

# 論文の内容の要旨

論文題目 IL-15 による Ly6C<sup>high</sup>NK 細胞の再活性化

(Ly6C<sup>high</sup> natural killer cells can be reactivated by IL-15)

氏名 尾見 歩惟

## 研究の背景：Natural killer 細胞にはいくつかのサブセットが存在する

Natural killer 細胞（NK 細胞）は、抗腫瘍・抗ウイルス反応を増強する IFN- $\gamma$ を産生すると共に、腫瘍細胞やウイルス感染細胞に対して傷害性を示す主要な免疫細胞である。NK 細胞は、抗原感作がなくとも標的細胞を傷害することができ、免疫応答の早期から働くことから自然免疫系の細胞に分類される。これまでに標的細胞の認識機構に関する研究が盛んに行われてきたが、分化・成熟過程やその制御因子については不明な点が多く残されている。

NK 細胞は他の血球と同じく造血幹細胞に由来し、骨髄で分化・成熟する。多くの自然免疫系の細胞は骨髄球系に分類されるが、NK 細胞はリンパ球系に分類され、獲得免疫系の主役である T 細胞の近縁とされている。実際、NK 細胞と T 細胞はいくつかの細胞表面分子を共有していることや、標的細胞の認識機構こそ違うものの標的細胞傷害のメカニズムは同じであることが明らかとなっている。T 細胞には生体内の環境に応じて様々なサブセットが存在することが知られており、これまで精力的に各サブセットの解析が行われてきた。一方、NK 細胞にもいくつかのサブセットが存在することが明らかにされているが、注目を集めるようになったのは比較的最近である。当初想定されていた以上に複雑な分化過程や生理学的機能が明らかになりつつあるが、未だ不明な点が多い。

## 本研究の目的：新規 NK 細胞サブセット、Ly6C<sup>high</sup> 及び Ly6C<sup>low</sup> の比較解析

Ly6C は Ly6 スーパーファミリーのメンバーで、GIP アンカー型細胞表面抗原である。Ly6C は主にリンパ球、単球/マクロファージ、顆粒球に発現しており、詳細な機能は不明であるが、

発現細胞の発生・成熟に関与していると考えられている。さらに、メモリーT細胞のマーカーとしても良く知られている。本研究では、マウス成熟NK細胞が、Ly6Cの発現量によりLy6C<sup>high</sup>とLy6C<sup>low</sup>の分画に分かれることを見いだした。NK細胞ではLy6Cの発現の違いに着目した詳細な解析は行われておらず、本研究ではそれら細胞集団の成熟段階や機能的な違いを解析した。

## 結果

### (1) マウス成熟NK細胞におけるLy6Cの発現

マウスの脾臓から血球を回収し、成熟NK細胞(CD11b<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> CD3e<sup>-</sup>)におけるLy6Cの発現をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、Ly6Cの発現量により二つのサブセットに分かれることを見いだした(Ly6C<sup>high</sup>及びLy6C<sup>low</sup>)。

### (2) Ly6C<sup>high</sup>は活性が抑制された状態である

NK細胞は免疫応答において様々な役割を果たしているが、中でも重要な役割のうちの一つにIFN- $\gamma$ 産生が挙げられる。そこで、Ly6C<sup>high</sup>とLy6C<sup>low</sup>の活性を比較するために、両者のIFN- $\gamma$ 産生を定量した。マウスの脾臓よりNK細胞を分取し、IL-12もしくはIL-18で刺激し、ELISAを行った。その結果、どちらのサイトカインで刺激した場合も、Ly6C<sup>high</sup>はLy6C<sup>low</sup>よりもIFN- $\gamma$ の産生量が格段に低い事が分かった。

標的細胞に対する傷害活性はNK細胞のもう一つの主要な役割である。活性化されたNK細胞はperforinやgranzyme Bといったタンパク質を放出して標的細胞を傷害するが、granzyme Bはcaspaseを切断することにより直接的に標的細胞のアポトーシスを誘導することが知られている。そこでLy6C<sup>high</sup>とLy6C<sup>low</sup>の細胞傷害能を比較するために、granzyme B産生をIFN- $\gamma$ と同様の手法でELISAにて定量した。その結果、どちらのサイトカインで刺激した場合も、Ly6C<sup>high</sup>はLy6C<sup>low</sup>よりもgranzyme Bの産生量が格段に低い事が分かった。

IL-15はNK細胞の生存、増殖に必須なサイトカインである。そこで各サブセットの増殖能を調べるために、マウス脾臓よりLy6C<sup>high</sup>とLy6C<sup>low</sup>を分取し、IL-15存在下で培養した。培養0、2、4、6日目に細胞増殖アッセイを行ったところ、どの時点においてもLy6C<sup>high</sup>の増殖能はLy6C<sup>low</sup>と比べて顕著に低いことが判明した。

以上の結果から、Ly6C<sup>high</sup>はLy6C<sup>low</sup>よりも活性と増殖能が低いことが明らかとなった。

### (3) Ly6C<sup>high</sup>はLy6C<sup>low</sup>から生じる

次に、Ly6C<sup>high</sup>とLy6C<sup>low</sup>の発生順序を明らかにするために移植実験を行った。まず、B6マウス(CD45.2<sup>+</sup>)の脾臓からLy6C<sup>high</sup>とLy6C<sup>low</sup>をそれぞれ分取し、各サブセットをLy5.1マウス(CD45.1<sup>+</sup>)に尾静脈より移植した。2週間後、レシピエントマウスの脾臓に存在するドナー由来の細胞(CD45.2<sup>+</sup>)のLy6Cの発現量をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、

Ly6C<sup>low</sup> のおよそ半数は Ly6C<sup>high</sup> へと変化していることが判明した。一方、大半の Ly6C<sup>high</sup> はその発現を保っていた。これらの結果は、Ly6C<sup>high</sup> は Ly6C<sup>low</sup> から生じる、より成熟した NK 細胞であることを示している。

#### (4) Ly6C<sup>high</sup> は IL-15 存在下で Ly6C<sup>low</sup> へと変化する

IL-15 は NK 細胞の発生や成熟にも必須なサイトカインである。そこで、IL-15 が Ly6C の発現に影響を与えるか否かを明らかにするために、マウスの脾臓より各サブセットを分取し、IL-15 存在下で培養した。培養 0、2、4、6 日目にて Ly6C の発現をフローサイトメトリーにて解析したところ、Ly6C<sup>low</sup> における発現量はどの時点においても低いままであった (Ly6C<sup>low(low)</sup>)。一方、興味深いことに、Ly6C<sup>high</sup> における発現量は 2 日目から徐々に下がり始め、6 日目にはほとんどの細胞が Ly6C<sup>low</sup> へと変化していた (Ly6C<sup>low(high)</sup>)。

先に示した通り、Ly6C<sup>low</sup> は Ly6C<sup>high</sup> よりも高い活性を持つことが明らかとなっている。そこで、Ly6C<sup>low(high)</sup> は Ly6C の発現量だけでなく活性も変化している可能性を検証するために、Ly6C<sup>low(high)</sup> と Ly6C<sup>low(low)</sup> の活性を比較した。培養 6 日目の Ly6C<sup>low(high)</sup> と Ly6C<sup>low(low)</sup> の IFN- $\gamma$  の産生量を ELISA にて定量した結果、Ly6C<sup>low(high)</sup> の産生量は Ly6C<sup>low(low)</sup> の産生量と同等であることを見いだした。さらに同様に granzyme B の産生量を定量したところ、Ly6C<sup>low(high)</sup> の産生量は Ly6C<sup>low(low)</sup> の産生量とほぼ同等であることが判明した。

#### (5) *in vivo* における Ly6C<sup>high</sup> から Ly6C<sup>low</sup> への変化

*in vitro* で観察された Ly6C の発現量の変化が *in vivo* でも起こるかを確かめるために移植実験を行った。まず、IL-15 を強制発現させた Ly5.1 マウス (CD45.1<sup>+</sup>) に、B6 マウス (CD45.2<sup>+</sup>) の脾臓から分取した Ly6C<sup>low</sup> と Ly6C<sup>high</sup> をそれぞれ尾静脈より移植した。そして4日後に、レシピエントマウスの脾臓に存在するドナー由来の細胞 (CD45.2<sup>+</sup>) の Ly6C の発現量をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、Ly6C<sup>high</sup> の約半分が Ly6C<sup>low</sup> へと変化することが明らかとなった。Ly6C<sup>low</sup> では Ly6C の発現量に大きな変化は見られなかった。

IL-15 はウイルス感染により発現誘導されるサイトカインである。そこでウイルス感染を模倣するために、ウイルスの構成成分である PolyI:C や CpG を、各サブセットを移植したマウスに腹腔内に投与した。その結果、PolyI:C と CpG を腹腔内投与したマウスでも Ly6C<sup>high</sup> が Ly6C<sup>low</sup> へと変化することを見いだした。同様の実験を Ly6C<sup>low</sup> でも行ったが、こちらでは Ly6C の発現量に大きな変化は見られなかった。

以上の結果により、Ly6C<sup>high</sup> は IL-15 が高発現される環境下で Ly6C<sup>low</sup> へと変化することのできる可塑性をもった細胞であることが明らかとなった。

## 考察

本研究により、Ly6C<sup>high</sup>はLy6C<sup>low</sup>と比べて抗腫瘍・抗ウイルス活性が低い細胞集団であることが示された。また、Ly6C<sup>high</sup>はLy6C<sup>low</sup>から生じる、より成熟したNK細胞であることが明らかとなった。これらの結果から、Ly6C<sup>high</sup>は休止状態にある成熟NK細胞であると考えられる。

一方、Ly6C<sup>high</sup>はIL-15が高発現される環境下で活性の高いLy6C<sup>low</sup>へと変化することができる可塑性を持った細胞であることが明らかとなった。IL-15はNK細胞の生存に必須なサイトカインであり、定常状態でも産生されている。そのような状況下では、活性の強いLy6C<sup>low</sup>は休眠状態であるLy6C<sup>high</sup>へと移行する。しかしpoly I:CやCpGの腹腔内投与時のようなIL-15の産生が増加したときは、Ly6C<sup>high</sup>は再活性化される。つまり、Ly6C<sup>high</sup>は「免疫応答に備えた休眠細胞」であると考えられる。このような報告は未だかつて無く、本研究はNK細胞の新たな特徴を明らかとしたものである。