

NK1.1<sup>+</sup> T細胞の分化機構の解析

## 学位論文内容の要旨

NK1.1<sup>+</sup> T細胞は、T細胞抗原受容体 (TCR)とNK1.1分子を同時に発現するT細胞サブセットである。NK1.1<sup>+</sup> T細胞の大部分は限られたTCRを使用しており、その限定されたTCRによりMHCクラスI b分子のCD1, またはTL抗原を認識することが判明している。メインストリームT細胞が胸腺上皮細胞上のMHC+ペプチドによりpositive selectionされるのに対し、NK1.1<sup>+</sup> T細胞は、骨髄由来のCD1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>胸腺細胞によりpositive selectionされる。NK1.1<sup>+</sup> T細胞は抗原を認識後、早期に大量のIL-4, IFN- $\gamma$ を産生する。NK1.1<sup>+</sup> T細胞の抗原認識・機能については、次第に明らかになりつつあるが、NK1.1<sup>+</sup> T細胞への系列決定・分化機構については不明である。NK1.1<sup>+</sup> T細胞は、胸腺内においてメインストリームT細胞やNK細胞と共通の前駆細胞から分化すると予想されている。しかし、どの分化段階でNK1.1<sup>+</sup> T細胞への系列決定がなされ、分岐していくのかについては不明である。

本研究はNK1.1<sup>+</sup> T細胞の分化機構を明らかにする目的で、メインストリームT細胞分化の系で詳細な解析がすでに行われているZAP-70<sup>-/-</sup>マウスを用いた。ZAP-70は、T細胞, NK細胞などに発現され、TCRシグナル伝達において中心的な位置を占めるチロシンキナーゼである。ZAP-70<sup>-/-</sup>マウスでは、メインストリームT細胞分化はTCR<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (double positive; DP)ステージで停止しており、胸腺および末梢においても成熟T細胞は認められない。一方、NK細胞の分化、および機能は正常である。

はじめに、ZAP-70<sup>-/-</sup>マウスの胸腺細胞, 脾細胞をフローサイトメトリーで解析した。その結果、ZAP-70<sup>-/-</sup>マウスではNK1.1<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T細胞, NK1.1<sup>+</sup> TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T細胞が欠損しており、NK1.1<sup>+</sup> T細胞の分化にはZAP-70が必須であることが判明した。また、ZAP-70<sup>-/-</sup>マウスの胸腺では、正常マウスでは認められないNK1.1<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup>のポピュレーションが存在した。ZAP-70<sup>-/-</sup>マウスの脾臓においてもNK1.1<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup>のポピュレーションの増加がみられた。そこで、正常マウスでは認められないZAP-70<sup>-/-</sup>マウスの胸腺内NK1.1<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup>細胞について、さらに詳細な解析を行った。その結果、ZAP-70<sup>-/-</sup>マウスの胸腺内NK1.1<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup>細胞は、NK細胞, NK1.1<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T細胞とは異なる特徴的な細胞表面マーカーを発現することが判明した。次に、ZAP-70<sup>-/-</sup>マウスの胸腺内NK1.1<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup>細胞について、機能解析を行った。ソーティングしたZAP-70<sup>-/-</sup>マウスの胸腺細胞, 脾細胞を固相化抗NK1.1抗体で刺激すると、上清中に有意のIFN- $\gamma$ 産生が認められたが、IL-4産生は見られなかった。続いてZAP-70<sup>-/-</sup>マウスの胸腺内NK1.1<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup>細胞の細胞傷害活性を<sup>51</sup>Cr リリースアッセイで測

定した。ZAP-70<sup>-/-</sup> マウスの胸腺内 NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>-</sup> 細胞は、有意な細胞傷害活性を示した。

以上の結果から、ZAP-70<sup>-/-</sup> マウス胸腺にみられる NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>-</sup> 細胞は、正常マウスの NK 細胞、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T 細胞いずれとも異なるユニークな機能的細胞ポピュレーションであることが判明した。そこで、この NK 様細胞を、本来は NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T 細胞に分化する細胞集団が、ZAP-70 が存在しないために分化が停止したものと想定し、ZAP-70 の欠損を生化学的にバイパスすることで、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T 細胞の分化誘導を試みた。メインストリームの T 細胞では、ZAP-70<sup>-/-</sup> マウスを用いた新生仔胸腺器官培養系 (NTOC) で、ZAP-70 の欠損を生化学的にバイパスすると、正の選択を再構築できることが示されている。この系を用いて、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T 細胞分化が誘導されるか検討した。

まず、CD4<sup>+</sup> T 細胞を誘導する PMA と ionomycin を添加する ZAP-70<sup>-/-</sup> NTOC 系で実験を行った。その結果、CD4<sup>+</sup> T 細胞を誘導するより高濃度の PMA (1600 nM) と ionomycin (130 nM) の存在下で、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T 細胞が出現した。誘導された NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T 細胞は、CD4 分子を発現せず、CD8(α,β) を発現していると推定された。従って、誘導された NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T 細胞は、正常マウス胸腺にみられる、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T 細胞とは異なる亜群と考えられた。次に、CD8<sup>+</sup> T 細胞を誘導する PTX を添加する ZAP-70<sup>-/-</sup> NTOC 系で実験したが、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T 細胞の誘導は全く認められなかった。

さらに、ZAP-70<sup>-/-</sup> マウスの胸腺内 NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>-</sup> NK 様細胞が、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T 細胞に直接分化するか検討した。ソーティングにより ZAP-70<sup>-/-</sup> マウス胸腺内の NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>-</sup> 細胞を分離し、デオキシグアノシン処理した BALB/c NTOC 系に導入し、PMA (1600 nM) と ionomycin (130 nM) の存在下で培養した。その結果、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T 細胞が誘導され、ZAP-70<sup>-/-</sup> マウス胸腺内 NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>-</sup> 細胞が、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T 細胞の前駆細胞であることが示された。

次に、TCR があらかじめ再構成している TCR を発現する DO11.10 トランスジェニックマウスより、ZAP-70 欠損系を樹立し、解析した結果、これらのマウスには、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>dim</sup> 細胞が認められた。この細胞は、CD4 を発現せず、CD8 発現が認められた。一方、このマウスにおいてもメインストリーム T 細胞は、DP で分化が停止していた。

以上まとめると、本研究により以下の事実が明らかになった。

- 1) NK1.1<sup>+</sup> T 細胞の分化には ZAP-70 が必須である。
- 2) ZAP-70<sup>-/-</sup> マウスでは、正常マウス胸腺においては認められない NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>-</sup> のポピュレーションが増加する。この細胞は NK 細胞、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T 細胞いずれとも異なるユニークなフェノタイプを示し、IFN-γ 産生能、腫瘍細胞傷害活性を有する。
- 3) PMA と ionomycin により生化学的に TCR のシグナルをバイパスした NTOC 系で、ZAP-70<sup>-/-</sup> マウス胸腺にみられる NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>-</sup> 細胞は、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T 細胞に直接分化した。
- 4) ZAP-70 はメインストリーム T 細胞の TCR 再構成には影響を与えないが、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T 細胞の TCR の再構成には必要であることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則  
副 査 教 授 吉 木 敬  
副 査 教 授 西 村 孝 司

## 学位論文題名

### NK1.1<sup>+</sup> T細胞の分化機構の解析

NK1.1<sup>+</sup> T細胞は、胸腺内においてメインストリーム T細胞や NK細胞と共通の前駆細胞から分化すると予想されている。しかし、どの分化段階で NK1.1<sup>+</sup> T細胞への系列決定がなされ、分岐していくのかについては不明である。

本研究はNK1.1<sup>+</sup> T細胞の分化機構を明らかにする目的で、メインストリーム T細胞分化が、途中で停止する ZAP-70<sup>-/-</sup> マウスを用いた。

はじめに、ZAP-70<sup>-/-</sup> マウスの胸腺細胞、脾細胞をフローサイトメトリーで解析した。その結果、ZAP-70<sup>-/-</sup> マウスでは NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T細胞、NK1.1<sup>+</sup> TCRγδ<sup>+</sup> T細胞が欠損しており、NK1.1<sup>+</sup> T細胞の分化には ZAP-70 が必須であることが判明した。また、ZAP-70<sup>-/-</sup> マウスの胸腺では、正常マウスでは認められない NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>-</sup> のポピュレーションが存在した。そこで、この細胞の細胞表面マーカーを詳細に解析した結果、NK細胞、NK1.1<sup>+</sup> T細胞とは異なる細胞表面マーカーを発現することが判明した。次に、機能を解析したところ、固相化抗 NK1.1 抗体刺激による IFN-γ 産生能、および腫瘍細胞傷害活性が認められた。

ZAP-70<sup>-/-</sup> マウスでは、本来 NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T細胞に分化する細胞集団が、ZAP-70 が存在しないために分化が停止していると想定し、ZAP-70 の欠損を生化学的にバイパスすることで、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T細胞の分化誘導を試みた。メインストリームの T細胞では、ZAP-70<sup>-/-</sup> マウスを用いた新生仔胸腺器官培養系 (NTOC) で、ZAP-70 の欠損を生化学的にバイパスすると、正の選択を再構築できることが示されており、この系を用いて検討した。

まず、CD4<sup>+</sup> T細胞を誘導する PMA と ionomycin を添加する ZAP-70<sup>-/-</sup> NTOC 系で実験を行った。その結果、CD4<sup>+</sup> T細胞を誘導するより高濃度の PMA と ionomycin の存在下で、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T細胞が出現した。CD8<sup>+</sup> T細胞を誘導する PTX を添加する ZAP-70<sup>-/-</sup> NTOC 系では、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T細胞の誘導は認められなかった。

さらに、ソーティングにより ZAP-70<sup>-/-</sup> マウス胸腺内の NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>-</sup> 細胞を分離し、デオキシグアノシン処理した BALB/c NTOC 系に導入し、PMA と ionomycin の存在下で培養した。その結果、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T細胞が誘導され、ZAP-70<sup>-/-</sup> マウス胸腺内 NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>-</sup> 細胞が、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T細胞の前駆細胞であることが示された。

次に、DO11.10 トランスジェニックマウスを用い、あらかじめ再構成している TCR 遺伝子を持つ ZAP-70 欠損系を樹立し、解析した結果、これらのマウスには、NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>dim</sup> 細胞が認められた。

公開発表に際し、副査の吉木教授より、胸腺外に認められる NK1.1<sup>+</sup> T 細胞と本研究で対象とした NK1.1<sup>+</sup> T 細胞の関連について、ZAP-70<sup>-/-</sup> マウスで発症する免疫異常等の質問があった。申請者は、胸腺外でみられる NK1.1<sup>+</sup> T 細胞と胸腺内 NK1.1<sup>+</sup> T 細胞は、共に TCR と NK1.1 を発現するが、CD4, CD8 の発現に臓器間で差があること、ZAP-70<sup>-/-</sup> マウスでは免疫異常疾患は特に認められない旨回答した。続いて副査の西村教授より、NK1.1<sup>+</sup> T 細胞の分化経路に関する研究の現時点でのコンセンサスについて、NK1.1<sup>+</sup> T 細胞は胸腺外分化の報告もあることを踏まえ、NK1.1<sup>+</sup> T 細胞の分化における TCR の再構成の場としての胸腺の役割に関して質問があった。申請者は、NK1.1<sup>+</sup> T 細胞の胸腺内分化経路に関する仮説について述べ、自己の研究結果との関連を説明した。また、ストローマ細胞を用いた NK1.1<sup>+</sup> T 細胞の誘導の報告はあるが、胸腺内の前駆細胞からの誘導は本研究が初めてである旨を説明した。さらに、主査の小野江教授より、正常マウス胸腺ではほとんど認められない NK1.1<sup>+</sup> TCRαβ<sup>-</sup> 細胞が増加する現象に関して質問があった。申請者は ZAP-70<sup>-/-</sup> マウスと同様に TCR 再構成がみられない RAG ノックアウトマウスの例を述べた。

この論文は、NK1.1<sup>+</sup> T 細胞の分化には ZAP-70 が必須であること、NK1.1<sup>+</sup> T 細胞の前駆細胞を直接同定した点で高く評価され、今後さらなる NK1.1<sup>+</sup> T 細胞の分化機構の解明が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。