

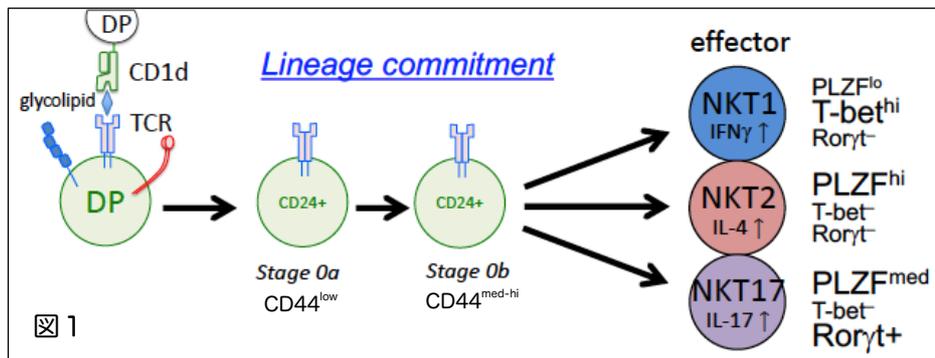
## 感染免疫や腫瘍免疫に重要な NKT 細胞の胸腺分化機構

千葉大学大学院 医学研究院 国際アレルギー粘膜炎免疫学  
木村 元子

ナチュラルキラーT (NKT) 細胞は、Cd1d 分子に提示された「糖脂質」を認識する多様性の極めて乏しいインバリエントな抗原受容体 (TCR) ( $V\alpha 14J\alpha 18/V\beta 8, 7, 2$ ) を有する細胞集団である。NKT 細胞は、病原体感染時の初期の免疫応答や抗腫瘍免疫などの生体の免疫監視機構を担う一方で、自己免疫疾患の発症にも関わることが示唆されており、近年その重要性が明らかとなってきたが、その分化機構の詳細は不明点が多い。

NKT 細胞は、CD4T 細胞や CD8T 細胞などのコンベンショナル T 細胞と同様に、胸腺において CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 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。通常、コンベンショナル T 細胞は、

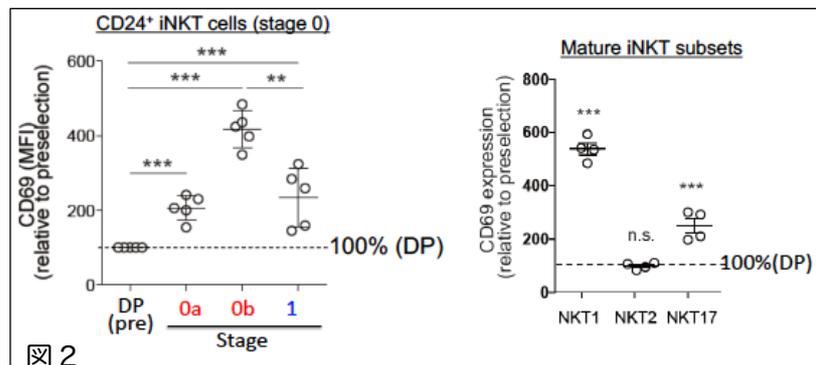
胸腺内でナイーブ T 細胞として分化した後、末梢へ排出され、末梢組織でエフェクター細胞へと分化する。しかし興味深いことに、NKT 細胞は胸腺内での分化過程で、異なるエフェクター機能を有する 3 つのサブセット (NKT1 細胞、



NKT2 細胞, NKT17 細胞) へと分化を遂げる (図 1)。「インバリエント」な TCR を有する NKT 細胞が、どうして異なる機能を持つ 3 つのサブセットへと分化を遂げることができるのか、その詳細は未だ不明である。NKT 細胞の胸腺内分化過程は、これまで、stage0 (CD24<sup>+</sup>), stage1 (CD24<sup>-</sup>CD44<sup>lo</sup> NK1.1<sup>-</sup>), stage2 (CD24<sup>-</sup>CD44<sup>hi</sup> NK1.1<sup>-</sup>), stage3 (CD24<sup>-</sup>CD44<sup>hi</sup> NK1.1<sup>+</sup>) と経過をたどると考えられてきた。そして、stage2 の細胞は IL-4 を多量に産生し、stage3 の細胞は IFN $\gamma$  を多量に産生することが報告されていた。しかし 2015 年に、NKT 細胞は、stage0 を経た後、IFN $\gamma$  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 つの異なる細胞集団へと分化することが示された (図 1)。そして、これまで唯一の成熟 NKT 細胞と思われていた stage 3 (CD44<sup>hi</sup> NK1.1<sup>+</sup>) 細胞は NKT1 細胞であり、stage2 (CD44<sup>hi</sup> NK1.1<sup>-</sup>) 細胞の中には、成熟した NKT2 細胞、NKT17 細胞が含まれることが明らかとなった。この事実は、各々の NKT 細胞サブセットが、胸腺内で何らかのシグナルによって運命決定をし、エフェクター機能を有する細胞へと成熟することを示している。しかし、これらの各 NKT 細胞サブセットの運命決定に重要なシグナルが何かは明らかにされていない。

私は、その分化の違いを生む分子機構として、1) 分化の際に提示される糖脂質抗原が異なる可能性、2) 各 NKT 細胞サブセットの TCR の抗原認識部位の配列が異なる可能性、3) 前述 1)2) 両方の可能性を考えて研究を開始した。NKT1 細胞、NKT2 細胞、NKT17 細胞を胸腺からソーティングにより調整し、TCR $\alpha$  鎖、TCR $\beta$  鎖のレパトア解析を行ったところ、NKT1 細胞、NKT2 細胞、NKT17 細胞において、サブセット特異的な TCR $\alpha$  鎖、TCR $\beta$  鎖は存在しないことがわかった。この事実は、TCR 配列の単純な違いによって分化の特異性が決定されているのでは無いことを示している。

そこで次に、NKT 細胞サブセットにおいて特徴的な発現を示す CD69 分子に着目し研究を行った。CD69 分子は、DP 細胞では発現が見られないが、正の選択シグナルによって発現が誘導される (図 2 左)。一方、成熟 NKT 細胞においては、NKT1 細胞で高い発現を示すが、NKT17 細胞ではその発現量は低く、NKT2 細胞では全く発現が見られないことがわかった。



CD69 の発現量の違いが、NKT 細胞の分化に及ぼす影響を調べるために、次に CD69 欠損マウスを用いて解析を行った (図 3)。その結果、CD69 欠損マウスでは、胸腺内における NKT2 細胞の割合、絶対数共に顕著に低く、NKT1 細胞の割合、絶対数は顕著に高いことがわかった。一方、CD69 欠損マウスにおける NKT2 細胞の顕著な低下は、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。

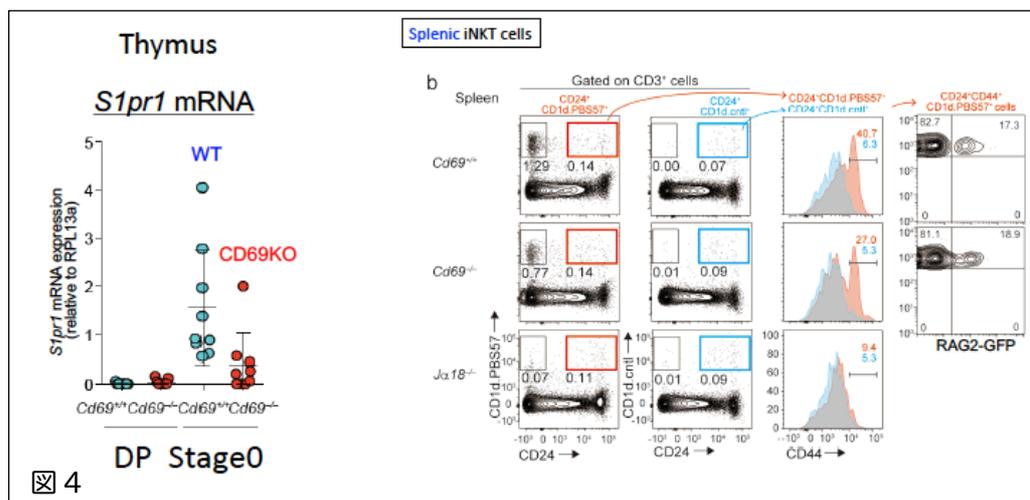
NKT 細胞サブセットは、遺伝背景の異なるマウス間で大きく異なることが知られている。そこで C57BL/6 バックグラウンドの CD69 欠損マウスを解析したところ、NKT2 細胞の顕著な低下は見られたが、NKT1 細胞数に変化は見られなかった。以上の結果から、CD69 欠損マウスで見られる NKT 細胞サブセット分化障害は、NKT2 細胞の胸腺内分化異常に起因すると考えられた。

この結果は、「成熟 NKT2 細胞は CD69 分子を発現していないに関わらず (図 2 右)、その分化には CD69 分子を必要とする」という、一見矛盾する現象が起きていることがわかった。

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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> と直接会合することで、S1P<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> 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 (図 2)、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<sup>+</sup>NKT 細胞 (Stage0) が S1P<sub>1</sub> を発現し得るのかを調べることにした。CD24<sup>+</sup>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<sub>1</sub> 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<sup>+</sup>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 4 左)。この結果は、CD69 欠損により S1P<sub>1</sub> を発現した CD24<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>flp</sup>* マウスを利用したところ、脾臓には、RAG2-GFP を発現した CD24<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>NKT 細胞が存在することがわかった (図 4 右)。この結果は、未成熟 CD24<sup>+</sup>NKT 細胞は胸腺外に移動することを示すものである。

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<sub>1</sub> アゴニストである FTY720 は、S1P<sub>1</sub> に作用することで S1P<sub>1</sub> の内在化を誘導することが知られている。そこで、FTY720 を 5 日間連続投与を行うことで S1P<sub>1</sub> 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 5)。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、未成熟な CD24<sup>+</sup>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でしょうか？

NKT2 細胞は、成熟 NKT 細胞の中で最も CD5 を高く発現することがわかった (図 6)。CD5 は、TCR シグナルの強弱を示す指標であることから、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」可能性が示唆される。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。

以上の結果より、NKT 細胞の胸腺内分化に関し、図 7 のようなモデルを提唱した。共通の NKT 細胞の前駆細胞である DP 細胞は、正の選択による 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。強い TCR シグナルを受けとった未熟 NKT 細胞は CD69 と S1P<sub>1</sub> を高く発現する NKT2 前駆細胞へと分化する。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。CD69 欠損によって S1P<sub>1</sub> 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と考えられた。一方、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 3)、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。

この研究成果は、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。

公益財団法人アステラス病態代謝研究会の平成 29 年度研究助成金を用いて行った、これらの研究成果は、Nature Communications, 2018 (DOI: 10.1038/s41467-018-06283-1)に掲載された。貴社の助成に対し、心より御礼申し上げます。

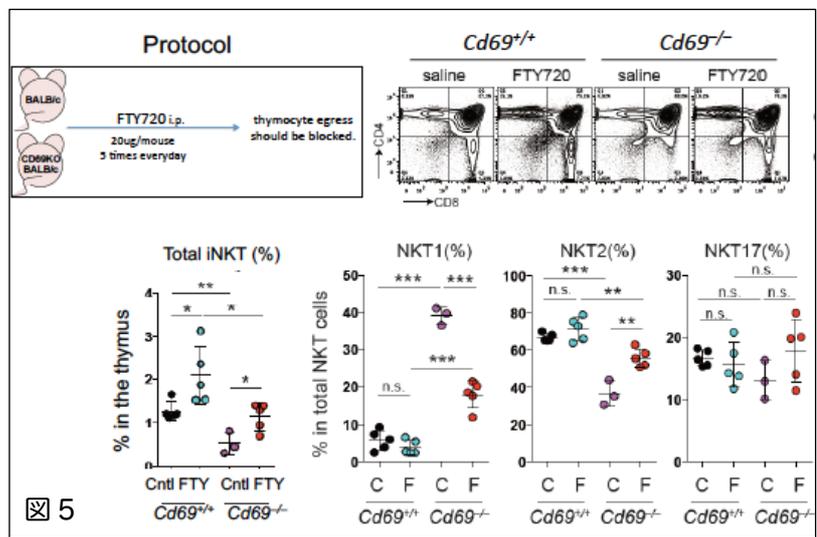


図 5

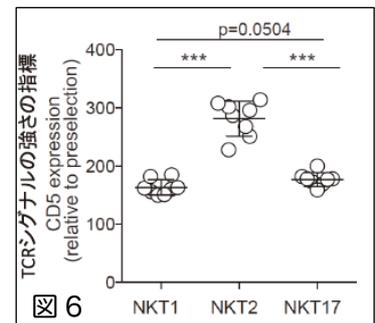


図 6

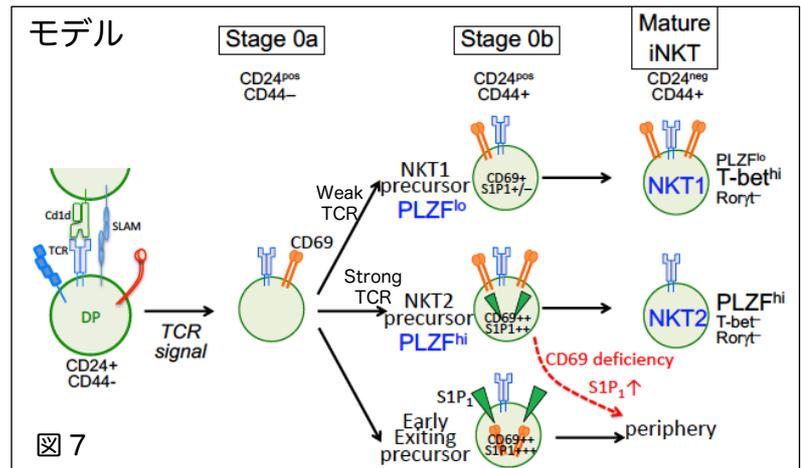


図 7