

博士論文

IL-4 による IL-15 を介した NK 細胞活性化機構の解明

(NK cells activated by Interleukin-4 in cooperation with
Interleukin-15 exhibit distinctive characteristics)

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻

木庭 乾

目次

要旨	• • • • •	2
第 1 章 序章	• • • • •	3
第 2 章 材料と方法	• • • • •	10
第 3 章 結果	• • • • •	22
第 4 章 考察	• • • • •	72
第 5 章 結論	• • • • •	80
第 6 章 参考文献	• • • • •	82
謝辞	• • • • •	91

要旨

NK 細胞は Th1 サイトカインである IL-2, IL-12, IL-18 などによって活性化され、多量の IFN- γ を産生することで Th1 応答を増強する役割を果たすことが知られている。一方、Th2 応答における NK 細胞の機能に関しては未解明の部分が多く残されている。そこで本研究では、Th2 応答の開始因子として知られる IL-4 に着目し、*in vivo* で IL-4 が NK 細胞の性状、機能に与える作用の解析を試みた。その結果、成体マウスにおける IL-4 の過剰発現が、定常状態に存在する conventional NK 細胞 (B220^{low}/ CD11b^{high}/ IL-18R α ^{high}, cNK 細胞)とは明らかに異なる特徴的な NK 細胞、IL-4-induced NK 細胞 (B220^{high}/ CD11b^{low}/ IL-18R α ^{low}, IL4-NK 細胞) を劇的に増加させることを見出した。IL4-NK 細胞の増殖には、IL-4 に応答し増殖したマクロファージが産生する IL-15 が寄与していた。また、IL4-NK 細胞は cNK 細胞に比べて高い IFN- γ , IL-10, GM-CSF の産生能と強い細胞傷害活性を示す、活性化した NK 細胞であった。単離した cNK 細胞を IL-4 と IL-15 を添加して培養することで IL4-NK 細胞と類似したマーカー発現、機能が獲得されたことから、IL4-NK 細胞の誘導に IL-4 の直接的な刺激と IL-15 を介した間接的な刺激が重要であることが示唆された。さらに、生理的な Th2 応答を示す寄生虫感染において、IL-4 依存的に IL4-NK 細胞に類似したマーカー発現を示す細胞が誘導されることが明らかになった。加えて、感染時に NK 細胞を除去した場合に、好酸球や好中球と言った Th2 応答誘導性の免疫細胞を誘引するケモカインの発現が低下したことから、寄生虫感染時に NK 細胞が過剰な Th2 応答を抑制していることが示唆された。本研究は、IL-4 による IL-15を介した NK 細胞の活性化経路を解明するとともに、IL4-NK 細胞による新しい Th2 応答の抑制機構の存在を提唱するものである。

第 1 章 序論

Th1 /Th2 免疫応答のバランス制御

免疫応答は、外来の異物や変性した自己の細胞を除去し、恒常性を維持するための生体防御機構である。免疫応答は、除去すべき抗原、分泌されるサイトカイン、活性化される細胞群の違いによって、Th1 応答と Th2 応答に大別される (Fig 1)。Th1, Th2 とは一連の免疫応答で中心的な役割を果たす、ヘルパー T 細胞の活性化サブセットを意味する (Mosmann and Coffman, 1989)。がん細胞やウイルス、細菌感染細胞などの存在が感知されると、IL-12 や IFN- γ が分泌され、ナイーブな T 細胞 (Th0 細胞) の Th1 細胞への分化が促進される (Parronchi et al., 1992; Schoenborn and Wilson, 2007)。Th1 細胞は大量の IL-2 や IFN- γ を産生することで、キラー T 細胞や NK 細胞などを活性化し、がん細胞や感染細胞の排除に働く。この一連の応答を Th1 応答と呼び、IL-12 や IFN- γ は Th1 サイトカインと呼ばれる。一方、寄生虫感染時には IL-4 や IL-13 が分泌され、Th0 細胞の Th2 細胞への分化が促進される (Parronchi et al., 1992)。Th2 細胞は大量の IL-4, IL-5, IL-13などを産生し、好酸球やマスト細胞などの活性化や B 細胞からの IgE 産生を促進することで、排虫のための様々な応答を惹起する。この一連の応答を Th2 応答と呼び、この時に働く IL-4, IL-5, IL-13などは Th2 サイトカインと呼ばれる。Th1 サイトカインである IFN- γ は Th2 細胞への分化を抑制し、逆に Th2 サイトカインである IL-4 は Th1 細胞の分化を抑制する (Abbas et al., 1996; Oriss et al., 1997; Szabo et al., 1997)。このように、Th1 応答と Th2 応答は互いに抑制し合うことでバランスを保っており、生体は必要に応じて Th1 /Th2 バランスを傾けることで適切な免疫応答を惹起している。しかし、過度なあるいは持続的な抗原の刺激やバランス維持機構の異常により

Th1 /Th2 バランスが大きく傾くと、様々な疾患を引き起こすことが知られている (Kidd, 2003) (Fig 2). 例えば過剰な Th1 応答は自己免疫疾患を増悪化させ、逆に不必要な Th2 応答は様々なアレルギー疾患の要因となる (Maggi, 1998; Okazaki et al., 2000), こうした疾患の発症メカニズムの解析や治療法の確立のためにも, Th1 /Th2 応答の制御機構の解明は重要な研究課題である.

Th1 /Th2 応答にはヘルパー T 細胞以外にも様々な免疫細胞が関与している. 近年, 同じ細胞腫であっても, ヘルパー T 細胞と同様, 作用するサイトカインによって活性化様式や細胞機能が大きく変化することが明らかになってきた. 例えばマクロファージは古くから Th1 サイトカインである IFN- γ によって活性化することが知られていたが, 近年 IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインによって従来とは異なる様式で活性化することが明らかになった (Gordon and Martinez, 2010). Th1 /Th2 パラダイムに則り, 前者は M1 マクロファージ, 後者は M2 マクロファージと呼ばれる. M1 マクロファージは炎症性サイトカインである TNF- α や IL-6 を高発現するのに対し, M2 マクロファージは抗炎症性サイトカインである IL-10 を高発現するなど, 細胞機能や遺伝子発現に様々な違いが報告されている (Martinez and Gordon, 2014; Sica and Mantovani, 2012). このように, 各種サイトカインによって免疫細胞の性質がどのように変化するのか理解することは, 免疫応答の制御機構を正確に把握するために必要なアプローチである.

NK 細胞と Th1/ Th2 応答

Natural killer (NK) 細胞は, T 細胞, B 細胞に次ぐ第 3 のリンパ球と呼ばれ, 抗原の感作なしに標的細胞を攻撃することができる Natural killing 活性を持つ細胞として発見された. NK 細胞はキラー T 細胞と並ぶ Th1 応答時に活性化する代表的な細胞のひ

とつであり，がん細胞やウイルス感染細胞の排除において中心的な役割を果たす (Sun and Lanier, 2011; Vivier et al., 2008). IL-12 や IL-18 などの Th1 サイトカインにより NK 細胞が刺激されると，細胞傷害活性を発揮するとともに多量の IFN- γ を産生し，Th1 応答をさらに増強させることが知られている (Bajénoff et al., 2006; Lünemann et al., 2009; Okamura et al., 1998). Th1 応答における活性化様式や生理機能の理解が進む一方，Th2 応答における NK 細胞の挙動に関しては多くの疑問点が残されている (Fig 3). 特に IL-4 による NK 細胞の制御については，一見矛盾したような報告が散見されるなど，統一的な理解には至っていないのが現状である. IL-4 欠損マウスでは NK 細胞は野生型マウスと同等数存在し，定常状態ではその機能についても違いは見られない (Vosshenrich et al., 2005). しかし，NK 細胞は IL-4R α を発現していることが知られており，IL-4 の刺激によって様々な影響を受けることが報告されている. Jackson や Brady らは，マウスの NK 細胞の細胞傷害活性が IL-4 によって抑制されることを示した (Brady et al., 2010; Jackson et al., 2001). また Marcenaro らにより，ヒトの NK 細胞に IL-4 を作用させることで，がん細胞や未成熟な樹状細胞に対する細胞傷害活性が減弱し，さらに IFN- γ ，TNF- α ，GM-CSF などのサイトカイン産生能も抑制されることが示された (Marcenaro et al., 2005). こうした研究を背景に，IL-4 が NK 細胞に抑制的に働き，Th2 応答時に NK 細胞は休止状態にあると説明されることも多い. しかし，一方では IL-4 による NK 細胞の活性化作用に関する報告もなされている. Morris らは，IL-4 を安定化し作用を長期間持続させる，IL-4 と anti-IL-4 抗体との複合体 (IL-4C) を投与したマウスにおいて，NK 細胞由来の IFN- γ 産生が誘導されることを報告した (Morris et al., 2006). また，Bream らによって，*in vitro* での IL-4 刺激が IL-2 や IL-12 によって誘導される NK 細胞からの IFN- γ 産生を増強することが示された (Bream et al., 2003). さらに近年，

Th2 タイプのメモリー T 細胞が IL-4 を介して NK 細胞の細胞傷害活性を増強することが *in vivo* の実験系で示されるなど (Kitajima et al., 2011), 状況によっては IL-4 の作用によって NK 細胞が活性化することが示唆されている.

本研究のアプローチ

上述したように, 主要な Th2 サイトカインであるにもかかわらず, IL-4 による NK 細胞の制御機構については未解明な部分が多く, なかでも *in vivo* での IL-4 の作用についての理解が十分ではないと考えられた. そこで本研究では, 成体マウスに IL-4 を一過性に過剰発現させる実験系を用いて, *in vivo* で産生された IL-4 が NK 細胞の性状・機能にどのような影響を及ぼすかについて解析を試みた. この方法では IL-4 から NK 細胞への直接的な作用だけではなく, 他の細胞を介した間接的な作用も再現されるため, 実際の Th2 応答に近い状況での解析が期待できる. また, Th2 応答そのものを誘導する実験系では様々な Th2 サイトカインが同時に NK 細胞に作用し, IL-4 を起点とした応答を区別することが困難であるが, 本研究で行う実験系では IL-4 の過剰発現を契機に生じる現象の解析が可能になるため, より明確に IL-4 と NK 細胞の関係性を解明することができると考えられる.

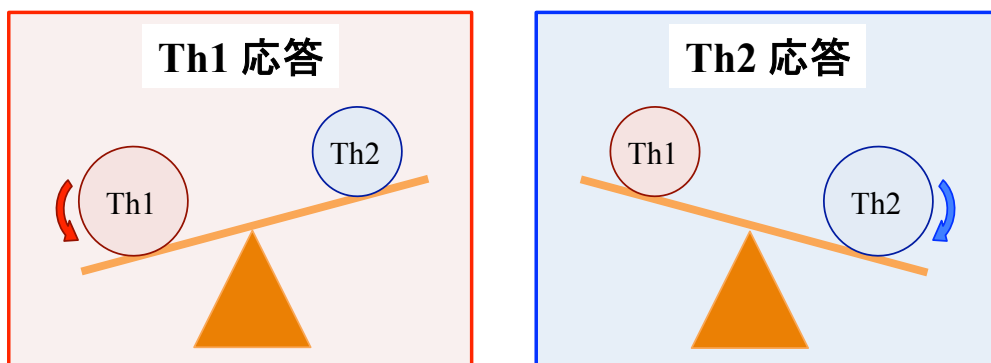
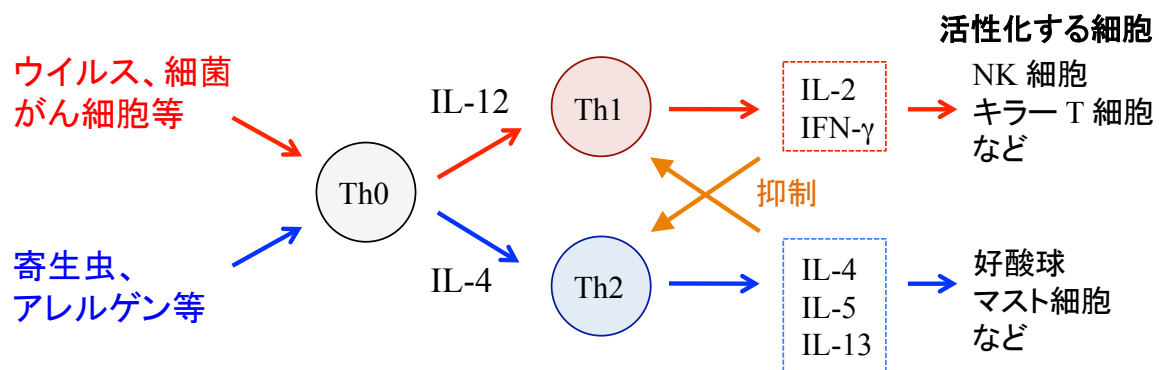


Figure 1. Th1 /Th2 免疫応答のバランス制御

免疫応答は Th1 /Th2 応答に大別される。それぞれの応答で分泌されるサイトカイン，活性化される細胞が異なり，排除すべき抗原の種類によって使い分けられている。Th1 /Th2 応答には互いに抑制し合う制御メカニズムが存在しており，通常生体内では，必要に応じてどちらかが優位になるよう精緻なバランス制御が行われている。

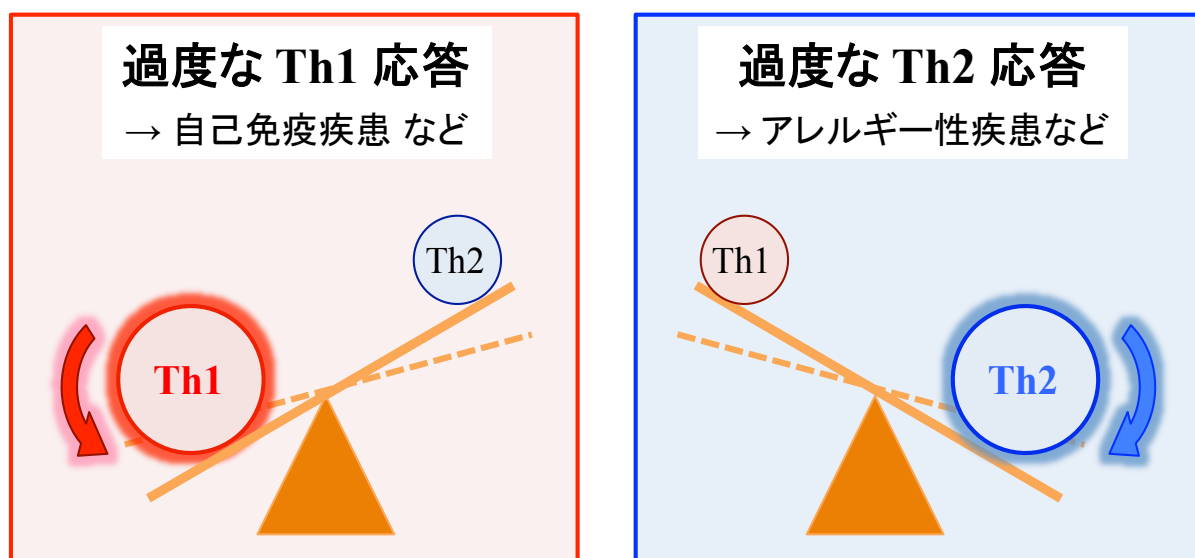


Figure 2. Th1 /Th2 バランス制御の破綻は様々な疾患の要因となる

過度な、または持続的な刺激やバランス制御機構の異常によってどちらか一方に大きく傾くと、様々な疾患の発症、増悪化の要因となる。

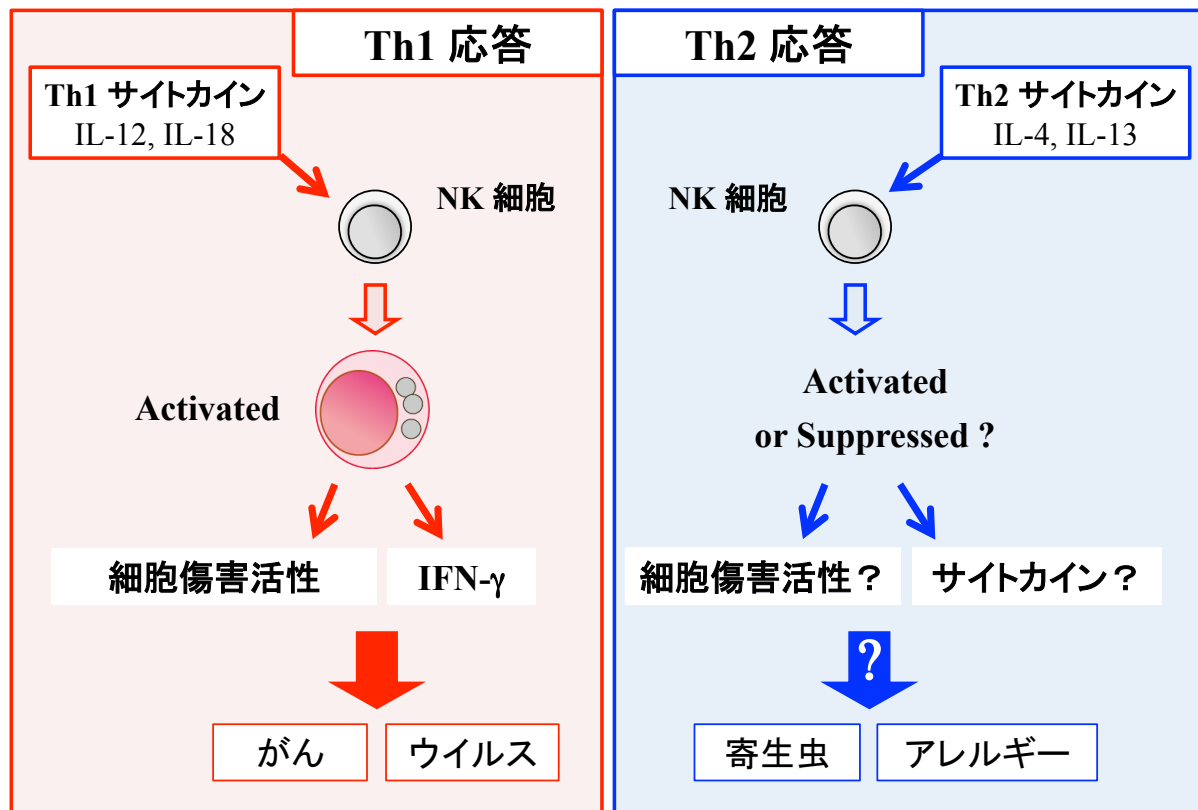


Figure 3. Th1/ Th2 応答における NK 細胞の挙動

NK 細胞は Th1 応答時に活性化される代表的な細胞として知られる。IL-12 や IL-18によって活性化されると、細胞傷害活性や IFN- γ 産生を通じて、がん細胞やウイルス感染細胞の除去に働く。一方、NK 細胞が Th2 サイトカインによってどのように制御され、どういった機能を発揮するかについては十分な理解が進んでいない。

第 2 章 材料と方法

マウスと寄生虫

野生型マウスとして、日本クレア社より購入した C57BL/6J 系統マウスおよび Balb/c 系統マウスを用いた。NK 細胞移植実験に用いた C57BL/6J 系統 CD45.1 コンジェニックマウスは RIKEN BRC より購入した。寄生虫感染実験に用いた Balb/c 系統 IL-4R α 欠損マウスは、Dr. Frank Brombacher（ケープタウン大学）が作成されたものを、久保 允人教授（東京理科大学 / RIKEN IMS）よりご供与頂いた。実験に用いた全てのマウスは SPF 環境下で飼育された 6 周齢から 12 周齢のものであり、東京大学の実験動物指針に基づいて処置を行った。寄生虫感染実験に用いた *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) の第 3 期幼虫は、石渡 賢治准教授（慈恵医科大学）よりご供与頂いた。

抗体とサイトカイン

抗体

フローサイトメトリー解析：FITC-conjugated anti-B220, CD45.2; PE-conjugated anti-B220 , CD3e; PE/Cy7-conjugated anti-CD45; biotin-conjugated anti-Thy1.1, IL-7R α ; PE-, APC-, PE/Cy7-conjugated streptavidin (BD Pharmingen より購入), FTTC-conjugated CD11b; PE-conjugated anti-NK1.1, Fc ϵ R1 α , 2B4, KLRG1, NKG2A, IL-4R α , IL-21R α , CD49b; PE/Cy7-conjugated anti-Ly6C; APC/Cy7-conjugated anti-CD11b; biotin-conjugated anti-CD49b, Fc ϵ R1 α , TRAIL, NKp46, NKG2D, F4/80; APC-conjugated CD49b, IL-21R α ; Alexa Fluor 647-conjugated IL-18R α ; BV421-conjugated anti-CD3e, CD19 (Biolegend より購入), 免疫組織染色：purified anti-CD68 (Biolegend より購入), purified anti-Granzyme B (eBioscience

より購入), **Intracellular staining** : PE-conjugated anti-Granzyme B (eBioscience より購入),
IL-15 中和実験 : LEAFTM purified Rat IgG1κ isotype antibody (Biolegend より購入),
Functional GradeTM purified mouse IL-15/IL-15Rα complex antibody (eBioscience より購入),
NK1.1 抗体刺激実験 : purified anti-Rat IgG2a isotype, NK1.1 (BD Pharmingen より購入)

サイトカイン

Recombinant murine IL-2 (PROSPEC より購入), IL-4 (Recentec より購入), IL-12
(PeproTech より購入), IL-13 (BioLegend より購入), IL-15 (eBioscience より購入),
IL-21 (BioLegend より購入)

Hydrodynamic tail vein injection method (HTVi 法) による過剰発現

IL-4 過剰発現に用いた pLIVE-IL-4 ベクターおよび IL-13 過剰発現に用いた pLIVE-IL-13 ベクターは, Mirus Bio Corporationより購入したpLIVE ベクターの BamH1-Xho1 サイトに, PCR 法によりクローニングした IL-4, IL-13 フラグメントをそれぞれ挿入し, 作成した. IL-4, IL-13 フラグメントは, LPS で刺激したマウス骨髓細胞と PMA で刺激したマウス胸腺細胞から抽出した cDNA をもとに, 以下のプライマーを用いてクローニングした (IL-4; 5'-cacagagctattgatgggtc-3', 5'-ctacgagtaatccattgcatg-3: IL-13; 5'-ctctgggcttcatggcgctc-3', 5'-ctcattagaaggggccgtg-3'). コントロールには, 当研究室の伊藤 暢准教授よりご供与頂いた, 分泌型アルカリフォスファターゼを発現させる pLIVE-SEAP ベクターを用いた. 各発現ベクターは TransIT-EE Hydrodynamic Delivery Solution (Mirus, Madison, WI) を用いて希釈し, 既報のプロトコルに従って尾静脈より注入した (Liu et al., 1999). 本研究では, マクロファージ除去実験では各 1 μg, それ以外の実験では各 5 μg の pLIVE-SEAP ベクターおよび pLIVE-IL-4 ベクターを野生型

C57BL/6J 系統マウスまたは野生型 Balb/c 系統マウスに注入し、それぞれコントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスとして解析した。IL-13 の過剰発現には、各 20 μ g の pLIVE-SEAP ベクターおよび pLIVE-IL-13 ベクターを野生型 C57BL/6J 系統マウスに注入し、解析した。また、特に断りのない場合、HTVi 法実施 5 日目に解析を行った。

各組織からの細胞分取

肝臓からの細胞分離

LPM (gibco) 20 ml, その後 collagenase type IV (0.5 g/l, Sigma-Aldrich) と DNase I (50 mg/l, Sigma-Aldrich) を含む灌流液 20 ml を、門脈より灌流させた。その後、摘出した肝臓を細分化し、2% FBS /PBS で懸濁したものを 70 μ m² のセルストレイナーに通した。得られた細胞懸濁液を 500 rpm, 1 分間の条件で 2 度遠心し、得られた細胞上清を粗精製肝非実質細胞、沈殿を粗精製肝実質細胞としてそれぞれ更に精製した。

肝細胞の精製

粗精製肝実質細胞を 50 % percoll (GEヘルスケア) /PBS に懸濁し、600 rpm で 10 分間遠心した。得られた沈殿を数回洗浄し、肝細胞として RNA 抽出に供した。

肝臓血液細胞の精製

粗精製肝非実質細胞を 500 rpm で 2 分間遠心し、回収した上清を 1800 rpm で 5 分間遠心した。得られた沈殿を 33% percoll/ PBS で懸濁し、1900 rpm で 15 分間遠心した。上清中に浮遊した死細胞や非血液細胞を除去した後、溶血処理を行ったものを肝臓血液細胞としてフローサイトメトリー解析に用いた。なお、この様に精製した肝臓血液細胞の 95% 以上が CD45 陽性を示す血液細胞であることを確認している。

脾臓、腸管膜リンパ節からの細胞分離

マウスから摘出した脾臓、腸管膜リンパ節をすり潰し、2% FBS/ PBSで懸濁しながら 70 μm^2 のセルストレイナーを通した、得られた細胞懸濁液を洗浄した後溶血処理を行い、フローサイトメトリー解析に用いた。

骨髄細胞の採取

マウスの後肢から大腿骨と脛骨を摘出し、骨の両端をハサミで切り落とし骨髄を露出させた。切り口から 2% FBS/ PBSを注入し押し出すことで骨髄細胞を回収し、70 μm^2 のセルストレイナーに通した。得られた細胞懸濁液を洗浄し溶血処理を行ったものを、骨髄細胞としてフローサイトメトリー解析に用いた。

末梢血液細胞の採取

ヘパリンを入れた容器で回収したマウスの末梢血に対して 2 度溶血処理を行い、得られた細胞を末梢血液細胞としてフローサイトメトリー解析に用いた。

肺血液細胞の採取

マウスから摘出した肺をハサミで細断し、collagenase type IV (0.5 g/l, Sigma-Aldrich) と DNase I (50 mg/l, Sigma-Aldrich) を含む灌流液 15 ml に入れ、20 分間攪拌した。その後、70 μm^2 のセルストレイナーに通した細胞懸濁液を 1800 rpmで 5 分間遠心し、得られた沈殿を溶血処理したものを肺血液細胞としてフローサイトメトリー解析に用いた。

フローサイトメトリー解析およびセルソーティング

まず、各組織から回収した細胞を Fc γ R 抗体（当研究室で作成）に供し、Fc レセプターを介した非特異的な結合を抑えるためのブロッキングを行った。続いて、各表面抗原に対して、FITC-conjugated 抗体、PE-conjugated 抗体、Alexa647-conjugated 抗体、

PE/Cy7-conjugated 抗体, brilliant violet-conjugated 抗体, 又は biotin-conjugated 抗体と APC-streptavidin (Biolegend) による染色を行った。また, 測定に際して Propidium iodide (PI) を懸濁液中に混合することで死細胞を染色した。染色した細胞は FACS Canto II (BD Biosciences) を用いて測定し, 得られたデータは FlowJo 8.8.7 software (TreeStar, Ashland, OR) を用いて解析した。セルソーティングは, MoFlo XDP (BECKMAN COULTER) を用いて行った。本実験では, cNK 細胞として定常状態の野生型 C57BL/6J 系統マウスの脾臓から $CD49b^{+}/CD11b^{+}/CD3e^{-}/CD19^{-}/Fc\epsilon R1\alpha^{-}$, $CD11b^{-}$ NK 細胞として $D49b^{+}/CD11b^{-}/CD3e^{-}/CD19^{-}/Fc\epsilon R1\alpha^{-}$ 分画を単離し, IL4-NK 細胞として IL-4 過剰発現マウスの肝臓から $CD49b^{+}/B220^{+}/CD3e^{-}/CD19^{-}/Fc\epsilon R1\alpha^{-}$ の分画を単離し, 各実験に用いた。

Intracellular Staining

コントロールベクターまたは pLIVE-IL-4 ベクターを HTVi 法により注入した 5 日目のマウスから肝臓血液細胞を採集し, IL-2 (100 ng/ml), Brefeldin A (5 μ g/ml) (Biolegend) 存在下で 5 時間 37 °C で培養した。培養した細胞を回収し, 上述した方法で表面抗原を染色した後, Cytofix/Cytoperm Fixtation/Permeabilization Solution Kit (BD) を用いて細胞内染色を行った。染色細胞の測定および解析は通常のプロセスと同等に行った。

ELISA

コントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスの血清を採取し, IL-4 の濃度を ELISA kit for IL-4 (BD Biosciences) を用いて測定した。また, コントロールマウスおよび IL-13 過剰発現マウスの血清を採取し, IL-13 の濃度を ELISA kit for IL-13 (BD Biosciences) を用いて測定した。単離した cNK 細胞および IL4-NK 細胞を, IL-2 (100 ng/ml) また

は IL-15 (100 ng/ml) 存在下で 24 時間培養し, その培養上清中の GM-CSF, Granzyme B の濃度をそれぞれ ELISA kit for GM-CSF (BD Biosciences) および ELISA kit for granzyme B (R&D) を用いて測定した. また, 単離した cNK 細胞および IL4-NK 細胞を, IL-2 (100 ng/ml) とともに IL-12 (100 ng/ml), IL-18 (100 ng/ml), IL-21 (100 ng/ml) または anti-NK1.1 抗体 (20 µg/ml, 培養プレートに 4 °Cで一晩コーティング) を加えた条件で 24 時間刺激し, 培養上清中の IFN-γ および IL-10 の濃度をそれぞれ ELISA kit for IFN-γ (BD Biosciences) および IL-10 (BD Biosciences) を用いて測定した.

qPCR

コントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスの肝臓から肝細胞を精製し, その total RNA を TRIZOL reagents (Invitrogen) を用いて抽出した. 抽出した RNA は DNase I (Invitrogen) で処理した. その後, PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio Ink) によって cDNA を合成し, SYBR premix Ex TaqII reagent (Takara Bio Ink) および LightCycler 96 (Roche Applied Science) を用いて qPCR に供した. インターナルコントロールとして HPRT を同時に測定し, IL-4 の発現量の正規化を行った. Nb を感染させたコントロールおよび NK 細胞除去マウス (後述), 定常状態のコントロールおよび NK 細胞除去マウスから肺を摘出し, その断片から total RNA を TRIZOL reagents (Invitrogen) を用いて抽出した. 上述の方法で DNase I 処理, cDNA 合成, qPCR を行い, HPRT をインターナルコントロールとして Eotaxin/ CCL11, KC/ CXCL1 の発現量の正規化を行った. HPRT, IL-4, Eotaxin/ CCL11, KC/ CXCL1 の qPCR には以下のプライマーを用いた.

HPRT (5'-agtgtcatcctgctcttcttctc-3' and 5'-atggcgctcccttctcctgt-3')

IL-4 (5'-tgacactggtaaaacaatgc-3' and 5'-tatccaacacttcgagaggt-3')

Eotaxin/ CCL11 (5'-agagctccacagcgttct-3' and 5'-gcaggaagttgggatgga-3')

KC/ CXCL1 (5'-gactccagccacactccaac-3' and 5'-tgacagcgcagctcattg-3')

May-Grünwald-Giemsa 染色

単離した cNK 細胞, CD11b⁻ NK 細胞, B220^{high}/ IL-18R α ^{low} NK 細胞および IL4-NK 細胞をサイトスピンによりスライドガラスに貼り付けた。風乾後, May-Grünwald 液で 4 分間, 5% Giemsa 染色液 / リン酸バッファー (pH 6.4) で 20 分間染色した。

EdU 取り込み実験

HTVi 法実施後 4 日目のコントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスに, 1 匹当たり 1 mg の EdU を腹腔投与した。2 時間後, 肝臓および脾臓から血液細胞を分取し, フローサイトメトリー解析に供した。コントロールマウスの肝臓, 脾臓中の cNK 細胞 (CD45⁺ NK1.1⁺ CD11b⁺ CD3e⁻ CD19⁻), CD11b⁻ NK 細胞 (CD45⁺ NK1.1⁺ CD11b⁻ CD3e⁻ CD19⁻) および IL-4 過剰発現マウスの肝臓, 脾臓中の IL4-NK 細胞 (CD45⁺ NK1.1⁺ B220⁺ CD3e⁻ CD19⁻) について, EdU を取り込んだ細胞の割合を比較した。細胞が取り込んだ EdU は, Click-iT® Plus EdU Alexa Fluor® 647 Flow Cytometry Assay Kit (Molecular Probes™) によって検出した。ネガティブコントロールとして EdU 非投与のコントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスを用意し, EdU 投与群と同様に処置した。

NK 細胞移植実験

C57BL/6J 系統 CD45.1 コンジェニックマウスに HTVi 法を実施し, コントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスを作成した。プラスミドの注入から 24 時間後, 定常状態の野生型 C57BL/6J 系統マウスから単離した cNK 細胞 または CD11b⁻ NK 細胞を

尾静脈より移植した。3 日後、それぞれのマウスの肝臓と脾臓中のドナー由来の NK 細胞 (CD45.2⁺/CD49b⁺) の表面マーカー発現をフローサイトメトリー解析により比較した。

脾臓血液細胞の移植実験

野生型 Balb/c 系統マウスに HTVi 法を実施し、IL-4 過剰発現マウスを作成した。24 時間後、野生型または IL-4R α 欠損マウスから採集した脾臓血液細胞を CFSE で標識し、尾静脈より移入した。3 日後、それぞれのマウスの肝臓と脾臓に存在するドナー由来の NK 細胞 (CFSE⁺) の表面マーカーの発現、および CFSE の蛍光強度をフローサイトメトリー解析により比較した。

CFSE 標識

単離した各種 NK 細胞、または脾臓血液細胞を 1 % BSA/ PBS 溶液に懸濁し、CFSE (eBioscience) を終濃度 5 μ M で添加した後、10 分間 37°C で培養した。培養後 1% BSA/ PBS 溶液を 5 ml 添加し、5 分間氷上で静置した。静置後、3 回多量の 1% BSA/ PBS 溶液で洗浄し、細胞数を計数して移植に用いた。細胞傷害活性の評価 (後述) に用いた YAC-1 細胞の標識では、CFSE を終濃度 5 μ M で添加し、同様に処置した。

免疫組織化学染色 (IHC)

コントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスの肝臓を O.C.T. Compound (Tissue Tek) に包埋し、液体窒素で急速凍結させた。試料を -20°C に緩めた後、クライオスタット (Thermo) を用いて 8 μ m 厚の切片を切り出し、PS-coated glass slides (Matsunami Glass) に張り付けた。続いて、アセトン (WAKO) 固定を 4 °C で一晩行なった後、5% skim milk/ PBS を用いてブロッキングを行なった。その後、一次抗体として purified-anti-CD68 抗体

および purified-Granzyme B 抗体を一晩，二次抗体として Alexa 488-conjugated anti-Rat 抗体および Alexa 555-conjugated anti-Goat 抗体を一晩 4°Cで作用させた．最後に，Hoechst 33342 (Sigma) を 5 分間，常温で作用させることで核染色を行い，蛍光顕微鏡で観察した (Axio Observer.Z1, Zeiss) ．

マクロファージ除去実験

30 μ l のコントロールリポソームまたはクロドロン酸リポソーム (片山化学工業) を PBS で 200 μ l にメスアップし，野生型の C57BL/6 系統マウスに腹腔投与することでマクロファージを除去した．24 時間後，コントロールマウスおよびマクロファージ除去マウスに対して pLIVE-IL-4 ベクター (1 μ g) を HTVi 法によって尾静脈から注入し，IL-4 の過剰発現を誘導した．3 日後，両マウスから肝臓と脾臓の血液細胞を採取し，フローサイトメトリー解析によって NK 細胞の増加の程度を比較した．定常状態のマウスへの投与実験では，同様にリポソームを投与した 4 日後，サンプリングを行った．

ALT 測定

定常状態のマウスにコントロールまたはクロドロン酸リポソームを投与した 4 日後，血清を採取し，ALT 濃度をオリエンタル酵母 (Tokyo, JAPAN) に委託し測定した．

細胞培養

NK 細胞の培養には，10% FBS, 2-ME (50 μ M), HEPES (20 mM), nonessential amino acid, sodium pyruvate, L-Gln および gentamycin を含む RPMI-1640 培地を用いた．単離した cNK 細胞を IL-15 (100 ng/ml) 単独存在下，IL-15 に IL-4 (200 ng/ml) または IL-15 に

IL-13 (200 ng/ml) を加えた条件下で 4 日間培養し、フローサイトメトリーによって表面マーカー発現を解析した。また、回収した NK 細胞を再度播種し、さらに 24 時間培養した上清中のサイトカイン濃度を ELISA により測定した。初めの 4 日間と同様の条件下で培養した上清中の GM-CSF, Granzyme B の濃度を測定した。播種し直す際 IL-15 や IL-4, IL-13 の代わりに IL-2 (100 ng/ml) を加え、さらに刺激として IL-12 (100 ng/ml) や IL-21 (100 ng/ml) を添加し培養した上清中の IFN- γ および IL-10 の濃度を測定した。経時的な生存率の変化を測定した実験では、単離した cNK 細胞を IL-4 (50 ng/ml) 単独存在下で培養し、CellTiter-Glo kit (Promega) を用いて生存率を測定した。

IL-4 応答性肝臓内マクロファージの単離

HTVi 法実施後 4 日目の IL-4 過剰発現マウスの肝臓から、collagenase type IV の代わりに collagenase-Yakult (0.25 g/l, Yakult Pharmaceutical Industry Co. Ltd.) を含む灌流液を用いて、上述の方法で粗精製肝非実質細胞を分取した。得られた細胞懸濁液を 700 rpm, 2 分間の条件で 3 回遠心し、回収した上清をさらに 1800 rpm で 5 分間遠心した。続いて、回収した沈殿を biotin-conjugated anti-F4/80 および APC-conjugated streptavidin によって染色した。その後、anti-APC micro beads (Miltenyi Biotec) を反応させ、autoMACS pro (Miltenyi Biotec) を用いて F4/80 陽性細胞を単離した。得られた細胞のおよそ 90% が F4/80 陽性であったことから、これを IL-4 応答性肝臓内マクロファージとし、NK 細胞との共培養実験に用いた。

cNK 細胞と IL-4 応答性肝臓内マクロファージの共培養実験

単離した IL-4 応答性肝臓内マクロファージを BioCoat™ Collagen I plate (Corning) に播種し、1800 rpm で 5 分間遠心した後、37 °C で培養した。4 時間後、培養上清を穏や

かに除き、非接着細胞を除去した。続いて、単離した cNK 細胞を接着した IL-4 応答性肝臓内マクロファージ上に播種し、1800 rpmで 5 分間遠心した後、37 °Cで培養した。この際、isotype control 抗体 (最終濃度 1 µg/µl) または anti-IL-15/IL-15Rα complex 抗体 (最終濃度 1 µg/µl) を添加した。48 時間後、Cell Dissociation Buffer (gibco) を用いて全ての細胞を回収し、生存している NK 細胞をフローサイトメトリー解析により定量した。

細胞傷害活性の評価

リンパ腫細胞株 YAC-1 細胞 (1×10^4 cells/well) (RCB1165 provided by RIKEN BRC through the National Bio-Resource Project of the MEXT, Japan.) を CFSE (eBioscience) で標識し、単離した cNK 細胞または IL4-NK 細胞と様々な比率で混合し、共培養を行った。4 時間後に細胞を回収し、フローサイトメトリー解析によって傷害された YAC-1 細胞 (CFSE⁺/PI⁺) を定量した。

寄生虫感染

Nippostrongylus brasiliensis (Nb) の第 3 期感染幼虫を、マウス 1 匹あたり 750 匹 PBS に懸濁し、皮下注射により Balb/c 系統の野生型または IL-4Rα 欠損マウスへと移入した。感染 9 日目の肺および感染 10 日目の腸間膜リンパ節から血液細胞を採取し、フローサイトメトリー解析に用いた。

NK 細胞除去実験

一回の投与につき、50 µl の抗アジアロ GM1 抗体 (WAKO) を PBS で 200 µl にメスアップし、野生型の Balb/c 系統マウスに腹腔投与することで NK 細胞を除去した。コ

ントロールには PBS 200 μ l を投与した。Nb 感染マウスへの投与の場合は、感染日を Day 0 として Day -1, 0, 5 に抗体または PBS を投与し、Day 9 にサンプリングした。定常状態のマウスへの投与の場合は、投与後 48 時間後にサンプリングした。

統計処理

データは、平均 \pm 標準誤差 (standard error of the mean; SEM) で示した。特に断りのない部分では Welch's t-test を行い、その他の部分では Student's t-test を行った。P値が 0.05 より小さい場合に、有意な差があるとした。統計解析には、GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いた。

第 3 章 結果

IL-4 の過剰発現は、B220⁺ を示す特徴的な NK 細胞を劇的に増加させる

IL-4 の NK 細胞に対する *in vivo* での作用を明らかにするため、HTVi 法による IL-4 の一過性過剰発現を行った。野生型 C57BL/6J 系統マウスに対して、コントロールベクターまたは pLIVE-IL-4 ベクターを 5 μ g ずつ尾静脈より注入した。5 日後、pLIVE-IL-4 ベクターを注入したマウスの肝細胞では IL-4 の発現が非常に強く誘導された (Fig 4)。また、血清中の IL-4 濃度を ELISA により測定したところ、コントロールベクターを注入したマウスでは全く検出されなかったのに対し、pLIVE-IL-4 ベクターを注入したマウスでは 100 ng/ml もの高濃度で検出された (Fig 4)。続いて、コントロールおよび IL-4 過剰発現マウスから肝臓血液細胞を分取し、フローサイトメトリー解析を行ったところ、IL-4 過剰発現マウスにおいてコントロールマウスにはほぼ存在しない CD45⁺NK1.1⁺B220⁺CD3e⁻CD19⁻ を示す特徴的な細胞が劇的に増加していた (Fig 5)。この IL-4 応答性の細胞は、NK1.1, CD49b, NKp46, NKG2D などの NK 細胞マーカーを高発現する一方で、CD3e (T 細胞および NKT 細胞マーカー), CD19 (B 細胞マーカー), TRAIL, IL-7R α (ILC1 マーカー) などは発現しておらず、NK 細胞の一種と考えられた (Fig 5, 6, 7)。本研究では、この細胞を IL4-NK 細胞と命名し、詳細な解析を行った。

IL-4 NK 細胞は活性化した NK 細胞の一種である

コントロールマウスに存在し CD45⁺NK1.1⁺CD11b⁺CD3e⁻CD19⁻ を示す、定常状態の成熟した NK 細胞 (conventional NK 細胞, 以下 cNK 細胞) と IL4-NK 細胞における様々な表面マーカーの発現を比較した。その結果、IL4-NK 細胞は B220, IL-4R α ,

IL-21R α の発現が高い一方で、CD11b, IL-18R α の発現は低いなど、cNK 細胞と多くの表面マーカーの発現パターンが異なっていた (Fig 6, Table 1). 続いて、NK 細胞の活性化に関わるマーカー群の発現を詳細に比較した. IL4-NK 細胞は NK1.1, 2B4, Ly108 などの活性化レセプターや活性化マーカーとして知られる Thy1.1 の発現が cNK 細胞に比べて高く、逆に抑制性レセプターである KLRG1 や NKG2A, 休止期のマーカーである Ly6C の発現は低かった (Fig 7, Table 1). さらに、単離した cNK 細胞と IL4-NK 細胞を May-Grünwald-Giemsa 染色 に供して形態を観察したところ、IL4-NK 細胞は cNK 細胞と比べて顕著に大きく、特に細胞質が肥大し顆粒を溜めている様子が観察された (Fig 8). 以上の表面マーカー発現、形態観察の結果から考えて、IL4-NK 細胞は特徴的な表面マーカー発現を示す、活性化した NK 細胞であると考えられた.

定常状態には、IL4-NK 細胞同様の活性化状態にある NK 細胞は存在しない

定常状態のマウスには、cNK 細胞の他に CD45⁺NK1.1⁺CD11b⁻CD3e⁻CD19⁻ を示す、未成熟な NK 細胞を含む 細胞分画 (以下 CD11b⁻ NK 細胞) が cNK 細胞のおよそ半数程度存在する (Fig.9). この分画に IL4-NK 細胞が存在するか確かめるため、CD11b⁻ NK 細胞と IL4-NK 細胞の表面マーカーの発現を比較した. その結果、CD11b⁻ NK 細胞の一部は、IL4-NK 細胞同様、IL-18R α の発現が低いことが明らかになった (Fig.10). しかし、IL4-NK 細胞に見られたその他の特徴的なマーカー発現パターンである B220, 2B4, IL-21R α の高発現や NKG2A の発現低下は確認できず、NK 細胞の未成熟マーカーとして知られる TRAIL や IL-7R α の発現が CD11b⁻ NK 細胞で高いことが明らかになった (Fig.10). さらに、定常状態のマウスから CD11b⁻ NK 細胞と ごく少数存在する B220⁺ IL-18R α ⁻ を示す NK 細胞とをそれぞれ単離し、May-Grünwald-Giemsa 染色 に供して形

態を観察したところ、IL4-NK 細胞のように肥大し活性化した NK 細胞は全く観察されなかった (Fig.11)。以上の結果から、定常状態のマウスに IL4-NK 細胞と同様のマーカー発現、活性化状態を示す NK 細胞は存在しないことが明らかになった。

IL-4 NK 細胞は肝臓以外の組織でも誘導され、盛んに増殖している

コントロールおよび IL-4 過剰発現マウスにおける、cNK 細胞と IL4-NK 細胞の分布を解析した。肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節、骨髄、末梢血の血液細胞中に含まれる cNK 細胞、IL4-NK 細胞の割合をフローサイトメトリー解析により定量したところ、全ての組織で IL4-NK 細胞の増加が認められた (Fig 12)。一方、cNK 細胞は IL-4 の過剰発現に伴い顕著に減少していた (Fig 12)。また、肝臓および脾臓に存在する cNK 細胞、IL4-NK 細胞の増殖活性を EdU 取り込み実験により比較したところ、肝臓、脾臓いずれにおいても cNK 細胞に比べ IL4-NK 細胞で顕著に高い活性が認められた (Fig 13)。なお、定常状態のマウス中の CD11b⁻ NK 細胞についても同様の方法で増殖活性を定量し、cNK 細胞同様 IL4-NK 細胞に比べ増殖活性が非常に低いことを確認した (Fig14)。

cNK 細胞および CD11b⁻ NK 細胞は、IL-4 過剰発現により IL4-NK 細胞へと分化する

IL-4 過剰発現マウスでは cNK 細胞が減少し、IL4-NK 細胞が増加していたことから、IL-4 過剰発現に伴ない cNK 細胞が IL4-NK 細胞へと変化する可能性が考えられた (Fig 12)。これを確かめるため、単離した cNK 細胞をコントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスに移植し、移植後の表面マーカー発現の変化を解析した。移植細胞を識別するため、レシピエントマウスには CD45.1 コンジェニックマウスを用いた。HTVi 法によって過剰発現を誘導した 24 時間後に、野生型マウスから単離した cNK 細胞を移植し、その 3 日後レシピエントマウスの肝臓と脾臓の血液細胞中の CD45.2 陽性を示す

ドナー由来 NK 細胞について、表面マーカー発現を解析した (Fig 15). その結果、肝臓、脾臓いずれにおいても、IL-4 過剰発現マウスに移植した NK 細胞は、コントロールマウスに移植した場合に比べて B220, IL-4R α , IL-21R α の発現が上昇し、CD11b, IL-18R α の発現が低下していた (Fig 16). こうした発現パターンは IL4-NK 細胞に見られる特徴であり、cNK 細胞が IL4-NK 細胞になるポテンシャルを有することが明らかになった.

続いて、CD11b⁻ NK 細胞も IL4-NK 細胞に成り得るのか、さらに cNK 細胞と比して IL4-NK 細胞の供給源としての寄与率に違いがあるか、解析を行った. IL-4 を過剰発現させた CD45.1 コンジェニックマウスへの移植実験に際し、野生型マウスから単離した CD11b⁻ NK 細胞を cNK 細胞と同時に同数移植し、1 日後および 3 日後の存在比率および表面マーカーの変化に違いが生じるか比較した (Fig.17). なお、予め cNK 細胞を CFSE で標識し、CD45.2⁺ 細胞中の CFSE 陽性/陰性の割合を解析することで 2 種類のドナー細胞由来の NK 細胞の存在比率を比較した (Fig.17). 解析の結果、移植後 1 日目にはわずかに CFSE 陽性 (cNK 細胞由来) の比率が高いものの、3 日目には逆転し、CFSE 陰性 (CD11b⁻ NK 細胞由来) の存在比率が CFSE 陽性のおよそ 4 倍程度まで高くなることが明らかになった (Fig.18). 続いて表面マーカー発現を比較したところ、cNK 細胞由来、CD11b⁻ NK 細胞由来のどちらの NK 細胞も B220, IL-18R α , IL-21R α の発現が時間を追うごとに IL4-NK 細胞に類似したパターンへと変化した (Fig.19).

IL4-NK 細胞の誘導および増殖には、NK 細胞自身の発現する IL-4R α が必須である

IL4-NK 細胞の活性化、増殖に、IL-4 の NK 細胞への直接的な刺激がどのように寄与しているか明らかにするため、IL-4 を過剰発現させた野生型マウスに定常状態の野生型および IL-4R α 欠損マウスから採取した脾臓血液細胞を移植し、ドナー細胞中の NK

細胞についてその後の変化を比較した (Fig.20). ドナー細胞を区別し, またドナー細胞同士の増殖活性を比較する目的で, 予め脾臓血液細胞を CFSE で標識し, 移植に用いた (Fig.20). HTVi 法により IL-4 過剰発現を誘導した 24 時間後にドナー細胞を移植し, その 3 日後にレシピエントマウスの肝臓に存在する CFSE 陽性の NK 細胞について解析を行った. その結果, 野生型マウスのドナー細胞由来の NK 細胞が B220, IL-21R α の発現上昇, CD11b, IL-18R α の発現低下といった IL4-NK 細胞同様の表面マーカーの発現を示したのに対し, IL-4R α 欠損マウスのドナー細胞由来の NK細胞ではそうした変化が全く生じなかった (Fig21). さらに, IL-4R α 欠損マウス由来の NK 細胞では CFSE の発現強度が有意に高いまま維持されていることが明らかになり, IL-4 の過剰発現に応じた NK 細胞の増殖が IL-4R α の欠損によって抑制されることが示唆された (Fig.21).

IL-13 の過剰発現では, IL4-NK 細胞は誘導されない

IL-4 は IL-13 と一部のレセプターを共有しており, IL-4R α 欠損マウスは IL-4 だけではなく IL-13 の刺激も受容できない (Fig 22). IL4-NK 細胞の誘導に IL-4 , IL-13 の作用がどのように寄与しているか解明するため, HTVi 法によって IL-13 の一過性過剰発現マウスを作成し, NK 細胞がどのように変化するか解析した. 野生型 C57BL/6J 系統マウスに対して, コントロールベクターまたは pLIVE-IL-13 ベクターを 20 μ g ずつ尾静脈より HTVi 法により注入した. 5 日後に血清中の IL-13 濃度を ELISA により測定したところ, コントロールベクターを注入したマウスではほとんど検出されなかったのに対し, pLIVE-IL-13 ベクターを注入したマウスでは 30 ng/ml の高濃度で検出された (Fig.23). この時の肝臓の血液細胞を解析した結果, NK 細胞の増加は確認されたものの, 増加した NK 細胞において IL4-NK 細胞に見られた表面マーカーの発現パターン変

化は見られなかった (Fig.24). この結果により, IL4-NK 細胞の誘導には, IL-4 固有のシグナルを伝える Type I レセプターを介した作用が重要であることが示唆された.

IL-4 の過剰発現により増加したマクロファージは, IL4-NK 細胞の増殖を促進している

IL-4 過剰発現マウスにおいて, IL4-NK 細胞は盛んに増殖していた (Fig 13). しかし, 単離した cNK 細胞を IL-4 単独存在下で培養したところ, 24 時間程度で死滅し, 増殖は認められなかった (Fig.25). 以上のことから, IL-4 は *in vivo* において, 何らかの間接的な作用によって NK 細胞の増殖を促していると考えられた. そこで間接的な IL-4 の作用として, マクロファージに着目し解析を行った. マクロファージは, NK 細胞の発生, 維持に必須であり成熟した NK 細胞の代表的な増殖因子である IL-15 の主要な産生細胞として知られている (Burkett et al., 2004; Lebrech et al., 2013; Stonier and Schluns, 2010). また近年, 寄生虫感染などの Th2 応答時にマクロファージが IL-4 依存的に増殖することが報告され, その生理的役割が改めて注目されている (Jenkins et al., 2011; Jenkins et al., 2013). まず, IL-4 過剰発現マウスにおける肝臓内マクロファージの動態を免疫組織染色によって解析したところ, IL-4 過剰発現に伴い, CD68 陽性で示されるマクロファージが顕著に増加することが明らかになった (Fig 26). 続いて, NK 細胞の増殖にマクロファージが関与しているかを確かめるため, クロドロン酸リポソームの投与によりマクロファージを除去したマウスに IL-4 の過剰発現を誘導した. コントロールリポソームあるいはクロドロン酸リポソームを腹腔投与した 24 時間後に HTVi 法による IL-4 の過剰発現を実施し, それから 3 日後の肝臓と脾臓の血液細胞をフローサイトメトリーで解析した. その結果, マクロファージを除去したマウスでは, コントロールマウスに比べ, 有意に NK 細胞の存在比率および絶対数が減少しており, IL-4 応

答性のマクロファージが NK 細胞の増殖を正に制御していることが示された (Fig 27).
なお、定常状態のマウスにクロンドロン酸リポソームを投与した場合に肝臓と脾臓のマ
クロファージが著明に減少すること、NK 細胞の絶対数に影響はないこと、肝障害マー
カーである ALT の上昇はわずかで炎症などのサイドエフェクトによる影響は最小
限であることを予備的な実験により確認している (Fig.28, 29).

IL-4 応答性マクロファージは IL-15 を介した NK 細胞支持能を発揮する

マクロファージや樹状細胞は、産生した IL-15 を自身の発現する IL-15R α を介し
て標的細胞に直接提示する *trans*-presentation という方法によって、NK 細胞の増殖を促
すことが知られている (Burkett et al., 2004; Lebec et al., 2013; Stonier and Schluns, 2010).
IL-4 過剰発現マウスの肝臓の免疫組織染色像を拡大し注意深く観察すると、Granzyme B
陽性で示される NK 細胞のほとんど全てがマクロファージと隣接して存在していた
(Fig 26). これは IL-4 応答性マクロファージによって IL-15 の *trans*-presentation が行
われていることを示唆している. なお、Granzyme B を強く産生する細胞の大半が
IL4-NK 細胞であることを Intracellular staining によって確認しており、免疫組織染色で
確認された Granzyme B 陽性細胞は確かに IL4-NK 細胞であると考えられた (Fig.30).
IL-4 応答性マクロファージの有する NK 細胞支持能が IL-15 によるものか確かめるた
め、IL-4 応答性マクロファージと cNK 細胞の共培養を行い、IL-15 を中和した場合の
影響を解析した. IL-4 過剰発現マウスから単離した肝臓内マクロファージを collagen I
coating plate に播種し、マクロファージ上で cNK 細胞を培養した. この時, isotype control
抗体または IL-15 の中和活性を持つ anti-IL-15 /IL-15R α complex 抗体を培地に添加し、
48 時間後に生存している NK 細胞の絶対数を比較した. なお、マクロファージと cNK

細胞の接着を促進する目的で、1800 rpm で 5 分間遠心し、浮遊した cNK 細胞を沈殿させた。フローサイトメトリーによって解析したところ、IL-15 の中和抗体を添加した場合に、生存している NK 細胞が有意に減少していた (Fig 31)。この結果から、IL-4 応答性マクロファージが IL-15 を介して NK 細胞の増殖に寄与することが示唆された。

IL4-NK 細胞は cNK 細胞とは異なる細胞機能を持つ

NK 細胞は、表面マーカーの発現パターンによって異なるサイトカイン産生や細胞傷害活性を示すことが知られている (Huntington et al., 2007; Omi et al., 2014; Sun and Lanier, 2011)。前述したとおり、IL4-NK 細胞は特徴的な表面マーカー発現を示すとともに、活性化状態にある NK 細胞の一種であると考えられたことから、cNK 細胞とは異なる細胞機能を有することが示唆された。そこで、単離した cNK 細胞と IL4-NK 細胞について、サイトカイン産生および細胞傷害活性を比較した。まず、NK 細胞の産生する主要なサイトカインである IFN- γ の産生量を定量したところ、IL-12, IL-21, anti-NK1.1 抗体で刺激をした場合のいずれにおいても、IL4-NK 細胞で非常に高い産生が認められた (Fig 32)。なお、無刺激の条件下では、cNK 細胞、IL4-NK 細胞共にほとんど産生が見られなかった (Fig 32)。次に、IFN- γ 以外に NK 細胞からの産生が報告されているサイトカインとして、IL-10 と GM-CSF の産生量を定量した。IL-10 に関しては、IFN- γ 同様、IL-12 や IL-21で刺激した IL4-NK 細胞において非常に高い産生が認められ、cNK 細胞および無刺激な条件下での IL4-NK 細胞からの産生は全く見られなかった (Fig 32)。興味深いことに GM-CSF に関しては、特別な刺激を与えない条件下においても、IL4-NK 細胞を IL-2, IL-15 という生存に必要なサイトカイン存在下で培養した際に産生が認められた (Fig 32)。続いて、サイトカイン産生と同様に NK 細胞の主要な機能である、細

胞傷害活性について cNK 細胞と IL4-NK 細胞を比較した。まず、細胞傷害性タンパク質である Granzyme B の産生能を定量した結果、特別な刺激を与えない条件下においても IL4-NK 細胞では非常に高い産生が認められた (Fig 33)。次に、T 細胞リンパ腫由来の細胞株である YAC-1 細胞に対する細胞傷害活性を共培養実験によって定量した。様々な混合比率で 4 時間共培養を行い、その間に死滅した YAC-1 細胞の割合を比較したところ、どの混合比率においても、IL4-NK 細胞と共培養した場合に、傷害された YAC-1 細胞の割合が顕著に増加していた (Fig 33)。以上のように、IL4-NK 細胞は高いサイトカイン産生と細胞傷害活性を有しており、cNK 細胞とは異なる機能、生理的役割を持つ NK 細胞であると考えられた。

IL-4 は cNK 細胞へと直接作用し、IL-18R α の発現低下およびサイトカイン、Granzyme B 産生の増強を促す

IL-4 の NK 細胞に対する直接的な作用を明らかにするため、単離した cNK 細胞の培養系に IL-4 を添加しその影響を解析した。ここまでの解析から、*in vivo* で IL-4 を過剰発現させた場合、cNK 細胞は IL-4 と同時に IL-15 のシグナルを受け取ると考えられたことから、IL-15 単独または IL-15 に IL-4 を加えた条件で 4 日間培養し、性状と機能を比較した。まず、表面マーカーの発現パターンを比較したところ、いずれの培養条件においても、単離してすぐの cNK 細胞に比べて IL4-NK の特徴である B220, IL-4R α , IL-21R α の発現上昇、および CD11b の発現低下が認められた (Fig 34)。しかし、同じく IL4-NK 細胞に見られる特徴である IL-18R α の発現低下は、IL-4 を添加した場合においてのみ観察された (Fig 34)。続いて、サイトカインおよび Granzyme B の産生能を ELISA によって定量したところ、IL-4 を添加し培養した NK 細胞では IL-15

単独の場合に比べて、IFN- γ 、IL-10、GM-CSF、Granzyme B 全ての産生能が亢進していた (Fig 35). 以上の結果から、IL-4 は cNK 細胞に直接作用し、IL-18R α の発現低下と細胞機能の亢進を促すことが明らかになったとともに、cNK 細胞を IL-15 と IL-4 を添加し培養することで、IL4-NK 細胞様の細胞を *in vitro* で誘導できることが示された。

また、IL-4 の代わりに IL-13 を添加し、IL-15 単独の場合と比較したところ、IL-18R α の発現低下や各種細胞機能の亢進は誘導されなかった (Fig 36). これは、*in vivo* で IL-13 を過剰発現させても IL4-NK 細胞が誘導されなかったこととよく一致する結果であり、IL-13 には NK 細胞を直接刺激する作用が無いことが明らかになった。

寄生虫感染時の腸間膜リンパ節では、IL4-NK-like 細胞が IL-4 依存的に誘導される

IL4-NK 細胞が生理的な条件下で誘導されるかを確かめるため、強力な Th2 応答が惹起されることで知られる、寄生虫感染モデルを解析した。本研究ではマウスの寄生虫感染モデルとして一般的な *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) 感染モデルを行った。Nb 感染モデルでは、IL-4 をはじめとする種々の Th2 サイトカインが産生されること、IL-4R α を介したシグナルが排虫に必須であることが知られている (Maizels et al., 2009; Urban et al., 1998). 感染 10 日目の腸間膜リンパ節 (MLN) を フローサイトメトリーによって解析したところ、IL4-NK 細胞と同様に B220^{high}/IL-18R α ^{low} を示す NK 細胞が増加していた (Fig 37). この IL4-NK-like 細胞 (CD45⁺ NKp46⁺ B220^{high} IL-18R α ^{low} CD3e⁻ CD19⁻) は非感染の野生型マウスにはほとんど存在せず、IL-4R α 欠損マウスでは感染しても増加が認められなかった (Fig 37). また、IL4-NK-like 細胞は、感染した野生型マウスの腸間膜リンパ節中の cNK-like 細胞 (CD45⁺ NKp46⁺ B220^{low} IL-18R α ^{high} CD3e⁻ CD19⁻) に比べて CD11b の発現が低く、逆に IL-4R α や IL-21R α の発現は高かった (Fig 38). こうし

た表面マーカーの発現パターンもまた、IL4-NK 細胞と一致していた。以上の結果から、生理的な Th2 応答である寄生虫感染においても、IL4-NK 細胞と同様の細胞集団が IL-4 シグナル依存的に誘導されることが明らかになった。

寄生虫感染時に NK 細胞を除去することで、特定のケモカインの発現量が上昇する

IL4-NK 細胞が寄生虫感染に果たす役割を解明するため、NK 細胞を除去した場合に Nb 感染にどういった影響が生じるか検証した。これまでの報告から、Nb は肺を經由して腸管へと移動することが知られている (Maizels et al., 2009; Urban et al., 1998)。マウスの感染モデルでは、Nb が通過する 5 日頃から 肺に IL-4 産生細胞が浸潤してくることが報告されており、後に続く Th2 応答によって Nb 通過に伴う組織損傷を修復していると考えられている (Hoeve et al., 2009)。そこで、肺においても Nb 感染に伴い IL4-NK like 細胞が誘導されるか解析したところ、感染 9 日目には、定常状態に比べて NK 細胞全体の絶対数は変化しないが、IL4-NK like 細胞の絶対数が有意に増加することが明らかになった (Fig 39)。そこで、抗アジアロ GM1 抗体の投与によって NK 細胞を除去したマウスに Nb を感染させた場合に、肺の遺伝子発現にどのような影響が生じるか qPCR によって解析した。その結果、好酸球を誘引する Eotaxin-1/CCL11 と好中球を誘引する KC/CXCL1 の遺伝子発現が、NK 細胞の除去により有意に上昇することが明らかになった (Fig 40)。なお、定常状態のマウスに抗アジアロ GM1 抗体の投与した場合には、Eotaxin-1/CCL11 や KC/CXCL1 の発現は変動しなかった (Fig 41)。以上の結果から、寄生虫感染において NK 細胞は Eotaxin-1/CCL11 や KC/CXCL1 の発現に抑制的に作用することが示唆された。

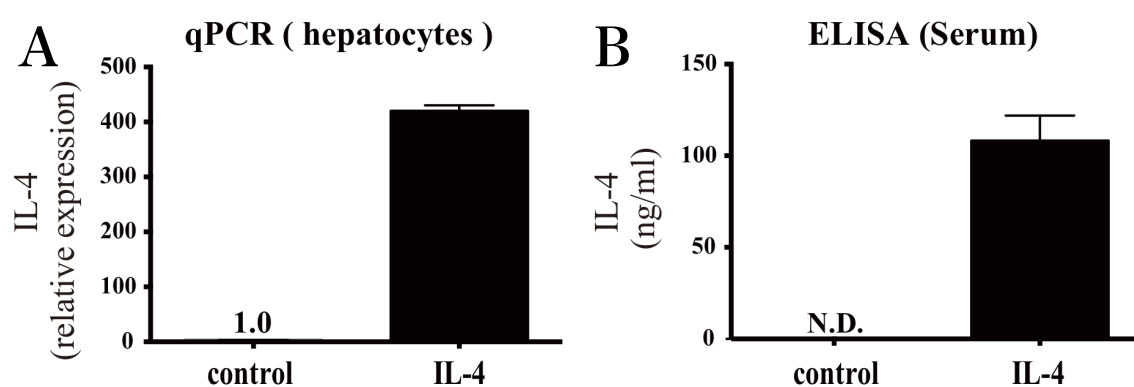


Figure 4. HTVi 法による IL-4 の一過性過剰発現

HTVi 法に従い、コントロールベクター (5 μ g) または pLIVE-IL-4 ベクター (5 μ g) を尾静脈より注入した。A: HTVi 法実施後 5 日目のコントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスから肝細胞を分取し、qPCR によって IL-4 の発現量を比較した。B: 同マウスの血清を採取し、ELISA によって IL-4 の濃度を定量した。

数値は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=3)。

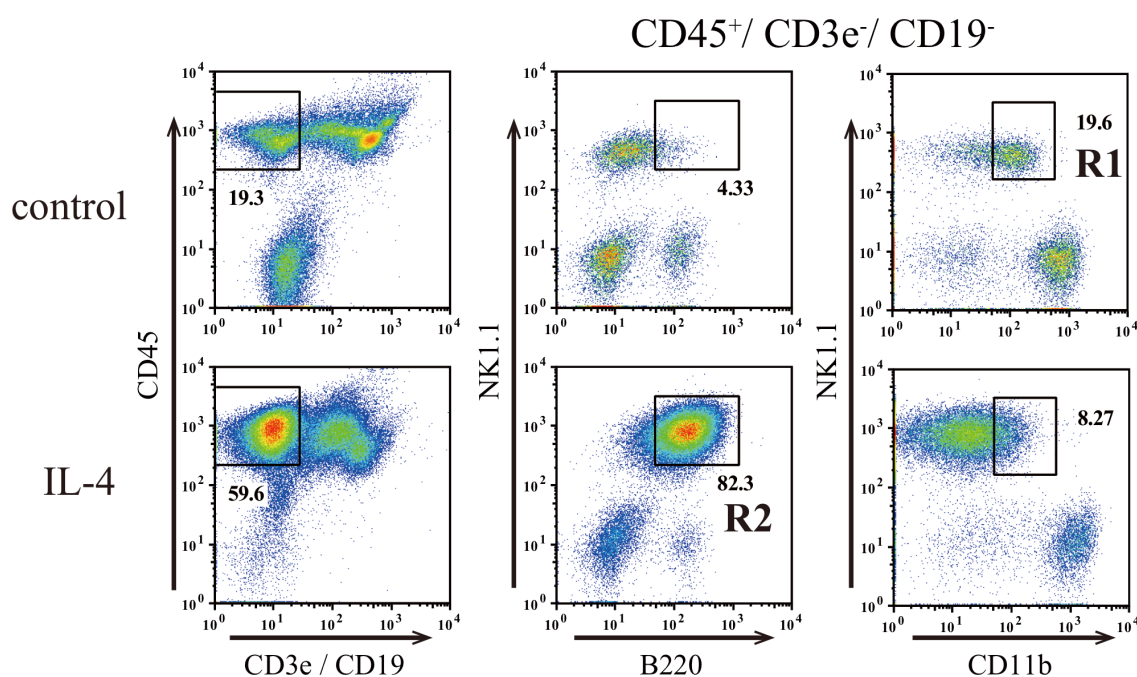


Figure 5. IL-4 過剰発現による肝臓血液細胞の変化

コントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスから肝臓血液細胞を分取し、フローサイトメトリーにより解析した。図中の数字はゲート内の細胞の占める割合を示す。R1 はコントロールマウス中の cNK 細胞 ($CD11b^+ CD49b^+ FceR1\alpha^- CD3e^- CD19^-$)，R2は IL-4 過剰発現マウス中の IL4-NK 細胞 ($B220^+ CD49b^+ FceR1\alpha^- CD3e^- CD19^-$) 細胞をそれぞれ示す。同実験を複数回行ったうち、代表的な結果を示す (n=3)。

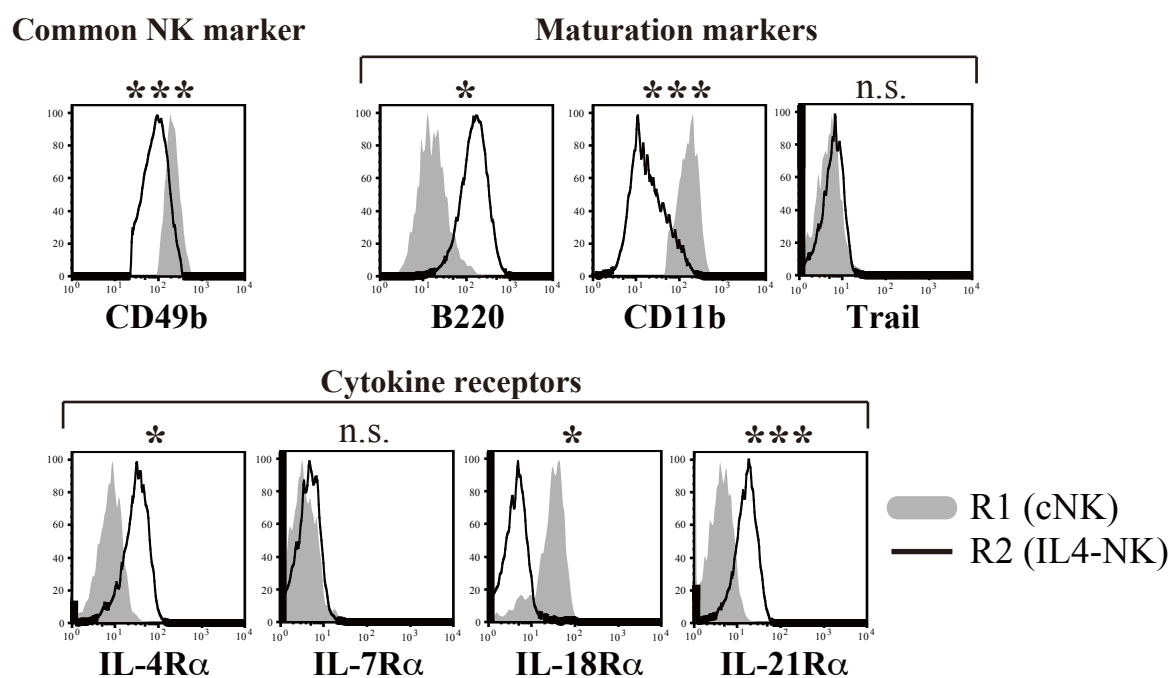


Figure 6. cNK 細胞および IL4-NK 細胞の表面マーカー発現 ①

コントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスから肝臓血液細胞を分取し, NK 細胞における各種表面マーカー発現をフローサイトメトリーにより解析した. R1 (グレー) はコントロールマウス中の $CD11b^{+}CD49b^{+}FceR1\alpha^{-}CD3e^{-}CD19^{-}$ 細胞, R2 (実線) は IL-4 過剰発現マウス中の $B220^{+}CD49b^{+}FceR1\alpha^{-}CD3e^{-}CD19^{-}$ 細胞をそれぞれ示す. 同実験を複数回行ったうち代表的な結果を示す ($n \leq 3$).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, n.s. 有意差なし (not significance).

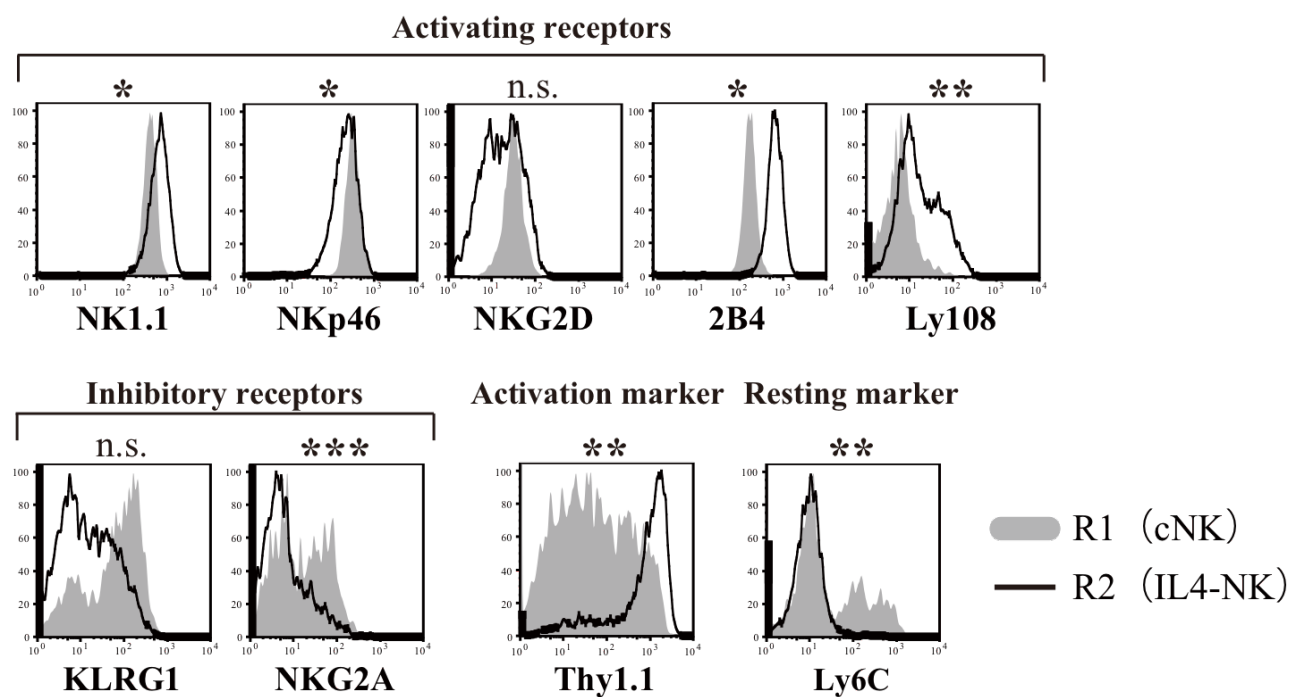


Figure 7. cNK 細胞および IL4-NK 細胞の表面マーカー発現 ②

コントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスから肝臓血液細胞を分取し, NK 細胞における各種表面マーカー発現をフローサイトメトリーにより解析した. R1 (グレー) はコントロールマウス中の $CD11b^{+}CD49b^{+}FceR1\alpha^{-}CD3e^{-}CD19^{-}$ 細胞, R2 (実線) は IL-4 過剰発現マウス中の $B220^{+}CD49b^{+}FceR1\alpha^{-}CD3e^{-}CD19^{-}$ 細胞をそれぞれ示す. 同実験を複数回行ったうち代表的な結果を示す ($n \leq 3$).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, n.s. 有意差なし (not significance).

Markers	cNK cells ^a	IL4-NK cells ^b	Markers	cNK cells ^a	IL4-NK cells ^b
Common NK marker			Inhibitory receptors		
CD49b**	180.0 ± 6.1	86.1 ± 2.5	KLRG1	161.0 ± 33.0	73.2 ± 16.8
Maturation markers			NKG2A***	30.6 ± 0.8	11.1 ± 0.3
B220*	20.2 ± 2.0	145.3 ± 17.4	Activation marker		
CD11b***	189.7 ± 1.9	27.5 ± 2.4	Thy1.1**	294.3 ± 89.1	963.5 ± 133.9
TRAIL	6.0 ± 0.7	5.1 ± 0.6	Resting marker		
Activating receptors			Ly6C**	106.5 ± 11.2	28.6 ± 5.4
NK1.1*	491.2 ± 21.4	720.0 ± 53.1	Cytokine receptors		
NKp46*	325.7 ± 21.5	222.3 ± 26.0	IL-4Rα*	10.1 ± 0.9	31.0 ± 4.9
NKG2D	35.6 ± 0.8	27.2 ± 4.6	IL-7Rα	5.3 ± 1.1	4.6 ± 0.1
2B4*	209.0 ± 16.4	681.3 ± 59.1	IL-18Rα*	26.6 ± 4.0	5.0 ± 0.3
Ly108**	9.3 ± 0.8	24.7 ± 2.4	IL-21Rα**	4.5 ± 0.3	17.4 ± 0.9

Table. 1 cNK 細胞および IL4-NK 細胞の表面マーカー発現

HTVi 法実施から 5 日目の肝臓血液細胞を分取し, NK 細胞における各種表面マーカー発現をフローサイトメトリーにより解析した. ^a cNK cells はコントロールマウス中の CD11b⁺ CD49b⁺ FcεR1α⁻ CD3e⁻ CD19⁻ 細胞, ^b IL4-NK cells は IL-4 過剰発現マウス中の B220⁺ CD49b⁺ FcεR1α⁻ CD3e⁻ CD19⁻ 細胞をそれぞれ示す.

数値は平均値 ± 標準誤差を示す (n=3).

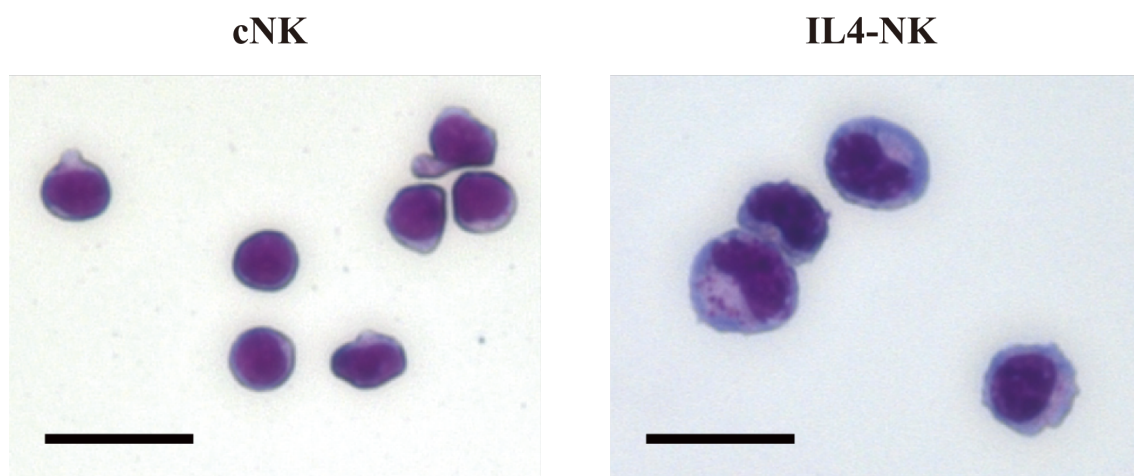


Figure 8. cNK 細胞および IL4-NK 細胞の形態

野生型マウスの脾臓より単離した cNK 細胞 ($CD11b^{+} CD49b^{+} FceR1\alpha^{-} CD3e^{-} CD19^{-}$), および IL-4 過剰発現マウスの肝臓より単離した IL4-NK 細胞 ($B220^{+} CD49b^{+} FceR1\alpha^{-} CD3e^{-} CD19^{-}$) をサイトスピンによりスライドガラスに貼り付け, May-Grünwald-Giemsa 染色により形態を観察した. 図中のスケールバーは 20 μm を表す.

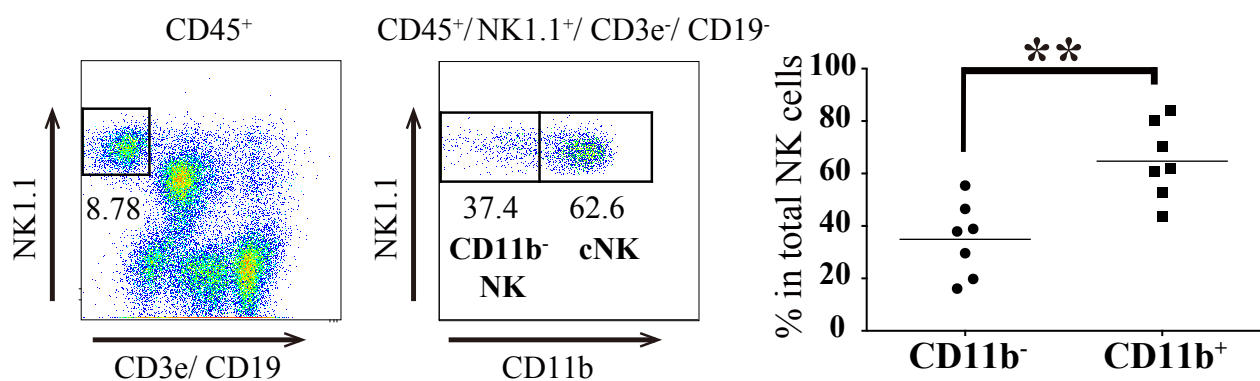


Figure 9. 定常状態に存在する NK 細胞の存在比率

コントロールマウスから肝臓血液細胞を分取し、フローサイトメトリーにより解析した。図中の数字はゲート内の細胞の占める割合を示す。CD11b⁻ NK は (CD11b⁻CD49b⁺FceR1α⁻CD3e⁻CD19⁻) を、cNK は (CD11b⁺CD49b⁺FceR1α⁻CD3e⁻CD19⁻) をそれぞれ示す。右図は定常状態に存在する NK 細胞における CD11b[±] の存在比率を示し、数値は平均値を示す (n=7)。ここでは、Student's t-test を行った。** $P < 0.01$ 。

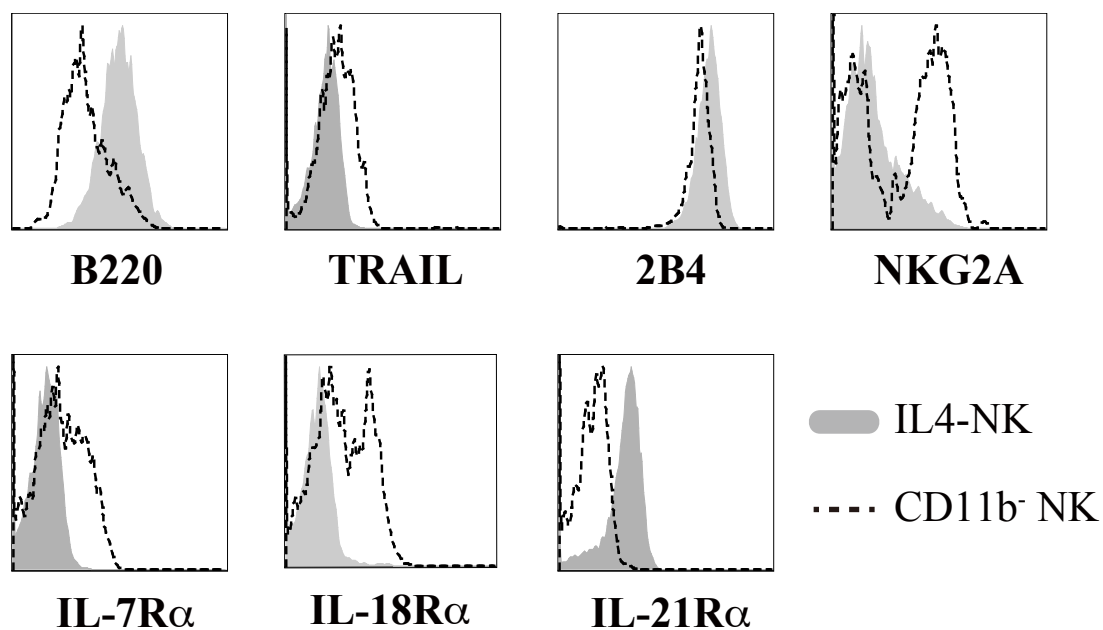


Figure 10. CD11b⁻ NK 細胞および IL4-NK 細胞の表面マーカー発現

コントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスから肝臓血液細胞を分取し, NK 細胞における各種表面マーカー発現をフローサイトメトリーにより解析した. IL4-NK 細胞 (グレー) は IL-4 過剰発現マウス中の B220⁺CD49b⁺FcεR1α⁻CD3ε⁻CD19⁻ 細胞, CD11b⁻ NK 細胞 (破線) はコントロールマウス中の CD11b⁻CD49b⁺FcεR1α⁻CD3ε⁻CD19⁻ 細胞をそれぞれ示す.

CD11b⁻ NK 細胞



B220^{high}/ IL-18R α ^{low} NK 細胞

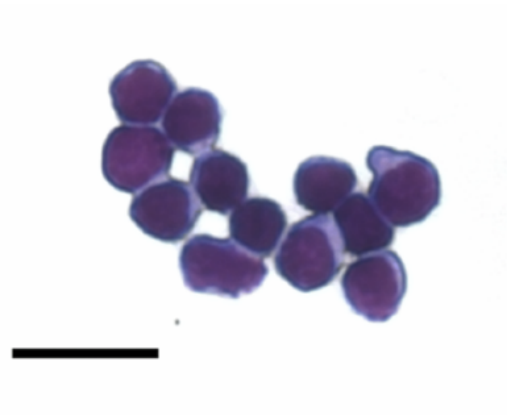


Figure 11. cNK 細胞および IL4-NK 細胞の形態

野生型マウスの脾臓より単離した CD11b⁻ NK 細胞 (CD11b⁻CD49b⁺FceR1 α ⁻CD3e⁻CD19⁻), および B220^{high}/IL-18R α ^{low} NK 細胞 (B220⁺IL-18R α ⁻CD49b⁺FceR1 α ⁻CD3e⁻CD19⁻) をサイトスピンによりスライドガラスに貼り付け, May-Grünwald-Giemsa 染色により形態を観察した. 図中のスケールバーは 20 μ m を表す.

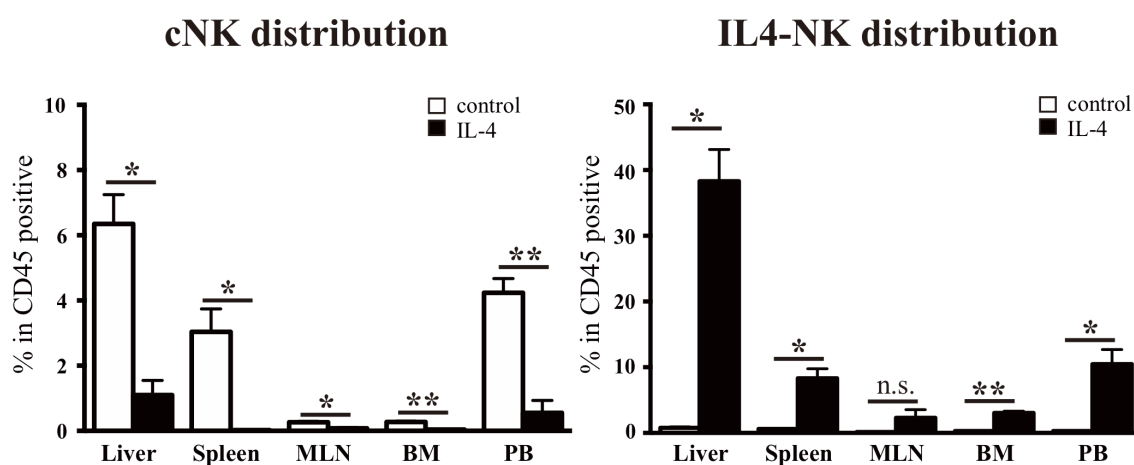


Figure 12. cNK 細胞および IL4-NK 細胞の各組織における分布

コントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスから肝臓，脾臓，腸間膜リンパ節，骨髓，末梢血の血液細胞を採取した．フローサイトメトリー解析により，CD45 陽性細胞中の cNK 細胞 ($CD11b^+CD49b^+FceR1\alpha^-CD3e^-CD19^-$) および IL4-NK 細胞 ($B220^+CD49b^+FceR1\alpha^-CD3e^-CD19^-$) の存在比率を定量した．数値は平均値 \pm 標準誤差を示す ($n=3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, n.s. 有意差なし (not significance).

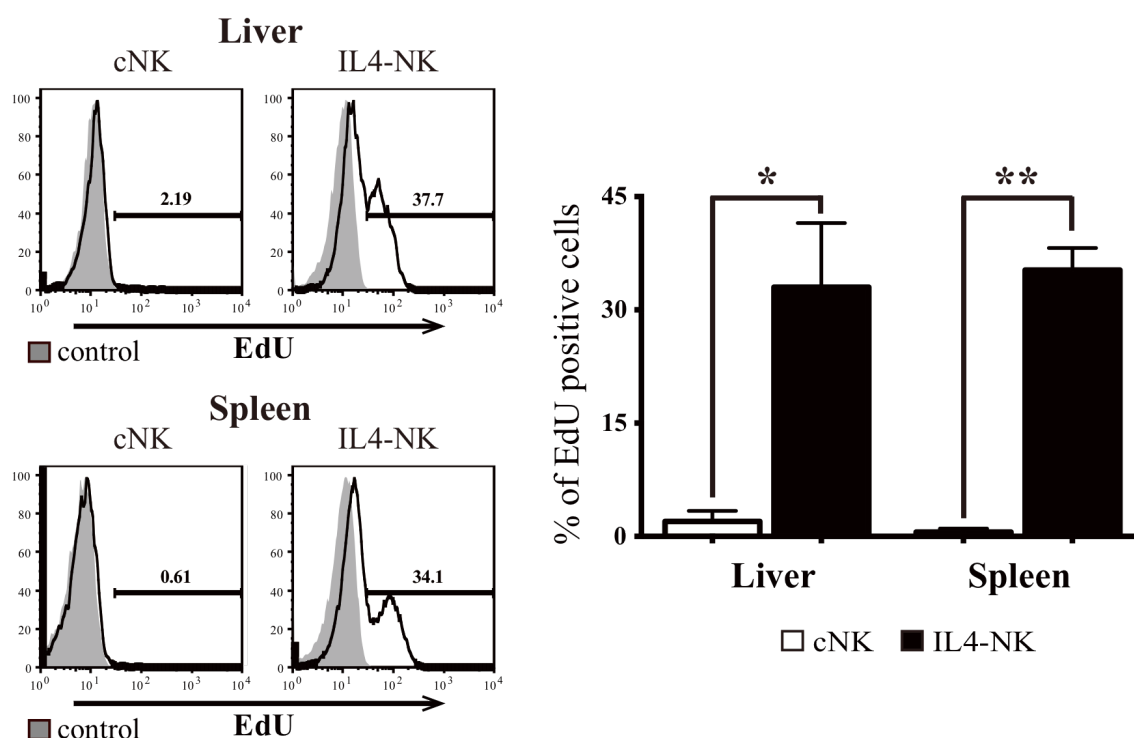


Figure 13. cNK 細胞および IL4-NK 細胞の増殖活性

HTVi 法実施から 4 日目のコントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスに対し, 1 mg の EdU (PBS 400 μ l で懸濁) を腹腔投与した. 2 時間後, 肝臓と脾臓の血液細胞を採取し, コントロールマウス中の cNK 細胞 ($CD11b^+ CD49b^+ Fc\epsilon R1\alpha^- CD3e^- CD19^-$), IL-4 過剰発現マウス中の IL4-NK 細胞 ($B220^+ CD49b^+ Fc\epsilon R1\alpha^- CD3e^- CD19^-$) における EdU 陽性細胞の比率を定量した. 同実験を 3 回行い, ヒストグラムはそのうち代表的な結果を示す. 図中のグレーは EdU 非投与群 (ネガティブコントロール), 実線は EdU 投与群を示し, 数値は EdU 陽性率を表す. グラフは cNK 細胞 (白) と IL4-NK 細胞 (黒) における EdU 陽性率を示す.

数値は平均値 \pm 標準誤差を示す ($n=3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

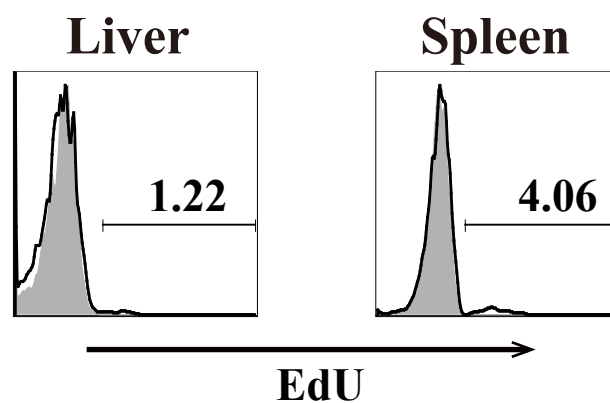


Figure 14. CD11b⁺ NK 細胞の増殖活性

Fig. 13 で行なった Edu 投与実験において，コントロールマウスの肝臓および脾臓の血液細胞中の CD11b⁺ NK 細胞（CD11b⁺CD49b⁺FcεR1α⁺CD3e⁺CD19⁺）について，EdU 陽性細胞の比率を定量した．同実験を 3 回行い，そのうち代表的な結果をヒストグラムに示した．図中のグレーは EdU 非投与群（ネガティブコントロール），実線は EdU 投与群を示し，数値は EdU 陽性率を表す．

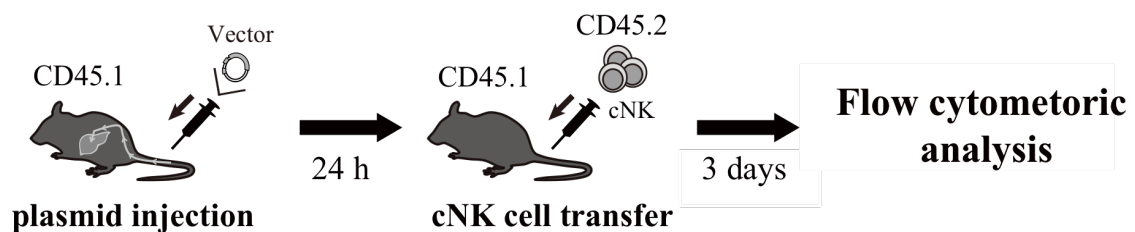


Figure 15. cNK 細胞移植実験の概要

cNK 移植実験の概要を示す。HTVi 法に従って、CD45.1 コンジェニックマウスにコントロールベクター (5 μ g) または pLIVE-IL-4 ベクター (5 μ g) を尾静脈より注入した。24 時間後、野生型マウスの脾臓から単離した cNK 細胞 (CD11b⁺CD49b⁺FcεR1α⁻CD3ε⁻CD19⁻, 4x10⁵ - 1x10⁶ cells/ 匹) を両マウスに移植した。3 日後、肝臓と脾臓の血液細胞を採取し、フローサイトメトリー解析によって、コントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウス中に存在するドナー由来の NK 細胞 (CD45.2⁺) の表面マーカー発現を比較した。

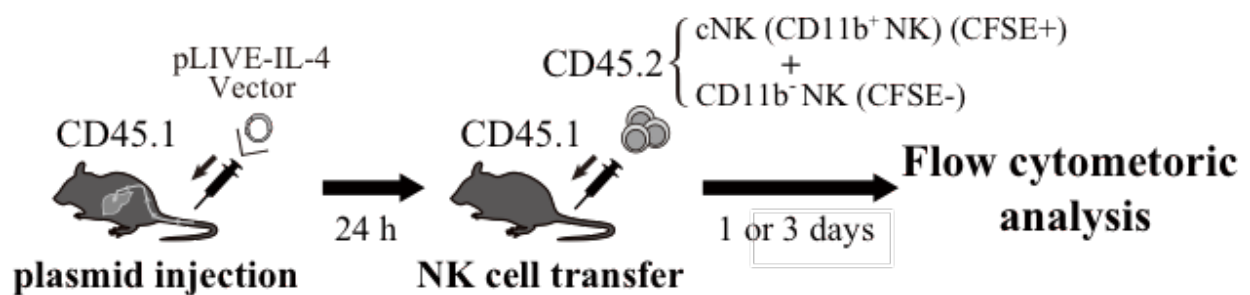


Figure 17. cNK 細胞 / CD11b⁻ NK 細胞同時移植実験の概要

cNK 細胞 / CD11b⁻ NK 細胞同時移植実験の概要を示す. HTVi 法に従って, CD45.1 コンジェニックマウスに pLIVE-IL-4 ベクター (5 μg) を尾静脈より注入した. 24 時間後, 野生型マウスの脾臓から単離した cNK 細胞 (CD11b⁺ CD49b⁺ FcεR1α⁻ CD3ε⁻ CD19⁻, 4x10⁵ - 1x10⁶ cells/ 匹) および CD11b⁻ NK 細胞 (CD11b⁻ CD49b⁺ FcεR1α⁻ CD3ε⁻ CD19⁻, 4x10⁵ - 1x10⁶ cells/ 匹) を同細胞数ずつ混濁し, 尾静脈より移植した. なお予め cNK 細胞は CFSE によって標識し, 移植に用いた. 移植後 1 日および 3 日目に肝臓と脾臓の血液細胞を採取し, フローサイトメトリー解析によってドナーの cNK 細胞由来 (CD45.2⁺/CFSE⁺) および CD11b⁻ NK 細胞由来 (CD45.2⁺/CFSE⁻) の NK 細胞の表面マーカー発現を比較した.

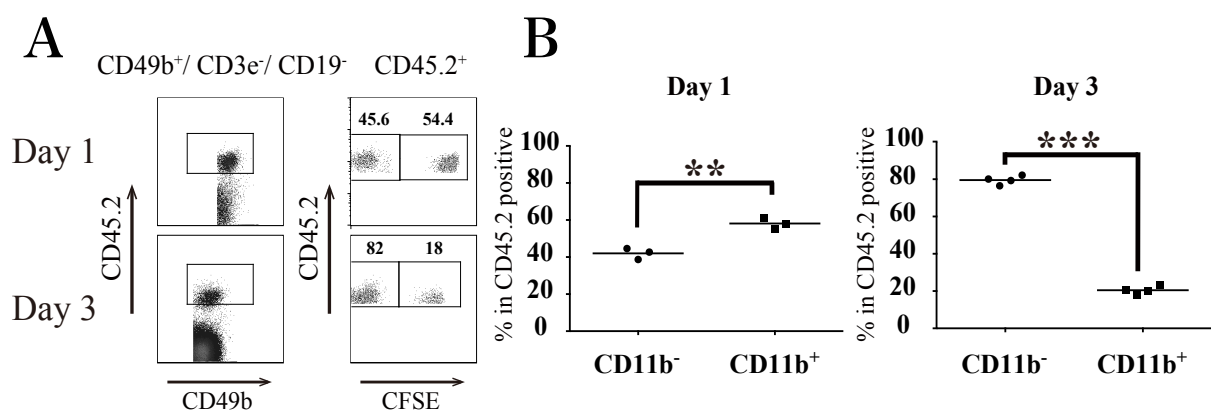


Figure 18. cNK 細胞 / CD11b⁻ NK 細胞同時移植後の各ドナー由来の NK 細胞の存在比率の変化

Figure 17. で示したスキームに従い、cNK 細胞 / CD11b⁻ NK 細胞の同時移植を行った。A では、移植後 1 日目および 3 日目のドナー由来の NK 細胞全体 (CD45.2⁺) に占める、cNK 細胞 (CD45.2⁺/CFSE⁺) および CD11b⁻ NK 細胞 (CD45.2⁺/CFSE⁻) 由来の細胞の存在比率について、同実験を 3 回行ったうち代表的な結果を示す。B のグラフの数値は、移植後 1 日目および 3 日目における CD11b⁻ NK 細胞 (CD11b⁻)、cNK 細胞 (CD11b⁺) 由来の NK 細胞の存在比率の平均値を示す (n=3)。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

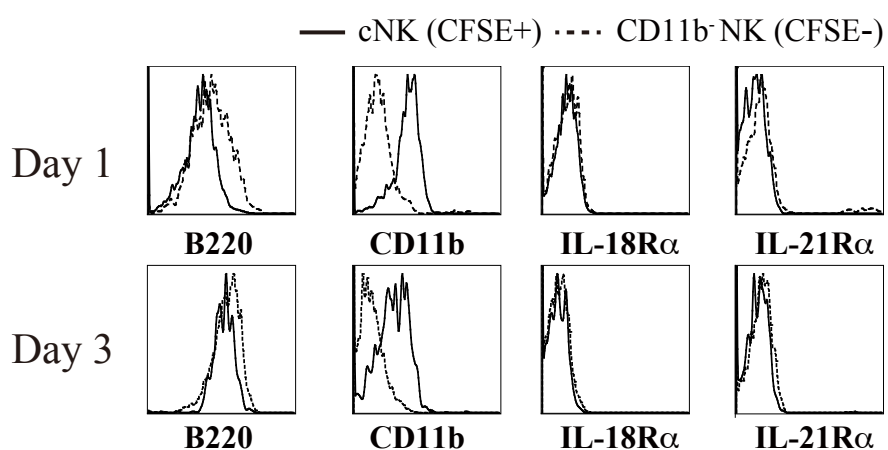


Figure 19. cNK 細胞 / CD11b⁻ NK 細胞同時移植後の各ドナー由来の NK 細胞の表面マーカー発現の変化

cNK 細胞 / CD11b⁻ NK 細胞同時移植後，1 日目および 3 日目におけるそれぞれのドナー由来の NK 細胞の表面マーカーの発現をヒストグラムで示す．図中の実線は cNK 細胞 (CD45.2⁺/CFSE⁺)，破線は CD11b⁻ NK 細胞 (CD45.2⁺/CFSE⁻) 由来の NK 細胞を示しており，同実験を 3 回行ったうち代表的な結果を示す．

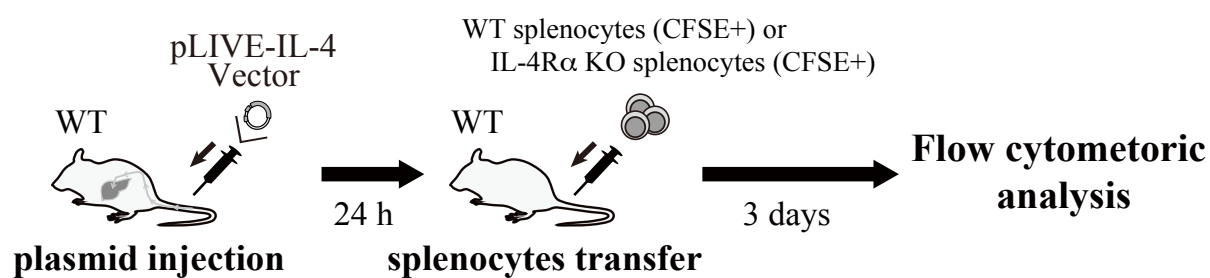


Figure 20. 脾臓血液細胞移植実験の概要

脾臓血液細胞移植実験の概要を示す。HTVi 法に従って、野生型 Balb/c 系統マウスに pLIVE-IL-4 ベクター (5 μ g) を尾静脈より注入した。24 時間後、野生型および IL-4R α 欠損マウスから採集した脾臓血液細胞 (2 \times 10⁷ cells/ 匹) を CFSE でそれぞれ標識し、尾静脈より移植した。3 日後、肝臓と脾臓の血液細胞を採取し、フローサイトメトリ解析によって、ドナー由来の NK 細胞 (CFSE⁺ NKp46⁺ CD3e⁻ CD19⁻) の表面マーカー発現および CFSE の蛍光強度を比較した。

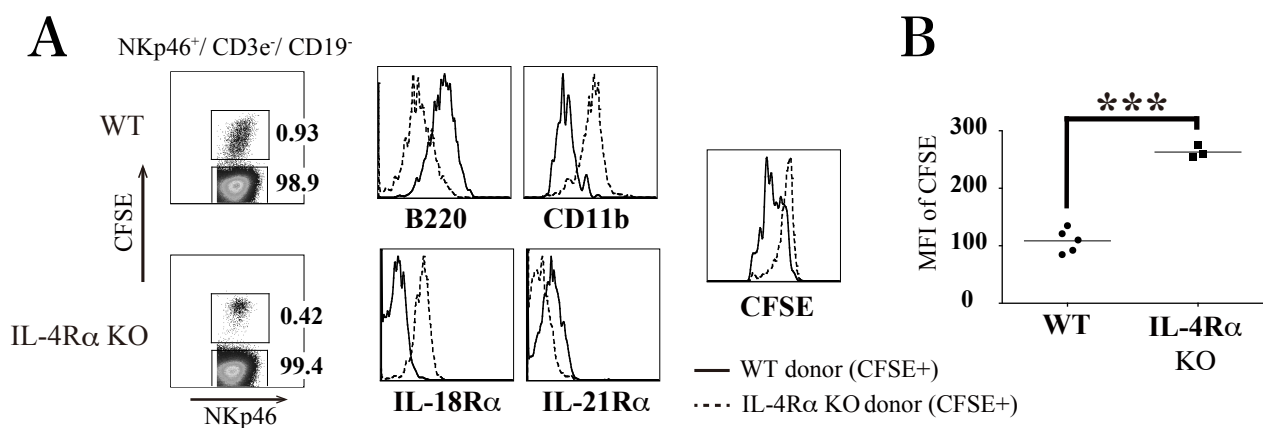


Figure 21. IL-4 過剰発現マウスへの移植後の野生型および IL-4Rα 欠損マウス由来の NK 細胞の表面マーカー発現および CFSE 蛍光強度の変化

Figure 20. で示したスキームに従い、脾臓血液細胞の移植を行った. A では、移植後 3 日目のドナー由来の NK 細胞 (CFSE⁺ NKp46⁺ CD3e⁻ CD19⁻) の存在比率および表面マーカーの発現および CFSE の蛍光強度を示す. ヒストグラム中の実線は野生型マウス由来, 破線は IL-4Rα 欠損マウス由来の NK 細胞を示しており, 同実験を 3 回以上行ったうち代表的な結果を示す. B のグラフの横線の数値は, 移植後 3 日目の野生型マウス由来および IL-4Rα 欠損マウス由来の NK 細胞における CFSE の MFI の平均値を示す (n≥3). *** $P < 0.001$.

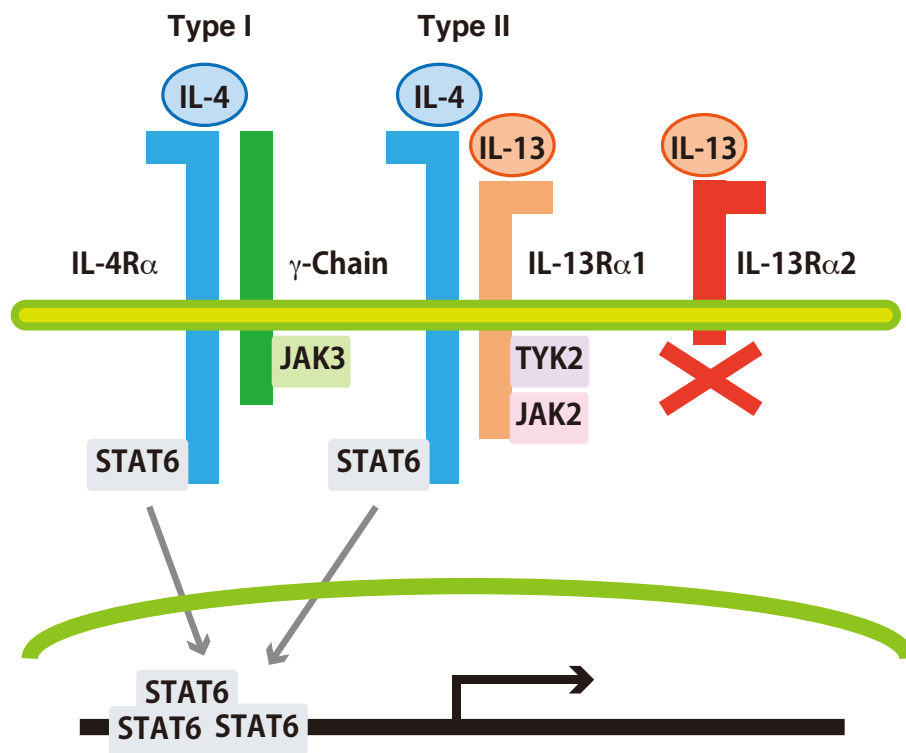


Figure 22. IL-4, IL-13 受容体の模式図

IL-4 および IL-13 の受容体の模式図を示す。IL-4 の受容体は IL-4Rα と γ -chain の複合体からなる Type I レセプター、IL-4Rα と IL-13Rα の複合体からなる Type II レセプターの 2 種類が存在し、STAT6 を介してシグナルが伝えられる。Type II レセプターには IL-13 も結合するため、IL-4 と IL-13 は一部の生理機能が共通している。

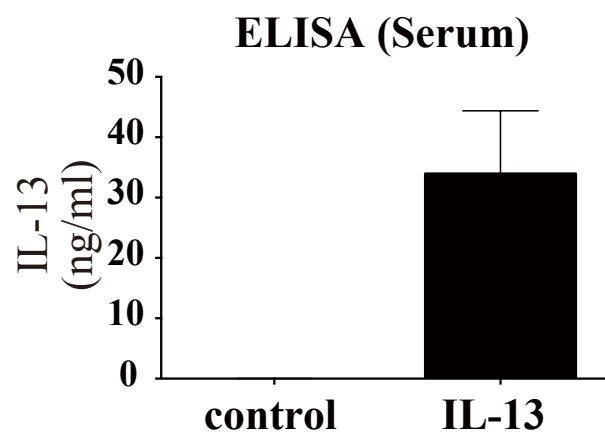


Figure 23. HTVi 法による IL-13 の一過性過剰発現

HTVi 法に従い、コントロールベクター (20 μ g) または pLIVE-IL-4 ベクター (20 μ g) を尾静脈より注入した。HTVi 法実施後 5 日目のコントロールマウスおよび IL-13 過剰発現マウスから血清を採取し、ELISA によって IL-13 の濃度を定量した。

数値は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=3)。

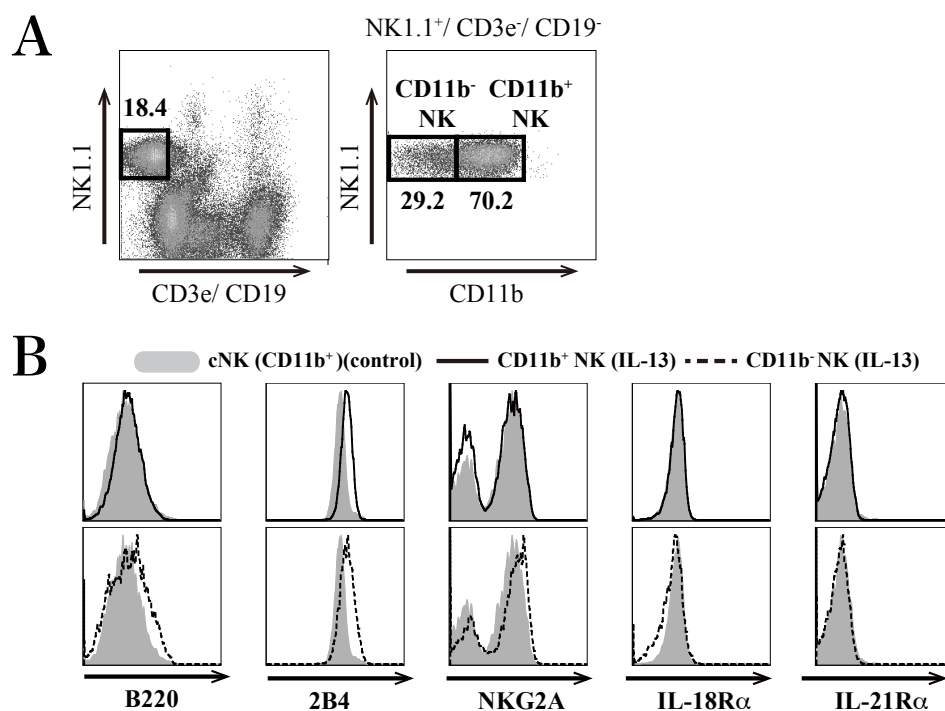


Figure 24. IL-13 過剰発現に伴う肝臓内の NK 細胞の変化

コントロールマウスおよび IL-13 過剰発現マウスから肝臓血液細胞を分取し、フローサイトメトリーにより解析した。A は IL-13 過剰発現マウスの肝臓血液細胞を示しており、図中の数字はゲート内の細胞の存在比率を示す。B のヒストグラムは、コントロールマウスおよび IL-13 過剰発現マウス中の NK 細胞の表面マーカー発現を示す。図中のグレーはコントロールマウス中の cNK 細胞 ($CD11b^+CD49b^+FceR1\alpha^-CD3e^-CD19^-$)、実線は IL-13 過剰発現マウス中の $CD11b^+$ 細胞 ($CD11b^+CD49b^+FceR1\alpha^-CD3e^-CD19^-$)、破線は IL-13 過剰発現マウス中の $CD11b^-$ 細胞 ($CD11b^-CD49b^+FceR1\alpha^-CD3e^-CD19^-$) 細胞をそれぞれ示す。同実験を複数回行ったうち、代表的な結果を示している ($n \geq 3$)。

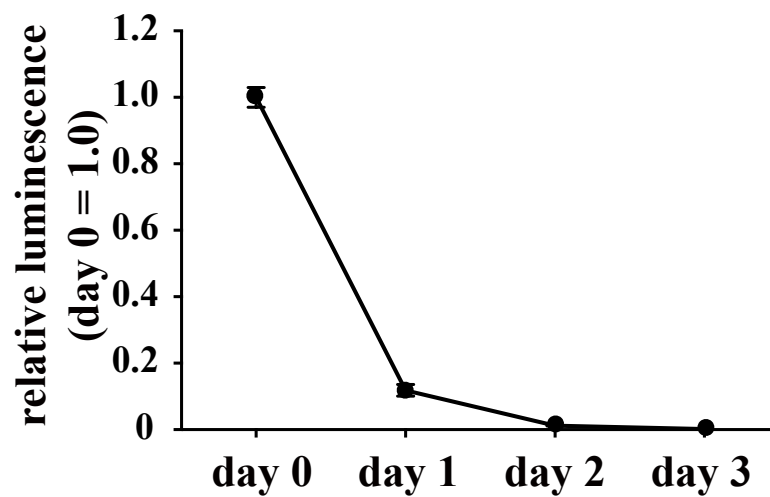


Figure 25. IL-4 単独存在下で培養した cNK 細胞の生存率の推移

単離した cNK 細胞 (1×10^6 cells) を IL-4 (50 ng/ml) だけを添加した条件で 4 日間培養し、24 時間毎に生存率を測定した。図中の数値は、各時点での CellTiter-Glo kit (Promega) の測定値を培養開始直後の測定値で割返した値の平均値 \pm 標準誤差を示す (n=3)。

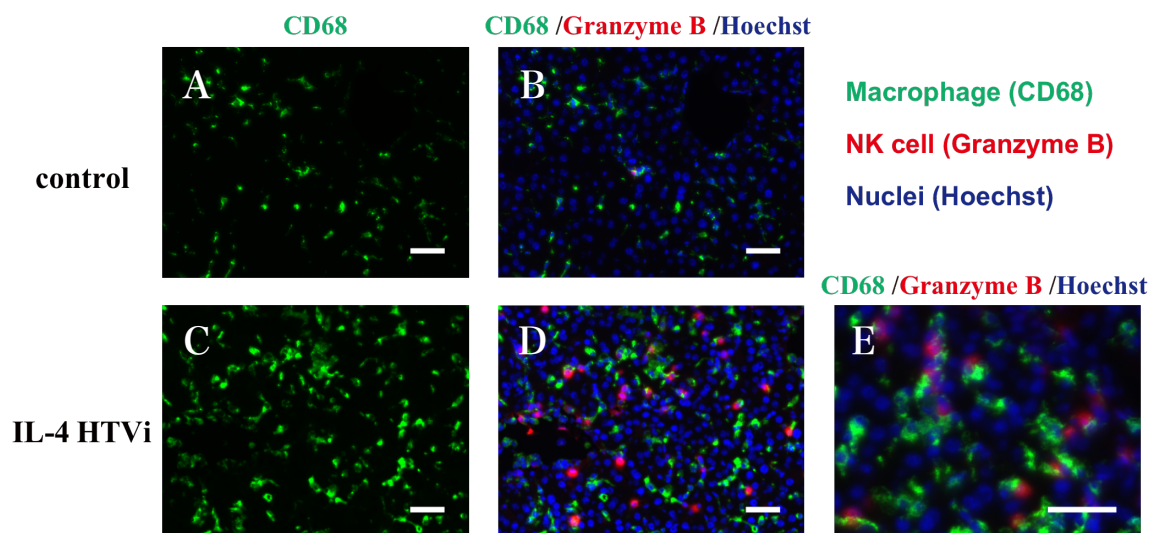


Figure 26. コントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスにおける

肝臓内マクロファージおよび NK 細胞の分布

コントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスの肝臓より切片を作成し、免疫組織染色を行った。マクロファージマーカーとして CD68 (緑, A-E), 活性化した NK 細胞マーカーとして Granzyme B (赤, B,D,E) を染色した。Hoechst によって核 (青, B,D,E) を同時に染色した。図中のスケールバーは 50 μm を示す。

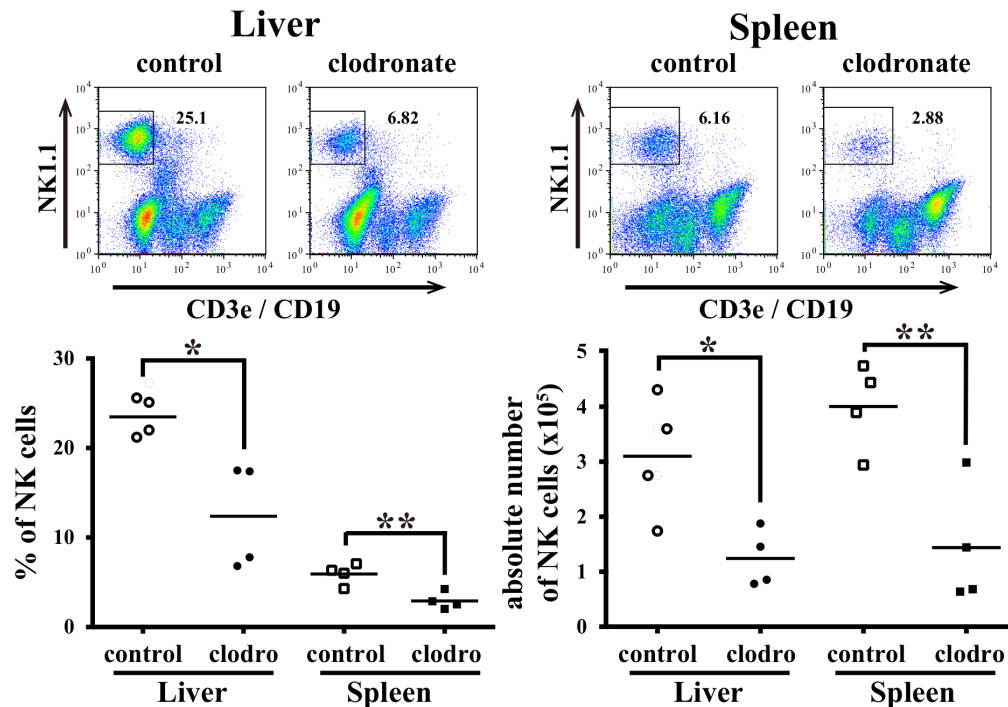


Figure 27. マクロファージの除去による IL4-NK 細胞の増殖能の変化

コントロールリボソームまたはクロドロン酸リボソーム 30 μ l を定常状態のマウスに腹腔投与し、コントロールマウスおよびマクロファージ除去マウスを作成した。24 時間後、両マウスに pLIVE-IL-4 ベクター (1 μ g) を尾静脈より注入し、HTVi 法に従って IL-4 を過剰発現させた。3 日後、両マウスの肝臓と脾臓から血液細胞を採取し、フローサイトメトリー解析によって NK 細胞の変化を比較した。同実験を 4 回行い、ドットプロットはそのうち代表的な結果を示す。数値は CD45 陽性細胞中の NK 細胞 (NK1.1⁺ CD3e⁻ CD19⁻) の割合を表す。左のグラフは CD45 陽性細胞中の NK 細胞の割合、右のグラフは NK 細胞の絶対数を示し、横線の数値は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=4)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

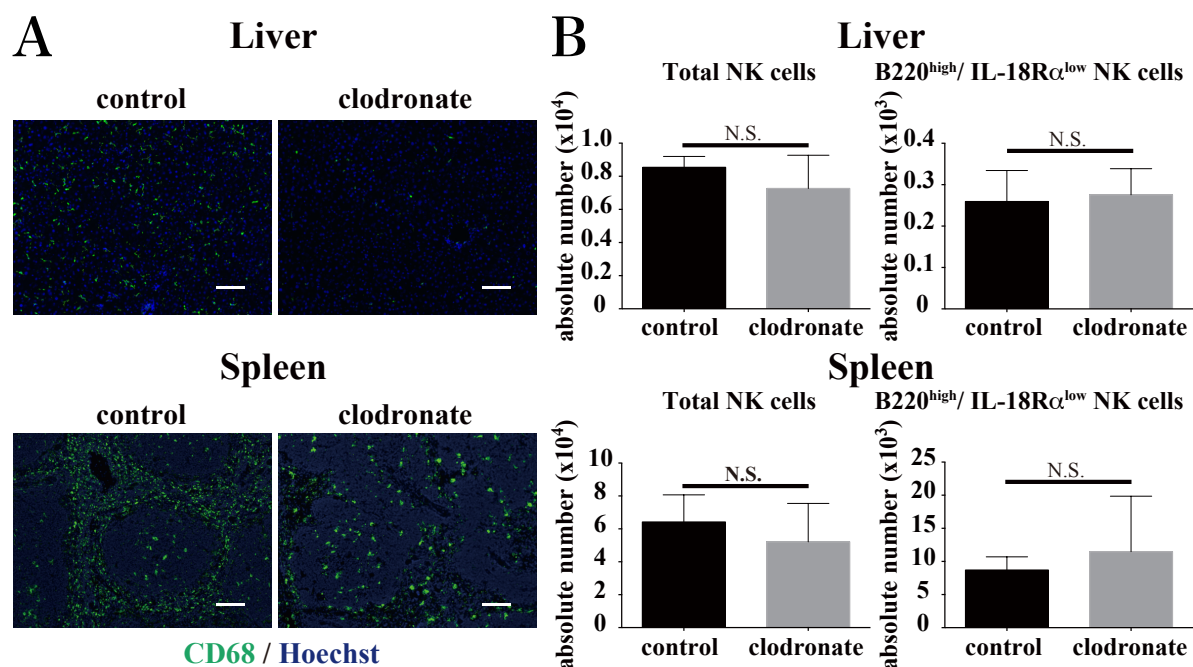


Figure 28. クロドロン酸リポソーム投与によるマクロファージと NK 細胞の変化

コントロールリポソームまたはクロドロン酸リポソーム 30 μ l を定常状態のマウスに腹腔投与し、4 日後のマクロファージおよび NK 細胞の変化を解析した。A では免疫組織染色を行い、マクロファージマーカーとして CD68（緑）を染色し、核を Hoechst（青）によって染色した。図中のスケールバーは 50 μ m を示す。B のグラフは、肝臓および脾臓の血液細胞中の全 NK 細胞の絶対数、および $B220^{high}/IL-18R\alpha^{low}$ NK 細胞の絶対数を示し、数値は平均値 \pm 標準誤差を示す ($n \geq 4$)。

N.S. 有意差なし (not significance).

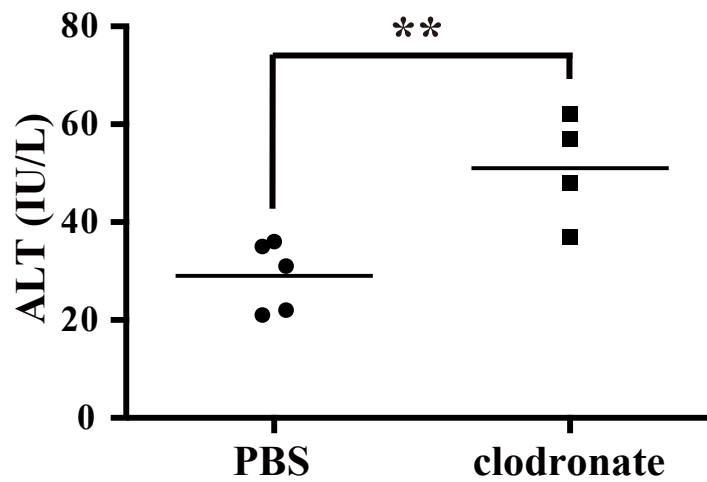


Figure 29. クロドロン酸リポソーム投与による肝障害マーカーの変化

コントロールリポソームまたはクロドロン酸リポソーム 30 μ l を定常状態のマウスに腹腔投与し、4 日後の肝障害マーカーの変化を解析した。血清を採取し、ALT 濃度を測定した。グラフの横線の数値は平均値を示す ($n \geq 4$)。 ** $P < 0.01$.

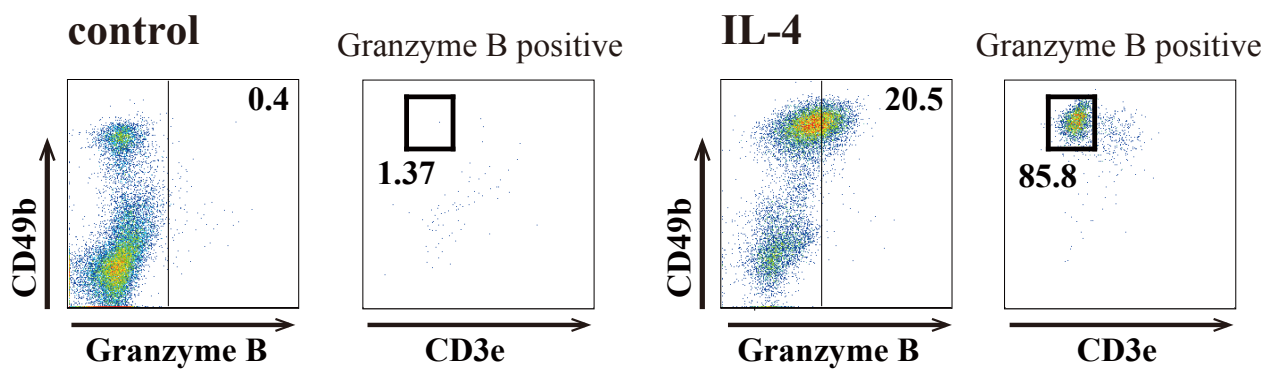


Figure 30. IL-4 過剰発現に伴う Granzyme B⁺ 細胞の変化

コントロールマウスおよび IL-4 過剰発現マウスから肝臓血液細胞を分取し、IL-2 (100 ng/ml) および Brefeldin A (5 µg/ml) 存在下で 5 時間 37 °Cで培養した。その後表面マーカーと共に細胞内染色を行い、Granzyme B⁺ 細胞を解析した。図中の数値は各集団の存在比率を示し、太枠線は Granzyme B⁺ 細胞中の NK 細胞 (Granzyme B⁺ CD49b⁺ CD3e⁻) を示す。

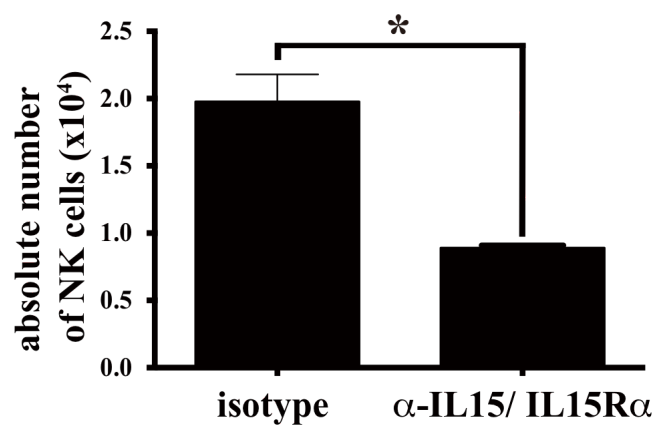


Figure 31. IL-15 の中和による IL-4 応答性肝臓内マクロファージの有する

NK 細胞支持能の変化

野生型マウスの脾臓から単離した cNK 細胞 (1×10^6 cells/well) と, HTVi 法実施から 4 日目の IL-4 過剰発現マウスより単離した 肝臓内マクロファージ (1×10^6 cells/well) との共培養を行った. 培養時に, isotype control抗体 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) または anti-IL-15/IL-15R α complex 抗体 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) を添加した. 48 時間後に細胞を回収し, 生存している NK 細胞の絶対数 (NK1.1⁺PI⁻) をフローサイトメトリー解析により定量した.

数値は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=4). * $P < 0.05$.

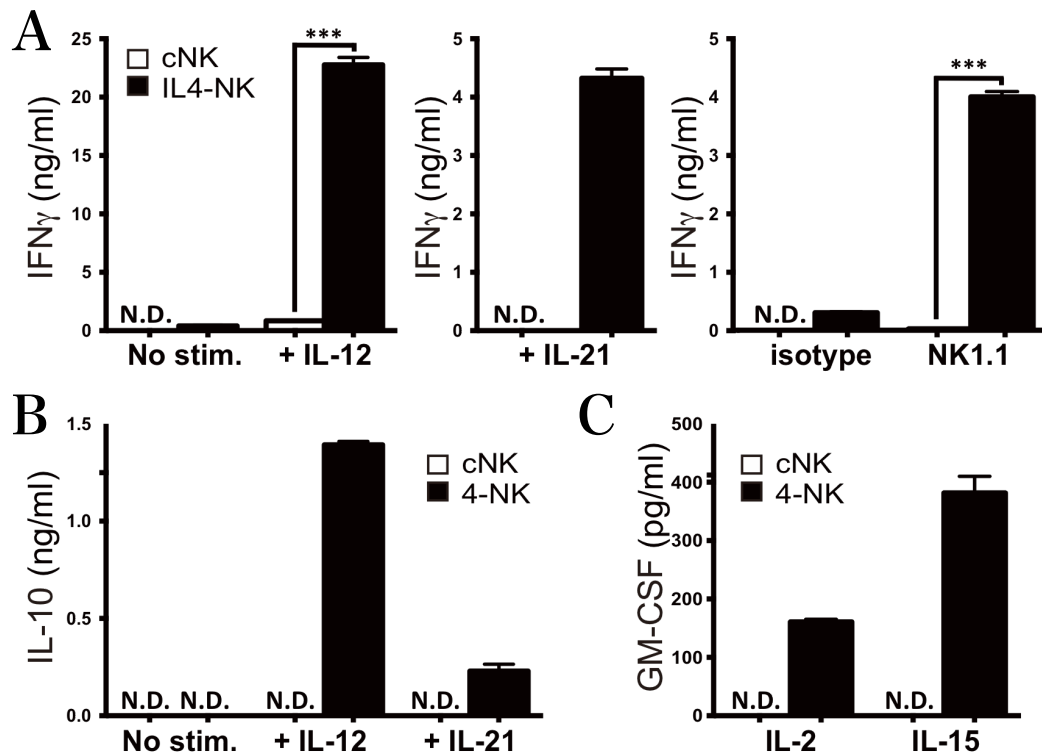
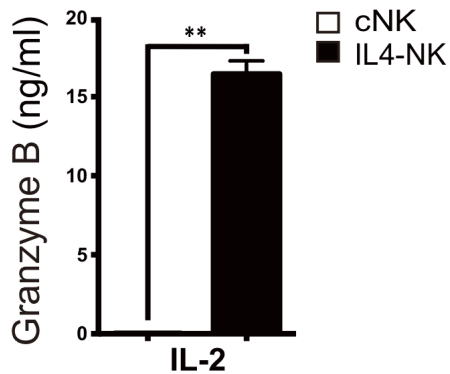


Figure 32. cNK 細胞および IL4-NK 細胞のサイトカイン産生

単離した cNK 細胞と IL4-NK 細胞のサイトカイン産生を，ELISA により比較した．
 Aは単離した NK 細胞 (5×10^4 cells/well) を IL-2 (100 ng/ml) 存在下，無刺激および IL-12 (100 ng/ml)，IL-21 (100 ng/ml)，NK1.1 (20 μ g/mlで一晩 well をコーティング) によって刺激した 24 時間後の培養上清に含まれる IFN- γ の濃度を定量した．B，C は単離した NK 細胞 (1×10^5 cells/well) を IL-2 (100 ng/ml) または IL-15 (100 ng/ml) 存在下，無刺激および IL-12 (100 ng/ml)，IL-21 (100 ng/ml) で刺激した 24 時間後の培養上清に含まれる B: IL-10，C: GM-CSF の濃度を定量した．同実験を 3 回行ったうち代表的な結果を示しており，数値は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=3)．

*** $P < 0.001$, N.D. 検出できず (Not detected.)，No stim. IL-2 のみ添加 (Not stimulated)．

A



B

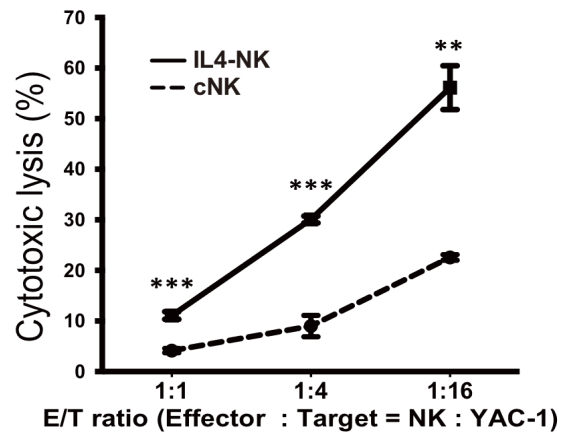


Figure 33. cNK 細胞および IL4-NK 細胞の Granzyme B 産生と細胞傷害活性

単離した cNK 細胞と IL4-NK 細胞の細胞傷害活性を比較した. A は単離した NK 細胞 (5×10^4 cells/well) を IL-2 (100 ng/ml) 存在下, 無刺激の条件下で 24 時間培養した上清に含まれる Granzyme B の濃度を, ELISA により定量した. B は IL-2 (100 ng/ml) 存在下, CFSE で標識した YAC-1 細胞 (1×10^4 cells/well) と単離した NK 細胞を様々な混合比率で共培養し, 4 時間後に傷害された YAC-1 細胞の割合

(CFSE⁺PI⁺) をフローサイトメトリー解析により定量した. 同実験を 3 回行ったうち代表的な結果を示しており, 数値は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=3).

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

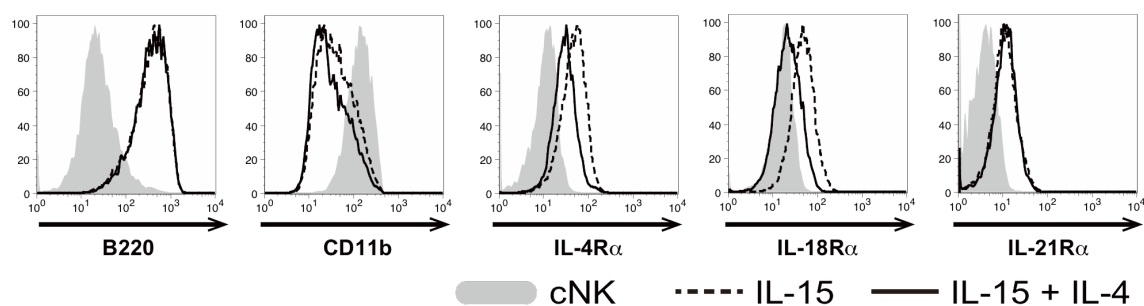


Figure 34. IL-15 および IL-4 による cNK 細胞の表面マーカー発現の変化

単離した cNK 細胞 (1×10^6 cells/well) を IL-15 (100 ng/ml) 単独, または IL-4 (200 ng/ml) を加えた条件で 4 日間培養し, フローサイトメトリーによって表面マーカーの発現パターンを解析した. 図中のグレーは単離してすぐの cNK 細胞, 破線は IL-15 単独存在下, 実線は IL-4 添加条件で培養した NK 細胞の表面マーカー発現を示す. 同実験を 3 回行ったうち, 代表的な結果を示す.

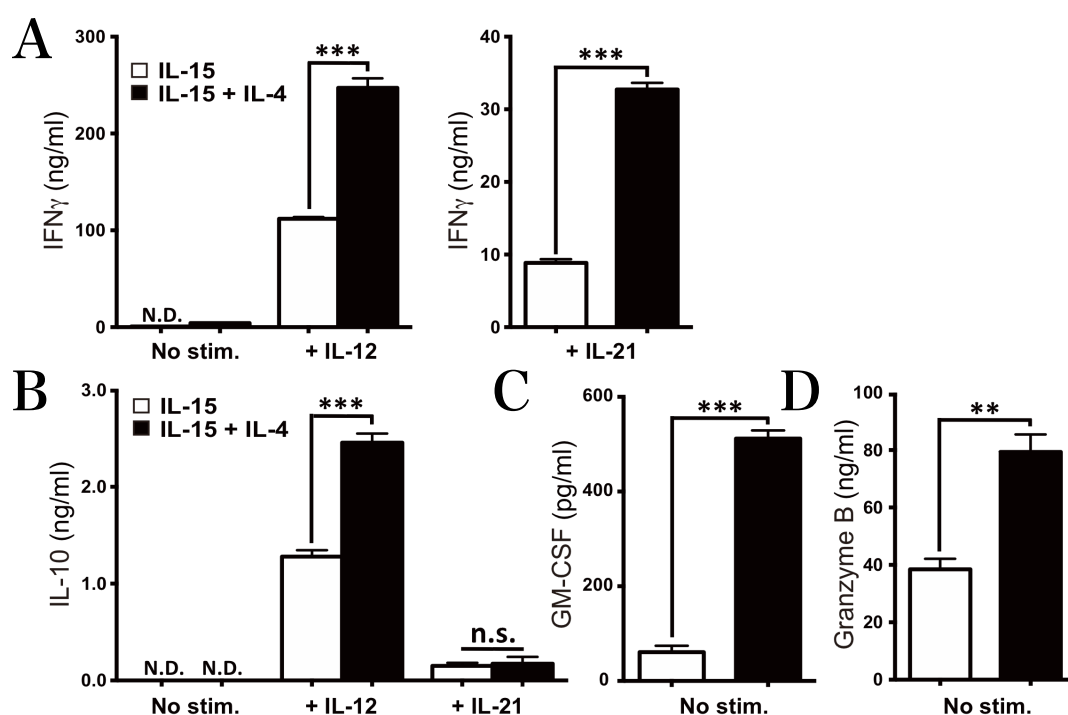


Figure 35. IL-4 による cNK 細胞のサイトカイン産生および Granzyme B 産生の変化

単離した cNK 細胞 (1×10^6 cells/well) を IL-15 (100 ng/ml) 単独, または IL-4 (200 ng/ml) を加えた条件で 4 日間培養した. 培養した NK 細胞 (A: 2×10^4 cells/well, B: 5×10^4 cells/well) を IL-2 (100 ng/ml) 存在下, 無刺激および IL-12 (100 ng/ml), IL-21 (100 ng/ml) で刺激した条件で 24 時間培養し, 上清中の A: IFN- γ , B: IL-10 の濃度を ELISA によって定量した. 同様に, 培養した NK 細胞 (C: 5×10^4 cells/well, D: 2×10^4 cells/well) を, 新たな刺激は加えずに 4 日間の培養と同条件で 24 時間培養し, 上清中の C: GM-CSF, D: Granzyme B の濃度を ELISA によって定量した. 同実験を 3 回行ったうち代表的な結果を示しており, 数値は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=3).

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, N.D. 検出できず (Not detected.),

n.s. 有意差なし (not significance), No stim. 4 日間の培養と同条件 (Not stimulated).

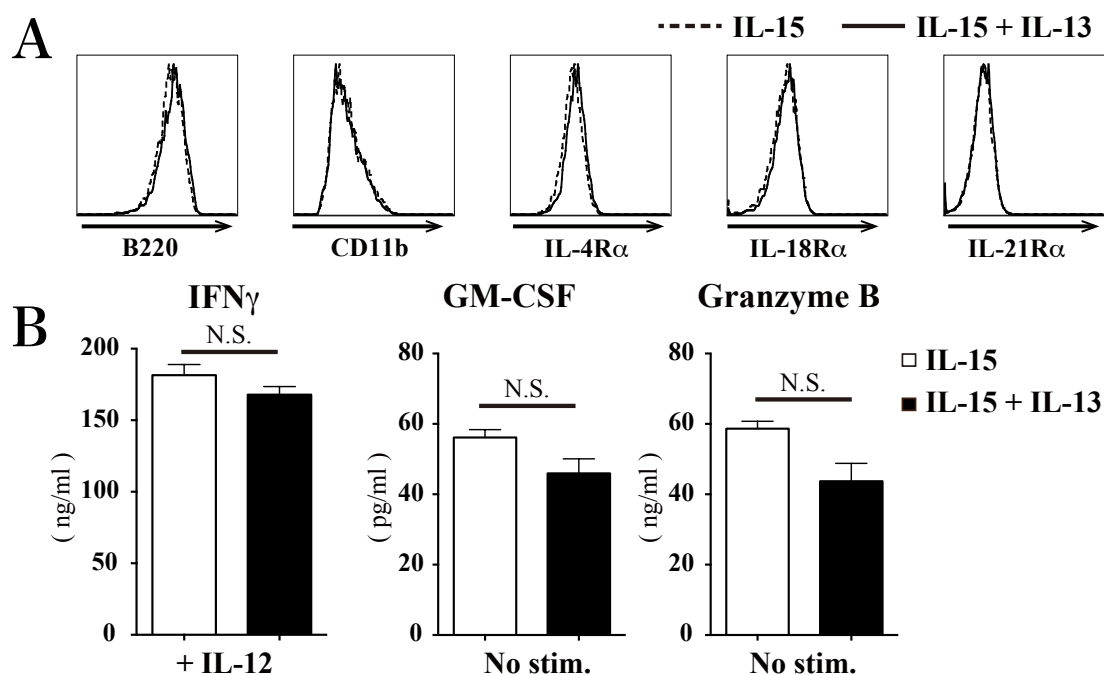


Figure 36. IL-13 による cNK 細胞の表面マーカー発現, サイトカイン産生および

Granzyme B 産生の変化

単離した cNK 細胞 (1×10^6 cells/well) を IL-15 (100 ng/ml) 単独, または IL-13 (200 ng/ml) を加えた条件で 4 日間培養した. Aのヒストグラムは, IL-15 単独 (実線) および IL-13 添加 (破線) 条件で培養した NK 細胞の表面マーカー発現を示しており, 同実験を 3 回行ったうち代表的な結果を示す. B では培養した NK 細胞 (2×10^4 cells/well) を IL-2 (100 ng/ml) 存在下, IL-12 (100 ng/ml) で刺激した条件で 24 時間培養し, 上清中の IFN- γ の濃度を ELISA によって定量した. C, D では, 同様に培養した NK 細胞 (C: 5×10^4 cells/well, D: 2×10^4 cells/well) を, 新たな刺激は加えずに 4 日間の培養と同条件で 24 時間培養し, 上清中の C: GM-CSF, D: Granzyme B の濃度を ELISA によって定量した. 同実験を 3 回行ったうち代表的な結果を示しており, 数値は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=3).

N.S. 有意差なし (not significance), No stim. 4 日間の培養と同条件 (Not stimulated).

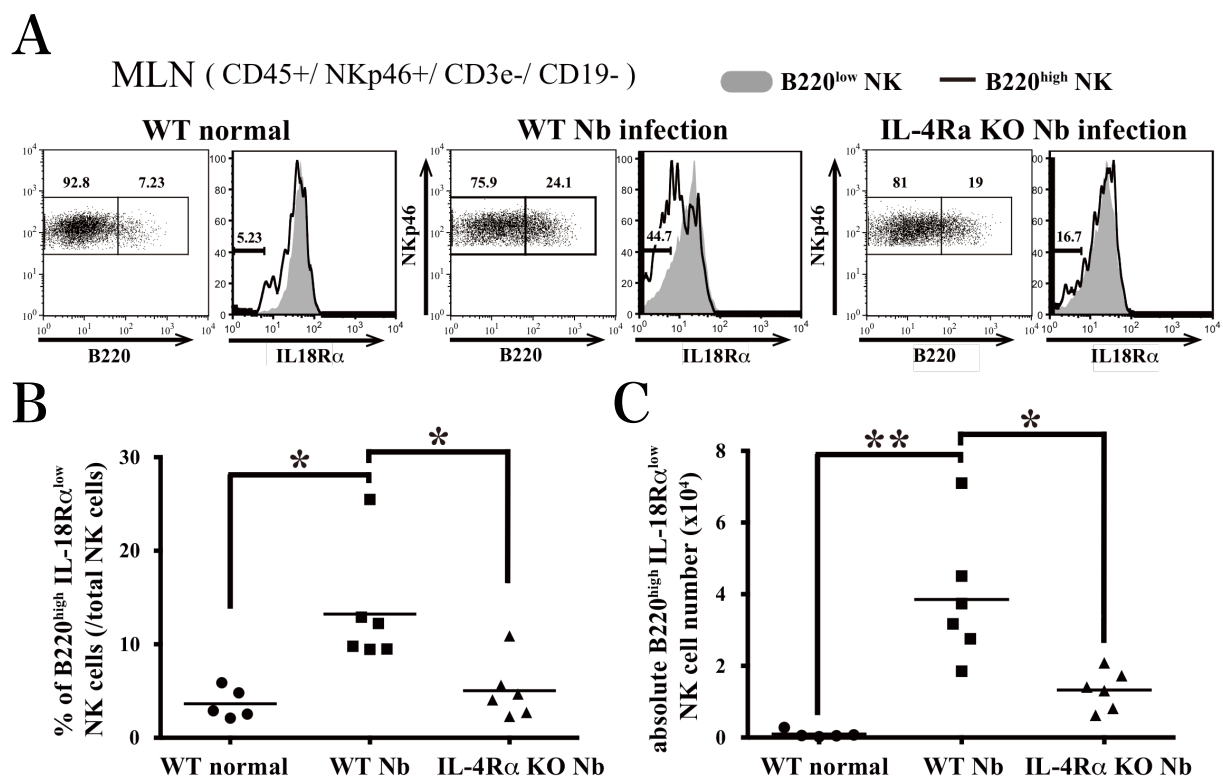


Figure 37. 寄生虫感染による B220^{high}/IL18Rα^{low} NK 細胞の誘導

Nb (750 larvae/mice) を皮下注射し，寄生虫感染を実施した．A は左から順に，非感染の野生型マウス，感染 10 日目の野生型マウス，感染 10 日目の IL-4Rα 欠損マウスを示す．ドットプロットは腸管膜リンパ節中の全 NK 細胞 (NKp46⁺ CD3e⁻ CD19⁻) を示し，数値はそのうち B220^{low} および B220^{high} の NK 細胞の割合を表す．ヒストグラムは B220^{low} NK 細胞 (グレー) および B220^{high} NK 細胞 (実線) の IL-18Rα の発現を示し，数値は B220^{high} NK 細胞のうち IL-18Rα 陰性の割合を示す．同実験を 6 回行ったうち代表的な結果を示す．B は全 NK 細胞中の B220^{high}/IL18Rα^{low} NK 細胞の割合，C は B220^{high}/IL18Rα^{low} NK 細胞の絶対数を示す．横線の数値は平均値 ± 標準誤差を示す (n≤6)．* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ．

MLN (WT Nb infection)

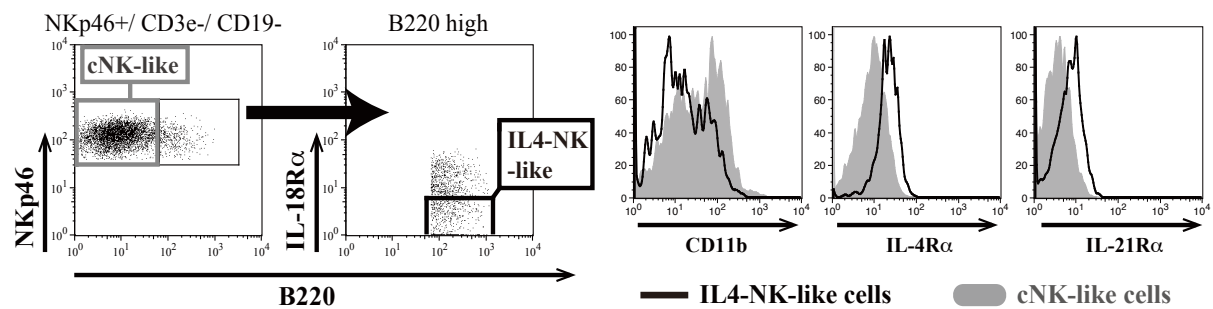


Figure 38. cNK-like 細胞と IL4-NK-like 細胞の表面マーカー発現

Nb 感染 10 日目の野生型 Balb/c 系統マウスの腸間膜リンパ節に存在する, cNK-like 細胞 (NKp46⁺ B220^{low} IL-18Rα^{high} CD3e⁻ CD19⁻) と IL4-NK-like 細胞 (NKp46⁺ B220^{high} IL-18Rα^{low} CD3e⁻ CD19⁻) の表面マーカー発現をフローサイトメトリー解析によって比較した. 左のドットプロットに示した分画をそれぞれ cNK-like 細胞 (グレー), IL4-NK-like 細胞 (実線) とし, 右のヒストグラムで表面マーカー発現を示した. 同実験を 4 回行ったうち代表的な結果を示している.

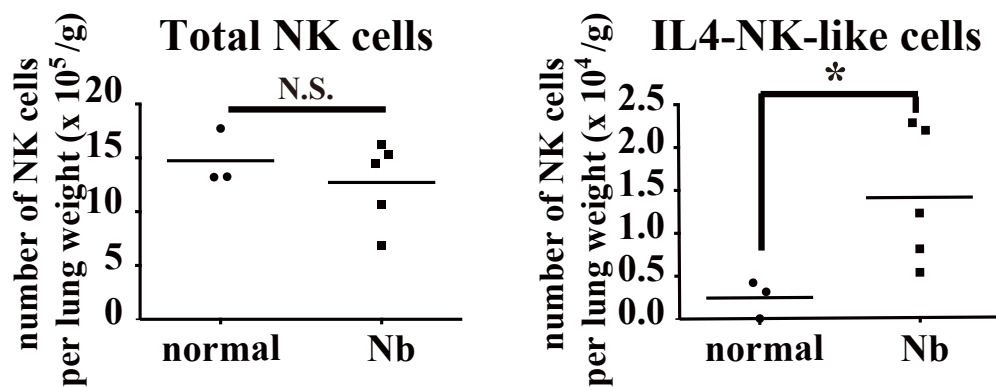


Figure 39. Nb 感染に伴う肺での IL4-NK-like 細胞の増加

定常状態および Nb 感染 9 日目の野生型 Balb/c 系統マウスに存在する，肺組織 1 g 当たりの全 NK 細胞数 (NKp46⁺ CD3e⁻ CD19⁻) および IL4-NK-like 細胞数 (NKp46⁺ B220^{high} IL18R α ^{low} CD3e⁻ CD19⁻) を定量した．横線の数値は平均値を示す (n \geq 3)．

N.S. 有意差なし (not significance), * $P < 0.05$.

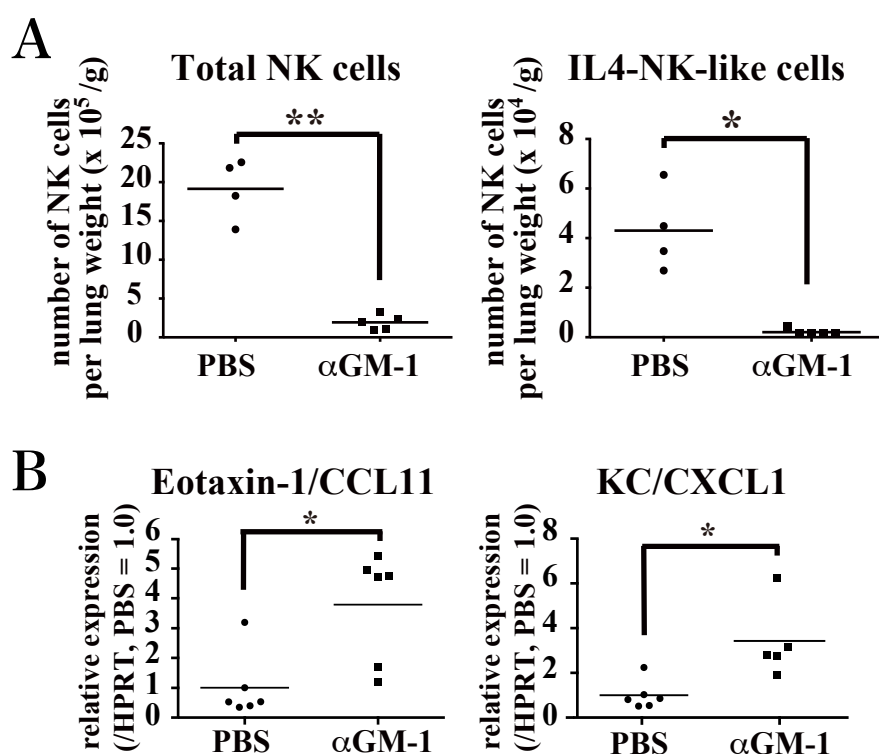


Figure 40. NK 細胞除去による Nb 感染マウスの肺での遺伝子発現の変化

Nb 感染マウスに対して、PBS または抗アシアロ GM1 抗体(α GM-1, 50 μ l/ 回)を Day -1, 0, 5 に腹腔投与し、NK 細胞を除去した(感染日を Day 0 とする)。A では、感染 9 日目の肺組織 1 g 当たりの全 NK 細胞数(NKp46⁺ CD3e⁻ CD19⁻)および IL4-NK-like 細胞数(NKp46⁺ B220^{high} IL18R α ^{low} CD3e⁻ CD19⁻)を定量した。横線の数値は平均値を示す (n \geq 4)。B では、感染 9 日目の肺組織における遺伝子発現の変化を qPCR によって解析した。各遺伝子の発現量は HPRT の発現量で正規化しており、PBS 投与群の平均値を 1.0 とした相対値で示しており、横線の数値は平均値を示す (n \geq 4)。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

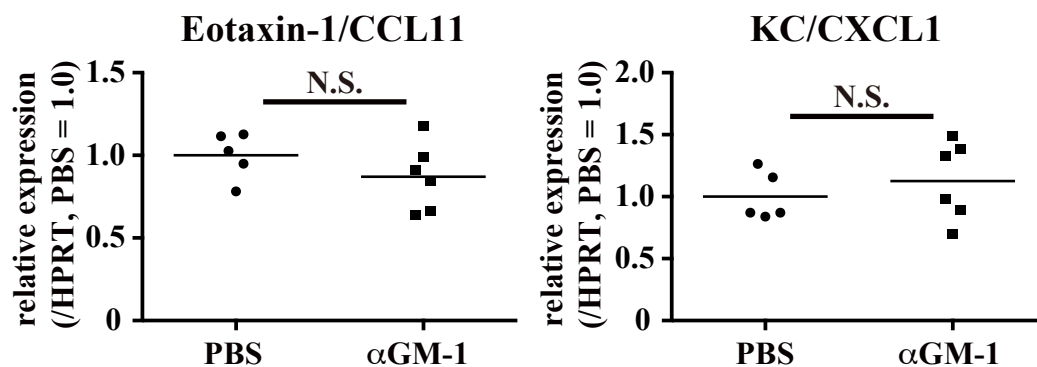


Figure 41. NK 細胞除去による定常状態のマウスの肺での遺伝子発現の変化

定常状態のマウスに対して、PBS または抗アシアロ GM1 抗体 (α GM-1, 50 μ l) を投与し、4 日目の肺組織における遺伝子発現の変化を qPCR によって解析した。各遺伝子の発現量は HPRT の発現量で正規化しており、PBS 投与群の平均値を 1.0 とした相対値で示しており、横線の数値は平均値を示す ($n \geq 5$)。

N.S. 有意差なし (not significance).

第 4 章 考察

表面マーカー発現から考察される IL4-NK 細胞の性状

本研究では、IL-4 過剰発現マウスにおいて、特徴的な NK 細胞である IL4-NK 細胞が劇的に増加することを見出した。IL4-NK 細胞の表面マーカー発現は cNK 細胞とは大きく異なっていた。例えば IL4-NK 細胞は B220 の発現が高く、逆に CD11b の発現が低かった。B220 は一部の未成熟な NK 細胞サブセットで高発現し、成熟した NK 細胞では発現が低下する (Vosshenrich et al., 2007)。一方 CD11b は NK 細胞の成熟に伴い発現が上昇する (Chiossone et al., 2009; Hayakawa and Smyth, 2006)。こうした今まで知られている B220 と CD11b の発現パターンを考慮すると、IL4-NK 細胞は未成熟な NK 細胞の一種である可能性が考えられた。しかし、IL4-NK 細胞は成熟した NK 細胞のマーカーである CD49b の発現が高く、未成熟マーカーである TRAIL や IL-7R α はほとんど発現していなかった (Arase et al., 2001; Takeda et al., 2005)。さらに、成熟した NK 細胞である cNK 細胞を IL-4 過剰発現マウスに移植した場合に IL4-NK 細胞へと変化したことから、IL4-NK 細胞は単なる成熟途中の NK 細胞ではないと考えられた。興味深いことに、IL-4 の過剰発現マウスでは CD11b⁻ NK 細胞のような未成熟な NK 細胞を含むほぼ全ての NK 細胞が IL4-NK 細胞になっており、IL4-NK 細胞への変化は幅広い成熟段階の NK 細胞に共通する機構によって誘導されると考えられた。

NK 細胞は、その細胞表面に数多くの活性化レセプターと抑制性レセプターを発現しており、それらの発現量のバランスが NK 細胞の活性化状態に大きく影響する (Backström et al., 2004; Lanier, 2003)。IL4-NK 細胞は NK1.1, 2B4, Ly108 などの活性化レセプターを高発現し、一方で NKG2A などの抑制性レセプターの発現は低かった。さらに May-Grünwald-Giemsa 染色の結果、細胞質が肥大し顆粒を溜め込んでいる様子が

観察され、IL-4-NK 細胞は活性化した NK 細胞の一種であることが明らかになった。既存の報告では、IL-4 が NKG2D などの活性化レセプターの発現を低下させることで、NK 細胞の機能を抑制することが示されている (Brady et al., 2010; Gays et al., 2005)。IL4-NK 細胞においても、全ての活性化レセプターが発現上昇しているわけではなく、NKG2D や NKp46 などの発現は低下傾向にあった。上述したとおり、NK 細胞の活性化状態には特定のレセプターの発現ではなく、各レセプターの発現量のバランスが重要である。これまでの研究から、IL-4 は NK 細胞に対する活性化作用と抑制的な作用の両方を持ち合わせていると考えられ、本研究で行った HTVi 法による IL-4 の過剰発現では活性化作用がより強く働いた結果、活性化した NK 細胞が誘導されたと考えられる。

cNK 細胞と IL4-NK 細胞は、サイトカインレセプターの発現も異なっており、IL4-NK 細胞は IL-4R α 、IL-21R α を高発現するが、IL-18R α の発現は低い。一部の未成熟なものの中には CD11b や IL-18R α の低い NK 細胞が存在するが、B220 や各種成熟マーカーの発現パターンが IL4-NK 細胞とは異なっている。ごく少数存在する B220 や IL-18R α の発現パターンがともに IL4-NK 細胞と一致する NK 細胞においても、活性化した形態を示す NK 細胞は確認できなかったことから、IL4-NK 細胞は定常状態には存在せず、IL-4 が強く産生された状況下で初めて誘導される NK 細胞だと考えられた。

IL-4 応答性マクロファージによる NK 細胞の増殖促進メカニズム

IL4-NK 細胞は、IL-4 過剰発現マウスにおいて盛んに増殖していた。しかし、単離した cNK 細胞を IL-4 のみを添加した条件で培養しても増殖せず、IL4-NK 細胞への変化も認められなかった。よって IL4-NK 細胞の誘導、増殖には、IL-4 の下流で増強される間接的なメカニズムが必要と考えられた。本研究では、マクロファージに注目し、IL-4

過剰発現マウスの肝臓内マクロファージが劇的に増加していること、IL-4 応答性マクロファージが NK 細胞の増殖に貢献していることを示した。さらに、IL-4 応答性マクロファージと共培養した NK 細胞の生存率が IL-15 の中和によって抑制されたことから、IL-4 応答性マクロファージが IL-15 の産生によって NK 細胞の増殖を促進していることが示唆された。近年、寄生虫感染などの Th2 応答時に、組織マクロファージが IL-4 シグナル依存的に増殖することが報告され、IL-4 によるマクロファージを介した寄生虫排除メカニズムに注目が集まっている (Jenkins et al., 2011; Jenkins et al., 2013)。しかし、本研究で明らかになったような、IL-4 応答性マクロファージによる IL-15 シグナルを介した NK 細胞の増殖、活性化メカニズムはこれまで全く報告されていない。IL-4 過剰発現マウスでの IL4-NK 細胞の増加が非常に劇的であることを考慮すると、Th2 応答時にマクロファージが増殖する重要な意義の一つとして、このメカニズムが何らかの意味を持つ可能性は十分に考えられる。

IL-4R α は様々な細胞で発現しており、*in vivo* で IL-4 が産生された場合、様々な間接的な影響が生じる。本研究では IL-4 の下流で IL-15 が増強されることを明らかにした。増強した IL-15 は NK 細胞の増殖を促すだけでなく、細胞機能にも影響すると予測された。IL-4 による NK 細胞の制御に関して、既存の研究でいくつかの矛盾した知見が得られた背景には、こうした間接的な作用の捉え方の違いがあると考えられる。

IL4-NK 細胞の持つ特徴的な機能

IL4-NK 細胞は、サイトカイン産生や細胞傷害活性においても、表面マーカー同様、cNK 細胞とは大きく異なっていた。興味深いことに、IL4-NK 細胞は IL-12 に強く応答し、cNK 細胞よりもはるかに多くの IFN- γ を産生した。IL-12 は Th1 応答の開始因子と

して知られているサイトカインである (Macatonia et al., 1995). また, IL4-NK 細胞は IL-10 についても, IL-12 刺激に応じて高い産生能を示した. IL-10 は Th1 応答と Th2 応答の両方を抑制する作用があることが知られている (Kosaka et al., 2011; Sabat et al., 2010). さらに, IL4-NK 細胞は, 無刺激な条件下でも GM-CSF を産生した. GM-CSF には様々な作用があるが, IL-4 と同時に作用することで樹状細胞の分化を促進し, IL-12 のヘテロダイマーの産生を促進することが報告されている (Hochrein et al., 2000). これらをふまえると, IL4-NK 細胞は過剰な Th2 応答を抑制する, あるいは Th1 応答の誘導を助けることで, Th1 /Th2 バランスを制御する細胞であることが示唆された.

IL4-NK 細胞の誘導における IL-4 と IL-15 のそれぞれの役割

IL-4R α を欠損した NK 細胞は, IL-4 過剰発現マウスに移植しても IL4-NK 細胞と同様の表面マーカー発現パターンを獲得せず, ほとんど増殖しないことが明らかになった. 一方で, 単離した cNK 細胞を IL-4 と IL-15 を添加し培養することで, IL4-NK 細胞と似た表面マーカー発現, 細胞機能を獲得することが明らかになった. この時, B220, CD11b, IL-4R α , IL-21R α については IL-4 を加えず IL-15 単独で培養した場合にも発現の変動が確認され, IL-15 シグナル依存的な変化であると考えられた. 一方で, IL-4 の添加によって初めて確認された IL-18R α の発現低下については, IL-4 の直接的な刺激に依存する変化であることが示唆された. 移植実験で用いたレシピエントマウスは野生型であり, マクロファージを介した IL-15 産生などの IL-4 の過剰発現による間接的な作用は通常通り誘導されることが考えられる. ところが, *in vitro* での解析結果から IL-15 依存的だと考えられたマーカー変化や増殖活性の亢進が生じていないことを考えると, IL-4 の NK 細胞に対する直接的な刺激が IL-15 などの間接的な作用に対する感受性を

高めていることが示唆された。 *in vitro* では、NK 細胞の生存のため 100 ng/ml という高濃度の IL-15 を添加しているため、NK 細胞の感受性の強さにかかわらず十分な刺激が NK 細胞に与えられていると考えられる。一方、 *in vivo* での IL-15 の作用亢進は比較的穏やかであり、IL-4 の直接的な刺激による IL-15 への感受性の向上が必要であったと考えられた。IL-15 は *trans*-presentation が行われるなど作用機序が複雑なサイトカインであり、IL-4 が IL-15 シグナルを増強するメカニズムについてはより詳細な解析を今後行っていく必要がある。

なお、サイトカインや Granzyme B の産生亢進や IL-18R α の発現低下など、高濃度で IL-15 が存在する *in vitro* の条件下でも IL-4 による作用が認められた変化については、IL-4 がより直接的かつ強力に NK 細胞に誘導する現象だと考えられ、IL-4 シグナルを受け取り十分に活性化した NK 細胞を区別する指標として有用であると思われた。

寄生虫感染時に IL4-NK 細胞の果たす生理的役割

Nb を用いた寄生虫感染実験によって、生理的な Th2 応答においても、IL4-NK 細胞と同じく B220^{high} /IL-18R α ^{low} /IL-4R α ^{high} /IL21R α ^{high} を示す NK 細胞が誘導されることが明らかになった。さらに、NK 細胞を除去したマウスに Nb を感染させた場合に、好酸球や好中球の浸潤に寄与する Eotaxin/ CCL11 や KC/ CXCL1 の遺伝子発現が亢進することが明らかになった。Nb 感染時、好酸球や好中球は組織に浸潤し、Th2 応答を増強することが報告されている (Hoeve et al., 2009; Chen et al. 2014)。IL4-NK 細胞はケモカインの産生を抑制することでこれらの細胞の浸潤をブロックし、過剰な Th2 応答の抑制や Th2 型炎症の終結に関与している可能性が示唆された。

IL4-NK 細胞による ILC2 抑制機構

近年 Th2 応答に関わる細胞として新たに Type-2 Innate lymphoid cells (ILC2) が同定され、注目を集めている (Moro et al., 2010). ILC2 は IL-13 や IL-5 などの産生能が非常に高く, Th2 応答の誘導に重要な役割を果たすことが次々に示されており, その機能や制御機構が盛んに研究されている (Moro et al., 2010). さらにごく最近, 寄生虫感染やぜんそくなどの Th2 応答において, ILC2 の過剰な活性化を抑制する因子として IFN- γ が重要な役割を果たすことが報告された (Moro et al., 2016). 本研究で報告した IL4-NK 細胞は, Th2 応答時に誘導される細胞でありながら高い IFN- γ 産生能を有することが示されており, IL4-NK 細胞による Th2 応答抑制機構の標的が ILC2 細胞であり, IFN- γ 産生を介して ILC2 の機能を抑制するメカニズムが存在する可能性は十分に考えられる. 今後は ILC2 との相互作用にも留意し, IL4-NK 細胞の生理的役割についての理解をより深めていくことが望まれる.

IL-4 と IL-13 の生理活性の違いと IL4-NK 細胞の関連性

IL-4 と IL-13 は共に Th2 応答の開始因子として重要なサイトカインであり, これらが惹起する Th2 応答によって Nb は排虫される (Maizels et al., 2009; Urban et al., 1998). IL-4 と IL-13 はレセプターの一部を共有しており, 様々な生理活性が共通している. しかし, IL-4 と IL-13 両方のシグナルが失われる IL-4R α 欠損マウスでは排虫が起こらないのに対し, IL-4 欠損マウスでは通常通り排虫が起こる (Barner et al., 1998; Lawrence et al., 1996). このことから, Nb の排虫には IL-4 よりも IL-13 が重要であると考えられている. 一方, 上述したように, IL-4C の投与が NK 細胞からの IFN- γ 産生を促すのに対し, IL-13 では同様の効果が得られないことが明らかになっている

(Morris et al., 2006). 興味深いことに, HTVi 法により IL-13 を過剰発現させても IL4-NK 細胞のような活性化 NK 細胞は誘導されず, *in vitro* で cNK 細胞を IL-13 で刺激しても IL-4 のような活性化作用は確認できなかった. これらを合わせて考えると, IL-4 に比べ IL-13 の方が Th2 応答を惹起する作用が強いのは, IL-4 だけが IL4-NK 細胞を誘導し, NK 細胞由来の IFN- γ 産生を増強する作用があるためではないかと考えられた. IL-13 に IL-4 の様な NK 細胞活性化作用がない理由については, NK 細胞が IL-13R α を発現しておらず, Type II レセプターを持たない可能性などが考えられるが, 現在までに具体的な知見は得られていない. 今後, NK 細胞への作用の違いやそれが生じる要因に着目することで, Th2 応答における IL-4 と IL-13 の生理的役割の違いがより詳細に解明されることが期待される.

NK1/NK2 パラダイムと IL4-NK 細胞との関連性

マクロファージにおける M1/ M2 細胞のように, NK 細胞においても NK1/NK2 パラダイムの存在が提唱されている. Peritt らは, ヒトの PBMC を IL-12 と抗 IL-4 抗体の存在下で培養すると IFN- γ や IL-10 の産生能が高い NK1 細胞が誘導され, IL-4 と抗 IL-12 抗体の存在下で培養すると IL-5 や IL-13 の産生能が高い NK2 細胞が誘導されることを報告した (Peritt D et al., 1998). さらに, Katsumoto らによってマウスにおいても同様に, NK1/ NK2 細胞が誘導可能であることが示された (Katsumoto T et al., 2004). 本研究で見出した IL4-NK 細胞と NK2 細胞は, 誘導に IL-4 が要する点で共通している. しかし, NK2 細胞の IFN- γ 産生や IL-12 への応答性が抑制されているのに対し, IL4-NK 細胞ではむしろ亢進されており, 機能面で両者は大きく異なっていた. 生理的意義の観点からも, NK2 細胞が Th2 応答を促進すると考えられるのに対し, IL4-NK 細

胞は過剰な Th2 応答を抑制することが示唆されている。こうした違いは、IL-4 の他に
関与する因子の違いを反映していると考えられ、IL-4 による NK 細胞の制御が非常に
複雑なことを示唆している。生体内での IL-4 の使い分けについては、状況に応じて IL-4
以外にどんな因子が作用するかに留意し、慎重に解析を進めていく必要がある。

IL4-NK 細胞のがん治療への応用可能性

IL4-NK 細胞は、cNK 細胞に比べ非常に高い Granzyme B 産生を示し、YAC-1 細胞
に対して強い細胞傷害活性を発揮した。これは、Th2 応答時に NK 細胞が細胞傷害活性
を発揮するメカニズムの存在を示唆している。生体はがんを排除するために Th1 応答を
惹起する。対して、がんは Th1 応答を抑制し Th2 応答優位にすることで、NK 細胞や
キラー T 細胞の機能抑制、M2 マクロファージを介した血管新生の亢進などを誘導し、
自身に有利な環境を形成する (Mantovani et al., 2002; Sredni et al., 1996)。しかし本研究か
ら、IL-4 は IL-15 と協調することで Th2 優位な条件下でも NK 細胞を活性化できるこ
とが明らかになった。これまでに、大腸がん細胞株 colon 26 細胞に IL-4 を発現させ
た場合に腫瘍形成能が低下することが報告されており、IL-4 が特定の条件下で抗腫瘍効
果を発揮することが示唆されている (Itsuki and Suzuki, 1996)。こうした IL-4 の抗腫瘍
効果が、IL4-NK 細胞の誘導によって発揮されている可能性は十分に考えられる。加え
て、本研究では IL-4 と IL-15 を用いることで *in vitro* で IL4-NK 細胞を誘導するこ
とに成功している。同様の培養系をヒトの末梢血由来の NK 細胞に適用することで、細胞
療法への応用を視野に入れた実践的な研究が可能になる。がんに対抗して Th1 応答を増
強させることを目指す従来のアプローチとは異なり、がんの形成した微小環境で NK 細
胞を活性化させるという、新基軸による治療法の開発が期待される。

第 5 章 結論

本研究では、IL-4 の過剰発現により誘導される NK 細胞として、IL4-NK 細胞を報告した (Fig 42)。IL4-NK 細胞は成熟途中の未成熟な NK 細胞ではなく、IL-4 により特殊な活性化が誘導された NK 細胞であると考えられた。IL4-NK 細胞の増殖、活性化には、IL-4 の直接的な作用とその下流で増強する IL-15 が重要であり、IL-4 によって IL-15 が増強する仕組みとして、IL-4 応答性に増殖した組織マクロファージを介する新たなメカニズムの存在を明らかにした。また、cNK 細胞を IL-4 と IL-15 を添加した条件で培養することで、*in vitro* で IL4-NK 細胞を誘導することに成功した。IL4-NK 細胞は高いサイトカイン産生能と細胞傷害活性を有しており、Th1 /Th2 応答のバランス制御に関わるとともに、Th2 応答時に高い抗腫瘍活性を発揮できる細胞であることが示唆された。さらに、生理的な Th2 応答である寄生虫感染によって、IL4-NK-like 細胞が IL-4 依存的に誘導されることを明らかになり、その生理的意義として好酸球や好中球といった Th2 応答誘導性の細胞の組織浸潤を防ぐことで、過剰な Th2 応答の抑制や Th2 型炎症の終結に関与する可能性が示された。本研究は IL-4 および NK 細胞のこれまで知られていなかった新しい機能や生理的役割を報告するものであり、Th2 応答に関わる疾患の発症メカニズム解明や新たながん治療法開発に至るまで、幅広い領域への貢献が期待される意義深いものである。

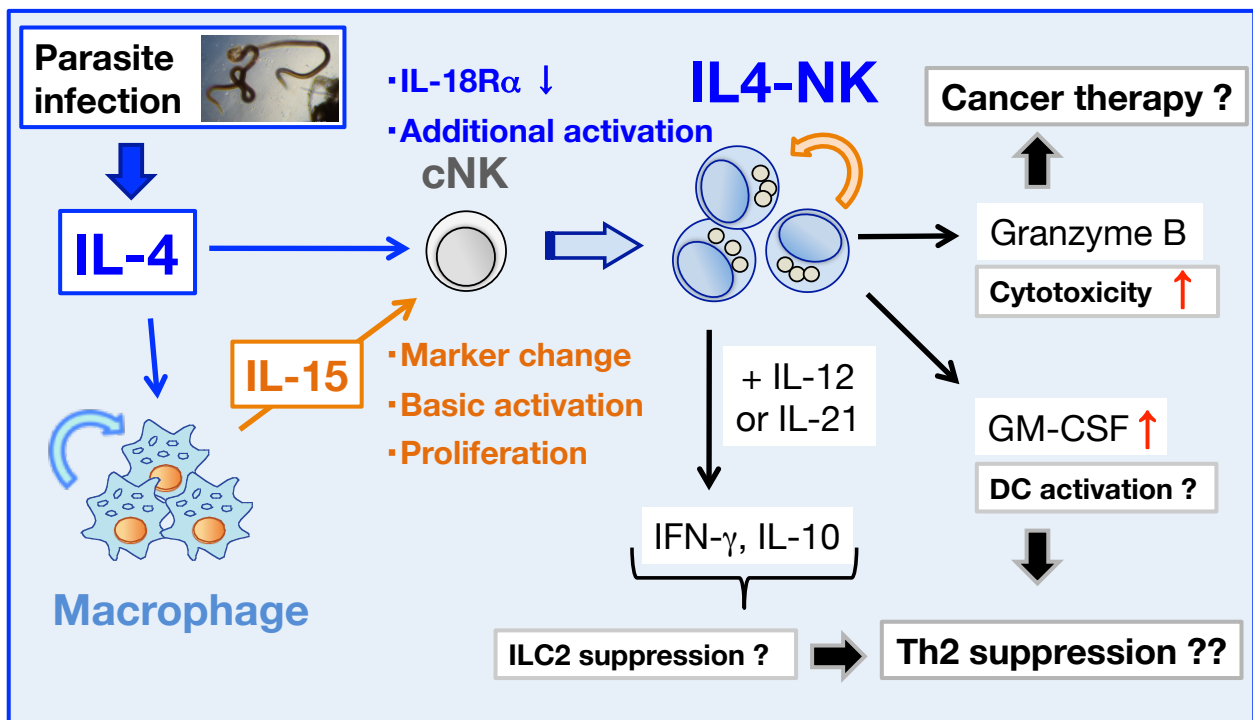


Figure 42. 本研究で明らかになったこと

本研究によって初めて明らかになった, IL-4 による NK 細胞の新規活性化メカニズムの概要, および想定される生理的役割や応用可能性を模式図で示す.

第 6 章 参考文献

Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787-793.

Arase, H., T. Saito, J.H. Phillips, and L.L. Lanier. 2001. Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b ($\alpha 2$ integrin, very late antigen-2) . *The Journal of Immunology* 167:1141-1144.

Backström, E., K. Kristensson, and H.G. Ljunggren. 2004. Activation of natural killer cells: underlying molecular mechanisms revealed. *Scandinavian journal of immunology* 60:14-22.

Bajénoff, M., B. Breart, A.Y. Huang, H. Qi, J. Cazareth, V.M. Braud, R.N. Germain, and N. Glaichenhaus. 2006. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *The Journal of experimental medicine* 203:619-631.

Barner, M., M. Mohrs, F. Brombacher, and M. Kopf. 1998. Differences between IL-4R α -deficient and IL-4-deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses. *Current Biology* 8:669-672.

Brady, J., S. Carotta, R.P. Thong, C.J. Chan, Y. Hayakawa, M.J. Smyth, and S.L. Nutt. 2010. The interactions of multiple cytokines control NK cell maturation. *The Journal of Immunology* 185:6679-6688.

- Bream, J.H., R.E. Curiel, C.-R. Yu, C.E. Egwuagu, M.J. Grusby, T.M. Aune, and H.A. Young. 2003. IL-4 synergistically enhances both IL-2–and IL-12–induced IFN- γ expression in murine NK cells. *Blood* 102:207-214.
- Burkett, P.R., R. Koka, M. Chien, S. Chai, D.L. Boone, and A. Ma. 2004. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL) -15 α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8 $^{+}$ T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine* 200:825-834.
- Chen F, Wu W, Millman A, Craft JF, Chen E, Patel N, Boucher JL, Urban JF Jr, Kim CC, Gause WC. 2014. Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. *Nature immunology*.15(10):938-946
- Chiossone, L., J. Chaix, N. Fuseri, C. Roth, E. Vivier, and T. Walzer. 2009. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* 113:5488-5496.
- Gays, F., K. Martin, R. Kenefeck, J.G. Aust, and C.G. Brooks. 2005. Multiple cytokines regulate the NK gene complex-encoded receptor repertoire of mature NK cells and T cells. *The Journal of Immunology* 175:2938-2947.
- Gordon, S., and F.O. Martinez. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32:593-604.
- Hayakawa, Y., and M.J. Smyth. 2006. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *The Journal of Immunology* 176:1517-1524.

Hochrein, H., M. O'Keeffe, T. Luft, S. Vandenabeele, R.J. Grumont, E. Maraskovsky, and K.

Shortman. 2000. Interleukin (IL) -4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 192:823-834.

Hoeve MA, Mylonas KJ, Fairlie-Clarke KJ, Mahajan SM, Allen JE, Graham AL.2009.

Plasmodium chabaudi limits early *Nippostrongylus brasiliensis*-induced pulmonary immune activation and Th2 polarization in co-infected mice. *BMC immunology*.10(1):60

Huntington, N.D., H. Tabarias, K. Fairfax, J. Brady, Y. Hayakawa, M.A. Degli-Esposti, M.J.

Smyth, D.M. Tarlinton, and S.L. Nutt. 2007. NK cell maturation and peripheral homeostasis is associated with KLRG1 up-regulation. *Journal of immunology* 178:4764-4770.

Itsuki, Y., and S. Suzuki. 1996. Expression of interleukin-4 in colon 26 cells induces both eosinophil mediated local tumor killing and T-cell mediated systemic immunity in vivo. *日本医科大学雑誌* 63:275-285.

Jackson, R.J., A.J. Ramsay, C.D. Christensen, S. Beaton, D.F. Hall, and I.A. Ramshaw. 2001.

Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox. *Journal of virology* 75:1205-1210.

Jenkins, S.J., D. Ruckerl, P.C. Cook, L.H. Jones, F.D. Finkelman, N. van Rooijen, A.S.

MacDonald, and J.E. Allen. 2011. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 332:1284-1288.

Jenkins, S.J., D. Ruckerl, G.D. Thomas, J.P. Hewitson, S. Duncan, F. Brombacher, R.M. Maizels, D.A. Hume, and J.E. Allen. 2013. IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *The Journal of experimental medicine* 210:2477-2491.

Katsumoto T, Kimura M, Yamashita M, Hosokawa H, Hashimoto K, Hasegawa A, Omori M, Miyamoto T, Taniguchi M, Nakayama T. 2004. STAT6-dependent differentiation and production of IL-5 and IL-13 in murine NK2 cells. *J Immunology*. 173(8):4967-75.

Kidd, P. 2003. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative Medicine Review* 8:223-246.

Kitajima, M., T. Ito, D.J. Tumes, Y. Endo, A. Onodera, K. Hashimoto, S. Motohashi, M.

Yamashita, T. Nishimura, and S.F. Ziegler. 2011. Memory type 2 helper T cells induce long-lasting antitumor immunity by activating natural killer cells. *Cancer research* 71:4790-4798.

Kosaka, S., H. Tamauchi, M. Terashima, H. Maruyama, S. Habu, and H. Kitasato. 2011. IL-10 controls Th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunobiology* 216:811-820.

- Lanier, L.L. 2003. Natural killer cell receptor signaling. *Current opinion in immunology* 15:308-314.
- Lawrence, R.A., C.A. Gray, J. Osborne, and R.M. Maizels. 1996. Nippostrongylus brasiliensis: cytokine responses and nematode expulsion in normal and IL-4-deficient mice. *Experimental parasitology* 84:65-73.
- Lebrec, H., M.J. Horner, K.S. Gorski, W. Tsuji, D. Xia, W.-J. Pan, G. Means, G. Pietz, N. Li, and M. Retter. 2013. Homeostasis of human NK cells is not IL-15 dependent. *The Journal of Immunology* 191:5551-5558.
- Liu, F., Y. Song, and D. Liu. 1999. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene therapy* 6:1258-1266.
- Lünemann, A., J.D. Lünemann, and C. Münz. 2009. Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. *Molecular medicine* 15:352.
- Macatonia, S.E., N.A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C.-S. Hsieh, J.A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K.M. Murphy, and A. O'Garra. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *The Journal of Immunology* 154:5071-5079.
- Maggi, E. 1998. The TH1/TH2 paradigm in allergy. *Immunotechnology* 3:233-244.

Maizels, R.M., E.J. Pearce, D. Artis, M. Yazdanbakhsh, and T.A. Wynn. 2009. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *The Journal of experimental medicine* 206:2059-2066.

Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, and A. Sica. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology* 23:549-555.

Marcenaro, E., M. Della Chiesa, F. Bellora, S. Parolini, R. Millo, L. Moretta, and A. Moretta. 2005. IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *The Journal of Immunology* 174:3992-3998.

Martinez, F.O., and S. Gordon. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* 6:

Moro K, Kabata H, Tanabe M, Koga S, Takeno N, Mochizuki M, Fukunaga K, Asano K, Betsuyaku T, Koyasu S. 2016. Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. *Nature Immunol.* 17(1):76-86.

Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S. 2010. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature.* 28;463(7280):540-4.

Morris, S.C., T. Orekhova, M.J. Meadows, S.M. Heidorn, J. Yang, and F.D. Finkelman. 2006.

IL-4 induces in vivo production of IFN- γ by NK and NKT cells. *The Journal of Immunology* 176:5299-5305.

Mosmann, T., and R. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine

secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* 7:145-173.

Okamura, H., S.-i. Kashiwamura, H. Tsutsui, T. Yoshimoto, and K. Nakanishi. 1998. Regulation

of interferon- γ production by IL-12 and IL-18. *Current opinion in immunology* 10:259-264.

Okazaki, K., K. Uchida, M. Ohana, H. Nakase, S. Uose, M. Inai, Y. Matsushima, K. Katamura, K.

Ohmori, and T. Chiba. 2000. Autoimmune-related pancreatitis is associated with autoantibodies and a Th1/Th2-type cellular immune response. *Gastroenterology* 118:573-581.

Omi, A., Y. Enomoto, T. Kaniwa, N. Miyata, and A. Miyajima. 2014. Mature resting Ly6Chigh

natural killer cells can be reactivated by IL-15. *European journal of immunology* 44:2638-2647.

Oriss, T.B., S.A. McCarthy, B.F. Morel, M. Campana, and P.A. Morel. 1997. Crossregulation

between T helper cell (Th) 1 and Th2: inhibition of Th2 proliferation by IFN-gamma involves interference with IL-1. *The Journal of immunology* 158:3666-3672.

- Parronchi, P., M. De Carli, R. Manetti, C. Simonelli, S. Sampognaro, M. Piccinni, D. Macchia, E. Maggi, G. Del Prete, and S. Romagnani. 1992. IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *The Journal of Immunology* 149:2977-2983.
- Sabat, R., G. Grütz, K. Warszawska, S. Kirsch, E. Witte, K. Wolk, and J. Geginat. 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine & growth factor reviews* 21:331-344.
- Schoenborn, J.R., and C.B. Wilson. 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology* 96:41-101.
- Sica, A., and A. Mantovani. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation* 122:787-795.
- Sredni, B., T. Tichler, A. Shani, R. Catane, B. Kaufman, G. Strassmann, M. Albeck, and Y. Kalechman. 1996. Predominance of Th1 response in tumor-bearing mice and cancer patients treated with AS 101. *Journal of the National Cancer Institute* 88:1276-1284.
- Stonier, S.W., and K.S. Schluns. 2010. Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunology letters* 127:85-92.
- Sun, J.C., and L.L. Lanier. 2011. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells. *Nature Reviews Immunology* 11:645-657.

- Szabo, S.J., A.S. Dighe, U. Gubler, and K.M. Murphy. 1997. Regulation of the interleukin (IL) -12R β 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *The Journal of experimental medicine* 185:817-824.
- Takeda, K., E. Cretney, Y. Hayakawa, T. Ota, H. Akiba, K. Ogasawara, H. Yagita, K. Kinoshita, K. Okumura, and M.J. Smyth. 2005. TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood* 105:2082-2089.
- Urban, J.F., N. Noben-Trauth, D.D. Donaldson, K.B. Madden, S.C. Morris, M. Collins, and F.D. Finkelman. 1998. IL-13, IL-4R α , and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* 8:255-264.
- Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini. 2008. Functions of natural killer cells. *Nature immunology* 9:503-510.
- Vosshenrich, C.A., S. Lesjean-Pottier, M. Hasan, O. Richard-Le Goff, E. Corcuff, O. Mandelboim, and J.P. Di Santo. 2007. CD11cI α B220+ interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* 204:2569-2578.
- Vosshenrich, C.A., T. Ranson, S.I. Samson, E. Corcuff, F. Colucci, E.E. Rosmaraki, and J.P. Di Santo. 2005. Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *Journal of immunology* 174:1213-1221.

謝辞

本研究は、東京大学分子細胞生物学研究所 発生・再生研究分野において、
宮島 篤教授のご指導のもと行われました。的確なご指導と惜しみないご尽力を頂いた
宮島 篤教授に深く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、直接ご指導くださった榎本 豊助教には大変お世話になりました。
ご教授くださった全てに心から感謝いたします。

折りに触れ、的確なアドバイスと励ましのお言葉をくださった田中 稔准教授、
伊藤 暢准教授ご両名に心より御礼申し上げます。

セルソーターのオペレーターとして大変力になってくださった宮田 奈保子さん、
マウスの管理にご尽力くださった今泉 典子さん、丸山 亮史さんに感謝いたします。

卒業された諸先輩方を含め、お世話になった研究室の皆様全員に感謝いたします。

最後に、長年に渡り私を信じ、応援し続けてくれた両親と祖母に深く感謝いたします。