新しい免疫系を形成する $V\alpha 14$ NKT 細胞

谷 口 克

Jpn. J. Clin. Immun., 22 (6) : 363~367, 1999.

$V\alpha 14$ NKT Cells as a novel immune system

Masaru Taniguchi

Department of Molecular Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba University

これまで知られていた免疫系は胸腺と言う臓器に代表されるように、胸腺依存性に系ができていく。胸腺は有顎類になってはじめて出現する器官であるが、免疫系多様性を獲得する上でも、自己・非自己を決定するうえでも重要な役割を果たす。すなわち、顎ができて、さまざまなものを食べるようになって免疫系も多様性を獲得し、それに対処する必要性に迫られたと考えることができる。実際、リンパ球の抗原受容体は 10^{15} も存在し、それに対応する数の抗原に対処できる。Tリンパ球が蛋白抗原を認識するときにはMHC分子に結合したペプチドと結合することによって行われるが、そのMHC分子も多くの多型が存在する。したがって、胸腺に依存した免疫系は複雑な抗原に対して適応分化してきたものと考えられる。

しかし、新しく発見された免疫系はただ一種類の抗原受容体が種族にただ一つしか存在しないCD1dというMHC様の分子によって提示される糖脂質を抗原とする点で従来の免疫系とは大きく異なる。しかも、生物は極論すればたんぱく質と糖脂質あるいは糖鎖から出来ているので、胸腺依存性に発達してきた従来知られていた免疫系は、自然界に存在する抗原のうちの一部しか対処していなかったのである。ここに新しく登場したNKT細胞は、残りの抗原に対処するという意味でも生物学的にも重要であると考えられる。

I. NKT細胞の発見の経緯と特徴

新しい細胞系列と考えられている第4のリンパ球、NKT細胞には他のリンパ球が持ち合わせない幾つの特徴がある。その最大の特徴はNKT細胞の抗原受容体である。NKT細胞が発現する抗原受容体は、多様性の無い、ただ一種類の受容体($V\alpha 14 J\alpha 281$)であり、通常のT細胞では使われておらず、NKT細胞にのみ発現する受容体である¹⁻³⁾。この特徴的で均一な $V\alpha 14$ 遺伝子は、1986年抑制T細胞ハイブリドーマからクローニングすることに成功した⁴⁾。当時、免疫学の常識では均一の受容体を持つリンパ球の増殖は極めて考えにくい事として扱われたため、この事実はなかなか受け入れられなかった。

しかし、この $V\alpha 14$ 抗原受容体遺伝子をプローブとしてRNaseプロテクション法を用いて調べると、実に面白い事が分かった。すなわち、(1) $V\alpha 14$ 受容体を持つリンパ球はMHC型と無関係に全ての純系マウスで高頻度に存在する⁵⁾。(2) しかも通常のTリンパ球と異なり、胸腺組織よりも肝臓や骨髄などの胸腺外組織に普遍的に発現している。とくに肝臓および骨髄のリンパ球のうちでCD3陽性細胞集団の約50%、脾では5%が、この細胞である¹⁾。胸腺には極めて僅かで、全リンパ球の0.4%である¹⁾。(3) 通常のT細胞が蛋白を認識するのとは異なり、蛋白以外の物質を抗原としていることなどを見だし、極めて重要な細胞集団であることが示唆された⁶⁾。

I		II
Antigen	Protein	Glycolipid
Presenting molecule	MHC	CD1d
Recognition system	T cell	NKT cell

図 1 Possible roles of the immune system

II. NKT 細胞の分化

NKT 細胞の分化に関して、われわれは均一な $V\alpha 14$ と $J\alpha 281$ との間で起こる遺伝子再構成の際、出現する環状 DNA 量を指標にした分子生物学的手法で NKT 細胞の胸腺外分化の経路を証明した⁷⁾。通常、リンパ球抗原受容体遺伝子はゲノム上には完成されたものではなく、遺伝子断片のみが存在する。幹細胞からリンパ球に運命決定が行われるとその時点で抗原受容体遺伝子再構成がおこり、NKT 細胞の場合は $V\alpha 14$ と $J\alpha 281$ 遺伝子断片の間に介在するゲノムは環状 DNA として切り出される。このことは一回の NKT 細胞への分化、すなわち均一な $V\alpha 14$ 抗原受容体遺伝子形成時には 1 コピーの環状 DNA ができることになる。しかも、環状 DNA はそれ自身で増える事はない。さらに環状 DNA の寿命は短く、しかも細胞分裂で細胞が 2 個に分裂したとしても一方に細胞のみに移行するので、環状 DNA 量の測定は NKT 細胞分化の頻度とその場を決定することになる。実験結果は、骨髄、肝臓などの胸腺外組織で環状 DNA 量が胸腺のその約 20 倍も多いことから、胸腺外組織が分化の場であると考えている⁷⁾。最近、 $V\alpha 14$ と $J\alpha 281$ 遺伝子再構成により派生する環状 DNA の定量を competitive PCR 法を用いて調べたところ、肝臓と骨髄が最も多く、 10^5 個の全組織細胞あたり 50 コピー検出できたのに対し胸腺ではたかだか 1-2 コピーしか検出できなかった。このことから $V\alpha 14$ NKT 細胞は胸腺外組織で主として分化するものと考えられた⁸⁾。さらに、胸腺形成前の胎生 9.5 日に $V\alpha 14$ mRNA が検出されたことから通常の T 細胞と異なる分化様式をとることが判明した。

III. NKT 細胞特異的前駆細胞の証明

さらに最近、NKT 細胞が新しい細胞系列である根拠として、NKT 細胞にだけ分化する前駆細胞を発見した⁹⁾。この細胞は NKT 細胞の受容体として $V\beta 8.2$ と $pT\alpha$ という未熟な受容体分子を発現し、細胞内には未熟リンパ球の特徴である遺伝子再構成に必要な酵素 recombination activating gene (RAG) が発現していた。さらに、この未熟 NKT 細胞は細胞表面にリンパ球には通常発現しないと思われていた GM-CSF 受容体が発現しており、GM-CSF の添加によって $V\alpha 14$ NKT 細胞受容体遺伝子が再構成され、成熟型 NKT 細胞だけへと分化した。GM-CSF 受容体からのシグナルが $V\alpha 14$ 受容体遺伝子再構成を誘導するという事実は極めて重要な知見である。すなわち、これまで遺伝子再構成を起すスイッチは何か不明であったが、遺伝子再構成が細胞外からのシグナルによって起こる事を証明した最初の例となったからである。

IV. 新しい免疫細胞系列としての NKT 細胞

NKT 細胞が独立した新しい細胞系列であることの第一の事実は、NKT 細胞のみが存在するマウス (NKT マウス) および NKT 細胞だけを欠損したマウス (NKT 欠損マウス) を作ることができたことである。すなわち、遺伝子再構成に必要な RAG 遺伝子を相同遺伝子組換え法によって破壊したのち、NKT 抗原受容体遺伝子 ($V\alpha 14/V\beta 8$) を導入したマウス (RAG- $V\alpha 14/V\beta 8$ tg マウス) は、NKT 細胞のみが出現し、通常のリンパ球の分化は完全に抑制された NKT マウスとなる^{2,9)}。一方、 $V\alpha 14$ NKT 抗原受容体遺伝子の発現を欠失したマウスにおいてはすべての組織から NKT 細胞のみが欠失し、正常な通常の免疫系をもつマウスが誕生した (NKT 欠損マウス)⁹⁾。このことは $V\alpha 14$ 受容体の発現が NKT 細胞の分化に必須で他のリンパ球系列とは異なる細胞系列であることを証明したことになる。

V. NKT 細胞抗原受容体が認識する抗原

NKT 細胞の唯一の $V\alpha 14$ 受容体はクラス Ib 分子である CD1d とともに抗原を認識する。しかし、どのような物質が $V\alpha 14$ 受容体のリガンドであるのか不明であった。通常ペプチドが MHC 分子に抗原提示される場合、細胞質でユビキチン化され断片化され

	V α 14 NKT	Conventional T
TCR	invariant V α 14 V β 8.2	heterogenous
MHC	class Ib (CD1d)	class I/II MHC
Ligand	α -GalCer	peptides
TAP	independent	dependent
Selection	BM	thymic epithel
Development	d9.5 AGM	d17thymus

MT1037-3

図 2 V α 14 NKT and conventional T cells

たペプチドは、粗面小胞体膜上にある transporter associated protein (TAP) を介して粗面小胞体内部に輸送され MHC 分子と会合する。すなわち、TAP 分子はペプチドの抗原提示には必須の分子であるが、NKT 細胞の分化は TAP 分子を欠損したマウスでも正常であった⁶⁾。この発見はわれわれに重大な示唆を与えた。すなわち、NKT 細胞は T 細胞と異なりペプチドを認識するのではなく、それ以外の抗原、すなわち糖脂質が最も可能性のあるリガンド候補となった。

この推測の結果、合成糖脂質を用いて、NKT 細胞のリガンドが糖脂質の一種である α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) であることを証明した⁹⁾。セラミド部分を構成するアシル化脂肪とスフィンゴシンの長鎖脂肪が CD1d 分子の 2 つの疎水性 A' と F' ポケットに結合し、糖鎖部分が NKT 細胞抗原受容体で認識される。CD1d 分子は各動物種に一種類しか存在せず、糖脂質との複合体が一種類の V α 14 NKT 抗原受容体によって認識される点で、糖脂質抗原に対する極めてユニークな免疫系と言える。最近、Schofield らはマラリアやトリパノゾーマが持つグリコリルフォスファチジルイノシトール (GPI) が CD1d 分子に結合し、NKT 細胞を活性化することを報告している¹¹⁾。マラリアに感染している妊婦の半数以上に死産、流産、早産が見られることから、この免疫系の生理的意義は感染に対する生体防御機能としての役割を担っていることを物語っているのかもしれない。

また、最近、 α -GalCer がヒト V α 24 NKT 細胞受容体のリガンドとしても機能していることが明らかになり、CD1d 分子が万人に共通であることを考えると、

すべての人に使用できる薬剤として期待されている¹²⁾。

VI. NKT 細胞の機能

NKT 細胞の機能は多彩である。 α -GalCer によって NKT 細胞が活性化されると IL-4 などの Th2 サイトカインとインターフェロンガンマなどの Th1 サイトカインを分泌する。したがって、NKT 細胞はサイトカイン制御異常による疾病の発症、たとえば自己免疫疾患発症制御^{13,14)}やアレルギー発症制御¹⁵⁾に関係する。さらにパーフォリンによる細胞障害は強烈であるものの制御や流産の機序に関与する新たな細胞としても注目を集めている。

リガンドである α -GalCer の極く微量を担がん動物に投与すると選択的に NKT 細胞のみが活性化され、肝や肺への実験的がん転移を完全に阻止したが、NKT 欠損マウスではがん転移を阻止できなかったことから、 α -GalCer が生体内で特異的に NKT 細胞を活性化し、がん転移を制御している事を証明した¹⁶⁾。

さらに、胎盤には均一な V α 14 と V β 7 受容体を発現する特徴的な NKT 細胞が受精卵着床初期から妊娠末期まで出現する。この胎盤特異的な NKT 細胞をリガンドである α -GalCer で活性化すると 100% 流産を引き起こすことが明らかになった。この流産は NKT 細胞が胎児組織である ectoplacental cone の trophoblast を細胞障害することによって起こることが組織学的に証明された。さらに、NKT 細胞欠損マウス、パーフォリン欠損マウス、TNF α 欠損マウス、IFN γ 欠損マウスでは α -GalCer 投与でも流産が起こらないことから、これらの分子が流産に必須であるこ

図 3 V α 14 rearrangements in pre NKT cells induced by GMCSF

とが証明された。

以上のように 1986 年に NKT 細胞の唯一の抗原受容体である V α 14 遺伝子の単離にはじまった NKT 細胞の研究は、NKT 細胞が胸腺外分化する新しい細胞系列のリンパ球で、胎生初期から出現する新しい免疫系を構成することを明らかにした。この細胞ががん

転移抑制や自己免疫発症制御、流産などの免疫統御機能を担当していることと考え合わせると極めて重要なシステムである。これまでの免疫系とは、分化も、発生も、機能も異なる新しい免疫系が登場したことによって、免疫系の生物学的意義、免疫系の成立機構に新しいページを開くことになる。

文 献

- 1) Makino, Y., Kanno, R., Ito, T., Higashino, K., Taniguchi, M.: Predominant expression of invariant V α 14⁺ TCR α -chain in NK 1.1⁺ T cell populations. *Int. Immunol.*, 7: 1157~1161, 1995.
- 2) Taniguchi, M., Koseki, H., Tokuhisa, T., Masuda, K., Sato, H., Kondo, E., Kawano, T., Cui, J., Perkes, A., Koyasu, S., Makino, Y.: Essential requirement of an invariant V α 14 T cell antigen receptor expression in the development of natural killer T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11025~11028, 1996.
- 3) Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., Taniguchi, M.: Requirement for V α 14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science*, 278: 1623~1626, 1997.
- 4) Imai, K., Kanno, M., Kimoto, H., Sigemoto, K., Yamamoto, S., Taniguchi, M.: Sequence and expression of transcripts of the T-cell antigen receptor α -chain gene in a functional, antigen-specific suppressor-T-cell hybridoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 8708~8712, 1986.
- 5) Koseki, H., Imai, K., Nakayama, F., Sado, T., Moriwaki, K., Taniguchi, M.: Homogenous junctional sequence of the V 14⁺ T cell antigen receptor α chain expanded in unprimed mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 5248~5252, 1990.
- 6) Adachi, Y., Koseki, H., Zijlstra, M., Taniguchi, M.: Positive selection of invariant

- V α 14⁺ T cells by non-major histocompatibility complex-encoded class I-like molecules expressed on bone marrow-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 : 1200~1204, 1995.
- 7) Makino, Y., Yamagata, N., Sasho, T., Adachi, Y., Kanno, R., Koseki, H., Kanno, M., Taniguchi, M. : Extrathymic development of V α 14-positive T cells. *J. Exp. Med.*, 177 : 1399~1408, 1993.
 - 8) Sato, H., Nakayama, T., Tanaka, Y., Yamashita, M., Shibata, Y., Kondo, E., Saito, Y., Taniguchi, M. : Induction of differentiation of pre-NKT cells to mature V α 14 NKT cells by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 : 7439~7444, 1999.
 - 9) Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H., Taniguchi, M. : CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*, 278 : 1626~1629, 1997.
 - 10) Makino, Y., Kanno, R., Koseki, H., Taniguchi, M. : Development of V α 14⁺ NKT cells in the early stages of embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 : 6516~6520, 1996.
 - 11) Schofield, L., McConville, M. J., Hansen, D., Campbell, A. S., Fraser-Reid, B., Grusby, M. J., Tachado, S. D. : CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science*, 283 : 225~229, 1999.
 - 12) Sumida, T., Sakamoto, A., Murata, H., Makino, Y., Takahashi, H., Yoshida, S., Nishio, K., Iwamoto, I., Taniguchi, M. : Selective reduction of T cells bearing invariant V α 24 J α Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J. Exp. Med.*, 182 : 1163~1168, 1995.
 - 13) Mieza, M. A., Itoh, T., Cui, J. Q., Makino, Y., Kawano, T., Tsuchida, K., Koike, T., Shirai, T., Yagita, H., Matsuzawa, A., Koseki, H., Taniguchi, M. : Selective reduction of V α 14⁺ NKT cells associated with disease development in autoimmune-prone mice. *J. Immunol.*, 156 : 4035~4040, 1996.
 - 14) Kaneko, Y., Harade, M., Kawano, T., Yamashita, M., Shibata, Y., Gejyo, F., Nakayama, T., Taniguchi, M. : Augmentation of V α 14 NKT cell-mediated cytotoxicity by IL-4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J. Exp. Med.*, in press.
 - 15) Cui, J., Watanabe, N., Kawano, T., Yamashita, M., Kamata, T., Shimizu, C., Kimura, M., Shimizu, E., Koike, J., Koseki, H., Tanaka, Y., Taniguchi, M., Nakayama, T. : Inhibition of T helper cell type 2 cell differentiation and immunoglobulin E response by ligand-activated V α 14 natural killer T cells. *J. Exp. Med.*, 190 : 783~792, 1999.
 - 16) Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Sato, H., Kondo, E., Harada, M., Koseki, H., Nakayama, T., Tanaka, Y., Taniguchi, M. : Natural killer-like non-specific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated V α 14 NKT cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 : 5690~5693, 1998.
-