

研究報告書

「インバリアントナチュラルキラーT (iNKT) 細胞による炎症慢性化機構の解明と制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年3月～平成26年3月

研究者: 渡会 浩志

1. 研究のねらい

外来微生物やウイルス感染に対する生体防御反応とそれによってもたらされる炎症制御機構を解明することは免疫学におけるもっとも本質的な課題の一つであり、またその破綻によって引き起こされる慢性炎症を人為的に制御する上でも重要である。炎症は外的あるいは内的環境要因に対する生体の防御反応であると認識されている。しかしながら近年、これら疾患の局所において炎症細胞の浸潤と慢性的な炎症が観察され、それが組織変性と疾患の重症化の重要な要因となっていることが明らかになってきた。ところが、炎症の慢性化がどのような機序で組織変性や疾患の重症化をひきおこすのか、なぜ、通常は終息するはずの炎症反応が持続し慢性化するのかについては不明な点が多いのが実状である。また、生体の高次機能は免疫系-神経系-内分泌系などのネットワークを介した複雑系により成り立っているため、これらの時空間的な調節と炎症の慢性化との関連性を解明することも重要である。

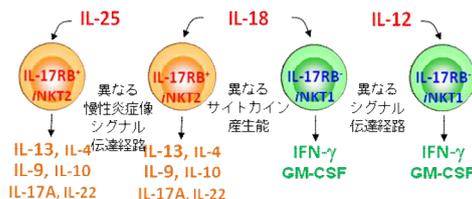
このような社会的要請の中、炎症のトリガーとなり得る自然リンパ球 (ILC: innate lymphoid cell) が脚光を浴びている。それは、その活性化によって即時的かつ大量のサイトカインを産生することで免疫系全体を支配し得るからである。本研究では ILC の中でも自然 Tリンパ球群に属する iNKT 細胞に着目した。iNKT 細胞は通常の T 細胞と異なり MHC クラス I 様抗原提示分子 CD1d に提示された糖脂質を認識する種を超えて進化的に保存されたユニークな免疫系を形成する T 細胞亜群で、限定された T 細胞抗原受容体 (TCR) を発現し、内在性糖脂質リガンドに常にさらされている状態にあるためメモリー化した状態にあり、反応の即時性ととも、種々のサイトカインやグランザイム、パーフォリンなどを産生する多機能性をも有することが知られている。これらの特徴から iNKT 細胞は自然免疫系と獲得免疫系の間に位置し(あるいは自然 Tリンパ球として獲得免疫系を調節することにより)、免疫系全体を制御・調節する役割を担っていると考えられている。したがって iNKT 細胞の異常な活性化や機能偏向は免疫系の異常や炎症の惹起をもたらすことが想定される。実際、Th1 型劇症肝炎や Th2 型アレルギー性喘息などにおいては iNKT 細胞がトリガーを担っているとの報告がある。

しかしながらこのような異なる免疫反応が iNKT 細胞によってどのようにしてもたらされるのかについては長い間不明であった。本さきがけ研究ではこれまで均一と考えられていた iNKT 細胞が機能的に異なる亜集団の集まりであることを見出し、各々の iNKT 細胞サブタイプの生体内での分化発生機構を明らかにするとともに、様々な炎症にどのように関与しているのかを明らかにすることで、慢性炎症病態形成メカニズム、特に細胞カスケードと分子機構について明確にする。そして、社会的要請の高い慢性炎症化機構の解明とその制御を目的として、iNKT 細胞によってもたらされる多彩な炎症惹起および終息反応に着目し、新たな治療戦略の方向づけの可能性を見出すことを主たる研究目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

研究者は iNKT 細胞が IL-12R と IL-25R を発現するキラー型 iNKT1 とヘルパー型 iNKT2 のサブタイプに大別できることを明らかにし、各々が胸腺内で別々の分化発生経路をたどって末梢に移行し、互いの可塑性を有さないことを明らかにした。両者は胸腺分化段階からケモカイン受容体の発現パターンが全く異なる(iNKT1: CXCR6 陽性、iNKT2: CCR4/7 陽性)ため、末梢組織局在性も大きく異なる(iNKT1: 肝臓、骨髄、脾臓、iNKT2: 肺、リンパ節、脾臓)。また iNKT1 と iNKT2 はそれぞれ IL-12 と IL-25 に反応し、iNKT1 からは IFN- γ や GM-CSF が、iNKT2 からは IL-13, IL-9, IL-10, IL-4, IL-17A, IL-22 が産生される。これらの知見をもとに、肺における iNKT2 の気道炎症の関与について確認したところ、OVA を疑似抗原としたアレルギー気道炎症モデルにおいて、IL-25 依存的な炎症反応が iNKT2 依存的にもたらされることを見出した。さらに、炎症性サイトカイン IL-18 が iNKT1、iNKT2 両方に反応性を有し、各々異なる炎症惹起反応を担うことを見出した。特に Respiratory Syncytial Virus (RSV) 感染においては、IL-18 依存的に iNKT2 が炎症のトリガーとなっていることを見出した。図に示すような試験管内で再現された両サブタイプの異なる機能発現メカニズムについて、シグナル伝達経路やエピゲノム状況を明らかにするだけでなく、特に新しく同定された iNKT2 にフォーカスして、生体内における機能、①アレルギー気道炎症モデル以外の病態との関連性とその発症機構の解明、②分化発生機構の解明、③GWAS 解析によるヒト疾患への関与の可能性などについて、事項に掲げるように詳細な解析を行い明らかとした。



(2) 詳細

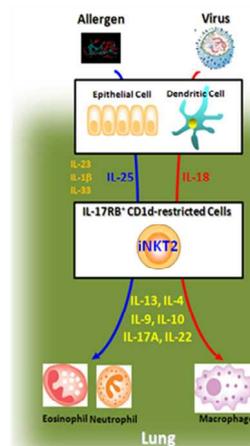
① iNKT2 細胞による RSV 感染気道炎症発症機構の解明

肺に局在が認められる iNKT2 は OVA を疑似抗原とした IL-25 誘発アレルギー性気道炎症惹起の中心を担う(さきがけ研究申請の契機)。他の非アレルギー喘息は、運動誘発性、アスピリン、大気汚染、ウイルス感染などその発症機構は複雑で、年齢によっても病態が異なるなど、多岐に渡るだけではなく、Th2 細胞を必要とせず、その大部分の発症機序は不明であった。しかしながら、1) センダイウイルスの感染によって引き起こされる喘息では、特に慢性化状態において、iNKT 細胞の活性化と肺胞マクロファージによる IL-13 産生の関与が重要であること(Nat Med 2008)、2) 大気汚染では、iNKT 細胞と好中球の活性化と IL-17 産生の関与が重要であること(J Exp Med 2008)、さらに、3) 重篤喘息患者やステロイド非感受性の患者においては、iNKT 細胞のリクルートとそれに続く好中球の活性化、IL-17 産生が指摘され(Nat Med 2009)、4) 慢性閉塞性肺疾患(COPD)においても iNKT 細胞の関与が疑われている(Nat Immunol 2010)など、非アレルギー喘息発症の重要な鍵を握っている細胞であると考えられる。

本研究では iNKT 細胞の中で新しく同定した iNKT2 が上記 1)~4) のモデルにおいて気道炎症のトリガーになり得るかを検証した結果、1) のウイルス感染モデルにおいて最も寄与が大きい結果を得た。さらに iNKT2 は週令が進むに伴って、肺あるいは脾臓に存在する数・割合ともが徐々に減少していくことを見出したため、小児喘息の起因ウイルスとして知

られる RSV をモデルとして、iNKT2 の気道炎症への関与を調べた。野生型 BALB/c マウス、*Il17rb* あるいは *Traj18*(iNKT 細胞) 欠損マウスに RSV(10^6 pfu)を 10 日おきに計 4 回経鼻感染させ、最初の 3 回の経鼻感染 4 日後に組換え体可溶化型 G 蛋白質(recGs)を腹腔内に免疫した。最後の RSV 感染翌日に recGs を経鼻投与し、その翌日に肺の気道圧、浸潤細胞、肺胞洗浄液中のサイトカインを観察した。野生型マウスにおいては RSV 感染群においてメサコリン誘発性の気道圧上昇が濃度依存的に観察されたのに対して、*Il17rb* あるいは *Traj18* 欠損マウスにおいては気道圧上昇は著しく低く、野生型 BALB/c マウスの RSV 非感染群のそれと同程度であった。浸潤細胞に関しては、RSV 感染野生群において全細胞数及び各細胞とも有意に多かったが、リンパ球・マクロファージが多く浸潤しているという結果が得られ、アレルギー性喘息で一般的に観察される好酸球・好中球浸潤とは異なる結果であった。肺胞洗浄液中のサイトカインに関しては IL-5 や IL-13 といった喘息で一般的に観察されるサイトカインの他に IL-9, 10, 17A, 22 といった炎症性サイトカインが RSV 感染野生群において有意に高かった。また、肺組織切片の H&E、PAS 染色の結果でも、RSV 感染野生群においてリンパ球浸潤と杯細胞からのムチン産生が観察された。さらに、*Traj18* 欠損マウスに iNKT2 を移入することで、RSV 誘発性の気道圧上昇が移入細胞数依存的に観察されることから、RSV 誘発性の気道炎症発症にも iNKT2 が深く関与していることが示された。

次に RSV 誘発性の気道炎症発症が IL-25 依存的か否かを検証するために、抗 IL-25 抗体投与による気道炎症の抑制の有無を検証したが、その関与が否定される結果であった。一方で、*Myd88* 欠損マウスでは、*Il17rb* あるいは *Traj18* 欠損マウスと同様に気道圧上昇は著しく低く、iNKT2 を移入することで、RSV 誘発性の気道圧上昇が移入細胞数依存的に観察されることから、iNKT2 の MyD88 下流のシグナルが深く関与していることが示された。MyD88 は Toll 様受容体、IL-1 ファミリー受容体のアダプターと知られるため、iNKT2 に発現するこれら受容体を検索したところ、IL-18 受容体が高発現であることを認めた。iNKT1 が Th1 サイトカインを産生するのに対して、iNKT2 は IL-18 に反応して Th2/17 サイトカインを産生することを見出した。IL-18 は当初 IL-12 と協調的に働いて T 細胞からの IFN- γ 産生を誘導する因子として報告され、*P. acnes* と LPS によって誘発される IFN- γ 依存性劇症肝炎モデルの炎症誘発因子であることが示されたが、その後の研究で IL-18 は従来と全く異なるメカニズムにより自然型アトピーや IgE、気管支喘息の誘導を引き起こすことも明らかにされ、種々のアレルギー反応の誘導にも寄与する多彩な生物活性を有するサイトカインであることが知られるようになった。IL-18 による iNKT 細胞からの IL-4 産生能についても報告があるものの、細胞ごとに異なる機能発現様式についての明確な説明はできていない。これまでの報告と本研究での知見を鑑みると、劇症肝炎モデルにおいては iNKT1 が、RS ウイルス感染モデルにおいては iNKT2 が IL-18 による炎症誘発の中心を担っていると想起される。入手した *Il18* あるいは *Il1r5*(IL-18 受容体 α 鎖) 欠損マウスや新たに樹立した *Il1r7*(IL-18 受容体 β 鎖)を用いて、詳細な解析を実施中である。

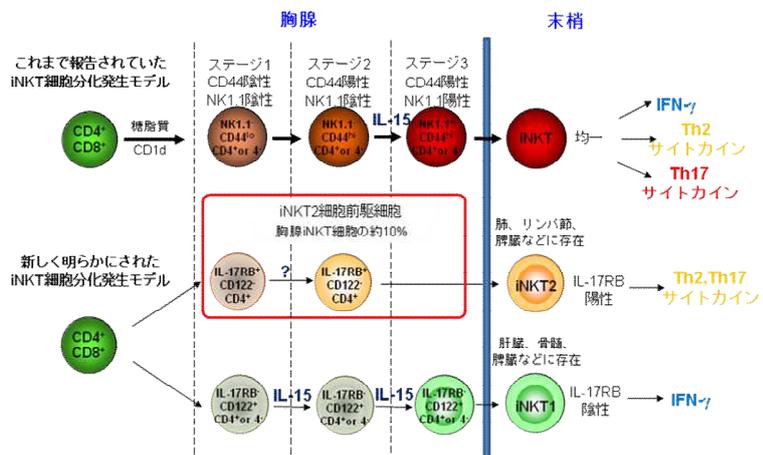


② iNKT サブタイプの分化発生機構の解明

iNKT 細胞は胸腺内で分化し、胸腺 CD4CD8 ダブルポジティブ(DP)から T 細胞決定系列と分岐し、CD44 陰性 NK1.1 陰性(ステージ 1)、CD44 陽性 NK1.1 陰性(ステージ 2)、CD44 陽性 NK1.1 陽性(ステージ 3)へと分化し、末梢に移行することが知られている。ステージ 2 において IL-4 産生能獲得、ステージ 3 において IFN- γ 産生能を獲得し、ステージ 2 から 3 への細胞の拡大には IL-15 が重要な役割を果たしていることが報告されている。

我々は、既に C57BL/6 マウス胸腺内に iNKT2 のマーカーである IL-17RB 陽性 CD1d 拘束性細胞が約 10%存在し、主にステージ 1 と 2 に局在することを見出した。すなわちステージ 1 及び 2 の 80%前後が IL-17RB 陽性で、ステージ 3 においては、1-2%程度が IL-17RB 陽性であった。また、*Il15* ミュータントマウスではステージ 3 の細胞が約 1/10 に激減しているのに対して、*Il17rb* 欠損マウスではステージ 3 は正常で、ステージ 1 及び 2 の細胞が約 1/5 に減っていた。さらに胸腺 IL-17RB 陽性 NKT 細胞は IL-15 受容体 β 鎖 CD122 が陰性で、iNKT1 のマーカーである CD122 は IL-17RB 陰性 NKT 細胞に発現が局在していた。CD4 と IL-17RB の発現を指標として iNKT ステージ 1 の細胞をソートし、胎児胸腺と組織培養を行うと、IL-17RB 陰性の iNKT 細胞はステージ 2 を経てステージ 3 へと IL-17RB 陰性 CD122 陽性 iNKT 細胞へと分化するのに対して、IL-17RB 陽性の iNKT 細胞はステージ 2 に分化しステージ 3 へは移行しないことが確認され、IL-17RB の発現も維持され、CD122 陰性であった。また、胸腺 iNKT 細胞(iNKT1 および iNKT2 前駆細胞)の遺伝子発現様式及びサイトカイン反応性、サイトカイン産生能は、末梢(脾臓)の iNKT1 および iNKT2 と一致する結果であり、iNKT2 細胞はこれまで知られていた iNKT1 の辿る細胞分化経路とは全く別に IL-15 非依存的に胸腺内で独自の経路で分化発生する、定常的に存在する可塑性のない細胞決定系列であることが示された。

今後、iNKT2 の分化発生様式に必須の分子群の同定、その細胞系列決定の解析や iNKT1 と iNKT2 の分岐点の解析を進めていく予定である。



③ GWAS 解析によるヒト疾患への関与の可能性

これまでの大規模なコンソーシアムベースの GWAS 解析の結果から、喘息に関連する複数の遺伝子が同定されている (*IL18R1*, *HLA-DQ*, *IL33*, *IL13*, *ORMDL3/GSDMB*, *IL2B*, *SMAD3*, *SLCA22A5*, *RORA* など)。しかしながら、iNKT2 のマーカーである *IL17RB* 遺伝子についてはこれまでのところ報告がなかった。そこでヒト *IL17RB* 遺伝子座に存在する一般的な 16 ヶ所の SNPs のうち 8 ヶ所について、対象をステロイド耐性小児喘息、ステロイド耐性成人喘息、アトピーと細分化し相互比較を行った。その結果、ヒト *IL17RB* 遺伝子座の 3' 非翻訳領域にステロイド耐性小児喘息特異的な SNP が一つ存在することを見出し

た。この SNP は対象患者において PPAR γ 結合部位に変換することから、翻訳調節に関わり得る可能性があり、現在転写制御解析を実施している。

④ 他の ILC(特にナチュラルヘルパー細胞に代表される ILC2)との相違

上記のように iNKT2 に関する新しい知見は本研究によって多くが見出された。しかしながら病態について俯瞰すると似て非なる他細胞(特に ILC2)とどのような類似点、相違点があるのかを明確にすることが炎症制御機構を明らかにする上でも重要である。ここでは他の研究で明らかにされた知見もまとめて、iNKT2 が ILC2 と非依存的あるいは協調して Th2 型炎症惹起(特に肺、幼少期)に関与し得ることを表にして示す。

	iNKT2細胞	ILC2細胞
出現時期	幼少期に多い	老齢期に多い
組織局在	肺、リンパ節	FALC ¹⁾
抗原特異性	糖脂質	なし
分化発生	胸腺、IL-7	骨髓?、IL-7
陽性表面抗原	CD45, Sca-1, Thy1, CD3, CD4, iNKT-TCR, CD44, CD25, CCR4, CCR7	CD45, c-Kit, Sca-1, Thy1, CD44, CD25
サイトカイン受容体	IL-7R, IL-18R1, IL-25R/IL-17RB	IL-7R, ST2/IL-33R, IL-25R/IL-17RB
サイトカイン反応性	IL-25 ²⁾ IL-18 ²⁾	IL-33 IL-25 ³⁾
サイトカイン産生能	IL-13, IL-9, IL-10, IL-4, IL-17A, IL-22	IL-13, IL-5, IL-6

両細胞間で共通するものを赤字で示す。
 太字は大規模GWAS解析によって喘息関連遺伝子として報告がある。下線IL-25R/IL-17RBは健常小児とステロイド非感受性小児喘息患者で相違のあるSNPを見出した。
 1) パバインやIL-33の投与、鉤虫感染によって肺にも出現。
 2) TCR共刺激が必要。
 3) IL-2との共刺激が必要。

3. 今後の展開

本さきがけ研究成果において、小児喘息の起因ウイルスとして知られる RSV 感染によって惹起される炎症反応が iNKT2 によってもたらされることをマウスで明らかとし、ヒト GWAS 解析によって iNKT2 のバイオマーカーである IL-17RB が小児喘息患者で有意差のあるシングルポリモルフィズムを見出した。したがって、実際にヒトで iNKT2 が RSV 感染時の炎症惹起細胞として機能しているかを明確にすることが重要である。

また、多彩な機能を有するサイトカインとして知られていた IL-18 が、細胞ごとに応答性が異なることが明確にされた。すなわち、IL-18 応答性は MyD88 依存的であるものの、これまでとは異なる受容体を介し、異なるシグナル伝達経路あるいはエピゲノム状態の相違によって制御され得ることを見出した。「似て非なる」iNKT1 と iNKT2 を詳細に比較検証することで、これまで不明であった IL-18 依存的な炎症誘発機構を明確化する。

一方で、他の ILC(特にナチュラルヘルパー細胞に代表される ILC2)との機能や病態との関連性について明確化することも重要である。iNKT2 も ILC2 も気道炎症の惹起を担うことが各々別箇に示されたが、組織局在性やサイトカイン応答性など、いくつかの点で異なることが示された(詳細④参照)。今後は、さらなる詳細な解析や両者が共に関与し得る炎症における互いの役割について詳細な解析が必要である。

4. 評価

(1) 自己評価

RSV 感染症は主に乳児に重篤な細気管支炎や肺炎を発症することがあり、細気管支炎を



発症した児が、後に喘鳴を繰り返すことがある、ということが明らかとなっている。また、1歳までに入院を要する重症のRSV下気道感染症に罹患した小児では、追跡調査により、7歳時に30%で気管支喘息を発症し明らかな喘息の発症を認めなくても68%の年長児に喘鳴を聴取したのに対して、RSVに罹患しなかった小児では、気管支喘息発症は3%に過ぎなかった、との報告もあることから、乳児期におけるRSV感染が気管支喘息を発症するリスクとして指摘されている。RSV感染による細気管支炎については、感染による気管支への直接的障害、感染の際に放出されるケミカルメディエーターなどの産生異常、免疫の異常反応などが考えられるが、その喘息発症の機序については詳細は不明のままであった。

本さがけ研究で、少なくともマウスRSVモデルにおいては、iNKT2とIL-18が責任細胞・分子の一端を担い得ることを示した。またiNKT2のバイオマーカーであるIL-17RBはヒト小児喘息の責任遺伝子であることをGWAS解析で明らかにした。これらの結果を統合して、今後は小児喘息における上皮細胞による気道炎症機構の詳細な解析や、iNKT2のヒトにおける分化発生機能獲得様式を明確にすることで、科学的で論理的な裏付けに基づいた治療戦略・個別医療への適応へと展開させることが重要である。

(2) 研究総括評価(公開項目)

多様な作用を有するiNKT細胞の本質的機能については、本細胞の発見からこれまで長らく捉え難かった。しかし、本研究においてiNKT細胞の発生・分化過程にまで遡る詳細な解析を行うことにより、これまでほぼ均質な細胞集団であると考えられていたiNKT細胞が、実は異なる種類のサイトカインを分泌するがIL-17RBを発現しない従来タイプのiNKT1細胞と、IL-17RBを発現する新たなiNKT2細胞との亜集団に分類できることを明らかにした。また、新たに同定したiNKT2細胞がウイルス感染による小児喘息の責任細胞であることの可能性をマウスモデルで示し、論文報告した。iNKT細胞の有する多様な機能に対する研究者の疑問に解を与えたことは高く評価される。今後は、IL17RB遺伝子座に見出したステロイド耐性小児喘息特異的なSNPとヒト疾患との関連性の追求や、iNKT細胞活性化シグナルの解析などから新たな治療戦略の基盤構築につながる成果が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Angkasekwinai P, Chang SH, Thapa M, Watarai H, Dong C. Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling. *Nature Immunology* 2010, 11(3):250-256.
2. Watarai H, Fujii SI, Yamada D, Rybouchkin A, Sakata S, Nagata Y, Iida-Kobayashi M, Sekine-Kondo E, Shimizu K, Shozaki Y, Sharif J, Matsuda M, Mochiduki S, Hasegawa T, Kitahara G, Endo T, Toyoda T, Ohara O, Harigaya KI, Koseki H, Taniguchi M. Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. *Journal of Clinical Investigation* 2010, 120(7):2610-2618.
3. Motomura Y, Kitamura H, Hijikata A, Matsunaga Y, Matsumoto K, Inoue H, Atarashi K, Hori S, Watarai H, Zhu J, Taniguchi M, Kubo M. E4bp4, a mammalian basic leucine zipper transcriptional factor, is a critical regulator of IL-10 and IL-13 production by CD4 T cells.

Nature Immunology 2011, 12(5):450-459.

4. Watarai H, Sekine-Kondo E, Motomura H, Yasuda T, Yoshida H, Kubo M, Koseki H, Taniguchi M. Development and function of invariant natural killer T cells producing T_H2- and T_H17-cytokines. *PLOS Biology* 2012, 10(2):e1001255.

5. Tarumoto N, Kinjo Y, Kitano N, Sasai D, Ueno K, Okawara A, Izawa Y, Shinozaki M, Watarai H, Taniguchi M, Takeyama H, Maesaki S, Shibuya K, Miyazaki S. Exacerbation of invasive *Candida albicans* infection by commensal bacteria or a glycolipid through IFN γ produced in part by iNKT cells. *Journal of Infectious Disease* in press.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 2件

1.

発明者: 渡会浩志、谷口克

発明の名称: 非アレルギー性気道炎症及び/又は非アレルギー性気道過敏症の治療薬

出願人: 理化学研究所

出願日: 2011/10/20

出願番号: US2011/321098

2.

発明者: 谷口克、渡会浩志、古関明彦、藤井眞一郎

発明の名称: iPS細胞由来アロNKT細胞を用いた免疫療法およびそのためのNKT細胞由来iPS細胞および該iPS由来NKT細胞のバンキング

出願人: 理化学研究所

出願日: 2011/12/2

出願番号: US2011/419064

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 招待講演

1. 渡会浩志、「ナチュラルキラーT(NKT)細胞による気道過敏性発症と炎症慢性化機構」第3回小児気道アレルギーフォーラム、福岡、2011/5/21

2. Watarai H, Sekine-Kondo E, Taniguchi M. “Development and function of invariant natural killer T cells producing T_H2- and T_H17-cytokines.” 6th International Symposium on CD1 and NKT cells, Chicago, USA, 2011/9/26

3. 渡会浩志、「気道過敏性発症に關与する炎症性ナチュラルキラーT細胞の機能と分化」第48回日本小児アレルギー学会・第16回アジア太平洋小児アレルギー呼吸器免疫学会合同学術大会、福岡、2011/10/28

4. Watarai H. Role of invariant natural killer T cells in the induction of airway hyperreactivity. 第41回日本免疫学会学術集会、神戸、2012/12/6

5. Watarai H. In vitro generation of iNKT cells with desired functions from iPSCs suitable for cancer immunotherapy. The Innovative Research Institute for Cell Therapy (IRICT) Spring Symposium, Seoul, Korea 2013/5/16

2. 著書

1. Taniguchi M, Fujii S, Nakayama T, Motohashi S, Dashtsoodol N, Watarai H. Mechanisms of NKT-cell-mediated adjuvant activity and function of iPS-derived NKT cells. *Natural Killer T cells* pp1-14 (2011).
2. Watarai H, Harada M, Tamari M, Taniguchi M. A role for natural killer T-cell subsets in the pathogenesis of various allergic disorders. *Inflammation and Allergy Drug Design* pp59-66 (2011).

3. プレスリリース

小児ぜんそくなどを引き起こす悪玉細胞の発生起源を解明 -アレルギー・炎症性疾患治療への応用に期待- 2012年2月8日 理化学研究所・科学技術振興機構