

NKT 細胞の糖脂質認識と免疫制御

三宅幸子

Immunoregulation by iNKT Cells

Sachiko MIYAKE

Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi-cho, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

(Received October 23, 2008)

NKT cells are defined as cells co-expressing of the natural killer receptors such as NK1.1 or NKR-P1A (CD161) and a T cell receptor (TCR). Although NK1.1⁺ TCR⁺ lymphocytes are heterogeneous, we focus on two distinct T cell subsets express invariant T cell receptor α chains, V α 14-J α 18 (V α 14i) and V α 19-J α 33 (V α 19i). V α 14i NKT cells (V α 24i NKT cells for human) are restricted by CD1d and V α 19i NKT cells (V α 7.2i NKT cells for human) are restricted by MR1 molecule. These cells emerge as a unique lymphocyte subset to bridge innate and acquired immunity. Here in this review, we discuss on the role of these cells in the regulation of autoimmunity and on the potential of therapeutic target for autoimmune diseases.

Key words—iNKT cell; glycolipid antigen; autoimmunity

1. はじめに

NKT 細胞は、NK マーカーを有する T 細胞の総称であり、拘束される抗原提示分子や、抗原特異性、使用されている T 細胞受容体 (TCR) の可変性などによって、いくつかのサブpopulation があることが知られている。その中で、CD1 拘束性で TCR α 鎖に可変性のない invariant 鎖 (マウスでは V α 14J α 18, ヒトでは V α 24J α 18) を発現する V α 14i T 細胞が最も解析が進んでいる。MR1 拘束性で invariant 鎖 (マウスでは V α 19J α 33, ヒトでは V α 7.2J α 18) を発現する V α 19i T 細胞も存在し、自己免疫との関連が報告されている。またこれら invariant 鎖を発現しない NKT 細胞も存在するが、解析が進んでいる 2 種の iNKT 細胞について、主に自己免疫病態への関与、治療応用への可能性などについて概説する。

2. V α 14i T 細胞の特徴2-1. 抗原提示分子と抗原 V α 14i T 細胞は、

限られた V β 遺伝子 (マウスでは V β 8.2, V β 7, V β 2, ヒトでは V β 11) と会合するため、TCR の可変性が乏しく、また主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I 類似の多様性のない CD1d 分子に提示された糖脂質を抗原として認識する。¹⁾ V α 14i T 細胞は、抗原受容体の半可変性、クローン性の増殖を必要とせず組織に多数存在し、すぐに反応を開始できることなどから自然免疫系と獲得免疫系の中間的存在として、様々な免疫の初期応答や調節に重要である。糖脂質抗原は、微生物などに由来するものと、内因性のものが報告されている。これまで内因性抗原としては、ガングリオシド GD3, Glycosylphosphatidylinositol (GPI), Phosphoethanolamine (PE) などが報告され、最近イソグロボシド (iGb3) が有力な抗原として示された。iGb3 が生成されると考えられる酵素を欠損したマウスでは V α 14i T 細胞が発生しないことから、iGb3 が内因性抗原の候補と考えられるが、生体内での分布など不明な点も多く、今後更なる検討がなされる。一方、外来抗原としては、Leishmania 由来の glycoinositol phospholipids (GIPLs) や lipophosphoglycan (LPG), Sphingomonas 由来の glycosphingolipid (GSL) などが報告されている。

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 (〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1)

e-mail: miyake@ncnp.go.jp

本総説は、日本薬学会第 128 年会シンポジウム S30 で発表したものを中心に記述したものである。

V α 14i T細胞は、はじめに同定された抗原が合成糖脂質であったことから、これまで V α 14i T細胞の研究には主に α -Galactosylceramide (α -GalCer) などの合成糖脂質が用いられてきた。²⁾ V α 14i T細胞の機能を研究するだけでなく、 α -GalCerは抗がん剤として治験がすすめられているほか、 α -GalCerの構造を基にして、様々な糖脂質を合成して V α 14i T細胞からの特定の機能を強く引き出す糖脂質を探索するという研究も進められている。

2-2. V α 14i T細胞の機能的特徴 機能的な特徴としては、TCRを介した刺激により IL-4, IFN- γ を含む多くのサイトカインを短時間で大量に産生することである。V α 14i T細胞は、マウスに抗 CD3抗体を投与すると、数時間後に血中で IL-4の上昇がみられるが、V α 14i T細胞はその際の IL-4の主要な産生細胞である。細胞当たりのサイトカイン産生能としても、V α 14i T細胞は *in vitro* で分化させた Th1, Th2細胞に匹敵する IFN- γ , IL-4産生能を持つ。V α 14i T細胞は、CD4-CD8-(DN)と、CD4陽性の細胞があるが、ヒトでは DNがマウスでは CD4陽性が多い。特にヒトでは、サブセットによるサイトカイン産生パターンが異なることが示されている。刺激によって、DN-iNKT細胞は IFN- γ , TNF- α といった Th1 サイトカインや細胞傷害活性に関与するタンパクが発現するが、CD4陽性細胞では Th2 サイトカインも産生する。生体内でこれらのサイトカイン産生は、状況に応じて調節されているようである。細菌感染などによって IL-12が上昇する環境では、iNKT細胞は Th1 サイトカインを選択的に産生するという報告がある一方、喘息患者の肺胞洗浄液中の iNKT細胞は IL-4や IL-13といった Th2 サイトカインを選択的に産生していることが報告されている。

3. V α 19i NKT細胞の特徴

ヒトの CD4陰性 CD8陰性の T細胞の解析で、V α 24i T細胞とともにインバリエント鎖を持つ T細胞として V α 7.2i T細胞は報告された。その後、Lantzらのよりマウスホモログである V α 19i T細胞は、腸管粘膜固有層やパイエル板に多く存在する細胞として、mucosal associated invariant T (MAIT)細胞として報告された。Lantzらは、V α 19i T細胞の発生が MHC class Ib分子である major histocompatibility molecule related 1 (MR1) 並びに B細胞に

依存することを明らかにした。一方 Shimamuraらは、CD1dノックアウトマウスでは数は激減するものの、NK1.1陽性 T細胞が肝臓に残存していることから、肝由来 NKT細胞ハイブリドーマの TCR解析を行い、その約半数(21中11)が V α 19i TCRを発現していることを報告した。また、彼らはその抗原として、 α -mannosylceramideを報告している。V α 19i T細胞の発生は、Transporters associated with Antigen Processing (TAP)非依存性であるが、抗原がペプチドなのか V α 14i T細胞のように糖脂質のような非タンパク質由来のものなのかについては、まだ議論が分かれている。V α 19i T細胞は無菌環境飼育では存在しないことから、V α 14i T細胞のように自己抗原を認識するよりも、腸内細菌由来の外来抗原を主に認識する可能性がある。

4. V α 14i T細胞の自己免疫病態における関与

4-1. 自己免疫疾患における V α 14i T細胞 ヒトの自己免疫疾患においては、進行性全身性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなどの全身性自己免疫疾患、多発性硬化症 (MS) のような臓器特異的自己免疫疾患のいずれでも V α 24i T細胞の減少が報告されている。³⁾ また、機能面での異常では全身性自己免疫疾患では、(α -GalCer)への反応の低下が報告されている。I型糖尿病患者では、末梢血での数について、変化があるとするものからないとするものまであり、議論がある。機能面では、V α 24i T細胞が IFN- γ を優位に産生し、Th1に偏倚しているという報告がある。MSでは、寛解期にある患者では、健康人と比較して減少しているが、再発期には V α 24i T細胞の減少はむしろ軽度であることが報告されている。この際、減少しているのは DN-V α 24i T細胞であり、CD4陽性 V α 24i T細胞は寛解期、再発時ともに減少していなかった。サイトカイン産生に関しては、DN-V α 24i T細胞では寛解期に IL-4, IFN- γ ともに産生の低下がみられたが、CD4陽性 V α 24i T細胞では寛解期にむしろ IL-4の産生亢進がみられた。これらの結果から、MS寛解期には IFN- γ などのサイトカインを産生する DN-V α 24i T細胞数が減少し、DN-V α 24i T細胞から産生されるサイトカインも減少し、残存している CD4陽性 V α 24i T細胞の IL-4産生能が上がっていることを考えると、MS寛解期において V α 24i T細胞は疾患を抑制するように働い

ていることが推定される。⁴⁾

4-2. V α 14i T 細胞の合成糖脂質リガンドを利用した自己免疫モデル治療の試み NKT 細胞を選択的に刺激するためには α -GalCer が汎用されている。NKT 細胞は IL-4 などの Th2 サイトカインを大量に産生できるため、 α -GalCer による NKT 細胞の活性化は、Th1 優位な臓器特異的自己免疫疾患を抑制することが期待された。しかし期待に反し、 α -GalCer は、NOD マウスにおける I 型糖尿病は抑制するが、多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)、関節リウマチの動物モデルであるコラーゲン関節炎 (CIA)、炎症性腸炎モデルなどの抑制効果は弱かった。³⁾ α -GalCer は、IFN- γ 遺伝子欠損マウスでは EAE を抑制することから、 α -GalCer が EAE に無効である理由は、NKT 細胞に Th1 抑制的な IL-4 だけでなく Th1 促進的な IFN- γ の産生を促すためであると考えられた。⁵⁾ タンパク抗原では、1つのアミノ酸を置換させることによって刺激の性質を変化させ、サイトカイン産生が変化することが知られている (Altered Peptide Ligand; APL)。APL は、多発性硬化症では臨床治験も行われたが、改善例とともに増悪例がみられ、残念ながら治験は中止となった。これは、抗原提示細胞の多型性を考慮しないペプチド設計に問題があったと考えられるが、CD1 には多型性がなく治療応用を考えると大きな利点がある。そこで、われわれは糖脂質抗原も構造を変化させると、サイトカイン産生を変化させることができるのではないかと考え、 α -GalCer の変異体を作成し、その 1つであるスフィンゴシン鎖を短縮した OCH では、IFN- γ の産生が低下し、IL-4 の選択的産生がみられた。⁶⁾ CD1 結合部位であるスフィンゴシン鎖の短縮体であるため、CD1 との結合安定性が α -GalCer より悪いことが予想される。スフィンゴシン鎖の長さを変えた変異体を用いて、CD1 との結合性を検討するとスフィンゴシン鎖の長さ、CD1 結合安定性は相関することが分かった。また、スフィンゴシン鎖の長さ、IFN- γ 産生刺激も相関した。NKT 細胞を固相化 CD3 抗体で刺激時間を変えながら刺激すると、IFN- γ 産生に必要な刺激時間は、IL-4 産生に必要な刺激時間より長い。このことから、スフィンゴシン鎖短縮体は、CD1 結合安定性が悪く、T 細胞受容体から刺激を入れる時間が短く

なるために IFN- γ 産生が起り難くなると考えられる。⁷⁾ それでは、なぜ IFN- γ 産生には IL-4 産生よりも長い刺激時間が必要なのか？ タンパク合成阻害剤を添加すると、IFN- γ のメッセージが誘導されなくなることから、IFN- γ のメッセージの誘導にはなんらかのタンパク合成が関与すると考えられる。そこで、 α -GalCer 若しくは OCH をマウスに投与後 NKT 細胞を分離し、 α -GalCer のみで誘導されて、OCH では誘導されない IFN- γ 発現に重要な遺伝子をマイクロアレイを用いて網羅的に検索し、c-Rel 分子が α -GalCer 刺激で選択的に上昇することが分かった。c-Rel は NF- κ B ファミリーに属する分子で、IFN- γ 発現に重要であることが知られている。c-Rel 分子のドミナントネガティブ変異体をレトロウイルスベクターを用いて NKT 細胞に導入すると、IFN- γ の産生は著しく抑制された。これらの結果から、OCH が Th2 サイトカインを選択的に産生させる分子機序を以下のように考えている。OCH は、CD1 分子との結合安定性が α -GalCer よりも劣るために、NKT 細胞に刺激を入れる時間が短くなる。そのため、IFN- γ の産生に必要な c-Rel の発現が十分に起こらない。また、IFN- γ も IL-4 も、サイクロスポリン A では発現誘導が抑制されることから、NFAT は、両サイトカインの産生に不可欠であるが、NFAT の核内局在は Ca 濃度に依存するため、刺激時間が短いと、NFAT の細胞内移行が起り易く、c-Rel とうまく協調して十分な IFN- γ 産生が起こらないのではないかと考えている。また、他のグループからは、CD1 との結合のみでなく、TCR とのコンタクトも OCH では弱く、TCR からはいる反応が短いという報告もある。In vivo に糖脂質を投与した際にみられる血清中の IFN- γ の上昇は、特に投与数時間以降 24-48 時間持続する後期については、NK 細胞などからの産生が重要であると考えられる。OCH を投与した場合は、NKT 細胞からの IFN- γ 産生が低く、また NKT 細胞上の CD40L の発現も弱いことから、抗原提示細胞からの IL-12 の産生が α -GalCer 投与と比べて低くなり、他の細胞が IFN- γ を産生するにいたるカスケードの形成が起こらないと考えられる。⁸⁾

OCH は、選択的 Th2 サイトカイン産生により、NOD マウスにおける I 型糖尿病のほか、EAE、CIA、炎症性腸炎モデルなどの臓器特異的自己免疫

モデル病態を抑制することが分かり、これらの疾患で治療薬としての開発が期待される。^{3,9,10)}

OCHの報告以来、いくつかの特徴ある合成糖脂質リガンドが報告された。例えば α -C-GalCerは、 α -GalCerよりも強い抗腫瘍活性を持つことが報告されている。³⁾ また、抗体誘導性関節炎を強く抑制する糖脂質をスクリーニングしたところ、スフィンゴシン鎖を5炭素鎖を伸長したものが、強い活性を持つことが分かった (SGL-S23)。SGL-S23の関節炎抑制作用は、IFN- γ 依存性であり、抗体誘導性関節炎においては、IFN- γ に強い抑制作用があることが分かった。また、SGL-S23による関節炎抑制には、滑膜組織に存在する肥満細胞の活性化抑制が関与するという興味深い結果が得られた。¹¹⁾ また、SGL-S23は、Oboalbumin免疫で誘導するアレルギー性気道炎症モデルにおいても、吸入時の投与で炎症を強く抑制することから、OCHとは異なる疾患スペクトラムにおいて治療効果が期待される。

5. V α 19i T細胞の自己免疫病態における関与

自己免疫疾患におけるV α 7.2i T細胞についての報告は、MSで調べられたものである。MS寛解期の末梢血では、V α 24i T細胞は減少しておりSSCP法では検出が困難であったが、V α 7.2i T細胞は全例において検出可能であり、MSの髄液でも11例中8例で検出されている。また剖検脳検体では、他疾患では6例中1例に検出されたのみだが、MSでは全例で検出されている。このようにV α 7.2i T細胞は、自己免疫や炎症局所で容易に検出されることから、腸管に限局した細胞ではなく広く炎症に関与する細胞であることが推定される。

動物モデルでは、V α 19i TCRのトランスジェニックマウス (V α 19i TCR Tg) と、V α 19i T細胞が存在しないMR1ノックアウトマウスを用いて解析した。¹²⁾ V α 19i TCR Tgでは、MSの動物モデルであるEAEは野生型マウスと比較して軽症化した。さらに、V α 19i TCR Tg/CD1d^{-/-}マウスからNKT細胞 (V α 14i T細胞が存在しないので、V α 19i T細胞が多く含まれると想定される) を移入すると、EAEは軽快した。一方、V α 19i T細胞が存在しないMR1ノックアウトマウスでは、EAEが増悪した。以上のことから、V α 19i T細胞はEAEを抑制する細胞であることが分かった。

中枢神経由来抗原に対するT細胞の反応では、

増殖反応は差がみられないが、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17などのサイトカインは減少し、EAEを抑制することが知られているIL-10が増加していた。IL-10の増加はEAEを誘導した脾臓B細胞でもみられた。Girilfillanらのグループも、V α 19i TCR Tgを作製し、IL-10産生の増加を報告しており、V α 19i T細胞の機能にはIL-10がキーサイトカインである可能性が高い。¹²⁾

6. 結び

V α 14i T細胞は、多くの研究に非生理的な抗原である α -GalCerが用いられていることや、その役割が様々であるために、生体内での機能を包括的に理解することは簡単ではない。一方、V α 14i T細胞の様々な機能を選択的に引き出す糖脂質の合成が世界各国で行われており、自己免疫やアレルギーなどの免疫疾患に臨床応用可能な薬剤となる可能性があり期待したい。

REFERENCES

- 1) Miyake S., Yamamura T., *Cur. Top. Microbiol. Immunol.*, **314**, 251–267 (2007).
- 2) Kawano T., Cui J., Koezuka Y., Toura I., Kaneko Y., Motoki K., Ueno H., Nakagawa R., Sato H., Kondo E., Koseki H., Taniguchi M., *Science*, **278**, 1626–1629 (1997).
- 3) Miyake S., Yamamura T., *Int. Rev. Immunol.*, **26**, 73–94 (2007).
- 4) Araki M., Kondo T., Gumperz J. E., Brenner M. B., Miyake S., Yamamura T., *Int. Immunol.*, **15**, 279–288 (2003).
- 5) Pal E., Tabira T., Kawano T., Taniguchi M., Miyake S., Yamamura T., *J. Immunol.*, **166**, 662–668 (2001).
- 6) Miyamoto K., Miyake S., Yamamura T., *Nature*, **413**, 531–534 (2001).
- 7) Oki S., Chiba A., Yamamura T., Miyake S., *J. Clin. Invest.*, **113**, 1631–1640 (2004).
- 8) Oki S., Tomi C., Yamamura T., Miyake S., *Int. Immunol.*, **17**, 1619–1629 (2005).
- 9) Chiba A., Oki S., Miyamoto K., Hashimoto H., Yamamura T., Miyake S., *Arthritis Rheum.*, **50**, 305–313 (2004).
- 10) Mizuno M., Masumura M., Tomi C., Chiba S., Oki S., Yamamura T., Miyake S., *J. Autoimmun.*, **23**, 293–300 (2004).
- 11) Kaieda S., Tomi C., Oki S., Yamamura T.,

Miyake S., *Arthritis Rheum.*, **56**, 1836–1845 (2007).

12) Croxford J. L., Miyake S., Huang Y.-Y.,

Shimamura M., Yamamura T., *Nat. Immunol.*, **7**, 987–994 (2006).