

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

### IL-4 応答性新規 NK 細胞サブセットの機能解析 および生理的意義の解明 (Interleukin-4 induces a unique subset of NK cells)

氏名 木庭 乾

#### 【背景】

NK (Natural killer) 細胞は、抗原の感作なしに細胞傷害活性を発揮することのできる大型の顆粒性リンパ球であり、がん細胞やウイルス感染細胞などを直接傷害し、細胞死を誘導するとともに、IFN $\gamma$ をはじめとした様々なサイトカインを産生することで他の免疫細胞の活性化を促す機能を持つ。免疫応答は、抗原刺激の種類や作用するサイトカイン、活性化細胞の種類によって Th1 応答/Th2 応答に大別される。NK 細胞はウイルス・細菌感染時に誘導される Th1 応答の代表的なエフェクター細胞として知られており、IL-12 や IL-18 といった Th1 サイトカインによって活性化されることで高い細胞傷害活性を発揮し、また大量の IFN $\gamma$  産生によって Th1 応答をさらに増強する役割を果たすことが報告されてきた。一方、寄生虫感染やアレルギー反応に際して誘導される Th2 応答における NK 細胞の機能については報告自体が少なく、理解が進んでいないのが現状である。そこで本研究では、Th2 応答における NK 細胞の生理的役割を明らかにするため、Th2 応答の開始因子として知られる IL-4 に着目し、特に *in vivo* における NK 細胞に対する作用の解析を行った。

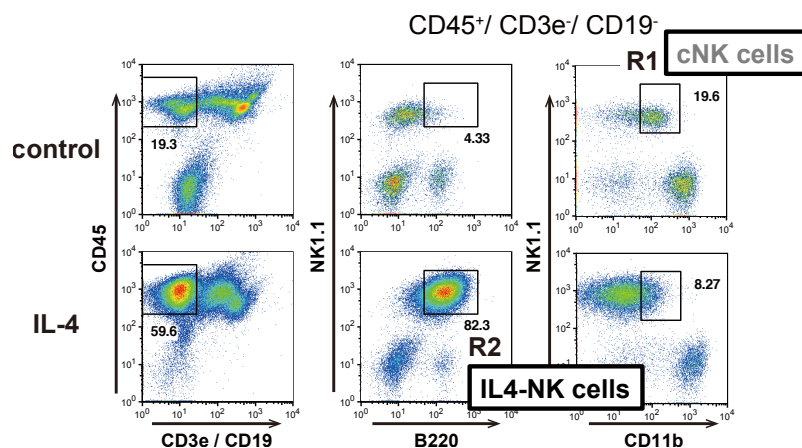
#### 【結果】

##### ・ IL4-NK の発見

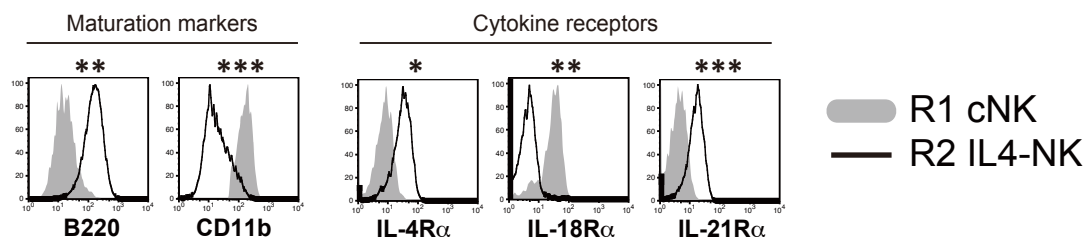
HTVi 法により IL-4 を過剰発現させ、5 日目の肝臓中の血液細胞をフローサイトメトリーによって解析したところ、B220<sup>high</sup>/NK1.1<sup>high</sup> 細胞集団が劇的に増加していた (図 1)。この細胞集団は NK 細胞の共通マーカーである CD49b やその他 NK 細胞受容体を高発現することから NK 細胞の一種と考えられたが、定常状態に存在する conventional mature NK cell (cNK) とは多くのマーカー発現パターンが異なっていた。例えば、B220<sup>high</sup>/NK1.1<sup>high</sup> 細胞は cNK と比べ B220 の発現が高く、CD11b の発現が低いといった、immature な NK 細胞に見られる発現パターンを示した (図 2)。しかし、いくつかの活性化レセ

プターを高発現しており、逆に抑制性レセプターの発現は低いことから、活性化状態にあると考えられた。さらに、サイトカインレセプターの発現パターンにも特徴が見られ、IL-4R $\alpha$ 、IL-21R $\alpha$  の発現が cNK に比べて顕著に高い一方で、IL-18R $\alpha$  については明らかに低い発現を示した(図2)。以上の結果から、B220<sup>high</sup>/NK1.1<sup>high</sup> 細胞は、IL-4 応答性の新規活性化 NK 細胞サブセットと考えられ、本研究ではこれを IL-4-responsive NK cell (IL4-NK) と命名し、さらに詳細な解析を行った。

**図1** IL-4過剰発現によるB220<sup>high</sup>/NK1.1<sup>high</sup> 細胞の増加



**図2** IL4-NKとcNKのマーカー発現の違い



### ・ IL4-NK の由来

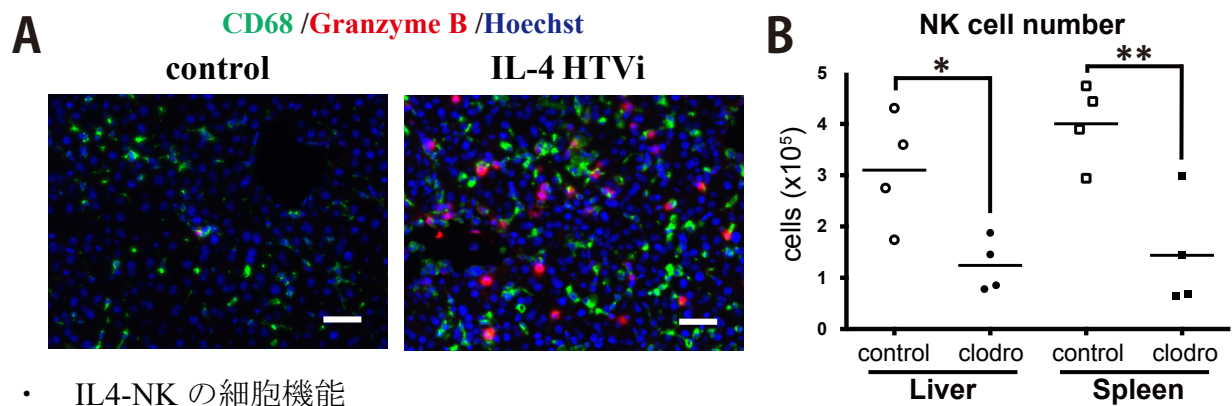
IL-4 過剰発現時に cNK がほぼ存在しないことから、cNK が IL4-NK の由来となっている可能性が考えられた。そこで、IL-4 を過剰発現させたマウス、およびコントロールマウスに単離した cNK を移植し、その後のマーカー発現の比較を行った。その結果、IL-4 を過剰発現させたマウスに移植した場合に、B220、CD11b、IL-18R $\alpha$ 、IL-21R $\alpha$  の発現が IL4-NK と同様のパターンに変化していることが明らかになり、cNK が IL4-NK に変化するポテンシャルを持つことが示された。

### ・ IL4-NK の増殖メカニズム

*in vivo* における IL-4 の過剰発現は cNK を IL4-NK へと変化させたが、単離した cNK を IL-4 単独存在下で培養しても、すぐに死滅し、IL4-NK は誘導出来なかった。一方、EdU 取り込み実験から、IL-4 過剰発現マウスの体内において IL4-NK は盛んに増殖していることが明らかになった。こうした *in vitro* および *in vivo* での違いから、*in vivo* では IL-4 が他の細胞に作用し、間接的に NK 細胞の増殖を促していると考えられた。そこで、NK 細胞の代表的な増殖因子である IL-15 の主要な産生細胞であり、また IL-4 によって自身が増殖することが知られるマクロファージに着目し、解析を行った。その結果、

マクロファージが IL-4 過剰発現によって劇的に増加していること(図 3A), IL-4 過剰発現時に clodronate liposome 投与によってマクロファージを除去することで NK 細胞の増殖が抑制されることが明らかになった(図 3B)。さらに, IL-4 過剰発現マウスから単離したマクロファージと cNK との共培養系において, IL-15 を中和することで cNK の viability が減少したことから, IL-4 がマクロファージの増殖および IL-15 産生を介して IL4-NK の増殖に寄与することが示唆された。

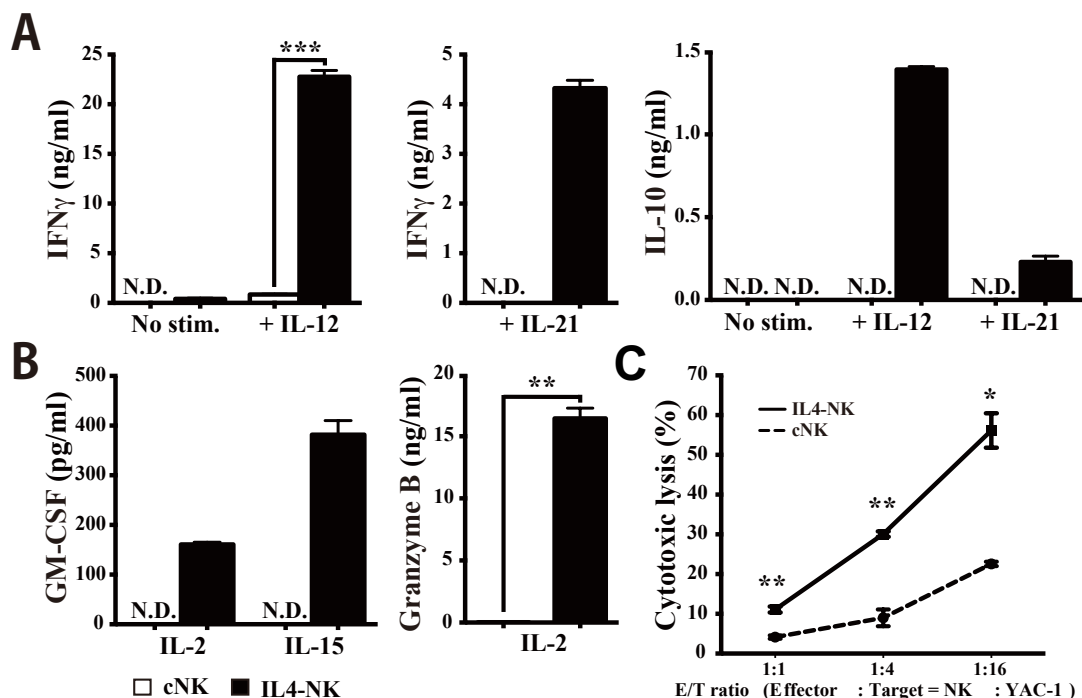
**図3** IL-4過剰発現によるマクロファージの増加とNK細胞増殖への寄与



• IL4-NK の細胞機能

IL4-NK のサイトカイン産生能, 細胞傷害活性について, cNK との比較を行った。単離した IL4-NK と cNK に各種刺激を与えた培養上清を ELISA に供し, IFN $\gamma$ , IL-10, GM-CSF, Granzyme B を定量したところ, いずれについても IL4-NK における産生量が c-NK を上回っていた(図 4)。IFN $\gamma$ , IL-10 については, IL-12, IL-21 など刺激することで多量の産生が確認され, これらのサイトカインに対する IL4-NK の感受性が增强されていることが示唆された(図 4 A)。一方, GM-CSF, Granzyme B に関しては特別な刺激を加えることなく, viability 維持のため添加した IL-2 や IL-15 単独存在下においても高い産生が見られた(図 4 B)。さらに, T リンパ腫細胞株 YAC-1 に対する細胞傷害活性を比較したところ, IL4-NK は cNK に比べ非常に高い活性を示した(図 4 C)。

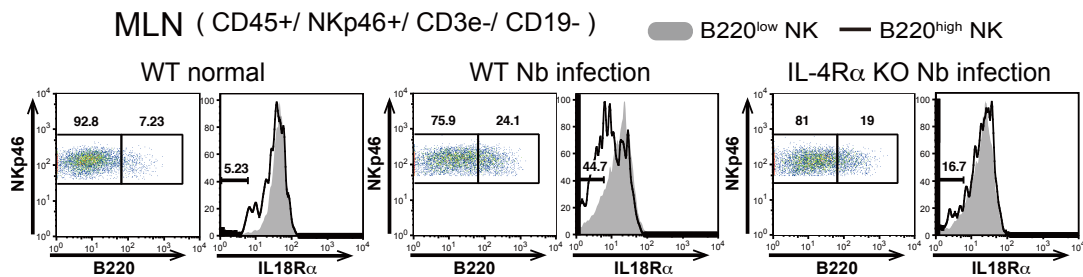
**図4** IL4-NKのサイトカイン産生および細胞傷害活性



・ 生理的条件下における IL4-NK の出現

特徴的な活性化状態にあることがわかった IL4-NK が、過剰発現ではなく、生理的なレベルの IL-4 の産生に応じて誘導されるか検討するため、IL-4 の発現が強く誘導されることで知られる寄生虫感染モデルの解析を行った。腸管寄生虫である *Nippostrongylus brasiliensis* を感染させ 10 日目のマウス腸管リンパ節を解析した結果、 $B220^{high}/IL-18R\alpha^{low}$  を示す IL4-NK 様細胞が出現することが明らかになった。一方、IL-4R $\alpha$  KO マウスでは出現しないことから、この細胞集団が IL-4 依存的であることが確かめられた。さらに、IL4-NK 様細胞と  $B220^{low}/IL-18R\alpha^{high}$  を示す cNK 様細胞をそれぞれ単離し遺伝子発現を比較したところ、IL4-NK 様細胞において、IL-4NK と同じく GM-CSF, IL-10 の発現が高い傾向にあった。以上の結果から、寄生虫感染によって、IL4-NK とよく似たマーカー発現と機能を発現する細胞が IL-4 依存的に誘導されることが示唆された。

図5 寄生虫感染によってIL-4依存的に誘導されるIL4-NK様細胞



【結論】

本研究では、*in vivo* での IL-4 産生によって、NK 細胞が増殖を伴い活性化する経路が存在することを新たに見出した。IL-4 によって誘導される IL4-NK は、高いサイトカイン産生、細胞傷害活性を有しており、これまで注目されてこなかった Th2 応答における NK 細胞の新たなエフェクター機能の存在を示唆するものである。この細胞の機能、生理的役割のさらなる解明は Th2 応答制御機構の理解を深めることに繋がると考えられる。

図 6 本研究でわかったこと

