

Title	マウス小腸粘膜に分布する孤立リンパ小節の同定とその解析
Author(s)	濱田, 裕公
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/42285
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	はま だ ひろ まさ 濱 田 裕 公
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 1 6 1 6 2 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	マウス小腸粘膜に分布する孤立リンパ小節の同定とその解析
論文審査委員	(主査) 教授 山元 弘 (副査) 教授 八木 清仁 教授 真弓 忠範 教授 本田 武司

論 文 内 容 の 要 旨

消化管（腸管）は外界からの栄養物を摂取するために必須の器官であり、原始的な動物も、摂取孔（口）から排泄孔（肛門）に至る1本の消化管を備えている。膨大な種類の食餌由来外来抗原や100兆個に達する腸内常在細菌に加えて、しばしば病原微生物や毒素が侵入してくる腸管は、生体内で最も危険な局所であると考えられる。腸管免疫装置（gut associated lymphoid tissues : GALT）は、実質リンパ組織と粘膜全般に散在する免疫担当細胞で構成される。分泌型免疫グロブリンA（S-IgA）は腸管における液性免疫防御の主役であり、代表的な実質GALTであるパイエル板（Peyer's patches : PP）は腸管腔へと侵入する外来抗原に対する特異的S-IgA応答の始動に重要な免疫誘導リンパ組織であることが提唱されている。しかしながら、PPはS-IgA応答に必ずしも必須の実質リンパ組織でないこともラットやウサギで示されており、未だPPの重要性については意見が分かれるところである。

一方、ヒト、ウサギ、モルモットでは、PPや、PPと並ぶ実質GALTである腸間膜リンパ節（mesenteric lymph nodes : MLN）とは異なったリンパ球小集積として、孤立リンパ小節（isolated lymphoid follicles : ILF）が報告されている。ILFは小腸の漿膜面からも粘膜面からも肉眼で確認することは極めて困難であり、組織学的な検索が必要である。ILFはPPの単一濾胞（follicle）と構造的かつ機能的に類似しており、それ故S-IgA抗体応答の誘導において、PPと同等、あるいはPPの代替リンパ組織であると考えられてきた。先に挙げた哺乳類に見つかるILFに対して、マウス小腸粘膜に分布するILFについての記載は未だない。

最近、Kanamoriらは、マウス腸管陰窩（crypt）の粘膜固有層にリンパ球の小集積が散在的に分布することを見出し、クリプトパッチ（cryptopatches : CP）と命名した。細胞表面抗原を検索した結果、CPリンパ球の大多数は未分化リンパ骨髄細胞が発現するレセプター型チロシンキナーゼ（c-kit）やインターロイキン7レセプター（IL-7R）および、T細胞抗原であるThy-1や白血球抗原（LFA-1）を発現することが判明した。さらに、Saito、Oida、Suzukiらは、CPが腸管上皮細胞間T細胞（intestinal intraepithelial T lymphocytes : IEL）の発達分化に不可欠な胸腺外局所であることを証明した。またMayrhoferらはラット腸管にも未分化リンパ球の集積する絨毛が存在することを見出し、これをlymphocyte filled villi（LFV）と命名した。彼らは、LFVがラットIELの発達分化場所であることを提唱している。従ってマウスCPとラットLFVは機能的に同一の腸管リンパ組織と考えられる。

こうした相次ぐ新たなGALTの発見や、ILFが様々な哺乳類に見出されることから、マウス小腸にもILFが存在する可能性が十分考えられたので、マウス小腸を精査した。その結果、ILFの特徴を備えたリンパ球集積がマウス小

腸に100-200カ所分布することを見出した。これはB細胞、その周囲を取り囲む c-kit⁺IL-7R⁺細胞、ストロマ細胞としての CD11c⁺細胞の層で構成され、B細胞領域には芽中心がみられる。少数のT細胞も散在しており、リンパ球集積を覆う上皮細胞層には、M細胞が存在する。さらにリンパ球集積には、PPに見られるものと同レベルの細胞表面IgAを発現するB細胞が分布する。すなわち、これらのリンパ球小集積は構造や構成細胞においてPPに複数存在する濾胞の一つに相当する。これらの小集積はBALB/cマウスにおいて出生直後には見出されないが、生後7日頃から発生することが分かった。以上の知見から、これらのリンパ球集積がマウス小腸において未だ報告のない、ILFであることが明らかとなった。

ILFと同等なリンパ球集積は、胸腺を欠損するヌードマウス、腸内常在細菌の存在しない無菌マウス、成熟 $\alpha\beta$ T細胞を持たないTCR- $\beta^{-/-}$ マウス、抗原受容体遺伝子再構成に必要な分子が欠損するために成熟T細胞、B細胞を欠損するRAG-2 $^{-/-}$ マウス、抗体 μ 鎖遺伝子の膜貫通領域を欠如するために成熟B細胞を欠損する μ m $^{-/-}$ マウスなどの腸間膜反対側に分布していた。しかしながら、ヌードマウス、無菌マウス、TCR- $\beta^{-/-}$ マウスに存在するILF様リンパ球集積では、B220⁺細胞が減少し、c-kit⁺細胞が増加していた。さらに、RAG-2 $^{-/-}$ マウスや μ m $^{-/-}$ マウスの、ILF様リンパ球集積を構成するほぼ全ての細胞は未熟なc-kit⁺細胞であることが分かった。

経胎盤的に抗IL-7R α 抗体やLT β R-Ig融合タンパク質などを投与するとPP欠損マウスが出生する。このPP欠損マウスの小腸粘膜を検索したところ、正常マウスと同等のILFが存在することを確認した。次に、PPを欠損するIL-7R $^{-/-}$ マウスにおいても、小腸粘膜にILF様リンパ球集積が存在していることは確認できたが、その数は著しく減少し、小型となっていた。これらの知見は、マウス小腸粘膜に分布するILFがPPとは発生学的に異なる組織であることを提示している。次にPPのみならず全身のリンパ節を欠損するLT $\alpha^{-/-}$ マウスやaly/alyマウスの小腸粘膜を検索した。その結果、これらのマウス小腸粘膜には腸間膜反対側に並ぶリンパ球集積を検出することはできなかった。LT $\alpha^{-/-}$ マウスとaly/alyマウスではLT β Rからの細胞内シグナル伝達が進まないため、LT β Rを介したシグナルはPPやILFの原基形成に必須であることが分かる。これに反し、CPや未分化CPリンパ球から発達分化する胸腺外分化IELは、LT $\alpha^{-/-}$ マウスやaly/alyマウスにも充分存在することが判明した。PPやILFは腸間膜反対側に分布するがCPは小腸粘膜にランダムに存在する。これに対しPPの組織発生は出生前にほぼ完了するが、ILFとCPの組織発生は出生後である。最後に、CP原基の形成にはLT β Rからのシグナルや小腸の腸間膜反対側に存在するストロマ細胞による位置決定シグナルは関与しないことが挙げられる。以上の事実は、PP、ILF、CPというGALTを構成する三つの組織が、それぞれ異なった発生機構によって発達分化することを物語っている。

論文審査の結果の要旨

本研究では、マウス小腸に、パイエル板、クリプトパッチ、あるいはリンパ節とは異なったリンパ球集積、孤立リンパ小節（ILF）を発見し、その細胞構成、発生と発達分化について解析し、以下の知見を得た。

- 1：マウス小腸を精査し、ILFの特徴を備えたリンパ球集積が小腸当たり100-200カ所分布することを見出した。ILFはB細胞、c-kit⁺IL-7R⁺細胞、CD11c⁺細胞の層で構成され、B細胞領域には芽中心がみられた。また少数のT細胞、リンパ球集積を覆う上皮細胞層には、M細胞が存在した。
- 2：ILFには、パイエル板と同レベルの細胞表面IgA陽性B細胞が分布していたため、パイエル板に存在する濾胞の一つに類似することがわかった。
- 3：ILFは、ヌードマウス、無菌マウス、成熟 $\alpha\beta$ T細胞欠損マウスでは、B細胞が減少し未熟リンパ球が増加していた。また成熟T・B細胞欠損マウス、成熟B細胞欠損マウスILFではほぼ全ての細胞が未熟リンパ球であった。
- 4：経胎盤的に抗IL-7R α 抗体やLT β R-Ig融合タンパク質を投与してパイエル板欠損マウスを作成したところ、正常マウスと同等のILFが確認できた。
- 5：パイエル板のみならず全身のリンパ節を欠損するLT $\alpha^{-/-}$ マウスやaly/alyマウスの小腸粘膜にはILFを検出できなかった。

6 : ILF の発達分化は、胸腺外分化腸管上皮間T細胞の発生を担うクリプトパッチの発達分化とは相関しなかった。

以上本研究では、マウスに新しい孤立リンパ球集積を発見するとともに、その細胞構成を明らかにし、さらにはその発生と発達分化が、パイエル板やクリプトパッチといった既知の消化管免疫装置は異なった機構によることを明確にした。したがってこれら成果は、薬学博士の学位を授与するにふさわしいものとする。