

## MAIT細胞—その性状とiPS化・再分化による増幅

若尾 宏, 藤田 博美

### 1. はじめに

近年の免疫生物学研究は遺伝子工学を駆使してノックアウト・ノックイン・トランスジェニック等、遺伝子改変マウスを作製・解析し、ここで得られた知見をヒトに外挿することで発展してきた。この傾向は今後も変わらないであろうし、マウスが研究モデルとして秀でていることは論を俟たない。しかし、マウスにはほとんど存在しない一方、ヒトに豊富な免疫細胞が存在した場合、上記論理の整合性は保たれるのであろうか？ 本稿ではこのような事例につき摘示し、この免疫細胞が、従前原因不明であった自己免疫疾患をはじめとするヒト難病の原因を探る手がかりとなる可能性について述べたい。

### 2. MAIT細胞とは

免疫反応に関わるT細胞はその機能から二つのクラスに分けることができる。第一のグループは適応免疫で働く通常型T細胞である。これらT細胞は補助受容体としてCD4もしくはCD8を発現し、その分化・増殖はmajor histocompatibility complex (MHC) 分子に依存する。これら細胞のT細胞抗原受容体 (TCR) は多様性を持ち、MHC分子上に提示されたペプチドを認識して、自己・非自己を区別する。第二の群は自然免疫型T細胞と称され、TCRを有するがそのアルファ鎖は通常型T細胞と異なって単一性を示し、natural killer (NK) 細胞と同一の表面抗原を発現する。これまで知られている自然免疫型T細胞にはnatural killer T (NKT) 細胞, mucosal-associated invariant T (MAIT) 細胞がある。NKT細胞TCRアルファ鎖のvariable (V) 部位とjoint (J) 部位との組み合わせはVa14-Ja18 (マウス), Va24-Ja18 (ヒト) であり、リガンドとして細菌もしくは

自己由来の糖脂質を認識する<sup>1)</sup>。これに対してMAIT細胞のTCRアルファ鎖のV-Jの組み合わせはVa19-Ja33 (マウス), Va7.2-Ja33 (ヒト) であり、リガンドとして細菌由来ビタミンB2合成中間産物を認識する (図1ならびに図2, 後述)。自然免疫型T細胞の分化・増殖はMHC分子そのものではなく、NKT細胞がCD1d, MAIT細胞がMR1 (MHC-related 1) といずれもMHC類似分子に依存する。NKT細胞ならびにMAIT細胞はマウスからヒトまで系統進化学的に保存されているが、その存在量には大きな相違がある。NKT細胞はマウスには豊富である一方、ヒトには希有である。これとは対照的にMAIT細胞はヒトに多く存在し、マウスにはほとんどない (図2)。MAIT細胞はヒト末梢血単核球、腸管粘膜固有層、肝臓に存在する全T細胞のそれぞれ1~10%, 3~10%, 20~50%を占め、おそらくヒトで最大のT細胞集団である<sup>2)</sup>。さらに無菌マウスを用いた実験から腸管でのMAIT細胞蓄積には常在菌が必要であることがわかっている。通常型T細胞ならびにNKT細胞は*in vitro*で抗原刺激等に反応して増殖能を示すが、

### MAIT細胞

- ・ 単一なT細胞抗原受容体 (Va7.2-Ja33) とNK細胞マーカー発現
- ・ リガンド: 微生物由来のビタミンB2合成中間産物 (下図)
- ・ 分化・増殖はMR1分子に依存
- ・ 粘膜に多く存在し、腸管への蓄積には常在菌の存在が必要
- ・ *in vitro*では増殖不可

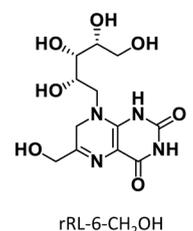
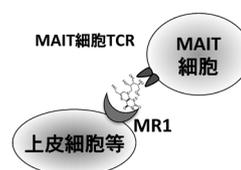


図1 MAIT細胞の特徴のまとめ

MAIT細胞は適応免疫に使用されるT, B細胞とは異なり、プロフェッショナル抗原提示細胞のみならず、上皮細胞等リガンドが結合したMR1分子を表面に発現する細胞により活性化される。右下の化学式はMAIT細胞が認識するリガンドのうち、アゴニストであるビタミンB2合成中間体 (reduced 6-hydroxy-methyl-8-D-ribityllumazine: rRL-6-CH<sub>2</sub>OH) を示す。

北海道大学大学院医学研究科衛生学・細胞予防医学 (〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目)

Expansion of MAIT cells via reprogramming to pluripotency and redifferentiation

Hiroshi Wakao and Hiroyoshi Fujita (Hygiene and Cellular Preventive Medicine, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, N15W7, Kita-ku Sapporo-shi 060-8638, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870112

© 2015 公益社団法人日本生化学会

### MAIT細胞とNKT細胞との比較

TCR $\alpha$ 鎖	マウスV $\alpha$ 19、ヒトV $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33	マウスV $\alpha$ 14、ヒトV $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18
TCR $\beta$ 鎖	マウスV $\beta$ 6,8、ヒトV $\beta$ 2,13	マウスV $\beta$ 2,7,8、ヒトV $\beta$ 11
補助受容体	DN, CD8 $\alpha\beta^{\text{int}}$ (ヒト)	DN, CD4(マウス/ヒト) CD8 $\alpha\alpha$ (ヒト)
存在量	ヒト>>マウス	マウス>>ヒト
存在場所	末梢血、腸管粘膜固有層、肝臓	胸腺、脾臓、肝臓
分化・増殖に必要な分子	MR1	CD1d
産生サイトカイン	IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL-17, IL-22	IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, TGF $\beta$
リガンド	ビタミンB2合成代謝中間物	糖脂質
関与する疾患	細菌・真菌感染、自己免疫疾患、炎症、がん?	感染、自己免疫疾患、炎症、がん
機能	粘膜免疫	免疫バランスの制御

図2 自然免疫型T細胞であるMAIT細胞とNKT細胞の特徴の比較

NKT細胞とMAIT細胞が関与するであろう疾患は類似しているのに対してMAIT細胞がヒトには非常に豊富である点に注目されたい。

MAIT細胞は従前知られているいかなるT細胞刺激に対しても増殖能を示さない(図1)。これはMAIT細胞を解析する上で重要である。

### 3. MAIT細胞のリガンド

MAIT細胞T細胞抗原受容体のリガンドは長い間不明であったが、最近、細菌由来ビタミンB2合成中間産物であることが示された<sup>3)</sup>。MR1の結晶化を進める過程でその構造を安定化させるものが細胞培養の培地RPMI-1640中に含まれていることがわかり、またサルモネラ菌の培養上清中にも同様の活性がみられることから、これら物質をEFI-TOF-MS (electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry) によって同定した(図1)。その構造はリビチル基とプリン環が結合したもので、MAIT細胞TCR鎖との複合体結晶構造解析によりリビチル基の水酸基がTCRアルファ鎖CDR (complementarity determining region)3内のTyr95と水素結合する一方、プリン環部位はMR1分子内の大きな溝に入り込み、MR1のArg9, Arg94と水素結合を形成することがわかった。その後の解析によりリビチル基とピリミジン環からなる化合物もMAIT細胞のリガンドとして認識されることが判明した<sup>4)</sup>。この場合もTCRアルファ鎖との相互作用にはリビチル基の水酸基とTyr95の水素結合、MR1との相互作用にはリビチル基ならびにピリミジン環とArg9, Arg94の水素結合がみられる。さらに最近、TCRベータ鎖の種類によって認識するリガンドが異なることが示された<sup>5)</sup>。MR1がMHC様の大きな溝を有し、プリン環・ピリミジン環を認識するという事実は、MR1がビタミンB2合成中間産物以外の物質を認識する蓋然性を

示す。これはMAIT細胞機能を考える上で、また創薬の視点からも重要である。

## 4. MAIT細胞の機能

### 1) 細菌感染

MAIT細胞のこれまでに解明された機能として細菌や真菌に対する感染防御能があげられる。パリCurie研究所のLantzらはヒト末梢血のMAIT細胞が感染した単球を認識してインターフェロンガンマ(IFN- $\gamma$ )を産生することを示し、MR1を欠損したマウス(MAIT細胞が分化・増殖できない)では抗酸菌感染に対する抵抗性が低下することを示した<sup>6)</sup>。同様にこのマウスでは肺炎桿菌*Klebsiella pneumoniae*に対する感染抵抗性、特に感染初期における抵抗性の減弱が観察される<sup>7)</sup>。また野兎病感染モデルでは経時的にMAIT細胞が肺に集積し、適応免疫に関わる細胞に代わって菌増殖を抑制するとの報告もある<sup>8)</sup>。以上から感染においてMAIT細胞は静菌作用を発揮すると考えられる。

### 2) 自己免疫疾患

MAIT細胞が多発性硬化症、炎症性腸炎、関節リウマチなど自己免疫疾患に関与することを示す証拠がある。多発性硬化症は中枢神経鞘の脱ミエリン化を特徴とする疾患である。MAIT細胞が多発性硬化症の病態を反映するという報告では患者末梢血中のMAIT細胞存在割合が、急性期において減少し、緩解とともに回復する<sup>9)</sup>。一方、罹患期間に比例してMAIT細胞と思われる細胞群が増加するとの報告もある。いずれの場合でもMAIT細胞が本疾患に関与するのことは明らかにされていない。炎症性腸炎はクローン病のように病変部が広範囲の消化管に及ぶものと大腸炎のように大腸に限定されるものがある。これらの患者では末梢血中MAIT細胞の存在割合は減少しており、刺激に対するサイトカイン産生能の変化がみられた。すなわち、患者由来MAIT細胞から産生されるIFN- $\gamma$ は健常人に比して減少するが、炎症性サイトカインであるインターロイキン17(IL-17)の産生量増加が観察された。また、クローン病回腸の病変部には正常部位に比してより多くのMAIT細胞が集積していた<sup>10)</sup>。しかし、MAIT細胞が炎症を増悪させるのか、あるいは炎症防御に働くのかは不明である。ヒト関節炎のモデルとしてコラーゲン誘導性関節炎マウスが知られているが、MR1ノックアウトマウスにおいては炎症の減弱が観察された<sup>11)</sup>。

これはMAIT細胞が関節炎を増悪させることを示唆するものである。

## 5. MAIT細胞のiPS化と再分化

上記のようにMAIT細胞はヒトで豊富に存在し、免疫システムの中で重要な機能を持つことが予想された。しかし、この細胞は*in vitro*で増殖能を有しないため*ex vivo*や*in vitro*における研究は困難であることが容易に想像できる。これを克服するため、我々はヒトMAIT細胞をiPS化し、再度MAIT細胞へと分化させた。がん化の恐れを最小限に抑えるため、ゲノムDNAを修飾しないセンダイウイルスにiPS化因子を組み込み、臍帯血から精製したMAIT細胞に感染させた。感染後、3日でコロニーが観察され、3週間後にはヒトES細胞と形態学的に区別不可能な様を示した(図3A)。ここで得られたiPS細胞(以下MAIT-iPS細胞)はES細胞の特徴である、*OCT3/4*、*NANOG*遺伝子プロモーター部位の脱メチル化、テロメラーゼ活性の出現、未分化マーカーの発現、*in vitro*、*in vivo*における3胚葉(外胚葉、中胚葉、内胚葉)への多分化能を示した。また、トランスクリプトーム解析からもMAIT-iPS細胞はヒトES/iPS細胞に近いことが証明された<sup>12)</sup>。

MAIT-iPS細胞はTCR遺伝子座がMAIT細胞特異的に遺伝子再構成したゲノム配列を持つ。繊維芽細胞などほかの体細胞由来iPS細胞からT細胞を分化誘導することは可能であるが、得られる細胞はCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>ダブルポジティ

ブのポリクローナルな未熟T細胞のみである。これは上記iPS細胞由来のT細胞前駆細胞においてはV-Jの遺伝子再構成がランダムに起こるためと考えられる。一方、ゲノムDNAに遺伝子再構成済みMAIT細胞特異的不変TCRアルファ鎖遺伝子座を有するiPS細胞では、T細胞へと分化誘導しても新たな遺伝子再構成が起こらない。これはNKT細胞の核移植によって樹立したクローン胚からT細胞を分化誘導すると、そのすべてがNKT細胞になるという実験結果から推定される<sup>13)</sup>。事実、MAIT-iPS細胞をT細胞分化誘導条件下で培養すると得られたリンパ球の98%以上がMAIT細胞(CD3<sup>+</sup>Vα7.2<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>)であった(図3B)。分化時間に比例して、MAIT細胞として認識される割合が増加したが、この際トランスクリプトーム解析を行い、分化経過とともにその発現プロファイルが臍帯血由来MAIT細胞に近づくことを確認した<sup>12)</sup>。以上、MAIT細胞を一度MAIT-iPS細胞に分化させ、再びT細胞へと分化誘導させることでMAIT細胞が高効率で得られることがわかった。MAIT-iPS細胞は*in vitro*で大量に増やせることから、この手法を用いることで、これまで生体内から単離し解析するしか手法がなかったMAIT細胞を大量に取得することが可能となった。

## 6. reMAIT細胞の機能

このMAIT-iPS細胞から得られたMAIT細胞(以下reMAIT細胞)がヒト末梢血に存在するMAIT細胞同様、感染した単球との共培養によりIFN-γを産生するかを検討した。その結果、reMAIT細胞と感染単球との培養上清からはIFN-γが検出され、同時にIL-10、IL-12、Tumor Necrosis factor(TNF)-α、IL-17、IL-22などのサイトカインとMIP、IP10などのケモカイン産生が観察された。また、reMAIT細胞を免疫不全マウスに移入すると各種組織で生着がみられ、reMAIT細胞表面抗原の発現変化が観察された。特にreMAIT細胞はCD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>のナイーブ型であったのに対して、マウス内ではCD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>となっていた。これはreMAIT細胞がマウスにおいてヒト末梢血に存在するMAIT細胞同様にメモリー型に変化したことを示す。以上を踏まえreMAIT細胞が感染制御能を発揮する可能性を追求した。あらかじめreMAIT細胞を免疫不全マウスに移入し、抗酸菌に感染させたところ、肝臓および脾臓での抗酸菌量はreMAIT細胞を移入しないコントロールマウスに比して、50%、60%と有為に減少していた。さらにこの抗菌活性を担うエフェクター分子の同定を行った。同様の実験系において抗酸菌感染後の血清を解析したところグラニューライシンをreMAIT細胞移入マウスから検出した。グラニューライシンは細胞内に潜んでいる細菌類を殺傷するのに重要な分子であることが示されている<sup>14)</sup>。このモデルによるとパーフォリンによって感染細胞に

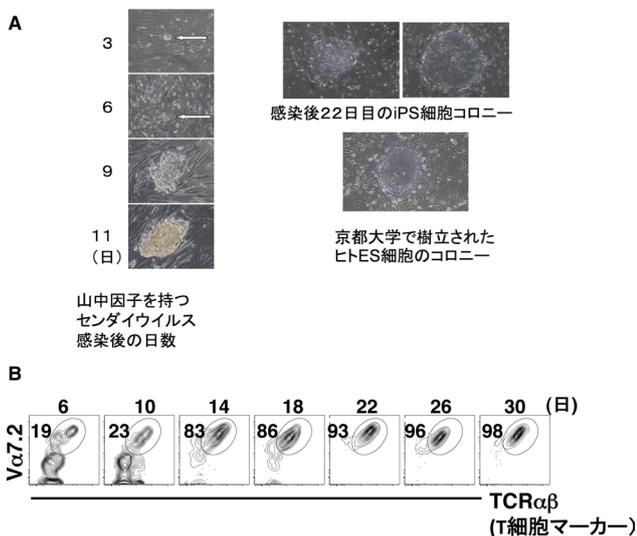


図3 MAIT細胞のiPS化とiPS細胞からのMAIT細胞再分化誘導 (A) 臍帯血由来MAIT細胞にセンダイウイルスベクターを感染させてiPS化したときの経時的なコロニー形成のようす(左図)。ベクター感染後3日ですでにコロニーが観察される点に注目。感染後3週間経つと、ヒトES細胞と形態学上区別がつかなくなる(右図)。(B) MAIT細胞由来iPS細胞を*in vitro*分化誘導して得られたリンパ球のフローサイトメトリー。縦軸はMAIT細胞TCRのVα7.2を認識する抗体、横軸はアルファ・ベータ型T細胞を認識する抗体である。分化誘導時間に比例してVα7.2<sup>+</sup>TCRαβ<sup>+</sup>であるMAIT細胞の割合増加が観察される。

穴が開けられ、グラニューライシンとグランザイムが細胞内に挿入される。グラニューライシンは次に細菌膜・壁を物理的に破壊し、セリン・トレオニンプロテアーゼであるグランザイムを菌体内に導入する。グランザイムは菌の生存に必須である電子伝達系複合体サブユニットや、活性酸素類・過酸化水素などから菌を保護するスーパーオキシドジスムターゼ、オキシゲナーゼ、カタラーゼなどを分解し、菌を殺すことが示されている。さらにグラニューライシンはマウス・ラットなどのげっ歯類にはそのホモログが存在しない。これはヒトとげっ歯類の免疫システムが質的に異なることを意味する。

## 7. 今後の展望

MAIT細胞が細菌感染における生体防御に重要な役割を担うことは示されたが、その詳細な分子メカニズムについてはいまだ不明の点が多い。MAIT細胞は感染した単球を認識し、IFN- $\gamma$ を産生するが、最近、MAIT細胞が感染した上皮細胞を認識して殺傷することが示された<sup>15)</sup>。これは気管上皮や肺胞上皮において行われている恒常的免疫反応を考えると興味深い。定常状態では粘膜上皮から分泌される粘液ならびに粘液中に存在する抗菌ペプチドの存在により外部から侵入する細菌類は上皮細胞まで届くことはない。しかし、感染が成立すると菌は上皮まで侵入しうる。このような場合に、感染の広がりを防止するため感染上皮細胞を除去することは合目的的である。ここで注目すべき点は通常型T細胞による細胞傷害性は数分程度で終了するのに対して、MAIT細胞によるものは数時間から10時間程度の時間を要することである。この傷害活性に関するエフェクター分子同定、分子機序解明などは今後の解析を待たねばならない。また、ヒト自己免疫疾患におけるMAIT細胞の機能解析を進めるには免疫不全マウス等を使用してreMAIT細胞や患者由来MAIT細胞を使用した疾患モデルの構築が必要となる。いずれの場合でも、マウスとは異なったヒト特異的な免疫反応の一端が明らかになることで、新たな観点からの創薬や細胞治療が可能となると期待できる。

## 文 献

1) Salio, M., Silk, J.D., Jones, E.Y., & Cerundolo, V. (2014) *Annu.*

*Rev. Immunol.*, **32**, 323–366.

- 2) Dusseaux, M., Martin, E., Serriari, N., Péguillet, I., Premel, V., Louis, D., Milder, M., Le Bourhis, L., Soudais, C., Treiner, E., & Lantz, O. (2011) *Blood*, **117**, 1250–1259.
- 3) Kjer-Nielsen, L., Patel, O., Corbett, A.J., Le Nours, J., Meehan, B., Liu, L., Bhati, M., Chen, Z., Kostenko, L., Reantragoon, R., Williamson, N.A., Purcell, A.W., Dudek, N.L., McConville, M.J., O'Hair, R.A., Khairallah, G.N., Godfrey, D.I., Fairlie, D.P., Rossjohn, J., & McCluskey, J. (2012) *Nature*, **491**, 717–723.
- 4) Corbett, A.J., Eckle, S.B., Birkinshaw, R.W., Liu, L., Patel, O., Mahony, J., Chen, Z., Reantragoon, R., Meehan, B., Cao, H., Williamson, N.A., Strugnell, R.A., Van Sinderen, D., Mak, J.Y., Fairlie, D.P., Kjer-Nielsen, L., Rossjohn, J., & McCluskey, J. (2014) *Nature*, **509**, 361–365.
- 5) Gold, M.C., McLaren, J.E., Reistetter, J.A., Smyk-Pearson, S., Ladell, K., Swarbrick, G.M., Yu, Y.Y., Hansen, T.H., Lund, O., Nielsen, M., Gerritsen, B., Kesmir, C., Miles, J.J., Lewinsohn, D.A., Price, D.A., & Lewinsohn, D.M. (2014) *J. Exp. Med.*, **211**, 1601–1610.
- 6) Le Bourhis, L., Martin, E., Péguillet, I., Guihot, A., Froux, N., Coré, M., Lévy, E., Dusseaux, M., Meyssonier, V., Premel, V., Ngo, C., Riteau, B., Duban, L., Robert, D., Huang, S., Rottman, M., Soudais, C., & Lantz, O. (2010) *Nat. Immunol.*, **11**, 701–708.
- 7) Georgel, P., Radosavljevic, M., Macquin, C., & Bahram, S. (2011) *Mol. Immunol.*, **48**, 769–775.
- 8) Meierovics, A., Yankelevich, W.J., & Cowley, S.C. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, E3119–E3128.
- 9) Miyazaki, Y., Miyake, S., Chiba, A., Lantz, O., & Yamamura, T. (2011) *Int. Immunol.*, **23**, 529–535.
- 10) Serriari, N.E., Eoche, M., Lamotte, L., Lion, J., Fumery, M., Marcelo, P., Chatelain, D., Barre, A., Nguyen-Khac, E., Lantz, O., Dupas, J.L., & Treiner, E. (2014) *Clin. Exp. Immunol.*, **176**, 266–274.
- 11) Chiba, A., Tajima, R., Tomi, C., Miyazaki, Y., Yamamura, T., & Miyake, S. (2012) *Arthritis Rheum.*, **64**, 153–161.
- 12) Wakao, H., Yoshikiyo, K., Koshimizu, U., Furukawa, T., Enomoto, K., Matsunaga, T., Tanaka, T., Yasutomi, Y., Yamada, T., Minakami, H., Tanaka, J., Oda, A., Sasaki, T., Wakao, R., Lantz, O., Udagawa, T., Sekiya, Y., Higuchi, K., Harada, N., Nishimura, K., Ohtaka, M., Nakanishi, M., & Fujita, H. (2013) *Cell Stem Cell*, **12**, 546–558.
- 13) Wakao, H., Wakao, R., Sakata, S., Iwabuchi, K., Oda, A., & Fujita, H. (2008) *FASEB J.*, **22**, 2223–2231.
- 14) Walch, M., Dotiwala, F., Mulik, S., Thiery, J., Kirchhausen, T., Clayberger, C., Krensky, A.M., Martinvalet, D., & Lieberman, J. (2014) *Cell*, **157**, 1309–1323.
- 15) Le Bourhis, L., Dusseaux, M., Bohineust, A., Bessoles, S., Martin, E., Premel, V., Coré, M., Sleurs, D., Serriari, N.E., Treiner, E., Hivroz, C., Sansonetti, P., Gougeon, M.L., Soudais, C., & Lantz, O. (2013) *PLoS Pathog.*, **9**, e1003681.

## 著者寸描

●若尾 宏 (わかお ひろし)

北海道大学大学院医学研究科衛生学・細胞予防医学分野准教授。Ph.D.

■略歴 1990年フランス、ルイ・パスツール大学地球・生命科学専攻博士課程修了。Ph.D. 東京大学、ヘリックス研究所、理化学研究所を経て、2006年より北海道大学大学院医学研究科勤務。

■研究テーマと抱負 自然免疫型T細胞であるMAIT細胞の機能解析とiPS細胞から調整したMAIT細胞を使用した再生医療・細胞治療の実現。

■趣味 英・仏語のニュースを見ること。