

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 神田 真聡

学位論文題名

Invariant natural killer T 細胞における interferon-gamma 産生の分子機序の解明
(Molecular mechanism of interferon-gamma production in invariant natural killer T cells)

【背景と目的】 CD1d 拘束性に糖脂質を認識して活性化される invariant NKT (iNKT) 細胞は、IFN- γ などのサイトカインを迅速かつ大量に産生する特徴をもち、初期免疫応答の initiator として重要である。しかしながら、iNKT 細胞がすみやかにかつ大量の IFN- γ を産生する分子機序についてはまだ十分に明らかになっていない。本研究では、スクリーニングから Basic helix-loop-helix, family member e40 (Bhlhe40) が、iNKT 細胞による IFN- γ 産生の分子機構に関わる候補因子である可能性を見出し、*Bhlhe40*^{-/-}マウスを用いて、iNKT 細胞の持つ迅速かつ大量の IFN- γ を産生の分子メカニズムが明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】本研究では Lenti-XTM 293T (Clontech Laboratory)、B16 (ATCC)、EL-4 (理研バイオリソースセンター) を購入して使用した。また、野生型 (C57BL/6) マウスは日本 SLC より購入して用いた。*Bhlhe40*^{-/-}マウスおよび、*Ja18*^{-/-}マウスおよび NKT クローンマウスは既報告で作製されたものを用いて行い、*Bhlhe40*^{-/-}×NKT クローンマウスは *Bhlhe40*^{-/-}マウスと NKT クローンマウスを自家交配して作製した。なお、動物の取り扱いは「北海道大学動物実験に関する規定」に則り、北海道大学の動物実験倫理審査の承認を受け行った。また、遺伝子組み換え操作に関しては、「北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定」を遵守し行った。T-bet negative iNKT 細胞は独自に開発した培養法によって、野生型マウスの脾臓から、TCR β ⁺ CD1d- α -GC dimer⁺ CD4⁺ IL17RB⁺を分離し、骨髄由来樹状細胞と共に α -CD3/CD28 Abs、IL-2/IL-7 存在下で *in vitro* 培養したものをを用いた。

【結果】iNKT 細胞の IFN- γ 産生に関与する分子を抽出するために、マイクロアレイデータベースおよびレンチウイルスによる short hairpin RNA を用いたスクリーニング解析を行い、*Bhlhe40* に注目した。まず、生理的な *Bhlhe40* の発現を検討し、iNKT 細胞では CD4⁺ T 細胞や CD8⁺ T 細胞と比較して、*Bhlhe40* の発現量が多く、IFN- γ 産生能の高い developmental stage 3 の胸腺 iNKT 細胞や、CD4⁺ IL-17RB⁺ iNKT 細胞 (iNKT1) において *Bhlhe40* の発現量が多いことが分かった。更に、iNKT 細胞では *Bhlhe40* の発現量は α CD3/CD28 Abs による TCR 刺激により増加するが、日内リズムによる変化はないことが示された。次に野生型マウスと *Bhlhe40*^{-/-}マウスにおいて iNKT 細胞の分化・成熟への影響を検討した。胸腺・肝臓・脾臓において iNKT 細胞の頻度に違いは認められず、iNKT 細胞サブセット、胸腺 iNKT 細胞の developmental stage には野生型と *Bhlhe40*^{-/-}マウス間に明らかな差がないことが示された。さらに iNKT 細胞の Ly49 ファミリーの発現および胸腺 DP 細胞の CD1d と SLAMF1 の発現にも異常は認められず、*Bhlhe40* 欠損による iNKT 細胞の分化・成熟への明らかな異常は認められなかった。次に、*in vitro* で TCR 刺激による iNKT 細胞の IFN- γ 産生能および、*in vivo* で α -galactosylceramide を投与し、IFN- γ の細胞内染色および、血清 IFN- γ の時間経過による変化を評価し、*Bhlhe40* 欠損による IFN- γ の産生の低下を確認した。一方で iNKT 細胞の産生するそのほかのサイトカインとして IL-4 の産生も

評価したが、*Bhlhe40* 欠損による IL-4 の産生は影響を受けなかった。さらに、*in vivo* メラノーマ転移モデルを用いて、*Bhlhe40* 欠損による *iNKT* 細胞における IFN- γ の産生の低下は、*iNKT* 細胞のもつ生理的機能の一つである抗腫瘍効果を抑制した。これらの結果を受け、*Bhlhe40* がどのような分子機構により IFN- γ 産生を制御するのかにつき検討した。レポーターアッセイにより *Ifng* プロモーター活性を検討したが、*Bhlhe40* 単独では活性に変化はなく、TCR 刺激の下流シグナルの NF- κ B や NFAT の転写因子の働きにも変化を与えなかった。このことから、他の転写因子の補因子として働くと考え、T-bet という転写因子に注目し、*iNKT* 細胞における T-bet と *Bhlhe40* の共免疫沈降を行った。生理的条件下において T-bet と *Bhlhe40* の結合を認め、TCR 刺激により *Bhlhe40*/T-bet の結合が増強された。さらに、*Bhlhe40* を *Tbet* とともに強制発現することにより、*Ifng* プロモーター活性が上昇することが示され、*Bhlhe40* は T-bet を介して IFN- γ 産生を増強すると考えた。さらに、*Bhlhe40*/T-bet 相互作用の影響を *iNKT* 細胞における *Ifng* 領域のクロマチン免疫沈降で評価し、*Bhlhe40* は *Ifng* 領域の T-bet 結合領域に集積していること、T-bet negative *iNKT* ではその集積が低下することが示された。さらに、クロマチン構造に与える影響を検討し、*iNKT* 細胞の *Ifng* 領域におけるヒストン H3-K9 アセチル化が *Bhlhe40* 欠損によって低下することが示された。さらに、T-bet が結合しない *Ii4* 領域のクロマチン構造に変化は認められなかった。これらの結果から、*Bhlhe40*/T-bet 複合体は *Ifng* 領域におけるヒストン H3-K9 アセチル化を変化させ、IFN- γ の産生を増強させていることが示唆された。

【考察】*iNKT* 細胞の特徴の一つが、刺激にすばやく応答して大量の IFN- γ を産生することであり、この機能が障害されると様々な疾患の原因になるとされる。しかし、これがどのようなメカニズムで起こっているのかは明らかとなっていなかった。本研究では、*Bhlhe40* がこの *iNKT* 細胞の持つ特徴的な IFN- γ 産生において重要な働きを担うことを示した。*Bhlhe40* 欠損は *iNKT* 細胞の活性化に伴う IFN- γ 産生に影響を与え、*Bhlhe40* が T-bet の補因子として働き、*Ifng* プロモーターの活性にかかわることを示した。*iNKT* 細胞において、*Bhlhe40* 欠損は *Ifng* 領域のヒストン H3-K9 アセチル化に変化をもたらし、*Bhlhe40*/T-bet 複合体が *Ifng* 領域のヒストン H3-K9 アセチル化に重要であることを示した。*Bhlhe40* は元来転写抑制因子として働くことが知られていたが、他の転写因子の補因子として転写制御を行うという報告や、転写活性化作用も有することが報告されていた。また、T-bet は CBP/P300 と結合して、*Ifng* 領域のヒストン H3-K9 アセチル化に関与すると報告されている。これらのことから、*Bhlhe40* も T-bet-CBP/P300 複合体に関与する可能性も示唆されるが、それについては今後の検討が必要である。また既報告では、*Bhlhe40* の発現には日内リズムがあるといわれていたが、*iNKT* 細胞および CD4⁺T 細胞の *Bhlhe40* の発現の日内リズムは認められなかった。このことは *iNKT* 細胞の働きが日内リズムの影響を受けないこと示唆していると考えられる。本研究では *iNKT* 細胞における *Bhlhe40*/T-bet 複合体による IFN- γ 産生の分子メカニズムを明らかにし、*iNKT* 細胞における *Bhlhe40* の働きを明らかにすることを介して、今後腫瘍免疫や自己免疫疾患を含むさまざまな疾患の病態解明の一助になると考える。

【結論】本研究では、*Bhlhe40* は IFN- γ 産生能を持つ *iNKT* 細胞 (*iNKT1* および胸腺 Stage 3 *iNKT*) において発現が高く、*Bhlhe40* 欠損は *iNKT* 細胞の分化・成熟に影響を与えないが、IFN- γ の産生の低下をもたらし、抗腫瘍効果を抑制した。これらの機序には、*Bhlhe40* が T-bet に結合し、*Ifng* 領域のヒストン H3-K9 アセチル化を制御すること関与することを示した。これらの検討から、*iNKT* 細胞における *Bhlhe40* による IFN- γ 産生メカニズムを明らかにした。