

# 胸腺内における NKT 前駆細胞から NKT 細胞への成熟経路の研究

## 学位論文内容の要旨

### I. 背景

invariant NKT (iNKT) 細胞は、糖脂質抗原を CD1d 拘束性に認識する T リンパ球である。感染・アレルギー・自己免疫・癌などで重要な制御機能を発揮することが明らかにされつつあるが、その分化に関しては不明な点が少なくない。iNKT 細胞は、これらの発現する invariant T 細胞受容体 (TCR: マウスでは V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18) を、 $\alpha$ -galactosylceramide 負荷 CD1d 多量体 ( $\alpha$ -GC CD1d-tetramer, -dimer) で検出することで追跡出来る。また、その  $\alpha$ -GC CD1d-dimer<sup>+</sup> の分画を、CD44 と NK1.1 発現パターンによって、CD44<sup>low</sup> NK1.1<sup>-</sup> (stage 1), CD44<sup>high</sup> NK1.1<sup>-</sup> (stage 2), CD44<sup>high</sup> NK1.1<sup>+</sup> (stage 3) の 3 分化段階 (stage 1  $\rightarrow$  3) に分類可能である。

*alymploplasia* マウス (以下 *aly* マウス) は、NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) 遺伝子変異により、全身のリンパ節とパイエル板を欠損し、胸腺・脾臓の構築異常や、免疫不全を呈するユニークなマウスである。申請者のグループでは、*aly* マウスの NKT 細胞 (NK1.1<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>) 分化障害を見出し、その原因が胸腺環境に存在することを示した。ただし、*aly* マウスにおける iNKT 細胞分化の障害、さらにこれらの障害がどのステップに存在するかなど、詳細な解析は行われていなかった。

### II. 目的

*aly* マウスにおける NKT 細胞分化障害の時期を明らかにし、NKT 細胞分化メカニズムを解明する。

### III. 材料と方法

ALY/Nsc Jcl-*aly/aly* (*aly*), *aly*/+, 野生型 C57BL/6 (B6; 以下 *aly*/+ とともに単に対照群と記す), B6.PL-*Thy1*<sup>1</sup>/Cy (B6.PL-Thy1.1) の各マウスは購入後、北大遺伝子病制御研究所疾患モデル動物実験施設にて、specific pathogen-free (SPF) 環境で維持・飼育し、8~12 週齢にて解析を行った。骨髄キメラは、*aly* あるいは B6.PL-Thy1.1 マウス骨髄より得た 0.5-1  $\times$  10<sup>7</sup> 個の T 細胞除去骨髄細胞を、致死線量 (9Gy) X 線照射したレシピエントマウス (*aly* あるいは B6.PL-Thy1.1 マウス) に静注し、作製した。レシピエントとしては、8~10 週令のマウスを用いた。簡便のため、B6.PL-Thy1.1 ドナー、*aly* レシピエントのキメラを [B6.PL  $\rightarrow$  *aly/aly*] のように表し、再建後 8 週で解析に供した。全ての動物実験は、北海道大学動物実験委員会の承認を受けた。フローサイトメトリーによる iNKT 細胞分化の解析には、TCR に結合した  $\alpha$ -GalCer 負荷リコンビナント可溶性マウス CD1d:Ig 融合蛋白 ( $\alpha$ -GC CD1d-dimer) を、phycoerythrin 標識抗マウス IgG<sub>1</sub> mAb で検出する組み合わせを用いた。その他に fluorescein isothiocyanate 標識抗マウス CD44, allophycocyanin 標識抗マウス NK1.1, 死細胞をゲートアウトする

ためのヨウ化プロピジウムを用いた。また、週齢・性別を合わせた対照群、および *aly* マウス胸腺から全 RNA を抽出し、cDNA を合成、リアルタイム定量 PCR 反応を行い、*i*TCR の発現量を比較した。相対的定量は、それぞれの Ct 値 (threshold cycle number) を用いて、以下の公式で導出し、比較した:  
Replication index =  $2^{-(Ct_{(target)} - Ct_{(HPRT)})}$

#### IV. 結果

*i*NKT 細胞の割合・実数、*i*TCR を構成する V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 メッセージ量は、対照群と較べ、*aly* マウスで有意に減少していた。しかし *aly* 胸腺細胞にも、一定の V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 転写産物が認められたので、TCR 遺伝子再構成自体ではなく、転写後の過程に障害が存在すると考えられた。次に、*aly* マウスの  $\alpha$ -GC CD1d-dimer<sup>+</sup> 細胞の成熟段階を CD44 と NK1.1 発現によって解析した。 $\alpha$ -GC CD1d-dimer<sup>+</sup> 細胞の大部分は、対照群では stage 3 に認められたが、*aly* マウスでは stage 1 の領域に認められた。したがって、*aly* マウス胸腺の *i*NKT 細胞の分化経路は、stage 1 から stage 2 への段階でブロックされていると推測された。一方、対照群の *i*NKT 細胞は、主に CD4<sup>+</sup> か CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DN) であったが、*aly* マウスでは  $\alpha$ -GC CD1d-dimer<sup>+</sup> 細胞中の CD4<sup>+</sup> および DN 分画が有意に減少し、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP) 分画の割合が、有意に増加していた。これらの結果は、*aly* マウスの *i*NKT 細胞は、DP 細胞から CD4<sup>+</sup>、あるいは DN へ分化出来ないことを示唆する。同様の結果は、1 週齢の若齢 *aly* マウス、*aly* マウスがホストの [B6.PL  $\rightarrow$  *aly/aly*], [*aly/aly*  $\rightarrow$  *aly/aly*] キメラにおいても認められた。一方、ドナーの系統に関わらず、ホストが NIK 健常の B6.PL マウスである [B6  $\rightarrow$  B6.PL]、および [*aly/aly*  $\rightarrow$  B6.PL] キメラでは、*i*NKT 細胞分化障害は認められなかった。

#### V. 考察

本研究によって、*aly* マウス胸腺における *i*NKT 細胞分化障害は、CD44<sup>low</sup> NK1.1<sup>+</sup> (stage 1) から CD44<sup>high</sup> NK1.1<sup>+</sup> (stage 2) の移行段階にあることが判明した。この分化障害は、[B6.PL  $\rightarrow$  *aly/aly*] キメラにおいても認められ、NIK の突然変異の影響は NKT 前駆細胞自体ではなく、胸腺の放射線抵抗性基質細胞を介することが示された。また *aly* 胸腺においては、未熟な DP *i*NKT 集団が多数認められた。これらの知見は、*i*NKT 細胞が DP から CD4<sup>+</sup> あるいは DN ステージへと進行するという報告に適合しており、CD44 と NK1.1 発現で見られたと同様、*i*NKT 細胞が最も未熟な段階で分化停止していることを支持する。*aly* マウスと同様、*i*NKT 細胞分化障害に胸腺の構築異常を伴うマウスとして、lymphotoxin (LT)  $\alpha$ ・LT $\beta$ 、RelB などのノックアウトマウスが知られている。これらの遺伝子産物は、NIK とともに *i*NKT 細胞生成に必須な LT $\alpha_1\beta_2$  シグナル経路を構成している。すなわち、*i*NKT 細胞分化には、<LT $\beta$  $\rightarrow$ LTBR  $\rightarrow$ NIK  $\rightarrow$ IKK  $\rightarrow$ RelB> シグナル伝達経路が重要な役割を果たしていると考えられる。NIK は p52/RelB ヘテロダイマーを活性化し、胸腺髄質上皮細胞などの放射線抵抗性の胸腺ストローマに未知の因子 X の発現を誘導し、この未知のストローマ因子 X が、*i*TCR を介して DP 胸腺細胞上の CD1d 分子によって正の選択を受けた *i*NKT 細胞の、stage 1 から stage 2 への移行の駆動力として機能するのではないかと考えている。ただし本研究において、ごく一部ではあるが *aly* マウス胸腺に stage 3 の細胞が出現した。恐らく、LTBR 以外の経路で微量生成した p52/RelB が機能するか、MAPK 系などの別のシグナル伝達系が作用すると考えている。今後、*i*NKT 細胞の分化成熟に必須の、LTBR/NIK/RelB 系依存性の因子 X の探索と、その作用メカニズムの解明が必要である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

## 胸腺内における NKT 前駆細胞から NKT 細胞への成熟経路の研究

invariant NKT (iNKT) 細胞は、感染・アレルギー・自己免疫・癌などで重要な制御機能を発揮することが明らかにされつつあるが、分化に関しては不明な点が少なくない。一方、ALY/Nsc Jcl-*aly/aly* マウス (以下 *aly* マウス) は、NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) 遺伝子変異により、全身のリンパ節とパイエル板を欠損し、胸腺・脾臓の構築異常を呈するマウスである。申請者のグループでは、*aly* マウスの NKT 細胞 (NK1.1<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>) 分化障害を見出した。ただし、*aly* マウスにおける iNKT 細胞の分化障害がどのステップに存在するかなど、詳細な解析は行われていなかった。そこで、*aly* マウスにおける iNKT 細胞分化障害の時期、分化メカニズムを解明することを目的とした。

iNKT 細胞は、これらの発現する invariant T 細胞受容体 (iTCR: マウスでは V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18) を、 $\alpha$ -galactosylceramide 負荷 CD1d 多量体 ( $\alpha$ -GC CD1d-tetramer, -dimer) で検出した。この  $\alpha$ -GC CD1d-dimer<sup>+</sup> の分画を、CD44<sup>low</sup> NK1.1<sup>-</sup> (stage 1), CD44<sup>high</sup> NK1.1<sup>-</sup> (stage 2), CD44<sup>high</sup> NK1.1<sup>+</sup> (stage 3) の 3 分化段階 (stage 1  $\rightarrow$  3) に分類し、*aly*, *aly*+, 野生型 C57BL/6 (B6; 以下 *aly*+ とともに単に対照群と記す), B6.PL-Thy1.1 (B6.PL) の各マウス (8~12 週齢) の胸腺内各ポピュレーションを比較・解析した。対照群マウスの  $\alpha$ -GC CD1d-dimer<sup>+</sup> 胸腺細胞の大部分は stage 3 に認められたが、*aly* マウスでは stage 1 に認められた。したがって、*aly* マウス胸腺の iNKT 細胞の分化経路は、stage 1 から stage 2 への段階でブロックされていると推測された。また対照群の iNKT 細胞は、主に CD4<sup>+</sup> か CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) であったが、*aly* マウスでは CD4<sup>+</sup> および DN 分画が減少し、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP) 未熟分画の割合が有意に増加していた。つまり、*aly* マウスの iNKT 細胞は、DP 細胞から CD4<sup>+</sup>、あるいは DN へ分化出来ないことが判明した。これらの結果は、いずれも *aly* マウスの iNKT 細胞が初期段階で分化停止することを示す。

次に、*aly* あるいは B6.PL マウスの T 細胞除去骨髓細胞を、致死線量 (9Gy) X 線照射したレシピエントマウス (*aly* あるいは B6.PL-Thy1.1 マウス) に静注し、骨髓キメラを作製した (B6.PL ドナー、*aly* レシピエントのキメラを [B6.PL  $\rightarrow$  *aly*] のように表す)。再建後 8~12 週の [B6.PL  $\rightarrow$  *aly*] 胸腺において、 $\alpha$ -GC CD1d-dimer<sup>+</sup> 細胞の stage 1 から stage 2 へ、DP から CD4<sup>+</sup> または DN 分画への分化にブロックが認められた。一方、ホストが NIK 健常の B6.PL マウスの、[B6.PL  $\rightarrow$  B6.PL]、および [*aly*  $\rightarrow$  B6.PL] キメラでは、iNKT 細胞の分化障害は認められなかった。

これらの研究から、iNKT 細胞分化には、<LT $\beta$  $\rightarrow$ LT $\beta$ R $\rightarrow$ NIK $\rightarrow$ IKK $\rightarrow$ RelB> シグナル伝達経路が

重要で、NIK は p52/RelB ヘテロダイマーを活性化し、胸腺上皮細胞に未知の因子 X の発現を生ずること、この未知因子 X が stage 1 から stage 2 への iNKT 細胞分化を誘導すること、そして *aly* マウスでは NIK 変異のため因子 X が産生されないと考えられた。

口頭発表後、副査の上出利光教授より、胸腺上皮細胞により提供される成熟シグナルの候補となる分子とその研究法について、次いで副査の西村孝司教授より、*aly* マウスにおける CD1d 発現量について、前駆細胞の各ステージにおける機能差について質問があった。最後に、主査の小野江教授より米国の研究室からの *aly* マウス stage 3 NKT 細胞の報告と、本研究の結果との乖離の理由について質問があった。いずれの質問に対しても申請者は、現在進行している実験の予備的な結果や、他の研究者からの報告を引用し、適切に回答した。

この論文は、*aly* マウスにおける iNKT 細胞分化異常を明らかにしただけではなく、stage 1 NKT 前駆細胞に胸腺上皮細胞由来の成熟シグナルが作用して stage 2 へ分化するという新規のメカニズムを提示したことで高く評価され、今後このシステムを用いた NKT 細胞成熟シグナルの全容解明が期待される。

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。