

学位論文

IL-15 による Ly6C^{high}NK 細胞の再活性化

Ly6C^{high} natural killer cells can be reactivated by IL-15

平成 25 年 12 月 博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

尾見 歩惟

目次

要旨 (Abstract)	2
第一章 序論	6
第二章 材料と方法	1 5
第三章 結果	2 1
第四章 考察	5 5
第五章 結論	6 3
謝辞	6 4
参考文献	6 5

Abstract

Natural killer 細胞（NK 細胞）は、抗腫瘍・抗ウイルス反応を増強する IFN- γ 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。近年、NK 細胞には様々なサブセットが存在することが明らかになってきたが、個々のサブセットの機能には不明な点が多い。本研究では、マウス成熟 NK 細胞集団が Ly6C の発現量により、Ly6C^{low} NK 細胞と Ly6C^{high} NK 細胞の分画に分かれることを見だし、それら細胞集団について詳細に解析した。

移植実験から Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞から生じることが明らかとなった。また、成熟した NK 細胞は、活性化により IFN- γ を産生すると共に、脱顆粒し granzyme B を放出することで標的細胞を傷害するが、Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞よりも IFN- γ や granzyme B の産生量、および脱顆粒マーカーである CD107a の発現量が低いことが分かった。さらに、NK 細胞の生存や増殖を促進するサイトカインである IL-15 存在下で増殖能を測定したところ、Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞よりも増殖能が低いことを見出した。以上により、Ly6C^{high} NK 細胞は休眠状態にある成熟 NK 細胞であると考えられる。

一般的に、分化した細胞はその状態が保たれるが、興味深いことに、Ly6C^{high} NK 細胞を IL-15 存在下で培養すると、Ly6C^{low} NK 細胞へと変化し、IFN- γ および granzyme B の産生

量が Ly6C^{low} NK 細胞と同程度にまで上昇した。さらに、IL-15 を強制発現させたマウス体内においても $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞へと変化した。また、ウイルス感染を模倣したマウスにおいては IL-15 の産生量が上昇し、 $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ NK 細胞が Ly6C^{low} NK 細胞へと変化した。以上の結果は、休眠状態の $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ NK 細胞はウイルス感染時に活性の高い NK 細胞へ変化する可塑性を持った細胞であることを示唆している。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にしたものである。

Abstract

NK cells are cytolytic and cytokine-producing effector cells that play crucial roles in the clearance of tumors and virus-infected cells. NK cells are classified into distinct populations according to the differentiation stages, but the roles of the each cell population and the factors that regulate the development and homeostasis of NK cells are unclear. In this study, I reveal that mouse mature NK cells (NK1.1⁺CD11b⁺CD3e⁻) in the spleen are subdivided into two populations based on the expression level of Ly6C, i.e. Ly6C^{low} and Ly6C^{high} subsets. Ly6C^{high} NK cells are in an inert state as evidenced by the production of lower levels of IFN- γ and cytotoxic granules than those of Ly6C^{low} NK cell. Moreover, the proliferative potential of Ly6C^{high} NK cells is lower than that of Ly6C^{low} NK cells when cultured with IL-15. I further found that Ly6C^{high} NK cells are derived from Ly6C^{low} NK cells by adoptive transfer experiments. These results strongly suggest that Ly6C^{high} NK cells are resting cells in the steady state.

However, Ly6C^{high} NK cells are reverted *in vitro* by IL-15 to Ly6C^{low} NK cells with strong effector functions. Moreover, Ly6C^{high} NK cells also revert to Ly6C^{low} NK cells *in vivo* by injection of IL-15 inducers, poly I:C and CpG. Taken together, these

results suggest the plasticity of mature NK cells, i.e., Ly6C^{high} NK cells are mature resting cells derived from Ly6C^{low} NK cells in the steady state and can be reactivated by IL-15. This study is the first to demonstrate the plasticity of more mature and resting NK cells in the mouse immune system.

第一章 序論

NK 細胞は腫瘍やウイルス感染に対する初期免疫反応に貢献する

高等動物が持つ免疫系は、自然免疫系と獲得免疫系に大別される (Medzhitov, 2001)。自然免疫系とは感染開始時から機能する生体防御機構であり、特定の病原体に対する特異性はない。傷口から病原体が侵入したり、汚染された空気や食物を体内に取り込んだりしても、大抵の場合は発症までには至らず、病原体は数日で排除される。これは、自然免疫系の働きによるものである。一方、獲得免疫系は病原体の侵入が自然免疫系では防げなかった場合、自然免疫系に続いて惹起される反応である。自然免疫系との最も重要な相違点は、抗原特異性の有無である。獲得免疫系において中心的な役割を担う T 細胞や B 細胞は、ランダムな遺伝子再構成を経た多様な受容体を持つ。樹状細胞に代表される抗原提示細胞により提示された抗原を認識する細胞のみが増殖、活性化されるため、抗原特異的な免疫反応を起こすことができるのである。

ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) は、T 細胞や B 細胞に次ぐ第三のリンパ球であり (図 1-1)、抗原提示なしに標的細胞を傷害 (natural killing) できる細胞として発見された (Sun and Lanier, 2011; Vivier et al., 2008)。T 細胞や B 細胞の様に抗原特異的な受容体を持たず、免疫応答の初期から働くことから、自然免疫系の細胞に分類される (図 1-1) (Sun and

Lanier, 2011; Vivier et al., 2008)。リンパ器官、非リンパ器官に関わらず、体内の様々な部位に存在し、腫瘍細胞やウイルス感染細胞に対して傷害性を示す (Cerwenka and Lanier, 2001; Vivier et al., 2008; Yokoyama and Plougastel, 2003)。また、NK 細胞は IFN- γ の主な産生源である (Cerwenka and Lanier, 2001; Vivier et al., 2008; Yokoyama and Plougastel, 2003)。IFN- γ は自然免疫担当細胞であるマクロファージや樹状細胞を活性化し、T 細胞の活性化を補助する分子の産生を促進する。それにより、後続く獲得免疫系が惹起される。

NK 細胞による抗原認識のシステム

NK 細胞は、細胞膜表面に発現する多数の受容体を用いた、T 細胞や B 細胞とは異なる独自のシステムで標的細胞を認識している (Cerwenka and Lanier, 2001; Lanier, 2005; Sun and Lanier, 2011; Yokoyama and Plougastel, 2003)。NK 細胞に発現する受容体は、活性化受容体と抑制性受容体に大別される (図 1-2)。活性化受容体は腫瘍細胞やウイルス感染細胞上に発現する糖鎖やタンパク質を認識し、細胞傷害や IFN- γ などのサイトカインの産生を誘導する。一方、抑制性受容体は自身の MHC クラス I 分子等を認識し、細胞傷害やサイトカイン産生を抑制する。これは、自身の正常な細胞を傷害しないための仕組みである。MHC クラス I 分子の発現低下はガン化やウイルス感染でしばしば見られる現象であり、NK 細胞はその様な細胞に対して攻撃するように制御されている。

NK 細胞は脱顆粒して標的細胞のアポトーシスを誘導する

NK 細胞は細胞傷害性顆粒を含む良く発達した大きな細胞質を持つ。標的細胞を認識して活性化した NK 細胞は、脱顆粒して perforin や granzyme B というタンパク質を放出する (Andrade et al., 1998; Russell and Ley, 2002)。perforin は標的細胞膜上で孔を形成し、granzyme B の標的細胞膜内への流入を促進する。セリンプロテアーゼである granzyme B は caspase を切断、活性化し、標的細胞のアポトーシスを誘導する。*in vitro* において、NK 細胞は炎症性サイトカインがなくとも、受容体を介して標的細胞を認識すれば傷害することができる。生体内では、感染などが起こると、自然免疫担当細胞であるマクロファージや樹状細胞から炎症性サイトカイン (I 型 IFN や IL-12、IL-18 など) が分泌される。NK 細胞はそれらに応答して強く活性化し、細胞傷害能も大きく上昇する (Vivier et al., 2008)。

NK 細胞の分化・成熟

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 (Kim et al., 2002; Yokoyama et al., 2004)。胎仔胸腺、胎仔肝臓中に T/NK 細胞共通前駆体が存在することから、T 細胞の近縁と考えられている (図 1-1) (Douagi et al., 2002; Michie et al., 2000)。

NK 細胞の前駆細胞は、IL-2 や IL-15 の受容体のサブユニットの一つである CD122 を発現するようになる (Kim et al., 2002; Yokoyama et al., 2004)。次いで NK 前駆細胞は、未熟

NK 細胞へと分化し、NK 細胞の主要な表面マーカーである NK1.1 や NKG2 ファミリー分子群および Ly49 ファミリー分子群を発現するようになる (Kim et al., 2002; Yokoyama et al., 2004)。NKG2 ファミリー分子群や Ly49 ファミリー分子群は NK 細胞の活性化受容体あるいは抑制性受容体として働く。最終的には CD11b の高発現と共に、perforin および granzyme B 経路による細胞傷害性、サイトカイン産生能を有する、成熟した NK 細胞に分化する (Kim et al., 2002; Yokoyama et al., 2004)。このように、NK 細胞は発生段階の違いにより、様々な表面マーカーの発現パターンを示す (図 1-3)。

CD122 を発現する NK 前駆細胞は、IL-15 存在下で培養すると機能的な NK 細胞へと分化する (Ogasawara et al., 1998)。また、IL-15 受容体のノックアウトマウスおよび IL-15 のノックアウトマウス、さらに IL-15 の転写を制御する IRF-1 のノックアウトマウスでは NK 細胞数が著しく減少し、細胞傷害能も顕著に低下する (Kennedy et al., 2000; Lodolce et al., 1998; Ogasawara et al., 1998)。これらの事実から、IL-15 が NK 細胞の分化、維持に非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。

ヒト成熟 NK 細胞におけるサブセット

成熟 NK 細胞は、かつて、抗原提示なしに標的細胞を傷害することのできる単一な集団であると考えられてきた (Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975; Strowig et al.,

2008)。しかし 1980 年代初期に、末梢血におけるヒト成熟 NK 細胞は CD56 の発現により CD56^{bright} NK 細胞と CD56^{dim} NK 細胞の二つのサブセットに分けられることが明らかにされた (Lanier et al., 1983)。各サブセットはそれぞれ異なった機能を持っており、CD56^{bright} NK 細胞は主にサイトカインを産生する役割を、CD56^{dim} NK 細胞は主に標的細胞を傷害する役割を担っている。さらに、CD56^{dim} NK 細胞は CD56^{bright} NK 細胞から分化することも明らかとなっている (Cooper et al., 2001; Frey et al., 1998; Jacobs et al., 2001)。

マウス成熟 NK 細胞におけるサブセット

CD56 はマウスでは発現していないため、マウス成熟 NK 細胞におけるサブセットは長らく同定されていなかった。しかし近年、マウス成熟 NK 細胞もいくつかのマーカーによって二つのサブセットに分けられることが明らかになった (Hayakawa and Smyth, 2006; Huntington et al., 2007; Yu et al., 2009)。なかでも CD27 を用いたサブセット解析がいくつか行われており、CD11b⁺CD27^{high} NK 細胞は CD11b⁺CD27^{low} NK 細胞よりも IFN- γ 産生と細胞傷害性が高いことが明らかになっている (Hayakawa and Smyth, 2006)。さらに、CD11b⁺CD27^{low} NK 細胞は CD11b⁺CD27^{high} NK 細胞から分化することも明らかとなっている (Chiossone et al., 2009; Hayakawa and Smyth, 2006)。しかしながら、ヒト成熟 NK 細胞の様に各サブセットの機能的な違いは見いだされていない。

本研究では、マウスの成熟 NK 細胞 (NK1.1⁺CD11b⁺CD3e⁻) が Ly6C の発現によって、Ly6C^{low} NK 細胞と Ly6C^{high} NK 細胞の二つのサブセットに分かれることを見いだした。

Ly6C は Ly6 スーパーファミリーのメンバーで、GPI アンカー型細胞表面抗原である (Bamezai, 2004)。主にリンパ球、単球／マクロファージ、顆粒球、内皮細胞に発現しており、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 (Hanninen et al., 2011; Juttila et al., 1994; Juttila et al., 1988)。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 (Hanninen et al., 2011; Sun and Lanier, 2011; Walunas et al., 1995)。一方、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いない (Sato et al., 1996)。本研究では、Ly6C^{low} NK 細胞と Ly6C^{high} NK 細胞の生体内における分布や表面マーカーの発現の違い、NK 活性、そして増殖能に差があることを見いだした。さらに、両者の成熟段階に違いがあることや、サイトカイン刺激によって可塑性を示すことを明らかにした。

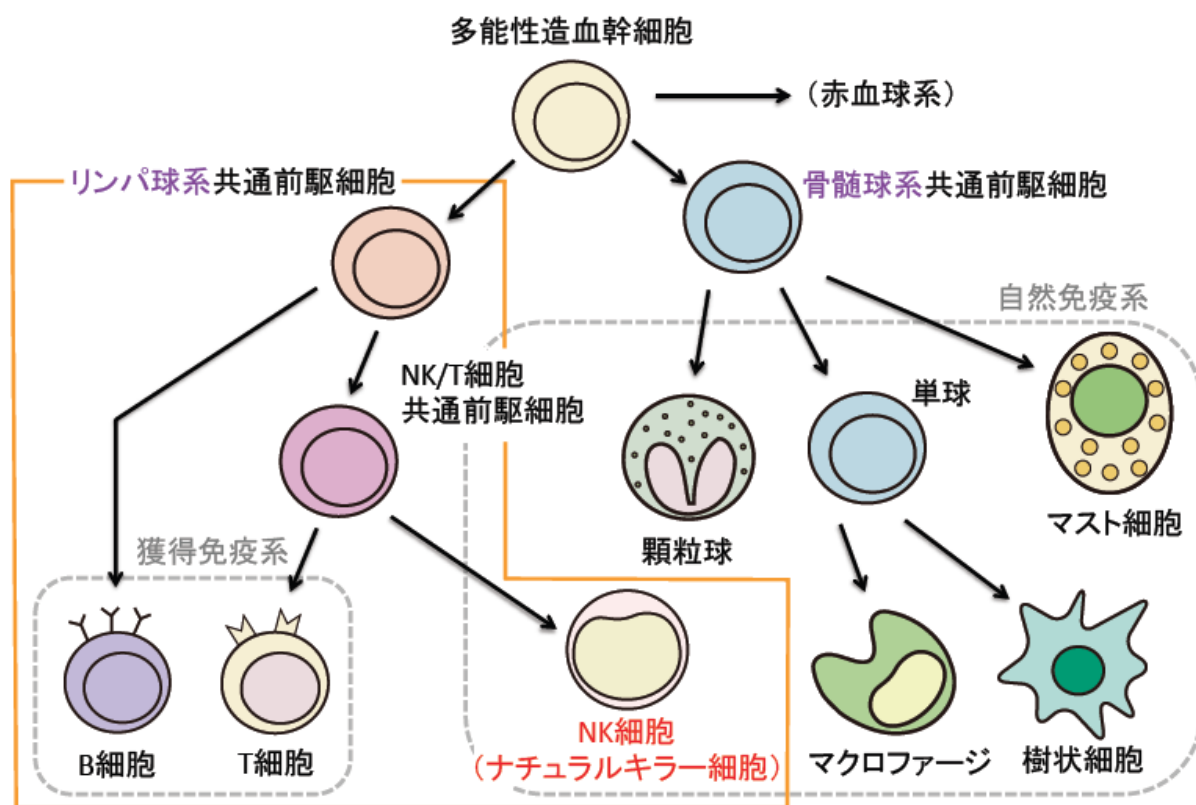


図 1-1 NK 細胞とその他免疫細胞との関係

NK 細胞は T 細胞や B 細胞に次ぐ第三のリンパ球であり、T 細胞の近縁である。T 細胞や B 細胞の様に抗原特異的な受容体を持たず、免疫応答の初期から働くことから、自然免疫系の細胞に分類される。

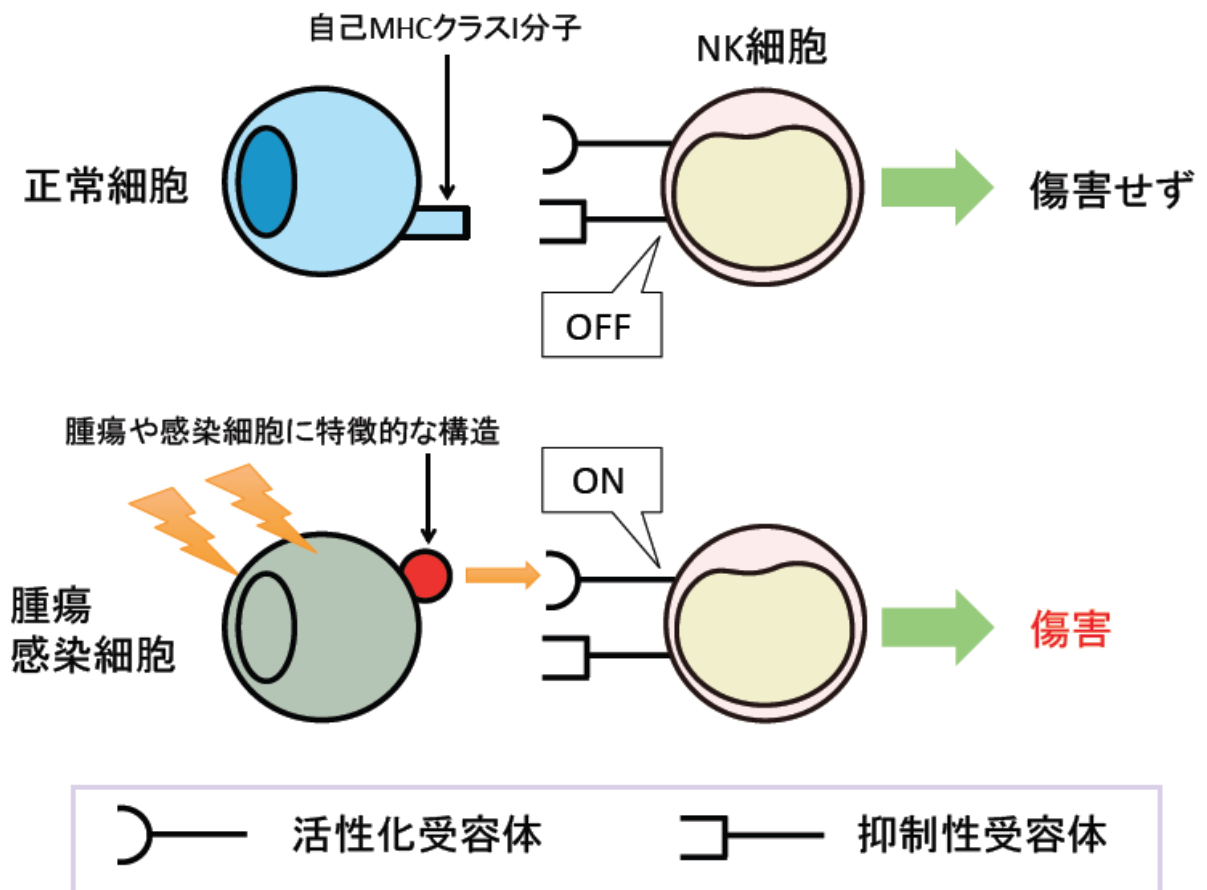


図 1-2 NK 細胞による抗原認識のシステム

NK 細胞に発現する受容体は、活性化受容体と抑制性受容体に大別される。活性化受容体は腫瘍細胞やウイルス感染細胞上に発現する糖鎖やタンパク質を認識し、細胞傷害や IFN- γ などのサイトカインの産生を誘導する。一方、抑制性受容体は自身の MHC クラス I 分子等を認識し、細胞傷害やサイトカイン産生を抑制する。




	NK 前駆細胞	未熟 NK 細胞	成熟 NK 細胞	
				
ステージ	1	2	3	4
CD122	+	+	+	+
NK1.1	-	+	+	+
NKG2	-	+	+	+
Ly49	-	-	+	+
CD11b	-	-	-	+

図 1-3 NK 細胞の成熟・分化

NK 細胞は発生段階の違いにより、様々な表面マーカーの発現パターンを示す。まず NK 細胞の前駆細胞は CD122 を発現するようになる。次いで NK 前駆細胞は、未熟 NK 細胞へと分化し、NK 細胞の主要な表面マーカーである NK1.1 や NKG2 ファミリー分子群および Ly49 ファミリー分子群を発現するようになる。最終的には CD11b の高発現と共に成熟した NK 細胞に分化する。

第二章 材料と方法

マウス

C57BL/6J-Ly-5.2 マウスは日本クレア株式会社より購入した。C57BL/6J-Ly-5.1 マウス (RBRC 00144) は理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。実験に用いたマウスは SPF 環境下にて維持し、10～14 週齢を用いた。本研究は、東京大学の実験動物指針に基づいて実験を行った。

フローサイトメトリー解析およびセルソーティング

各器官・組織より回収した血球を溶血させた後、非特異的に抗体が反応するのを防ぐ為に Fc γ receptor (FcR, 2.4G2) にて 10 分間氷上でブロッキングを行った。次に一次抗体およびアイソタイプコントロールを 20 分間氷上で反応させた。一次抗体は以下の通りである。fluorescein isothiocyanate (FITC) を結合した抗体は、抗 CD11b 抗体である。brilliant violet 421 を結合した抗体は、抗 CD3e 抗体である。PE を結合した抗体は、抗 Fc ϵ R1 α 抗体、抗 KLRG1 抗体、抗 Ly49H 抗体、抗 Ly49D 抗体、抗 LY49A 抗体、抗 NKG2A 抗体、抗 CD45.1 抗体、抗 CD45.2 抗体である。PE/Cy7 を結合した抗体は、抗 Ly6C 抗体である。biotin を結合した抗体は、抗 CD49b 抗体、抗 CD27 抗体、抗 NKp46 抗体、抗 Ly108 抗体、抗 NKG2D

抗体である。これらの抗体は BioLegend 社より購入した。また、PE を結合した抗 CD3e 抗体、抗 Ly49C/I 抗体、Ly49F 抗体、および biotin を結合した抗 NK1.1 抗体は BD Pharmingen 社より購入した。一次抗体反応後、二次抗体を 20 分間氷上で反応させた。二次抗体には APC が結合した streptavidin を用いており、BioLegend 社より購入した。細胞染色後、fluorescence-activated cell sorter Canto II (BD Biosciences) と FlowJo 8.8.7 ソフトウェア (TreeStar, Ashland) を用いてフローサイトメトリー解析を行った。セルソーティングは MoFlo (Beckman Coulter) にて行った。

細胞培養と細胞増殖測定

C57BL/6J-Ly-5.2マウスの脾臓からセルソーティングにてNK細胞分取し、10% FBS、2-ME (50 μ M)、HEPES (20 mM)、nonessential AA、sodium pyruvate、L-Gln、gentamycinを含むRPMI-1640 mediumにて培養した。*in vitro*における絶対細胞数の測定では、分取した 3×10^5 個の細胞をIL-15 (100 ng/ml, eBioscience) 存在下で培養し、6 日後に0.4% trypan blueを用いて生細胞数をカウントした。測定はtriplicateで行った。

ELISA

C57BL/6J-Ly-5.2マウスの脾臓からセルソーティングにてNK細胞を分取し、IL-12（100 ng/ml, PeproTech）、あるいはIL-18（100 ng/ml, MBL）で24時間刺激した。刺激している間にNK細胞が死ぬのを防ぐ為に、全てのwellにIL-2（100 ng/ml, PROSPEC）を加えた。

ELISAキットは、IFN- γ （BD Biosciences）とgranzyme B（R & D）を用い、付属の説明書に従って行った。解析はtriplicateで行った。

CD107a 陽性細胞の解析

C57BL/6J-Ly-5.2マウスの脾臓より血球を採取し、CD49b⁺の分画を磁気細胞分離装置（MACS, Miltenyi Biotec）を用いて分取した。分取した細胞はIL-18（100 ng/ml）で刺激した。刺激している間にNK細胞が死ぬのを防ぐ為に、IL-2（100 ng/ml）を加えた。16時間培養後、CD11b, CD49b, CD3e, Ly6Cで染色し、effector target比1:1でYAC-1（RCB1165, 文部科学省ナショナルリソースプロジェクトを介して理研BRCから提供された）と5時間共培養した。共培養はIL-18（100 ng/ml）およびIL-2（100 ng/ml）存在下で行った。また、脱顆粒した細胞を検出するためにCD107a抗体（PE, BioLegend）を加えた。共培養開始から1時間後、monensin solution（10 μ M, BioLegend）を加え、残り4時間共培養した。共培養後、

CD11b⁺CD49b⁺CD3e⁻ Ly6C^{low} もしくはLy6C^{high} NK細胞におけるCD107a陽性細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析した。

細胞移植実験

C57BL/6J-Ly-5.2マウス (CD45.2⁺) の脾臓からセルソーティングにてNK細胞を分取し、各サブセット $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個の細胞をC57BL/6J-Ly-5.1マウス (CD45.1⁺) 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より血球を回収し、CD45.2⁺の細胞をフローサイトメトリーにて解析した。また、レシピエントマウスにIL-15を強制発現させた実験、およびpoly I:C (100 μ g, InvivoGen)、CpG (20 nmol, Hycult Biotech) を腹腔内に投与した実験では、移植後4日でフローサイトメトリーにて解析した。

IL-15強制発現マウス (hydrodynamic tail vein injection method)

マウス IL-15 の cDNA は以下のプライマーを用いてPCRにて増幅した。
5'-gcgctagccaccatgaaaattttgaaaccatatatgag-3'、5'-cgctcgagtcaggacgtgttgatgaaca-3'
増幅後、NheIとXhoIサイトで切断し、pLIVE vector (Mirus, Madison, WI)に挿入した。
pLIVE-IL-15 (20 ng)は2 mlのTransIT-EE Hydrodynamic Delivery Solution (Mirus, Madison, WI)で希釈し、C57BL/6J-Ly-5.1マウスに尾静脈より投与した (Wooddell et al.,

2008; Zhang et al., 1999)。コントロールにはpLIVE-SEAP (secreted alkaline phosphatase) (20 µg)を用いた。

Real-time RT PCR

PBS、poly I:C (100 µg) もしくはCpG (20 nmol) をC57BL/6J-Ly-5.2マウスの腹腔内に投与し、3時間後に脾臓の血球を回収した。Total RNAはRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio Ink) を用いて逆転写した。Real-time RT-PCRはSYBR premix Ex Taq reagent (Takara Bio Ink) およびLightCycler 480 (Roche Applied Science) を用いて行った。遺伝子の発現量は、HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) の発現を除算した後に、相対的発現量としてグラフ化した。プライマー配列は以下の通り。

IL-15 ; 5'-tctcgtgctactgtgtttccttc-3' 、 5'-catctatccagttggcctctgtt-3'

HPRT ; 5'-tgacactggtaaaacaatgc-3' 、 5'-tatccaacacttcgagaggt-3'

統計解析

データは平均値とSEM で示している。統計的有意差は、各器官・組織におけるNK細胞サブセットの分布ではone-way ANOVA methodで検定を行った後、Tukey's testを行った。そ

の他はStudent's t testで検定を行った。 $P<0.05$ で有意差があると見なした。統計解析はGraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いて行った。

第三章 結果

マウス成熟NK細胞におけるLy6Cの発現

C57BL/6J-Ly-5.2マウスの脾臓より血球を採取し、成熟NK細胞 ($CD11b^+ NK1.1^+ CD3e^-$) 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 ($Ly6C^{low}$ NK細胞および $Ly6C^{high}$ NK細胞) (図2-1-1)。次に、脾臓以外での組織・器官においても成熟NK細胞が $Ly6C^{high}$ NK細胞および $Ly6C^{low}$ NK細胞の二つのサブセットに分かれるかどうかを調べた。骨髄、肝臓、肺、末梢血、リンパ節にて同様に解析した結果、全ての組織・器官に $Ly6C^{low}$ NK細胞および $Ly6C^{high}$ NK細胞が存在することが判明した (図2-1-2 A)。しかしながら、NK細胞発生場である骨髄に存在する $Ly6C^{high}$ NK細胞の割合は、他の組織・器官における存在比率と比較すると著しく低いことも明らかとなった (図2-1-2 A, B)。また、骨髄ほどではないものの、リンパ節においても $Ly6C^{high}$ NK細胞の割合が低いことが分かった (図2-1-2 A, B)。リンパ節は、免疫細胞の成熟場としての役割を持つ (Junt et al., 2008)。これらの結果は $Ly6C^{high}$ NK細胞が主に末梢の組織・器官に存在することを示している。

Ly6C^{low} NK細胞およびLy6C^{high} NK細胞における表面マーカーの発現

NK細胞は精巧な受容体群を持ち、それぞれの受容体からNK細胞の細胞傷害活性、サイトカイン産生を制御するシグナルが伝達される。これらの受容体はNK細胞の応答を惹起し増強する活性化型と、応答を抑制する抑制性に分類される (Cerwenka and Lanier, 2001; Lanier, 2005; Sun and Lanier, 2011; Yokoyama and Plougastel, 2003)。活性化受容体および抑制性受容体の発現が、Ly6C^{low} NK細胞とLy6C^{high} NK細胞において違いがあるか否かを確かめた。まずマウス脾臓から血球を採取し、その後フローサイトメトリーにて解析した。その結果、Ly6C^{low} NK細胞およびLy6C^{high} NK細胞における活性化受容体の発現には特段大きな差がないことが示された (図2-2-1)。一方抑制性受容体は、KLRG1、Ly49C/IにおいてLy6C^{high} NK細胞の方がLy6C^{low} NK細胞よりも発現が高いことが判明した (図2-2-2)。Ly49AはLy6C^{low} NK細胞の方がLy6C^{high} NK細胞よりも発現が高かった (図2-2-2)。さらに、NK細胞の活性化に関与することが報告されているCD43、CD69、Ly108の発現を比較した (Falco et al., 2004; Flaig et al., 2004; Moretta et al., 1991; Nieto et al., 1999)。その結果、CD43とCD69には差は見られなかったが、Ly108の発現はLy6C^{low} NK細胞の方がLy6C^{high} NK細胞よりも発現が高いことが判明した (図2-2-3 A)。以上の結果はLy6C^{high} NK細胞の活性はLy6C^{low} NK細胞の活性よりも低い可能性を示している。

CD49bとCD27は、NK細胞の後期発生段階の指標となっている (Chiossone et al., 2009; Hayakawa and Smyth, 2006; Kim et al., 2002)。両者についても発現の違いを確かめた。図 2-2-3 B に示すように、どちらのサブセットもCD49bにおいては高い発現を示した。一方、CD27の発現はLy6C^{low} NK細胞の方がLy6C^{high} NK細胞よりも発現が高い傾向があることが判明した (図2-2-3 B)。この結果は、Ly6C^{low} NK細胞とLy6C^{high} NK細胞の分化ステージが異なる可能性を示している。

Ly6C^{high} NK細胞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ひとつにIFN- γ 産生が挙げられる (Cerwenka and Lanier, 2001; Vivier et al., 2008; Yokoyama and Plougastel, 2003)。そこで、Ly6C^{low} NK細胞とLy6C^{high} NK細胞の活性を比較するために、両者のIFN- γ 産生をELISAにて定量した。C57BL/6J-Ly-5.2マウス脾臓より血球を採取し、セルソーターでCD11b⁺CD49b⁺CD3e⁻Fc ϵ R1 α ⁻ Ly6C^{low}もしくはLy6C^{high}の分画を分取した。そして、分取した細胞を96穴プレートに 5×10^4 細胞ずつtriplicateで播種した。NK細胞は、主にマクロファージや樹状細胞が分泌するIL-12やIL-18の刺激を受けると活性化される (Degli-Esposti and Smyth, 2005; Vivier et al., 2008)。そこで、播種した後IL-12もしくはIL-18を加え、24時間培養した。また、培養している間の細胞死を防ぐため、全てのwellにIL-2

を加えた (Kuribayashi et al., 1981; Meazza et al., 2011)。培養後、上清のみを回収し、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^{high} NK細胞はLy6C^{low} NK細胞よりもIFN- γ の産生量が低いことが分かった (図2-3-1 A)。また、IL-2のみを加えたwellではIFN- γ の産生は検出されなかった (図2-3-1 A)。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 (Cerwenka and Lanier, 2001; Vivier et al., 2008; Yokoyama and Plougastel, 2003)。活性化されたNK細胞は脱顆粒して標的細胞を傷害するが、顆粒の中に含まれるgranzyme Bはcaspaseを切断することにより標的細胞のアポトーシスを誘導する (Andrade et al., 1998; Russell and Ley, 2002)。そこで、Ly6C^{low} NK細胞とLy6C^{high} NK細胞の細胞傷害能を比較するために、granzyme B産生をIFN- γ 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^{high} NK細胞はLy6C^{low} NK細胞よりもgranzyme Bの産生量が低いことが分かった (図2-3-1 B)。さらに、マウスリンパ腫細胞株であるYAC-1とNK細胞との共培養を行い、CD107aの発現をフローサイトメトリーにて解析した。CD107aはグリコシル化されたタンパク質で、顆粒の膜に存在する。標的細胞を傷害するために脱顆粒しているNK細胞の細胞膜表面にはCD107aが発現することが知られており、NK細胞の活性化マーカーとして用いられている (Alter et al., 2004)。granzyme Bの産生量と一致して、Ly6C^{high} NK細胞はLy6C^{low} NK細胞よりもCD107a陽性細胞の割合が低いことが分かった (図2-3-1 C)。これらの結果は、Ly6C^{high} NK

細胞における抑制性レセプターの発現がLy6C^{low} NK細胞における発現よりも高い、という結果と一致する。

IL-15 は NK 細胞の生存と増殖に必須なサイトカインである (Kennedy et al., 2000; Meazza et al., 2011; Ogasawara et al., 1998)。そこで、Ly6C^{low} NK 細胞と Ly6C^{high} NK 細胞の生存・増殖能を比較するために、マウス脾臓より各サブセットを分取し、IL-15 存在下で 6 日間培養した。図 2-3-2 に示す通り、どちらのサブセットも IL-15 存在下で生存していることが明らかとなった。そして、Ly6C^{low} NK 細胞は Ly6C^{high} NK 細胞と比べて顕著に高い増殖能を有することが明らかとなった (図 2-3-2)。

以上の結果から、Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞よりも低い活性と増殖能を持つことが明らかとなった。

Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞から生じる

次に、Ly6C^{low} NK 細胞と Ly6C^{high} NK 細胞の発生順序を明らかにするために、C57BL/6J-Ly-5.2 マウスと C57BL/6J-Ly-5.1 マウスを用いた移植実験を行った。まず、C57BL/6J-Ly-5.2 マウス脾臓より Ly6C^{low} NK 細胞もしくは Ly6C^{high} NK 細胞をセルソーターにて分取した。次に、それぞれのサブセットを C57BL/6J-Ly-5.1 マウス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⁺) の Ly6C

の発現量をフローサイトメトリーにて解析した（図 2-4 A）。その結果、Ly6C^{low} NK 細胞の 30～40 %は Ly6C^{high} NK 細胞 へと変化することが判明した（図 2-4 B, C）。一方、ほぼ全ての Ly6C^{high} NK 細胞はその発現を保っていた（図 2-4 B, C）。これらの結果は、定常状態において Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞から生じ、Ly6C^{low} NK 細胞は Ly6C^{high} NK 細胞から生じないことを示している。

Ly6C^{high} NK 細胞は IL-15 存在下で Ly6C^{low} NK 細胞へと変化する

IL-15 は NK 細胞の分化や成熟に必須なサイトカインである（Meazza et al., 2011; Ogasawara et al., 1998; Walzer et al., 2005）。IL-15 が Ly6C の発現に影響を与えるかを明らかにするために、C57BL/6J-Ly-5.2 マウスの脾臓より Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞を分取し、IL-15 存在下で培養した。そして、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。図 2-5-1 の左の図が示す通り、Ly6C^{low} NK 細胞における Ly6C の発現量は、いずれの時点においても低いままであった（Ly6C^{low(low)} NK 細胞）。しかし、驚くべきことに、Ly6C^{high} NK 細胞における発現量は 2 日目から徐々に下がり始め、4 日目には発現量が中間レベルの細胞が出現した（Ly6C^{mid(high)} NK 細胞）（図 2-5-1、右の図）。さらに、6 日目にはほとんどの細胞が Ly6C^{low} NK 細胞へと変化していた（Ly6C^{low(high)} NK 細胞）（図 2-5-1、右の図）。

先に示した通り、Ly6C^{low} NK 細胞は Ly6C^{high} NK 細胞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、各サブセットを IL-15 存在下で 4 日間培養し、Ly6C^{low} NK 細胞より生じた Ly6C^{low(low)} NK 細胞と Ly6C^{high} NK 細胞より生じた Ly6C^{mid(high)} NK 細胞や Ly6C^{high} NK 細胞 のままの細胞 (Ly6C^{high(high)} NK 細胞) の活性を比較した。セルソーターにて分取した Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞を 4 日間 IL-15 存在下で培養し、再びセルソーターにて目的の細胞を分取した。続いて IL-12 や IL-18 で刺激し、IFN- γ 産生量を ELISA にて定量したところ、Ly6C^{mid(high)} NK 細胞の産生量は Ly6C^{high(high)} NK 細胞よりも高いことが明らかとなった (図 2-5-2)。さらに、Ly6C^{mid(high)} NK 細胞と Ly6C^{low(low)} NK 細胞の産生量を比較すると、Ly6C^{low(low)} NK 細胞の方が高いことが明らかとなった (図 2-5-2)。

次に、Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞を IL-15 存在下で 7 日間培養し、Ly6C^{low} NK 細胞より生じた Ly6C^{low(low)} NK 細胞と Ly6C^{high} NK 細胞より生じた Ly6C^{low(high)} NK 細胞の活性を比較した。セルソーターにて分取した Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞を 7 日間 IL-15 存在下で培養し、再びセルソーターにて目的の細胞を分取した。続いて IL-12 や IL-18 で刺激し、IFN- γ の産生量を ELISA にて定量したところ、Ly6C^{low(high)} NK 細胞の産生量は Ly6C^{low(low)} NK 細胞の産生量と同等であることを見いだした (図 2-5-3、上段)。同様に granzyme B の産生量を定量したところ、Ly6C^{low(high)} NK 細胞の産生量は Ly6C^{low(low)} NK 細胞の産生量とほぼ同等であることが判明した (図 2-5-3、下段)。さらに、Ly6C^{low(high)} NK

細胞における抑制性レセプターである NKG2A、KLRG1、Ly49C/I の発現量を調べた。ELISA の結果と一貫して、これらの発現は明らかに減少していた（図 2-5-4）。一方、Ly6C^{high(high)} NK 細胞においては Ly6C^{low(high)} NK 細胞よりも高い発現を維持していた（図 2-5-4）。

これまでに、マウス成熟 NK 細胞は CD27 の発現によってふたつのサブセットに分けられることが報告されている。セルソーターにて分取した Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞を IL-15 存在下で培養し、0、4、6 日後に CD27 の発現をフローサイトメトリーにて解析した。図 2-5-5 に示すように、培養 6 日後の CD27 の発現は Ly6C^{low(low)} NK 細胞、Ly6C^{low(high)} NK 細胞、Ly6C^{high(high)} NK 細胞において差がなかった。この結果は、CD27 の発現レベルが IL-15 培養後の成熟 NK 細胞の活性と一致していないことを示す。

IL-2 は IL-15 と同様、NK 細胞の生存や増殖に必須なサイトカインである。そこで、Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞を IL-2 存在下で 6 日間培養したところ、IL-15 ほどではないが Ly6C の発現が低下し、Ly6C^{high} NK 細胞から Ly6C^{mid(high)} NK 細胞が出現することを見いだした（図 2-5-6）。

IL-15 強制発現マウスにおいて Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞へと変化する

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、IL-15 を強制発現させたマウスに移植実験を行った。*in vivo* にて IL-15 を強制発現させるた

めに、本研究では hydrodynamic tail vein injection 法を用いた。C57BL/6J-Ly-5.2 マウスの脾臓より Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞を分取し、C57BL/6J-Ly-5.1 マウスへ尾静脈より移植した。レシピエントマウスである C57BL/6J-Ly-5.1 マウスには、移植 6 時間前に pLIVE-IL-15 vector を尾静脈より投与し (hydrodynamic tail vein injection 法)、IL-15 を予め強制発現させた。各サブセットを移植してから 4 日後、レシピエントマウスの脾臓から血球を採取し、ドナー由来 (CD45.2⁺) の NK 細胞の 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^{high} NK 細胞の約 30% が Ly6C^{low} NK 細胞へと変化することが明らかとなった (図 2-6)。対照的に、Ly6C^{low} NK 細胞を移植したマウスやコントロール vector を尾静脈より投与したマウスでは大きな変化は見られなかった (図 2-6)。

poly I:C および CpG を腹腔内に投与したマウスにおいて Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞へと変化する

IL-15 はウイルス感染を起こしたときに積極的に樹状細胞やマクロファージから産生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 poly I:C や CpG を腹腔内に投与し (Eidenschenk et al., 2010; Lucas et al., 2007; Stonier and Schluns, 2010)、移植した各サブセットの Ly6C の発現量を調べることにした。まず、poly I:C や CpG によって IL-15 の発現量が上昇することを確認した。C57BL/6J-Ly-5.2 マウス

ウスに poly I:C あるいは CpG を腹腔内に投与し、3 時間後に脾臓の血球を採取した。脾臓の血球から total RNA を抽出し、cDNA に逆転写した後に Real-time RT-PCR にて IL-15 の発現量を測定した。図 2-7-1 に示す通り、poly I:C、CpG のいずれを投与した場合でも、PBS を投与した場合に比べ IL-15 の発現が約 5 倍に上昇していることが確認された。

次に、poly I:C を腹腔内に投与した際の、NK 細胞における Ly6C の発現量に対する影響を調べた。C57BL/6J-Ly-5.2 マウスの脾臓より各サブセットを分取し、C57BL/6J-Ly-5.1 マウスに尾静脈より移植した。移植直後に poly I:C を腹腔内に投与した。移植から 4 日後、レシピエントマウスの脾臓から血球を採取し、ドナー由来 (CD45.2⁺) の NK 細胞の Ly6C の発現をフローサイトメトリーにて解析した (図 2-7-2 A)。その結果、移植した Ly6C^{high} NK 細胞のおよそ 30%が Ly6C^{low} NK 細胞へと変化した (図 2-7-2 B, C)。対照的に、Ly6C^{low} NK 細胞を移植したマウスや PBS を腹腔内に投与したマウスでは大きな変化は見られなかった (図 2-7-2 B, C)。

poly I:C や CpG はどちらもウイルスの構成成分であるが、それぞれの受容体は異なり、それに続くシグナル経路も異なる。そのため、両者を時間差で立て続けにマウスに投与すると、相乗効果的に働き、より強い炎症を模倣することができることが知られている (Napolitani et al., 2005; Zhu et al., 2008)。そこで、poly I:C および CpG を腹腔内に投与した際の、NK 細胞における Ly6C の発現量に対する影響を調べた。C57BL/6J-Ly-5.2 マウスの脾臓より各

サブセットを分取し、C57BL/6J-Ly-5.1 マウスに尾静脈より移植した。移植直後に poly I:C を腹腔内に投与した。2 日後、CpG を腹腔内に投与した。移植から 4 日後、レシピエントマウスの脾臓から血球を採取し、ドナー由来 (CD45.2⁺) の NK 細胞の Ly6C の発現をフローサイトメトリーにて解析した (図 2-7-3 A)。その結果、Ly6C^{high} NK 細胞の約半分が Ly6C^{low} NK 細胞へと変化することが明らかとなった (図 2-7-3 B, C)。対照的に、Ly6C^{low} NK 細胞を移植したマウスや PBS を腹腔内に投与したマウスでは大きな変化は見られなかった (図 2-7-3 B, C)。

以上の結果により、Ly6C^{high} NK 細胞は IL-15 が高発現される環境下で Ly6C^{low} NK 細胞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。

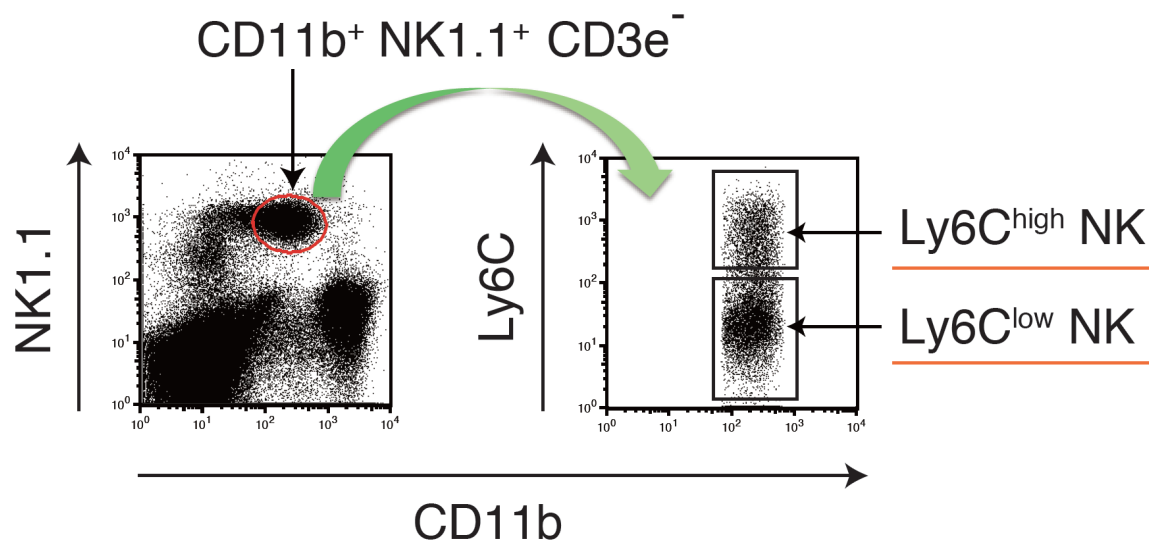


図 2-1-1 マウス成熟 NK 細胞における Ly6C の発現

C57BL/6J-Ly-5.2 マウスの脾臓より血球を採取し、成熟 NK 細胞（CD11b⁺NK1.1⁺CD3e⁻）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。これは、3 回行われた実験のうち、代表的な結果である。

A

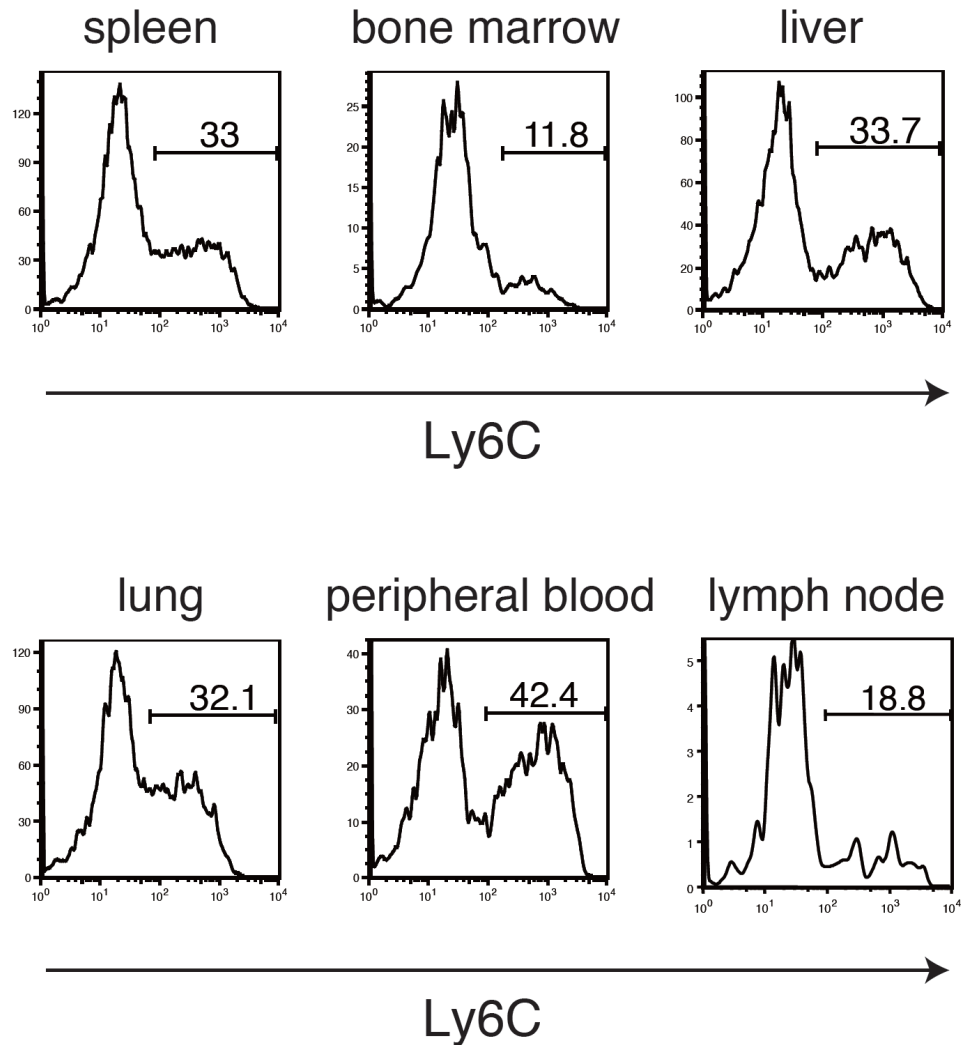


図 2-1-2 各組織・器官の成熟 NK 細胞における Ly6C の発現

C57BL/6J-Ly-5.2 マウスの脾臓 (spleen)、骨髄 (bone marrow)、肝臓 (liver)、肺 (lung)、末梢血 (peripheral blood)、リンパ節 (lymph node) より血球を採取し、成熟 NK 細胞 (CD11b⁺NK1.1⁺CD3e⁻) 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。(A) Ly6C の発現レベルをヒストグラムにて表した。数値は Ly6C^{high} NK 細胞の割合を示す。この結果は、3 回行われた実験のうち、代表的なものである。

B

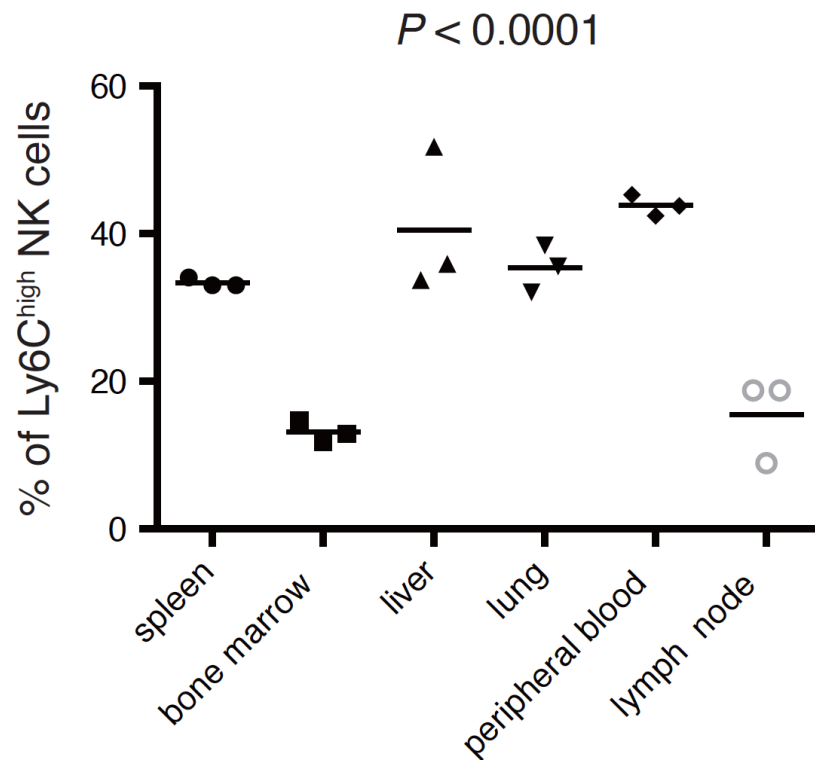


図 2-1-2 各組織・器官の成熟 NK 細胞における Ly6C の発現

(B) 各組織・器官における Ly6C^{high} NK 細胞の割合。バーはそれぞれの平均値を示す ($n = 3$)。P 値は one-way ANOVA 検定の結果である。Tukey's test の結果、骨髄と脾臓、肝臓、肺、末梢血の間には、それぞれ有意差があった。さらに、リンパ節と脾臓、肝臓、肺、末梢血の間にも、それぞれ有意差があった。

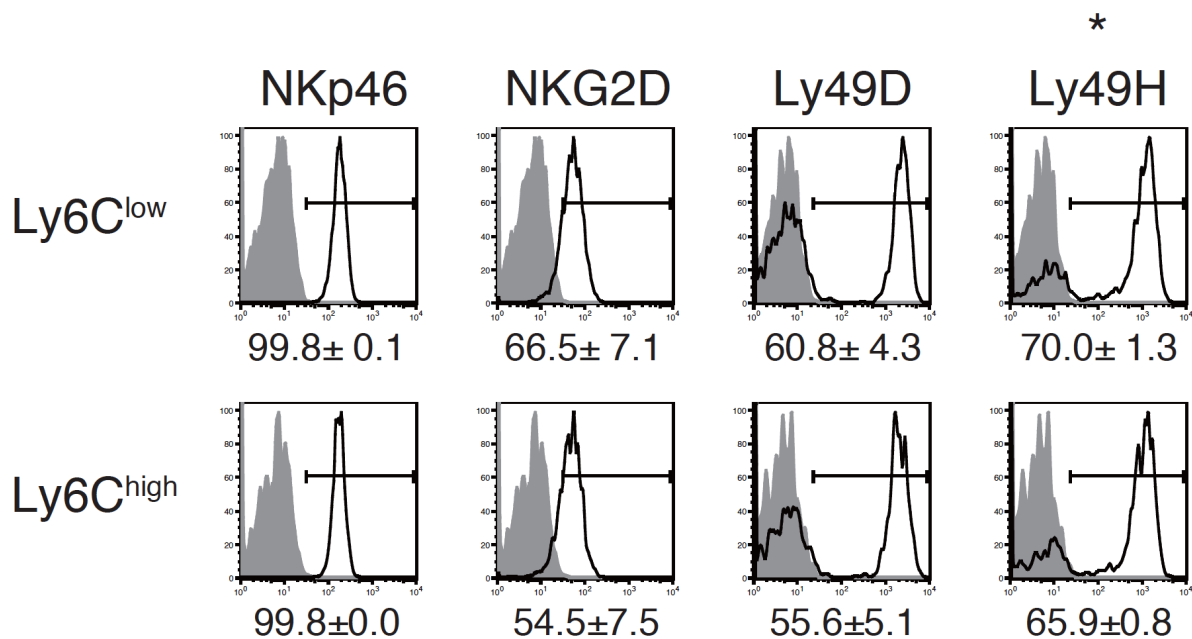


図 2-2-1 Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞における活性化受容体の発現
C57BL/6J-Ly-5.2マウスの脾臓より血球を採取し、Ly6C^{low} NK細胞およびLy6C^{high} NK細胞における活性化受容体の発現をフローサイトメトリーにて解析した。黒の実線は各受容体の発現、グレーはisotype controlを示す。Ly6C^{low} NK細胞およびLy6C^{high} NK細胞はCD11b⁺NK1.1⁺CD3e⁻の細胞集団にゲートしてある。数値は平均値 (%) ± 標準誤差を示す (n=3) 。ヒストグラムは、3回行われた実験のうち、代表的な結果である。

* $P < 0.05$

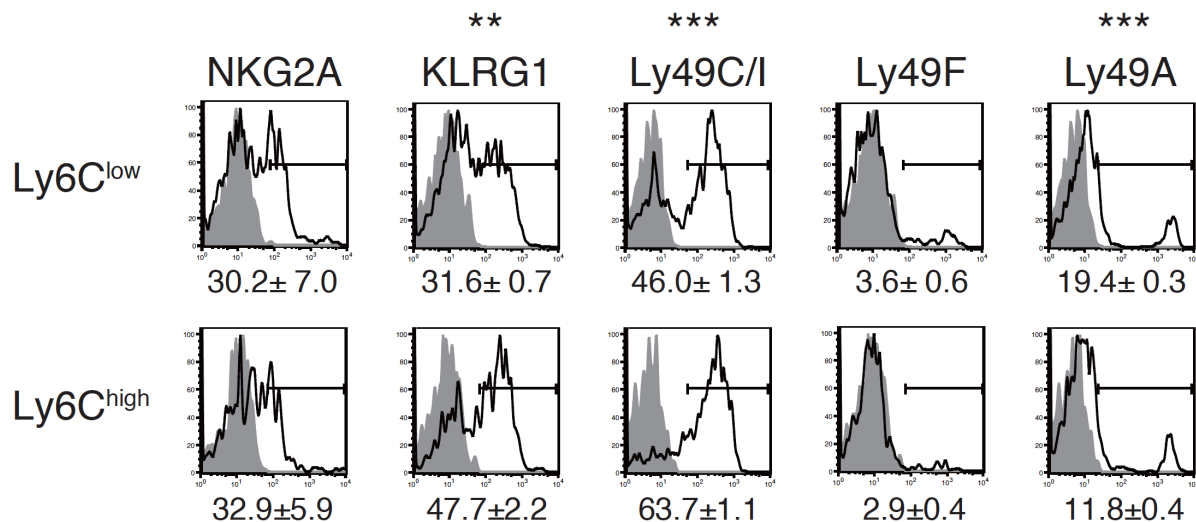


図 2-2-2 Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞における抑制性受容体の発現
C57BL/6J-Ly-5.2マウスの脾臓より血球を採取し、Ly6C^{low} NK細胞およびLy6C^{high} NK細胞における抑制性受容体の発現をフローサイトメトリーにて解析した。黒の実線は各受容体の発現、グレーはisotype controlを示す。Ly6C^{low} NK細胞およびLy6C^{high} NK細胞はCD11b⁺NK1.1⁺CD3e⁻の細胞集団にゲートしてある。数値は平均値 (%) ± 標準誤差を示す (n=3) 。ヒストグラムは、3回行われた実験のうち、代表的な結果である。

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

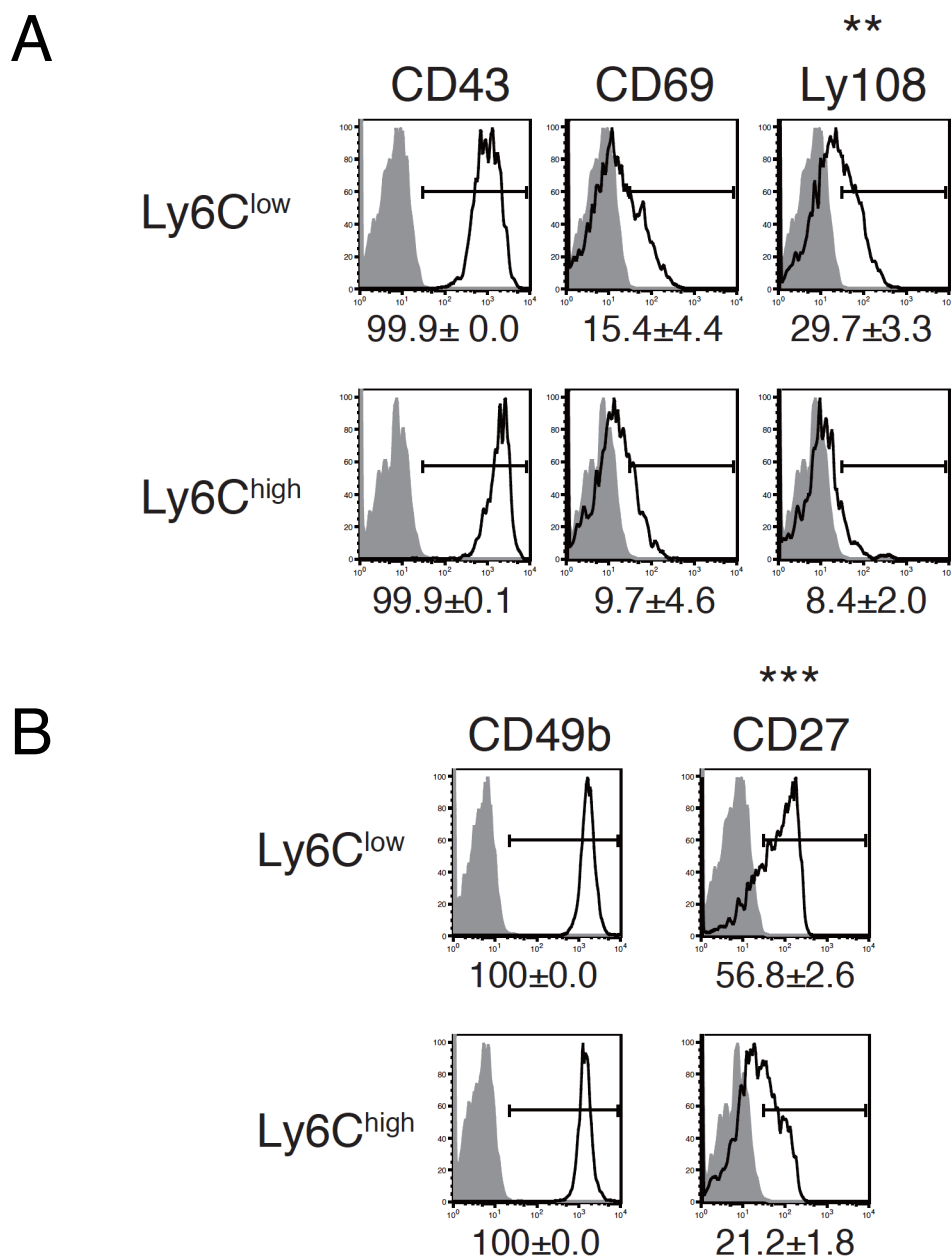
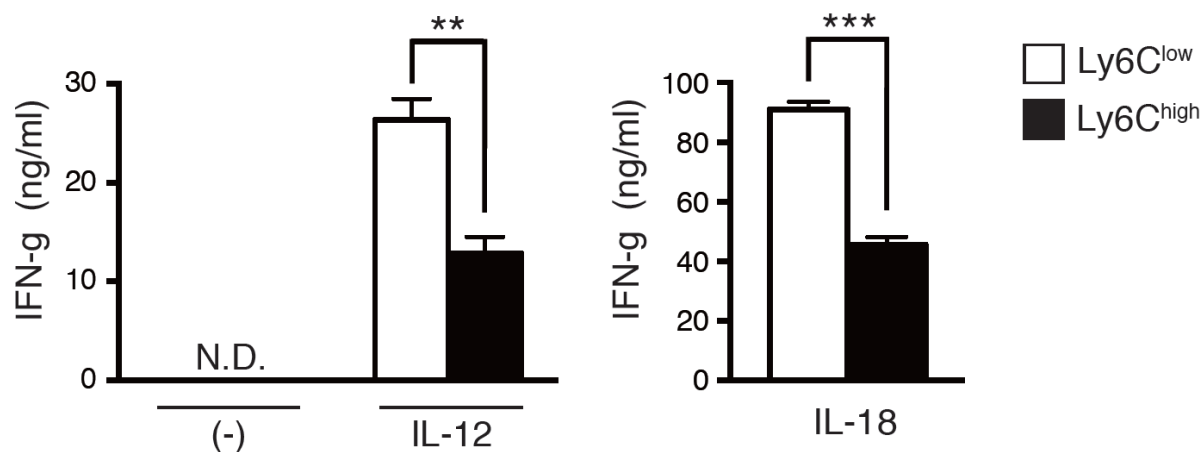


図 2-2-3 Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞における各マーカーの発現
C57BL/6J-Ly-5.2マウスの脾臓より血球を採取し、Ly6C^{low} NK細胞およびLy6C^{high} NK細胞における各マーカーの発現をフローサイトメトリーにて解析した。黒の実線は各マーカーの発現、グレーはisotype controlを示す。Ly6C^{low} NK細胞およびLy6C^{high} NK細胞はCD11b⁺NK1.1⁺CD3e⁺の細胞集団にゲートしてある。(A) NK細胞の代表的な活性化マーカーの発現。(B) NK細胞の後期発生段階のマーカーの発現。数値は平均値 (%) ± 標準誤差を示す (n=3)。ヒストグラムは、3回行われた実験のうち、代表的な結果である。

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

A



B

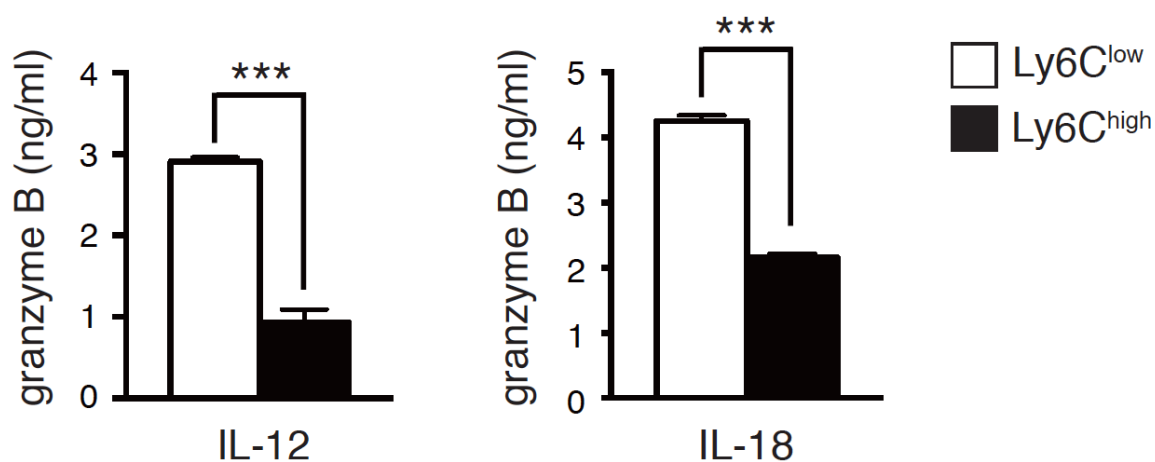


図 2-3-1 Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞における活性の比較

C57BL/6J-Ly-5.2マウスの脾臓より血球を採取し、CD11b⁺CD49b⁺CD3e⁺FcεR1α⁺ Ly6C^{low}もしくはLy6C^{high}の分画をセルソーターにて分取した。分取した細胞は5 × 10⁴ 細胞ずつ播種し、IL-12 (100 ng/ml) もしくはIL-18 (100 ng/ml) で刺激した。24時間後、上清を回収し、IFN-γ (A) およびgranzyme B (B) の産生量をELISAにて定量した。これらは、3回行われた実験のうち、代表的な結果である。

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

C

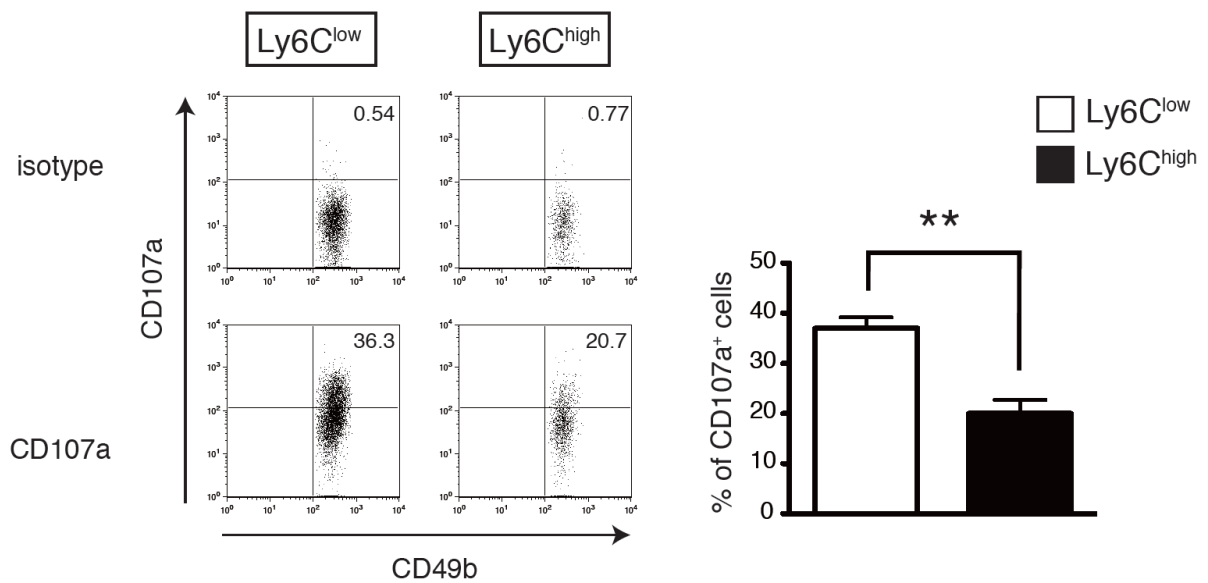


図 2-3-1 Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞における活性の比較

(C) C57BL/6J-Ly-5.2マウスの脾臓より血球を採取し、CD49b⁺の分画を磁気細胞分離装置にて分取した。分取した細胞はIL-18 (100 ng/ml) で16時間刺激した。その後、effector target比1:1でYAC-1と共培養し、CD11b⁺CD49b⁺CD3e⁺Ly6C^{low}もしくはLy6C^{high} NK細胞におけるCD107a陽性細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析した。1回の実験における共培養はtriplicateで行われており、右のグラフはそれらの平均値と+標準誤差を示している。これらは、3回行われた実験のうち、代表的な結果である。

** $P < 0.01$

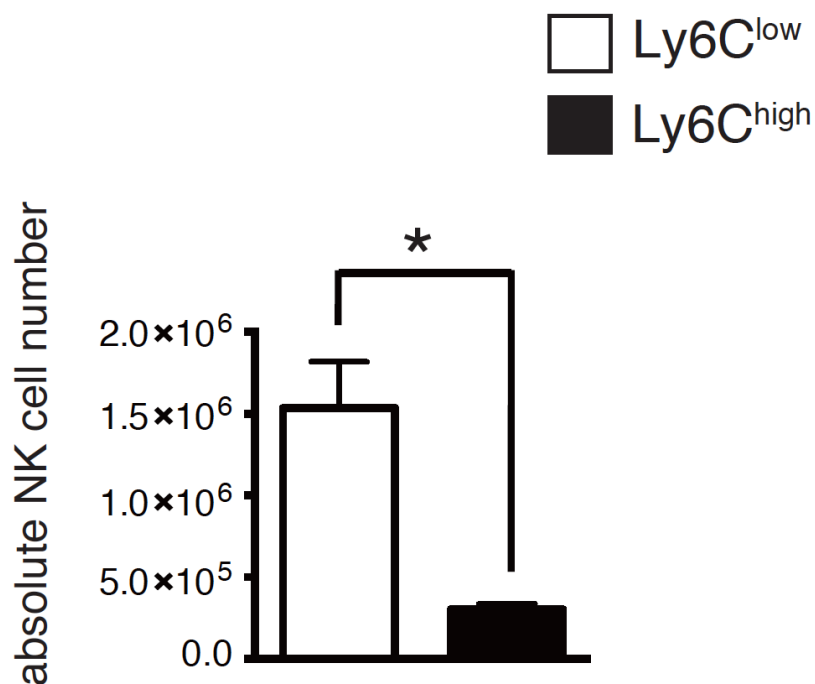


図 2-3-2 Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞における細胞増殖能の比較
C57BL/6J-Ly-5.2マウスの脾臓より血球を採取し、CD11b⁺CD49b⁺CD3e⁺FcεR1α⁺ Ly6C^{low}もしくはLy6C^{high}の分画をセルソーターにて分取した。分取した細胞はIL-15 (100 ng/ml) 存在下で6日間培養し、絶対細胞数を0.4% trypan blueを用いてカウントした。1回の実験における培養はtriplicateで行われており、グラフはそれらの平均値と+標準誤差を示している。この結果は、3回行われた実験のうち、代表的なものである。

* $P < 0.05$

A

二種類のマウス用いた移植実験の方法

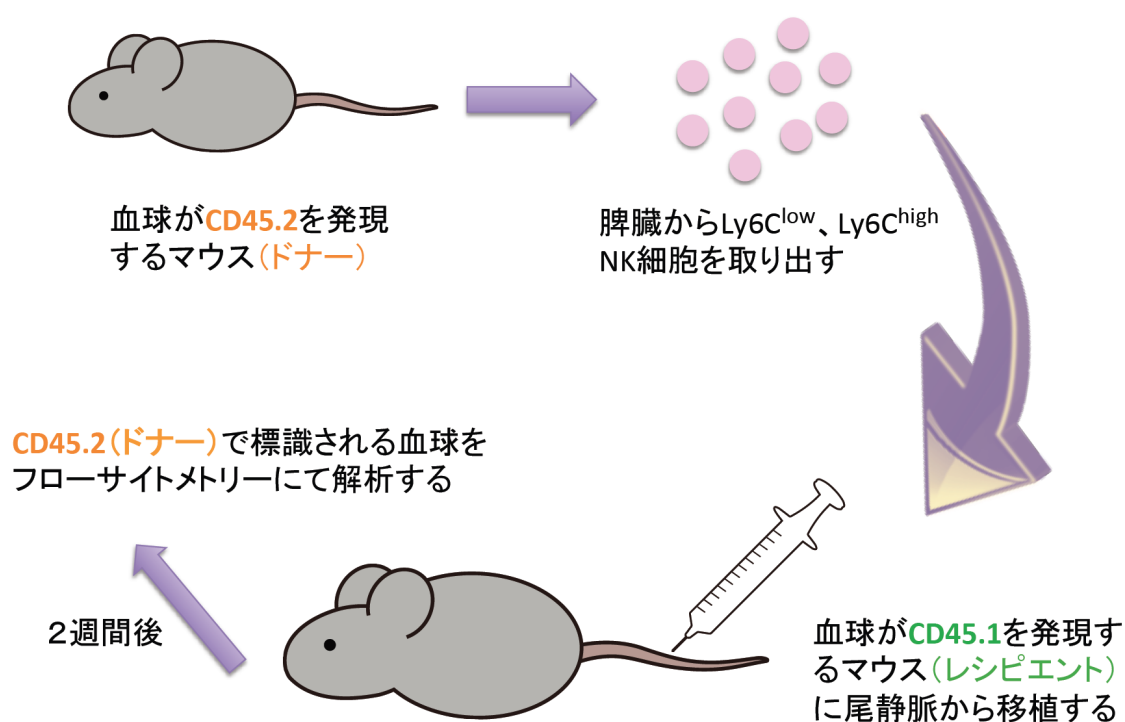


図 2-4 Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞から生じる

(A) C57BL/6J-Ly-5.2マウスの脾臓よりCD11b⁺CD49b⁺CD3e⁻FcεR1α⁻ Ly6C^{low}もしくはLy6C^{high}の分画をセルソーターにて分取し、C57BL/6J-Ly-5.1マウス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より血球を採取し、ドナー細胞におけるLy6Cの発現をフローサイトメトリーにて解析した。

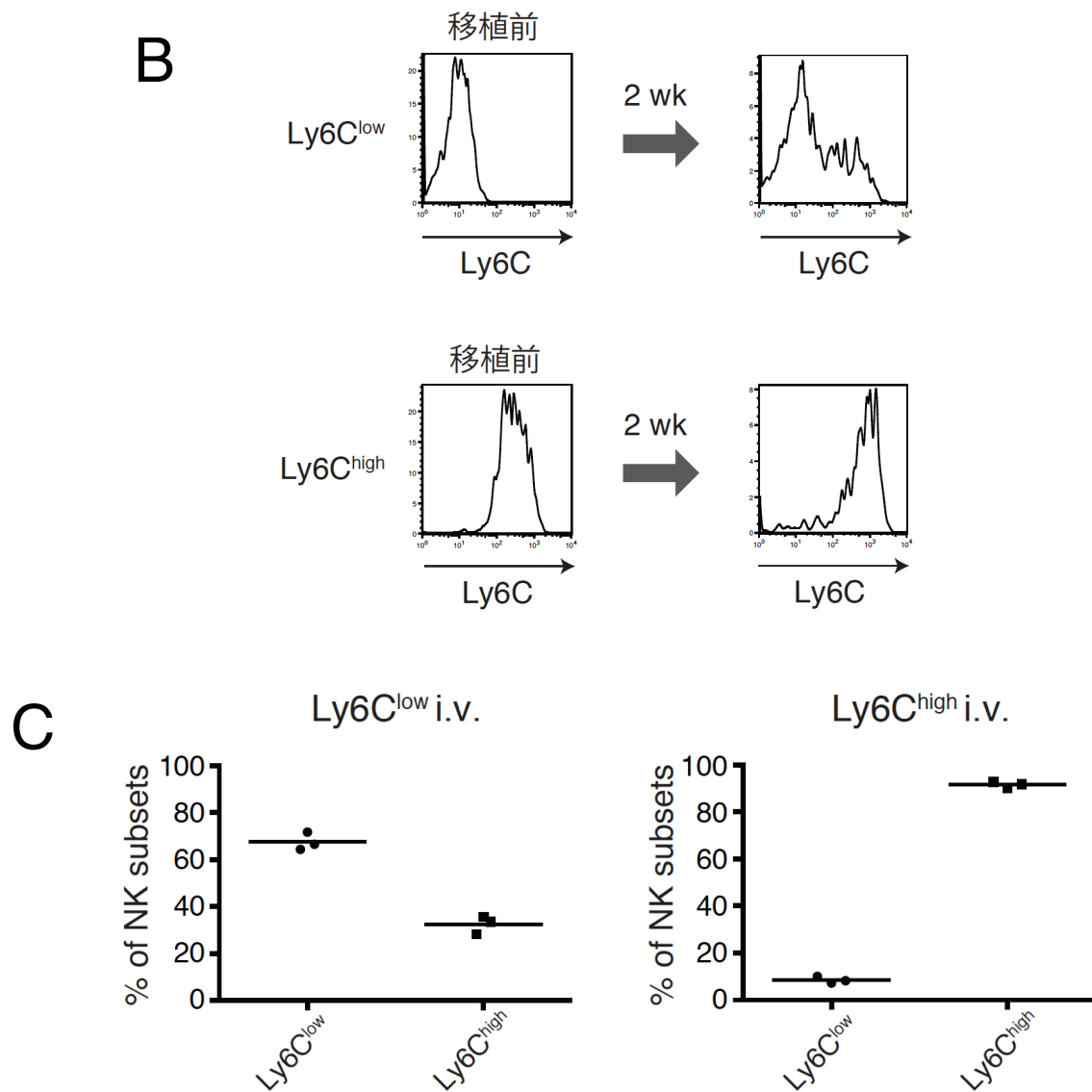


図 2-4 Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞から生じる

(B) 移植したLy6C^{low} NK細胞 (上段) およびLy6C^{high} NK細胞 (下段) におけるLy6Cの発現をヒストグラムで示す。CD45.2+CD11b+NK1.1+CD3e⁻の細胞集団にゲートして解析した。これらは、3回行われた実験のうち、代表的な結果である。(C) ドナー細胞におけるLy6C^{low} NK細胞およびLy6C^{high} NK細胞の割合。左のグラフ (Ly6C^{low} i.v.) はLy6C^{low} NK細胞を移植した場合、右のグラフ (Ly6C^{high} i.v.) はLy6C^{high} NK細胞を移植した場合の結果である。バーはそれぞれの平均値を示す ($n=3$)。

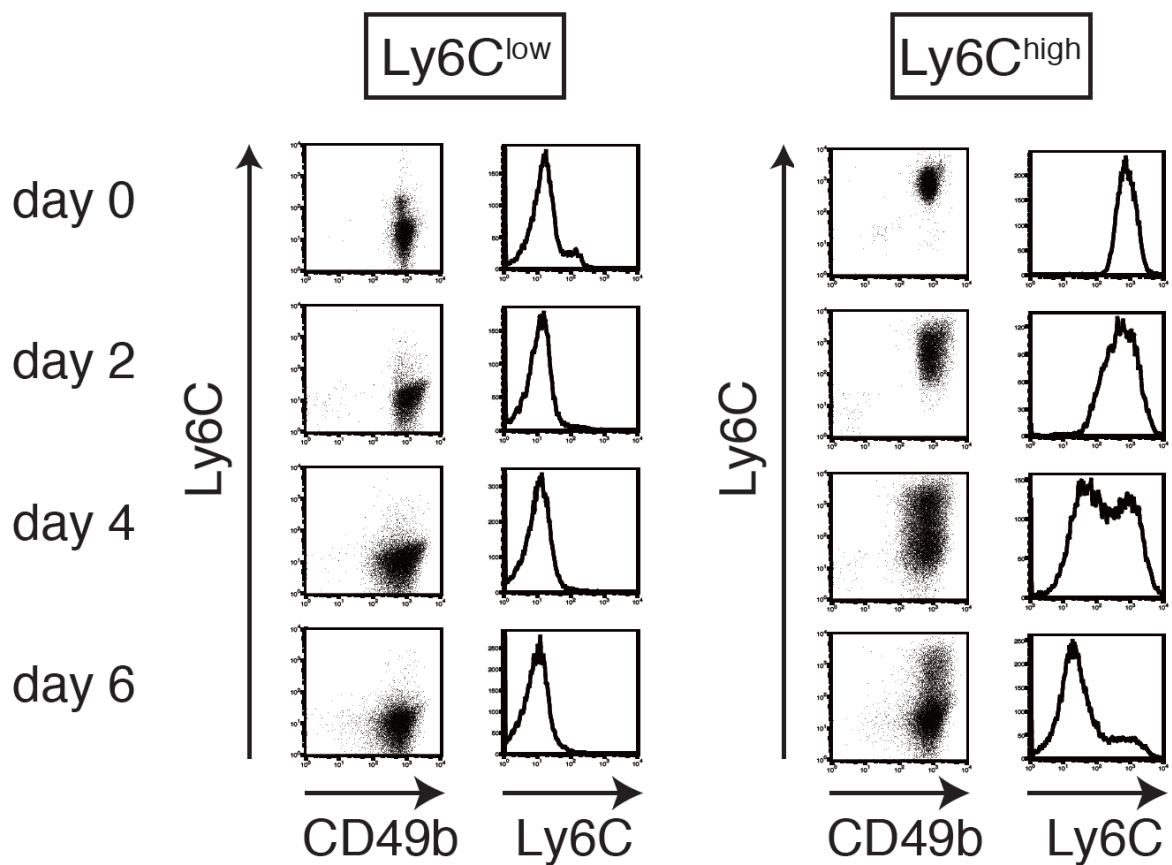


図 2-5-1 IL-15 による培養後の Ly6C の活性変化

C57BL/6J-Ly-5.2 マウスの脾臓より CD11b⁺CD49b⁺CD3e⁺FcεR1α⁺Ly6C^{low} もしくは Ly6C^{high} の分画をセルソーターにて分取し、IL-15 存在下 (100 ng/ml) で培養した。そして、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。左の図は Ly6C^{low} NK 細胞を、右の結果は Ly6C^{high} NK 細胞を培養した結果である。これらは、3 回行われた実験のうち、代表的な結果である。

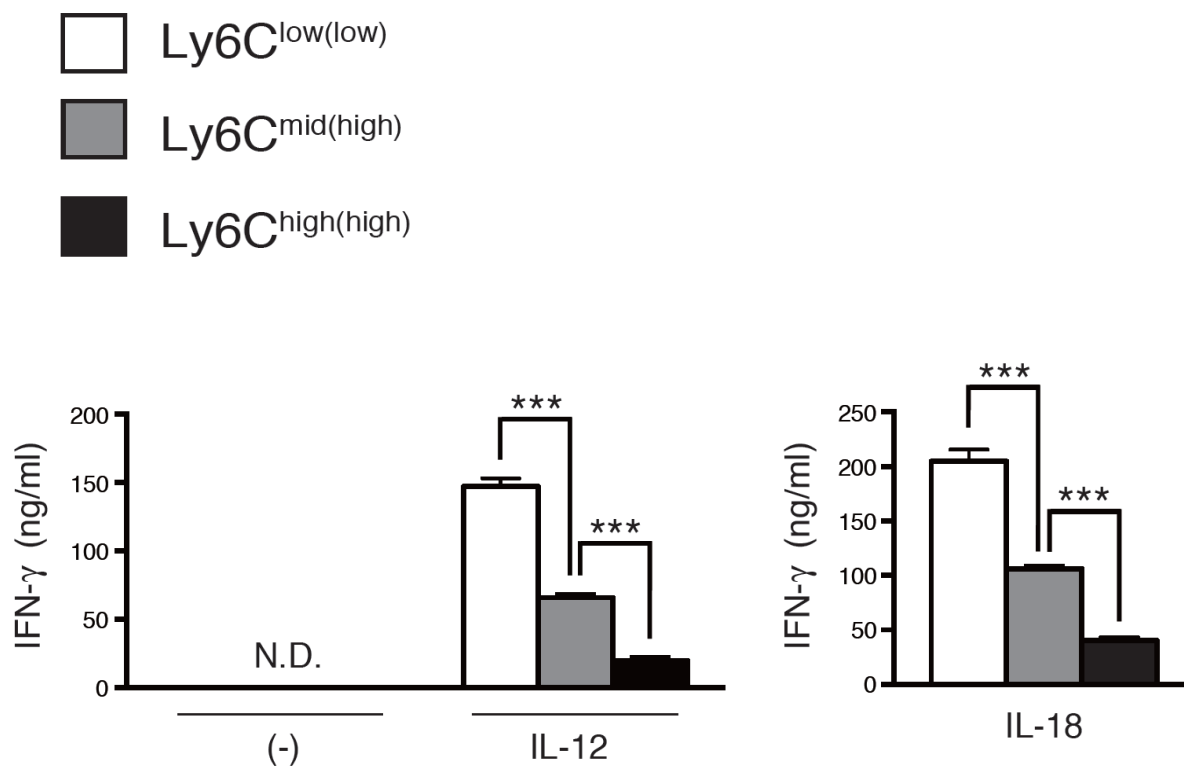


図 2-5-2 IL-15 による培養後の活性変化

セルソーターで分取したLy6C^{low} NK細胞およびLy6C^{high} NK細胞をIL-15存在下で4日間培養した。その後再びセルソーターにて、Ly6C^{low(low)} NK細胞、Ly6C^{mid(high)} NK細胞、Ly6C^{high(high)} NK細胞を分取した。分取した細胞は 2×10^4 細胞ずつ播種し、IL-12 (100 ng/ml) もしくはIL-18 (100 ng/ml) で刺激した。24時間後、上清を回収し、IFN- γ の産生量をELISAにて定量した。これらは、3回行われた実験のうち、代表的な結果である。

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

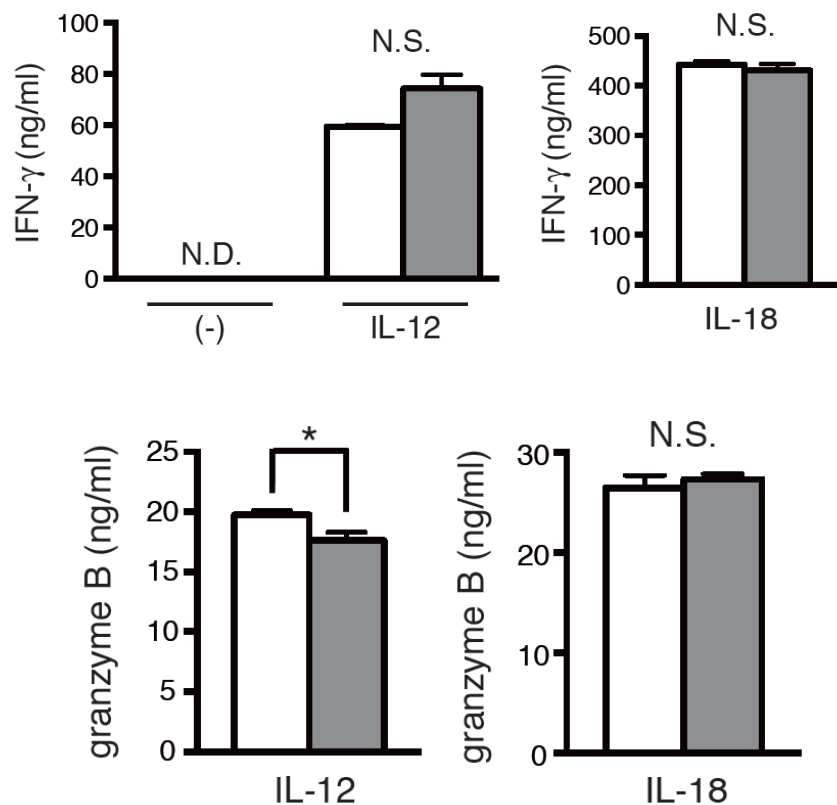
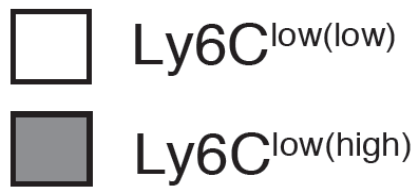


図 2-5-3 IL-15 による培養後の活性変化

セルソーターで分取したLy6C^{low} NK細胞およびLy6C^{high} NK細胞をIL-15存在下で7日間培養した。その後再びセルソーターにて、Ly6C^{low(low)} NK細胞およびLy6C^{low(high)} NK細胞を分取した。分取した細胞は 2×10^4 細胞ずつ播種し、IL-12 (100 ng/ml) もしくはIL-18 (100 ng/ml) で刺激した。24時間後、上清を回収し、IFN-γ (上段) とgranzyme B (下段) の産生量をELISAにて定量した。これらは、3回行われた実験のうち、代表的な結果である。

* $P < 0.05$ N.D., 検出できず(not detected), N.S., 有意差なし(not significance)

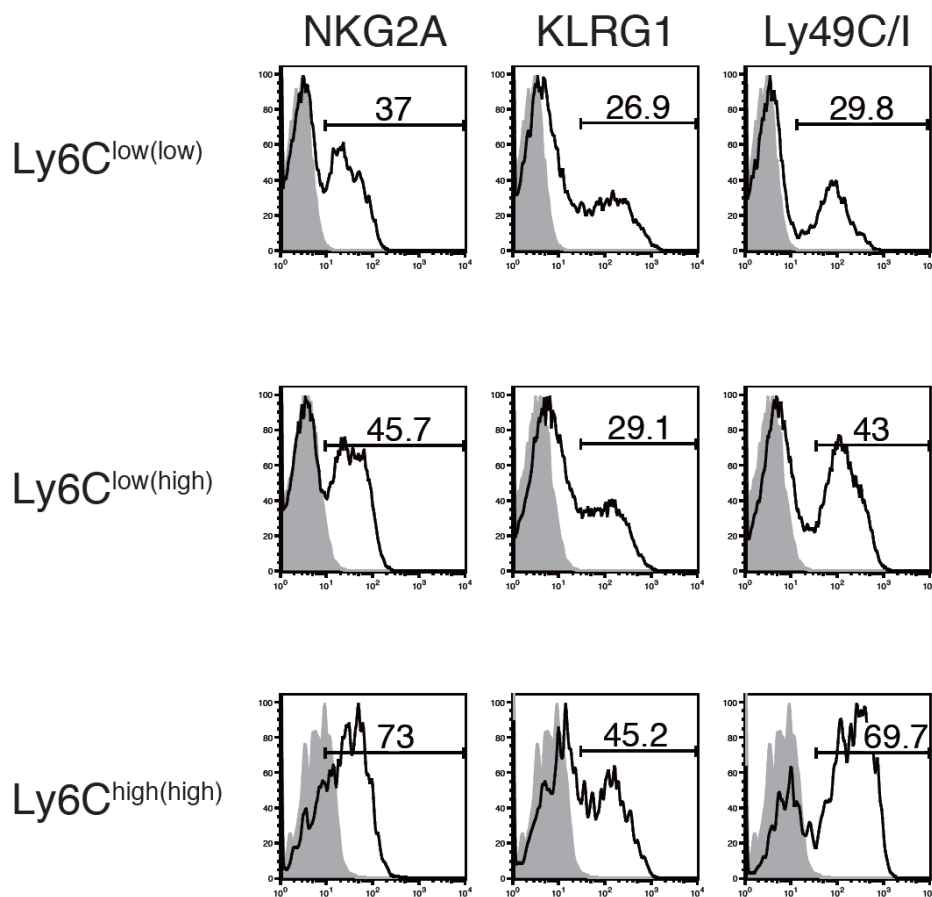


図 2-5-4 IL-15 による培養後の抑制性受容体の発現変化

セルソーターで分取したLy6C^{low} NK細胞およびLy6C^{high} NK細胞をIL-15存在下で6日間培養した。その後、Ly6C^{low(low)} NK細胞、Ly6C^{low(high)} NK細胞、Ly6C^{high(high)} NK細胞における抑制性受容体の発現をフローサイトメトリーにて解析した。黒の実線は各受容体の発現、グレーはisotype controlを示す。これらは、3回行われた実験のうち、代表的な結果である。

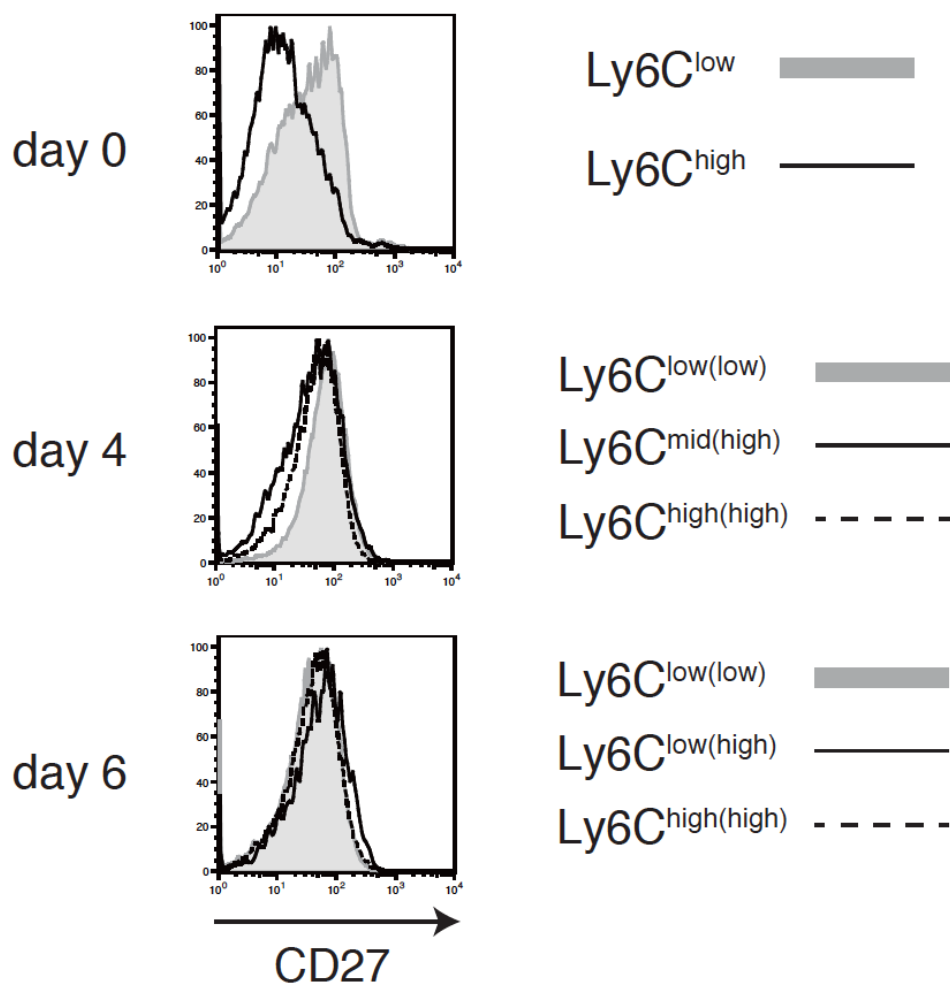


図 2-5-5 IL-15 による培養後の CD27 の発現変化

セルソーターで分取したLy6C^{low} NK細胞およびLy6C^{high} NK細胞をIL-15存在下で培養した。培養0、4、6日目にて、CD27の発現をフローサイトメトリーにて解析した。これらは、2回行われた実験のうち、代表的な結果である。

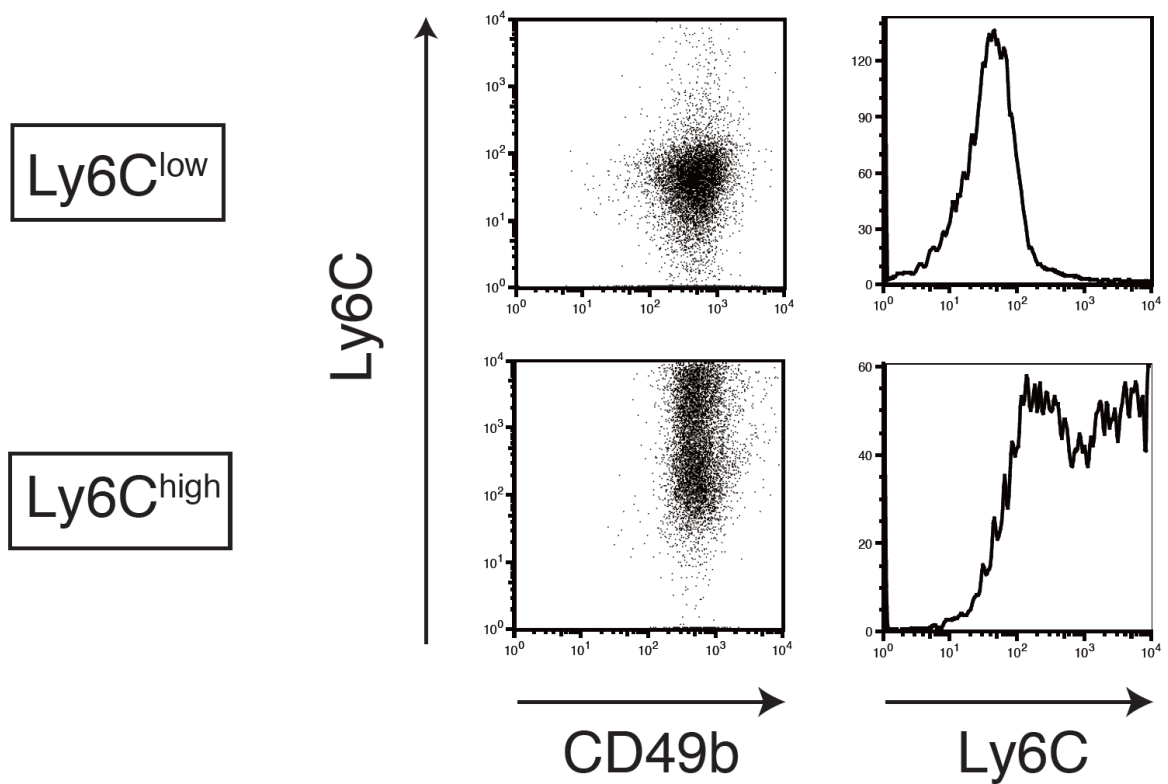


図 2-5-6 IL-2 による培養後の抑制性受容体の発現変化

C57BL/6J-Ly-5.2 マウスの脾臓より $\text{CD11b}^{\text{+}}\text{CD49b}^{\text{+}}\text{CD3e}^{\text{+}}\text{Fc}\epsilon\text{R1}\alpha^{\text{+}}\text{Ly6C}^{\text{low}}$ もしくは $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ の分画をセルソーターにて分取し、IL-2 存在下 (100 ng/ml) で培養した。そして、培養 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。これらは、2 回行われた実験のうち、代表的な結果である。

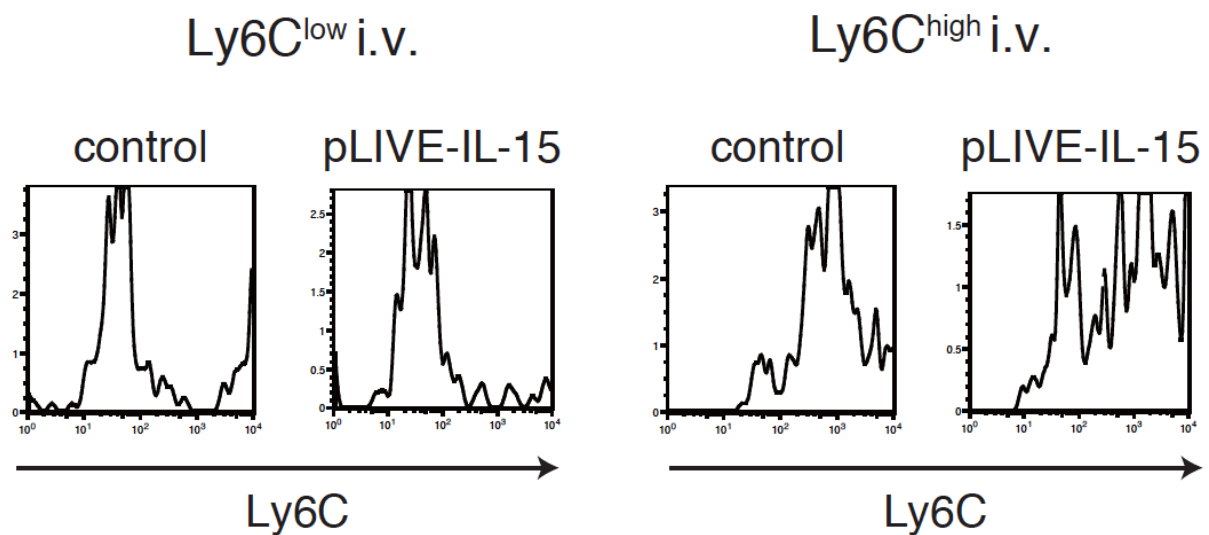


図 2-6 IL-15 強制発現マウスにおいて $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞へ変化する

IL-15 あるいはコントロール vector を C57BL/6J-Ly-5.1 マウスに尾静脈より投与した。6 時間後、C57BL/6J-Ly-5.2 マウスの脾臓より Ly6C^{low} NK 細胞と $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ NK 細胞を分取し、vector を投与したマウスにそれぞれ尾静脈より移植した。4 日後、レシピエントマウスの脾臓より血球を採取し、ドナー細胞における Ly6C の発現をセルソーターにて解析した。左の図 (Ly6C^{low} i.v.) は Ly6C^{low} NK 細胞を、右の図 ($\text{Ly6C}^{\text{high}}$ i.v.) は $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ NK 細胞を移植したマウスの結果である。ヒストグラムは $\text{CD45.2}^+\text{CD11b}^+\text{NK1.1}^+\text{CD3e}^-$ の細胞集団にゲートしてある。これらは、3 回行われた実験のうち、代表的な結果である。

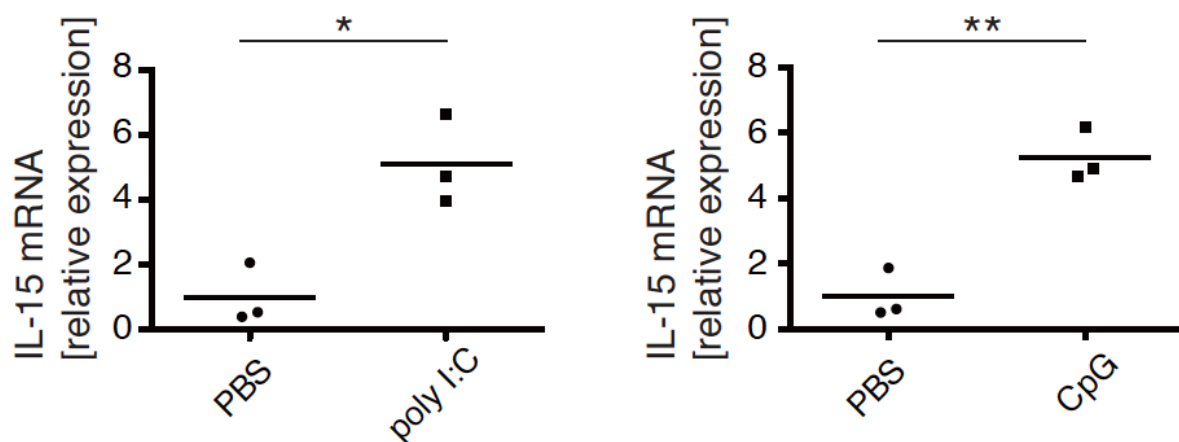
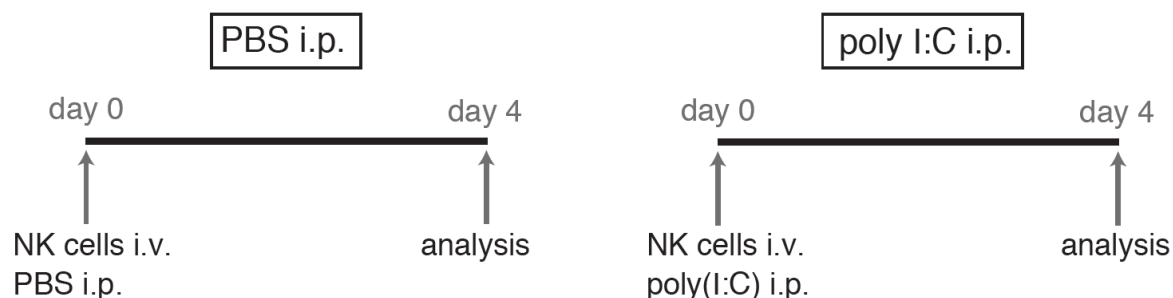


図 2-7-1 poly I:C または CpG 腹腔投与時の IL-15 の発現変化

C57BL/6J-Ly-5.2 マウスに PBS、poly I:C (100 μ g)、CpG (20 nmol) をそれぞれ腹腔投与し、3 時間後に脾臓の血球を採取した。脾臓の血球から total RNA を抽出し、cDNA に逆転写した後に Real-time RT-PCR にて IL-15 の発現量を測定した。IL-15 の発現量は HPRT の発現量を除算した後に、相対的発現量としてグラフ化した。バーはそれぞれの平均値を示す ($n = 3$)。PBS 投与時の平均値を 1 としている。

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

A



B

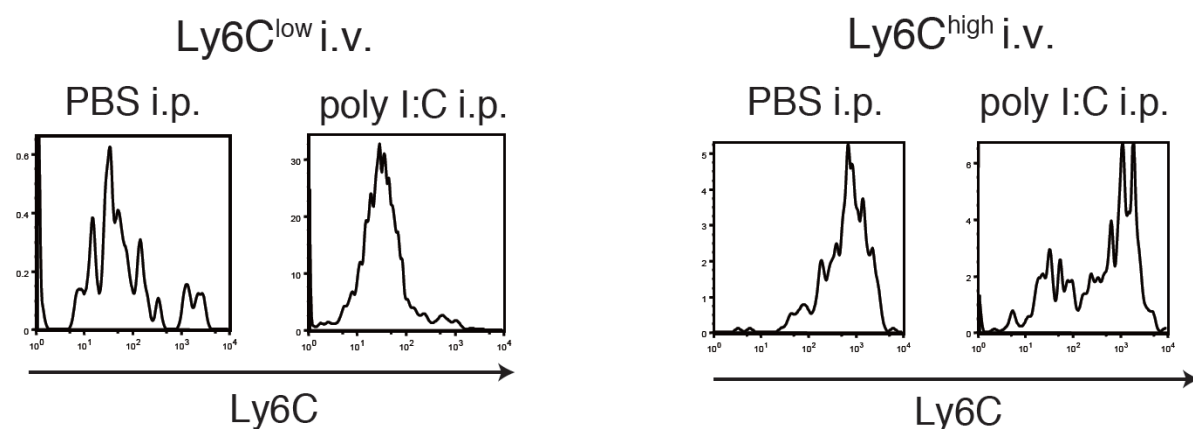


図 2-7-2 poly I:C 投与マウスにおいて Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞へ変化する

(A) C57BL/6J-Ly-5.2 マウスの脾臓より Ly6C^{low} NK 細胞もしくは Ly6C^{high} NK 細胞をセルソーターにて分取し、C57BL/6J-Ly-5.1 マウスに尾静脈より移植した。移植直後に poly I:C を腹腔内に投与した。4 日後、レシピエントマウスの脾臓から血球を採取し、ドナー由来 (CD45.2⁺) の NK 細胞の Ly6C の発現をフローサイトメトリーにて解析した。(B) 左の図 (Ly6C^{low} i.v.) は Ly6C^{low} NK 細胞を、右の図 (Ly6C^{high} i.v.) は Ly6C^{high} NK 細胞を移植したマウスの結果である。ヒストグラムは CD45.2⁺CD11b⁺NK1.1⁺CD3e⁻の細胞集団にゲートしてある。これらは、3 回行われた実験のうち、代表的な結果である。

C

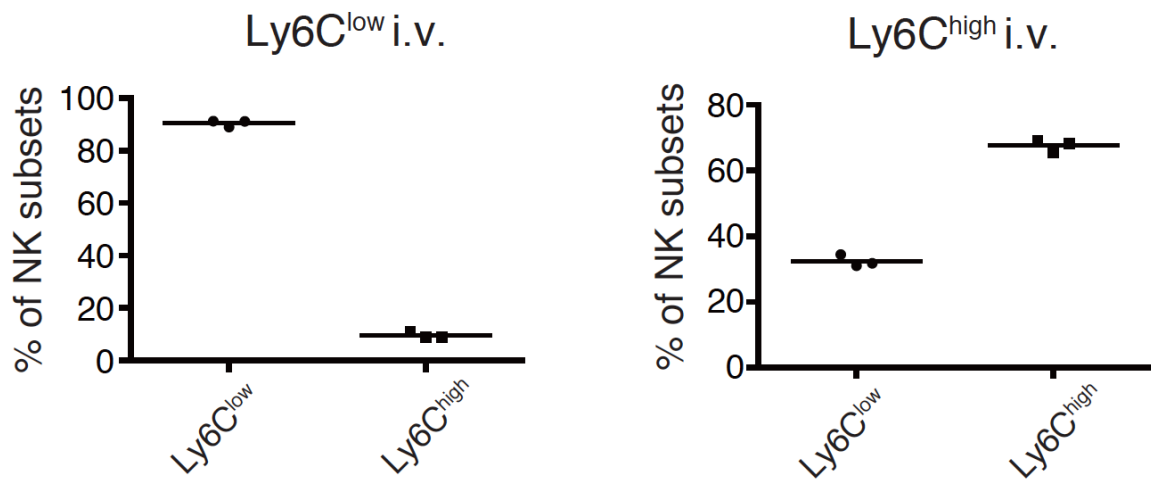
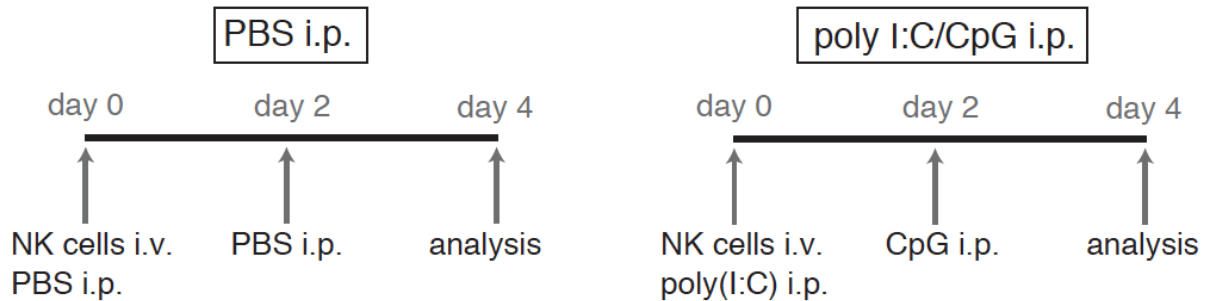


図 2-7-2 poly I:C 投与マウスにおいて Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞へ変化する

(C) ドナー細胞における Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞の割合。左のグラフ (Ly6C^{low} i.v.) は Ly6C^{low} NK 細胞を移植した場合、右のグラフ (Ly6C^{high} i.v.) は Ly6C^{high} NK 細胞を移植した場合の結果である。バーはそれぞれの平均値を示す ($n = 3$)。

A



B

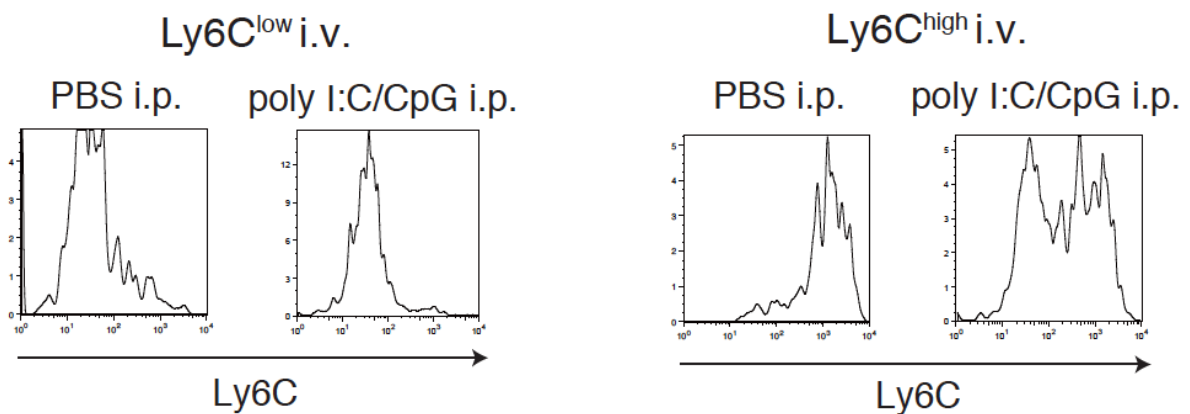


図 2-7-3 poly I:C/ CpG 投与マウスにおいて Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞へ変化する

(A) C57BL/6J-Ly-5.2 マウスの脾臓より Ly6C^{low} NK 細胞もしくは Ly6C^{high} NK 細胞をセルソーターにて分取し、C57BL/6J-Ly-5.1 マウスに尾静脈より移植した。移植直後に poly I:C を腹腔内に投与した。さらに 2 日後、CpG を腹腔内に投与した。移植から 4 日後、レシピエントマウスの脾臓から血球を採取し、ドナー由来 (CD45.2⁺) の NK 細胞の Ly6C の発現をフローサイトメトリーにて解析した。(B) 左の図 (Ly6C^{low} i.v.) は Ly6C^{low} NK 細胞を、右の図 (Ly6C^{high} i.v.) は Ly6C^{high} NK 細胞を移植したマウスの結果である。ヒストグラムは CD45.2⁺CD11b⁺NK1.1⁺CD3e⁻の細胞集団にゲートしてある。これらは、3 回行われた実験のうち、代表的な結果である。

C

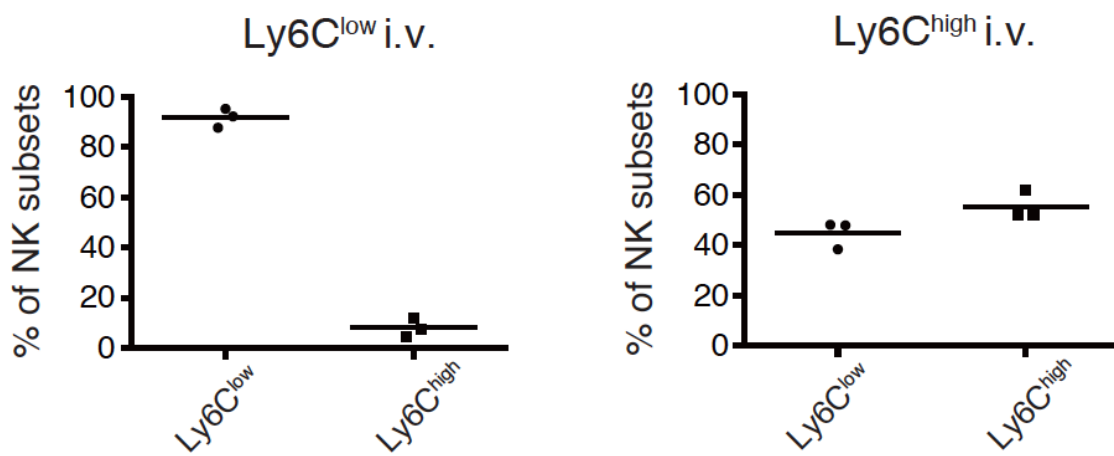


図 2-7-3 poly I:C/ CpG 投与マウスにおいて Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞へ変化する

(C) ドナー細胞における Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞の割合。左のグラフ (Ly6C^{low} i.v.) は Ly6C^{low} NK 細胞を移植した場合、右のグラフ (Ly6C^{high} i.v.) は Ly6C^{high} NK 細胞を移植した場合の結果である。バーはそれぞれの平均値を示す ($n = 3$)。

第四章 考察

生体内における Ly6C^{low} NK 細胞と $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ NK 細胞の発生順序

本研究により、マウス成熟 NK 細胞は Ly6C の発現により Ly6C^{low} NK 細胞と $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ NK 細胞の二つのサブセットに分かれることが明らかとなった。どちらのサブセットもリンパ系、非リンパ系に関わらず、体内の様々な組織・器官に存在していたが、骨髄における $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ NK 細胞の存在比率は Ly6C^{low} NK 細胞の存在比率よりも明らかに低かった。骨髄は一次リンパ組織であり、NK 細胞発生場である (Kim et al., 2002; Yokoyama et al., 2004)。更に、本研究では移植実験により、生体内で Ly6C^{low} NK 細胞が $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ NK 細胞へと変化することを示した。一方で、 $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ NK 細胞のほとんどは Ly6C の発現を高く保っていた。これらの結果は、 $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞に由来することを示している (図 3-1)。

Ly6C^{low} NK 細胞と $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ NK 細胞における活性の比較

NK 細胞は、腫瘍やウイルス感染に対する初期免疫応答に貢献する免疫細胞である。NK 細胞の主な役割としては、抗腫瘍・抗ウイルス反応を増強する $\text{IFN-}\gamma$ を産生することや、腫瘍細胞やウイルス感染細胞に対して傷害性を示すことが挙げられる (Cerwenka and Lanier, 2001; Vivier et al., 2008; Yokoyama and Plougastel, 2003)。本研究では、 $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ NK 細胞

胞による IFN- γ や granzyme B の産生量、および脱顆粒マーカーである CD107a の発現量が Ly6C^{low} NK 細胞よりも低いことを明らかにした。また、Ly6C^{high} NK 細胞と Ly6C^{low} NK 細胞における活性化受容体と抑制性受容体の発現量を比較し、Ly6C^{high} NK 細胞における抑制性受容体の発現が Ly6C^{low} NK 細胞よりも高い傾向にあることを明らかにした。この結果は、Ly6C^{high} NK 細胞における NK 活性が Ly6C^{low} NK 細胞よりも低い、という結果と一致する。さらに、IL-15 で培養した場合、Ly6C^{high} NK 細胞の増殖能は Ly6C^{low} NK 細胞と比べて顕著に低いことが判明した。

以上の結果から、定常状態の Ly6C^{high} NK 細胞の活性は Ly6C^{low} NK 細胞と比べて明らかに抑制されており、休眠状態であることが明らかとなった（図 3-1）。

ヒト成熟 NK 細胞との比較

ヒトでは、成熟した NK 細胞は CD56 の発現により CD56^{bright} NK 細胞と CD56^{dim} NK 細胞の二つのサブセットに分けられることができ、各サブセットがそれぞれ違った機能を持っていることが知られている（Caligiuri, 2008; Cooper et al., 2001; Frey et al., 1998; Jacobs et al., 2001）。CD56^{bright} NK 細胞は多量の IFN- γ を産生するが、細胞傷害能はさほど高くない。一方、CD56^{dim} NK 細胞の細胞傷害能は高いが、IFN- γ の産生量は少ない。さらに、CD56^{dim} NK 細胞は CD56^{bright} NK 細胞から分化することも明らかとなっている（Caligiuri, 2008;

Lanier et al., 1986)。マウス成熟 NK 細胞では先行研究において、本研究の結果と同様に、成熟 NK 細胞の中でも後に出現する分画は IFN- γ 産生能や細胞傷害能が抑制されていることが明らかとなっている。さらに、それらの増殖能が低いことも明らかとなっている (Hayakawa and Smyth, 2006; Huntington et al., 2007; Robbins et al., 2002)。これらの結果はヒト成熟 NK 細胞とは異なっており、これまでの研究では、マウス成熟 NK 細胞における各サブセットの生理学的意義は不明のままであった。

Ly6C^{high} NK 細胞の生理学的意義

本研究によって、Ly6C^{high} NK 細胞は IL-15 存在下で培養すると、Ly6C^{low} NK 細胞 (Ly6C^{low(high)} NK 細胞) へ変化することが明らかとなった。さらに、Ly6C^{low(high)} NK 細胞における IFN- γ と granzyme B の産生量は、IL-15 培養後の Ly6C^{low} NK 細胞 (Ly6C^{low(low)} NK 細胞) における産生量と同等であることも判明した。このように Ly6C^{high} NK 細胞が Ly6C^{low} NK 細胞へ変化する現象は、IL-15 を強制発現したマウスや、IL-15 の発現を促進する poly I:C と CpG を腹腔内投与したマウスにおいても観察された。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^{low} NK 細胞は休眠状態である Ly6C^{high} NK 細胞へと移行する。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^{high} NK 細胞は再活性化され

る。これらの結果は、Ly6C^{high} NK 細胞は IL-15 が高発現される環境下で活性の高い Ly6C^{low} NK 細胞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を示している (図 3-1)。

poly I:C や CpG はウイルスの構成成分であるが、ウイルス感染によって強い炎症が惹起され、Ly6C^{low} NK 細胞のみでは対応しきれない場合に、Ly6C^{high} NK 細胞が再活性化されるのではないだろうか。つまり、Ly6C^{high} NK 細胞は「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にしたものである。また、これまでマウス成熟 NK 細胞は、主に CD27 の発現レベルによって二つのサブセットに分けられてきた。しかし、IL-15 による成熟 NK 細胞の再活性化は CD27 の発現によって追跡することは出来なかった。上記の現象は Ly6C を用いた本研究だからこそ見いだせた特徴であると言える。

他のサイトカイン存在下での培養

IL-2 は IL-15 と同様、NK 細胞の生存や増殖に必須なサイトカインである。そこで、Ly6C^{low} NK 細胞および Ly6C^{high} NK 細胞を IL-2 存在下で培養したところ、IL-15 ほどではないが Ly6C の発現が低下し、培養 6 日目で Ly6C^{high} NK 細胞から Ly6C^{mid(high)} NK 細胞が出現することを見いだした。IL-2 の受容体は α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖から構成されているが、IL-15 受容体と β 鎖と γ 鎖を共有している (Meazza et al., 2011)。IL-15 ほど強い作用ではないが、IL-2 に

よっても Ly6C^{high} NK 細胞から Ly6C^{mid(high)} NK 細胞が出現するのは、このことと何らかの
関係があるのかも知れない。

メモリーCD8⁺T 細胞との類似性

Ly6C は主にリンパ球、単球／マクロファージ、顆粒球、内皮細胞に発現しており、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 (Hanninen et al., 2011; Jutila et al., 1994; Jutila et al., 1988)。興味深いことに、ナイーブ T 細胞における Ly6C の発現は低く、メモリーCD8⁺ T 細胞では Ly6C の発現が高いことが明らかにされている (Hanninen et al., 2011; Sun and Lanier, 2011; Walunas et al., 1995)。NK 細胞と CD8⁺ T 細胞には、多くの共通した性質が存在する (Bezman et al., 2012; Sun and Lanier, 2011)。NK 細胞も T 細胞もリンパ球系に分類され、共通の前駆体から分化する。そして、両者の分化や維持には IL-15 の存在が重要な役割を果たしている。さらに、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、ウイルス感染時に IL-12 に応答して IFN- γ を大量に産生することなども挙げられる。一般的に、メモリーCD8⁺ T 細胞の寿命は長く、一次感染後の活性は抑制されていることが知られている。そして、同じ抗原に再び感染した時に再活性化される (Kaeche et al., 2003; Wherry and Ahmed, 2004)。定常状態では活性が抑制されており、刺激

に応じて再活性化されるという性質をふまえると、Ly6C^{high} NK 細胞はおそらくメモリー CD8⁺ T 細胞と類似の細胞であると考えることができる。

「メモリー」NK 細胞の存在と類似性

NK 細胞はこれまで自然免疫系で働く細胞であると考えられてきた。しかしながら、最近になり、NK 細胞にもメモリー機能が存在し獲得免疫系に寄与しているという報告がされた (O'Leary et al., 2006; Sun et al., 2009)。Sun et al., 2009 によると、サイトメガロウイルス感染のマウスモデルでは、ウイルス特異的な Ly49H 受容体を持つ NK 細胞が、T 細胞と同様に、感染後に脾臓で 100 倍、肝臓で 1000 倍に増殖する。さらに、NK 細胞の半減期は 2 週間とされているが、Ly49H⁺ NK 細胞は感染後数ヶ月もの間、リンパ器官および非リンパ器官に存在し続ける。このような「メモリー」NK 細胞は、再活性化された場合には迅速に細胞傷害性を示し、サイトカインを産生する。そして、「メモリー」NK 細胞を非感染マウスへ移植した後にウイルスに感染させると、強力な二次増殖が起こり、防御性免疫が生じる。興味深いことに、このような「メモリー」NK 細胞は Ly6C の発現が高いことが判明している。さらに、同じグループの研究者は、リンパ球が減少したマウスに成熟 NK 細胞を移植すると、自己複製をする寿命の長い NK 細胞が出現することも明らかにしている (Sun et al., 2011)。そのような NK 細胞はリンパ器官および非リンパ器官において半年以上も存在する

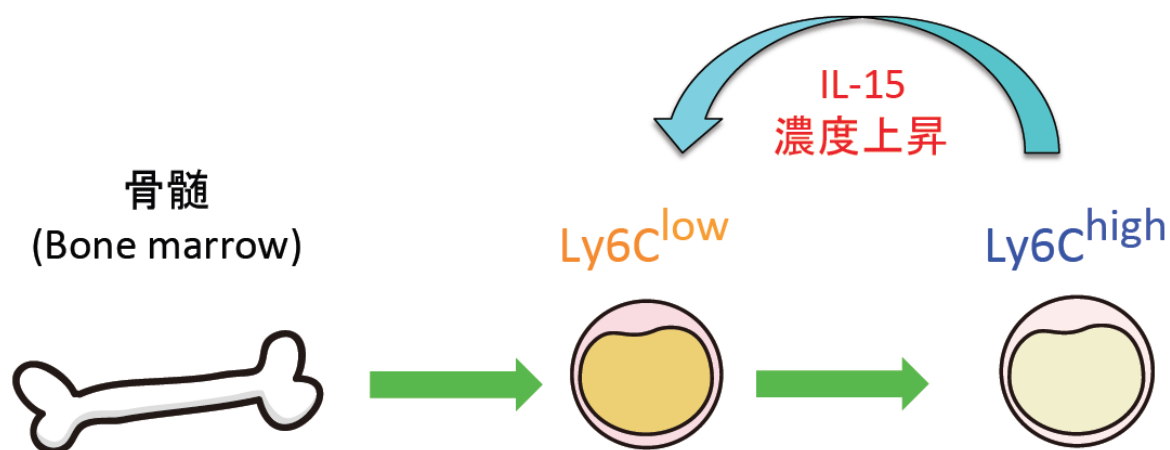
と共に、機能も維持していることが示されており、ウイルスに感染させると強力に反応する。

しかしながら、この「長生き」NK細胞における Ly6C の発現は明らかにされていない。Ly6C^{low}

NK 細胞がどのようなメカニズムで Ly6C^{high} NK 細胞になるのか、また、「メモリー」NK 細

胞や「長生き」NK 細胞と本研究が示した Ly6C^{high} NK 細胞にどのような関係があるのか、

今後更なる研究が必要である。



	Ly6C ^{low}	Ly6C ^{high}
IFN- γ 産生	++	+
granzyme B 産生	++	+
細胞増殖能	++	+

図 3-1 本研究により明らかになったこと

Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞と比べて抗腫瘍・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^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞から生じる 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^{high} NK 細胞は休眠状態にある成熟 NK 細胞であると考えられる。一方、Ly6C^{high} NK 細胞は IL-15 が高発現される環境下で活性の高い Ly6C^{low} NK 細胞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。

第五章 結論

本研究により、Ly6C^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞と比べて抗腫瘍・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^{high} NK 細胞は Ly6C^{low} NK 細胞から生じる 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^{high} NK 細胞は休眠状態にある成熟 NK 細胞であると考えられる。

一方、Ly6C^{high} NK 細胞は IL-15 が高発現される環境下で活性の高い Ly6C^{low} NK 細胞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^{low} NK 細胞は休眠状態である Ly6C^{high} NK 細胞へと移行する。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^{high} NK 細胞は再活性化される。つまり、Ly6C^{high} NK 細胞は「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。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導賜り、また、このような研究の機会を与えてくださいました宮島篤教授に心より御礼を申し上げます。宮島教授のご厚意なしには、免疫分野での研究を進めるという夢は叶えられませんでした。

日頃より、実験のご指導や研究方針に対する適切な助言をくださいました榎本豊助教に心より御礼申し上げます。榎本助教のアドバイスなしには本研究は進められませんでした。

定期的に行われたグループミーティングのみならず、日頃より私とディスカッションしてくださった博士課程学生の木庭乾さんに感謝致します。毎週火曜日、朝から晩まで、セルソーターによるNK細胞の分取を快く行っていたいただいた学術支援員の宮田奈保子さんに感謝致します。本研究で用いた **pLIVE-IL-15 vector** をご供与頂き、研究方針についてアドバイスを頂いた伊藤暢講師に感謝致します。

本研究を行うにあたり、様々なご指導、ご協力をいただきました田中稔特任准教授、木戸丈友助教、および発生・再生研究分野の皆様に感謝致します。

最後に、暖かく見守ってくれた家族に心から感謝致します。

参考文献

Alter, G., Malenfant, J.M., and Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of immunological methods* *294*, 15-22.

Andrade, F., Roy, S., Nicholson, D., Thornberry, N., Rosen, A., and Casciola-Rosen, L. (1998). Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity* *8*, 451-460.

Bamezai, A. (2004). Mouse Ly-6 proteins and their extended family: markers of cell differentiation and regulators of cell signaling. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* *52*, 255-266.

Bezman, N.A., Kim, C.C., Sun, J.C., Min-Oo, G., Hendricks, D.W., Kamimura, Y., Best, J.A., Goldrath, A.W., and Lanier, L.L. (2012). Molecular definition of the identity and activation of natural killer cells. *Nat Immunol* *13*, 1000-1009.

Caligiuri, M.A. (2008). Human natural killer cells. *Blood* *112*, 461-469.

Cerwenka, A., and Lanier, L.L. (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* *1*, 41-49.

Chiossone, L., Chaix, J., Fuseri, N., Roth, C., Vivier, E., and Walzer, T. (2009). Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* *113*, 5488-5496.

Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaeheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., and Caligiuri, M.A. (2001). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* *97*, 3146-3151.

Degli-Esposti, M.A., and Smyth, M.J. (2005). Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* *5*, 112-124.

Douagi, I., Colucci, F., Di Santo, J.P., and Cumano, A. (2002). Identification of the earliest prethymic bipotent T/NK progenitor in murine fetal liver. *Blood* *99*, 463-471.

Eidenschenk, C., Crozat, K., Krebs, P., Arens, R., Popkin, D., Arnold, C.N., Blasius, A.L., Benedict, C.A., Moresco, E.M., Xia, Y., *et al.* (2010). Flt3 permits survival during infection by rendering dendritic cells competent to activate NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 9759-9764.

Falco, M., Marcenaro, E., Romeo, E., Bellora, F., Marras, D., Vely, F., Ferracci, G., Moretta, L., Moretta, A., and Bottino, C. (2004). Homophilic interaction of NTB-A, a member of the CD2 molecular family: induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells. *Eur J Immunol* *34*, 1663-1672.

Flaig, R.M., Stark, S., and Watzl, C. (2004). Cutting edge: NTB-A activates NK cells via homophilic interaction. *J Immunol* *172*, 6524-6527.

Frey, M., Packianathan, N.B., Fehniger, T.A., Ross, M.E., Wang, W.C., Stewart, C.C., Caligiuri, M.A., and Evans, S.S. (1998). Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol* *161*, 400-408.

Hanninen, A., Maksimow, M., Alam, C., Morgan, D.J., and Jalkanen, S. (2011). Ly6C supports preferential homing of central memory CD8+ T cells into lymph nodes. *Eur J Immunol* *41*, 634-644.

Hayakawa, Y., and Smyth, M.J. (2006). CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol* *176*, 1517-1524.

Herberman, R.B., Nunn, M.E., and Lavrin, D.H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *International journal of cancer Journal international du cancer* *16*, 216-229.

Huntington, N.D., Tabarias, H., Fairfax, K., Brady, J., Hayakawa, Y., Degli-Esposti, M.A., Smyth, M.J., Tarlinton, D.M., and Nutt, S.L. (2007). NK cell maturation and peripheral homeostasis is associated with KLRG1 up-regulation. *J Immunol* *178*, 4764-4770.

Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K.W., and Schmidt, R.E. (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* *31*, 3121-3127.

Junt, T., Scandella, E., and Ludewig, B. (2008). Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol* *8*, 764-775.

Jutila, D.B., Kurk, S., and Jutila, M.A. (1994). Differences in the expression of Ly-6C on neutrophils and monocytes following PI-PLC hydrolysis and cellular activation. *Immunol Lett* *41*, 49-57.

Jutila, M.A., Kroese, F.G., Jutila, K.L., Stall, A.M., Fiering, S., Herzenberg, L.A., Berg, E.L., and Butcher, E.C. (1988). Ly-6C is a monocyte/macrophage and endothelial cell differentiation antigen regulated by interferon-gamma. *Eur J Immunol* *18*, 1819-1826.

Kaech, S.M., Tan, J.T., Wherry, E.J., Konieczny, B.T., Surh, C.D., and Ahmed, R. (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* *4*, 1191-1198.

Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N., Butz, E.A., Viney, J.L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C.R., *et al.* (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* *191*, 771-780.

Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* *5*, 112-117.

Kim, S., Iizuka, K., Kang, H.S., Dokun, A., French, A.R., Greco, S., and Yokoyama, W.M. (2002). In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol* *3*, 523-528.

Kuribayashi, K., Gillis, S., Kern, D.E., and Henney, C.S. (1981). Murine NK cell cultures: effects of interleukin-2 and interferon on cell growth and cytotoxic reactivity. *J Immunol* *126*, 2321-2327.

Lanier, L.L. (2005). NK cell recognition. *Annual review of immunology* *23*, 225-274.

Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R., and Phillips, J.H. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* *136*, 4480-4486.

Lanier, L.L., Le, A.M., Phillips, J.H., Warner, N.L., and Babcock, G.F. (1983). Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol* *131*, 1789-1796.

Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Dassopoulos, T., Trettin, S., and Ma, A. (1998). IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* *9*, 669-676.

Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., and Diefenbach, A. (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* *26*, 503-517.

Meazza, R., Azzarone, B., Orengo, A.M., and Ferrini, S. (2011). Role of common-gamma chain cytokines in NK cell development and function: perspectives for immunotherapy. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, 861920.

Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1, 135-145.

Michie, A.M., Carlyle, J.R., Schmitt, T.M., Ljutic, B., Cho, S.K., Fong, Q., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2000). Clonal characterization of a bipotent T cell and NK cell progenitor in the mouse fetal thymus. *J Immunol* 164, 1730-1733.

Moretta, A., Poggi, A., Pende, D., Tripodi, G., Orengo, A.M., Pella, N., Augugliaro, R., Bottino, C., Ciccone, E., and Moretta, L. (1991). CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *J Exp Med* 174, 1393-1398.

Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertonni, F., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 6, 769-776.

Nieto, M., Rodriguez-Fernandez, J.L., Navarro, F., Sancho, D., Frade, J.M., Mellado, M., Martinez, A.C., Cabanas, C., and Sanchez-Madrid, F. (1999). Signaling through CD43 induces natural killer cell activation, chemokine release, and PYK-2 activation. *Blood* 94, 2767-2777.

O'Leary, J.G., Goodarzi, M., Drayton, D.L., and von Andrian, U.H. (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* 7, 507-516.

Ogasawara, K., Hida, S., Azimi, N., Tagaya, Y., Sato, T., Yokochi-Fukuda, T., Waldmann, T.A., Taniguchi, T., and Taki, S. (1998). Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* 391, 700-703.

Robbins, S.H., Nguyen, K.B., Takahashi, N., Mikayama, T., Biron, C.A., and Brossay, L. (2002). Cutting edge: inhibitory functions of the killer cell lectin-like receptor G1 molecule during the activation of mouse NK cells. *J Immunol* *168*, 2585-2589.

Russell, J.H., and Ley, T.J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology* *20*, 323-370.

Sato, N., Yahata, T., Santa, K., Ohta, A., Ohmi, Y., Habu, S., and Nishimura, T. (1996). Functional characterization of NK1.1 + Ly-6C⁺ cells. *Immunol Lett* *54*, 5-9.

Stonier, S.W., and Schluns, K.S. (2010). Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunol Lett* *127*, 85-92.

Strowig, T., Brilot, F., and Munz, C. (2008). Noncytotoxic functions of NK cells: direct pathogen restriction and assistance to adaptive immunity. *J Immunol* *180*, 7785-7791.

Sun, J.C., Beilke, J.N., Bezman, N.A., and Lanier, L.L. (2011). Homeostatic proliferation generates long-lived natural killer cells that respond against viral infection. *J Exp Med* *208*, 357-368.

Sun, J.C., Beilke, J.N., and Lanier, L.L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* *457*, 557-561.

Sun, J.C., and Lanier, L.L. (2011). NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells. *Nat Rev Immunol* *11*, 645-657.

Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* *9*, 503-510.

Walunas, T.L., Bruce, D.S., Dustin, L., Loh, D.Y., and Bluestone, J.A. (1995). Ly-6C is a marker of memory CD8⁺ T cells. *J Immunol* *155*, 1873-1883.

Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., and Vivier, E. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106, 2252-2258.

Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2004). Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *Journal of virology* 78, 5535-5545.

Wooddell, C.I., Reppen, T., Wolff, J.A., and Herweijer, H. (2008). Sustained liver-specific transgene expression from the albumin promoter in mice following hydrodynamic plasmid DNA delivery. *The journal of gene medicine* 10, 551-563.

Yokoyama, W.M., Kim, S., and French, A.R. (2004). The dynamic life of natural killer cells. *Annual review of immunology* 22, 405-429.

Yokoyama, W.M., and Plougastel, B.F. (2003). Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol* 3, 304-316.

Yu, J., Wei, M., Mao, H., Zhang, J., Hughes, T., Mitsui, T., Park, I.K., Hwang, C., Liu, S., Marcucci, G., *et al.* (2009). CD94 defines phenotypically and functionally distinct mouse NK cell subsets. *J Immunol* 183, 4968-4974.

Zhang, G., Budker, V., and Wolff, J.A. (1999). High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Human gene therapy* 10, 1735-1737.

Zhu, Q., Egelston, C., Vivekanandhan, A., Uematsu, S., Akira, S., Klinman, D.M., Belyakov, I.M., and Berzofsky, J.A. (2008). Toll-like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce T cell responses: implications for vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16260-16265.