

加齢に伴うマウス肝内NK細胞の機能変化

白 雪 峰

新潟大学大学院医歯学総合研究科機能再建医学講座

消化器・一般外科学分野（主任：畠山勝義教授）

新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学講座

免疫・医動物学分野（指導：安保 徹教授）

Age - associated Change of the Quantity and Quality of NK Cells in the Liver

XueFeng BAI

Department of Regenerative and Transplant Medicine,

Division of Digestive and General Surgery

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Katsuyoshi HATAKEYAMA)

Department of Infectious Disease Control and International Medicine,

Division of Immunology and Medical zoology

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Toru ABO)

要 旨

Natural killer (NK) 細胞は加齢に伴いその細胞傷害活性が変化することが分かっている。成熟期の肝内NK細胞は脾と末梢血内NK細胞と同じ程度の細胞傷害活性を有するという報告もあるものの、若齢肝内NK細胞に関しては不明な点が多い。本研究では、肝臓におけるNK細胞の加齢による変化を phenotype と機能の点を中心に解析した。

各週齢の C57BL/6 マウス及び 2, 8 週齢 perforin (−/−) マウスを使用した。肝と脾内の単核球を採取した。細胞傷害活性を測定するために、4 時間 ^{51}Cr 遊離試験を行った。二、三重免疫蛍光染色によってNK細胞における Mac-1, CD69, Fas-L, Ly49C/I, CD94 及び NKG2 を解析した。また、2, 8 週齢 B6 マウス肝内単核球の perforin 及び Fas-L を RT-PCR 法により測定した。

肝内NK細胞の細胞傷害活性は2週齢時に最大となった。その現象は脾臓では認められなかった。8週齢肝内には CD69^{low} Mac-1^{high} NK細胞が多いのに対して、2週齢肝内NK細胞はほぼ CD69^{high} Mac-1^{low} であった。また、2週齢の肝内NK細胞のほとんどが Ly49C/I^{low}, CD94^{high}, NKG2^{high} であったが、8週齢の肝内NK細胞では Ly49C/I^{high}, CD94^{low}, NKG2^{low}

Reprint requests to: Katsuyoshi HATAKEYAMA
Department of Regenerative and
Transplant Medicine,
Division of Digestive and General Surgery
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科機能再建医学講座
消化器・一般外科学分野 畠山勝義

であった。2週齢マウスの肝単核球では perforin の発現は増大していた。

今回の研究では、成熟マウス（8週齢）より若齢マウス（2週齢）の肝内NK細胞は強い細胞傷害活性を有することが明らかになった。その細胞傷害活性は perforin を使用していると考えられた。2週齢マウスの肝内NK細胞は無刺激でも活性化された状態であると考えられた。以上の事実から、肝内NK細胞は肝臓という特殊な環境で成熟し、通常のNK細胞と異なった性質を有するものと考えられた。

キーワード：NK細胞, 肝臓, 加齢, 細胞傷害活性

緒 言

NK細胞は自然免疫におけるエフェクターであり生体防御における重要な役割が明らかにされている¹⁾。NK細胞はおもに perforin, Fas-L及びTRAILを介して標的細胞を傷害することが報告されている^{2)–5)}。

肝臓は胎生期の造血器官としてNK細胞の分化と深い関係があり、ヒトとマウスの肝臓の中には豊富なNK細胞が存在する。NK細胞は骨髄由来の幹細胞から分化していると報告されている一方、胎生期の肝内にNK細胞の幹細胞を有するとの報告もある^{6)–8)}。

NK細胞数及び機能と加齢の関係は多く報告されているものの^{9)–16)}、その由来器官（肝臓、脾臓及び末梢血）及び分化段階の違いなどにより、その報告には多様性がある。人間の末梢血とマウスの脾臓、末梢血NKの加齢の変化は一致しているという報告が多い¹⁰⁾¹²⁾。すなわち、新生期ではNK細胞の細胞傷害活性が低くて、すぐ上昇し、若齢期では成熟NK細胞と同等の細胞傷害活性を有すると報告されている¹²⁾。肝臓では、胎生時と新生期のNK細胞傷害活性の低下が多く報告されているものの¹⁶⁾、若齢期から成熟期にかけての肝臓内NK細胞の機能と phenotype の加齢に伴う変化は不明な点が多い。

本研究では、肝臓におけるNK細胞の加齢による変化を phenotype と機能の点を中心に解析した。

材料と方法

1. マウス

1, 2, 4, 8, 12週齢と48週齢C57BL/6 (B6)

と2, 8週齢 perforin (–/–) (PKO, B6 back-ground) マウス¹⁷⁾を使用した。上記マウスは新潟大学動物実験施設にてSPF環境下で飼育されたものである。

2. 単核球の調製

マウス肝臓と脾臓を細切後、200ゲージのステンレスメッシュを通しEagle's MEM (Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) で洗浄後、脾臓は0.83% NH₄Cl-Tris buffer (pH7.6) で溶血させ、単核球を分離した。肝臓は35% percoll で比重遠心した後、0.83% NH₄Cl-Tris buffer (pH7.6) で溶血させ、単核球を分離した¹⁸⁾。

3. 細胞傷害試験

常法にて4時間⁵¹Cr遊離試験を行った¹⁹⁾²⁰⁾。標的細胞はYAC-1, EL-4及びB6胸腺細胞を用いた。Effector細胞には肝臓から得た単核細胞を用いた。

4. フローサイトメトリーによる解析

単核球を抗マウスモノクローナル抗体で二重及び三重染色し、フローサイトメトリーを用いて解析した²¹⁾。

Fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) 及び biotin 標識された以下の抗マウスモノクローナル抗体を使用した。Anti-CD3 (145-2C11), anti-IL-2R β (IL-2 receptor β -chain; TM- β 1), anti-NK1.1 (PK136), anti-CD69 (H1.2F3), anti-Ly49C/I (5E6), anti-CD94 (18d3), anti-NKG2 (20d5), anti-Fas-L (MFL3) and anti-Mac-1 (M1/70) mAbs (PharMingen Co., San Diego, CA) を使用した。

5. RT-PCR法によるmRNA発現解析

常法にて細胞傷害活性関連分子とサイトカインのmRNAをRT-PCR法で測定した²²⁾。プライマ

ーは以下のものを使用した. Perforin: sense 5'-GCT CCT TCC CAG TGA ACA CA-3', antisense 5'-GTG GTA AGC ATG CTC TGT GG-3'; Fas ligand (L): sense 5'-ATG GTT CTG GTG GCT CTG GT-3', antisense 5'-GTT TAG GGG CTG GTT GTT GC-3'; G3PDH: sense 5'-ACC ACA GTC CAT GAA ATC AC-3', antisense 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'.

結 果

1. 加齢に伴う肝臓のNK細胞数の変化

2週齢と8週齢マウス肝及び脾単核球を, 抗CD3及びIL-2R β , CD3及びNK1.1の二重染色で解析を行った(図1A). NK細胞は, CD3⁻IL-2R β ⁺またはCD3⁻NK1.1⁺で同定した. 脾臓のNK細胞の比率は加齢によって2倍以上増えるのに対して, 肝臓ではNK細胞の比率は2週齢と8週齢で差を認めなかった. 肝内NK細胞の絶対数は, 2週齢が 3×10^5 , 8週齢が 4×10^5 と8週齢が2週齢より多かった一方, 臓器重量あたりのNK細胞数は, 2週齢が $12.5 \times 10^5/g$, 8週齢が $3.8 \times 10^5/g$ と2週齢において8週齢より多く認められた(図1B). 脾臓内NK細胞の絶対数と臓器重量あたりの細胞数は, 8週齢のほうが多かった.

2. 肝NK細胞の加齢に伴う細胞傷害活性の変化

加齢に伴うNK細胞傷害活性の変化について, YAC-1を標的細胞として, 1, 2, 4, 8, 12, 48週齢肝臓および脾臓内リンパ球のNK細胞傷害活性を測定して, NK細胞比率あたりの細胞傷害活性を解析した(図2A). 肝臓ではすでに1週齢より強い細胞傷害活性を有しており, 2週齢時に最大となり, 8週齢まで徐々に低下し, 8週齢以降48週齢までは安定状態であった. 脾臓では1週齢より弱い細胞傷害活性を有していたが, 加齢に伴い強くなり, 8週齢以降肝臓と同じ程度の細胞傷害活性を有していた.

さらに, 2週齢と8週齢B6マウスNK細胞細胞傷害活性についてYAC-1, B6マウス胸腺細胞

及びEL-4を標的細胞として解析を行った(図2B). YAC-1を標的細胞とした場合に, 2週齢肝NK細胞傷害活性が極めて高いものの, EL-4及びB6胸腺細胞では2週齢と8週齢のマウスで差を認めなかった. 一方, 脾臓では, 8週齢マウスでYAC-1に対する細胞傷害活性がやや強かったものの, 他の標的細胞では差を認めなかった. PKOマウスのNK細胞傷害活性を解析したところ, 週齢に関係なくNK細胞傷害活性は顕著に低下していた(図2C).

3. 若齢と成熟マウスNK細胞の細胞表面抗原の解析

肝及び脾単核球を三重染色でNK細胞におけるMac-1, CD69, Fas-L, Ly49C/1, CD94及びNKG2の発現を解析した(図3).

肝臓では2週齢の肝内NK細胞はCD69とFas-Lが高値を示し(78.0%と10.3%), 8週齢では低値を示し(26.0%と3.4%), 有意差を認めた. Mac-1について, 2週齢ではNK細胞中の22.0%がMac-1陽性を示したのに対して, 8週齢では71.0%と高値を示した. Ly49C/1の発現は, 2週齢のほうが8週齢に比し有意差をもって低値を呈し(19.4%と52.6%), 逆にCD94とNKG2は8週齢より2週齢の方が有意差をもって高値を示した(図3A).

脾臓内NK細胞では, 若齢でCD69の発現が弱かった以外, 加齢による変化は認められなかった.

4. Mac-1陽性及びMac-1陰性NK細胞におけるCD69の発現

Mac-1は成熟NK細胞のマーカーと考えられている. Mac-1⁻未熟なNK細胞は2週齢肝臓と脾臓に多数存在した. 加齢に伴うMac-1⁺及びMac-1⁻NK細胞におけるCD69の発現を解析した(図4).

肝臓のMac-1⁻NK細胞は週齢にかかわらずCD69を強く発現していた. 肝臓のMac-1⁺NK細胞は若齢のみでCD69を強く発現していた.

脾臓では, 週齢と関係なくMac-1⁺とMac-1⁻NK細胞のいずれも低値CD69を発現した.

5. 細胞傷害活性関連分子のmRNA発現解析

細胞傷害活性関連分子の発現についてRT-

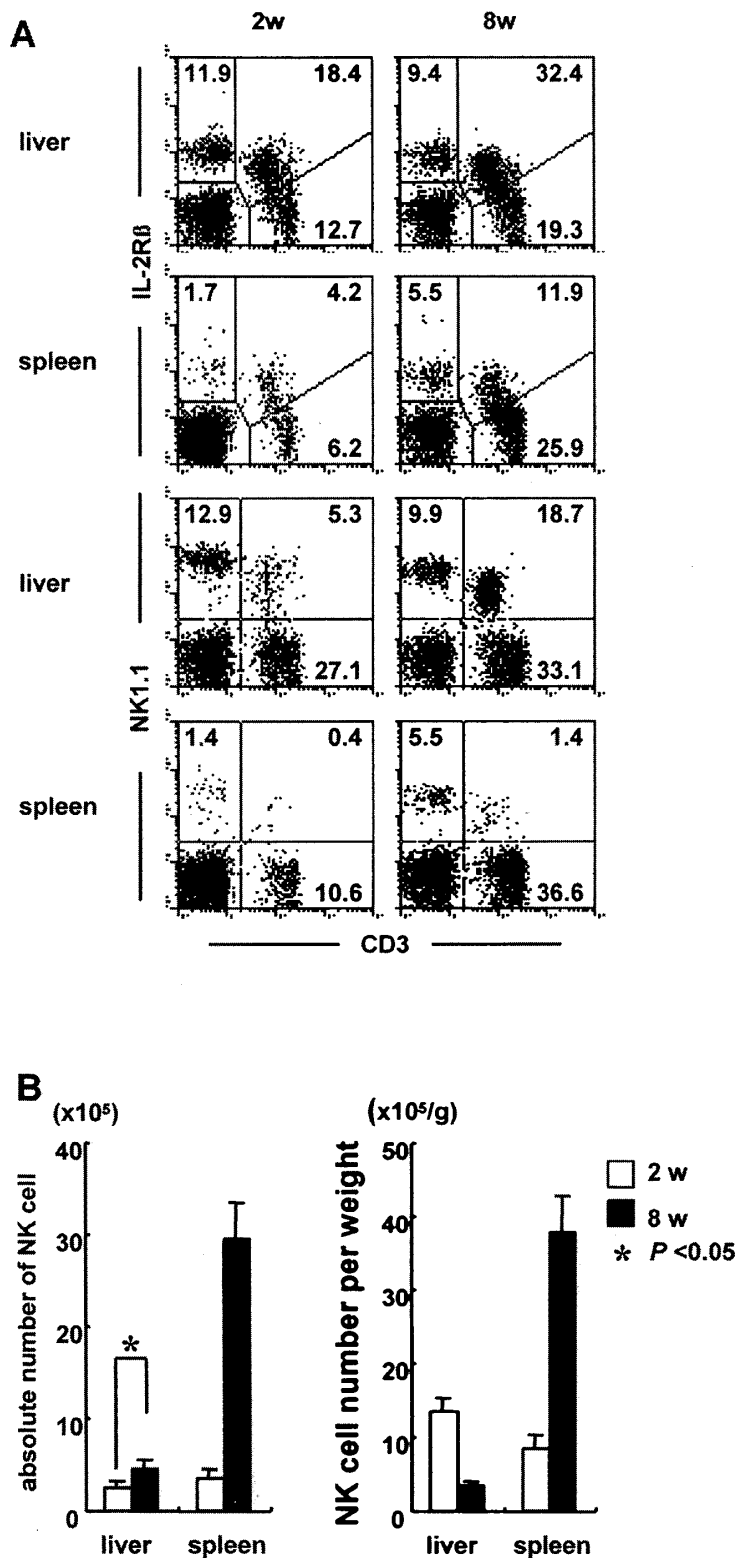


図 1

(A) 2週齢と8週齢マウス肝臓及び脾臓内リンパ球各サブセットをCD3, IL-2R β 及びNK1.1により二重染色で解析を行った。図中の数値は各サブセットの比率を示す。(B) 週齢別肝臓及び脾臓内NK細胞の絶対数($\times 10^5$)と肝臓重量あたりNK細胞数($\times 10^5/g$)を示した。

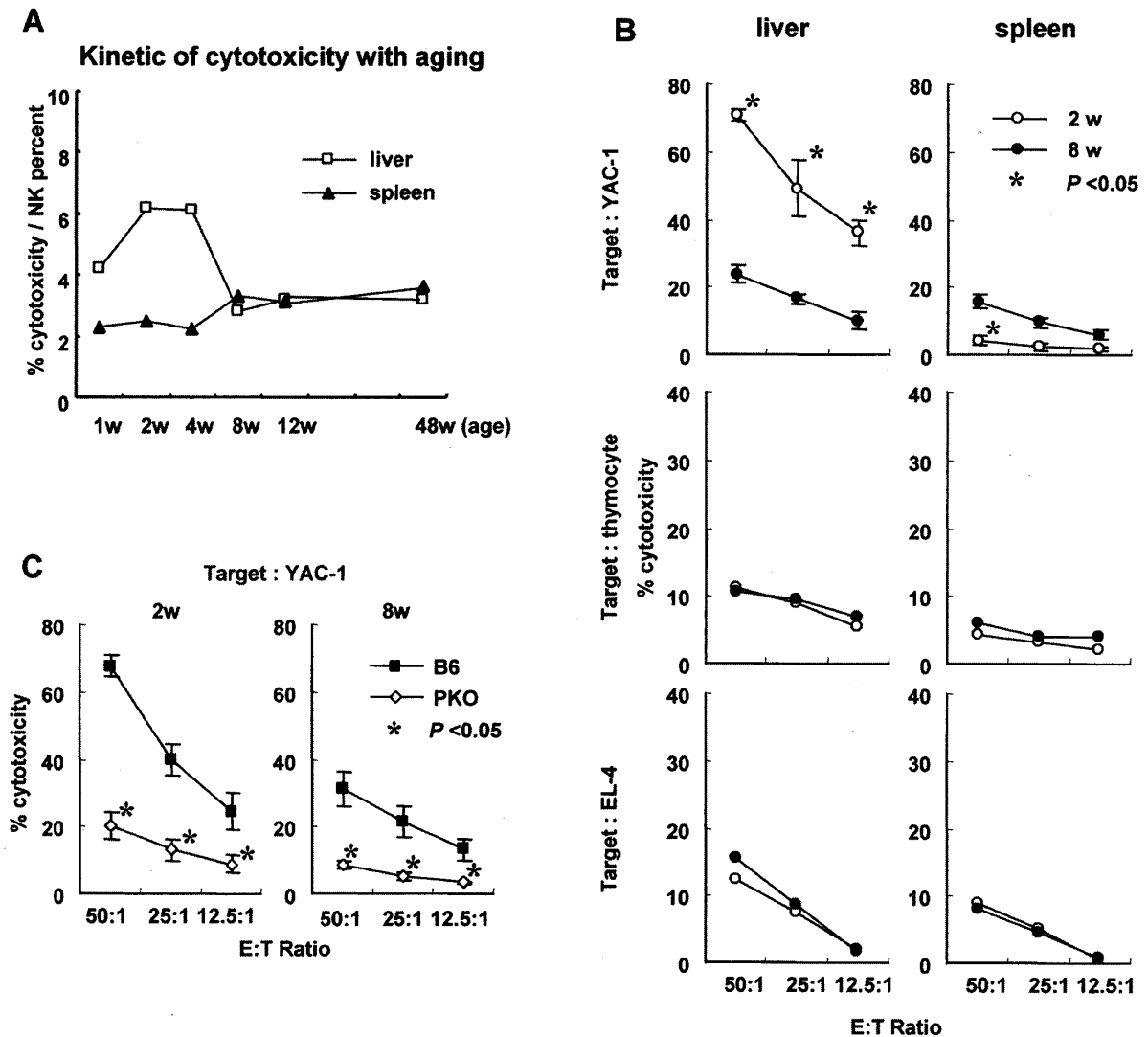


図2

(A) 週齢別肝臓及び脾臓内単核球をエフェクターした。標的細胞はYAC-1である。(B) 2週齢と8週齢B6マウス肝単核球をエフェクターした。標的細胞はYAC-1, B6胸腺細胞及びEL-4である。(C) 2週齢と8週齢perforin(-/-)(PKO)マウス肝単核球をエフェクターした。標的細胞はYAC-1細胞とした。エフェクターと標的細胞の比率は50:1, 25:1及び12.5:1である。

PCR法で解析を行った(図5)。2週齢マウスの肝単核球では、8週齢マウスの肝単核球に比しperforinの発現は増大していた。一方、Fas-Lの発現は加齢によって差を認めなかった。

考 察

今回の研究では、肝臓のNK細胞の加齢による

性質と機能の変化について解析した。成熟マウス(8週齢)より若齢マウス(2週齢)肝内NK細胞は、強い細胞傷害活性を有することが明らかになった。

臓器内NK細胞数は加齢に伴い増えることが認められた。その原因は以前の報告¹¹⁾と同様に、臓器の重量が加齢に伴って増えることと考えられた。臓器内NK細胞絶対数及び臓器重量1gあた

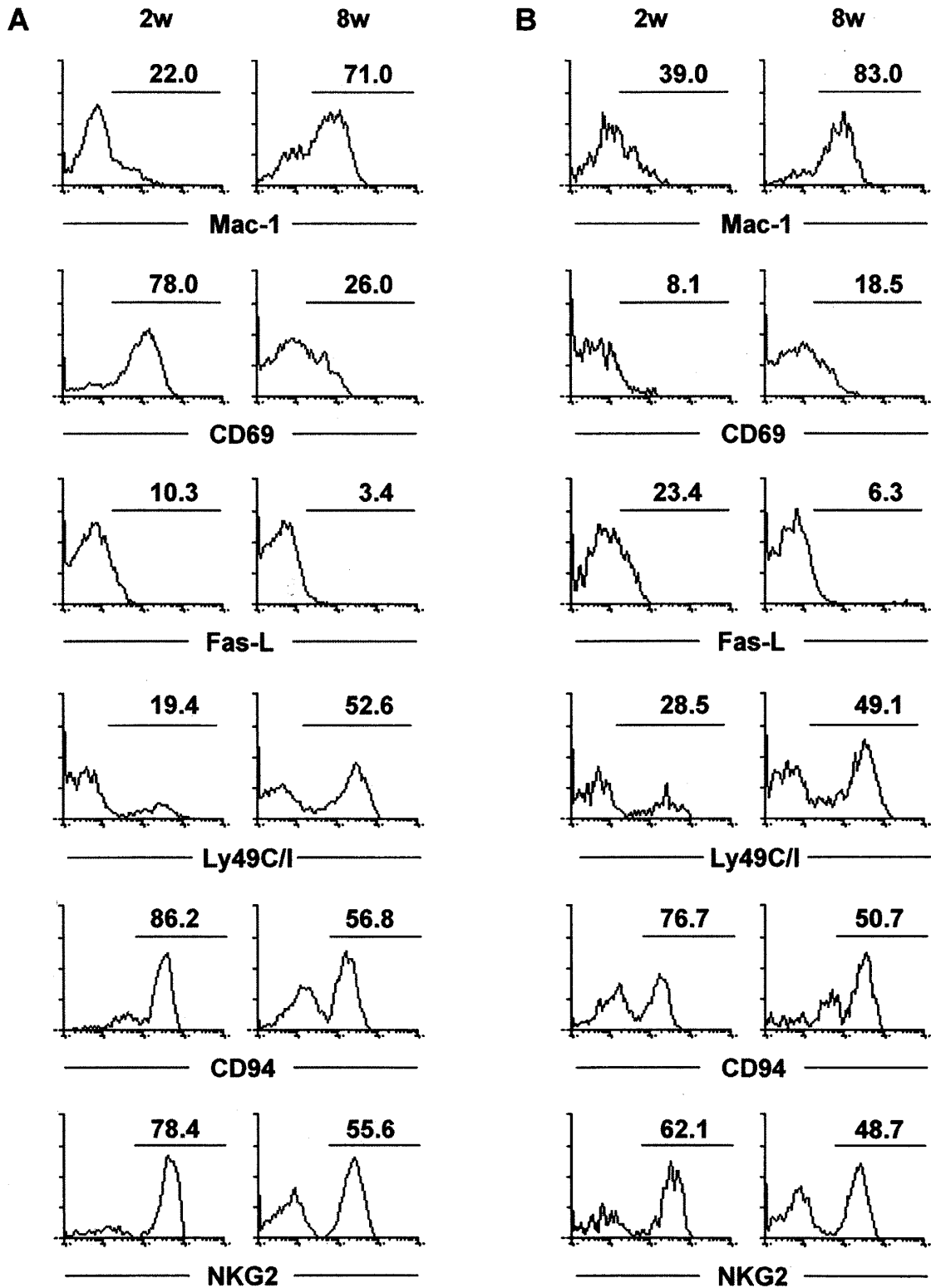


図3

NK細胞はCD3⁻NK1.1⁺によって同定され、三重染色で肝臓(A)及び脾臓(B)NK細胞におけるMac-1, CD69, Fas-L, Ly49C/I, CD94及びNKG2を解析した。図内の数値は各抗体陽性NK細胞の比率を示す。

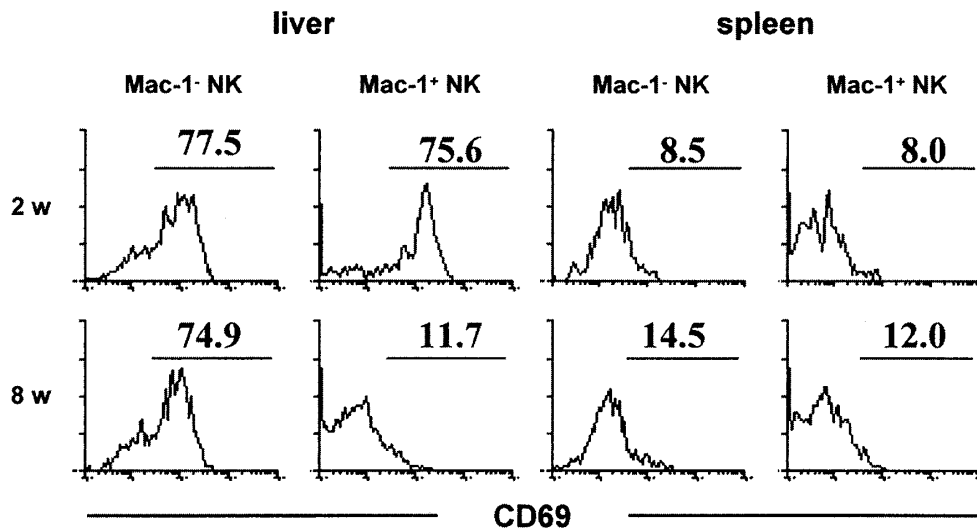


図 4

2, 8 週齢マウスの肝臓と脾臓の Mac-1⁺及び Mac-1⁻ NK 細胞における CD69 を解析した. 図内の数値は各抗体陽性 NK 細胞の比率を示す.

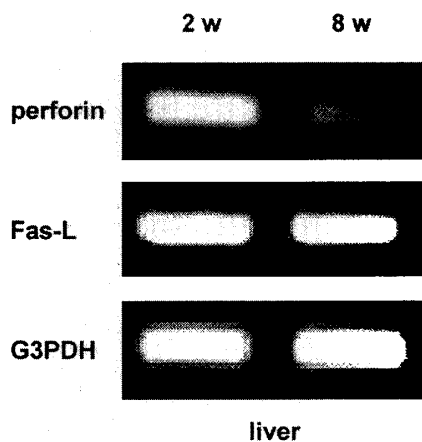


図 5

2 週齢と 8 週齢 B6 マウス肝臓単核球の perforin 及び Fas-L を RT-PCR 法により測定した.

りの NK 細胞数については, 脾臓では加齢に伴い両方増加するものの, 肝臓では NK 細胞絶対数は加齢により増加したが, 臓器重量 1 g あたりの NK 細胞数は減少した. このことより, 若齢マウスの肝臓では単位重量あたり NK 細胞が多く存在し, 肝臓での免疫に対し重要な役割を担っている

ことが考えられた.

マウス及びヒトの NK 細胞の細胞傷害活性は加齢に伴って変化することが多く報告されている^{9) - 16)}. 脾臓と末梢血では, 若齢では弱い細胞傷害活性を有して加齢に伴い上昇して成熟期以降安定状態になるという報告がある^{9) 10) 12)}. また, 臍帯血では弱い細胞傷害活性を有するものの, IL-2, IL-18 などのサイトカインに刺激された場合は末梢血と同等の細胞傷害活性を示すという報告もある¹⁴⁾. 一方, 肝臓では, 胎生期と新生期及び若齢の NK 細胞細胞傷害活性が低下するという報告もあった^{15) 16)}.

今回の我々の研究では, YAC-1 細胞を標的として肝臓と脾臓内 NK 細胞細胞傷害活性を解析した. 肝内 NK 細胞はすでに 1 週齢より強い細胞傷害活性を有しており, 2 週齢時に最大となり, 8 週齢まで徐々に低下し, 8 週齢以降 48 週齢までは安定状態であることが分かった. 脾臓では, 今までの報告に一致して, 若齢では弱い細胞傷害活性を示し, 8 週齢以降肝臓と同じ細胞傷害活性を有していた. 以上から, 若齢の肝臓においての NK 細胞では強力な細胞傷害を有するということが機能的にも明らかになった.

NK細胞は perforin と Fas-L 及び TRAIL を介して細胞傷害能力を発揮する。NK細胞はサイトカインに刺激された後、強い Fas-L 及び TRAIL を発現し、細胞傷害作用を発現するという報告がある一方²⁾³⁾、静止及び活性化NK細胞は主に perforin を介して細胞傷害活性を発現するという報告もある⁴⁾。今回の検討では、PKOマウスの肝内NK細胞の細胞傷害活性は抑制されていることから、その細胞傷害活性に perforin を使用している可能性が示唆された。また、その機能が2週齢マウスで強く、2週齢マウスの perforin mRNA が多いことよりからも肝臓内NK細胞はその細胞傷害活性に perforin を使用していると考えられた。

NK細胞表面には、活性化リセプター及び抑制リセプターがある。NK細胞の機能はこのリセプターにより支配される。その中、CD94, NKG2はNK細胞の活性化リセプター、Ly49C/IはNK細胞の抑制リセプターと考えられている^{23)–25)}。成熟マウスでは、肝臓と脾臓でその発現パターンは変わらなかったが、若齢マウスの肝内NK細胞では、Ly49C/Iの発現が低く、CD94, NKG2の発現が高かった。このことより若齢マウス肝内NK細胞の強い細胞傷害活性にはLy49C/I, CD94, NKG2が関与していると考えられた。

興味深いのはCD69の発現パターンである。CD69は、リンパ球早期活性化マーカーとして知られており、NK細胞の細胞障害活性及びサイトカイン産生と深い関係があると報告されている²⁶⁾²⁷⁾。自然状態では、常に低値であるものの、IL-2, IL-18, INF- γ などサイトカインの刺激により強く発現するといわれている²⁷⁾。我々は、2週齢マウスの肝内NK細胞はCD69を発現している細胞が多いことを観察した。8週齢の肝臓と2, 8週齢の脾臓NK細胞はCD69の発現は低値であった。さらにMac-1は、骨髄系細胞のマーカーとして知られており、成熟NK細胞において発現する^{28)–30)}。我々は、未熟型NK細胞(Mac-1⁻)と成熟型NK細胞(Mac-1⁺)におけるCD69の発現も解析した。肝臓では2週齢と8週齢の未熟型NK細胞(Mac-1⁻)は同等の高値CD69を発現したが、成熟型NK細胞(Mac-1⁺)

では2週齢の方が高値のCD69を発現した。脾臓では週齢とMac-1陽性か否かに関係なく、いずれもCD69陽性細胞が少なかった。このことより、2週齢マウスの肝内NK細胞は無刺激でも活性化された状態であると考えられた。以上より肝内NK細胞、特に若齢期では通常のNK細胞と違ったNK細胞が存在することが明らかになった。

肝臓は胎生期造血器官としてNK前駆細胞も有するといわれている⁶⁾。その前駆細胞は成熟期でも存在しているという報告もある⁷⁾。肝臓内環境及び肝細胞はNK細胞の発育成熟において重要な役割をもつという報告もある⁸⁾。このような事から、今回の検討で認められた肝内NK細胞は肝臓という特殊な環境で成熟しているのではないかと考えられた。

結 語

若齢期に肝臓内に多数存在するNK細胞は、強い細胞傷害活性を有する。その細胞表面抗原の発現は通常のNK細胞と異なり、その起源も発生学的に違う細胞であることが示唆された。これらの細胞は、若齢期の生体防御に強く関わっているのではないかと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導御校閲を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科免疫医動物学分野、安保徹教授、同消化器一般外科学分野、島山勝義教授に深謝致します。また直接御指導頂きました免疫医動物学分野、関川弘雄助教授、川村俊彦講師、富山(宮路)智香子医学部保健学科教務職員、同消化器一般外科学分野、飯合恒夫助手の皆様に深謝致します。

尚、本研究の一部は第33回日本免疫学会にて発表した(2003年、福岡)。

文 献

- 1) Cerwenka A and Lanier LL: Nature killer cells, viruses, and cancer. *Nat Rev Immunol* 1: 41–49, 2001.
- 2) Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L,

- Alnemri ES and Perussia B: Natural killer (NK) cell - mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 188: 2375 - 2380, 1998.
- 3) Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Takeda K, Akiba H, Tsutsui H, Okamura H, Nakanishi K, Okumura K and Yagita H: Expression and function of TNF - related apoptosis - inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol* 163: 1906 - 1913, 1999.
 - 4) Lee RK, Spielman J, Zhao DY, Olsen KJ and Podack ER: Perforin, Fas ligand, and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine - activated killer cells. *J Immunol* 157: 1919 - 1925, 1996.
 - 5) Miyaji C, Watanabe H, Miyakawa R, Yokoyama H, Tsukada C, Ishimoto Y, Miyazawa S and Abo T: Identification of effector cells for TNF α mediated cytotoxicity against WEHI164S cells. *Cell Immunol* 216: 43 - 49, 2002.
 - 6) Kaneda K, Dan C and Wake K: Pit cells as natural killer cells. *Biomed Res* 4: 567 - 576, 1983.
 - 7) Watanabe H, Miyaji C, Seki S and Abo T: c - kit $^+$ stem cells and thymocyte precursors in the livers of adult mice. *J Exp Med* 184: 687 - 693, 1996.
 - 8) Bordoni V, Alonzi T, Agrati C, Poccia F and Tripodil M: Murine hepatocyte cell lines promote expansion and differentiation of NK cells from stem cell precursors. *Hepatology* 39: 1508 - 1516, 2004.
 - 9) Itoh K, Suzuki R, Umezu Y, Hanaumi K and Kumagai K: Studies of murine large granular lymphocytes. II. Tissue, strain, and age distributions of LGL and LAL. *J Immunol* 129: 395 - 405, 1982.
 - 10) Koo GC, Peppard JR and Hatzfeld A: Ontogeny of Nk - 1 $^+$ natural killer cells 1. Proportion of Nk - 1 $^+$ cells in fetal, baby, and old mice. *J Immunol* 129: 867 - 871, 1982.
 - 11) Itoh H, Abo T, Sugawara S, Kanno A and Kumagai K: Age - related variation in the proportion and activity of murine liver natural killer cells and their cytotoxicity against regeneration hepatocytes. *J Immunol* 141: 315 - 323, 1988.
 - 12) Yabuhara A, Kawai H and Komiyama A: Development of natural killer cytotoxicity during childhood: Marked increases in number of natural killer cells with adequate cytotoxic abilities during infancy to early childhood. *Pediatr Res* 28: 316 - 322, 1990.
 - 13) Kutza J and Murasko DM: Age - associated decline in IL - 2 and IL - 12 induction of LAK cell activity of human PBMC samples. *Mech Ageing Dev* 90: 209 - 222, 1996.
 - 14) Nomura A, Takada H, Jin CH, Tanaka T, Ohga S and Hara T: Functional analyses of cord blood natural killer cells and T cells: a distinctive interleukin - 18 response. *Exp Hematol* 29: 1169 - 1176, 2001.
 - 15) Uksila J, Lassila O, Hirvonen T and Toivanen P: Development of natural killer cell function in the human fetus. *J Immunol* 130: 153 - 156, 1983.
 - 16) Takeda K, Cretney E, Hayakawa Y, Ota T, Akiba H, Ogasawara K, Yagita H, Kinoshita K, Okumura K and Smyth MJ: TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse, liver. *Blood* 105: 2082 - 2089, 2005.
 - 17) Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM and Hengartner H: Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin - deficient mice. *Nature* 369: 31 - 37, 1994.
 - 18) Watanabe H, Miyaji C, Kawachi Y, Iiai T, Ohtsuka K, Iwanaga T, Takahashi - Iwanaga H and Abo T: Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1 $^+$ T cells in various immune organs. NK1.1 $^+$ T cells are present within a population of intermediate TCR cells. *J Immunol* 155: 2972 - 2983, 1995.
 - 19) Minagawa M, Oya H, Yamamoto S, Shimizu T, Bannai M, Kawamura H, Hatakeyama K and Abo T: Intensive expansion of natural killer T cells in the early phase of hepatocyte regeneration after partial hepatectomy in mice and its association with sympathetic nerve activation. *Hepatology* 31: 907 - 915, 2000.

- 20) Oya H, Kawamura T, Shimizu T, Bannai M, Kawamura H, Minagawa M, Watanabe H, Hatakeyama K and Abo T: The differential effect of stress on natural killer T and NK cell function. *Clin Exp Immunol* 121: 384 - 390, 2000.
- 21) Yamagiwa S, Kuwano Y, Hasegawa K, Sato K, Ohtsuka K, Iiai T, Tomiyama K, Watanabe H, Sugahara S, Seki S, Asakura H and Abo T: Existence of a small population of IL - 2R^{hi} TCR^{int} cells in SCG and MRL - *lpr/lpr* mice which produce normal Fas mRNA and Fas molecules from the *lpr* gene. *Eur J Immunol* 26: 1409 - 1416, 1996.
- 22) Mannoor MK, Halder RC, Morshed SRM, Ariyasinghe A, Bakir HY, Kawamura H, Watanabe H, Sekikawa H and Abo T: Essential role of extrathymic T cells in protection against malaria. *J Immunol* 169: 301 - 306, 2002.
- 23) Dorfman JR and Raulet DH: Acquisition of Ly49 receptor expression by developing natural killer cells. *J Exp Med* 187: 609 - 618, 1998.
- 24) Vance RE, Jamieson AM and Raulet DH: Recognition of the class I b molecule Qa - 1^b by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells. *J Exp Med* 190: 1801 - 1812, 1999.
- 25) Fraser KP, Gays F, Robinson JH, van Beneden K, Leclercq G, Vance RE, Raulet DH and Brooks CG: NK cells developing *in vitro* from fetal mouse progenitors express at least one member of the Ly49 family that is acquired in a time - dependent and stochastic manner independently of CD94 and NKG2. *Eur J Immunol* 32: 868 - 878, 2002.
- 26) Pisegna S, Zingoni A, Pirozzi G, Cinque B, Cifone MG, Morrone S, Piccoli M, Frati L, Palmieri G and Santoni A: Src - dependent Syk activation controls CD69 - mediated signaling and function on human NK cells. *J Immunol* 169: 68 - 74, 2002.
- 27) Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Pena J and Solana R: CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* 97: 159 - 165, 1999.
- 28) Kim S, Iizuka K, Kang HSP, Dokun A, French AR, Greco S and Yokoyama WM: *In vivo* developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol* 3: 523 - 528, 2002.
- 29) Werfel T, Witter W and Gotze O: CD11b and CD11c antigens are rapidly increased on human natural killer cells upon activation. *J Immunol* 147: 2423 - 2427, 1991.
- 30) Vetvicka V, Hanikyrova M, Vetvickova J and Ross GD: Regulation of CR3 (CD11b/CD18) - dependent natural killer (NK) cell cytotoxicity by tumour target cell MHC class I molecules. *Clin Exp Immunol* 115: 229 - 235, 1999.

(平成 17 年 1 月 14 日受付)