

論文の内容の要旨

論文題目 マウス鼻腔粘膜免疫におけるナチュラルキラー細胞の解析

氏名 岡田 和也

ナチュラルキラー細胞 (Natural Killer cells, 以下 NK 細胞)は自然免疫を担うリンパ球の一種であり、生体の恒常性維持、防御に深く関わる細胞である。NK 細胞は細胞障害活性とサイトカイン産生能を持ち、ウイルスを含む感染、あるいは腫瘍細胞の排除において中心的な働きを担っている。NK 細胞の分画や機能は組織によって異なっていることが明らかにされてきており、特に近年の粘膜免疫学の発展に伴い、腸管や子宮内膜などのさまざまな粘膜面で特徴的な NK 細胞が同定されている。

鼻腔をはじめとする上気道は、解剖学的位置から各種抗原や病原体などの侵入経路となりやすいため、生体防御の最前線として重要な場所であり、そこでの免疫機構の解明は特に呼吸器感染症に対する予防・治療戦略を構築する上で重要であると考えられる。しかしながら、自然免疫に関していえば、これまでに上気道、特に鼻腔の NK 細胞はほとんど解析されておらず、その分画や機能は未だに明らかにされていない。

今回の研究課題では、マウス鼻腔 NK 細胞の同定、および分画・機能の解析を目的とした。研究対象として NK 細胞特異的受容体 NKp46 をコードする遺伝子 *Ncr1* のエクソンを *GFP* 遺伝子で置換した *Ncr1*^{GFP/+} ノックインマウスを使用し、組織中での NK 細胞の解析に役立てた。

まずは免疫組織化学染色により、NKp46 陽性 NK 細胞を鼻腔内に同定した。NK 細胞は広く鼻腔の粘膜固有層に分布していたが、その中でも鼻中隔に多くみられる傾向があった。一方で、鼻

咽腔関連リンパ組織にはほとんど存在していなかった。

次にフローサイトメトリー解析により、鼻腔 NKp46 陽性細胞における表面マーカーの発現を検討した。鼻腔 NKp46 陽性細胞は CD3 陰性、CD122 陽性、NK1.1 陽性、2B4 陽性かつ CD49b 陽性であり、脾臓や肺由来の NKp46 陽性細胞と同様、NK 前駆細胞から十分に NK 細胞へと分化を果たした細胞であると考えられた。一方、NKp46 陽性でありながら、NK1.1 陰性で IL-22 を産生するとされる、腸管で見出された NK-22 細胞は、脾臓や肺同様、鼻腔でも認められなかった。

続いて鼻腔 NK 細胞の詳細を明らかにするため、Ly49 受容体ファミリーの発現レパートリーを比較した。脾臓 NK 細胞に比較して、肺および鼻腔 NK 細胞では Ly49C/F/H/I 受容体の陽性細胞の割合が有意に低下しており ($p < 0.01$)、また Ly49D 受容体陽性細胞の割合は鼻腔で有意に低下していた ($p < 0.05$)。

NK 細胞の成熟・活性化に関わる表面マーカーの検索を行ったところ、肺の NK 細胞の 80%近くが CD27^{low}CD11b^{high} の「老化」を示す表現型を取るのに対し、鼻腔では CD27^{high}CD11b^{low} の比較的幼若な NK 細胞が 40%近くを占め、有意に高い割合を占めていた ($p < 0.01$)。また NK 細胞における CD127 の発現は脾臓、肺、鼻腔でほとんど差がなかったが、特に活性化マーカーである CD69 の発現が鼻腔で脾臓や肺に比べて有意に上昇しており ($p < 0.05$)、一部の鼻腔 NK 細胞が何らかの要因で活性化状態にあることが示唆された。

さらに NK 細胞の機能についても検討を加えた。細胞傷害活性を司るグランザイム B の細胞内での発現量は脾臓、鼻腔、肺それぞれの NK 細胞で差を認めなかった。一方、phorbol-12-myristate-13-acetate (以下 PMA) および ionomycin (以下 iono) 、あるいは IL-12 および IL-18 により *in vitro* で刺激すると、脱顆粒能を反映するとされる CD107a 陽性細胞の割合が、脾臓 NK 細胞に対して肺あるいは鼻腔 NK 細胞では有意に低下していた ($p < 0.01$)。また、インターフェロン γ 産生 NK 細胞の割合も、PMA および iono による刺激では脾臓 NK 細胞に比べて肺および鼻腔 NK 細胞で有意に低下していた ($p < 0.01$) が、さらに IL-12 および IL-18 の存在下では、鼻腔 NK 細胞において脾臓のみならず、肺由来 NK 細胞に比較しても有意に低下していた ($p < 0.05$)。

このように、*in vitro* での鼻腔 NK 細胞の反応性が減弱していることが判明したため、鼻腔 NK 細胞が実際に *in vivo* で機能しているか否かを検討するため、鼻腔インフルエンザウイルス感染モデルを採用し解析を行った。インフルエンザウイルス Influenza A/Puerto Rico/8/34 を無麻酔下でマウス鼻腔内に投与することで鼻腔内に感染させた。感染後 2 日目には、鼻腔 NK 細胞のリンパ球全体に占める割合および細胞数が有意に増加し ($p < 0.05$)、感染後 5 日目に至るまで維持されていた。一方、鼻腔 NK 細胞での CD69 の発現は、感染後 2 日目の時点では変化がないが、感染後 5 日目には有意に上昇しており ($p < 0.05$)、感染の際には NK 細胞が比較的早期に鼻腔内で増加し、その後活性化されているであろうことが示唆された。

より直接的に NK 細胞の関与を検討するため、NK 細胞の除去を試みた。抗 NK1.1 抗体を、同抗体を産生するハイブリドーマを腹腔内投与したヌードマウスの腹水より精製し、実際に腹腔内投与により *in vivo* で脾臓および鼻腔 NK 細胞を除去することを確認した。この抗体により NK 細胞を除去した群では対照群に比較して、鼻腔内のウイルス価が感染後 2 日目では差がなかったが、感染後 5 日目には有意に増加しており ($p < 0.05$)、鼻腔 NK 細胞がインフルエンザウイルス感染の制御において重要な役割を果たしていることが示された。

このように、鼻腔 NK 細胞は、脾臓 NK 細胞、あるいは肺の NK 細胞と比較しても表面マーカーの発現や機能の面でユニークな細胞であることが明らかになった。このような相違が生み出される機構については今後の研究課題であるが、既に報告されている皮膚 NK 細胞と鼻腔 NK 細胞との類似点や、同じ粘膜面でも腸管で見出される NK-22 細胞が腸内細菌に依存していることなどを考え合わせると、粘膜面における共生細菌叢の有無、あるいは構成細菌の相違が、NK 細胞の分画や機能に影響を与える可能性があると考えられた。また、特に同じ呼吸器に属する鼻腔と肺での分画の相違を手がかりとして、上気道と下気道の粘膜免疫をそれぞれ制御するメカニズムを解明できるのではないかと期待される。

また、インフルエンザウイルス感染時に、鼻腔 NK 細胞が重要な役割を果たしていることが改めて示された。他の呼吸器感染ウイルス、あるいは細菌感染時の NK 細胞の関与については今後の検討を要するが、少なくとも鼻腔 NK 細胞は上気道粘膜免疫において、自然免疫系を担う主要な細胞の一つであることが示唆された。NK 細胞の担う自然免疫系による抗ウイルス能は、T 細胞や B 細胞による獲得免疫系と異なり抗原による事前の感作が必要ない。そのため、鼻腔 NK 細胞の活性をコントロールすることにより、様々な呼吸器感染症に対する予防、あるいは治療に結びつけられるのではないかと考える。

以上より本研究は、鼻腔 NK 細胞が生体防御において重要な鼻腔粘膜免疫システムの構成要素であることを示しており、今後の呼吸器粘膜免疫学の発展の上で基礎となる成果と考えられた。