

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20954

研究課題名(和文) IL-4応答性NK細胞の生体内における役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of IL-4-induced NK cells in vivo

研究代表者

榎本 豊 (Enomoto, Yutaka)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：20608210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Th2免疫応答におけるNK細胞の役割はよくわかっていない。私達はIL-4を過剰発現させたマウスにおけるNK細胞の解析を行い、IL-4が通常のNK細胞とは異なるNK細胞を誘導することを発見した。IL-4は組織常在性のマクロファージの増殖を誘導し、IL-15の産生を介してNK細胞の増殖に寄与する。IL4応答性NK細胞はIFN- γ 、IL-10、GM-CSFの産生能が高く、また細胞傷害活性も高かった。また、Th2免疫応答を誘導する寄生虫感染においてIL4応答性様のNK細胞が誘導されることを確かめた。本研究結果は、免疫応答におけるIL-4の新たな役割を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：The roles of NK cells in Th2-type responses have remained unclear. We examined the characteristics of NK cells in mice overexpressing IL-4. We found that IL-4 overexpression induces distinctive characteristics of NK cells, which are different from mature conventional NK (cNK) cells. IL-4 overexpression induces proliferation of tissue-resident macrophages, which contributes to NK cell proliferation via production of IL-15. These IL-4-induced NK cells (IL4-NK cells) produce higher levels of IFN- γ , IL-10, and GM-CSF, and exhibit high cytotoxicity compared with cNK cells. Finally, parasitic infection, which typically causes strong Th2-type responses, induces the development of NK cells with characteristics similar to IL4-NK cells. These results suggest a novel role of IL-4 in immune responses through the induction of the unique NK cells.

研究分野：免疫

キーワード：NK細胞 IL-4 IL-15 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

肝臓はヒトの体内にある最大の臓器であり、代謝や解毒、胆汁の生成など重要な機能を担っている。また、肝臓は門脈から流入する外来栄養素や腸内細菌由来の菌体成分に常に曝されており、それらを排除するための免疫反応の場としても重要である。しかし、肝臓での持続的な炎症は線維の蓄積を誘導し、やがては肝硬変、肝がんへと進行する要因となる。ウイルス感染、アルコール、薬剤による肝疾患に加えて、近年生活習慣病としての肝疾患の患者が著しく増加しており、肝臓に何らかの疾患を抱えている人は 1000 万人を超えるとも推測されている。多くの肝疾患において免疫反応の重要性が示唆されており、肝臓における免疫反応の機序を解明することが求められている。

免疫応答は、分泌されるサイトカインなどにより、Th1 応答と Th2 応答に大別される。肝臓においては、ウイルス感染による Th1 応答研究が古くから行われてきた。しかし近年、Th2 応答を惹起する免疫細胞により線維の蓄積が誘導されることが新たに明らかになるなど、肝臓における Th2 応答のさらなる解析の重要性が増している。

2. 研究の目的

Th2 応答のイニシエーターとなるサイトカインである IL-4 の作用を解析するため、マウスを用いて IL-4 の肝臓特異的な一過性過剰発現による解析を行った。方法として、大量の溶媒とともに発現プラスミドを尾静脈から注入することで肝細胞特異的な遺伝子導入を行う、Hydrodynamic Tail Vein injection (HTVi) 法を用いた。FACS 解析の結果、IL-4 を過剰発現させた肝臓中で、NK1.1^{high}/CD3⁻ の NK 細胞の顕著な増加が確認された。しかしこの IL-4 応答性 NK は定常状態の NK (conventional NK、以下

cNK) と異なり、B220^{high}/CD11b^{low}/IL18Ra^{low} というマーカー発現パターンを示していた。IL-4 によりこのような NK が生体内で増加することはこれまでに報告がない。そこで IL-4 と NK に着目して解析をした結果、これまでに全く知られていなかった現象が次々と明らかになった (投稿準備中)。以下にその実験結果を示す。

1. IL-4 過剰発現マウスで、NK が高い増殖性を示す (BrdU の陽性率が非常に高い)

2. IL-4 応答性 NK は cNK と比較して細胞傷害に作用するグランザイム B を高発現し、実際に腫瘍細胞に対し強い傷害活性を示す。

3. IL-4 応答性 NK は cNK と比較して IL-12 への応答性が増しており、IL-12 刺激で多量の IFN- γ 、および IL-10 を産生する (図 1)

4. cNK を IL-4 存在下で培養すると、生体内で見られた IL-4 応答性 NK 様の細胞になる。

(同様のマーカーパターン、IL-4 非存在下での培養と比較してグランザイム B の発現上昇、IL-12 への応答性の増加を示す。)

5. *in vitro* での cNK 単独培養では、IL-4 による増殖能の向上は見られない。

6. IL-13 の肝臓内過剰発現では、このような特徴を示す NK は誘導されない。

結果の 2. 及び 4. は IL-4 による NK への直接的な作用だと考えられる。しかし、1. 及び 5. の結果は *in vivo* と *in vitro* での違いを現しており、IL-4 による NK への直接的な作用とは考えられない。そこで改めて IL-4 過剰発現マウスの肝臓を解析した結果、肝臓に常在するマクロファージであるクッパー細胞が顕著に増加していることが明らかになった。マクロファージは、NK の増殖因子である IL-15 を NK に提示する主要な細胞の一つとして知られている。そこで、クッパー細胞と cNK を共培養した

結果、さらに以下の現象を発見した。

7. IL-4 過剰発現マウス由来のクッパー細胞との共培養の方が、野生型マウス由来のクッパー細胞との共培養と比較して NK の生存数が大きい(図2)

8. 共培養系に IL-15 の中和抗体を加えると、NK の生存率が低下する。

以上より、IL-4 による NK の増加には、クッパー細胞の作用が重要であることが示唆された。

本研究ではこれまで得られた知見を元に、まず IL-4 により IL-4 応答性 NK が誘導されるまでの詳細なメカニズムを明らかにする。これにより、生体内の IL-4 を起点として生じる新たな免疫応答機構を解明する。さらに、IL-4 応答性 NK の遺伝子発現解析、Th2 応答を惹起する肝疾患における役割の解析を行い、生理学的意義の解明を目指す。

3. 研究の方法

マウスにおける肝臓特異的な IL-4 の過剰発現に応じて増加する IL-4 応答性 NK の生理的役割を解明するため、まず生体内での誘導メカニズムを解析する。さらに、生体内における IL-4 応答性 NK の役割を明らかにするため、IL-4 の発現が上昇する Th2 応答を誘導し、NK の動態と機能の解析を行う。

4. 研究成果

Th2 免疫応答における NK 細胞の役割はよくわかっていない。私達は IL-4 を過剰発現させたマウスにおける NK 細胞の解析を行い、IL-4 が通常の NK 細胞とは異なる NK 細胞を誘導することを発見した。IL-4 は組織常在性のマクロファージの増殖を誘導し、IL-15 の産生を介して NK 細胞の増殖に寄与する。IL4 応答性 NK 細胞は IFN- γ 、IL-10、GM-CSF の産生能が高く、また細胞傷害活性も高かった。また、Th2 免疫応答を誘導する寄生虫感染において IL4 応答性様の NK 細胞が誘導されることを確

かめた。本研究結果は、免疫応答における IL-4 の新たな役割を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1、Kiniwa T, Enomoto Y, Terazawa N, Omi A, Miyata N, Ishiwata K, Miyajima A. NK cells activated by Interleukin-4 in cooperation with Interleukin-15 exhibit distinctive characteristics

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 査読有 113(36): 10139-44 (2016)

[学会発表](計 2 件)

(1)第44回日本免疫学会学術集会 平成27年11月18日 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

Kiniwa T, Enomoto Y, Omi A, Miyajima A

「A unique subset of NK cells induced by IL-4 during Th2 responses」(ポスター発表)

(2) IMMUNOLOGY 2015 AAI Annual Meeting 平成27年5月11日 New Orleans (アメリカ)

Kiniwa T, Enomoto Y, Omi A, Miyajima A

「Interleukin 4 induces a unique NK cell population in vivo and in vitro」(ポスター発表)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 豊 (ENOMOTO, Yutaka)
東京大学 分子細胞生物学研究所 助教
研究者番号：20608210

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()