

トレーニングがNK細胞の活性化レセプターにおよぼす影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 明治大学人文科学研究所 公開日: 2014-03-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴井, 正敏 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10291/16423

トレーニングがNK細胞の活性化レセプターに およぼす影響

鈴 井 正 敏

Effects of Training on NK cell activating receptors.

SUZUI Masatoshi

PURPOSE: Natural killer (NK) cells are large cytotoxic lymphocytes and play important roles in the innate immune system. NK cell cytotoxic activity is controlled by both activating and inhibitory receptors. There are many activating receptors on NK cell surface, and are responsible for eliminating tumor cells and infected cells. We have previously reported that chronic exercise induces changes in cytolytic activity per NK cell. These receptors might be influenced by the repeated exercise. In the present study, we examined the impact of training on the activating receptors, and the relationships between cytotoxicity and expression of these receptors during training.

METHODS: Eight college-level male wrestlers underwent 1-month of pre-season training. Drills were performed 4 hours/day, 6 days/week. 3 morning resting blood samples were taken pre-training (PRE), 1 day after the end of training (END), and 5 days after training (POST). Phenotype and receptor density of NK cells were analyzed by flow cytometry. NKG2D (CD314), DNAX accessory molecule -1 (DNAM-1, CD226), NKp46 (CD335), Fc γ RIII (CD16) and IL-12 receptor (IL-12R, CD212) are measured as activating receptors. Cytotoxic activity was determined using a standard ^{51}Cr release assay, with effector to target cell ratios of 20:1, 10:1, 5:1 and 2.5:1. The lytic unit was calculated as an index of per cell cytotoxicity. Plasma adrenaline, noradrenaline, serum C-reactive protein (CRP) and creatine phosphokinase (CPK) were also measured. One-factor ANOVA was applied to compare the responses from PRE exercise values with statistical significance set at $p < 0.05$. Linear regression analyses were performed to determine the relationship between cytotoxicity and the expression of activating receptors.

RESULTS: The expression of DNAM-1 decreased ($p=0.0340$) at END ($p=0.0103$). Expressions of other activating receptors did not change, nor were there changes in circulating CD56^{dim} and $\text{CD56}^{\text{bright}}$ NK cell ratios, or in total cytolytic activity (20:1) throughout the experiment. Per-cell cytotoxicity showed large inter-individual variation but did not change significantly. It correlated positively with the expression of NKG2D ($r=0.518$, $p=0.010$), but no significant relationship was established with DNAM-1 expression.

DISCUSSION: The impact of training in this study seemed less than that observed in our previous study, because 7 of the 8 subjects showed no decrease in cytotoxic activity per NK cell at END. Nevertheless, analysis of the relationship with activating receptors indicated that

NKG2D expression, and not DNAM-1 expression, affects the cytotoxicity per NK cell.

CONCLUSION: The results suggest that chronic exercise affects DNAM-1 expression. Moreover, under resting conditions, cytotoxic activity per NK cell relates to the expression of NKG2D activating receptors, and not to that of the DNAM-1 receptors.

《個人研究第1種》

トレーニングがNK細胞の活性化レセプターに
およぼす影響

鈴木正敏

I. はじめに

ナチュラルキラー（NK）細胞はリンパ球の一種で、生体内ではがん化やウイルス感染により変性した細胞を傷害するため、生体防御の最前線の役割を果たしていると考えられている^(58, 85)。Imai et al. の報告によるとNK細胞の傷害活性が低い人はがんになりやすいことを11年間の縦断的な研究により明らかにしている⁽⁵⁰⁾。NK細胞はまた、身体的・精神的なストレスに最も反応しやすいリンパ球であり^(5, 7, 8, 9, 31, 32, 39, 44, 45, 46, 47, 49, 52, 53, 61, 65, 72, 86, 89, 82, 86, 89, 99, 100, 101)、ストレスが加わった場合には血中に急速に動員される。運動の影響としてはオーバートレーニングや一過性の強い運動の後に傷害活性が低下することにより、上気道感染などの感染率が増加する疑いもたれている^(35, 67, 77, 80, 81, 84, 89, 102, 103, 104, 132)。一方、比較的軽度な強度によるトレーニングではNK細胞傷害活性が増加し^(33, 83, 88)、上気道感染の感染率が低くなる可能性がある⁽¹¹⁹⁾。

筆者らの研究グループ（自然科学系の業績は基本的にチームによる研究成果であり、このような表現をするが、本研究は当該研究チームの協力の下、個人で行っている研究である）では、これまで強いトレーニングを1ヶ月間行った場合のNK細胞機能を検討している。その結果、強いトレーニングの終了時にはNK細胞濃度に変化は見られないものの、傷害活性は低下することを報告している。このとき、細胞当たりの傷害活性の指標である、lytic unitsは低下しており、個々の細胞の活性が低下することが明らかとなった⁽¹¹⁷⁾。通常、一過性の運動でみられるNK細胞の変化は細胞の濃度の増減が傷害活性に影響するもので、個々の細胞の活性は変化しない。ここで得られた結果は、その意味で特殊な変化をとらえたことになった。競技スポーツでは夏休みなど長期休暇を利用した強化合宿トレーニングは頻繁に行われている。ただし、そのようなハードな環境の練習では逆にオーバートレーニングといわれるディコンディショニングが生じることもある。これはトレーニングによってパフォーマンスを上げたい競技者やコーチにおけるジレンマでもある。前述のNK細胞個々の傷害活性の低下はこのディコンディショニングに関連した現象とも考えられる。一方、そのメカニズムにつ

トレーニングがNK細胞の活性化レセプターにおよぼす影響

いては不明であり、これまでの研究報告にも関連した内容は見られない。

NK細胞の活性は通常、活性化レセプターと抑制性レセプターによって調節されている (Figure 1) (1, 2, 3, 6, 10, 11, 15, 19, 22, 23, 24, 28, 54, 55, 56, 57, 59, 60, 63, 66, 74, 75, 96, 97, 110, 113, 116, 121, 126, 128, 129, 134, 135)。活性化レセプターは細胞内に immunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAM) と呼ばれる活性化モチーフを持ち、がん抗原やウイルスタンパクなどを認識する。抑制性レセプターは細胞内に immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) と呼ばれる抑制性モチーフを持ち、major histocompatibility complex (MHC) クラス I の発現を認識する。NK細胞の主な機能であるがん細胞やウイルス感染細胞の除去にはこれらが関与している。MHC クラス I はヒトでは白血球の血液型といわれる human leukocyte antigen (HLA) であり、赤血球の血液型である ABO 型の4型に比べて、10万型と圧倒的に多い型が存在する。これらは自分の標識 (または表札や名札) と考えてよく、それを細胞膜上に表出して自分自身の正常な細胞であること (self) を表していることになる。がんやウイルス感染によりこの MHC クラス I の発現が低下することがある。すると NK細胞の抑制性レセプターがこれを認識できなくなり、細胞内に傷害抑制の命令を出せなくなる。これが missing-self という状態で、傷害が発揮されることにつながる。実際に生体では活性化シグナルと抑制シグナルのバランスに基づいて傷害活性の発揮がコントロールされている。

トレーニングによって個々の細胞の活性が変化するのであれば、このようなレセプターにも変化が生じている可能性がある。そこで、本研究ではNK細胞上の活性化レセプターに着目して、その発現がトレーニングによって影響を受けるのかを検討した。

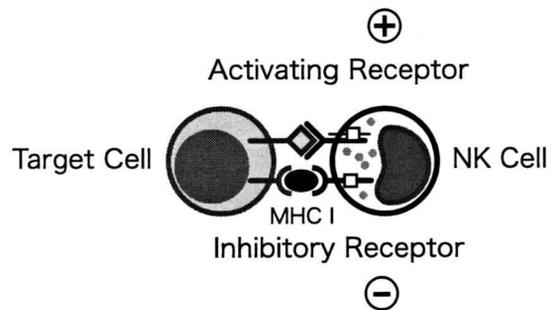


Figure 1. NK細胞の傷害活性のコントロール

II. 方法

1. 被験者

被験者は健康な男子大学生8名 (明治大学体育会レスリング部所属, 非喫煙者) とした。被験者の身体的特性を Table1に示した。被験者にはあらかじめ実験内容とそれにとまう危険性を説明し、研究参加同意書に署名を得た。なお、本研究は The American College of Sports and Medicine “Policy Statement Regarding the Use of Human Subjects and Informed Consent⁽¹²⁴⁾” のおよび “The Declaration of Helsinki” に従って計画を立てた。

2. トレーニング

夏休みの1ヶ月間の強化合宿を対象のトレーニングとした (Figure 2)。トレーニング中の練習時

間は通常の練習時間よりも1時間長い4時間で、練習は週6日行った。

Table 1. 被験者の身体的特性

Subject	Age	Height(cm)	Weight(kg)
A	21	180	91
B	20	175	63
C	20	172	68.2
D	19	178	110
E	18	174	68.4
F	19	167	60
G	18	167	61
H	19	173	99
Average	19.3	173.3	77.6
SD	1.0	4.7	19.5



Figure 2. 実験プロトコル

3. 採血

採血のタイムポイントはトレーニング前（7月15日，PRE），トレーニング後（8月31日，END），回復期（9月4日，POST）の3回とした。採血は医師により，早朝7時に前日21時からの絶食状態で前腕静脈より行った（MN-SVS21BH，テルモ，東京）。真空採血管は血清用プレーン7ml（VP-P070K，テルモ，東京），血漿用は ethylenediaminetetraacetic acid（EDTA）-2Na 5ml（VP-NA050KN，テルモ，東京）と EDTA-2K 2ml（VP-DK052K，テルモ，東京），末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cell，PBMC）分離用にヘパリン10ml（VP-H100K，テルモ，東京）を使用し，一回の採血総量は24 mlとした。採血場所は生田レスリング部合宿所とした。検体は速やかに氷冷保存し，当日中に全て順天堂大学医学部免疫学教室で分析した。

4. 測定項目

(1) 血球算定と血液内物質

血球算定（自動分析，XT2000i，シスメックス，神戸），血液像（顕微鏡法）は EDTA-2K 添加血を用いて測定した。白血球分画（好中球，リンパ球，単球，好酸球，好塩基球）の濃度は血液像で得

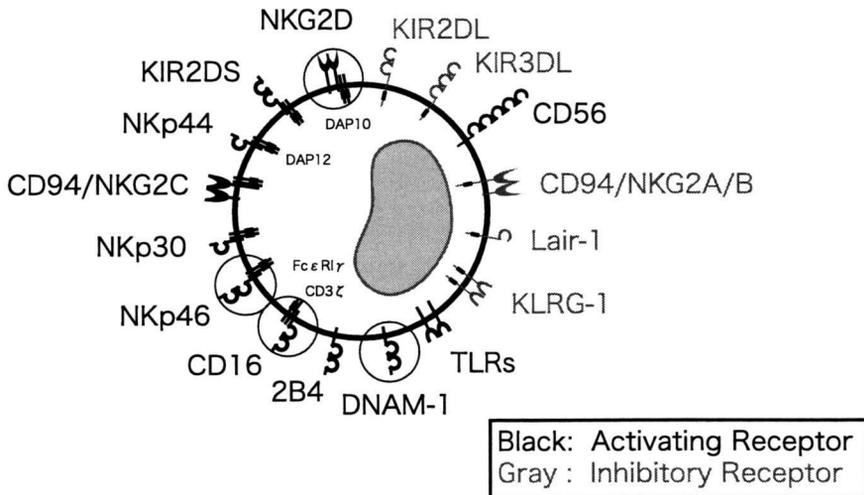
トレーニングがNK細胞の活性化レセプターにおよぼす影響

られた比率を白血球数に乗じることで算出した。カテコールアミン (high performance liquid chromatography (HPLC) 法) とコルチゾール (radioimmunoassay (RIA) 固相法) は EDTA-2Na 添加血漿を、C-reactive protein (CRP, ラテックス免疫比濁法) と creatine phosphokinase (CPK, 日本臨床化学会 (JSCC) 標準化対応法) は血清を用いて測定した。

(2) フローサイトメトリー

リンパ球分画とNK細胞上の活性化レセプターの発現はフローサイトメーター (FACSCalibur, BD Japan, 東京) により、分析した。まず、PBMCをヘパリン添加した血液をリン酸緩衝液 (phosphate buffered solution, PBS, 除 Ca_2^+ , Mg_2^+ , 14190-250, GIBCO, ライフテクノロジーズ ジャパン, 東京) で1:1に希釈し、リンパ球分離液 (セパレート L, 武藤化学, 東京) 上に重層し、密度勾配を利用した遠心分離 (400G, 30分間, Low Brake, 室温) により採取した。PBMCは10% ウシ胎児血清 (fatal calf serum, FCS, F942, シグマ アルドリッチ ジャパン, 東京), ペニシリン (100 IU/mL) 及びストレプトマイシン (100 mg/mL) (15140-148, GIBCO, ライフテクノロジーズ ジャパン, 東京) 添加の RPMI-1640 (22400-097, GIBCO, ライフテクノロジーズ ジャパン, 東京) 中に 4°C で測定まで保存した。

リンパ球分画およびNK細胞膜上の活性化レセプターの発現は fluorescein isothiocyanate (FITC)-FL1, phycoerythrin (PE)-FL2, peridinin-chlorophyll (PerCP)-FL3, allophycocyanin (APC)-FL4 の4カラーのモノクローナル抗体染色法により測定した。PBMC 1×10^6 個に充分量の抗体カクテルを加え、20分間、4°C 冷暗所にて恒温保存した。その後、PBSで2回洗浄し、測定まで4°C 冷暗所に保存した。染色した細胞はフローサイトメーター (FACSCalibur, BD ジャパン, 東京) を通して、解析用ソフトウェア CellQuest Pro 6.0 (BD ジャパン, 東京) を利用して蛍光度を解析した。リンパ球分



(Lanier, J. Immunol., 2007)

Figure 3. NK レセプター

NK細胞には膜上に多くの活性化レセプターと抑制性レセプターが表出している。

画はリンパ球ゲート内の蛍光度から決定した。ヘルパー T 細胞 (CD4 T 細胞) は CD3⁺ CD4⁺ 細胞, キラー T 細胞 (CD8 T 細胞) は CD3⁺ CD8⁺ 細胞, NK 細胞は CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ 細胞, B 細胞は CD3⁻ CD19⁺ 細胞とした。NK 細胞はさらに CD56の発現の強さで CD56^{dim} NK 細胞と CD56^{bright} NK 細胞に分類した。これらの細胞はすべてリンパ球ゲート内の比率を求め、濃度はここで得られた比率と総リンパ球濃度を乗じた値とした。

また、今回の NK 細胞活性化レセプターとしては細胞膜上に発現している immunoglobulin gamma Fc region receptor III (FcγRIII, CD16), homing cell adhesion molecule, (HCAM, CD44), interleukine-12 receptor (IL-12R, CD212), DNAX accessory molecule 1 (DNAM-1, CD226), NK cell receptor D (NKG2D, CD314), NK cell p46-related protein (NKp46, CD335) とし (Figure 3), その蛍光度を CD3⁻ CD56^{dim} 細胞上で測定した。使用した抗体 (クローン) は PerCP 結合 CD3 (SK7), FITC 結合 CD44 (G44-26), PE 結合 CD212 (2.4E6), CD314 (1D11) は BD ジャパン (東京) より, FITC 結合 CD4 (OKT4), PE 結合 CD8 (B9.11), CD335 (BAB281) はベックマン・コールタージャパン (東京), FITC 結合 CD16 (CB16), CD226 (11A8), APC 結合 CD19 (SJ25C1), CD56 (MEM188) はベイバイオサイエンス (神戸, 兵庫) より購入した。

(3) NK 細胞傷害活性

NK 細胞傷害活性は標準的な⁵¹Cr リリース法で測定した⁽¹²³⁾。標的細胞としてヒト赤芽球様白血病細胞株 K562細胞を使用した。K562細胞を100 μCi の Na₂⁵¹CrO₄ を含む10% FCS 添加 RPMI-1640 で 37°C, 60分間恒温保存してラベリングを行った。その後, 3回洗浄し, 1×10⁵/ml に調整した。96ウェルラウンドボトムプレートを用い, この標的細胞100 μl (1×10⁴個) に2×10⁶/ml に調整した PBMC をエフェクター: ターゲット比が20:1, 10:1, 5:1, 2.5:1になるように希釈分注した。一回遠心した後, 37°C, 5% CO₂ で4時間恒温保存し, その後, 上清液を採取し, ガンマカウンターで測定した。なお, maximum release 用にはエフェクターの代わりに10% Triton X-100 (シグマ アルドリッチ ジャパン, 東京) を用いた。傷害活性は以下の式で算出した。

$$\% \text{lysis} = (\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release}) \times 100$$

細胞当たりの活性を推定するために lytic units (LU) を回帰分析により算出した。LU はまず1×10⁴個の標的細胞の20%を傷害するエフェクター細胞の数を散布図から推定し, それを PBMC 1×10⁶個に換算した。その値をさらに以下の式によって NK 細胞当たりに調整した。

$$\text{Lytic Units (20\%)} \cdot \text{NK}^{-1} \cdot 10^{-5} = \text{Lytic Units} \cdot [\% \text{NK cells} \cdot (1 \cdot 10^6 \text{ PBMC-Monocytes})]^{-1}$$

5. 統計処理

結果は平均 ± 標準偏差で表した。結果は統計処理ソフト StatView-J 5.0 (ヒューリンクス, 東京)

トレーニングがNK細胞の活性化レセプターにおよぼす影響

を用い、有意差は $p < 0.05$ とした。PREからの変化はone-factor ANOVAを利用し、有意なF値が検出された場合にはタイムポイント間をBonferroni's post hocテストで検討した。傷害活性と活性化レセプターの関係について回帰分析を行った。

Ⅲ. 結果

1. 白血球分画とリンパ球分画の変化

総白血球数、好中球数、リンパ球数および単球数に有意な変化はみられなかった (Figure 4)。好酸球数はENDで増加 ($p = 0.0249$) を、好塩基球数はPOSTで増加 ($p = 0.0129$) を示した。リンパ球分画ではB細胞がPOST ($p < 0.0001$) で有意な増加を示したものの、NK細胞 (CD56^{dim} NK細胞およびCD56^{bright} NK細胞) はじめ、CD4 T細胞、CD8 T細胞には有意な変化はみられなかった (Figure 5)。

2. カテコールアミン、コルチゾール、CRP、CPK濃度の変化

血漿アドレナリン濃度はENDで低下し ($p = 0.0003$)、POSTでもPRE値よりも低いままだった (Figure 6, $p = 0.0035$)。ノルアドレナリン濃度は逆にENDで増加し ($p = 0.0028$)、POSTでも高値を保った ($p = 0.0001$)。しかし、その変動範囲はいずれも安静基準値以内 (アドレナリン; 100 pg/ml以下、ノルアドレナリン; 100-450 pg/ml) の変化だった。血漿コルチゾール濃度 (Figure 7)、血清CRP濃度 (Figure 8)、血清CPK濃度 (Figure 9) は有意な変化を示さなかった。CPK濃度はPREの平均で297.4 U/lあり、これは安静基準値 (62-287 U/l) を上回る値だった。

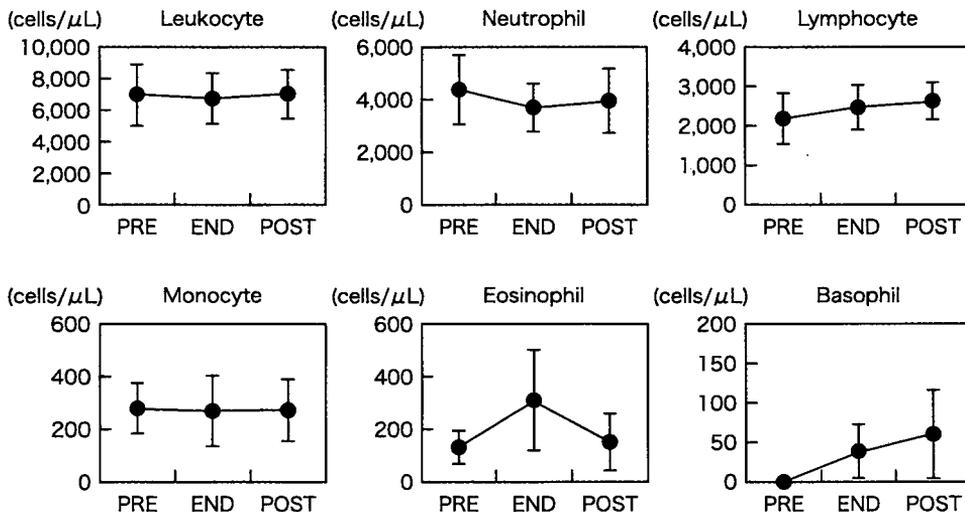


Figure 4. 白血球分画の変化

データは平均±標準偏差。有意な変化はみられなかった。

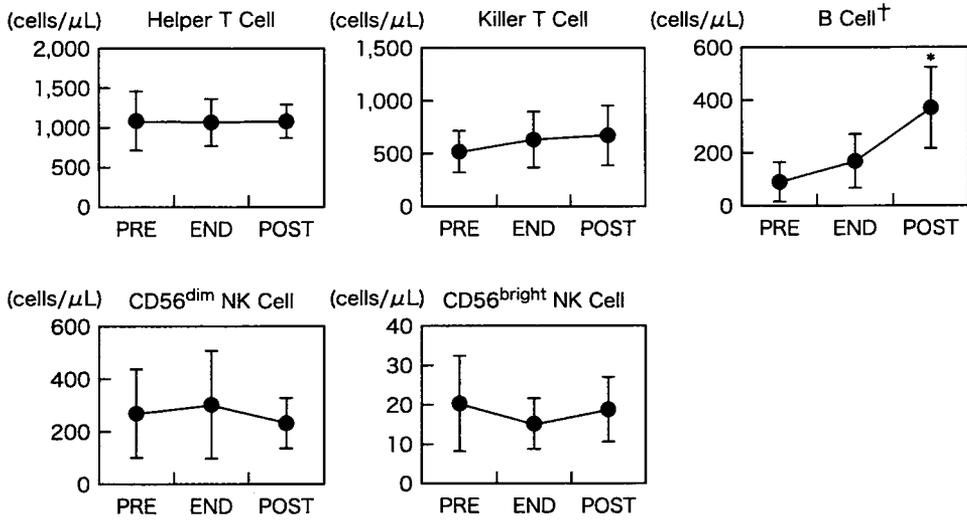


Figure 5. リンパ球分画の変化

データは平均±標準偏差。B細胞がPOSTに増加した。*はPRE値よりも有意な変化を、†はone-factor ANOVAにおいて有意な変化があったことを示している。有意差は $p < 0.05$ とした。

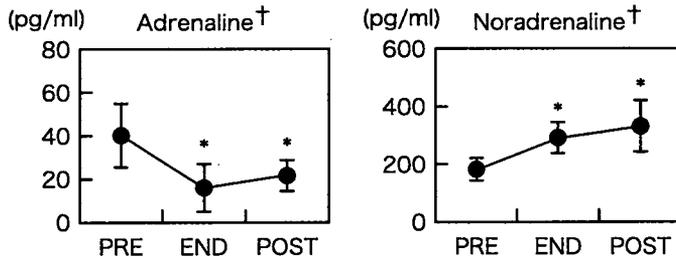


Figure 6. 血漿カテコールアミン濃度の変化

データは平均±標準偏差。AdrenalineがENDとPOSTに低下し、逆にNoradrenalineはENDとPOSTに増加した。*はPRE値よりも有意な変化を、†はone-factor ANOVAにおいて有意な変化があったことを示している。有意差は $p < 0.05$ とした。

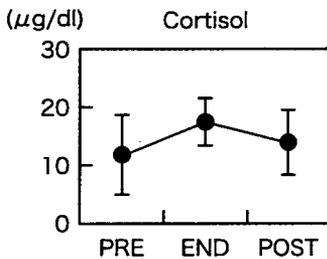


Figure 7. 血漿コルチゾール濃度の変化

データは平均±標準偏差。
有意な変化はみられなかった。

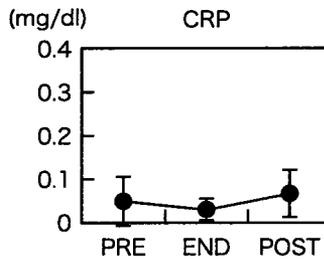


Figure 8. 血清CRP濃度の変化

データは平均±標準偏差。
有意な変化はみられなかった。

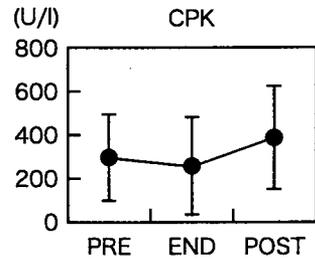


Figure 9. 血清CPK濃度の変化

データは平均±標準偏差。
有意な変化はみられなかった。

3. NK細胞傷害活性の変化

Figure 10にNK細胞傷害活性と細胞当たりの傷害活性の指標であるLUを示した。傷害活性は総活性および細胞当たりの活性とも変化はなかった。

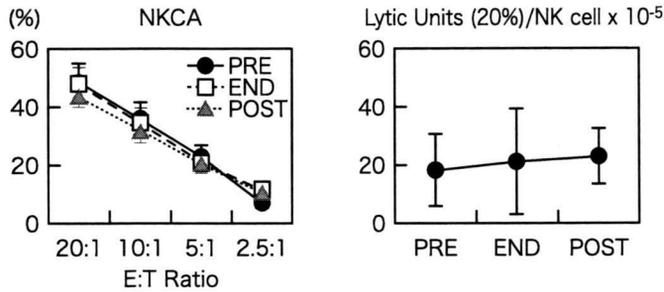


Figure 10. NK細胞傷害活性の変化

データは平均±標準偏差。有意な変化はみられなかった。

4. NK細胞上の活性化レセプターの発現

CD3⁻CD56^{dim}細胞上のレセプターの発現をFigure 11~15に示した。CD16 (Figure 11), CD212 (Figure 12), には有意な変化はみられなかった。CD226 (Figure 13) は有意に変化し (p=0.0340), ENDに低下 (p=0.0103) を示した。POSTも被験者によっては低下を示したが, 有意ではなかった (p=0.1283)。CD314は絶対値では有意な変化ではなかったが, PRE値からの変化量 (Δ値) では有意 (p=0.0006) となった (Δ値の結果は示していない)。その場合にはEND (p=0.0002), POST (p=0.0042) で増加が示された。ただし, ヒストグラム上ではクリアな差ではなかった。CD335も絶対値では差が見られず, Δ値ではANOVAで変化していることが示された (p=0.0497) が, タイムポイント間のpost hoc testでは有意差は示されなかった。

5. 傷害活性と活性化レセプターの関係

細胞当たりの活性の指標であるLUと活性化レセプターの発現について, 回帰分析を行いFigure 16~20に結果を示した。ここではCD314との発現に有意 (p=0.0095) な正の相関 (r=0.5173) が示された。CD16, CD212, CD226およびCD335とは関係がみられなかった。

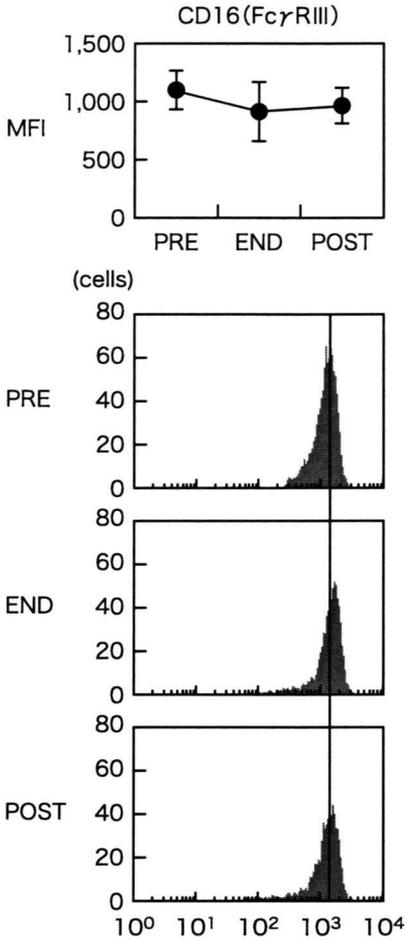


Figure 11. CD16の発現の変化

CD3⁻ CD56^{dim} NK 細胞上における発現。折れ線グラフのデータは平均±標準偏差。
 有意な変化はみられなかった。典型例をヒストグラムに示したが、変化はみられなかった。
 比較のためにヒストグラムに PRE の最大値に合わせた縦線を示した。

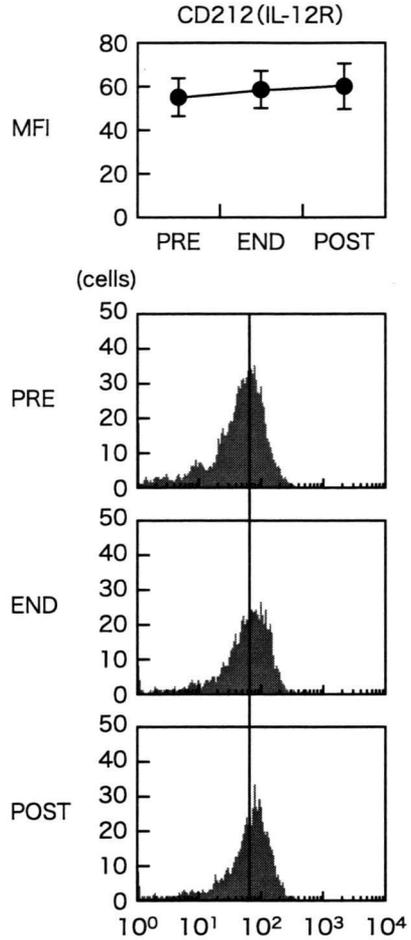


Figure 12. CD212の発現の変化

CD3⁻ CD56^{dim} NK 細胞上における発現。折れ線グラフのデータは平均±標準偏差。
 有意な変化はみられなかった。典型例をヒストグラムに示したが、変化はみられなかった。
 比較のためにヒストグラムに PRE の最大値に合わせた縦線を示した。

トレーニングがNK細胞の活性化レセプターにおよぼす影響

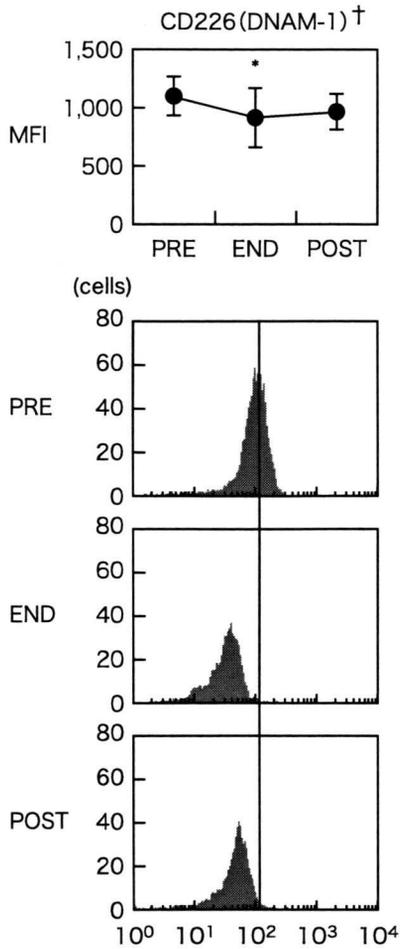


Figure 13. CD226の発現の変化

CD3⁻CD56^{dim} NK細胞上における発現。折れ線グラフのデータは平均±標準偏差。
 ENDにおいて有意な低下 ($p=0.0103$) がみられた。典型例をヒストグラムに示したが、ENDにおける低下が示されている。比較のためにヒストグラムにPREの最大値に合わせた縦線を示した。*はPRE値よりも有意な変化を、†はone-factor ANOVAにおいて有意な変化があったことを示している。有意差は $p<0.05$ とした。

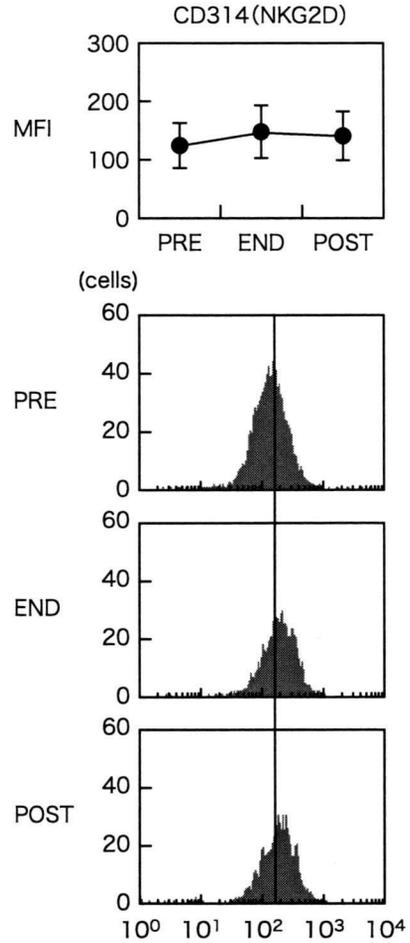


Figure 14. CD314の発現の変化

CD3⁻CD56^{dim} NK細胞上における発現。折れ線グラフのデータは平均±標準偏差。
 有意な変化はみられなかった。典型例をヒストグラムに示したが、変化はみられなかった。比較のためにヒストグラムにPREの最大値に合わせた縦線を示した。

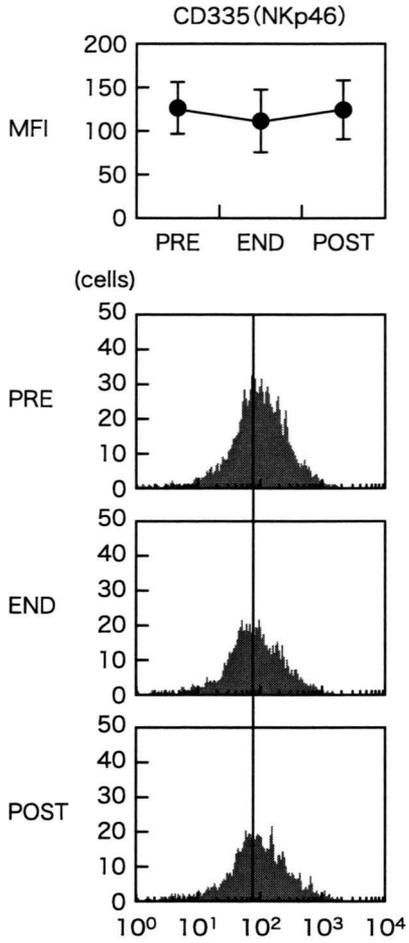


Figure 15. CD335の発現の変化

CD3⁻CD56^{dim} NK 細胞上における発現。折れ線グラフのデータは平均±標準偏差。

有意な変化はみられなかった。典型例をヒストグラムに示したが、変化はみられなかった。

比較のためにヒストグラムに PRE の最大値に合わせた縦線を示した。

トレーニングがNK細胞の活性化レセプターにおよぼす影響

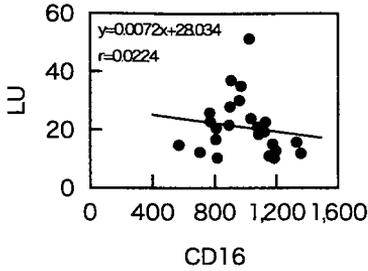


Figure 16. CD16の発現とLUの関係
有意な関係はみられなかった。

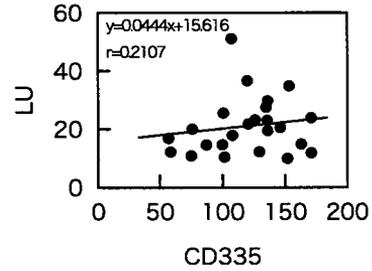


Figure 20. CD335の発現とLUの関係
有意な関係はみられなかった。

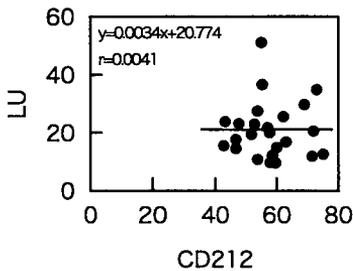


Figure 17. CD212の発現とLUの関係
有意な関係はみられなかった。

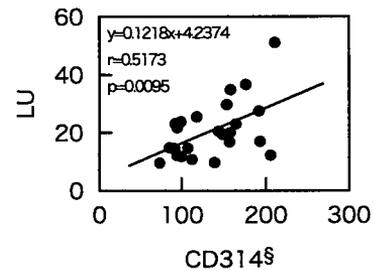


Figure 19. CD314の発現とLUの関係
有意な正の相関が見られた。\$は回帰分析で
有意な関係であることを示す。有意な関係は
 $p < 0.05$ とした。

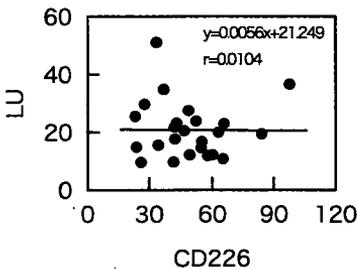


Figure 18. CD226の発現とLUの関係
有意な関係はみられなかった。

IV. 考察

1. トレーニングの強度

今回の1ヶ月にわたるトレーニングは通常トレーニング(3時間/日)にくらべ一日1時間長い練習時間(4時間/日)であった。これは以前に報告したトレーニング実験⁽¹¹⁷⁾(練習時間:5時間/日)に比べて運動量としては少なくなる。そのため、筋への負担度の指標であるCK(Figure 8)をみると経時的な変化はなく、インパクトとしては大きく増加したものではなかったと推測される。ただし、

CKの値は安静基準値の62-287 U/lを上回るか上限に近いPRE；297.4 U/l, END；258.0 U/l, POST；389.1 U/lで推移している。つまり、トレーニング期における筋負担は大きな変化はないが、筋負担自体のインパクトはPREから継続的にあった可能性もある。これはテスト期間中のトレーニングが個人に任されているため、ウエイトトレーニングなど、筋に負荷のかかる練習をしていた可能性がある。

2. 白血球分画およびリンパ球分画の変化

唯一の変化がB細胞のPOSTの増加として示された (Figure 5)。他の白血球分画、リンパ球分画には変化はみられなかった。B細胞はヘルパーT細胞からの抗体提示を受け抗体産生を担う獲得免疫において重要な働きをしている細胞である。運動に関しての動態は報告が少なく、一過性の運動ではほとんど変化しないとされている^(78, 109)。通常リンパ球は β -アドレナリンレセプターを有しており、運動時はカテコールアミンの増加の刺激を受けて末梢血への動員が起こる。とくにこれはNK細胞で顕著にみられる。NK細胞はリンパ球分画のなかで最も β -アドレナリンレセプターの発現が高く、それが影響していると考えられている。 β -アドレナリンレセプターの発現は次にキラーT細胞が高く、ヘルパーT細胞が最も低い。B細胞も β -アドレナリンレセプターの発現はキラーT細胞と同様にみられるが、セカンドメッセンジャー以降の働きが他のリンパ球と異なっており、動態には影響しないと考えられている⁽⁶⁸⁾。しかし、Malmら⁽⁶⁹⁾によると、サッカーを2試合行った後(48時間後および72時間後)に成熟B細胞(CD20⁺CD5⁺細胞)が増加するという。今回の研究はトレーニングを対象としているので一過性の運動とは異なるが、身体活動後、少し時間が経ってから増加する可能性がある。ここでは前日の運動が増加させる刺激になっていた可能性を示している。また、今回の実験ではカテコールアミンが安静基準値内ではあるが有意な変動を示している。前述のようにリンパ球の変動に影響するのであれば、他の分画に変化があっても良さそうである。ただし、運動時のような大きな変化ではないためか、アドレナリンが増加、ノルアドレナリンが低下という相反する変化 (Figure 6) のためか、影響は出ていない。これについてのメカニズムは不明である。

3. NK細胞の動態と傷害活性の変化

NK細胞は一過性の運動では運動中は増加、運動後は低下するという大きな増減を示すことが知られている。しかし、トレーニングのような慢性運動ではコンセンサスを得られるような動きはない。前述の先行研究ではトレーニング終了時にCD56^{dim} NK細胞は変化しなかったがCD56^{bright} NK細胞が増加し、傷害活性は総活性、細胞当たりの活性とも低下した⁽¹¹⁷⁾。CD56^{dim} NK細胞はNK細胞の約90%を占める主要分画で、傷害活性が強い。これに対して、CD56^{bright} NK細胞は10%ほどの小さな分画でサイトカイン分泌能や増殖能が高い^(17, 18, 25, 26, 29, 36, 39, 40, 62, 64, 87, 93, 95, 98, 105)。基本的に両細胞とも成熟細胞と考えられているが、特定の環境下ではCD56^{bright} NK細胞からCD56^{dim} NK細胞に分化することが報告されており⁽²⁰⁾、CD56^{dim} NK細胞が最終的な成熟細胞である可能性もある。先行実験でCD56^{bright} NK細胞が増加したのは、強いトレーニングの継続では、運動の刺激でアポ

トレーニングがNK細胞の活性化レセプターにおよぼす影響

トリスした分の細胞の補充が十分に間に合わず^(48, 73), より強い増殖の必要性がおこった可能性がある。そのため, 増殖能が強く, 活性酸素曝露にも強い CD56^{bright} NK 細胞の増加が顕著になったと推定している⁽¹²⁵⁾。ただし, このとき増殖は CD56^{dim} NK 細胞でも起こっていて, 未成熟な細胞が動員されていた可能性がある。したがって, 未成熟な CD56^{dim} NK 細胞増加ともともと傷害活性の弱い CD56^{bright} NK 細胞の増加によって, 傷害活性の低下が起こったと推察している。強度の高いトレーニングの継続ではそのような免疫機能の脆弱化を引き起こすことがあるが, 今回は CD56^{bright} NK 細胞に変化はみられず (Figure 5), LU も低下したのは8人中ひとりだけであった (Figure 10)。ここから今回のトレーニングのインパクトが変化をおよぼすほどは大きくはなかったことが伺える。

4. NK細胞活性化レセプターの発現の変化

(1) CD16 (Figure 11)

CD16はFcγRIIIとして免疫グロブリン (IgG) のFc部分と結合する分子であり, CD56とともにNK細胞を同定する糖タンパクである。標的細胞に結合したIgGを介した傷害活性を抗体依存性細胞傷害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) といい, 直接結合による傷害活性とともにNK細胞の特徴ある活性形態である^(14, 25, 115)。このような細胞傷害は他にも単球・マクロファージで行われている⁽¹³⁾。

今回の実験ではNK細胞上のCD16の発現はトレーニングによって変化しなかった。CD16は一過性の激しい運動で低下する可能性がある⁽¹¹⁸⁾。また, ノルアドレナリンによっても低下する⁽⁴¹⁾。ただし, このような低下は一時的であり, すぐに回復するものである。そのため, トレーニングの運動中には変化している可能性はあるが, 次の日までそれが継続することはないと考えていいだろう。

(2) CD212 (Figure 12)

CD212はIL-12のレセプター (IL-12 receptor β1) であり, 主にNK細胞とT細胞に発現している^(21, 94, 133)。単球系細胞 (樹状細胞・マクロファージ) やB細胞から産生されたIL-12がレセプターに結合することにより, NK細胞は活性化し, 細胞増殖, 細胞傷害活性の誘導, インターフェロン (interferon: INF)-γ産生の誘導, ラック (lymphokine activated killer: LAK) 細胞の誘導が生じる。

CD212の発現も実験期間中には変化はなかった。このレセプターも一過性の運動では動くことが報告されており⁽¹¹⁸⁾, 短時間で元に戻るため, 変化が捉えられていない。

(3) CD226 (Figure 13)

CD226はDNAM-1と呼ばれる白血球接着分子であり⁽¹⁰⁷⁾, リガンドはポリオウイルスレセプター (poliovirus receptor: PVR, CD155) とヘルペスウイルスレセプターのネクチン (nectin)-2 (CD112) といったウイルスレセプターである^(12, 90, 91, 121, 122)。これらは上皮細胞, 内皮細胞, 神経細胞に広く発現しており, 細胞のがん化にともなって発現が増加する⁽⁹¹⁾。DNAM-1はleukocyte function antigen (LFA)-1との会合により, NK細胞とCD8 T細胞による細胞傷害活性を増加させるように働く^(43, 106, 108)。

CD226の発現はENDで低下 ($p=0.0103$) した。CD226は一過性の運動でも遅延して低下する可能

性が示されている⁽¹¹⁸⁾。トレーニングのようにより繰り返される刺激ではその低下が延長される可能性が示された。この反応がNK細胞活性の低下に先駆けて起こるようであれば、CD226の発現を監視することでコンディショニング悪化を予測できる可能性がある。

(4) CD314 (Figure 14)

CD314はNKG2Dとも称されるC型レクチンファミリーに属する膜貫通タンパクである。他のNKG2ファミリーがCD94とヘテロダイマーを形成するのに対して、ホモダイマーを形成するという特徴がある。リガンドは上皮由来腫瘍細胞に発現するストレス誘導タンパクのMHC class I-related chain(MIC)AとMICB^(6, 16, 27, 51, 114)、さらにヒトサイトメガロウイルスの標的であるUL16-binding protein(ULBP)が同定されている^(6, 16, 30, 112)。NKG2Dから生じる活性化シグナルはMHCクラスIの認識により抑制性レセプターから出されるシグナルより上位に位置し、両方のレセプターから刺激が入っている場合であれば細胞傷害活性を発揮することがある^(130, 131)。NK細胞ではIL-12, IL-15, INF- γ などの作用で発現が強くなる^(56, 127)。

トレーニングにおいては絶対値では変化が認められず、PREからの Δ 値でENDとPOSTで増加することが示された。ただし、ヒストグラムではクリアには差が確認できない程度の変化であり、生体への影響は不明である。一過性の運動においてについても変化は認められていない⁽¹¹⁸⁾。一方、細胞当たりの傷害活性と有意な正の相関($r=0.6173, p=0.0095$)を示し、安静値の傷害活性のコントロールに何らかの作用があることを示している。

(5) CD335 (Figure 15)

CD335はNKp46と呼ばれる膜貫通型糖タンパクで、NK細胞特異的な活性化レセプターである^(37, 74, 92, 110)。MHCクラスI陽性細胞の溶解と除去に中心的な役割を果たす主要なレセプターで、リガンドはインフルエンザウイルスのヘマグルチニンなどである^(4, 34, 38, 70, 71)。

CD335の発現はトレーニングでは変化はみられなかった。このレセプターの発現強度と細胞障害の強さとの関係があるといわれているが^(42, 111)、LUとの関係では有意な関係は示されなかった。また、一過性の運動で多少変動する可能性が示されているが⁽¹¹⁸⁾、トレーニングの影響は強くないようである。

V. まとめ

1ヶ月のトレーニングがNK細胞の活性化レセプターにおよぼす影響を検討した。被験者は明治大学レスリング部に所属する健康な男子大学生8名とし、夏休みの強化合宿を対象のトレーニングとした。結果はNK細胞活性やCD56^{bright} NK細胞には変化はみられず、インパクトとしては先行研究よりも小さなものとなった。ただし、NK細胞上の活性化レセプターではCD226(DNAM-1)の発現強度がトレーニング終了時(END)で減少することが確認された($p=0.0103$)。この変化が生体におよぼす影響は不明であるが、NK細胞活性の変化に先立って起こる可能性はないか、興味深い。CD16(Fc γ RIII), CD212(IL-12R), CD314(NKG2D), CD335(NKp46)の発現には変化がみら

トレーニングがNK細胞の活性化レセプターにおよぼす影響

れなかった。また、CD314の発現と細胞当たりの活性には有意な正の関係が見られた。これらの結果は一過性の運動で見られる反応とは異なったものであり、NK細胞活性が変化するような場合にはどのような動態を示すのか、さらなる研究が必要とされる。

VI. 謝辞

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究 B No. 21300257, 2009年～2012年）によって行いました「運動がナチュラルキラー細胞サブセットのレセプターの発現におよぼす影響」に関する研究の補足として行わせていただきました。研究成果の一部は既に2009年 American College of Sports Medicine 57th Annual Meeting, Baltimore, Maryland, U.S.A. において発表させていただきました⁽¹²⁰⁾。研究をすすめるにあたり、農学部 多賀恒雄先生、順天堂大学医学部免疫学教室 奥村康先生、八木田秀雄先生、竹田和由先生、安倍能之先生、坂木理先生、University of Toronto, Roy J. Shephard 先生、Defence R & D Canada-Toronto, Pang N. Shek 先生に多大なご協力をいただきました。とくに、実験では順天堂大学医学部免疫学教室 竹田和由先生にお世話になりました。報告の終わりにあたり、お礼を申し上げます。

VII. 参考文献

- 1 Al-Hubeshy ZB, Coleman A, Nelson M, Goodier MR. A rapid method for assessment of natural killer cell function after multiple receptor crosslinking. *J Immunol Methods*, 366(1-2), 52-59, 2011.
- 2 Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roeytynck S, Stewart CA, Breso V, Frassati C, Reviron D, Middleton D, Romagne F, Ugolini S, Vivier E, Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*, 25(2), 331-342, 2006.
- 3 Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science*, 296(5571), 1323-1326, 2002.
- 4 Arnon TI, Achdout H, Lieberman N, Gazit R, Gonen-Gross T, Katz G, Bar-Ilan A, Bloushtain N, Lev M, Joseph A, Kedar E, Porgador A, Mandelboim O, The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood*, 103(2), 664-672, 2004.
- 5 Bauer ME, Perks P, Lightman SL, Shanks N, Are adhesion molecules involved in stress-induced changes in lymphocyte distribution?. *Life Sci*, 69(10), 1167-1179, 2001.
- 6 Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T, Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 285(5428), 727-729, 1999.
- 7 Benschop RJ, Nijkamp FP, Ballieux RE, Heijnen CJ. The effects of b-adrenoceptor stimulation on adhesion of human natural killer cells cultured endothelium, *Br J Pharmacol*, 113(4), 1311-1316, 1994.
- 8 Benschop RJ, Oostveen FG, Heijnen CJ, Ballieux RE. 2-Adrenergic stimulation causes detachment of natural killer cells from cultured endothelium, *Eur J Immunol*, 23(12), 3242-3247, 1993.
- 9 Benschop RJ, Rodriguez-Feuerhahn M, Schedlowski M. Catecholamine-induced leukocytosis: Early observations, current research and future, *Brain Behav Immun*, 10(2), 77-91, 1996.

- 10 Biassoni R, Cantoni C, Falco M, Pende D, Millo R, Moretta L, Bottino C, Moretta A. Human natural killer cell activating receptors, *Mol Immunol*, 37(17), 1015-1024, 2000.
- 11 Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, Bottino C, Moretta A, Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev*, 181, 203-214, 2001.
- 12 Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, Cantoni C, Grassi J, Marcenaro S, Reymond N, Vitale M, Moretta L, Lopez M, Moretta A, Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*, 198(4), 557-538, 2003.
- 13 Boyle JJ, Human macrophages kill human mesangial cells by Fas-L-induced apoptosis when triggered by antibody via CD16. *Clin Exp Immunol*, 137(3), 529-537, 2004.
- 14 Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO, Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, 107(1), 159-166, 2006.
- 15 Burshtyn DN, Shin J, Stebbins C, Long EO. Adhesion to target cells is disrupted by the killer cell inhibitory receptor. *Curr Biol*, 10(13), 777-780, 2000.
- 16 Carlsten M, Bjorkstrom NK, Norell H, Bryceson Y, van Hall T, Baumann BC, Hanson M, Schedvins K, Kiessling R, Ljunggren HG, Malmberg KJ, DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer Res*, 67(3), 1317-1325, 2007.
- 17 Carson W, Caligiuri M, Natural Killer Cell Subsets and Development. *Methods*, 9(2), 27-43, 1996.
- 18 Carson WE, Fehniger TA, Caligiuri MA. CD56bright natural killer cell subsets: characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand. *Eur J Immunol*, 27(2), 354-360, 1997.
- 19 Castriconi R, Dondero A, Corrias MV, Lanino E, Pende D, Moretta L, Bottino C, Moretta A, Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliiovirus receptor interaction. *Cancer Res*, 64(24), 9180-9184, 2004.
- 20 Chan A, Hong DL, Atzberger A, Kollnberger S, Filer AD, Buckley CD, McMichael A, Enver T, Bowness P. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol*, 179(1), 89-94, 2007.
- 21 Chua AO, Chizzonite R, Desai BB, Truitt TP, Nunes P, Minetti LJ, Warriar RR, Presky DH, Levine JF, Gately MK, et al. Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J Immunol*, 153(1), 128-136, 1994.
- 22 Colonna M, Moretta A, Vély F, Vivier E. A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function. *Immunol Today*, 21(9), 428-431, 2000.
- 23 Colonna, M. Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors. *Immunol Rev*, 155, 127-133, 1997.
- 24 Cooley S, Xiao F, Pitt M, Gleason M, McCullar V, Bergemann TL, McQueen KL, Guethlein LA, Parham P, Miller JS, A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood*, 10(2), 578-586, 2007.
- 25 Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 22(11), 633-640, 2001.
- 26 Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*, 97(10), 3146-3151, 2001.

トレーニングがNK細胞の活性化レセプターにおよぼす影響

- 27 Dayanc BE, Beachy SH, Ostberg JR, Repasky EA, Dissecting the role of hyperthermia in natural killer cell mediated anti-tumor responses. *Int J Hyperthermia*, 24(1), 41-56, 2008.
- 28 De Celis R, Feria-Velasco A, Bravo-Cuellar A, Hicks-Gomez JJ, Garcia-Iglesias T, Preciado-Martinez V, Munoz-Islas L, Gonzalez-Unzaga M, Expression of NK cells activation receptors after occupational exposure to toxics: a preliminary study. *Immunol Lett*, 118(2), 125-131, 2008.
- 29 Di Santo JP, A defining factor for natural killer cell development. *Nat Immunol*, 10(10), 1051-1052, 2009.
- 30 Diefenbach A, Raulet DH, Innate immune recognition by stimulatory immunoreceptors. *Curr Opin Immunol*, 15(1), 37-44, 2003.
- 31 Dopp JM, Miller GE, Myers HF, Fahey JL. Increased natural killer-cell mobilization and cytotoxicity during marital conflict. *Brain Behav Immun*, 14(1), 10-26, 2000.
- 32 Dos-Santos MC, Matos-Gomes N, Makimoto FH, Katsurayama M, Santana LL, Becker MA, Paredes-Garcia E, Bertho AL, Cell phenotyping in saliva of individuals under psychological stress. *Cell Immunol*, 260(1), 39-43, 2009.
- 33 Douglas M, Crist, Laurel Traeger Mackinnon, Robert F. Thompson, Hemming A. Atterbom, Peter A. Egan, Physiological exercise increases natural killer cellular-mediated tumour cytotoxicity in elderly women, *Gerontology*, 35(2-3), 66-71, 1989.
- 34 Draghi M, Pashine A, Sanjanwala B, Gendzekhadze K, Cantoni C, Cosman D, Moretta A, Valiante NM, Parham P, NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection. *J Immunol*, 178(5), 2688-2698, 2007.
- 35 Eagle H, Oyama Vi, Levy M, Horton Cl, Fleischman R. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *J Biol Chem*, 218(2), 607-616, 1956.
- 36 Eissens DN, Spanholtz J, van der Meer A, van Cranenbroek B, Dolstra H, Kwekkeboom J, Preijers FW, Joosten I, Defining early human NK cell developmental stages in primary and secondary lymphoid tissues. *PLoS One*, 7(2), e30930, 2012.
- 37 El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, McGonagle D, Mackie SL, Morgan AW, Cook G, Feyler S, Richards SJ, Davies FE, Morgan GJ, Cook GP, The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res*, 67(18), 8444-8449, 2007.
- 38 Elboim M, Gazit R, Gur C, Ghadially H, Betser-Cohen G, Mandelboim O, Tumor immunoediting by NKp46. *J Immunol*, 184(10), 5637-5644, 2010.
- 39 Farag SS, Caligiuri MA, Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev*, 20(3), 123-137, 2006.
- 40 Farag SS, VanDeusen JB, Fehniger TA, Caligiuri MA. Biology and clinical impact of human natural killer cells. *Int J Hematol*, 78(1), 7-17, 2003.
- 41 Gan X, Zhang L, Solomon GF, Bonavida B. Mechanism of norepinephrine-mediated inhibition of human NK cytotoxic functions: inhibition of cytokine secretion, target binding, and programming for cytotoxicity. *Brain Behav Immun*, 16(3), 227-246, 2002.
- 42 Garcia-Iglesias T, Del Toro-Arreola A, Albarran-Somoza B, Del Toro-Arreola S, Sanchez-Hernandez PE, Ramirez-Duenas MG, Balderas-Pena LM, Bravo-Cuellar A, Ortiz-Lazareno PC, Daneri-Navarro A, Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer*, 9, 186, 2009.
- 43 Gilfillan S, Chan CJ, Cella M, Haynes NM, Rapaport AS, Boles KS, Andrews DM, Smyth MJ, Colonna M, DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *J Exp Med*, 205(13), 2965-2973, 2008.

- 44 Glover DA, Steele AC, Stuber ML, Fahey JL, Preliminary evidence for lymphocyte distribution differences at rest and after acute psychological stress in PTSD-symptomatic women. *Brain Behav Immun*, 19(3), 243-251, 2005.
- 45 Greeson JM, Hurwitz BE, Llabre MM, Schneiderman N, Penedo FJ, Klimas NG, Psychological distress, killer lymphocytes and disease severity in HIV/AIDS. *Brain Behav Immun*, 22(6), 901-911, 2008.
- 46 Gruzelier J, Smith F, Nagy A, Henderson D. Cellular and humoral immunity, mood and exam stress: the influences of self-hypnosis and personality predictors. *Int J Psychophysiol*, 42(1), 55-71, 2001.
- 47 Hennig J, Netter P, Voigt KH, Cortisol mediates redistribution of CD8+ but not of CD56+ cells after the psychological stress of public speaking. *Psychoneuroendocrinology*, 26(7), 673-687, 2001.
- 48 Hom LL, Lee EC, Apicella JM, Wallace SD, Emmanuel H, Klau JF, Poh PY, Marzano S, Armstrong LE, Casa DJ, Maresh CM, Eleven days of moderate exercise and heat exposure induces acclimation without significant HSP70 and apoptosis responses of lymphocytes in college-aged males. *Cell Stress Chaperones*, 17(1), 29-39, 2012.
- 49 Huang CJ, Webb HE, Garten RS, Kamimori GH, Acevedo EO, Psychological stress during exercise: lymphocyte subset redistribution in firefighters. *Physiol Behav*, 101(3), 320-326, 2010.
- 50 Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*, 356(9244), 1795-1799, 2000.
- 51 Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Suzuki T, Miyagi T, Hayashi N, Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *J Immunol*, 171(10), 5423-5429, 2003.
- 52 Kelly GS, Nutritional and botanical interventions to assist with the adaptation to stress. *Altern Med Rev*, 4(4), 249-265, 1999.
- 53 Kimura K, Ohira H, Isowa T, Matsunaga M, Murashima S, Regulation of lymphocytes redistribution via autonomic nervous activity during stochastic learning. *Brain Behav Immun*, 21(7), 921-934, 2007.
- 54 Kirwan SE, Burshtyn DN, Regulation of natural killer cell activity. *Curr Opin Immunol*, 19(1), 46-54, 2007.
- 55 Konjevic G, Mirjagic Martinovic K, Vuletic A, Jurisic V, Spuzic I, Distribution of several activating and inhibitory receptors on CD3-CD16+ NK cells and their correlation with NK cell function in healthy individuals. *J Membr Biol*, 230(3), 113-123, 2009.
- 56 Lanier LL, Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol*, 9(5), 495-502, 2008.
- 57 Lanier LL, Phillips JH. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells, *Immunol Today*, 17(2), 86-91, 1996.
- 58 Lanier LL. The origin and functions of natural killer cells. *Clin Immunol*, 95(1 Pt 2), S14-18, 2000.
- 59 Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*, 16, 359-393, 1998.
- 60 Lanier LL. Natural killer cells: from no receptors to too many. *Immunity*, 6(4), 371-378, 1997.
- 61 LaPerriere A, Ironson G, Antoni MH, Schneiderman N, Klimas N, Fletcher MA. Exercise and psychoneuroimmunology, *Med Sci Sports Exer*, 26(2), 182-190, 1994.
- 62 Lima M, Teixeira MA, Queiros ML, Leite M, Santos AH, Justica B, Orfao A. Immunophenotypic

トレーニングがNK細胞の活性化レセプターにおよぼす影響

- characterization of normal blood CD56 + lo versus CD56 + hi NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties. *Blood Cells Mol Dis*, 27(4), 731-743, 2001.
- 63 López-Botet M, Moretta L, Strominger J. NK-cell receptors and recognition of MHC class I molecules. *Immunol Today*, 17(5), 212-214, 1996.
- 64 Loza MJ, Perussia B, The IL-12 signature: NK cell terminal CD56 + high stage and effector functions. *J Immunol*, 172(1), 88-96, 2004.
- 65 Lucas A, Holtmann G, Gerken G, Pietsch A, Braun-Lang U, Gilani K, Strassburger K, Gesing S, Janssen OE, Kavelaars A, Heijnen CJ, Schedlowski M, Elsenbruch S, Visceral pain and public speaking stress: neuroendocrine and immune cell responses in healthy subjects. *Brain Behav Immun*, 20(1), 49-56, 2006.
- 66 Luci C, Tomasello E, Natural killer cells: detectors of stress. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(11), 2335-2340, 2008.
- 67 MacKinnon LT, Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: overtraining effects on immunity and performance in athletes. *Immunol Cell Biol*, 78(5), 502-509, 2000.
- 68 Maisel AS, Harris T, Rearden CA, Michel MC. Beta-adrenergic receptors in lymphocyte subsets after exercise. Alterations in normal individuals and patients with congestive heart failure. *Circulation*, 82(6), 2003-2010, 1990.
- 69 Malm C, Ekblom O, Ekblom B, Immune system alteration in response to two consecutive soccer games. *Acta Physiol Scand*, 180(2), 143-155, 2004.
- 70 Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, Davis DM, Strominger JL, Yewdell JW, Porgador A, Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*, 409(6823), 1055-1060, 2001.
- 71 Mandelboim O, Porgador A, NKp46. *Int J Biochem Cell Biol*, 33(12), 1147-1150, 2001.
- 72 Miller GE, Cohen S, Herbert TB, Pathways linking major depression and immunity in ambulatory female patients. *Psychosom Med*, 61(6), 850-860, 1999.
- 73 Mooren FC, Bloming D, Lechtermann A, Lerch MM, Volker K, Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *J Appl Physiol*, 93(1), 147-153, 2002.
- 74 Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L, Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, 19, 197-223, 2001.
- 75 Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Cantoni C, Pende D, Mingari MC, Moretta A, Human NK cells and their receptors. *Microbes Infect*, 4(15), 1539-1544, 2002.
- 76 Nakata A, Irie M, Takahashi M, Psychological distress, depressive symptoms, and cellular immunity among healthy individuals: a 1-year prospective study. *Int J Psychophysiol*, 81(3), 191-197, 2011.
- 77 Nash MS, Exercise and immunology. *Med Sci Sports Exer*, 26(2), 125-127, 1994.
- 78 Natale VM, Brenner IK, Moldoveanu AI, Vasilou P, Shek P, Shephard RJ, Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise. *Sao Paulo Med J*, 121(1), 9-14, 2003.
- 79 Nieman DC, Marathon training and immune function. *Sports Med*, 37(4-5), 412-415, 2007.
- 80 Nieman DC, Exercise and resistance to infection. *Can J Physiol Pharmacol*, 76(5), 573-580, 1998.
- 81 Nieman DC, Immune response to heavy exertion. *J Appl Physiol*, 82(5), 1385-1394, 1997.

- 82 Nieman DC, Exercise immunology: practical applications, *Int J Sports Med*, 18 Suppl 1, S91-100, 1997.
- 83 Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL, Markoff PA, Balk-Lamberton AJ, Yang H, Chritton DB, Lee JW, Arabatzis K. The effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections. *Int J Sports Med*, 11(6), 467-473, 1990.
- 84 Orange JS, Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection, *Microbes Infect*, 4(15), 1545-1558, 2002.
- 85 押味和夫, NK細胞 初版. 金原書店, 東京, 151, 1993.
- 86 Owen N, Steptoe A. Natural killer cell and proinflammatory cytokine responses to mental stress: associations with heart rate and heart rate variability, *Biol Psychol*, 63(2), 101-115, 2003.
- 87 Papamichail M, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. *Cancer Immunol Immunother*, 53(3), 176-186, 2004.
- 88 Pedersen BK, Helge JW, Richter EA, Rohde T, Kiens B. Training and natural immunity: effects of diets rich in fat or carbohydrate. *Eur J Appl Physiol*, 82(1-2), 98-102, 2000.
- 89 Pedersen BK, Ullum H. NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action, *Med Sci Sports Exer*, 26(2), 140-146, 1994.
- 90 Pende D, Bottino C, Castriconi R, Cantoni C, Marcenaro S, Rivera P, Spaggiari GM, Dondero A, Carnemolla B, Reymond N, Mingari MC, Lopez M, Moretta L, Moretta A, PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. *Mol Immunol*, 42(4), 463-469, 2005.
- 91 Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, Martini S, Rivera P, Capobianco A, Falco M, Lanino E, Pierri I, Zambello R, Bacigalupo A, Mingari MC, Moretta A, Moretta L, Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood*, 105(5), 2066-2073, 2005.
- 92 Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, Biassoni R, Moretta A, Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med*, 188(5), 953-960, 1998.
- 93 Poli A, Michel T, Theresine M, Andres E, Hentges F, Zimmer J, CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, 126(4), 458-465, 2009.
- 94 Presky DH, Minetti LJ, Gillessen S, Wilkinson VL, Wu CY, Gubler U, Chizzonite R, Gately MK, Analysis of the multiple interactions between IL-12 and the high affinity IL-12 receptor complex. *J Immunol*, 160(5), 2174-2179, 1998.
- 95 Raulat DH, Development and tolerance of natural killer cells, *Curr Opin Immunol*, 11(2), 129-134, 1999.
- 96 Reyburn H, Mandelboim O, Valés-Goméz M, Sheu EG, Pazmany L, Davis DM, Strominger JL. Human NK cells: their ligands, receptors and functions. *Immunol Rev*, 155, 119-125, 1997.
- 97 Robbins SH, Brossay L. NK cell receptors: emerging roles in host defense against infectious agents. *Microbes Infect*, 4(15), 1523-1530, 2002.
- 98 Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol*, 71(2), 173-183, 2002.
- 99 Schedlowski M, Jacobs R, Alker J, Pröhl F, Stratmann G, Richter S, Hädicke A, Wagner TO, Schmidt RE, Tewes U. Psychophysiological neuroendocrine and cellular immune reactions under psychological stress, *Neuropsychobiology*, 28(1-2), 87-90, 1993.

トレーニングがNK細胞の活性化レセプターにおよぼす影響

- 100 Schedlowski M, Jacobs R, Stratmann G, Richter S, Hädicke A, Tewes U, Wagner TO, Schmidt RE. Changes of natural killer cells during acute psychological stress, *J Clin Immunol*, 13(2), 119-126, 1993.
- 101 Shephard RJ, Rhind S, Shek PN. Exercise and the immune system, *Sports Med*, 18(5), 340-369, 1994.
- 102 Shephard RJ, Shek PN. Exercise, aging and immune function, *Int J Sports Med*, 16(1), 1-6, 1995.
- 103 Shephard RJ, Shek PN. Infectious diseases in athletes: New interest for an old problem, *J Sports Med Phys Fitness*, 34(1), 11-22, 1994.
- 104 Shephard RJ, Verde TJ, Thomas SG, Shek P. Physical Activity and the Immune System, *Can J Sport Sci*, 16(3), 163-185, 1991.
- 105 Shibuya A. Development and functions of natural killer cells. *Int J Hematol*, 78(1), 1-6, 2003.
- 106 Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, Kitamura T, Nicholl J, Sutherland GR, Lanier LL, Phillips JH, DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity*, 4(6), 573-581, 1996.
- 107 Shibuya A, Lanier LL, Phillips JH. Protein kinase C is involved in the regulation of both signaling and adhesion mediated by DNAX accessory molecule-1 receptor. *J Immunol*, 161(4), 1671-1676, 1998.
- 108 Shibuya A, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, DNAM-1 (CD226): A Two-Sword Fencer for Innate and Adaptive Immunity, *Curr Med Chem*, 4(1), 53-58, 2005.
- 109 Shinkai S, Shore S, Shek PN, Shephard RJ. Acute exercise and immune function; Relationship between lymphocyte activity and changes in subset counts, *Int J Sports Med*, 13(6), 452-461, 1992.
- 110 Sivori S, Parolini S, Marcenaro E, Castriconi R, Pende D, Millo R, Moretta A. Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol*, 107(2), 220-225, 2000.
- 111 Sivori S, Pende D, Bottino C, Marcenaro E, Pessino A, Biassoni R, Moretta L, Moretta A, NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol*, 29(5), 1656-1666, 1999.
- 112 Song H, Kim J, Cosman D, Choi I. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression, *Cell Immunol*, 239(1), 22-30, 2006.
- 113 Spies T, Groh V. Natural cytotoxicity receptors: influenza virus in the spotlight. *Nat Immunol*, 7(5), 443-444, 2006.
- 114 Stern-Ginossar N, Gur C, Biton M, Horwitz E, Elboim M, Stanietzky N, Mandelboim M, Mandelboim O. Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat Immunol*, 9(9), 1065-1073, 2008.
- 115 Sun PD. Structure and function of natural-killer-cell receptors. *Immunol Res*, 27(2-3), 539-548, 2003.
- 116 Sundstrom Y, Nilsson C, Lilja G, Karre K, Troye-Blomberg M, Berg L. The expression of human natural killer cell receptors in early life. *Scand J Immunol*, 66(2-3), 335-344, 2007.
- 117 Suzui M, Kawai T, Kimura H, Takeda K, Yagita H, Okumura K, Shek PN, Shephard RJ. Natural killer cell lytic activity and CD56(dim) and CD56(bright) cell distributions during and after intensive training. *J Appl Physiol*, 96(6), 2167-2173, 2004.
- 118 Suzui M, Takeda K, Yagita H, Okumura K, Shek PN, Shephard RJ. Effects of Acute Exercise on Expressions of Natural Killer Cell Receptors, *Med Sci Sports Exer*, 44(5), S612, 2012.
- 119 鈴井正敏, 運動すればかぜをひかなくなりますか?, 明治大学経営学部人文科学論集, 57, 37-48, 2011.

- 120 Suzui M, Takeda K, Yagita H, Okumura K, Shek PN, Shephard RJ, Effect of NKG2D and DNAM-1 Expression on CD56dim NK Cell and Cytotoxic Activity During Training, *Med Sci Sports Exer*, 42(5), S258, 2010.
- 121 Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Kai H, Miyamoto A, Morikawa Y, Ohkochi N, Honda S, Shibuya A, Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor. *Blood*, 107(4), 1491-1496, 2006.
- 122 Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Onoda Y, Zhang H, Yamazaki S, Miyamoto A, Honda S, Lanier LL, Shibuya A, Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *Int Immunol*, 16(4), 533-538, 2004.
- 123 Takeda K, Seki S, Ogasawara K, Anzai R, Hashimoto W, Sugiura K, Takahashi M, Satoh M, Kumagai K, Liver NK1.1 + CD4 + alpha beta T cells activated by IL-12 as a major effector in inhibition of experimental tumor metastasis. *J Immunol*, 156(9), 3366-3373, 1996.
- 124 The American College of Sports Medicine, Policy Statement Regarding the Use of Human Subjects and Informed Consent, *Med Sci Sports Exer*, 28(10), 125, 1996.
- 125 Thoren FB, Romero AI, Hermodsson S, Hellstrand K, The CD16-/CD56bright subset of NK cells is resistant to oxidant-induced cell death. *J Immunol*, 179(2), 781-785, 2007.
- 126 Vacca P, Cantoni C, Prato C, Fulcheri E, Moretta A, Moretta L, Mingari MC, Regulatory role of Nkp44, Nkp46, DNAM-1 and NKG2D receptors in the interaction between NK cells and trophoblast cells. Evidence for divergent functional profiles of decidual versus peripheral NK cells. *Int Immunol*, 20(11), 1395-1405, 2008.
- 127 Verhoeven DH, de Hooge AS, Mooiman EC, Santos SJ, ten Dam MM, Gelderblom H, Melief CJ, Hogendoorn PC, Egeler RM, van Tol MJ, Schilham MW, Lankester AC, NK cells recognize and lyse Ewing sarcoma cells through NKG2D and DNAM-1 receptor dependent pathways. *Mol Immunol*, 45(15), 3917-3925, 2008.
- 128 Vivier E, Biron CA. Immunology. A pathogen receptor on natural killer cells. *Science*, 296(5571), 1248-1249, 2002.
- 129 Vivier E, Nunes JA, Vely F, Natural killer cell signaling pathways. *Science*, 306(5701), 1517-1519, 2004.
- 130 Vivier E, Tomasello E, Paul P, Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition?, *Curr Opin Immunol*, 14(3), 306-311, 2002.
- 131 Watzl C, The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the "missing self"?, *Microbes Infect*, 5(1), 31-37, 2003.
- 132 Woods JA, Davis JM, Smith JA, Nieman DC. Exercise and cellular innate immune function, *Med Sci Sports Exer*, 31(1), 57-66, 1999.
- 133 Wu CY, Warriar RR, Carvajal DM, Chua AO, Minetti LJ, Chizzonite R, Mongini PK, Stern AS, Gubler U, Presky DH, Gately MK, Biological function and distribution of human interleukin-12 receptor beta chain. *Eur J Immunol*, 26(2), 345-350, 1996.
- 134 Wu J, Cherwinski H, Spies T, Phillips JH, Lanier LL. DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *J Exp Med*, 192(7), 1059-1068, 2000.
- 135 Yokoyama WM, Scalzo AA. Natural killer cell activation receptors in innate immunity to infection. *Microbes Infect*, 4(15), 1513-1521, 2002.