

## 論文の内容の要旨

論文題目 液性免疫応答におけるリンパ節髄質の  
機能的意義の解析

指導教員 松島 綱治 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入（進）学

医学博士課程

社会医学専攻

氏名 阿部 淳

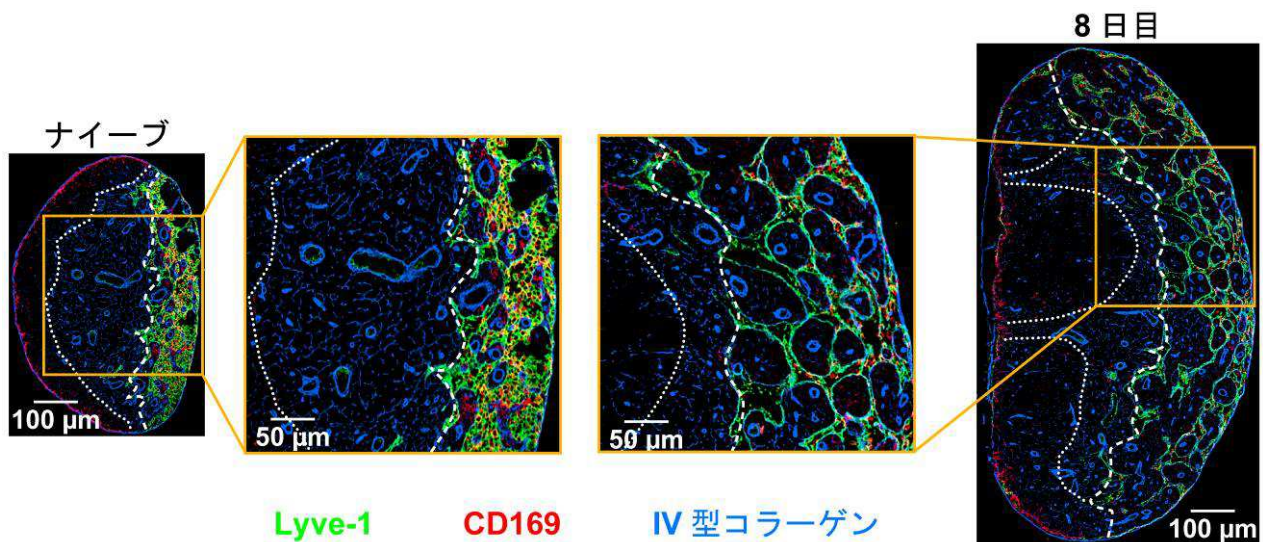
リンパ節は皮膚・粘膜組織に続いて生体防御の最前線を担うリンパ器官であり、自然免疫による抗原排除や獲得免疫誘導の場として中心的な役割を果たす。リンパ節の組織学的構築は濾胞 (B 細胞)、傍皮質 (T 細胞)、髄質の 3 領域に分類され、濾胞、傍皮質の 2 領域が獲得免疫応答の場になると考えられている。しかし、実際には単一の領域で応答が完結するわけではなく、効果的な応答の誘導には、リンパ球のリンパ節内移動を伴う他の免疫細胞との相互作用と、それを支持するリンパ節構造の動的制御が必要になる。

B 細胞の抗原特異的応答は、濾胞領域における抗原獲得、活性化、初期増殖を経た後、形質細胞への分化に続く抗体産生と、液性免疫記憶を担うメモリーB 細胞を産生する胚中心応答への参画、という 2 つの方向性に分岐すると考えられてきた。胚中心応答の場は濾胞領域であるが、リンパ節における抗体産生の場は髄質領域であり、応答極期には多数の

形質細胞が髄質領域に集積することが知られている。従来、胚中心応答とそれに続くメモリー形成が精力的に研究されてきた一方で、リンパ節における抗体産生誘導機序には不明な点が多く残されている。正常状態のリンパ節には存在せず応答に伴ってのみ現れる形質細胞の生存やその抗体産生の支持には、応答に伴う髄質領域の微小環境変化が必要になると推察される。しかし、髄質領域の微小環境変化については、形質細胞の分化・生存に関わるインターロイキン-6やAPRIL (A Proliferation Inducing Ligand) といった増殖因子の発現増強が起こるなど、断片的な知見しか報告されていない。そこで本研究では、リンパ節における抗体産生の場合とされる髄質領域の液性免疫応答における意義について、髄質領域の再構築による抗体産生の支持基盤形成という視点から解析を行った。

髄質領域の再構築については、炎症免疫応答に伴いリンパ球の集積が認められること以外に報告がなかったため、まずその実証を行った。アジュバントと共にハプテン結合タンパクを投与したところ、リンパ節髄質領域に実質領域の拡大とリンパ洞の縮小を伴う再構築が認められた (図 1)。同様の現象がウイルスや細菌の感染によっても誘導されたことから、髄質領域の再構築が炎症免疫応答に伴って誘導される一般的現象であると考えられる。髄質領域の再構築を経時的に解析した結果、再構築像は免疫後3日目頃からB細胞の髄質領域への局在化とともに顕在化し免疫後21日目頃まで認められるという、B細胞応答の時系列と関連した動態を示すことが明らかとなった。また、再構築に伴い髄質領域に存在する免疫細胞群の多様化が見られた。

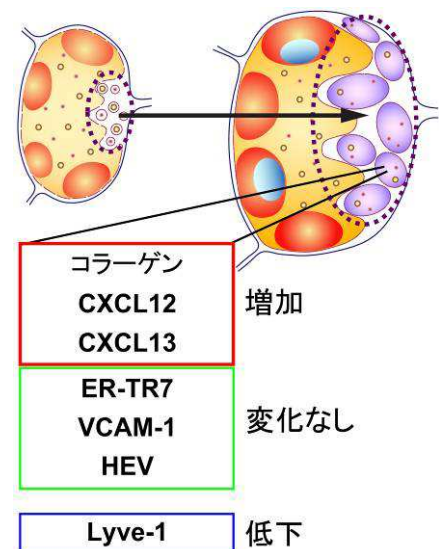
再構築に伴い髄質領域に存在する細胞群の変化や著しいB細胞集積が認められたことから、髄質領域におけるリンパ球遊走制御機構が再構築により変化したという可能性が考え



**図1 髄質領域の再構築** 正常状態および免疫後8日目の炎症所属リンパ節をLyve-1 (リンパ管内皮細胞)、CD169 (リンパ洞のマクローファージ)、IV型コラーゲンに対する抗体で染色した。免疫後のリンパ節では実質領域の拡大とLyve1陽性領域の縮小が認められる。点線はT-B境界、破線は皮質-髄質境界を表し、髄質領域が右側となるよう各図を示す。

られた。そこで、リンパ球遊走を制御するケモカイン・接着因子の発現を解析したところ、リンパ節間質系細胞に広く発現の見られるVCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule) -1、線

維芽細胞マーカーであるER-TR7の発現、リンパ球のリンパ節移入の場である高内皮細静脈の存在が、再構築前後で同程度に認められた。一方、再構築後の髄質領域ではコラーゲン繊維の局所的増加や、形質細胞、B細胞の遊走制御に関与するケモカインCXCL12、CXCL13の発現誘導が認められたことから、再構築に伴って他のリンパ節内領域とは異なる性質の遊走制御環境が髄質領域に形成されたと考えられ

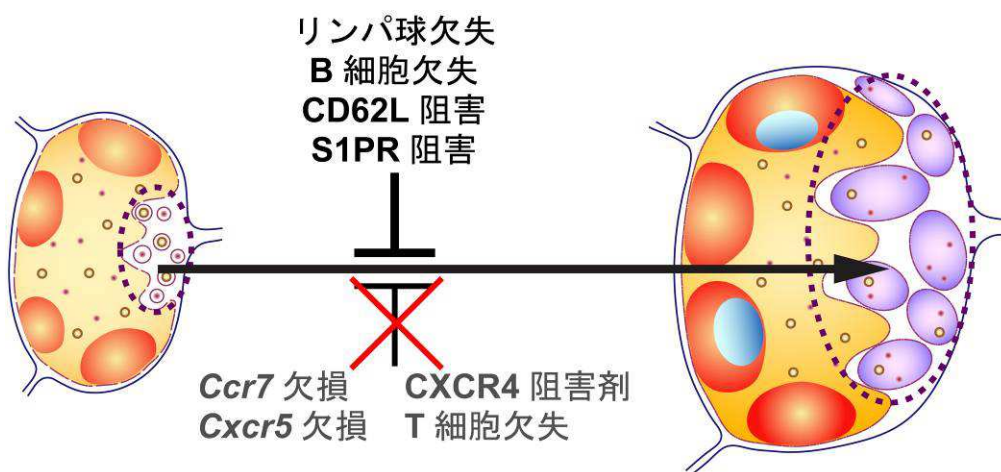


**図2 髄質領域の再構築に伴う微小環境変化** 再構築後(右)のリンパ節髄質領域における各種分子の増減をまとめた。

る (図 2)。

髄質領域の再構築に必要な細胞群を同定するために様々なリンパ球サブセットを欠失するマウスを用いて再構築誘導についての解析を行ったところ、T 細胞の欠失したヌードマウスでは再構築の誘導が正常に認められたのに対し、CD4 陽性ないし CD8 陽性 T 細胞と B 細胞が欠失する *Rag2* 欠損 T 細胞受容体トランスジェニックマウスや、全リンパ球が欠失する *Rag2* 欠損マウスでは再構築が阻害されたことから、髄質領域の再構築には B 細胞が必須であることが明らかとなった (図 3)。

正常状態の髄質領域に存在する B 細胞はわずかであることから、炎症免疫応答に伴い再構築を誘導するためには、再構築に先んじて B 細胞が髄質領域に移行することが必要になると考えられた。そこで再構築の遊走関連因子依存性を検討したところ、リンパ球の正常状態における体内循環を制御するケモカイン受容体 *Ccr7* ないし *Cxcr5* の欠損マウスだけでなく、髄質領域へのリンパ球・形質細胞遊走を制御するとされる CXCR4 に対する阻害剤

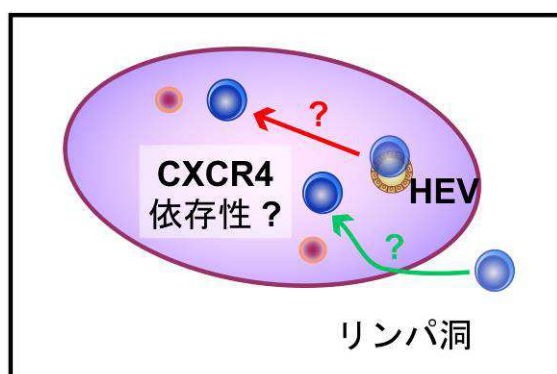


**図 3 リンパ節髄質領域の再構築機序** 髄質領域の再構築に対する各種遺伝子欠損、薬剤処理による影響をまとめた。これらの結果から、髄質領域の再構築には B 細胞、およびその生体内循環が必須であることが明らかとなった。

を投与したマウスにおいても、再構築が正常に誘導された。一方、リンパ球のリンパ節への移入および移出を制御する CD62L (L-セレクチン) やスフィンゴシン-1-リン酸受容体 (S1PR) の阻害によって髄質領域の再構築が阻害されたことから、再構築の誘導における B 細胞の髄質領域への移行は、HEV を介した血行性の移入ないし S1PR を介した移出に依存すると考えられる (図 4)。また、CXCR4 阻害剤処置マウスにおいても B 細胞、形質細胞の髄質領域への集積が認められたことから、B 細胞の髄質領域への集積は CXCR4 非依存的である可能性が示唆される。

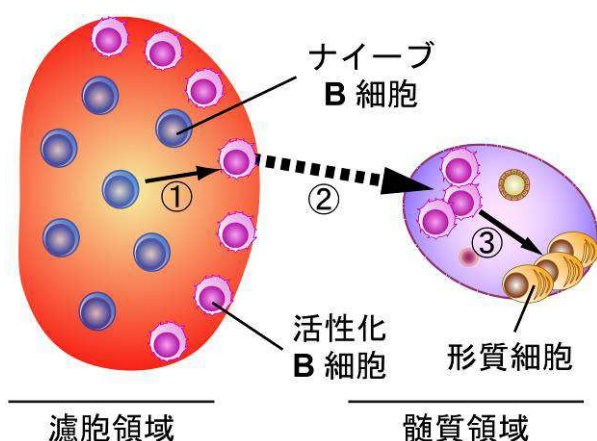
再構築の誘導には、B 細胞の髄質領域への遊走亢進により多くの B 細胞を髄質領域へ動員する必要があると推測される。B 細胞のホーミングアッセイによる検証を行った結果、炎症所属リンパ節において B 細胞 (とくにナイーブ B 細胞) の髄質領域への遊走亢進が認められた。したがって、炎症免疫応答に伴って B 細胞の髄質領域への遊走を促進させる機序が働いていることが示唆された。また、再構築後の髄質領域には抗原非特異的 B 細胞・形質細胞も多く存在していたことから、再構築の誘導にナイーブ (抗原非特異的) B 細胞が寄与する可能性が提示された。

炎症免疫応答に伴って多数の形質細胞が髄質領域に集積することは古くから知られてい



**図 4 B 細胞の髄質領域への移行** 再構築の阻害実験から、B 細胞の髄質領域への移行は CXCR4 非依存的である可能性、さらには HEV を介した血行性経路 (赤) と、S1PR の作用に依存するリンパ行性経路 (緑) という 2 つの経路が存在する可能性が示唆された。

たものの、活性化した抗原特異的 B 細胞がいつ髄質領域に移行するのか、また髄質領域への移行が活性化 B 細胞、形質芽細胞いずれの状態で行われるのか、といった点は厳密には明らかにはされていなかった。そこで、抗原特異的 B 細胞受容体ノックインマウスを用いて応答の初期過程を可視化することで、抗原特異的 B 細胞の髄質領域への移行時期を組織学的に解析した。免疫後 24 時間後までに早期活性化マーカーである CD86 の発現増強、B 細胞受容体の発現低下が認められることから、抗原特異的 B 細胞は免疫後 24 時間までに活性化すると考えられる。さらに、活性化に伴い B 細胞は濾胞間領域や濾胞-傍皮質境界部に集積するようになり、その局在が少なくとも免疫後 48 時間後まで持続することが明らかとなった。一方、髄質領域への抗原特異的 B 細胞の局在は免疫後 24 時間後までにはほとんど認められず、その後 72 時間後まで T-B 境界や濾胞間領域への集積とともに髄質領域に局在する抗原特異的 B 細胞が増加していったことから、髄質領域への移行は免疫後 48 時間から 72 時間の間に開始すると考えられた。髄質領域への移行が開始する段階では形質芽細胞への分化はまだ見られないことから、応答の初期過程では、髄質領域への移行後に活性化 B 細胞から形質芽細胞へと分化すると考えられた (図 5)。また、活性化 B 細胞の髄質領域



**図 5 活性化 B 細胞の髄質領域への移行** B 細胞は免疫後 24 時間目までに活性化し、濾胞-傍皮質境界部へと集積する (①)。さらに免疫後 48 時間から 72 時間後までの間に髄質領域への移行を開始し (②)、その後形質 (芽) 細胞へと分化すると考えられる (③)。図中②と髄質領域の再構築の開始が時期を同じくすることから、再構築によって抗体産生のための微小環境形成が行われることが示唆される。

への移行と再構築の開始時期がともに免疫後 72 時間 (3 日) 目頃であること、さらに過去の報告により髄質領域における形質細胞分化・生存に関連する増殖因子の応答に伴う発現増強が示されていることから、活性化 B 細胞の形質 (芽) 細胞への分化、形質芽細胞の増殖や形質細胞への分化、ならびに抗体産生を支持するための基盤が髄質領域の再構築によって形成されることが示唆された。

最後に、B 細胞の主たる応答の場であるとされてきた濾胞領域と髄質領域の機能的差異について検討するために、濾胞領域が欠失する *Cxcr5* 欠損マウスにおける液性免疫応答の解析を行ったところ、免疫後 60 日後までの抗原特異的抗体価と形質細胞数には、野生型と *Cxcr5* 欠損マウスの間で顕著な差が認められなかった。一方、抗原特異的 B 細胞数は応答期間を通じて野生型マウスのおよそ 1/3 に低下しており、とくに胚中心 B 細胞数は免疫後 21 日目では約 1/50、60 日目では約 1/20 と大きく低下していた。組織学的解析においても、濾胞を欠失した *Cxcr5* 欠損マウスでは胚中心構造の形成が認められなかった。したがって、髄質領域は形質細胞の分化と抗体産生に特化した場であり、胚中心応答を介して液性免疫記憶の樹立を担う濾胞領域とは機能的に差別化されていると考えられる。

本研究の結果から、B 細胞依存的に誘導される髄質領域の再構築によって抗体産生誘導のための基盤が形成されるという可能性が提示された。今後、再構築誘導を担う分子機序や B 細胞の髄質領域への移行を制御する遊走因子の解明をもとに、リンパ節髄質領域の再構築が液性免疫応答に果たす意義を明らかにすることで、リンパ節における抗体産生誘導機序の解明へとつながることが期待される。