MBL Immunology News

No. 4

July 2012

# 糖脂質の免疫学：NKT細胞

監修：千葉大学大学院医学研究院
千葉大学未来医療教育研究センター
教授　中山　俊憲　先生
准教授　本橋　新一郎　先生

## NKT細胞の発見

2011 年のノーベル生理学・医学賞の対象となった自然免疫系は、パターン認識型受容体が病原体に共通した構造を認識することで、迅速な生体防御を達成しています。自然免疫系が発動されると、更に抗原に対してより高い特異性と親和性を有する獲得免疫系が T 細胞や B 細胞によって誘導されます。この自然免疫系と獲得免疫系の中間的な役割を担う細胞の一つとして NKT 細胞が知られ、いまアレルギーやがんなど様々な分野で大いに注目されています。

NKT 細胞は、T 細胞抗原レセプター (TCR) と NK レセプターを共発現する細胞で、CD1 分子を認識する新たなリンパ球として 1990 年代に同定されました[1]。日本では、谷口克先生 ( 独立行政法人理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター・センター長 ) らを中心に研究が進んできました。NKT 細胞の存在様式は通常の T 細胞と異なり、肝臓、骨髄に多く分布します。リンパ節や脾臓などのリンパ組織にはあまり存在していません。TCR のレパトアにも特徴があります。NKT 細胞は、T 細胞と同様に TCR を介して抗原を認識しますが、その多様性は乏しく (invariant)、マウスでは、α鎖は Vα14、β鎖は Vβ8.2、Vβ7、Vβ2、ヒトではα鎖は Vα24、β鎖は Vβ11 だけが知られています ( 図 1)。このことから NKT 細胞は、invariant NKT 細胞とも呼ばれています ( 以下 iNKT 細胞と略称します )。iNKT 細胞上の TCR が認識する抗原も型破りで、通常の T 細胞とは異なり、糖脂質を認識します[2]。ヒトの iNKT 細胞もげっ歯類の iNKT 細胞も、種を超えて同じ糖脂質抗原を認識することから、iNKT 細胞による糖脂質の認識は生体防御において根幹的な役割を持っていると考えられています ( 糖脂質抗原については後述 )。

## iNKT 細胞の働き

iNKT 細胞は IFN-γと IL-4、すなわち Th1 細胞ならびに Th2 細胞の両方のタイプのサイトカインを大量に産生することから、感染免疫、アレルギー、腫瘍免疫など、多様な疾患に幅広く関与していることが指摘されています。最近では、IL-17RB を発現する新規の NKT 細胞が、喘息患者に多くみられる気道過敏性に寄与していることが報告されています[3]。さらに、IL-17RB 陽性 NKT 細胞は CD4 の発現の有無で 2 種のサブセットに分類されます。CD4 陽性のサブセットは IL-25 刺激によって Th2 サイトカインの IL-13、Th9 サイトカインの IL-9 と IL-10、そして Th17 サイトカインの IL-17a と IL-22 を産生します。一方、CD4 陰性のサブセットは RORγt 陽性であり、IL-23 刺激によって Th17 サイトカインを産生します。特に前者は肺に多く存在し、ウイルス誘発性の気管支炎に関係していると報告されています[4]。

また全身性強皮症、全身性エリテマトーデス (SLE)、関節リウマチなどの自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎の患者では、iNKT 細胞の血中数が減少していることから、これら疾患の病因にも iNKT 細胞の

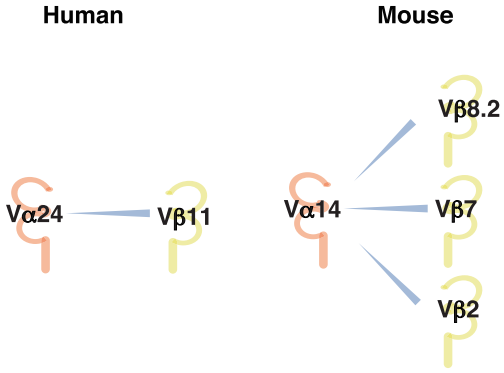


図 1　ヒトとマウスの iNKT 細胞に発現する invariant TCR の組合せ

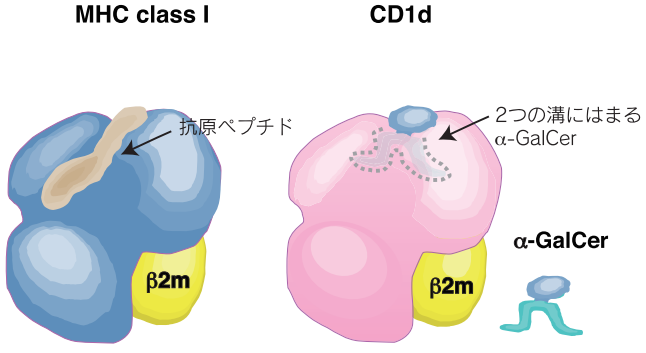


図2　MHC class I/ペプチド抗原複合体と、CD1d/α-GalCer複合体の模式図

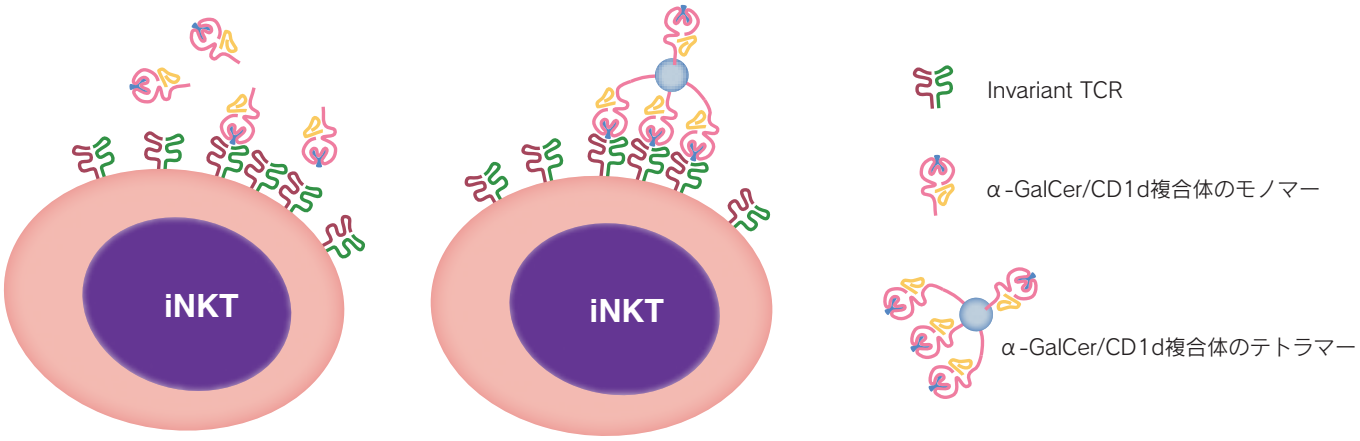


**図3　α-GalCer/CD1dは、モノマーだとinvariant TCRとの結合を維持できないが、テトラマーなら離れにくく検出が容易になる**

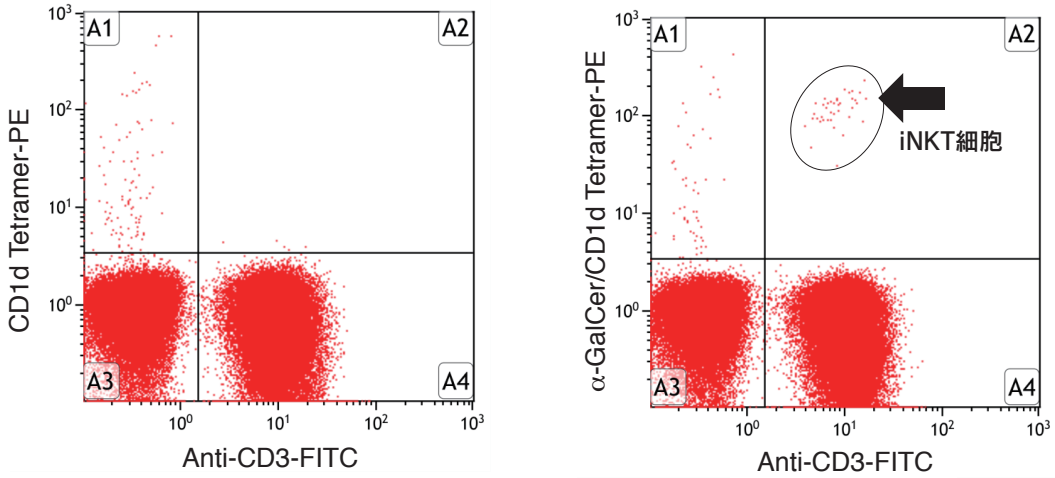


**図4　α-GalCer/CD1d tetramerによるiNKT細胞の検出**

関与が示唆されています[5–9]。さらにがん患者の患部では、腫瘍に集積するiNKT細胞の数と質が予後に相関することが報告されています[10, 11]。

## iNKT細胞の抗原

iNKT細胞の抗原として実験で最も利用されるのは海綿から抽出したスフィンゴ糖脂質のα-Galactosylceramide (α-GalCer) です[2]。内因性抗原としては、リソソームの構成因子であるイソグロボトリヘキソシルセラミド (iGb3) が有力視されていましたが[12]、ヒトではiGb3は存在しません。一方、外因性抗原としては*Sphingomonas*属細菌や*Borrelia*属細菌などの特定の細菌由来の糖脂質を認識することが報告されていますが[13–15]、その詳細は不明です。しかし、ついに2011年に致死性の高いグラム陽性菌である肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*) および B群連鎖球菌 (Group B *Streptococcus*) が持つ糖脂質が外因性抗原として特定されました。加えて、iNKT細胞の活性化には、糖だけでなく脂肪酸 (バクセン酸) も重要であることが明らかになりました[16]。

## MHCクラスI様糖タンパク質CD1

糖脂質を抗原として提示できるユニークなMHCクラスI様糖タンパク質としてCD1分子が知られています[17, 18]。CD1分子とMHCクラスI分子の立体構造が良く似ており、共にβ2ミクログロブリンを結合しますが、抗原結合部位の構造が異なります。MHCクラスI分子は、親水性ペプチドの結合に適した親水性の溝構造をもつのに対し、CD1分子は、疎水性の深い2つの溝構造となっており、糖脂質のアルキル鎖が結合しやすい構造をしています[19] (図2)。CD1分子はさらに細かく、グループ1 (CD1a、CD1b、CD1c) とグループ2 (CD1d) に分類することができます。ヒトには両方のグループのCD1分子が存在しますが、マウスやラットにはグループ2のCD1分子 (CD1d) しか存在しません。iNKT細胞はこのグループ2に属するCD1dと糖脂質の複合体を特異的に認識します。

## iNKTの検出とCD1dテトラマー

テトラマーとは、たとえば細胞表面の受容体に結合するリガンド分子を四量体化させた複合体を指します。免疫学の分野ではMHCクラスI分子のテトラマーが最も有名です。一般に、MHC/ペプチド複

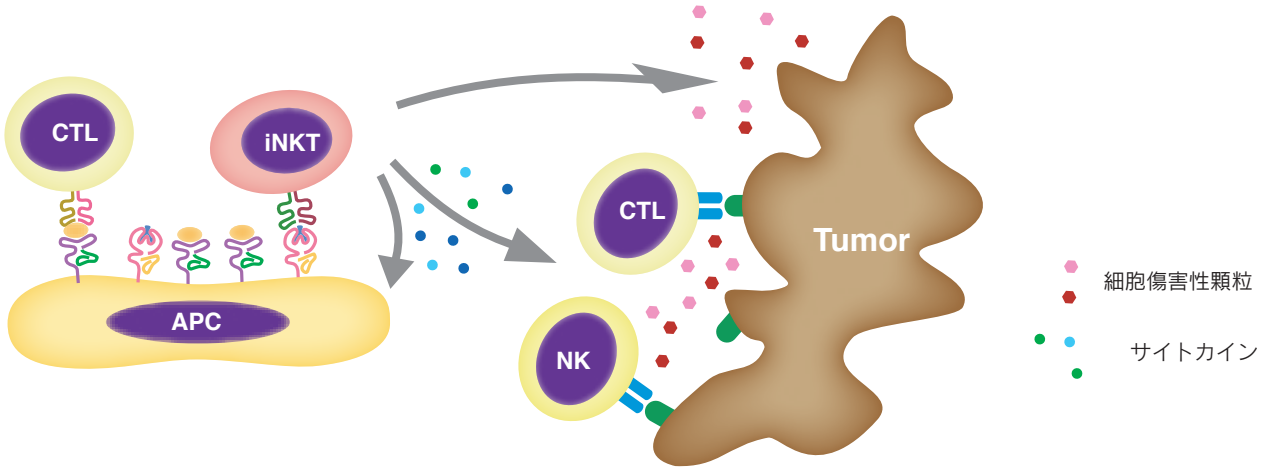


**図5　活性化されたiNKT細胞は細胞傷害性顆粒で直接、サイトカインでCTLやNK細胞を介して間接的にがん細胞を攻撃する**

合体やCD1d/リガンド複合体がTCRと結合する親和力は低く、両者の結合状態を維持することは困難です。そこで、MHC分子と抗原の複合体を人工的に四量体化することによって、対象となるTCRに対する結合力を増強させ、特定のTCRを発現するT細胞あるいはNKT細胞を検出することができます。(図3、図4)。

α-GalCer/CD1dテトラマーは、iNKT細胞だけと反応することから、最も正確にiNKT細胞を検出できる方法と考えられています。実際にCD1dテトラマーあるいはTCRに対する抗体を反応させた細胞集団をそれぞれ比較してみると、検出される細胞の割合が一致しないことが報告されています[20]。

なお、当社は米国のBeckman Coulter, Inc. よりMHCテトラマー試薬の国内開発・販売に関する独占的なライセンスを受けています。

## iNKT細胞のがん免疫療法

近年、iNKT細胞を用いたがん免疫療法が行われるようになりました。この方法には幾つかの利点があります。まず、iNKT細胞は、人工的に合成したα-GalCerで活性化できるため、活性化の制御が容易です。また、α-GalCerにより活性化されたiNKT細胞は、複合的な抗腫瘍効果が期待できます。がんに対する直接的な作用としては、パーフォリンやグランザイムなどによる細胞傷害活性が挙げられます。また、間接的な作用としては、大量に産生されるIFN-γ等のサイトカインや樹状細胞の成熟化に伴うIL-12産生などによる、NK細胞やCD8陽性T細胞の働きを増強するアジュバント効果が挙げられます(図5)。すなわち、自然免疫活性化療法とCTL療法の良いところを兼ね備えた方法ともいえます。

千葉大学の本橋新一郎先生、中山俊憲先生のグループでは、2001年より肺がんを対象とした2種類の臨床試験を進めています[21]。一つは、患者末梢血から誘導した樹状細胞にα-GalCerをパルスした後、再び体内に戻すことでiNKT細胞を活性化させる樹状細胞療法です。樹状細胞投与後にIFN-γを産生する細胞数の増加が見られた症例においては、同反応が見られなかった症例よりも全生存期間の延長が確認されています[22]。本治療法は厚生労働省より第3項先進医療(高度医療)として認定されています(2012年3月現在)。もう一つは、iNKT細胞の機能回復を目指し、*in vitro*で増殖させたiNKT細胞を体内に投与する方法です。さらに、千葉大学・耳鼻咽喉科の岡本美孝先生と共同で頭頸部がんに対しても、同様な臨床試験が進められて、肺がん同様に良好な結果が報告されています[23-25]。

## 終わりに

iNKT細胞は発見当初その生理的な活性化物質は不明であったものの、その機能が多岐にわたることは予想されていました。現在進行中の臨床応用例としては糖脂質リガンドを用いた免疫活性化を利用したがん治療が着目されていますが、近年発見された感染症病原菌由来のリガンドを考えると、NKT療法は病原性微生物感染の治療などにも大いに寄与するかもしれません。また、NKT細胞は様々な炎症反応を促進する方向に働くことから、自己免疫疾患やアレルギーなどに見られる過剰な免疫反応を抑制するアプローチの一環として、NKT細胞の働きや増殖を制御する方法の開発も待たれます。

References

1) Taniguchi M, Harada M, *et al.*, The regulatory role of Vα14 NKT cells in innate and acquired immune response. Annu. Rev. Immunol. 21, 483–513 (2003), PMID: 12543936
2) Kawano T, Cui J, *et al.*, CD1d-restricted and TCR-mediated activation of Vα14 NKT cells by glycosylceramides. Science 278, 1626–1629 (1997), PMID: 9374463
3) Terashima A, Watarai H, *et al*, A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. J. Exp. Med. 205, 2727–2733 (2008), PMID: 19015310
4) Watarai H, Sekine-Kondo E, *et al.*, Development and function of invariant natural killer T cells producing TH2- and TH17-cytokines. PLoS Biology 10, e1001255 (2012), PMID: 22346732
5) van der Vliet HJ, von Blomberg BM, *et al.*, Circulating Vα24+ Vb11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. Clin. Immunol. 100, 144–148 (2001), PMID: 11465942
6) Sumida T, Sakamoto A, *et al.*, Selective reduction of T cells bearing invariant Vα24JαQ antigen receptor in patients with systemic sclerosis. J. Exp. Med. 182, 1163–1168 (1995), PMID: 7561690

7) Sumida T, Maeda T, *et al.*, TCR AV24 gene expression in double negative T cells in systemic lupus erythematosus. Lupus 7, 565–568 (1998), PMID: 9863902
8) Kojo S, Adachi Y, *et al.*, Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18+, BV11+ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases. Arthritis Rheum. 44, 1127–1138 (2001), PMD: 11352245
9) Oishi Y, Sakamoto A, *et al.*, CD4-CD8- T cells bearing invariant Vα24JαQ TCR α-chain are decreased in patients with atopic diseases. Clin. Exp. Immunol. 119, 404–411 (2000), PMID: 10691910
10) Tachibana T, Onodera H, *et al.*, Increased intratumor Vα24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. Clin. Cancer Res. 11, 7322–7327 (2005), PMID: 16243803
11) Metelitsa LS, Wu HW, *et al.*, Natural killer T cells infiltrate neuroblastomas expressing the chemokine CCL2. J. Exp. Med. 199, 1213–1221 (2004), PMID: 15123743
12) Zhou D, Mattner J, *et al.*, Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. Science 306, 1786–1789 (2004), PMID: 15539565
13) Mattner J, Debord K, *et al.*, Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. Nature 434, 525-529 (2005), PMID: 15791258
14) Kinjo Y, Wu D, *et al.*, Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. Nature 434, 520–525 (2005), PMID: 15791257
15) Kinjo Y, Tupin E, *et al.*, Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. Nat. Immunol. 7, 978–986 (2006), PMID: 16921381
16) Kinjo Y, Illarionov P, *et al.*, Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. Nat. Immunol. 10, 966–974 (2011), PMID: 21892173
17) Zajonc DM, and Kronenberg M, CD1 mediated T cell recognition of glycolipids. Curr. Opin. Struct. Biol. 17, 521–529 (2007), PMID: 17951048
18) Schiefner A, and Wilson IA, Presentation of lipid antigens by CD1 glycoproteins. Curr. Pharm. Des. 15, 3311–3317 (2009), PMID: 19860680
19) Moody DB, Zajonc DM, *et al.*, Anatomy of CD1-lipid antigen complexes. Nat. Rev. Immunol. 5, 387–399 (2005), PMID: 15864273
20) Kita H, Naidenko OV, *et al.*, Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. Gastroenterology 123, 1031–1043 (2002), PMID: 12360465
21) Motohashi S, Okamoto Y, *et al.*, Anti-tumor immune responses induced by iNKT cell-based immunotherapy for lung cancer and head and neck cancer. Clin. Immunol. 140, 167–176 (2011), PMID: 21349771
22) Motohashi S, Nagato K, *et al.*, A phase I-II study of α-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. J. Immunol. 182, 2492–2501 (2009), PMID: 19201905
23) Uchida T, Horiguchi S, *et al.*, Phase I study of α-galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells administration to the nasal submucosa in unresectable or recurrent head and neck cancer. Cancer Immunol. Immunother. 57, 337–345 (2008), PMID: 17690880
24) Kunii N, Horiguchi S, *et al.*, Combination therapy of *in vitro*-expanded natural killer T cells and α-galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. Cancer Sci. 100, 1092–1098 (2009), PMID: 19302288
25) Yamasaki K, Horiguchi S, *et al.*, Induction of NKT cell-specific immune responses in cancer tissues after NKT cell-targeted adoptive immunotherapy. Clin. Immunol. 140, 167–176 (2011), PMID: 21185787

## 関連製品

| コードNo. | 製品名 | 標識 | 容量 | 希望納入価格(税別) |
|---|---|---|---|---|
| **Tetramer** | | | | |
| TS-HCD-1 | T-select Human CD1d Tetramer | PE | 50 tests | ¥145,000 |
| TS-HCD-2 | T-select Human CD1d Tetramer | APC | 50 tests | ¥145,000 |
| TS-MCD-1 | T-select Mouse CD1d Tetramer | PE | 50 tests | ¥145,000 |
| TS-MCD-2 | T-select Mouse CD1d Tetramer | APC | 50 tests | ¥145,000 |

| コードNo. | 製品名 | クローン | アイソタイプ | 使用法 | 容量 | 希望納入価格(税別) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Antibody, Human** | | | | | | |
| IM-1588 | Anti-TCR Vα24 (Human) mAb | C15 | Mouse IgG1 | FCM | 100 µg | ¥39,800 |
| IM-1582 | Anti-TCR Vβ11 (Human) mAb | C21 | Mouse IgG2a | FCM | 100 µg | ¥39,800 |
| IM-3450 | Anti-CD161 (Human) mAb-PE | 191B8 | Mouse IgG2a | FCM | 50 tests | ¥65,000 |
| A83481 | Anti-CD3 (Human) mAb | UCHT1 | Mouse IgG1 | FCM | 100 tests | ¥50,000 |
| A83479 | Anti-CD4 (Human) mAb | SFCI12T4D11(T4) | Mouse IgG1 | FCM | 100 tests | ¥50,000 |
| IM-0398 | Anti-CD4 (Human) mAb | 13B8.2 | Mouse IgG1 | FCM | 200 µg | ¥43,000 |
| A83480 | Anti-CD8α (Human) mAb | SFCI21Thy2D3(T8) | Mouse IgG1 | FCM | 100 tests | ¥50,000 |
| IM-0102 | Anti-CD8α (Human) mAb | B9.11 | Mouse IgG1 | FCM | 200 µg | ¥43,000 |
| 6602705 | Anti-CD56 (Human) mAb | N901(NKH-1) | Mouse IgG1 | FCM | 100 tests | ¥50,000 |
| **Antibody, Mouse** | | | | | | |
| 731978 | Anti-CD3ε (Mouse) mAb | 145-2C11 | Hamster IgGκ | FCM | 500 µg | ¥33,000 |
| 731986 | Anti-CD3ε (Mouse) mAb | 500-A2 | Hamster IgG | FCM | 500 µg | ¥33,000 |
| 731990 | Anti-CD3ε (Mouse) mAb | C363.29B (YCD3-1) | Rat IgG2c | FCM | 500 µg | ¥34,000 |
| 732284 | Anti-NK1.1 (Mouse) mAb | PK136 | Mouse IgG2aκ | FCM | 500 µg | ¥43,000 |
| *Coming soon* | Anti-IL-17RB (Mouse) mAb | B5F6 | | | | |
| *Coming soon* | Anti-IL-17RB (Mouse) mAb | 3H8 | | | | |

*その他標識の抗体もあります

テトラマー試薬の最新情報は、MBL研究用試薬ウェブサイトにてご覧いただけます　MBL　テトラマー　検索

Copyright © 2012 MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD. All Rights Reserved.

2012.09　151085-19101000

製造販売元
MBL 株式会社 医学生物学研究所
A JSR Life Sciences Company　https://ruo.mbl.co.jp/
◎ LSTR事業部
〒105-0012
東京都港区芝大門2丁目11番8号 住友不動産 芝大門二丁目ビル
TEL : 03-6854-3614　E-mail : support@mbl.co.jp