

末梢リンパ球の全能性とその応用

若尾 宏

体細胞核移植によって作製されたクローン動物の多くは種々の成長/機能異常を呈することが報告されているが、ナチュラルキラー T (NKT) 細胞由来のクローンマウスは正常に成長し、生殖能力にも問題はなかった。野生型マウスと NKT 細胞由来クローンの交配から生まれた子孫のうち、NKT 細胞特異的な遺伝子再構成済み T 細胞抗原受容体 (TCR) 遺伝子座をその対立遺伝子の片方に有するものでは NKT 細胞数とその割合が顕著に増加していた。また、この子孫由来の NKT 細胞の機能は野生型のそれに非常に近いものであり、従来のトランスジェニックマウス由来 NKT 細胞とは異なっていた。これらマウスは NKT 細胞の分化様式の研究に新たな光を当てるモデルとなりうる。

我々は NKT 細胞核を未受精卵に核移植することにより核移植胚性幹細胞 (ntES 細胞) を樹立し、ここから NKT 細胞を高効率かつ大量に分化誘導することに成功した。これら NKT 細胞は個体への移入により自立的に成熟し、その免疫制御能発揮に必須であるサイトカインを産生するとともに、抗原特異的なアジュバント効果を発揮した。従って NKT 細胞をヒト ES 細胞から分化誘導することができれば、これを細胞治療/再生医療に結びつけることが可能と考えられる。

はじめに

これまで数多くのクローン動物が体細胞核移植によって作製されてきたが、これらクローンが終分化した細胞由来であるという直接的証拠は希薄であった。我々は末梢に存在する T リンパ球の一種である NKT 細胞の核が未受精卵への移植により全能性を発揮し、クローンを生み出すことを示した¹⁾。この事実より終分化した細胞においてもその核は全能性を保持していることが証明された。NKT 細胞の全能性については先に本誌ミニレビューにて解説済みであるので今回改めて記載しない (『生化学』, 第 79 巻第 5 号, 446-449, 2007)。

ここでは、このクローンから生まれた子孫を利用して長い間議論の的であった NKT 細胞の分化様式について一

の解答を示し得たことと、クローン由来の子孫においては NKT 細胞数が増大していることをヒントに NKT 細胞から核移植によって ntES 細胞を樹立し、これを出発点として機能を有する NKT 細胞の大量産生に成功したこと、およびその将来の細胞治療ならびに再生医療への応用の可能性について述べたい。

1. 新規モデルマウス (ノックアウトでもトランスジェニックマウスでもないマウス)

これまでに実験で使用されているマウスは大きく分類してある遺伝子を組織特異的にまたは全身で高発現するトランスジェニックマウス、もしくは特定遺伝子を欠失させたノックアウトマウスである。これに対して今回我々が作製したクローンマウスの子孫は遺伝子再構成済みの NKT 細胞特異的 TCR α 鎖遺伝子座をその片方の対立遺伝子に有するものである (図 1)。従前の研究においてクローンマウスの子孫についての記述があるものは希少で、特に T リンパ球由来クローンの子孫に関しては皆無といってよい。T リンパ球における TCR は通常 α/β 鎖の組み合わせもしくは γ/δ 鎖の組み合わせから成る。NKT 細胞 TCR は α/β

北海道大学院医学研究科環境医学分野 (〒060-8638 札幌市北区北 15 条西 7)

Totipotency of the peripheral lymphocyte and its application
Hiroshi Wakao (Environmental Biology, Graduate School of Medicine Hokkaido University, W7N15 Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan)

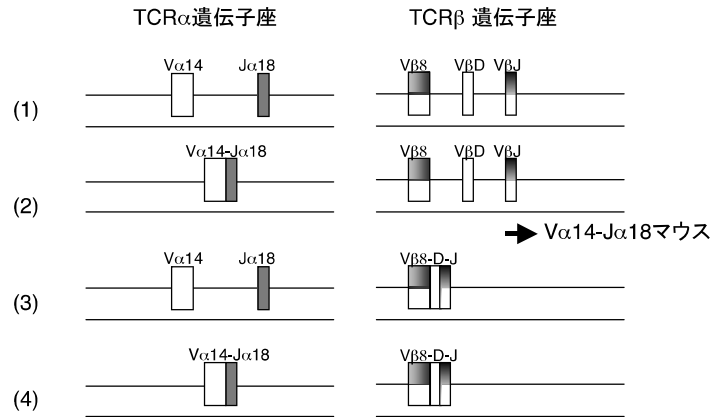


図1 野生型マウスとNKT細胞由来クローンマウスとの掛け合わせで生じるTCR α 遺伝子座とTCR β 遺伝子座におけるV α 14, J α 18およびV β 遺伝子座の対立遺伝子の模式図

- (1) 遺伝子再構成済み（インフレーム）のTCR α 遺伝子座もTCR β 遺伝子座も持たない対立遺伝子を有するマウス
- (2) 片方の対立遺伝子に遺伝子再構成済みV α 14-J α 18遺伝子座を有するマウス（V α 14-J α 18マウス）。実験に使用したV α 14-J α 18マウスはこのマウスと野生型マウスとの間で十分にバッククロスをかけてある。
- (3) 片方の対立遺伝子に遺伝子再構成済みTCR β 遺伝子座を有するマウス。このマウスではTCR β 鎖の対立遺伝子排除が観察された。
- (4) 対立遺伝子に遺伝子再構成済みV α 14-J α 18遺伝子座ならびに遺伝子再構成済みTCR β 遺伝子座を有するマウス。このマウスにおいてもTCR β 鎖の対立遺伝子排除が観察された。

鎖から成り、その α 鎖はほぼ一義的であってマウスの場合にはV α 14-J α 18ヒトの場合はV α 24-J α 18である。一方、 β 鎖においても通常のTリンパ球と異なり、そのレパトワー^{脚注*}における使用頻度の偏りが観察され、V β 8, 7, 2が主に使用されている。NKT細胞由来クローンマウスはそのゲノムDNAにおいてTCR α 鎖遺伝子座および β 鎖遺伝子座において遺伝子再構成が終了した配列を有しており、これらは独立してその子孫に遺伝する。すなわちクローンマウスの子孫においては遺伝子再構成済みTCR α 鎖遺伝子座を片方の対立遺伝子に持ったもの、遺伝子再構成済みTCR β 鎖遺伝子座を片方の対立遺伝子に持ったもの、遺伝子再構成済みTCR α 鎖および β 鎖遺伝子座を対立遺伝子に持ったもの、遺伝子再構成済みのTCR遺伝子座をその対立遺伝子に持たない場合が存在する（図1参照）。これらのうち、遺伝子再構成済みのTCR β 鎖遺伝子座を片方の対立遺伝子に持った子孫においては、これまでTCR β トランスジェニックマウスにおいて示されているよ

うに対立遺伝子排除、すなわちあるTCR β 鎖が正しく（インフレームで）発現すると、このマウスではもう一つの対立遺伝子からのTCR β 鎖レパトワーの発現が著しく抑制され、ほぼ単一のTCR β 鎖発現のみが観察された。これはBリンパ球からES細胞を経て作製されたマウスおよびその子孫で、片側の対立遺伝子に遺伝子再構成済みの重鎖遺伝子座を有するマウスにおいても見られる^{2,3)}。

TCR β 鎖発現における対立遺伝子排除とは対照的にTCR α 鎖はこの排除を受けず、両対立遺伝子上での発現が保証されるため、しばしばTリンパ球上において2種類のTCR α 鎖の発現が観察される。また、通常のTリンパ球由来TCR α 鎖トランスジェニックマウスにおいてもこのような対立遺伝子排除は観察されない⁴⁾。これはBリンパ球分化の場合と異なりTリンパ球分化においては、T細胞レセプターの発現のみでは遺伝子再構成を停止させることができないためと考えられている。Tリンパ球の分化過程においてTCR β 鎖発現はTCR α 鎖発現に先行し、一旦発現すべきTCR β 鎖の種類が決定されてしまうと、細胞はこの運命決定を覆すことができない。しかし、Tリンパ球分化過程後半である胸腺中でのダブルポジティブすなわちCD4, CD8分子を両方発現するステージではたとえ遺伝子再構成によって正常な（インフレームである）TCR α 鎖ができたとしても、それは正の選択（positive selection）によって別のTCR α 鎖に置換されうる。これを遺伝子再再

*レパトワーとは抗原受容体の抗原結合部位の特異性を決定する可変部の集合体の中でB細胞ではV遺伝子とJ遺伝子（軽鎖の場合）またはV遺伝子、D遺伝子およびJ遺伝子（重鎖の場合）の様々な組み合わせからなる。一方、T細胞ではV遺伝子とJ遺伝子（ α 鎖の場合）またはV遺伝子、D遺伝子およびJ遺伝子（ β 鎖の場合）の様々な組み合わせからなる。

構成 (further rearrangement または secondary rearrangement) と呼ぶが、これは胸腺上皮細胞による T リンパ球の正の選択が終了するかその細胞がアポトーシスによって死滅するまで継続する。この機構により TCR α 鎖は対立遺伝子排除を示さないと考えられている。

ところが驚くべきことに NKT 細胞由来クローンマウスの子孫ではその遺伝子再構成済み TCR α 鎖 (V α 14-J α 18) は対立遺伝子排除とまでは至らないものの、他の T リンパ球レパトワーに比較して有為にその割合および NKT 細胞数が増加しており、V α 14-J α 18 という組み合わせは遺伝子再構成によって除去され難いと言える。興味深いことに遺伝子再構成済み V α 14-J α 18 を片方の対立遺伝子に持つマウスにおいては、TCR γ / δ 鎖の発現はその細胞数ならびに TCR α / β 鎖との数量比が野生型マウスとほぼ同一であった。これは TCR γ / δ 鎖および他の TCR レパトワーの発現が別の対立遺伝子から起こっていることを示唆するものである⁵⁾。TCR α 鎖トランスジェニックマウスにおいては TCR γ / δ 鎖においても TCR α 鎖の異所性の発現が観察されるが、上記遺伝子再構成済み V α 14-J α 18 を有するマウスにおいてはこのような現象は見られなかった。このことから遺伝子再構成済み V α 14-J α 18 遺伝子座はもう一つの対立遺伝子からの T リンパ球発現に格別影響を与えるものではないことが推察される。

2. 外部刺激による前駆(幹)細胞分化決定様式について

(1) 外部刺激が細胞分化に及ぼす影響とその様式について

ある幹細胞の分化決定は外部刺激ならびにその内在性のプログラムによって複雑に決定されている。これまでの研究で外部刺激が幹細胞分化に及ぼす様式には大きく 2 種類存在することが示されている。一つは外部刺激が幹細胞に直接働きかけ、幹細胞から分化する細胞を一義的に決定するもので、この時生ずる分化細胞は 1 種類のみである。別の言葉で言い換えると、外部刺激が幹細胞に作用して他の分化細胞生成を犠牲にして、特定の分化細胞を生じさせるものである。このような外部刺激による分化決定の様式を誘導的系列決定 (instructive mechanism) と言う (図 2A)。これに対して幹細胞が外部刺激に依存せずに種々の分化細胞を生成し、その中で外部刺激に反応し、生存・増殖できたものだけが選択されるという分化の様式がある。この場合、生成された種々の分化細胞のうち、外部刺激によってその生存が保証されなかったものはアポトーシスなどで死んで行く。この外部刺激による分化決定様式は自律的系列決定 (autonomous mechanism) と呼ばれる。また、結果として外部刺激に反応する分化細胞のみが生存し、選択されることから選択的系列決定 (selective mechanism) とも称される (図 2B)⁶⁾。

誘導的系列決定の具体例は *C. elegance* において生殖アンカー細胞から産生される上皮細胞増殖因子 (EGF) 様シグナルが陰門前駆細胞の運命を決定すること、また *Drosophila* においては R8 光受容体に結合する膜貫通型リガンドである BOSS が前駆細胞をグリア細胞に誘導するのか、光受容体細胞に誘導するのかを決定する^{7,8)}。これらの例は自己複製能を有する幹細胞の運命決定に関わるものではないが、これらの知見はより分化の進んだ各種前駆細胞の運命決定がどのように外部刺激によって制御されているか考える上で重要である。

上記の例とは対照的に脊椎動物における造血系でのこれらの分化様式の貢献度は混沌として常に議論的となってきた^{9,10)}。例えば、不死化した血液系前駆細胞に *bcl-2* を強制発現させると、この前駆細胞はサイトカインの非存在下で各種血液細胞を生じ、サイトカインという外部刺激が選択的に血液細胞の系列決定を行っていることが示唆された¹¹⁾。また、赤血球系サイトカインであるエリスロポエチン (EPO) の受容体を骨髄由来の細胞に強制発現させたところ EPO を添加することにより赤血球、顆粒球、マクロファージ、巨核球などのコロニー形成が観察され、EPO には前駆細胞を赤血球系細胞に一義的に分化させる誘導的系列決定能力が無いことが示唆された¹²⁾。また、顆粒球系のサイトカインである顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の受容体を発現させたトランスジェニックマウスにおいては顆粒球系のみのは発生は観察されず、種々の前駆細胞が形成された¹³⁾。この結果もまた EPO の例で示したように G-CSF には前駆細胞を顆粒球系細胞に一義的に分化させる誘導的系列決定能力が無いことを示唆している。

ではサイトカインは常に前駆細胞の運命決定において誘導的には作用しないのであろうか? この問いに対しては神経冠細胞におけるサイトカインの神経細胞分化決定への作用は誘導的であることが示されている。骨形成タンパク質 2 (BMP-2)、グリア細胞成長因子 (GGF)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF)- β のうち、BMP-2 は神経冠細胞のニューロンへの分化を、また GGF はシュワン (グリア) 細胞への、そして TGF- β は平滑筋細胞への分化を誘導的に決定している^{14,15)}。また、毛様体神経栄養因子 (CNTF) は中枢神経幹細胞に誘導的に作用し、そのアストロサイトへの分化を誘導する¹⁶⁾。

この血液系と神経系におけるサイトカインの作用様式の違いは何に由来するのであろうか? 単純に血液系サイトカインはその前駆細胞の運命決定に対して選択的(自律的)に働き、神経系サイトカインは前駆細胞の運命決定に誘導的に作用するということなのであろうか? この問いは従前から繰り返されてきたものであるが、現在に至るまでに明快な解答は得られていない。

さて、この問いに答える前に、サイトカインなどの外部

刺激が前駆細胞の運命決定にどのように作用するのかを調べるために用いられてきた手法について考察する必要がある。上記に記載したとおり、これらの解析手法としてはサイトカインやその受容体の強制発現（ウイルスなどによる異所性発現やトランスジェニックマウス作製を含む）や逆にこれらの遺伝子を欠損させたノックアウトマウス利用などが挙げられる。しかしながらこれらモデルから解析できることはサイトカインやその受容体の強制発現やそれらの遺伝子欠損によって、結果的に現れた表現型のみが観察されるということである。例えば、EPO 受容体ノックアウトマウスでは確かに赤血球数の著しい低下が観察されるが、赤血球前駆細胞数は野生型とほとんど変わらない¹⁷⁾。この事実はEPOがその共役受容体の非存在下では赤血球前駆細胞分化において誘導的には作用しないことを示唆するのみで、共役受容体存在下でも同様に作用することを保証するものではない。一方、G-CSF 受容体強発現で観察されたように顆粒球コロニー以外のコロニー産生はG-CSFが顆粒球前駆細胞分化において誘導的に作用する可能性を全て否定するものでなく、異所性に発現されたG-CSF 受容体によって元来起こりえない顆粒球コロニー以外のコロニー産生が起きているとも考えられる。

どうしてこのような混乱が起こるのであるのか？ これは強制発現や遺伝子欠損の系ではシグナル分子の発現亢進もしくは欠失により観察される事象が最終的なアウトプットのみであってその途上についてはブラックボックス化されているためと考えられる。また、BMP-2, GGF, TGF- β などの神経系サイトカインが誘導的にその前駆細胞の分化決定に作用することが証明されているのに対して、血液系サイトカインの前駆細胞への分化決定様式が解析し難い理由として、各前駆細胞の分裂速度の違いを挙げることができる。BMP-2による神経冠細胞からのニューロン分化では細胞分裂は約24時間周期で起こるのに対して、血液やリンパ球前駆細胞の細胞分裂周期は数十分ということもあり得る。この分裂速度の違いは外部刺激による前駆細胞の分化決定様式研究に重大な影響を及ぼす。すなわち、血液系サイトカインがたとえ当初その前駆細胞分化に誘導的に働いたとしても、その分裂速度が非常に速いことから、ある一定時間が経過してしまうと、観察している分化細胞が外部刺激により誘導的に生成された集団なのか、それとも選択的に作用した結果としての集団なのかの区別ができなくなる（図3）。これまで血液系/リンパ球系細胞におけるサイトカインの作用様式につき多くの混乱や誤解があった原因の一端はこの分裂速度にあると言える。

(2) 外部刺激による幹（前駆）細胞分化決定様式における混乱と誤解

ここでこれまでの研究で細胞分化決定様式において誘導

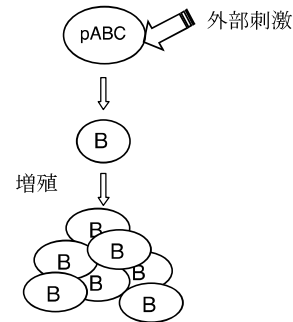


図2 誘導的系列決定と自律的（選択的）系列決定

図2A 誘導的系列決定の模式図

この図では前駆細胞（幹細胞）pABCは外部刺激によってBという系列の細胞に分化誘導されるが、この時A, Cという細胞は生じない。また別の系ではAもしくはC系列細胞のみが分化誘導されてもよい。この時もB, CおよびA, B系列の細胞は誘導されないことに注意する必要がある。

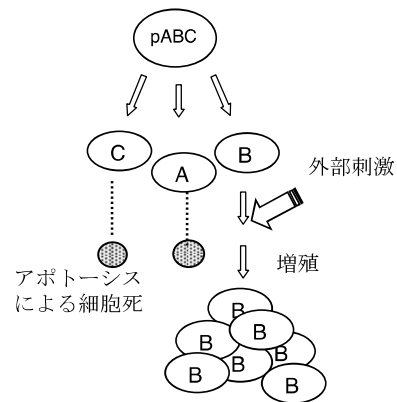


図2B 自律的（選択的）系列決定の模式図

誘導的系列決定とは異なり、外部刺激はそれ自身では系列細胞への分化には直接関与しない。この場合pABCは外部刺激とは無関係にA, B, Cという3種類の系列細胞を生じさせる。この図では外部刺激は生じてきた3種類のうちB系列細胞のみの生存/増殖を保証し、それ以外のA, C系列細胞はアポトーシスで消失する。

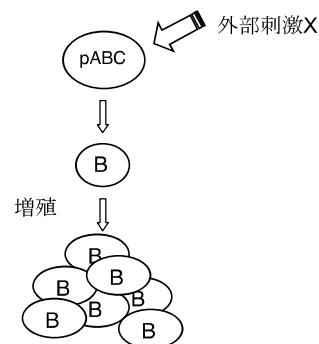


図2C 確定的な誘導的系列決定の模式図

この場合pABCの系列決定は誘導的に行われるが、外部刺激Xは常に100%の確率を以てB系列細胞のみを生じさせる。また別の系ではAもしくはC系列細胞のみが100%の確率を以て分化誘導されてもよい。

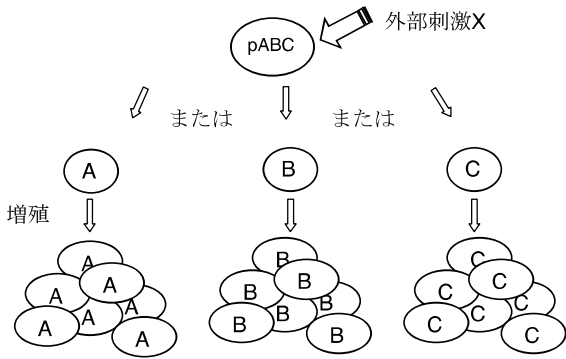


図 2D 確率的な誘導的系列決定の模式図
 ここでは pABC の系列決定は誘導的に行われるが、外部刺激 X はさいころを振る場合のようにランダムに A 系列細胞のみを、あるいは B 系列細胞のみを、またあるいは C 系列細胞のみを誘導する。この場合、外部刺激のアウトプットは確率的に決定されている。

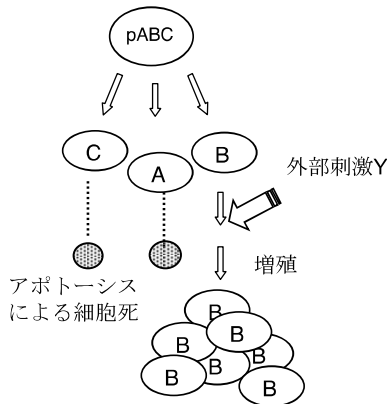


図 2E 確定的な自律的（選択的）系列決定の模式図
 pABC は外部刺激とは無関係に A, B, C という 3 種類の系列細胞を生じさせるが、ここで外部刺激 Y は常に（100% の確率を以て）B 系列細胞のみの生存／増殖を保証する。外部刺激 Y はいかなる場合も A, C 系列細胞の生存／増殖を保証しない。

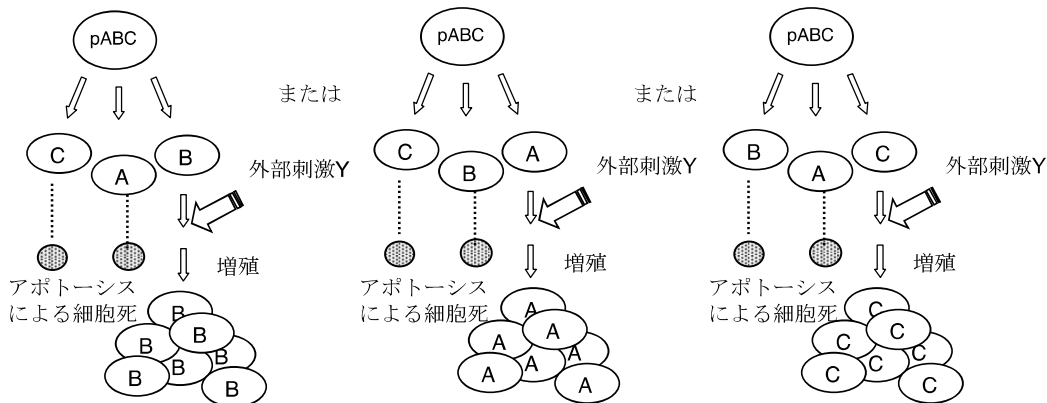


図 2F 確率的な自律的（選択的）系列決定の模式図
 pABC は外部刺激とは無関係に A, B, C という 3 種類の系列細胞を生じさせるが、外部刺激 Y はランダムに（確率的に）A, B, C 系列細胞のうち、いずれかのみを生存／増殖を担保する。確定的系列決定とは異なり、外部刺激 Y によるアウトプットはさいころを振る場合のように決定される。

的という用語と選択的（自律的）という用語が如何に誤用されてきたか述べたい。さらに誘導的／自律的系列決定の両者において外部刺激（環境因子）が幹（前駆）細胞の分化方向を確定的に決定する場合と確率的に決定する場合の二通りが存在することを示す（図 2C～F）。

血液系サイトカインなどは上記したようにどちらかという前駆細胞の運命決定において選択的に作用することが示唆されているが、これは強制発現や遺伝子欠損モデルを使用したデータに基づくものである。従って以下に示す如く、ある遺伝子の強制発現やその欠損によってある外部刺激が B ではなく A という細胞系列を誘導する場合にはその解釈に十分な注意が必要である。

Notch1 は T 細胞系列の分化決定において重要な役割を果たす。Notch1 のトランスジェニックマウスでは本来 T 細胞が存在しないはずの骨髄中で T 細胞が観察されるのに対して、血球系特異的な Notch1 のノックアウトマウスでは胸腺中にほとんど T 細胞が存在せず、代わりに B 細胞が分化していた¹⁸⁾。この結果から Notch1 が単なる成長因子として働く以外、何らかの生理作用を有していることが示唆されるが、果して Notch1 は T 細胞の前駆細胞に誘導的に作用してこのような表現型を呈するのか、あるいは Notch1 はただ単に T 細胞に分化すると決定した T 細胞前駆細胞の生存を補助しているのかは区別できない。

T 細胞分化における抗原受容体の役割についても多くの研究がなされてきた。T 細胞抗原受容体 (TCR) α 鎖欠損マウスでは T 細胞分化はダブルポジティブ段階で中断してしまい、TCR からのシグナルが重要な役割を果たしていることが分かる¹⁹⁾。しかしこの場合、TCR 複合体形成が T 細胞分化に誘導的に作用するのかそれとも自律的に作用するのかは不明である。TCR β 鎖と pT α 鎖ならびに CD3 ϵ 鎖からなるプレ TCR 複合体の形成が $\alpha\beta$ T 細胞分化に誘導的に作用するとの仮説が出されているが、T 細胞が $\alpha\beta$ 型へ

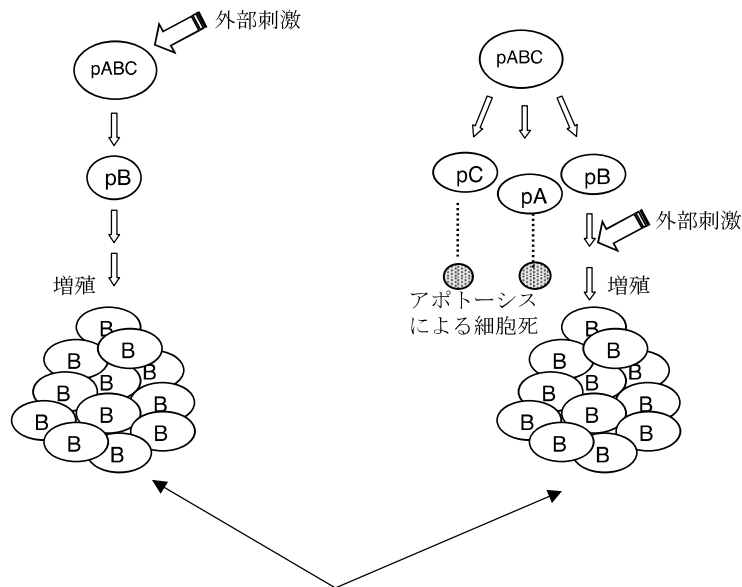
分化するのか $\gamma\delta$ 型へ分化するのかは既に TCR 遺伝子再構成以前に決定されているとの説もあり、これに則れば T 細胞の分化は自律的に決定されていることになる^{20,21}。

T 細胞の $\alpha\beta$ 型もしくは $\gamma\delta$ 型への分化における外部刺激の作用様式の問題と同様に、T 細胞がその前駆細胞から CD4⁺細胞（ヘルパー T 細胞）となるか CD8⁺細胞（細胞傷害性 T 細胞）となるかについて CD4 ならびに CD8 が T 細胞分化決定に及ぼす影響につき研究されてきた。CD4 は完成された TCR 複合体が主要組織適合複合体（MHC）クラス II 分子と、また CD8 は同複合体が MHC クラス I 分子と適切な相互作用を行うのに必要なモニタリングを行っている。CD8 強制発現系を使用した実験から CD8 は CD4⁺細胞発現にほとんど影響を及ぼさずに CD8⁺細胞の選択を増大させ、CD8⁺細胞分化は誘導的に決定されていると示唆された²²。事実、MHC クラス I 分子欠損マウスでは CD8⁺細胞が存在せず、この結果を支持していた。ところが MHC クラス I 分子欠損マウスに CD4 を強制発現させたところ CD8⁺細胞が生成され、MHC クラス II 分子欠損マウスに CD8 を強制発現させたところ CD4⁺細胞が生成された^{23,24}。これらの結果は CD4⁺細胞/CD8⁺細胞分化は CD4/CD8 分子それ自身によって決定されているわけではなく、CD4/CD8 分子は分化方向の決定された CD4⁺および CD8⁺前駆細胞の生存を保証するシグナルを媒介するに

過ぎないことを示している。

最近提唱された反応速度論的シグナルモデルによれば、胸腺細胞の CD4⁺CD8⁺細胞（いわゆるダブルポジティブ胸腺細胞）において CD8 の発現が一過性に低下することが CD4⁺および CD8⁺細胞への分化に重要であるとされている。これに従えば絶え間ない TCR からのシグナルはダブルポジティブ胸腺細胞を CD4⁺細胞に分化させるのに対して、TCR からのシグナルの断絶は CD4/CD8 の発現を逆転させてこれら細胞を CD8⁺細胞へと分化させる²⁵。しかしながら、このモデルにおいても前駆細胞からの CD8⁺細胞、CD4⁺細胞への分化が誘導的になされるのか、自律的に起こるのかについては全く問題視されていない。

以上に記述した実験系は外部刺激が誘導的にもしくは自律的に前駆細胞の分化方向を決定するのかという問いに対して正答を与えず、この問題は歴史的に混乱を極めたのである。どうしてこのようなことが起こるのであろうか？これはひとえに用いた実験系が適切でないということである。なぜならば、上述したように分化の終了した細胞集団のみを観察する場合には、その集団が外部刺激により当初誘導的に前駆細胞から生じたものである場合でも自律的に生じた場合であっても、時間経過に伴う細胞増殖によりこれら細胞間の区別が不可能となるからである。すなわち、外部刺激が前駆細胞または幹細胞の分化決定に及ぼす様式



増殖後はこれら細胞が誘導的もしくは自律的に系列決定されたのか区別不可能となる。

図3 細胞増殖により前駆細胞（幹細胞）の系列決定様式が区別不可能となる説明図

前駆細胞（幹細胞）pABC が当初誘導的あるいは自律的に pB という B 系列細胞の前駆細胞に作用したとしても、一定期間の細胞増殖（培養）後にはいずれの場合も B 系列細胞のみが存在することとなる。従ってこの時点で B 系列細胞が pABC から誘導的あるいは自律的に系列決定されたのかという問いは無意味となる。

を研究するためには、分化した細胞のみならず分化する以前の前駆細胞または幹細胞の存在が同時に保証される必要がある。従ってこの前提条件が保証されるか否か不明である前駆細胞もしくは幹細胞からの血液系/リンパ球系細胞分化におけるサイトカインの作用様式は必然的に解析不可能となる。

血液系/リンパ球系細胞分化における別の混乱は外部刺激がこれら細胞の前駆細胞の運命決定を確定的もしくは確率的に制御するという概念である(図2C~Fおよび図4)。これは多能性前駆細胞の単一性前駆細胞への分化過程において、その中間段階である細胞の運命決定が確定的もしくは確率的に決定されるというものである。Ogawaらの提唱した血液細胞分化における確率的モデル(stochastic model)は多能性前駆細胞から単一性前駆細胞への分化過程において中間段階として様々の分化能を有する前駆細胞群がランダムに作られるというものである²⁶⁾。これに対し

て、Katsuraらは血球系アッセイに限定されていたコロニー法(CFU-Cアッセイ)を離れ、多能性前駆細胞から血液系細胞分化とリンパ球系細胞分化を同時に解析する多系列アッセイ法を開発した。そしてこのアッセイ法を用いて、多能性前駆細胞から単一性前駆細胞への分化中間段階においては様々の分化能を有する前駆細胞群がランダムに作られるのではなく整然とした順序に従って作られており、中間段階で生ずる前駆細胞群はそれぞれ分化の方向性が拘束されたものであることを示し、この過程が確定的に起こっていることを証明した²⁷⁾(図4)。

これらの用語の使用にあたってはその正確な定義・意味を理解し、細心の注意が払われるべきであるのだが、これまで述べたように免疫学者や血液学者の間ではこれらの概念を各自が勝手に解釈している例がしばしば見られる。また、CD4細胞対CD8細胞、 $\alpha\beta T$ 細胞対 $\gamma\delta T$ 細胞などの分化決定様式の議論においてはその前提条件となる分化前の前駆細胞と分化後の細胞の存在が示されていない。

また別の意味での用語の混乱も存在する。それは誘導的系列決定様式の対立概念が確率的系列決定様式と考えるものである。これは後に説明するように上位概念である誘導的自律的(選択的)系列決定とこれらの下位概念である確率的対確定的系列決定を混同するものであって、論理的に誤りである。

ここで外部刺激による誘導的系列決定様式と自律的(選択的)系列決定様式、ならびに確率的系列決定様式、そして確定的系列決定様式との連関について考察してみよう。まず結論をいうと後者の二つの概念は前者の下位概念であるということである(図2C~F参照)。すなわち、幹細胞や前駆細胞の系列決定様式を外部刺激との関連で考えた場合には外部刺激はこれら細胞の運命決定に対して誘導的もしくは自律的(選択的)に働く(図2AおよびB)。そして重要なことはこの運命決定が誘導的であっても自律的(選択的)であっても、その結果として生ずる分化細胞がどのような系列に属するものであるかは、確定的または確率的に決定される、ということである。まず外部刺激が誘導的に前駆細胞・幹細胞の系列決定を行っている場合を考える。仮定としてこの前駆細胞・幹細胞(pABC)はA, B, Cという系列の細胞に分化しようとしよう。ここで外部刺激Xにより、必ず(確率100%で)B系列細胞のみが生じたとすれば、この外部刺激は誘導的に作

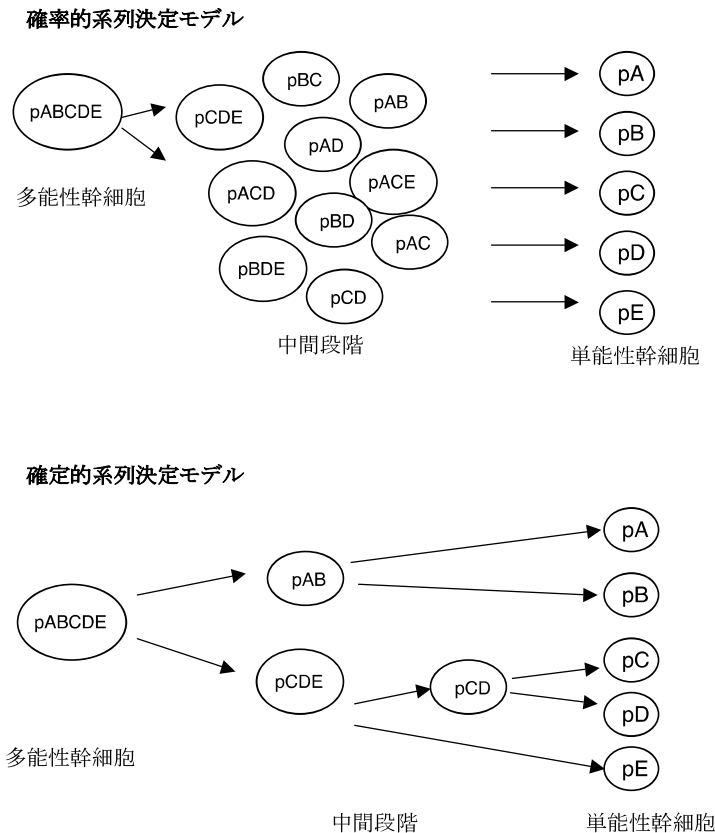


図4 多能性前駆細胞から多系列へ分化能が限定される過程におけるモデル

確率的系列決定モデル(stochastic model)は血液幹細胞から単能性前駆細胞へとその分化能が限定されていく過程の中間段階においてランダムな組み合わせの分化能を有する前駆細胞が生成するというものである。

これに対して、確定的系列決定モデル(ordered restriction model)では血液幹細胞から単能性前駆細胞へとその分化能が限定されていく過程でその分岐に伴って生じる前駆細胞は発生順序ならびに分化能が限定されており、これらはランダムには起こらないことを示している。

用していることが分かる (図2C). これに対して刺激Xによりサイコロを振った場合のようにある時にはA系列細胞のみが生じ, また別の時にはB系列細胞のみが, さらに別の機会にはC系列細胞のみが生み出されるような場合はやはり誘導的系列決定といえるが, この系列決定はランダムである (図2D). これらの例はいずれも誘導的系列決定の例であるが前者では確定的に, 後者では確率的に運命決定がなされる.

それではpABCのA, B, Cへの分化が自律的 (選択的) に決定される場合はどうであろうか? 定義よりA, B, C系列細胞はすべてYという外部刺激とは無関係に生じる (図2B). この場合にYが常に (100%の確率を以て) B系列細胞のみの生存・増殖を引き起こしたとすると, Yは確定的にB系列細胞に作用したことになる (図2E). これに対して, Yによりある時にはA系列細胞が, 別の時にはB系列細胞が, また別の機会にはC系列細胞がランダムに選択されるようなケースではYは確率的に各系列細胞に作用することになる (図2F).

このように整理すると誘導的系列決定の対立概念が確率的系列決定ではありえないことが容易に理解できる.

(3) 新規モデルマウスが示唆するNKT細胞分化の外部刺激作用様式

ここでどうしてNKT細胞クローンマウスの子孫とNKT細胞の分化様式が結びつくのか具体的に述べてみたい. 先に前駆細胞 (幹) 細胞系列決定における外部刺激の作用様式研究のためには分化前の前駆細胞 (幹) 細胞と系列細胞へと分化した分化細胞の存在が前提条件となる旨説明したが, まず, クローンマウス子孫がこの前提条件を満たしていることから説明する. 個体内に存在するNKT細胞の細胞表面にはこの細胞特有の分子発現が観察される. これはNK細胞受容体であるLy49DやLy49A, また活性化マーカーであるCD44, CD69, 本来NK細胞マーカーであるNK1.1などである. 野生型マウス胸腺細胞におけるこれら表面分子の発現をその対立遺伝子の片方に遺伝子再構成済み $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ 遺伝子座を有するクローンマウスの子孫 (以下 $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウスと称する) のそれと比較すると, Ly49DやLy49Aの発現は変わらないものの, CD44, CD69およびNK1.1の発現プロファイルが変化していた. さらに後者においては未熟細胞のマーカーであるCD24の発現が亢進しており, $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウス胸腺細胞は2種類以上のNKT細胞より構成されていることを示唆していた⁵⁾ (図5). NKT細胞はMHCクラスI様分子であるCD1dにその分化が依存しており, 事実 $CD1d$ の欠損したマウスでは成熟したNKT細胞はみられない^{28, 29)}. 個体内でのNKT細胞分化および成熟にはCD1d以外にもCD1d上に提示され, $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ 鎖を認識する糖脂質が重要な役割を果た

す³⁰⁾. では $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウス胸腺細胞に存在するNKT細胞はどのような細胞から構成されているのであろうか?

結論を先に言うと, これはCD1dと相互作用してNKT細胞と分化決定された細胞と, $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ というNKT細胞特異的TCRを発現しているのだが, 未だCD1dと作用していない, いわば系列決定前の細胞とから成り立っている (図6A). これは以下の事象から説明できる. まず, $CD1d$ ノックアウトマウスにも実はNKT細胞が僅かながら存在する³¹⁾. 野生型マウス胸腺ではNKT細胞は胸腺細胞のおよそ0.5%を占める. 一方, $CD1d$ ノックアウトマウスにおいてはその割合はさらに低下し, この僅少さ故に性状解析も不可能であり, その存在は無視されてきた. しかし, 論理的に考えるとここで見えているNKT細胞はCD1dと相互作用する前の細胞集団と考えることができる. 我々はこのCD1dと相互作用する前のNKT細胞数を増大させるため以下の操作を行い, その細胞表面分子の解析に成功した. $CD1d$ ノックアウトマウスと $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウスを掛け合わせ, その子孫F1で遺伝子再構成済み $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ を有するマウスとこれを有しないマウスとを再度掛け合わせる

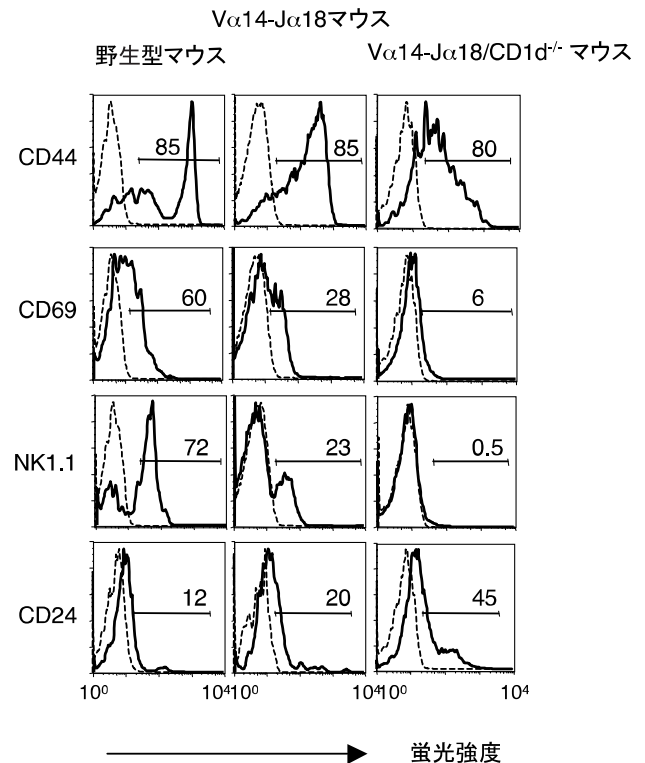


図5 新規モデルマウスにおけるNKT細胞表面分子の発現プロファイル

野生型マウス, $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウス, $CD1d$ ノックアウトバックグラウンドに遺伝子再構成済み $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ を有するマウス ($V\alpha 14\text{-}J\alpha 18/CD1d^{-/-}$) 胸腺細胞におけるNKT細胞表面分子, CD44, CD69, NK1.1, CD24の発現をフローサイトメーター (FACS) で調べた. 図中の数字は各分子を発現するNKT細胞の割合を示す.

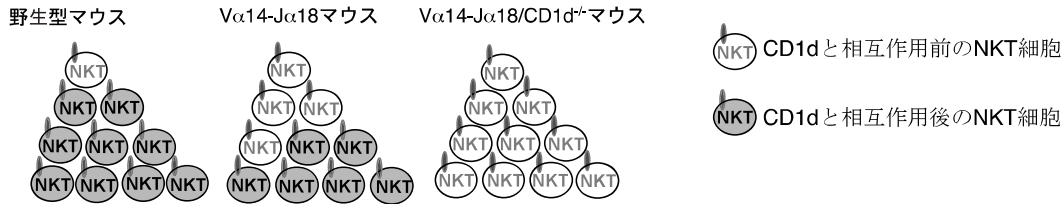


図 6A 野生型マウス, $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウスならびに $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18/CD1d^{-/-}$ マウス胸腺細胞における NKT 細胞組成の模式図

NKT 細胞は CD1d と相互作用する以前の細胞 (白地の楕円) と CD1d と相互作用した後の細胞 (黒塗りの楕円) とから構成されている。野生型マウスでは殆どの NKT 細胞が CD1d と相互作用した後の細胞からなるのに対して, $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウスでは CD1d と相互作用する以前の細胞が観察される。一方, $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18/CD1d^{-/-}$ マウスに存在する NKT 細胞は全て CD1d と相互作用する以前の細胞である。図において CD1d と相互作用した後の細胞と相互作用以前の細胞は便宜的に描写したものであり, 実際の各細胞数の比を正確に示すものではない。

ことで F2 において *CD1d* ノックアウトの遺伝子バックグラウンドを持ち, かつ片方の対立遺伝子上に $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ を有するマウスを得た。このマウス胸腺を解析したところ NKT 細胞の割合は全胸腺細胞のおよそ 1% であり, 野生型マウス胸腺細胞でみられた NK1.1, CD69 の発現は殆ど見られず, CD44 の発現強度も野生型マウスに比して低いものであった。一方, これとは対照的に CD24 の発現は亢進していた⁵⁾。これら NKT 細胞表面分子の発現プロフィールを比較すれば, $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウス胸腺における NKT 細胞が CD1d と相互作用する前後の細胞より構成されていることが理解できよう (図 5 および 6A)。

(4) NKT 細胞分化が誘導的に決定されている証拠

$V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウス胸腺 NKT 細胞は外部刺激による前駆細胞からの分化決定様式研究のための前提条件を有していることが明らかとなった。次に, NKT 細胞の前駆細胞からの分化決定様式が外部刺激によって誘導的に決定されている証拠を挙げる。最初に明らかにしておかねばならないことは外部刺激および前駆細胞の定義である。先に NKT 細胞分化は CD1d に依存していることを述べたが, CD1d が外部刺激と考えてよい。より厳密には CD1d に NKT 細胞のリガンドである糖脂質が結合したものであるが, ここでは単純化のため CD1d とする。次に前駆細胞の定義であるが, 最近遺伝学的に NKT 細胞は通常の T 細胞と同様にダブルポジティブ段階を経て分化してくることが証明されたので前駆細胞はヘルパー T/細胞傷害性 T/NKT 細胞になりうる $CD4^+CD8^+$ ダブルポジティブ胸腺細胞である³²⁾。従って, CD1d が $CD4^+CD8^+$ ダブルポジティブ胸腺細胞に作用して $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ の組み合わせを持つ NKT 細胞を誘導的に分化させるのか, それとも $CD4^+CD8^+$ ダブルポジティブ胸腺細胞は CD1d とは無関係に自律的にヘルパー T/細胞傷害性 T/NKT 細胞を生み出し, ヘルパー T/細胞傷害性 T 細胞はアポトーシスなどで除去された後に NKT 細胞だけが CD1d によって選択的にその生存を保証されるのか

問題となる (図 6B)。結論的には CD1d の NKT 細胞分化への作用様式は誘導的と考えられるが, この理由を以下に説明する。

$V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウス胸腺では NKT 細胞の割合は胸腺細胞の 16% まで増大しており, その絶対数においても野生型の約 6 倍になっている。これは NKT 細胞の細胞分裂周期が通常の T 細胞のそれに比較してより短いことで説明可能であるが, 細胞周期解析の結果からはこのような事実は観察されない。これは先に記したように遺伝子再構成済み $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ を有する対立遺伝子からの TCR 発現が対立遺伝子排除に近い様式で起こっているからと考えられる。そうだとするとこの対立遺伝子由来 T リンパ球は TCR α 鎖遺伝子再再構成がほぼ抑制されて $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ を持つ NKT 細胞に限定される。すなわちこの対立遺伝子からはヘルパー T/細胞傷害性 T 細胞の生成はほとんどあり得ないこととなる (誘導的作用様式の定義, 図 6B)。この分子機序として $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウス胸腺のダブルポジティブ胸腺細胞を NKT 細胞とそれ以外の細胞に分類し, これら集団における *Rag* の発現を検討したところ前者より後者においてその発現がより多く見られ, 分化中間段階においても $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ を発現する NKT 細胞は TCR α 鎖遺伝子再再構成を起こし難いことが証明された (注: RAG は TCR 遺伝子再構成に必須であり, T 細胞が正に選択されるあるいは死滅するまで発現される)。 $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウス胸腺に NKT 細胞以外の T 細胞が存在するのは別の対立遺伝子から生成した T 細胞であると考えられる。

$V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウス胸腺での NKT 細胞の圧倒的存在はその細胞周期の違いで説明できない。従ってもし前駆細胞からの NKT 細胞分化が自律的に決定されているのなら, 前駆細胞分化時に同時に生じるヘルパー T/細胞傷害性 T 細胞において強いアポトーシスが観察されるはずである。しかしながら, 野生型マウス胸腺細胞に比べて $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウス胸腺でより活発なアポトーシスが起きているという証拠は得られなかった (図 6B)。

CD1dによる誘導的系列決定モデル

CD1dによる自律的系列決定モデル

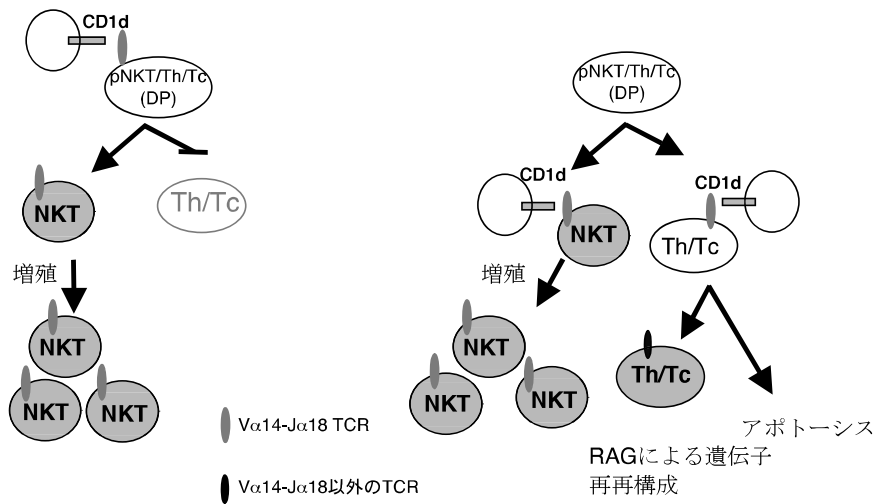


図 6B 前駆細胞から NKT 細胞に分化する際の系列決定モデル

Vα14-Jα18 という TCR を発現した前駆細胞は CD1d と相互作用を行うことにより誘導的に NKT 細胞分化を決定する。この際にはヘルパー/細胞傷害性 T 細胞は産生されない (左)。一方、自律的 (選択的) 系列決定モデルに従えば、前駆細胞からは Vα14-Jα18 という TCR を発現した NKT 細胞とヘルパー/細胞傷害性 T 細胞が同時に産生されることとなる。このうち、NKT 細胞のみが CD1d によってその生存/増殖を保証される一方で、Vα14-Jα18 を発現するヘルパー/細胞傷害性 T 細胞はアポトーシスによって消滅するか、TCR 遺伝子再構成に必要な RAG 遺伝子を発現させて遺伝子再構成によって Vα14-Jα18 以外に置換し、NKT 細胞以外へと運命転換するかを選択を行うことになる。

NKT 細胞で使用される TCRβ 鎖はそのレパトワーが非常に限定されており、Vα14-Jα18 マウス胸腺では TCRβ⁺ 細胞の 80% 以上が NKT 細胞であったが、CD1d ノックアウトバックグラウンドでの Vα14-Jα18 マウス胸腺ではこれが 20% にまで下落していた。この結果は、CD1d が前駆細胞からの NKT 細胞分化を誘導的に制御していることを示唆する。

以上より NKT 細胞分化は CD1d という外部刺激によりそのダブルポジティブ胸腺細胞からの分化が誘導的に制御されていることがほぼ証明された。この誘導的分化決定が確定的になされるのかまた確率的になされるのかについては CD1d ノックアウトバックグラウンドを持つ Vα14-Jα18 マウス胸腺から分化前の NKT 細胞を取り出し、これを *in vitro*, *in vivo* で分化させることによって解析可能となる。

3. 胚性幹 (ES) 細胞からの NKT 細胞分化誘導

(1) 免疫制御性細胞としての NKT 細胞

マウスにおいて NKT 細胞は Th1, Th2, Th17 型のサイトカインを産出し、個体の免疫バランス維持に重要な役割を果たしている。この多彩なサイトカイン産生能故に NKT 細胞の免疫制御性細胞としての特性は全く矛盾した二面性を有する。すなわち NKT 細胞は免疫抑制性に働くこともあるし、また反対に免疫強化性に働くこともありうる。こ

の免疫抑制能を利用できれば、自己免疫疾患や移植片対宿主病 (GVHD) に対して新たな治療法を提示でき、また異種臓器移植においてホストに免疫寛容を誘導することも可能となる。一方、免疫強化能を利用すればがんの免疫監視能を亢進させたり、各種ウイルス・細菌感染に対してより強力な免疫防御を期待できる³³⁻³⁵。現在までの NKT 細胞研究の最大の問題点はこの相矛盾する免疫制御能をどうコントロールし、必要に応じてその免疫抑制能または免疫強化能を発揮させるかにある。このため NKT 細胞がどのような分子機序でこれら免疫制御能を発揮しているのかを理解する必要がある。当該細胞自身の生化学的/分子生物学的な解析が待たれていた。しかしながら、他の免疫制御性細胞の例にもれず、NKT 細胞もその個体での希少さ故にこのような解析は従前不可能であった。そこで我々はこの問題を解決すべく ES 細胞から NKT 細胞分化誘導を試みた³⁶。これが実現できると NKT 細胞は事実上無限に取得可能となり、上述の各種解析が可能となる。また、この実現は NKT 細胞の細胞治療/再生医療への応用という視点からも重要なステップである。将来、NKT 細胞の免疫制御能を自在に制御できるようになった場合、先に示した各種疾患や状況に応じてその機能が保証された細胞を必要な数だけ供給することができるようになる。これは病的状態において患者自身の NKT 細胞が機能不全に陥っている場合などに最適である。

(2) クローン胚からの NKT 細胞分化誘導

NKT 細胞は T 細胞と NT 細胞の両方の性質を併せもつため、従来からその起源や分化について興味を持たれてきた。ここでは本論から逸脱するので詳述しないが、我々の ES 細胞からの NKT 細胞分化誘導の結果からは NKT 細胞は T 細胞と同一の起源を有すると結論づけることができる。しかしながら、NKT 細胞は $V\alpha 14-J\alpha 18$ という一義的な TCR を発現することからヘルパー T/細胞傷害性 T 細胞の分化とは質的相違があることは間違いない。その一つとして NKT 細胞は CD1d によってその前駆細胞から誘導的に分化されることは 2 章で記載したとおりである。

さて、NKT 細胞も T 細胞の一種であるということで我々はまず通常の受精卵由来の ES 細胞を使用して NKT 細胞分化を試みた。用いたシステムはフィーダー細胞として Notch のリガンドである delta-like 1 を異所性に発現した OP9 (以下 OP9-dlk1) を使用した共培養系である。このフィーダー細胞を使用することにより従前 ES 細胞から分化誘導不可能であった T 細胞が誘導可能となった。しかし、この系から生じる T 細胞は殆どダブルポジティブ胸腺細胞であり、胸腺上皮細胞での教育もなされていないため、これらの T 細胞は免疫不全マウスの免疫能を再構築することはできなかった。この再構築には ES 細胞から誘導された T リンパ球ダブルポジティブ以前の、より未熟であるダブルネガティブ画分を人工的な胸腺環境 (FTOC という胸腺上皮細胞のみが存在する胎児由来の胸腺) のもとで培養する必要があった³⁷⁾。

ES 細胞を OP9-dlk1 と共培養すると確かにダブルポジティブ T リンパ球が産生されたが、この集団を FACS で解析しても NKT 細胞は検出されなかった (図 7)。野生型マウス胸腺では胸腺細胞の約 0.5% が NKT 細胞であることを考えるとこの結果は (1) NKT 細胞分化と T 細胞分化は全く異なった経路で行われる、(2) NKT 細胞分化には T 細胞分化要因以外に特殊な要因が必要である、ことを示唆していた。遺伝学的解析結果から (1) の可能性は低く、(2) の可能性が高かった³²⁾。では (2) の特殊要因とは何であろうか？ ここで NKT 細胞由来クローンマウスの子孫である $V\alpha 14-J\alpha 18$ マウス胸腺の表現型を思い出してみるとそれは「遺伝子再構成が終了した $V\alpha 14-J\alpha 18$ という TCR 遺伝子座の存在」であることが分かる。このような特殊な TCR 遺伝子座を有するマウスでは NKT 細胞の割合/絶対数が増大していた。これをヒントに NKT 細胞の核移植を行うことで遺伝子再構成が終了した $V\alpha 14-J\alpha 18$ を有する ntES 細胞を作製すれば、NKT 細胞が大量に産生可能であると仮定した。何種類かの ntES 細胞が樹立されたが、このなかで両対立遺伝子において $V\alpha 14-J\alpha 18$ 遺伝子再構成が終了している ntES 細胞を分化誘導に使用した。両対立遺伝子において $V\alpha 14-J\alpha 18$ 遺伝子再構成が終了しているとい

うことはどちらか片方の対立遺伝子上の $V\alpha 14-J\alpha 18$ はアウトオブフレームである (V-J 遺伝子再構成後、正しいタンパク質が作られない) 可能性が高く、より NKT 細胞生成に有利と判断した。この ntES 細胞を OP9-dlk1 と共培養して T 細胞に分化誘導したところ、 $CD4^+CD8^+$ ダブルポジティブ胸腺細胞のみならず、 $CD8^+$ 細胞や $CD4^-CD8^-$ 細胞の出現が観察された。この時、リンパ球集団の 90% 以上が NKT 細胞であった (図 7)。さらに NKT 細胞 TCR β 鎖のレパトワーは $V\beta 8$ のみであって、対立遺伝子排除を示していた。この共培養では 5.0×10^4 の ES 細胞から 10^8 オーダーの NKT 細胞を取得可能であった。一方、ntES 細胞を dlk1 の非存在下、OP9 と共培養したところ B 細胞や NK 細胞などが産生誘導され、T 細胞は誘導されなかった。これにより NKT 細胞由来の ntES 細胞は通常の ES 細胞同様に dlk1 によってその T 細胞分化が誘導されることが明らかとなり、 $V\alpha 14-J\alpha 18$ マウスで観察された遺伝子再構成済み $V\alpha 14-J\alpha 18$ が ntES 細胞分化においても優位に作用することが示された。なお、ここで使用した ntES 細胞はアグリゲーションによってキメラマウスを作出する能力を有していることを確認しており、この ntES 細胞が通常の ES 細胞同様に多能性を発揮することが確かめられている。

(3) ntES 細胞由来 NKT 細胞の性状と機能

ntES 細胞から分化誘導された NKT 細胞はいったいどのような性質を有するのであろうか？ 我々はまずこの NKT 細胞表面分子の発現を解析した。CD4、CD8 の発現については先に先に述べたが、興味深いことに CD44、CD69 は殆ど発現しておらず、CD24 の発現が野生型マウ

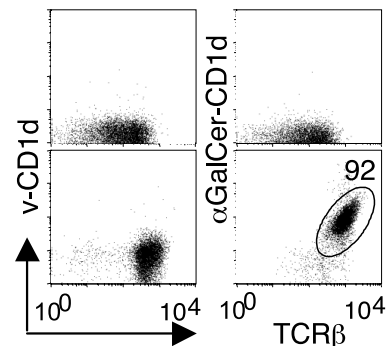


図 7 ntES 細胞からの NKT 細胞分化誘導

通常の受精卵由来 ES 細胞 (上段) あるいは NKT 細胞核由来 ntES 細胞 (下段) を OP9-dlk1 と 3 週間共培養し、得られたリンパ球集団を FACS にて解析した。NKT 細胞は $\alpha GalCer$ という糖脂質が結合した CD1d にて検出可能である。コントロールとして溶媒のみが結合した CD1d を用いている。FACS の結果から通常の ES 細胞由来 T 細胞は様々なレベルの TCR ベータ鎖を発現するのに対して、ntES 細胞由来の細胞ではその発現レベルが一定であることが分かる (図左)。ntES 細胞由来リンパ球の 92% が NKT 細胞であった。

スや $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウスのそれと比較しても有意に亢進していた。これは ntES 細胞より誘導された NKT 細胞が非常に未熟な集団であることを示唆する。その証左として *CD1d* ノックアウトバックグラウンド $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ マウスにおいても野生型に比して *CD44*, *CD69* の有意な発現低下と *CD24* の発現亢進が観察されたが、クローン胚由来の NKT 細胞においてはこれらの相違がより顕著であった。また別の証拠としてこの NKT 細胞は $V\alpha 14\text{-}J\alpha 18$ 鎖を発現しているが、細胞内には *Rag* の発現が見られた。これら NKT 細胞が未熟な集団であることはそのサイトカイン産生パターンからも推察できる。現在報告されている胸腺内に存在する最も未熟な NKT 細胞は Th2 サイトカインを主に産生するのに対して、その成熟と共に Th1 サイトカインを産生するようになる³⁸⁾。これに呼応するように ntES 細胞由来 NKT 細胞を刺激して産生されるサイトカインは IL-4, IL-10, IL-13 などの Th2 型であり、Th1 型の典型である IFN γ は殆ど産生されなかった。これに対して ntES 細胞由来 NKT 細胞と通常の ES 細胞から分化誘導したダブルポジティブ胸腺細胞とを共培養した後に NKT 細胞刺激を行ったところ、IFN γ 産生が顕著に亢進した。これは共培養により ntES 細胞由来 NKT 細胞の成熟が進行したことを示唆するもので興味深い。これらダブルポジティブ胸腺細胞の細胞表面分子を解析したところ、胸腺で報告されているのと同様に *CD1d* の発現が確認された。

ntES 細胞由来 NKT 細胞をマウスに移入したところ、その細胞表面分子の発現プロフィールが未成熟型から成熟型に変化した。特筆すべきものは *CD44*, *CD69*, *NK1.1* の発現亢進と未熟マーカー *CD24* の発現低下である。また、ntES 細胞から分化誘導した NKT 細胞は培養末期においても *Rag* を発現していたが、個体への移入によりその発現も消失した。ここで NKT 細胞分化を考える上で重要な結果が得られた。それは遺伝学的に示されたようにこの細胞が $CD4^+CD8^+$ ダブルポジティブ胸腺細胞に由来するということが明らかにされたのである。ntES 細胞由来 NKT 細胞では $CD4^-CD8^-$, $CD8^+$, $CD4^+CD8^+$ の NKT 細胞が存在していたが、個体移入により後者は消失して、 $CD4^-CD8^-$, $CD8^+$ の二つのタイプに集約された。これは $CD4^+CD8^+$ NKT 細胞が分化途上にある細胞群であって、分化成熟とともにその細胞表面分子発現を変化させた結果と考えることが可能である。さらに静脈より移入されたこれら細胞は胸腺を除く骨髄、肝臓、脾臓など本来 NKT 細胞が存在する臓器に存在しており、そのホーミング能は正常と考えられた。NKT 細胞分化成熟に必要な *CD1d* は胸腺上皮細胞のみならず、これら臓器中にも発現しているため、生体内に存在する NKT 細胞のリガンドと共役して ntES 細胞由来 NKT 細胞を成熟させていると考えられる。以上の結果から ntES 細胞由来 NKT 細胞は通常の T 細胞と異なり、胸

腺環境を必要とせず、自律的に成熟すると結論できる。

次にサイトカイン産生以外の NKT 細胞機能について解析した。NKT 細胞はある抗原で免疫した際に同時に活性化されると次と同じ抗原で免疫した際に抗原特異的免疫補強能 (アジュバント効果) を発揮する。この時には $CD8^+$ T 細胞からエフェクターとして IFN- γ が産生される。NKT 細胞の欠失した *J $\alpha 18$* ノックアウトマウスを使用して ntES 細胞由来 NKT 細胞を移入しアジュバント効果を検討したところ、抗原特異的に $CD8^+$ T 細胞から IFN- γ 産生が観察された。またこのアジュバント効果を利用して抗原の代わりにがん細胞を使用したところ、同じがん細胞を再移植した場合にはこのがん細胞の増殖が ntES 細胞由来 NKT 細胞によって抑制された。一方、別種類のがん細胞を再移植した場合にはそのがん細胞増殖は抑制されなかった。

以上の結果から ntES 細胞由来 NKT 細胞は生体に存在する NKT 細胞と同じように種々のサイトカインを産生し、抗原特異的なアジュバント効果を発揮し、免疫強化能を有することが示された。

今後の展望

ES 細胞由来の分化細胞を再生医療/細胞治療に利用するためには以下の基準が満たされる必要がある³⁹⁾。

- (1) ES 細胞より分化誘導された細胞が最終分化した単一集団から構成されていること
- (2) ES 細胞より分化誘導された細胞の機能が *in vivo* で保証されること
- (3) ES 細胞より分化誘導された細胞の生存が *in vivo* で保証されること
- (4) ES 細胞より分化誘導された細胞が移入によりその本来の居場所にホーミングし、毀損・喪失した細胞に代替し、機能修復を行うこと
- (5) ES 細胞より分化誘導された細胞が移入後、宿主免疫系によって拒絶され、排除をうけないこと

ES 細胞より分化誘導された細胞、特に神経系細胞は *in vivo* では生存が難しいとされるが、クローン胚由来 NKT 細胞は少なくとも3ヶ月は脾臓、肝臓、骨髄においてその存在が確認された。今回作製したクローン胚由来 NKT 細胞は上記(1)~(4)までをほぼクリアしており、再生医療/細胞治療具現化の最先端に位置していると言える。免疫拒絶の問題は宿主由来 iPS 細胞使用で解決可能と考えられるが、NKT 細胞が免疫制御性細胞である点に注目すれば、ホストの免疫バランス異常が一過性のものである限り、異種血液幹細胞移植によるがん治療のように異種 ES 細胞由来の NKT 細胞を用いることも十分可能と思われる。しかしながら、NKT 細胞の免疫制御能が諸刃の剣であることから、再生医療/細胞治療に使用する際にはこの制御能の作用機序を分子生物学/生化学的に解析し、これを基に

NKT細胞がその免疫強化能もしくは抑制能の片方のみを発揮するよう仕組まれた人工細胞の創造やその活性を適切に修飾するリガンド(ミメティックス; 擬態薬物)の合成/探索が必要となろう。今回の ntES 細胞からの NKT 細胞分化誘導成功により, この細胞が再生医療/細胞治療実用化にいち早く結びつくことを希求して止まない。

文 献

- 1) Inoue, K., Wakao, H., Ogonuki, N., Miki, H., Seino, K., Nambu-Wakao, R., Noda, S., Miyoshi, H., Koseki, H., Taniguchi, M., & Ogura, A. (2005) *Curr. Biol.*, **15**, 1114-1118.
- 2) Gerdes, T. & Wabl, M. (2004) *Nat. Immunol.*, **5**, 1282-1287.
- 3) Hochedlinger, K. & Jaenisch, R. (2002) *Nature*, **415**, 1035-1038.
- 4) Bendelac, A., Hunziker, R.D., & Lantz, O. (1996) *J. Exp. Med.*, **184**, 1285-1293.
- 5) Wakao, H., Kawamoto, H., Sakata, S., Inoue, K., Ogura, A., Wakao, R., Oda, A., & Fujita, H. (2007) *J. Immunol.*, **179**, 3888-3895.
- 6) Morrison, S.J., Shah, N.M., & Anderson, D.J. (1997) *Cell*, **88**, 287-298.
- 7) Kenyon, C. (1995) *Cell*, **82**, 171-174.
- 8) Zipursky, S.L. & Rubin, G.M. (1994) *Annual Review of Neuroscience*, **17**, 373-397.
- 9) Mayani, H., Dragowska, W., & Lansdorp, P.M. (1993) *J. Cell Physiol.*, **157**, 579-586.
- 10) Metcalf, D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11310-11314.
- 11) Fairbairn, L.J., Cowling, G.J., Reipert, B.M., & Dexter, T.M. (1993) *Cell*, **74**, 823-832.
- 12) Dubart, A., Feger, F., Lacout, C., Goncalves, F., Vainchenker, W., & Dumenil, D. (1994) *Mol. Cell Biol.*, **14**, 4834-4842.
- 13) Yang, F.C., Watanabe, S., Tsuji, K., Xu, M.J., Kaneko, A., Ebihara, Y., & Nakahata, T. (1998) *Blood*, **92**, 4632-4640.
- 14) Shah, N.M., Groves, A.K., & Anderson, D.J. (1996) *Cell*, **85**, 331-343.
- 15) Shah, N.M., Marchionni, M.A., Isaacs, I., Stroobant, P., & Anderson, D.J. (1994) *Cell*, **77**, 349-360.
- 16) Johe, K.K., Hazel, T.G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M.M., & McKay, R.D. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 3129-3140.
- 17) Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., & Lodish, H.F. (1995) *Cell*, **83**, 59-67.
- 18) Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., & Aguet, M. (1999) *Immunity*, **10**, 547-558.
- 19) Mombaerts, P., Clarke, A.R., Rudnicki, M.A., Iacomini, J., Ito-hara, S., Lafaille, J.J., Wang, L., Ichikawa, Y., Jaenisch, R., Hooper, M.L., et al. (1992) *Nature*, **360**, 225-231.
- 20) Aifantis, I., Azogui, O., Feinberg, J., Saint-Ruf, C., Buer, J., & von Boehmer, H. (1998) *Immunity*, **9**, 649-655.
- 21) Kang, J., Volkman, A., & Raulet, D.H. (2001) *J. Exp. Med.*, **193**, 689-698.
- 22) Robey, E.A., Fowlkes, B.J., Gordon, J.W., Kioussis, D., von Boehmer, H., Ramsdell, F., & Axel, R. (1991) *Cell*, **64**, 99-107.
- 23) Davis, C.B., Killeen, N., Crooks, M.E., Raulet, D., & Littman, D.R. (1993) *Cell*, **73**, 237-247.
- 24) Robey, E., Itano, A., Fanslow, W.C., & Fowlkes, B.J. (1994) *J. Exp. Med.*, **179**, 1997-2004.
- 25) Bosselut, R., Guinter, T.I., Sharrow, S.O., & Singer, A. (2003) *J. Exp. Med.*, **197**, 1709-1719.
- 26) Suda, T., Suda, J., & Ogawa, M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6689-6693.
- 27) Kawamoto, H. & Katsura, Y. (2005) *Methods in Molecular Medicine*, **105**, 345-358.
- 28) Chen, Y.H., Chiu, N.M., Mandal, M., Wang, N., & Wang, C.R. (1997) *Immunity*, **6**, 459-467.
- 29) Mendiratta, S.K., Martin, W.D., Hong, S., Boesteanu, A., Joyce, S., & Van Kaer, L. (1997) *Immunity*, **6**, 469-477.
- 30) Bendelac, A., Savage, P.B., & Teyton, L. (2007) *Annual Review of Immunology*, **25**, 297-336.
- 31) Hong, S., Wilson, M.T., Serizawa, I., Wu, L., Singh, N., Naidenko, O.V., Miura, T., Haba, T., Scherer, D.C., Wei, J., Kronenberg, M., Koezuka, Y., & Van Kaer, L. (2001) *Nature Medicine*, **7**, 1052-1056.
- 32) Egawa, T., Eberl, G., Taniuchi, I., Benlagha, K., Geissmann, F., Hennighausen, L., Bendelac, A., & Littman, D.R. (2005) *Immunity*, **22**, 705-716.
- 33) Godfrey, D.I. & Kronenberg, M. (2004) *J. Clin. Invest.*, **114**, 1379-1388.
- 34) Kronenberg, M. & Rudensky, A. (2005) *Nature*, **435**, 598-604.
- 35) Tupin, E., Kinjo, Y., & Kronenberg, M. (2007) *Nature Reviews*, **5**, 405-417.
- 36) Wakao, H., Wakao, R., Sakata, S., Iwabuchi, K., Oda, A., & Fujita, H. (2008) *Faseb J.*, **22**, 2223-2231.
- 37) Schmitt, T.M., de Pooter, R.F., Gronski, M.A., Cho, S.K., Ohashi, P.S., & Zuniga-Pflucker, J.C. (2004) *Nat. Immunol.*, **5**, 410-417.
- 38) Benlagha, K., Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L., & Bendelac, A. (2002) *Science*, **296**, 553-555.
- 39) Murry, C.E. & Keller, G. (2008) *Cell*, **132**, 661-680.