

学位論文題名

Natural killer T cells from interleukin-4-deficient mice
are defective in early interferon- γ production in
response to α -galactosylceramide

(α -GalCer 反応性 NKT 細胞の IL-4 を介した IFN- γ 産生機構の解明)

学位論文内容の要旨

[Introduction and Aim]

NK1.1⁺ T cells (NKT cells) are characterized by the expression of a single invariant T-cell receptor α (TCR α) chain encoded by V α 14-J α 281 and activated by the specific ligand, α -GalCer in a CD1d-dependent manner. They promptly produce large amount of T-helper type 1 (Th1) cytokines and T-helper type 2 (Th2) cytokines at the same time and are considered to play an important role as immunoregulatory cells in antitumor immunity, autoimmunity and maintaining some forms of tolerance. Therefore, it is of great important to investigate the mechanisms underlying the regulation of cytokine production by NKT cells to develop a new strategy for immune diseases.

Here we demonstrated the role of IL-4 in the production of IFN- γ from NKT cells using IL-4^{-/-} mice during the stimulation of α -GalCer. Since IL-4 antagonizes IFN- γ production, we at first estimated that IFN- γ production from NKT cells might be augmented in IL-4^{-/-} mice. However unexpectedly the level of IFN- γ of NKT cell was mostly diminished in the early stage of activation.

[Materials and Methods]

Mice. C57BL/6 mice were purchased from Charles River Japan (Kanagawa). IL-4-deficient mice on C57BL/6 background were kindly donated by Dr. Y. Iwakura (Tokyo University, Tokyo, Japan).

Monoclonal antibodies and reagents. PE-Anti-IL-4, FITC-Anti-IFN-g, APC-Anti-NK1.1, PerCp-Anti-CD3 mAb were purchased from Pharmingen (San Diego, CA). Mitomycin-C was purchased from Kyowa (Tokyo, Japan). α -GalCer used for this study was donated by Kirin Brewery Co., Ltd., Japan.

Intracellular cytokine detections of NKT cells in vivo

Hepatic lymphocytes obtained from mice 1, 2 or 4hrs after intravenous (i.v.) injection of α -GalCer (2 μ g/mouse) were stained with PerCp-Anti-CD3 mAb and APC-Anti-NK1.1 mAb. Washed several times they were fixed with 4% paraformaldehyde and then treated with permeabilizing solution. The fixed cells were further stained with FITC-Anti-IFN- γ mAb and PE-Anti-IL-4 mAb. The percentages of cytoplasmic IL-4 and IFN- γ expressing cells were determined by flour-color flow cytometry using a FACSCalibur (Becton Dickinson).

Add-back system of purified NKT cells and DCs Spleen cells were incubated on nylon wool

columns for 45min, and the nonadherent cells were used for the isolation of NK1.1⁺CD3⁺ (NKT) cells by cell sorting with a FACSVantage™ instrument (Becton Dickinson). In order to purify DCs, spleen cells were incubated in 10-cm plastic dishes (Falcon; Becton Dickinson) for 2h, and the nonadherent cells were removed from the culture. The adherent cells were further incubated overnight and the nonadherent cells were harvested. Then, CD11c⁺B220⁻CD4⁺CD8⁻ cells were isolated from the nonadherent populations by cell sorting and used as the source of DCs after mitomycin-C treatment.

To build add-back system of purified NKT and DCs, splenic DCs (2x10⁵) from wt mice or IL-4^{-/-} mice were cocultured with purified NK1.1⁺CD3⁺ NKT cells (2x10⁵) from wt mice or IL-4^{-/-} mice in the presence of 200 ng/ml of α -GalCer in 96-well U-bottomed plates. After incubation for 36h, IL-2 and IFN- γ activity in the culture supernatants were detected by ELISA kits (PharMingen).

[Result and Discussion]

The discovery of NKT cell-specific ligand, α -galactosylceramide (α -GalCer), enables us to investigate the functional regulation of NKT cells. However, the detail mechanism of cytokine production by NKT cells remains to be elucidated. Here we evaluated the role of IL-4 in the production of IFN- γ from NKT cells using IL-4-deficient C57BL/6 mice (IL-4^{-/-} mice). Administration of α -GalCer into wild-type C57BL/6 mice caused the production of both IFN- γ and IL-4 in serum or cytoplasm within 4 hrs after the injection. Unexpectedly, however, IL-4^{-/-} mice-derived NKT cells did not produce any IFN- γ at early phase after primary stimulation with α -GalCer. The number of NKT cells in IL-4^{-/-} mice was the same as that of wild-type mice, thus there appeared to be function defect in NKT cells derived from IL-4^{-/-} mice. Since NKT cells from IL-4^{-/-} mice produced IFN- γ when they were secondarily stimulated with α -GalCer in vitro for 72 hrs and IL-4^{-/-} NKT cells were surely activated in this system because IL-2 production and the elevation of IFN- γ mRNA was induced even in IL-4^{-/-} NKT cells by stimulation with α -GalCer, NKT cells from IL-4^{-/-} mice were not completely genetic defect for IFN- γ production. To elucidate which cells, NKT cell or dendritic cell (DC), were responsible for the deficient property of IFN- γ production in IL-4^{-/-} mice, we performed add-back experiment using purified NKT cells and DCs, which were prepared from either wild-type mice or IL-4^{-/-} mice. NKT cells from wild-type mice produced IFN- γ when they were co-cultured with DC prepared from either wild-type or IL-4^{-/-} mice, whereas NKT cells from IL-4^{-/-} mice did not produce IFN- γ by co-culturing with DCs from either wt or IL-4^{-/-} mice. These results indicated that NKT cell, but not DC ruled the deficient property of IFN- γ production in IL-4^{-/-} mice. Thus IL-4 is required for the activation of NKT cells to produce IFN- γ in response to α -GalCer.

Some groups reported that in some condition IL-4-primed DCs produce IL-12, which introduce NKT cells to produce IFN- γ . Another group reported that IL-4 enhanced the response of NKT cells to IL-2 and IL-12, leading to the production of IFN- γ . Then, to examine whether IL-4 from NKT cells is involved in the following IFN- γ production through such mechanisms, we added exogenous rIL-4 to cross-cocultivation system or injected rIL-4 directly into IL-4^{-/-} mice. However, IFN- γ production was not recovered in both systems, (data not shown), indicating that unknown other mechanisms were involved in the IFN- γ -deficient property in IL-4^{-/-} mice, which could not be recovered by later addition of rIL-4. We proposed that IL-4 might play an unknown, but critical role for the functional development of NKT cells in vivo for the production of IFN- γ . We are now planning for the next experiment using chimeric mice of IL-4^{-/-} mice and IFN- γ ^{-/-} mice to unveil the critical role of IL-4 in functional development of NKT cells.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

Natural killer T cells from interleukin-4-deficient mice are defective in early interferon- γ production in response to α -galactosylceramide

(α -GalCer 反応性 NKT 細胞の IL-4 を介した IFN- γ 産生機構の解明)

本研究では、C57BL/6 マウス由来 NKT 細胞のインターフェロン- γ (IFN- γ) 産生に対する IL-4 サイトカインの影響について検討した。IL-4 ノックアウト (KO) マウスでは、 α -galactosylceramide (α -GalCer) 刺激後、NKT 細胞からの早期の IFN- γ 産生が欠損しており、IL-4 の IFN- γ 産生における重要性が示された。そこで、ワイルドタイプ (WT) と IL-4KO マウスより得た樹状細胞 (DC)、NKT 細胞相互の組み合わせの培養系で、 α -GalCer で刺激を加えたところ、WT マウスの DC で α -GalCer を提示された IL-4KO マウス NKT 細胞は IFN- γ を産生出来ず、逆に IL-4KO マウスの DC と α -GalCer で刺激された WT マウス NKT 細胞は IFN- γ を産生した。このことから NKT 細胞自身の産生する IL-4 が NKT 細胞からの IFN- γ 産生に重要であることが示された。

学位論文の口頭発表後、副査の上出利光教授から、NKT 細胞の *in vitro* 刺激増殖系で、siRNA など IL-4 産生を抑制したとき IFN- γ 産生が抑制されるかどうか、IFN- γ が産生されないのは分泌される経路に問題あるのではないかという質問があった。それに対し申請者は、IL-4KO マウスで IFN- γ 産生が減弱するのは α -GalCer 刺激による初期反応だけであること、細胞内染色でも IFN- γ 産生が認められないので分泌が問題なのではないと回答した。また、NKT 細胞は初期に IL-4 single positive 細胞になり、次に IFN- γ との double positive 細胞になるが、それを証明した報告はあるのかという質問に対して、文献では未だ報告がない、血清においても IL-4 産生が先であるから矛盾しないと回答した。最後に IL-4KO マウスの NKT 細胞における T-bet や NF- κ B、GATA3 などの転写因子の発現はどうなっているのかという質問に対し、C57BL/6 の IL-4 レセプター KO マウスがないので直接証明することはできないが、IL-4 を添加しても IFN- γ の回復は起こらないので、IL-4 はおそらく NKT 細胞の分化の過程で重要な役割を果たしているであろうと回答した。

次に主査の小野江和則教授から、IFN- γ が欠損している現象は NKT 細胞以外でも見られるか、 α -GalCer 以外の刺激に対しても同様の現象がみられるか、またインバリエント NKT

細胞を同定するのに α -GalCer-テトラマーを使う必要はないのかという質問に対し、Th1/Th2 バランスを調節する細胞としてNKT細胞しか検討していないこと、後の二つ質問に対しては今後の検討課題であると回答した。また、C57BL/6 以外の IL-4KO マウスで実験を行ったことがあるかという質問に対して、マウスが手に入れば試みたいと回答した。

最後に副査の西村孝司教授から、STAT6 KO マウスでは IFN- γ 産生が欠損しないことから考えると、IL-4 には STAT6 以外のシグナルが存在するのではないかという質問に対して、否定はできないが IL-4 の添加によっても IFN- γ 産生が回復しないので、NKT 細胞が分化する過程で IL-4 の存在が必要であろうと回答した。また、 α -GalCer と同時に IL-12 を投与すると部分的に IFN- γ 産生が回復するが、完全回復するわけではないので今後さらに検討が必要と回答した。

この論文は、IL-4 が NKT 細胞の正常分化に重要であることを初めて明らかにした。NKT 細胞は生体内において Th1 型サイトカインと Th2 型サイトカインを同時に産生できる細胞として注目されており、今後、IL-4 による IFN- γ 産生調節の詳細な機構解明が進めば、Th1/Th2 サイトカインバランス制御による様々な免疫疾患の治療につながる事が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、これまでの研鑽なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。