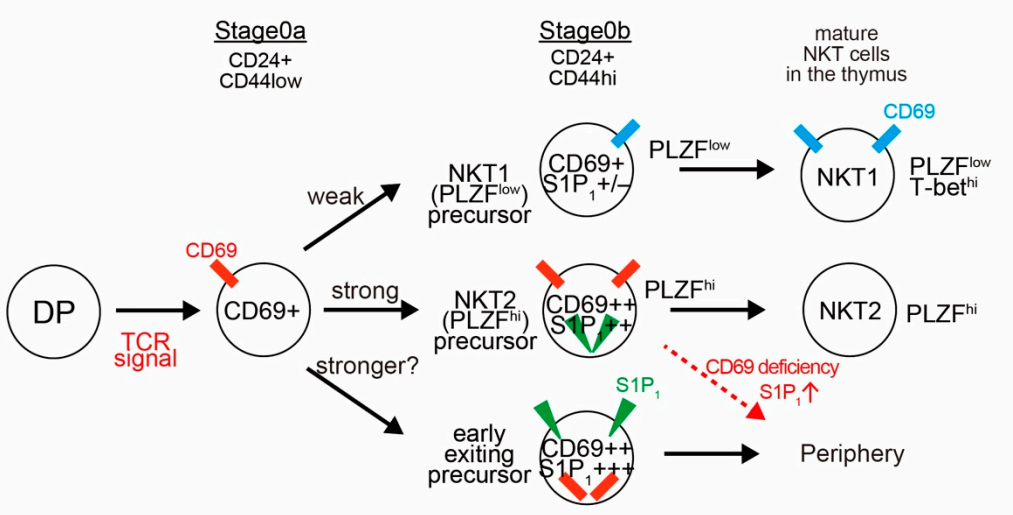
34　NKT細胞サブセットの運命決定機構	木村　元子

【目的】Natural Killer T（NKT）細胞は、CD1d 分子上に提示された「糖脂質」を認識する多様性の乏しいインバリアント T 細胞抗原受容体（TCR）（Vα14Jα18/Vβ8,7,2）を有する細胞集団である。抗原認識により迅速にサイトカイン産生などの様々なエフェクター機能を発揮することで、感染症や腫瘍形成に対して防御的に働く一方で、自己免疫疾患やアレルギー・生活習慣病などの免疫関連疾患に対しては、対象疾患により防御的な反応もしくは有害な反応を示すことが知られている。最近の研究により、NKT 細胞は、IFNγを産生する NKT1 細胞、IL-4 を産生する NKT2 細胞、IL-17 を産生する NKT17 細胞の 3 つの異なるサブセットが存在することが明らかとなった。そして興味深いことに、これらのエフェクター機能を有する各 NKT 細胞サブセット（*i.e.* NKT1, NKT2, NKT17 細胞）への分化運命決定は、胸腺内での分化過程で起こることがわかった。しかし、その分化のメカニズムの詳細は良くわかっていない。

【方法】CD69 分子は、胸腺内の分化の過程にある細胞に発現することが知られている。そこで胸腺内における各 NKT 細胞サブセットへの分化運命決定に、CD69 分子が関わっているかを調べる目的で、*CD69* 欠損マウスを用いて解析を行った。また CD69 は $S1P_1$ の発現を抑制し、胸腺細胞の胸腺外への移出を防ぐ働きをする。そこで、$S1P_1$ アゴニストである FTY720 を *CD69* 欠損マウスに投与し、$S1P_1$ の発現を抑制することによる NKT 細胞サブセット分化への影響について解析した。

【結果】*CD69* 欠損マウスでは、胸腺内 NKT2 細胞の分化が顕著に低下することがわかった。一方で、NKT1 細胞の分化、NKT17 細胞の分化に違いは見られなかった。また *CD69* 欠損による NKT2 細胞の分化低下は、$CD24^+$NKT2 前駆細胞が $S1P_1$ を発現することにより、早期に胸腺外に排出されてしまうことが原因であることが判明した。つまり、$CD24^+$NKT2 前駆細胞は、CD69 を発現することで $S1P_1$ の発現を抑制し胸腺内に留まることが、NKT2 細胞の分化完遂に重要であると考えられる。さらに、NKT2 細胞は胸腺内にて強い TCR シグナルを受け取っていることが判明した。すなわち、強い TCR シグナルを受けた細胞は、CD69 を高発現する NKT2 前駆細胞へと分化し、$PLZF^{hi}$ の NKT2 細胞へと分化する。一方、弱い TCR シグナルを受けた細胞は、CD69 非依存的に NKT1 細胞へと分化を遂げることが示唆された。この結果は、NKT 細胞の各サブセットへの運命決定は、正の選択を受ける際の TCR のシグナルの強弱、もしくは長短によってなされ、従来考えられていたよりも早い段階で、運命決定がされることを示唆するものである。また、CD69 が、成熟分化過程にある細胞の胸腺内での滞在時間を制御することで、その分化成熟に寄与することを初めて示したものであり、科学的な意義は大きいと考える。

NKT 細胞の胸腺内分化運命決定機構



34. NKT 細胞サブセットの運命決定機構

木村　元子

*千葉大学 大学院医学研究院 未来医療推進治療学

Key words：NKT2 細胞，胸腺，CD69，$S1P_1$，前駆細胞

緒　言

Natural Killer T（NKT）細胞は、 CD1d 分子上に提示された「糖脂質」を認識する多様性の乏しいインバリアント T 細胞抗原受容体（TCR）（Vα14Jα18/Vβ8,7,2）を有する細胞集団である。抗原認識により迅速にサイトカイン産生などの様々なエフェクター機能を発揮することで、感染症や腫瘍形成に対して防御的に働く一方で、自己免疫疾患やアレルギー・生活習慣病などの免疫関連疾患に対しては、対象疾患により防御的な反応もしくは有害な反応を示すことが知られている［1〜3］。このように様々な免疫関連疾患に関わる細胞であることから、NKT 細胞は疾患の制御や新規治療への応用の標的として非常に重要である。最近の研究により、NKT 細胞は、IFNγを産生する NKT1 細胞、IL-4 を産生する NKT2 細胞、IL-17 を産生する NKT17 細胞の３つの異なるサブセットが存在することが明らかとなった［4］。この事実は、NKT 細胞が関与する多彩な免疫応答には、それぞれ異なった NKT 細胞サブセットが優位に関わる可能性を示唆するものである。では、そのような各 NKT 細胞サブセットは、どのように分化してくるのだろうか？ NKT 細胞は、胸腺において、コンベンショナルな CD4T 細胞、CD8T 細胞と同様に、$CD4^+CD8^+$ダブルポジティブ(DP)細胞から分化成熟することが知られている。そして最近の研究から、興味深いことに、NKT 細胞は、胸腺内での分化の過程で、エフェクター機能を有する各 NKT 細胞サブセット（*i.e.* NKT1、NKT2、NKT17 細胞）へと分化を遂げることがわかった。これは、ナイーブ T 細胞として末梢へと排出されるコンベンショナル CD4T 細胞、CD8T 細胞の分化過程と大きく異なるものである。しかし、その分化のメカニズムの詳細は良くわかっていない。

本研究では、胸腺における正の選択、負の選択の際に発現誘導されることが知られている CD69 という分子に着目し、NKT 細胞サブセットへの運命決定における CD69 分子の関与について解析を行った。その結果、未成熟 NKT2 前駆細胞に発現する CD69 は、これらの細胞が $S1P_1$ 依存的に胸腺外へ移出するのを抑制することで胸腺内に留め、NKT2 細胞への分化を完遂させる働きをすることが判明した。一方、NKT1 細胞、NKT17 細胞の分化は CD69 による制御は受けないことがわかった。この結果は、NKT 細胞の胸腺内分化運命決定は、これまで考えられていたよりも初期の段階で起こることを示すものである。また CD69 が、成熟分化過程にある細胞の胸腺内での滞在時間を制御することで、その分化成熟に寄与することを初めて報告したものであり、科学的な意義は大きいと考える［5］。

方法および結果

1. *CD69* 欠損マウスにおける NKT 細胞の分化

各 NKT 細胞サブセットへの分化に、CD69 分子が関わっているかを調べるために、*CD69* 欠損マウスを用いて解析を行った（図 1）。*CD69* 欠損マウスの胸腺では、NKT2 細胞の割合、絶対数共に顕著に減少し、NKT1 細胞の割合、絶対数は顕著に上昇することがわかった。NKT17 細胞の割合、絶対数には変化は見られなかった。一方、*CD69* 欠損マウスにおける NKT2 細胞の低下は、脾臓、肺などの末梢組織においても見られたが、NKT1 細胞の亢進は、末梢組織では見られなかった。NKT 細胞サブセットは、遺伝背景の異なるマウス間で大きく異なることが知られている。

*現在の所属：千葉大学 大学院医学研究院 国際アレルギー粘膜免疫学・免疫発生学

そこで次に C57BL/6 バックグラウンドの *CD69* 欠損マウスを解析したところ、NKT2 細胞の顕著な低下は見られたが、NKT1 細胞数に変化は見られなかった。以上の結果から、*CD69* 欠損マウスで見られる NKT 細胞サブセット分化障害は、NKT2 細胞の胸腺内分化異常に起因すると考えられた。BALB/c マウスの胸腺でみられた NKT1 細胞数の上昇は、NKT2 細胞数が減少したことによる二次的な影響と考えられる。

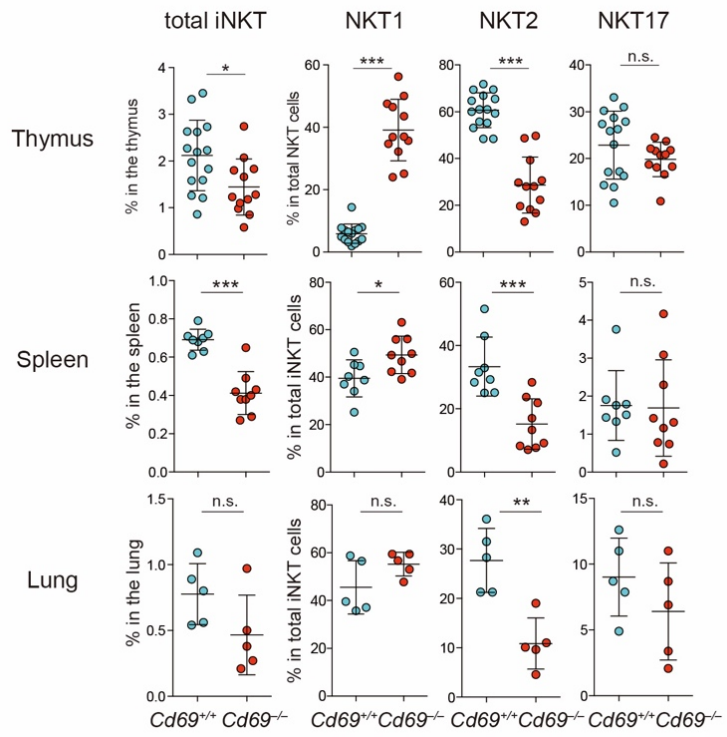


図 1. *CD69* 欠損マウスにおける各 NKT 細胞サブセットの割合

CD69 野生型 BALB/c、並びに *CD69* 欠損 BALB/c マウスの胸腺、脾臓、肺における NKT 細胞の割合（左）と、各 NKT 細胞の割合を示す。*CD69* 欠損マウスでは、いずれの臓器においても NKT2 細胞の割合が顕著に低かった［5］。

2. NKT2 前駆細胞の早期胸腺外移出

では、なぜ CD69 分子は NKT2 細胞の分化に必要なのだろうか。

胸腺細胞は細胞表面に $S1P_1$ を発現することで、胸腺外へと移動することが知られている。一方 CD69 分子は $S1P_1$ と直接会合することで、$S1P_1$ の細胞外発現を抑制し、胸腺細胞の胸腺外への移動を抑制する。つまり、*CD69* の欠損は $S1P_1$ の細胞表面への発現をもたらすことで、細胞の胸腺外への移動を促す可能性が考えられた。しかし成熟 NKT2 細胞には CD69 の発現が無いことから（Data not shown）、*CD69* 欠損によって、NKT2 細胞自身が早期に胸腺外へと排出されるとは考え難い。そこで私たちは、*CD69* を欠損することにより、NKT2 細胞の「前駆細胞」が特異的に細胞外に排出されているのではないかと考えた。この仮説を検証するために、はじめに $CD24^+$NKT 細胞（Stage0）が $S1P_1$ を発現し得るのかを調べることにした。$CD24^+$NKT 細胞（Stage0）と正の選択前の DP 細胞をソーティングにより調整し、*S1pr1*（$S1P_1$ をコードする）mRNA の発現を調べたところ、*S1pr1* mRNA の発現は DP 細胞では見られず、正の選択によって $CD24^+$NKT 細胞（Stage0）に誘導されることがわかった。しかし *CD69* を欠損した Stage0 細胞では、その発現量が著しく低いことがわかった（図 2a）。この結果は、*CD69* 欠損により $S1P_1$ を発現した $CD24^+$NKT 細胞（Stage0）が胸腺外へ排出されたことを示唆するものである。次に、早期に胸腺外に移動した $CD24^+$NKT 細胞の末梢組織（脾臓）における検出を試みた。正の選択から時間が間もない細胞を検出することが可能な RAG2-GFP マウスを利用したところ、脾臓には、RAG2-GFP を発現した $CD24^+CD44^{hi}$NKT 細胞が存在することがわかった（図 2b）。この結果は、未成熟 $CD24^+$NKT 細胞は胸腺外に移動したことを示すものである。

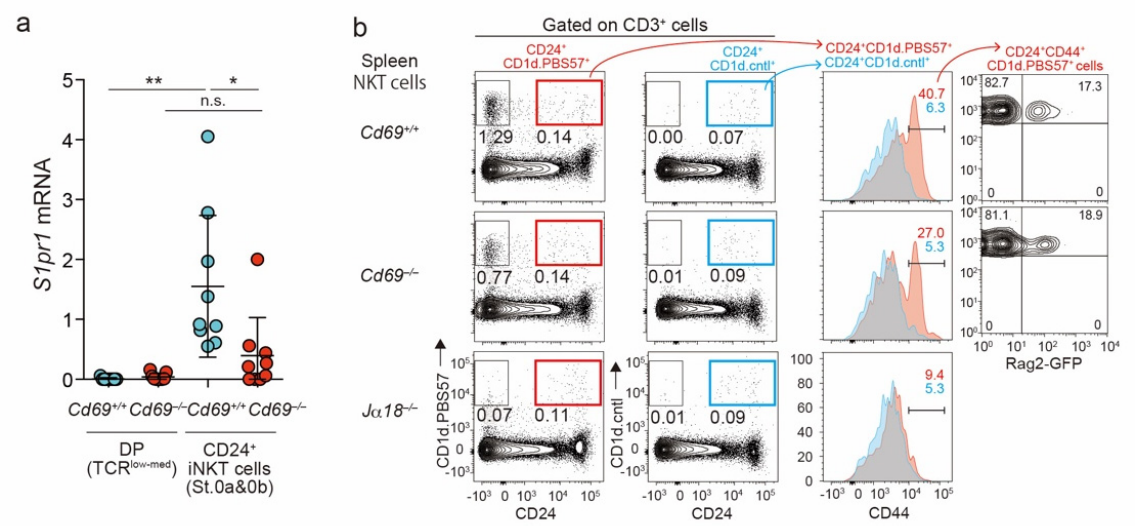


図 2. 未成熟 CD24^{+}NKT 細胞の胸腺外への移出

a）ソーティングにより精製した CD24^{+}（Stage 0）NKT 細胞の発現する *S1pr1* mRNA 量を定量的 RT-PCR 法により測定したところ、*CD69* 欠損細胞で顕著に低かった［5］。

b）脾臓における未成熟 CD24^{+}NKT 細胞をフローサイトメトリーを用いて検出した。未成熟 CD24^{+} NKT 細胞は CD44^{hi} の表現系を示し、一部の細胞は RAG2-GFP を発現していた［5］。

3. S1P$_1$ の発現抑制による *CD69* 欠損 NKT2 細胞分化の回復

つづいて、*CD69* 欠損による胸腺外への細胞排出を抑制することで、NKT2 細胞の分化障害が抑制されるか検討した。S1P$_1$ アゴニストである FTY720 は、S1P$_1$ に作用することで S1P$_1$ の内在化を誘導することが知られている。そこで、FTY720 を 5 日間連続投与し S1P$_1$ の細胞外発現を抑制することで、*CD69* 欠損マウスにおける NKT2 細胞の分化障害が回復するかを解析した（図 3）。その結果、FTY720 投与群では、NKT 細胞数の上昇が見られ、さらに *CD69* 欠損マウスにおける NKT2 細胞数の減少が回復することがわかった。以上の結果より、未成熟 CD24^{+}NKT 細胞上の *CD69* の発現は、これらの細胞を胸腺内に留めることで、成熟 NKT2 細胞への分化を誘導することがわかった。しかし、なぜ NKT2 細胞分化だけが、*CD69* 欠損の影響を受けるのかは不明であった。

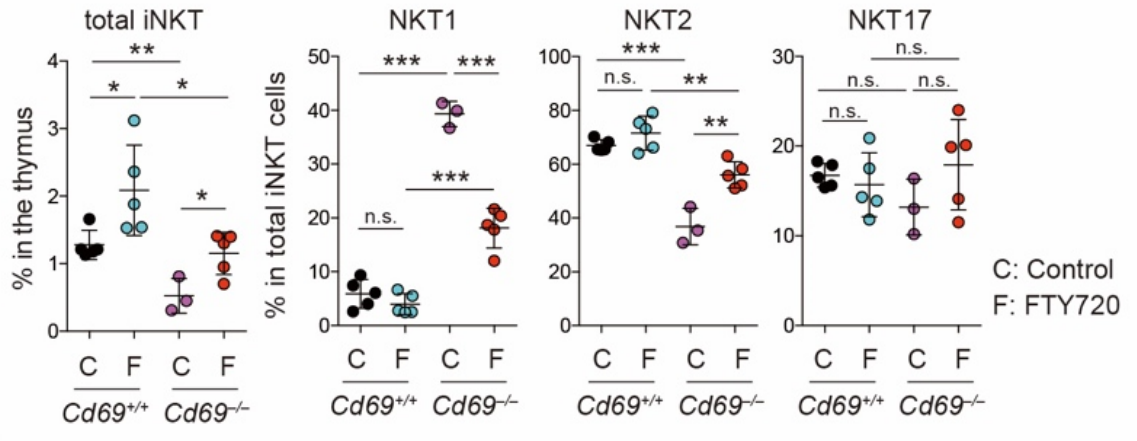


図 3. FTY720 投与による NKT2 細胞分化の影響

FTY720 を 5 日間投与後の、胸腺中の NKT 細胞の割合（左図）と、各種 NKT サブセットの割合（右図）をフローサイトメトリー解析した。FTY720 投与により、*CD69* 欠損マウスで見られた NKT2 細胞の割合の低下は回復した［5］。

4. 各 NKT 細胞サブセットの分化運命決定における TCR シグナルの関与

各細胞の発現する CD5 レベルは、その細胞が受け取っている TCR シグナルの強弱を示す指標であることが知られている。各種 NKT サブセットの CD5 発現量を調べたところ、NKT2 細胞は顕著に高いことがわかった。この結果は、「NKT2 細胞はその分化の過程において強い TCR シグナルを受け取っている」ことを示唆するものである。一方、NKT1 細胞、NKT17 細胞の発現する CD5 の発現は NKT2 細胞よりも低いことから、NKT2 細胞に比べて弱い TCR シグナルによって分化誘導されると考えられた（図 4)。以上の結果から、「各 NKT 細胞サブセットの運命決定は、胸腺内における正の選択の際に受け取る TCR シグナルの強さや長さの違いによるものである」可能性が示唆された。

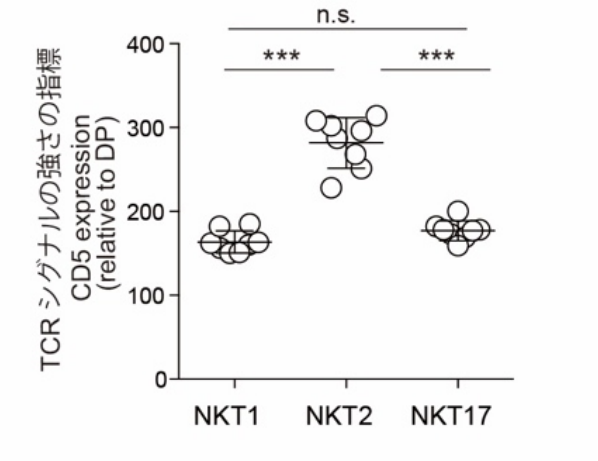


図 4. 各種 NKT サブセットにおける CD5 の発現

胸腺内に存在する各種 NKT サブセット上に発現する CD5 レベルをフローサイトメトリーにより解析した。NKT2 細胞は CD5 の発現が顕著に高いことがわかった［5］。

考　察

NKT 細胞は DP 細胞から分化することが知られている。DP 細胞は、CD1d 分子に提示された糖脂質抗原由来の TCR シグナルを受け取ることで、NKT 細胞への分化過程を開始する。当研究により、強い TCR シグナルを受けとった未熟 NKT 細胞は CD69 と $S1P_1$ を高く発現する NKT2 前駆細胞へと分化することが示唆された。一方、弱い TCR シグナルを受け取った未熟 NKT 細胞は NKT1 前駆細胞へと分化すると考えられる。*CD69* 欠損によって $S1P_1$ を細胞表面に発現した NKT2 前駆細胞は胸腺外へと早期に移動してしまうために、NKT2 細胞への分化が完遂できないことがわかった。しかし早期に胸腺外へ移動した NKT2 前駆細胞は、末梢組織においても NKT2 細胞へと分化できないことから（図 1)、NKT2 細胞の分化には、胸腺内にて、さらなる別の分化シグナルを受け取る必要があると考えられた。以上の結果をまとめた、NKT 細胞の胸腺内分化のモデルを図 5 に示す。これらの研究成果は、CD69 分子が、成熟分化過程にある細胞の胸腺内での滞在時間を制御することで、その分化成熟に寄与することを初めて報告したものであり、科学的な意義は大きい。

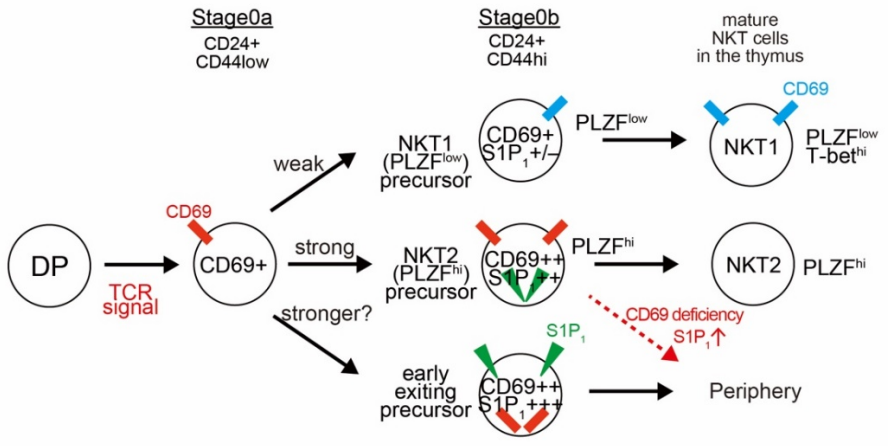


図 5. NKT 細胞の胸腺内分化運命決定機構

NKT 細胞は、胸腺内で共通の DP 細胞から分化する。糖脂質抗原由来の TCR シグナルを受け取ると $CD24^+$ NKT 細胞となる。この分化の際に、強い TCR シグナルを受けとった細胞は、CD69 と $S1P_1$ を高発現する NKT2 前駆細胞となり、胸腺内で $PLZF^{hi}$ の NKT2 細胞へ分化する。一方、弱い TCR シグナルを受けた細胞は $PLZF^{low}$ の NKT1 細胞へと分化する。*CD69* 欠損は、NKT2 前駆細胞上に S1P1 の発現を誘導し、これらの細胞を早期に胸腺外に排出するために、NKT2 細胞分化が完遂できない。さらに、野生型マウスにおいても、未成熟 $CD24^+$NKT 細胞のまま、早期に胸腺外に排出されるものが存在することが明らかとなった［5］。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、千葉大学大学院医学研究院免疫発生学研究室の中山俊憲教授、伊木明美さん、林崎浩史博士、三田恭義博士、並びに、米国国立衛生研究所癌研究所の Dr. Alfred Singer 博士、Miho Shinzawa 博士、Tejas Kadakia 博士である。

これらの研究成果は、上原記念生命科学財団の平成 29 年度研究助成金を用いて行ったものであり、Nature Communications、2018（DOI: 10.1038/s41467-018-06283-1）［5］に掲載された。貴財団の助成に対し、心より御礼申し上げます。

文　献

1) Taniguchi, M., Harada, M., Kojo, S., Nakayama, T., Wakao, H. The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response. Annu Rev Immunol 2003; 21:483-513. PMID: 12543936 DOI:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141057

2) Bendelac, A., Savage, P. B., Teyton, L. The biology of NKT cells. Annu Rev Immunol 2007; 25:297-336. PMID: 17150027 DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711

3) Godfrey, D. I., Stankovic, S., Baxter, A. G. Raising the NKT cell family. Nat Immunol 2010; 11:197-206. PMID:20139988 DOI: 10.1038/ni.1841

4) Lee, Y. J., Holzapfel, K. L., Zhu, J., Jameson, S. C., Hogquist, K. A. Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. Nat Immunol 2013; 14:1146-1154. PMID: 24097110 DOI:10.1038/ni.2731

5) Kimura, M.Y., Igi, A., Hayashizaki, K., Mita, Y., Shinzawa, M., Kadakia, T., Endo, Y., Ogawa, S., Yagi, R., Motohashi, S., Singer, A. and Nakayama, T.: CD69 prevents PLZFhi innate precursors from prematurely exiting the thymus and aborting NKT2 cell generation. Nat. Commun.2018; 9:3749. PMID: 30218105 DOI: 10.1038/s41467-018-06283-1