

Title	Autocrine IL-15 Mediates Intestinal Epithelial Cell Death Via the Activation of Neighboring Intraepithelial NK Cells
Author(s)	木下, 直俊
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43928">https://hdl.handle.net/11094/43928</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	木下直俊
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 17644 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Autocrine IL-15 Mediates Intestinal Epithelial Cell Death Via the Activation of Neighboring Intraepithelial NK Cells (IL-15 により活性化された腸管上皮間 NK 細胞による上皮細胞の細胞死制御)
論文審査委員	(主査) 教授 清野 宏 (副査) 教授 菊谷 仁 教授 宮坂 昌之

#### 論文内容の要旨

[目的] 腸上皮間リンパ球 (IEL) は上皮細胞 (IEC) と基底膜の間に存在し、両者間には SCF、KGF、IL-7 などサイトカインを介した相互依存性制御システムが存在している。今回我々はその腸管上皮細胞死制御メカニズムについての解明を試みた。そこで近年粘膜免疫で注目されている IL-15 を用い、IEC-IEL クロストークへの影響について共培養系を用いた解析を行った。

[方法と成績] 共培養系には、IEC として C3H/He マウス小腸由来の上皮細胞株 MODE-K を、IEL として同系マウスの小腸から採取した新鮮分離 IEL 細胞を用いた。この共培養系の観察結果から、IEL の存在下でのみ IEC の細胞死が誘導されることを見いだした。

次に IEL により誘導された IEC の細胞死を定量化するために、DNA 断片化試験を行った。具体的には標的細胞である MODE-K の DNA を  $^3\text{H}$ -thymidine で標識したのちエフェクター細胞として各種 IEL 分画と共に 6 時間培養し、培養プレートに付着している細胞内  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みを測定し、細胞死を定量した。

マウスから採取した直後の IEL を IL-7、IL-15 と共に前処理したのち MODE-K と共培養したところ、IL-15 処理群でのみ MODE-K の細胞死が有意に高く誘導された。

IEL には胸腺由来と非胸腺由来細胞群が混在している事が知られている。そこで IL-15 で前処理した IEL を胸腺由来 T 細胞群 ( $\text{CD4}^+$  及び  $\text{CD4}^-\text{CD8}\alpha\beta^+$ )、非胸腺由来 T 細胞群 I ( $\text{CD4}^-\text{CD8}\alpha\alpha^+$ ) と非胸腺由来 T 細胞群 II ( $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ ) に磁気ビーズ (MACS 法) を用いて分離精製した後、MODE-K と共に培養すると非胸腺由来 T 細胞群 II が有意に MODE-K の細胞死を誘導することが分かった。この群は更に  $\text{TCR}^+$  と  $\text{TCR}^-$  に分かれるので、それぞれの群について同様の実験をしたところ、 $\text{TCR}^-$  群が MODE-K の細胞死を誘導することが明らかとなった。この  $\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{TCR}^-$  IEL は NK マーカーである DX5 陽性であり Ly-49 や NKG2 などの NK レセプターも発現していたことから NK 細胞 (NK-IEL) と考えられた。また IL-15 は NK-IEL に対する増殖活性を持っていることが分かった。

次に NK-IEL による IEC 細胞死誘導メカニズムを明らかにするため、perforin と Fas-L に注目した。まず、新鮮

分離 IEL を IL-15 存在下で培養し定量 RT-PCR により解析したところ、perforin 特異的 mRNA の発現増強が認められた。同じ手法を用いて、IL-15 で処理した CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>TCR<sup>-</sup> の NK-IEL 分画で有意に perforin mRNA の発現が高いことも分かった。次に NK-IEL での Fas-L 発現を FACS で解析したところ発現が認められなかった。更に perforin の阻害剤である Concanamycin A を共培養系に添加すると NK-IEL による MODE-K への細胞死が阻止された。一方 Fas-L と Fas との結合を阻害する Fas-Fc 融合タンパクを用いた場合には細胞死は阻止できなかった。以上の結果から NK-IEL が perforin を介して IEC に細胞死を誘導するという事実が見出された。

[総括] 従来よりマウスの IEL には NK 細胞活性があることが知られており、その一部は非胸腺由来の T 細胞によると考えられていた。今回、上皮細胞由来サイトカインの一つである IL-15 によって CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>TCR<sup>-</sup> NK-IEL が増殖し perforin の活性化を介して IEC の細胞死を誘導する事が分かった。このことから IEC によって分泌された IL-15 がその近傍にいる NK-IEL を活性化し IEC 自身の細胞死を誘導するという新たな制御システムが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は腸管における免疫ホメオスタシスの維持に重要な役割を担う腸上皮間リンパ球と腸管上皮細胞について、新たな相互作用を明らかにしたものである。現在までに KGF、IL-7 などのサイトカインを介した腸上皮間リンパ球と腸上皮細胞の相互制御メカニズムが報告されている。この論文は、IL-15 が腸上皮間 NK リンパ球を活性化し近傍の上皮細胞の細胞死を誘導するという、新たな制御メカニズムを示唆している。実験系も精緻であり論理の構築にも不備はない。よって、本論文は学位の授与に値すると考えられる。