

細菌感染における Natural Killer T (NKT) 細胞の認識抗原の同定及び  
その活性化機構の解明

琉球大学 金城雄樹

派遣期間 2003年4月10日～

研究機関 Division of Developmental Immunology, La Jolla Institute for Allergy and  
Immunology, 10355 Science Center Dr., San Diego, CA  
92121, U.S.A.

研究指導者 Dr. Mitchell Kronenberg

プロジェクトの背景、目的、方法及び成果:

**背景:** Natural Killer T (NKT) 細胞は、T細胞受容体 (TCR) 及びNKマーカーを発現したリンパ球である。NKT 細胞の主要なサブセットはマウスでは V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18、ヒトでは V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 15 遺伝子により再構築された多様性に乏しい (invariant: *i*) 抗原受容体を有した V $\alpha$ 14*i* (又は V $\alpha$ 24*i*)NKT である。NKT 細胞は自己免疫疾患の発症制御、腫瘍の転移抑制及び微生物感染防御において重要な役割を担うことが明らかにされている (1, 2)。

V $\alpha$ 14*i* 及び V $\alpha$ 24*i* NKT 細胞は抗原提示細胞上の CD1 に提示された合成糖脂質である $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) を認識すると、IFN- $\gamma$  及び IL-4 を産生して様々な免疫応答をもたらす。しかし、微生物由来の NKT 細胞の認識抗原は明らかにされていない。

我々は以前に V $\alpha$ 14*i* NKT 細胞がクリプトコッカス感染や肺炎球菌感染防御において重要な役割を担うことを明らかにした。このことから、クリプトコッカスや肺炎球菌は V $\alpha$ 14*i* NKT 細胞の認識抗原を有している可能性が示唆された (3, 4)。

最近 Brigl M らはサルモネラ感染において 観察される NKT 細胞の活性化は、細菌由来の脂質を介したのではなく、サルモネラ由来の LPS により活性化された抗原提示細胞由来の IL-12 と内因性抗原を介したものであると報告した (5)。しかし以前からサルモネラ感染において NKT 細胞は感染防御に寄与していないということが知られており、Brigl M らの報告は NKT 細胞の認識抗原をサルモネラが有する可能性が低いという我々の考えを支持するものである。

**目的:** 細菌由来の Natural Killer T (NKT) 細胞の認識抗原の同定し、細菌感染における NKT 細胞の活性化機構を解明する。我々は肺炎球菌や緑膿菌といった NKT 細胞が感染防御に寄与することが知られている細菌と、サルモネラのように NKT 細胞が感染防御に寄与しない細菌を比較することで、細菌由来の認識抗原の検索を試みる。また

有望な糖脂質を有する細菌を検索し、その糖脂質の NKT 刺激活性を調べる。

#### 方法及び成果: 細菌からの脂質の抽出及びNKT細胞刺激活性の測定方法の確立

1:細菌の増殖、殺菌及び凍結乾燥;肺炎球菌を液体培地で増殖させ、エタノールで殺菌後凍結乾燥を行う。凍結乾燥後の乾燥重量を調べた。

2:ソニケーション;凍結乾燥させた細菌を蒸留水にサスペンドしソニケートした。

3:NKT刺激活性の測定;NKT細胞の刺激活性の測定にはAPC-free antigen presentation assay を用いた。脂質がTCRを介してNKT細胞を刺激するには、抗原提示細胞上のCD1分子に提示される必要がある。脂質が CD1 に結合し、NKT 細胞を刺激するかどうかを調べるために考案された方法が APC-free antigen presentation assay である。

3a. CD1 の精製:baculovirus vectorをinsect cellに導入してCD1 を産生させた。

3b. CD1 コーティング:96well culture plateにCD1 蛋白を 1 $\mu$ g/well/100 $\mu$ l加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、結合させる。

3c. Blocking:PBSで洗浄後、10%FCS/PBSを加え非特異的反応が起こるのをblockした。

3d. 菌ソニケートの添加:菌ソニケートを加え 24 時間インキュベートした。この時点でサンプルに脂質が含まれていれば、CD1 に結合する。

3e. NKTハイブリドーマの添加、培養:洗浄によりCD1 に結合できない物質を全て除いて後、NKT ハイブリドーマを加え培養した。

3f. IL-2 測定:16-20 時間の培養後、上清を回収し、IL-2 の産生を調べた。肺炎球菌ソニケートは IL-2 の産生誘導が認められた。その事より肺炎球菌は CD1 に結合してNKT 細胞を刺激する脂質を有していることが示唆された。また、この反応は抗 CD1 抗体で阻害されることより CD1 を介した反応であることを確認した。

3g. 肺炎球菌、緑膿菌、サルモネラの比較:肺炎球菌ソニケート、緑膿菌ソニケート、サルモネラソニケートを用いて上記の方法と同様に NKT ハイブリドーマの刺激活性を調べた。肺炎球菌ソニケート及び緑膿菌ソニケートはハイブリドーマからの IL-2 の産生を誘導するものの、サルモネラソニケートではハイブリドーマ刺激活性は認められなかった。

4: その他の細菌由来の糖脂質のNKT刺激活性の検討:Sphingomonas という土壌に生息する菌は $\alpha$ -GalCer と似た構造の糖脂質を有する。我々はその細菌由来の糖脂質 GSL-1 (alpha-glucuronosyl ceramide), GSL-1' (alpha-galacturonosyl ceramide)を用いて NKT ハイブリドーマ刺激活性を調べた。GSL-1' 及び GSL-1 は共に NKT ハイ

ブリードマ刺激活性を認め、GSL-1'の方がGSL-1より強い活性を示した。以前より $\alpha$ -GalCerの方が $\alpha$ -glucosyl ceramideと比較して活性が強いことが報告されており、今回の所見はその結果と一致するものであった。

考察:以上の結果より、ある細菌においてはNKT細胞の抗原を有する可能性が示唆された。細菌由来の抗原の同定は細菌感染防御におけるNKT細胞活性化機構の解明につながるものと考えられる。

今後の方針:脂質の抽出方法として代表的なFolch法により総脂質の抽出を行ったあと、Silica gelカラムクロマトグラフィーにより脂質を分離して、どの脂質にNKT細胞の刺激活性があるのか調べ、特定の刺激活性を有する脂質を同定する。その後、NMR、Mass spectroscopyで構造解析を行う。

\* Folch 法:検体を chloroform/methanol (2/1) 溶液にサスペンドさせ、ホモジナイズまたはソニケートする。ソニケート後しばらく静置し、脂質を抽出する。遠心又はフィルターにより上清を回収する。この過程を繰り返し行う。上清に 1/5 量の水を加えて混ぜた後遠心して2層に分離させる。

参考文献:

- 1) Kronenberg, M. and Gapin, L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 557-68 (2002)
- 2) Taniguchi, M., Harada, M., Kojo, S., Nakayama, T., Wakao, H. The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 483-513 (2003)
- 3) Kawakami, K., Kinjo, Y., Uezu, K., Yara, S., Miyagi, K., Koguchi, Y., Nakayama, T., Taniguchi, M., Saito, A. Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V alpha 14 NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. *J. Immunol.* 167, 6525-32 (2001)
- 4) Kawakami, K., Yamamoto, N., Kinjo, Y., Miyagi, K., Nakasone, C., Uezu, K., Kinjo, T., Nakayama, T., Taniguchi, M., Saito, A. Critical role of Valpha14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol.* 33, 3322-30 (2003)
- 5) Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol.* 4, 230-7 (2003).