

論文の内容の要旨

論文題目： 粘膜関連リンパ組織形成機構に関する研究

指導教員： 清野 宏 教授

東京大学大学院医学系研究科医学博士課程病因・病理学専攻

2006年4月 進学

氏名： 長竹 貴広

二次リンパ組織の初期形成は血球系 $CD3^+CD4^+CD45^+$ リンパ組織誘導細胞 (Lymphoid tissue inducer cells: LTI) がリンパ組織原基に遊走することで開始される。消化器関連リンパ組織の1つ、パイエル板 (Peyer's patch: PP) の形成にはたらく LTI は CXCR5-CXCL13 ケモカイン依存的に PP 原基に遊走し、ここで IL-7R α を介した刺激により活性化すると膜型リンフォトキシン (Lymphotoxin $\alpha 1\beta 2$: LT $\alpha 1\beta 2$)を発現するようになる。LTI が産生する LT $\alpha 1\beta 2$ によって PP 原基の VCAM-1+ PP ストローマ細胞 (PP organizer cells: PPO) が LT β R-NF- κ B inducing kinase (NIK) 依存的なシグナルにより活性化するとリンフォイドケモカイン (CXCL13, CCL19, CCL21) や接着分子 (VCAM-1、

ICAM-1) の発現が誘導される。こうしてさらに多くの L_Ti が集積するとともに T 細胞、B 細胞、樹状細胞などの免疫担当細胞が PP 原基へ遊走することで組織形成プログラムが進行する。

転写制御因子 Inhibitor of DNA binding/differentiation 2 (Id2)、Retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t (ROR γ t)、Core binding factor β 2 (Cbf β 2) は L_Ti の分化に重要な因子であり、それぞれの遺伝子ノックアウトマウスでは PP や単径部リンパ節など二次リンパ組織が発達しない。しかしながら、上気道鼻粘膜に発達する鼻咽頭関連リンパ組織 (Nasopharynx-associated lymphoid tissue: NALT) の発生は ROR γ t に依存しないことが知られていた。さらに、NALT 形成には LT α 1 β 2 や NIK が必須でないことから、PP をはじめ多くの二次リンパ組織とは組織形成機構が異なることが示唆されていた。しかしながら興味深いことに、Id2 は NALT 形成にも必須の役割を果たし、Id2^{-/-}マウスは NALT 原基での CD3⁻CD4⁺CD45⁺細胞の消失とともに NALT が発達しない。また、重要なことに、野生型マウスから単離した CD3⁻CD4⁺CD45⁺細胞を Id2^{-/-}マウスに移入することで NALT が再生することが報告されている。これらの事実は、NALT 形成に PP と同様 CD3⁻CD4⁺CD45⁺細胞が重要な役割を

もつこと、しかし、組織形成に用いられるサイトカインシグナルは PP と異なることを示唆している。さらに、NALT 形成ではたらく CD3⁻CD4⁺CD45⁺細胞は ROR γ t に依存しないことが考えられる。しかしながら、これまでに ROR γ t 非依存的な LTi の同定に関する報告や、NALT 形成に用いられるユニークな分子の同定には至っていなかった。

本論文第一章では PP 形成を誘導する PP 誘導細胞 (PP inducer cells: PPI) と NALT 形成を誘導する NALT 誘導細胞 (NALT inducer cells: NALTi) が ROR γ t への依存性と CD4 発現レベルによって異なった細胞群であることを示し、NALT 形成に特異的な新規分子を報告する。まず、ROR γ t に依存的に分化する CD3⁻CD4^{High}CD45⁺細胞を PPI 候補細胞として同定し、一方、ROR γ t に非依存的に分化する CD3⁻CD4^{Low}CD45⁺細胞を NALTi 候補細胞として同定した。PPI 候補細胞で高い発現が確認された *Cxcr5* や *Il-7 α* 、*Lta*、*Ltb1* は NALTi 候補細胞では発現していなかった。NALTi 候補細胞は ROR γ t を発現しないが、*Id2* と *Cbfb2* を発現することが確認された。*Cbfb2*^{-/-}マウスにおける NALT 形成を解析すると、NALT が発達しないことが明らかとなった。したがって、*Cbfb2* は PP だけでなく NALT の形成にも共通に用いられる分子であることが示され

た。

次に、NALT 形成に特異的にはたらく分子を同定するため NALTⁱ 候補細胞と PPI 候補細胞との間で cDNA サブトラクション解析を行った。その結果、NALTⁱ 候補細胞に *Interferon regulatory factor 1 (Irf1)* が高発現することが見いだされた。*Irf1*^{-/-}マウスの NALT 原基には NALTⁱ 候補細胞が検出されず、NALT が発達しなかった。興味深いことに、*Irf1*^{-/-}マウスは NALT 原基から離れた鼻粘膜部位に NALTⁱ 候補細胞を保持していた。また、*Irf1*^{-/-}マウスの PP、腸間膜リンパ節、鼠径部リンパ節、頸部リンパ節など他の二次リンパ組織は野生型マウスと同様に発達していた。この知見は、二次リンパ組織の中で NALT 形成を特異的に制御する初めての分子として IRF1 を同定したことを示している。

本論文第二章では消化器や呼吸器に比べ解析が遅れていた眼球粘膜免疫機構について報告する。これまで、ヒトの結膜に結膜関連リンパ組織 (Conjunctive-associated lymphoid tissue: CALT) が、涙嚢に涙道関連リンパ組織 (Tear duct-associated lymphoid tissue: TALT) が発達することが知られていたが、これらの組織が眼球粘膜免疫にどのように寄与するかは不明であっ

た。眼球粘膜免疫機構の理解が他の粘膜組織に比べ遅れた原因として、マウスなどのげっ歯類で CALT が形成されないという事実があり、実験的な解析が困難であったことが挙げられる。また、TALT についての実験動物を用いた報告はこれまでなかった。私は眼球粘膜免疫機構の理解を目的としてマウスの涙器を詳細に解析したところ、マウスの涙嚢に TALT が発達することを初めて同定し、NALT と同様に生後、微生物刺激に依存しない形で形成されてくることを見いだした。興味深いことに、TALT 原基に遊走する LTi[TALT 誘導細胞 (TALT inducer cells: TALTi)]候補細胞は NALTi 候補細胞と同様の $CD3^-CD4^{Low}CD45^+$ で規定された。また、TALTi 候補細胞はサイトカイン/ケモカイン関連分子の発現パターンが NALTi 候補細胞と一致しており CXCR5、IL-7R α 、LT α 1 β 2 を発現しなかった。一方、転写制御因子の発現パターンを検討すると TALTi 候補細胞は NALTi 候補細胞や PPI 候補細胞と異なった性質を示すことが明らかとなった。すなわち、二次リンパ組織形成を司る $CD3^-CD4^+CD45^+$ LTi は転写制御因子 Id2、ROR γ t、Cbf β 2、IRF1 への依存性と、CD4 発現レベルにより 3 つの異なる粘膜関連 LTi 候補細胞サブセットに分類された (PPI 候補細胞: $CD4^{High}$ 、Id2, ROR γ t, Cbf β 2 依存的かつ IRF1 非依存的、NALTi 候補細胞: $CD4^{Low}$ 、Id2,

Cbfb β 2, IRF1 依存かつ ROR γ t 非依存、TALTi 候補細胞: CD4^{Low}、Cbfb β 2 依存かつ Id2, ROR γ t, IRF1 非依存)。このように、各々の LTi 候補細胞はそれぞれ異なった遺伝子発現パターンを示したが、一方で Cbfb β 2 は PP、NALT、TALT の組織形成に共通に用いられる必須の因子であることが見いだされた。

興味深いことに、Cbfb β 2 と会合し転写因子複合体としてはたらく Promotor 1-Runx1 (P1-Runx1) は PP 形成に必要なものの、NALT や TALT 形成には必須でないことが明らかとなった。したがって、P1-Runx1 ではない別の Runx タンパク質が NALT、TALT 形成を制御する可能性が示唆された。

次に、眼球粘膜免疫機構における TALT の役割を検討するため組織学的な解析により濾胞関連上皮層を観察した。光学顕微鏡にて TALT を覆う濾胞関連上皮層を観察すると、単層扁平上皮の形態を示すことが見いだされた。これは、TALT 周辺の涙嚢上皮が重層扁平上皮の形態をとることと異なっていた。

また、共焦点レーザー顕微鏡解析によって TALT 濾胞関連上皮層を観察すると NKM16-2-4⁺UEA-1⁺WGA⁻で規定される M 細胞が同定された。電子顕微鏡を用いてさらに解析を進めると、ポケット白血球を保持する M 細胞の存在が確認された。眼球粘膜からの抗原に対し TALT がどのように応答するかを検討するた

め眼球表面より *Salmonella* や *Pseudomonas* を点眼投与した。すると、M 細胞を介した抗原の取り込みや胚中心反応、抗体クラススイッチに重要な Activation-induced cytidine deaminase (AID) の発現が観察された。さらに、コレラトキシンを点眼投与した場合に TALT において胚中心反応や抗原特異的 T 細胞応答が確認され、涙道で抗原特異的 IgA 抗体産生が検出された。これらの事実は、TALT が眼球粘膜免疫機構の誘導組織として機能することを示している。

以上のように、TALT、NALT、PP はそれぞれ眼球、鼻腔、腸管粘膜免疫系の誘導組織として類似した機能を果たすが、その組織形成はそれぞれ異なった LTi 候補細胞サブセットによるユニークな分子機序により行われることが示された。