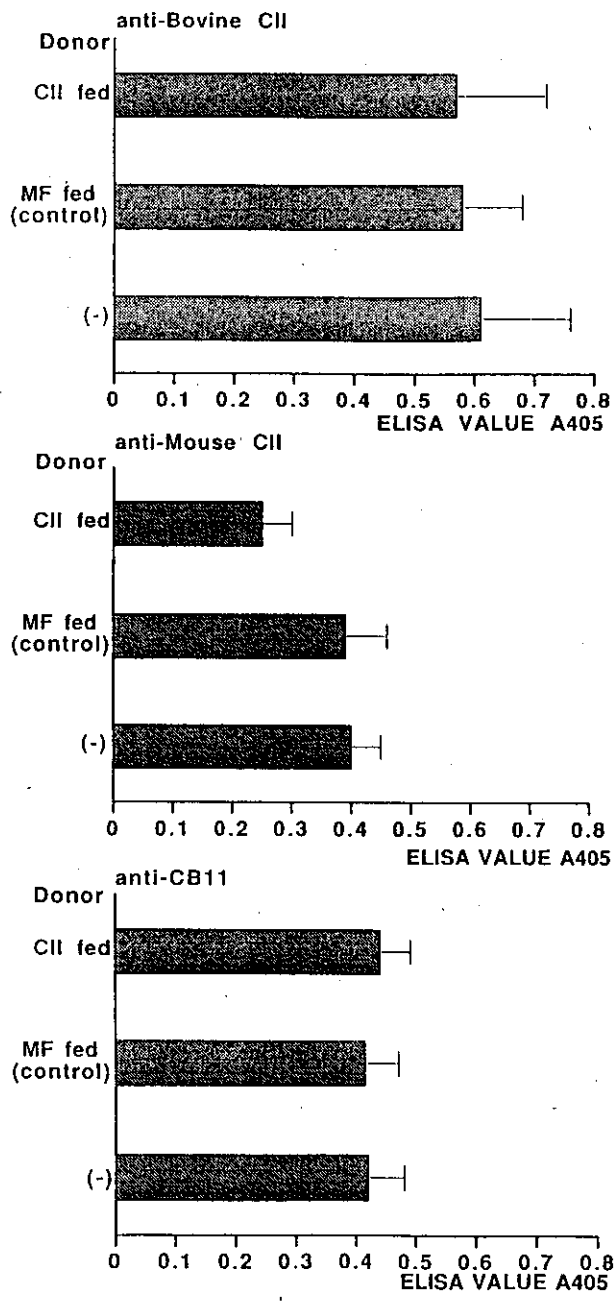


Tolerance to CIA induced by adoptive transfer of spleen cells from CII fed mice

Figure 10



Effect of adoptive transfer of spleen cells on antibody production

⊗ 1 1

## D. 考察

### 1. CII 食の摂食によるCIA症状の抑制

マウスにチューブを用いてCIIを経口投与することによって、CIAの抑制を誘導した例がNagler-Andersonらによって報告されている。しかしその抑制効果は弱かった。ラットにおいてもCIIの経口投与によるCIAの抑制の報告が同様にありますが、あまり強い抑制効果は認められなかった。

一般的に抗原を投与するにはこのようにチューブを用いて強制的に投与する方法が用いられてきた。しかしこの方法は定量性の点の優れているが、大量に抗原を投与するには不適當である。一般的に抗原を投与量が多いほど、経口寛容が強く成立すると考えられている。そこでわれわれは、投与抗原をタンパク質源として含む飼料を用いることにより大量の抗原を投与する系を開発した。実際当研究室において、この方法はwCNを投与抗原とする経口寛容の系において使用され、投与抗原量が多いほど経口免疫寛容が強く誘導させることが確認されている。

今回CIAの系にこの投与方法を利用したわけであるが、大量のCIIを投与することにより、非常に効果的なCIAの抑制に成功した。すなわち50% CII食を2週間投与することにより、CIA症状がほぼ完全に抑制された。これはマウス1匹あたり3.5gのCIIを投与したことになるが、それよりかなり少ない量のCIIを投与したNagler-Andersonらの結果と比較してかなり強くCIAを抑制できた。そのことからwCNの経口寛容の系と同様に、CIAにおいても大量のCIIを投与することにより有効に経口寛容を誘導できることが示された。本研究の方より抑制効果が明確にみられたのはこのように抗原投与量の問題が最も大きいと思われるが、投与方法の問題も関係しているのかもしれない。本研究においてNagler-

Andersonらの報告と同量のCIIをチューブを用いて投与し、CIAの抑制効果を調べたが、弱い抑制効果しか得られなかった(結果省略)

なおCIIの静注によりCIIに対する免疫寛容を誘導しCIAを抑制した報告もあり、抑制効果はかなり強いものであったが、本研究においてもこれと同じほどの強さの抑制効果が得られていて、免疫寛容を誘導する方法として経口投与は静注による投与に比べて遜色ないことが確認された。

また、飼料中のタンパク質の50%がCIIであり、栄養的な要因がCIAの抑制に関わった可能性についてであるが、以下のことより不定された。すなわち50% CII食を摂食しているマウスの体重と対照群に比較してあまり変化がなかった。さらにはCIIと非常に似たアミノ酸組成を持ち、栄養的には非常に似ていると考えられるI型コラーゲンを用いた50% I型コラーゲン食においてはCIAの抑制は見られなかった(結果省略)。

以上のように50% CII食の投与により効果的にCIAが抑制されたが、飼料中のCII含量が全タンパク質の50%であるのは病者用食品等へ応用を考えると実用性に欠けると思われる。そこで十分に効果的な経口寛容を誘導するのに必要最低限のCII含量について調べた。すなわち、50% CII食の投与の場合と同じように5%食、0.5%食、0.05%食を2週間、または4週間マウスに摂食させCIAの症状の抑制効果、抗体産生応答について調べてみた。

その結果を、Nagler-Andersonらの報告とともに表に示す。これによると2週間の経口投与により経口投与により経口免疫寛容を誘導するためには、50% CII食という大量のCIIを投与することが必要であるが、摂食期間を4週間に延ばすことによって、低含量のCII食を投与することによっても経口寛容を誘導できることが

明らかにされた。

また、最も低含量の 0.05% CII 食群に関しても対照群に比較してやや症状の低下がみられる。しかしそれより CII が多く含まれる 0.5% CII 食群の場合抑制作用がわずかにしか見られなかった。これまでもある抗原により免疫寛容を誘導する場合、少量では免疫寛容を誘導し、中量では免疫応答をもたらし、さらに多量では再び免疫寛容を誘導すること示されている。本実験で得た結果はまさにこれに一致する。

## 2. CII の経口摂取による CIA の抑制機構

50% CII 食摂取群においては CIA 誘導の際、抗ウシ CII 抗体産生応答について有意に抑制がみられた。すなわち他のタンパク質抗原における経口寛容の場合と同様に投与抗原に対する抗体産生が経口寛容によって抑制されたと考えられる。一般にマウス抗体のサブクラスにおいては IgG<sub>1</sub> が主なものであるが、DBA/1 マウスを CII で免疫した場合 IgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub> が最も多く、また補体活性化能が強く炎症反応を誘発する意味で、CIA の発症に大きな意味を持つと考えられる。本研究の結果、これらのサブクラスにおいても CII の経口投与によって、有意にその応答の低下がみられた。これにより補体活性化能が低下し、炎症反応が抑えられて CIA の抑制につながったと考えられる。

ウシ CII はマウス CII と高い相同性を有するために、抗体はマウス CII と交差反応を起こし、マウス CII を含む関節に沈着し、その後の CIA の発症を導くと考えられている。それゆえに、CIA には自己抗原であるマウス CII を認識する抗体が直接的に関与していると考えられる。実際、CII 食を摂取したマウスではマウス CII に対する抗体産生応答も有意に低下していた。また CB11 に対する抗体産生応答も有意に低下していたが、CB11 が B 細胞エピ

トープを含み、発症能を持つことが明らかにされていることを考えると、CIA の抑制にはこの CB11 に対する抗体産生応答の抑制が深く関係していることが示唆された。

次に T 細胞増殖応答について調べた。これまでの実験において、対照群として用いている wCN 食群と MF 食群の間にはわずかな差がみとめられたが有意な差ではなく、両者間の差はないと考えられる。そこで、以降の実験においては MF 食群のみを対照群として用いた。その結果、50% CII 食を摂取した群においては対照群に比較してウシ CII に対する T 細胞応答性が低下していることが示された。また T 細胞エピトープを含む CB11 に対する T 細胞応答性も低下していた。これらの結果、CIA の抑制には T 細胞の応答性の抑制も関係していることが示された。

ところで対照群においても S.I. 値が低いのは、抗原刺激の無い条件で培養した T 細胞の増殖応答が非常に高かったためである。これは DBA/1 マウス特有の現象であり、外来抗原なしに自己抗原に反応しているためであると考えられ、自己免疫疾患を発症しやすい性質を反映していると思われる。

このように 50% CII 食という大量の CII の経口投与により、抗体産生応答、T 細胞増殖応答の両方において CII に対する反応性の低下が見られた。CII を静注により予め投与すると CIA の症状がほぼ完全に抑制され、CII に対する抗体産生応答及び遅延型過敏反応も低下し B 細胞、T 細胞における免疫応答が抑制されていることが報告されているが、ここで示された CII の経口投与による免疫寛容の誘導はこの報告に合致する。また、これは CIA の発症には B 細胞、T 細胞の両者が関わっているとの知見とも一致する。

一方で CII 低含量飼料を摂取させた場合は、抗ウシ CII 抗体、抗マウス CII 抗体、抗 CB11 抗体すべてについて対照群と比

較したが、差は見られなかった（結果省略）。CIA 症状において抑制がみられた 5% CII 食を投与した場合でも抗体産生応答の抑制が認められなかった。このことより、CIA の発症に関与する B 細胞エпитープに対する抗体産生応答は抑制されている可能性はあるものの、CIA の症状の抑制されるために必ずしも抗体産生応答の低下が必要ないことが示唆される。この場合、CII に対する T 細胞応答の低下、あるいは調節性抑制 T 細胞の誘導（アクティブサプレッション）により CIA が抑制されるのかもしれない。そこでこの免疫応答低下にアクティブサプレッションが関与しているか検討するため、細胞移入実験を行った。その結果、50% CII 食摂取した供与マウスの脾臓細胞を移入した受容マウスは、CII を含まない市販の飼料を摂取した供与マウスの脾臓細胞を移入された対照群に比較して CIA の症状が抑制された。なお移入する細胞数については 1 匹につき  $1 \times 10^7$  個、 $2 \times 10^7$  個、 $4 \times 10^7$  個移入したが、 $4 \times 10^7$  個移入した場合のみ効果があった。

さて、Myers が CII の静注投与による免疫寛容誘導の系においても脾臓細胞を移入すると、寛容状態が受容マウスに移ることを報告している。さらに Myers らはこの脾臓細胞中の  $CD4^+$  T 細胞を移入することで、CIA が抑制されることよりを示し、同細胞が抑制作用を担っていることを明らかにした。一般には  $CD4^+$  T 細胞はヘルパー活性をもつ細胞として知られ、 $CD8^+$  T 細胞が抑制的な活性を持つ T 細胞であるとされていた。OVA などの経口寛容の移入実験においては、経口寛容を担っているのは  $CD8^+$  T 細胞であることが示され、また、ラットを用いた EAE の系においても MBP を経口投与したとき

誘導される抑制性 T 細胞は  $CD8^+$  T 細胞である。一方で最近、マウスに MBP を経口投与した場合に、抑制機能を有する  $CD4^+$  T 細胞が誘導されることが示された。本研究でも CII を経口投与することにより、脾臓に抑制性の T 細胞が誘導されたと考えられる。この細胞が  $CD4^+$  T 細胞、 $CD8^+$  細胞であるかは興味深い問題である。

最近の研究で、アクティブサプレッションは経口投与抗原の投与量が少量の場合に誘導され、投与量が多い場合はクローナルアナジーが誘導されるとされている。しかし、本研究では大量の抗原を投与した場合にアクティブサプレッションが誘導されていることが示された。また本研究で経口寛容の誘導されたマウスの脾臓細胞を移入したマウスにおいては、直接 CII を経口投与した場合とは異なり、ウシ CII 及び CB11 に対する抗体産生応答に差は認められず、マウス CII に対する抗体産生応答のみ低下した。マウス CII に対する抗体産生応答の低下については関節においてマウス CII に対して起こる局所的な反応が、移入した脾臓細胞の産生したサイトカインにより特に効率よく抑えられたことが考えられるが、この細胞移入試験における CIA の抑制は、直接 50% CII 食を摂取することにより誘導される経口免疫寛容とは完全に同じではなく、その一部のみを再現している可能性が考えられる。50% CII 食の摂取によりアクティブサプレッションの他、クローナルアナジー等複数のメカニズムによる免疫抑制が同時に誘導された可能性がある。

### (3) 自己免疫疾患患者用病者用食品の開発

多くの疾患は、食と関係して発症あるいは悪化するが、また同時に食の適切な摂取により、これを正常に修復することも可能となってきた。このような観点

から厚生省によって許可された特定の疾患を持つ人の治療等を目的に食事療法を行うためにデザインされた食品群として病者用食品がある。この病者用食品は、食品に特別の用途に適する旨の表示を許可する特別用途食品に位置づけられるものである。規格基準設定型の病者用食品については、たとえば糖尿病者用などをはじめとしてすでに多数が表示許可を受けているが、平成9年度よりさらに個別評価により許可される個別評価型病者用食品が新規に設けられた。この制度により新しく肥満、先天性代謝異常、アレルギー、免疫賦活、自己免疫疾患などの病者用食品が申請される可能性が増大している。

本研究により RA のモデルマウスにおいて、CII 食の経口摂取により関節炎症状が軽減することを明らかにした。また、本研究の進行中に RA、多発性硬化症について経口免疫寛容の臨床応用が試みられている。さらに、本研究で認められた CII の抑制効果は、加熱 CII においても認められることを見出しており、食品としての加熱殺菌操作も問題ない。本研究及びこれらの報告により、RA 等ある特定の抗原の存在が知られている自己免疫疾患は、その自己抗原の経口投与による免疫寛容の誘導によって非常に効果的に予防、治療ができると考えられ、自己免疫疾患に対する経口免疫寛容を利用した病者用食品開発の可能性が示された。また、このような自己免疫疾患用病者用食品の評価系として CIA 等の動物モデル実験系が有効であると考えられた。

#### E. 結論

経口免疫寛容現象を利用することにより慢性関節リウマチの動物実験系であるコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) を抑制できることが示された。自己免疫疾患用病者用食品として経口免疫寛容を利用した食品が期待される。また、CIA などのモ

デル動物系が自己免疫疾患用病者用食品の評価法として有用であることが示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. T. Matsumoto, A. Arnetani, S. Hachimura, A. Iwaya, Y. Taguchi, K. Fujita, T. Shigehisa, S. Kaminogawa. Intranasal administration of denatured type II collagen and its fragments can delay the onset of collagen-induced arthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol* 88: 70 (1998)
2. H. Yoshida, S. Hachimura, K. Hirahara, T. Hisatsune, K. Nishijima, A. Shiraishi, S. Kaminogawa. Induction of oral tolerance in splenocyte-reconstituted SCID mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 87: 282 (1998)

##### 2. 学会発表

1. 凌梅, 八村敏志, 植田祥啓, 海江田功, 久恒辰博, 橋口昌章, 志田寛, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 飴谷章夫, 上野川修一. TCR トランスジェニックマウスにおける経口免疫寛容の誘導. 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p.107 (1998).
2. 凌梅, 八村敏志, 植田祥啓, 橋口昌章, 志田寛, 後藤貴康, 伊勢渉, 戸塚護, 海江田功, 久恒辰博, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 飴谷章夫, 上野川修一. 抗原を経口摂取した TCR トランスジェニックマウスにおける抗体産生応答と T 細胞トレランスの誘導. 日本免疫学会総会・学術集会記録第 28 巻, p.370 (1998)

#### 4. パイエル板細胞、腸管上皮内リンパ球 (IEL)、粘膜固有層リンパ球の分離法の確立

##### A. 研究目的

平成9年度よりさらに個別評価により許可される個別評価型病者用食品が新規に設けられた。この制度により新しく肥満、先天性代謝異常、アレルギー、免疫賦活、自己免疫疾患などの病者用食品が申請される可能性が増大している。本研究においては免疫機能向上食品、自己免疫疾患用食品の開発および評価法確立のための基礎的研究として腸管免疫細胞の評価法への利用に向け、腸管由来免疫担当細胞の分離法について検討し、確立した。腸管には各組織 (パイエル板、粘膜固有層、腸管上皮) に抗原提示細胞、リンパ球が存在 (図1) し、各部位によって細胞の性質、機能が異なることも知られている。したがって、それぞれの部位から細胞を分離することが重要である。一方で、その分離法についてはパイエル板細胞、粘膜固有層細胞、腸管上皮についてようやく確立されつつあるところであり、分離方法は複雑で未だ統一的な方法が存在しない状況である。そこで、本研究ではパイエル板細胞、粘膜固有層細胞、腸管上皮内リンパ球の分離方法について既存の方法を参考に再検討した。なお、新規に発見された腸管免疫組織クリプトパッチについては別に分担研究者研究として行なった。

##### B. 研究方法

###### (1) パイエル板細胞の分離と調製

パイエル板細胞は既述の方法 (Frangakis ら, *J. Immunol. Methods* 48: 33, 1982) を参考にした方法により得

た。簡略化して記すと、まず、パイエル板を小腸より摘出し、1.5 mg/ml の Dispase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany, あるいは合同酒精, 東京) を含む 2.5-5% FCS cRPMI 中 37°C で 30 分間攪拌し、上部懸濁液を回収した後、下部懸濁液にあらたに同様の溶液を加え、同様の条件で攪拌した。計 4 回の攪拌の後、回収した懸濁液は cRPMI で洗浄し、細胞懸濁液を得た。

###### (2) IEL の分離と調製

石川らの方法 (Komano ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6147, 1995) により以下のように IEL を採集した。一匹当たり、約  $5 \times 10^6 \sim 10^7$  個の採集が可能である。

1. マウスを頸椎脱臼で殺し、正中線に沿って開腹し胃の幽門部直下と盲腸の直前を手術用鋏で切断し、小腸を摘出した。摘出した小腸は 5°C に保冷したハンクス氏液 (HBSS) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) で維持した。
2. 小腸内を HBSS で洗浄した後、ポリエチレンチューブ Size 3 (Hibiki, Tokyo) で小腸を反転し、腸管腔側を露出した。露出した後ペーパータオルで腸内分泌物を軽く除去した。
3. 37°C に保温した HBSS (FCS 5% 含有) 45 ml の入った 50 ml チューブ (Becton Dickinson, San Jose, CA) に小腸を 4 等分し入れ、45 分間 37°C、150 rpm で振盪した。
4. 50 ml チューブを良く振盪した後、内の細胞浮遊液をガラスウールカラムに通し、接着性の細胞や細胞の破片などの夾雑物を除去した。10 ml シリンジのシリンダー内部に二重にしたガーゼ

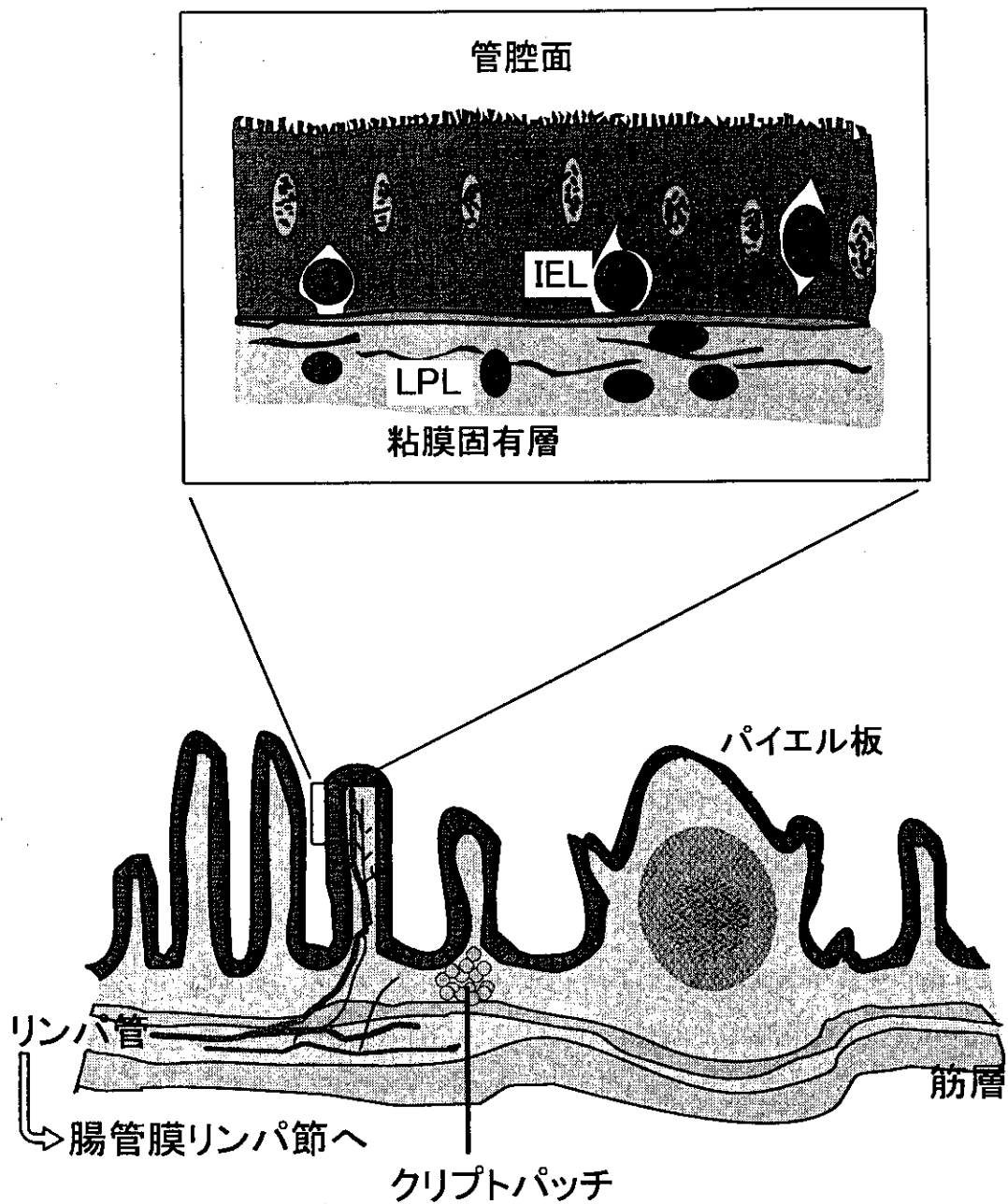


図1. 腸管付属リンパ組織(GALT)の構造

IEL: 小腸上皮間T細胞、LPL: 粘膜固有層リンパ球



を敷き、更に約 0.1 g のガラスウールを軽く詰めたものをカラムとした。さらに 5 ml の HBSS でカラムから細胞を完全に洗い出し、先に濾過した細胞浮遊液と合わせて総量 50 ml の細胞浮遊液とした。

5. 室温において 1200 rpm で 10 分間遠心分離した後、3 ml 残して上清を除去し、細胞を懸濁した。この細胞浮遊液と 3 ml の 100%パーコール (ファルマシア社パーコール原液と 10 倍濃度の HBSS を 9:1 の割合で混合したもの) を合わせ、培地で 10 ml にメスアップした。
6. 室温において 1800 rpm で 18 分間遠心分離した後、1 ml 残して上清を除去し、細胞を懸濁した。100%パーコールを 4.1 ml 加え、さらに培地で 10 ml にメスアップして、密度が均一になるように慎重に攪拌し、細胞浮遊液とした。
7. 上記の細胞浮遊液を 2 ml の 70%濃度のパーコール上に静かに重層し、室温において 1800 rpm で 18 分間遠心分離した。4 ml 残して上清を除去し、界面に存在する細胞層をピペットで 0.5 ml 残して回収した。
8. 培地で 15 ml にメスアップし、1500 rpm で 10 分間遠心分離し、細胞を洗浄した。

### (3) 粘膜固有層のリンパ球の分離と調製

マウスを屠殺後、すぐに開腹し、小腸 (十二指腸から回腸末端まで) を丁寧に採取し、氷冷しておいたハンクス液 (HBSS (+)) の入ったシャーレに入

れた。腸内容物を注射器を用いて HBSS で洗い流し、サイズ 3 のポリエチレンチューブ (Hibiki, Tokyo) で小腸を反転し、腸管腔側を露出させた。反転させた腸管はパイエル板を注意深くハサミで取り除いた後、あらかじめ 37°C に加温した 5% FCS-HBSS (-) (Ca, Mg フリー, 5 mM EDTA) 45ml の入った 50 ml チューブに 4 等分して入れ、37°C、135 rpm で 20 分間振盪した。その後、ガーゼでろ過して再び 5% FCS-HBSS (Ca, Mg フリー, 5 mM EDTA) で振盪処理をした。この振盪操作を 3 回行った後、腸管を約 1 cm の長さに切り、35 mg コラゲナーゼ (Sigma, St. Louis, MO) および 5% FCS-HBSS (+) 50 ml の入った三角フラスコ中にて、37°C で 20-30 分間スターラーで静かに攪拌しながら反応させる。腸管がバラバラになる直前の状態で反応を止め、速やかにガーゼでろ過し、得られたろ液を 1200 rpm、5 分間遠心処理をした。得られた細胞を HBSS (+) で洗浄し、ガラスウール・カラムを通してろ過した。さらにパーコール液 (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) を用いた密度勾配遠心法により 44%パーコール液と 70%パーコール液の境界面に得られるリンパ球面分を採取した。さらに得られた細胞を 5% FCS-RPMI 培地にて 37°C、2-3 時間シャーレにて培養し、非付着性細胞を回収して粘膜固有層リンパ球を得ることができた。

### C. 研究結果と考察

それぞれの細胞の分離法については方法の項に詳細に記述した。パイエル板は Dispase を用いた Frangakis らの方法をもとに分離法を検討し、分離した。IEL については石川らの方法にも

とづき分離した。この方法は、パイエル板の混入を防ぎ、切断箇所が少ないため切断断面からの粘膜固有層の細胞のリークをより防止することができる。粘膜固有層リンパ球も腸を反転する方法をもとに確立した。

これらパイエル板細胞、腸管上皮内リンパ球、粘膜固有層リンパ球に対する食品成分の作用を解析することにより、病者用食品の免疫系に対する機能の評価系を築くことが可能であると考えられる。

#### D. 結論

パイエル板細胞、腸管上皮内リンパ球 (IEL)、粘膜固有層リンパ球の分離法を示した。これ細胞に対する食品成分の作用を解析することにより、病者用食品の免疫系に対する機能の評価系を築くことが可能であると考えられる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. S. Kaminogawa, S. Hachimura, H. Nakajima-Adachi, M. Totsuka. Food allergens and mucosal immune systems with special reference to recognition of food allergens by gut-associated lymphoid tissue. *Allergol. Int.* 48: 15 (1999)

##### 2. 学会発表

1. 後藤真生, 八村敏志, 飴谷章夫, 衣笠文貴, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 上野川修一. 食餌抗原は小腸上皮内リンパ球 (IEL) を感作する/TCR トランスジェニックマウスを用いた解析. 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p.107 (1998).
2. 衣笠文貴, 後藤真生, 八村敏志,

- 飴谷章夫, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 上野川修一. TCR トランスジェニックマウスより樹立した小腸上皮内リンパ球 (IEL) の細胞株の性質と抗原に対する応答に関する研究. 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p.107 (1998).
3. 種田貴徳, 加藤真吾, 斉藤恒, 石川博通, 上野川修一. 新しい腸管リンパ組織 (cryptopatch) 未分化リンパ球の TCR 遺伝子再構成に関与する遺伝子発現の検索. 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p.352 (1998)
4. 橋口昌章, 八村敏志, 飴谷章夫, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 上野川修一. T細胞レセプタートランスジェニックマウスを用いたパイエル板T細胞のサイトカイン分泌応答の解析. 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p.352 (1998).
5. 石杜美奈, 好田正, 八村敏志, 衣笠文貴, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 飴谷章夫, 上野川修一. 脾臓及びパイエル板細胞の抗原提示能の解析 I. 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p.352 (1998).
6. 好田正, 八村敏志, 石杜美奈, 衣笠文貴, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 飴谷章夫, 上野川修一. 脾臓及びパイエル板細胞の抗原提示能の解析 II. 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p.353 (1998).
7. 植田祥啓, 八村敏志, 久恒辰博, 海江田功, 凌梅, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 飴谷章夫, 上野川修一. 抗原の経口投与に

- よって誘導されるクローン消去の検討. 日本農芸化学会 1998 年度講演要旨集, p.353 (1998).
8. 海江田功, 久恒辰博, 八村敏志, 植田祥啓, 凌梅, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 上野川修一. 経口免疫寛容における p53 遺伝子の関与について. 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p.353 (1998).
  9. 好田正, 八村敏志, 石杜美奈, 衣笠文貴, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 飴谷章夫, 上野川修一. パイエル板細胞の抗原提示能に関わる液性因子の解析. 日本免疫学会総会・学術集会記録第 28 巻, p.140 (1998)
  10. 香山雅子, 南野昌信, 鈴木健司, 齊藤亘, 渡辺守, 日比紀文, 久保田英朗, 上野川修一, 石川博道. T 細胞抗原受容体  $\alpha$  鎖欠損マウスの腸管  $\gamma\delta$ T 細胞の機能亢進について. 日本免疫学会総会・学術集会記録第 28 巻, p.143 (1998)
  11. 橋口昌章, 倉岡雅征, 八村敏志, 飴谷章夫, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 上野川修一. TCR トランスジェニックマウスを用いたパイエル板 T 細胞の IL-5 分泌応答の解析. 日本免疫学会総会・学術集会記録第 28 巻, p.147 (1998)
  12. 凌梅, 八村敏志, 植田祥啓, 橋口昌章, 志田寛, 後藤貴康, 伊勢涉, 戸塚護, 海江田功, 久恒辰博, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 飴谷章夫, 上野川修一. 抗原を経口摂取した TCR トランスジェニックマウスにおける抗体産生応答と T 細胞トレランスの誘導. 日本免疫学会総会・学術集会記録第 28 巻, p.370 (1998)

## 5. 腸管免疫組織クリプトパッチ細胞の分離と特性

### A. 研究目的

消化管は外界からの栄養物を摂取する器官であり、効率よく栄養を吸収するため腸管はその管腔面に絨毛を発達させている。このためヒト腸管粘膜の表面積は400 m<sup>2</sup>にもなる。また、腸管内には無数の腸内細菌が生息している。このことは、腸管は栄養物のみならず、同時に外界からの病原菌、毒素、アレルギー起因物質などにさらされ、有害物の体内への侵入の危険性が皮膚などと比べて高いことを意味する。これらの外界からの侵入に対し腸管は独自の免疫系を発達させており、これらを総称として腸管付属リンパ組織 (gut-associated lymphatic tissue; GALT) と呼んでいる。我々は、近年マウス腸管に未熟なリンパ球の表現型を持つ細胞の小集積が1腸管あたり約1,500個存在することを発見し、これをクリプトパッチと命名した。本研究では、免疫関連や自己免疫疾患用病者用食品の *in vitro* における簡易評価法の開発を目的とし、消化管に存在する免疫担当細胞の分離法の開発の一環として、クリプトパッチからの細胞分離を試みた。

### B. 研究方法

#### クリプトパッチ細胞の採取

マウス小腸を長さ1 cm程度に切断し、縦方向に切り開いてシート状にした。この腸管シートの管腔面を濾紙に張り付けることにより粘液を取り除いた後、細胞培養用6 cmプラスチック皿の上に平らになるように置き、透過照明型実体顕微鏡(拡大率約20-30倍)で観察した。クリプトパッチを視認しながら、21 G注射針を加工して作製した金属筒を用いてクリプトパッチを含む腸管組織を打ち抜いた。このクリプトパッチを含む組織を4℃のFCS(ウシ胎児血清)中で、精密ピンセットの先を用いて切れ目を入れ、崩れた組織から出てきた単細胞を回

収してクリプトパッチ細胞とした。

クリプトパッチの評価には、免疫組織化学染色、FACS解析、RT-PCRの手法を用いた。

### C. 研究結果

#### クリプトパッチ細胞の分離法の確立

実体顕微鏡下クリプトパッチが存在する腸管部を21G注射針(内径570 μm)を研磨して作製した金属筒を用いて打ち抜いた。この実体顕微鏡下で目視される構造物がまさにクリプトパッチであることは、打ち抜いた腸管組織から凍結切片を作製し、これを抗c-kit抗体で免疫組織染色することにより確認した。

クリプトパッチ組織を4℃100%FCS中で微小手術用ピンセットを用いて一つ一つ丹念にほぐすと、打ち抜いた腸管から単細胞のリンパ球が崩れ出てきた。この手法により1つのクリプトパッチ組織から約1,000個のリンパ球を得ることに成功した。

#### クリプトパッチ細胞のFACS解析

クリプトパッチ c-kit<sup>+</sup>細胞の中には主にT細胞系列が発現するCD4陽性、Thy-1陽性細胞が存在することが確かめられ、免疫組織化学的検索からの予想と一致した。一方、成熟したT細胞が発現するCD3の発現はみられず、これらは未熟なT細胞系列の細胞であることがあらためて確認された。

#### クリプトパッチ c-kit<sup>+</sup>細胞による IEL の再構成能

クリプトパッチ細胞に IEL 前駆細胞が含まれているかどうかを確認するために、4週齢ヌード (nu/nu) マウスからクリプトパッチ細胞を調製し、c-kit<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> 細胞 10,000 個を 2.5 Gy 放射線照射した SCID (severe combined immunodeficient) マウスの静脈内へ移

入した。5週間後、IEL画分および腸管膜リンパ節細胞を調製し、FACSにてTCRの発現を解析したところ、成熟IELが再構成されていた。

クリプトパッチ細胞およびIELにおけるT細胞分化初期マーカーの解析

胸腺におけるT細胞の発達分化は詳しく調べられており、その過程において発達段階に特異的なマーカーがいくつか知られている。このようなT細胞分化初期マーカーとしてRAG-2, pT $\alpha$ , TdTのmRNAの発現を半定量的RT-PCRを用いて調べた。RAG-2, pT $\alpha$ , TdTの各mRNAは、胸腺と比較すると弱いものの、クリプトパッチ細胞およびIELにおいても発現がみられた。このことはT細胞が腸管局所で発達分化していることを裏付けるものである。

#### D. 考察

クリプトパッチ細胞の分離法の開発

クリプトパッチはマウス腸管に散在するリンパ球小集積で、小腸あたり1,500個存在する。1クリプトパッチあたりの細胞数は約1,000細胞であり、胸腺や脾臓の10<sup>8</sup>細胞と比較しごくわずかしか構成細胞は存在しない。このような組織から純度よく構成細胞を採取する方法は至難であることが予想された。我々は、マウス腸管を切り開き、粘液を十分にはがした腸管壁を透過照明型実体顕微鏡で観察すると、クリプトパッチが小腸あたり約200個視認できることを見出した。さらに、21Gの注射針を研磨して作製した金属筒を用いることにより、実体顕微鏡下クリプトパッチを含む腸管組織を打ち抜くことに成功した。この組織片を実体顕微鏡下、超精密ピンセットを用いてクリプトパッチ部分の組織を掻き開くと、浮遊性の細胞がFCS中に放出された。このように回収された浮遊細胞は、c-kitの発現に富むことから、真にクリプトパッチ細胞であることが照明された。

クリプトパッチ細胞のFACSによる解

析

クリプトパッチ細胞はFACSで解析すると、c-kit<sup>+</sup>画分にCD4<sup>+</sup>およびThy-1<sup>+</sup>細胞を認めるが、これらはすべてCD3<sup>-</sup>, Lin<sup>-</sup>であった。IELは以前より胸腺外分化する集団が存在することが知られており、おそらくは腸管局所において発達分化しているのではないかと推測されてきた。このような背景より、未熟なリンパ球マーカーを発現するクリプトパッチ細胞は、IELの前駆細胞ではないかと推測された。

クリプトパッチ細胞によるIELの再構成

クリプトパッチがIELの前駆細胞を含むかどうかを確認するため、成熟T細胞を持たない免疫不全SCIDマウスに分離・精製したクリプトパッチc-kit<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>細胞を移入したところ、IEL画分に成熟T細胞が出現するのを確認した。このことより、クリプトパッチはIELが腸管局所で分化発達する場であることが示された。

クリプトパッチのT細胞分化初期マーカーのRT-PCRによる解析

クリプトパッチ細胞はRAG-2, pT $\alpha$ , TdTのT細胞分化初期マーカーを発現しており、このことからクリプトパッチはIELが腸管局所部発達分化していることが示された。

#### E. 結論

新たに発見された腸管リンパ組織クリプトパッチの細胞分離方法を確立し、その特性を明らかにした。クリプトパッチ細胞は、1)その表現型が未熟なTリンパ球の様相を示し、2)免疫不全SCIDマウスのIELを再構成し、3)T細胞分化初期マーカーであるRAG-2, pT $\alpha$ , TdTのmRNAを発現する。これらのことは、クリプトパッチがIELの発達分化する場であることを支持する。このクリプトパッチ細胞に対する食品成分の作用を解析することにより、食品の免疫系に対する機能の評価系を築くことが可能であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 発表論文

Saito, H., Kanamori, Y., Takemori, T., Nariuchi, H., Kubota, E., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., and Ishikawa, H. (1998). Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. *Science* 280, 275-278.

### 2. 学会発表

#### 1998年度 農芸化学会

- ・ 新しい腸管リンパ組織 (cryptopatch) 未分化リンパ球の TCR 遺伝子再構成に関与する遺伝子発現の検索 種田貴徳, 加藤真吾, 斉藤恒, 石川博通, 上野川修一

#### 1998年度 日本免疫学会

- ・ 腸管リンパ組織 cryptopatch リンパ球と上皮間 T 細胞の T 前駆マーカー遺伝子発現と TCR 遺伝子再構成 種田貴徳, 鈴木健司, 斉藤恒, 石丸薫, 久保田英郎, 伊藤守, 石川博通, 上野川修一
- ・ 腸管リンパ組織 cryptopatch 欠如マウスにおける上皮間 T 細胞の発達分化 鈴木健司, 石丸薫, 種田貴徳, 斉藤恒, 南野昌信, 上野川修一, 久保田英郎, 石川博通
- ・ マウス腸管リンパ組織 cryptopatch と上皮間 T 細胞の細胞学および免疫組織化学的検索 石丸薫, 鈴木健司, 斉藤恒, 金森豊, 久保田英郎, 石川博通

分担研究報告書

分担研究者 石川博通 慶應義塾大学医学部

腸管免疫組織クリプトパッチ細胞の分離と特性

研究要旨

食品成分の消化管免疫系への作用を評価するための *in vitro* アッセイ系の確立を目的とし、マウスの腸管より新規に発見された免疫組織“クリプトパッチ”からの細胞分離法の確立と、クリプトパッチ細胞の特性を明らかにすることを目的とした。クリプトパッチから高純度の c-kit 陽性細胞の調製に成功し、この c-kit 陽性クリプトパッチ細胞が免疫不全 SCID マウスの IEL を再構成すること、T 細胞分化初期マーカーである RAG-2, pT $\alpha$ , TdT の mRNA を発現していることを見出した。これらのクリプトパッチ細胞の性質は、クリプトパッチが腸管上皮間 T 細胞(IEI)が腸管局所で発達分化する場であることを支持している。従って、食品成分のクリプトパッチ細胞への作用を解析することは、食品の免疫系の調整機構の評価をするのに有効であると考えられる。

分担研究者 石川博通

慶應義塾大学医学部

助教授

A. 研究目的

本研究では、免疫関連や自己免疫疾患用病患者用食品の *in vitro*における簡易評価法の開発を目的とし、消化管に存在する免疫担当細胞の分離法の開発を行った。特に、近年我々が発見したマウス腸管に存在する免疫組織“クリプトパッチ”からの細胞分離を試みた。クリプトパッチ細胞の食品に対する反応性を考慮することについての妥当性を示すため、以下に消化管免疫系の独自性を概説する。

消化管免疫系

消化管は外界からの栄養物を摂取する器官

であり、効率よく栄養を吸収するため腸管はその管腔面に絨毛を発達させている。このためヒト腸

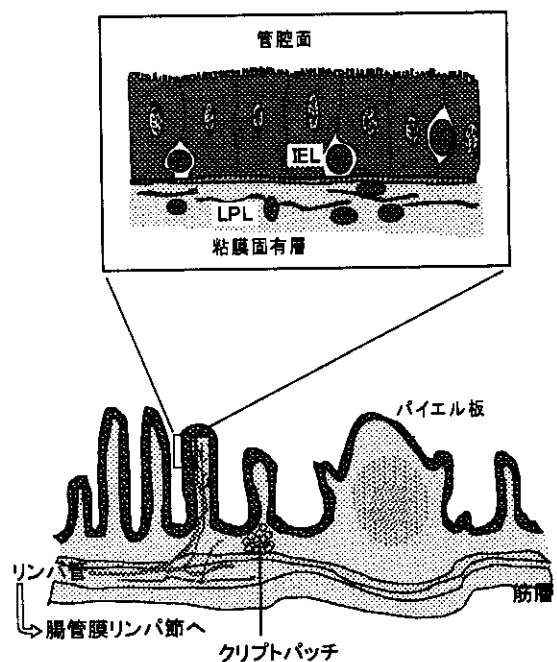


図1. 腸管付属リンパ組織(GALT)の構造  
IEL: 小腸上皮間T細胞, LPL: 粘膜固有層リンパ球

管粘膜の表面積は 400 m<sup>2</sup> にもなる。また、腸管内には無数の腸内細菌が生息している。このことは、腸管は栄養物のみならず、同時に外界からの病原菌、毒素、アレルギー起因物質などにさらされ、有害物の体内への侵入の危険性が皮膚などと比べて高いことを意味する。これらの外界からの侵入に対し腸管は独自の免疫系を発達させており、これらを総称として腸管付属リンパ組織 (gut-associated lymphatic tissue; GALT) と呼んでいる (図 1)。事実、腸管には全末梢リンパ球の 60~70 % が存在し、腸管内に放出される IgA 抗体は他のクラスの抗体と比較してもっとも多く産生される抗体である。パイエル板 (Peyer's patch: PP) はマウス腸管に約 10 個ほど存在するリンパ組織であり、その腸管管腔側表面は抗原を管腔面から基底膜側に細胞内小胞輸送を介してパイエル板細胞に受け渡す M 細胞が分布している。この取り込んだ抗原に対しパイエル板において B 細胞は IgA を産生するようにクラススイッチが誘導される。またパイエル板は経口免疫寛容を誘導する器官であると考えられており、食餌抗原などに対する腸管における不必要な活性化を防いでいる。粘膜固有層は小腸上皮層の基底膜直下に存在する組織であり、T 細胞、B 細胞、プラズマ細胞、マスト細胞などからなる多様な細胞集団が存在する。パイエル板で誘導された表面 IgA 陽性細胞はいったんリンパ管から血流に乗った後、表面受容体を介し粘膜固有層などの作用部位に走化する。ここで産生された IgA が小腸上皮細胞によって腸管管腔表面まで移送され、微生物や異物の侵入に対する防衛

の役割を果たしている。小腸上皮細胞は細胞間に密着結合組織 (タイトジャンクション) という物理的障壁を形成することにより外界からの有害物質の侵入を防いでいるだけでなく、免疫細胞に影響を与えるサイトカインや成長因子を発現し、免疫細胞を積極的に制御していると考えられている。また、小腸上皮細胞は外来抗原を T 細胞の抗原受容体 (T cell receptor; TCR) に提示して T 細胞を活性化させる主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex; MHC) クラス II 分子を表面に発現しており、実際に *in vitro* において T 細胞の活性化を誘導することができることが示されている。

#### 小腸上皮間 T 細胞 (IEL)

マウス小腸上皮間にはその数が全身末梢 T 細胞の約半数に匹敵すると考えられながら現在その生理的意義がほとんど不明である細胞群が存在する。それが小腸上皮間 T 細胞 (intestinal intraepithelial T lymphocytes; IEL) である。IEL は小腸上皮細胞 4~6 個に 1 個の割合で上皮にはさまれるようにして存在している多様な T 細胞の集団である (図 1)。IEL は以下の点で全身免疫系の細胞と異なる特徴をもっている (表 1)。

- 1) マウス IEL は TCR $\alpha\beta$  を発現する  $\alpha\beta$ -IEL と TCR $\gamma\delta$  を発現する  $\gamma\delta$ -IEL が約半数ずつ存在する。これに対し、リンパ節などの末梢リンパ組織における TCR $\gamma\delta$  発現 T 細胞の割合は数%にとどまる。



		末梢T細胞	IEL
TCR	$\alpha\beta$	> 95 %	40 ~ 70 %
	$\gamma\delta$	< 5 %	30 ~ 60 %
TCRの多様性		多様性に富む	多様性に乏しい
CD3 $\zeta$ 鎖		不可欠	Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 鎖で代用可
CD8分子		CD8 $\alpha\beta$ 異種二量体	CD8 $\alpha\alpha$ 同種二量体
細胞傷害性		小	大
自己反応性クローン		なし	あり
Con A刺激への応答		強い	弱い

表1. 末梢T細胞とIELとの比較

- 2)  $\alpha\beta$ -IELのTCRの多様性は末梢と比較し限られており、小数のクローンが優位に存在する。優位のクローンは同一環境下で飼育したマウスでも個体ごとに異なっており、また無菌マウスでもクローンの偏りがみられることから腸内細菌の抗原に反応して特定のT細胞クローンが増殖しているわけではないようである。
- 3) 一般に、TCRはCD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta/\eta$ の5つのサブユニットよりなるCD3分子とTCR-CD3複合体を形成するが、IELにおいては、末梢T細胞でみられるCD3 $\zeta$ -CD3 $\zeta$ 同種二量体のほかにCD3 $\zeta$ -Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 異種二量体、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ -Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 同種二量体が存在する。また、CD3 $\zeta$ 欠損マウスの胸腺では細胞数が激減しTCR-CD3複合体発現量も低下してい

るが、IELにおいてはTCR-CD3複合体発現量は正常と変わらない程度である。このことから、IELにおけるTCR-CD3複合体を介した情報伝達経路においてCD3 $\zeta$ はFc $\epsilon$ RI $\gamma$ で代用可能である、あるいは末梢T細胞とは異なる機能を担っていると考えられる。

- 4) 末梢T細胞のほとんどはTCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$ CD8 $^-$ あるいはTCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^+$ の表現型を持つが、マウスIELでは、TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 、TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$ 、TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $\alpha\alpha^+$ 、TCR $\gamma\delta^+$ CD4 $^-$ CD8 $\alpha\alpha^+$ などの末梢ではみられない独自の表現型をもつサブセットが多数を占める。
- 5) IELの大多数は細胞内顆粒を持ち、細胞傷害活性をもつ。
- 6) マウスIELには自己反応性クローンが存在する。これに対しリンパ節には自己反応性クローンは胸腺における選択により排除されている。
- 7) IELはリンパ節などの末梢T細胞と比較しCon A等の各種マイトージェンやIL-2に対する増殖応答性が著しく低い。

### IELの選択

胸腺においてT細胞は正の選択と負の選択という過程を経て、これに生き残った細胞だけが成熟して末梢リンパ組織へと移行する。T細胞による抗原認識は、CD4 $^+$ T細胞の場合、マクロファージや、樹状細胞、B細胞などが抗原をエンドソーム内で消化し抗原の部分ペプチドをMHCに結合した形で細胞

表面に提示したものをT細胞上のTCRが認識することで行なわれる。TCRをコードする遺伝子はT細胞の発達分化する過程で生殖体遺伝子に再構成がおきることにより形成される。この過程はランダムであり、遺伝子再構成により形成されたTCRの中にはいかなるMHC-ペプチド複合体をまったく認識できないものや、MHC-自己抗原由来ペプチド複合体に強く反応するものも含まれる。まったく自己のMHCに提示されたペプチドを認識できないTCRを持つT細胞は増殖シグナルを受けることができず自然死に至る(選択なし)。一方、自己のMHCに提示されたペプチドを適度な親和力で認識できるT細胞は増殖シグナルを受けて成熟する(正の選択)。また、自己ペプチドに強く反応する自己反応性T細胞はアポトーシスを起こし排除される(負の選択)。MHCにはクラスIとクラスIIが存在し、末梢T細胞においてはCD4陽性T細胞は抗原提示細胞上のクラスII分子に結合した抗原を認識し、CD8陽性細胞はクラスI分子に結合した抗原を認識する。しかし、上記に述べたようにIELにおいて自己反応性クローンやが存在し、CD4、CD8分子の発現に多様性がみられることは、IELは抗原認識の方式が末梢T細胞と異なり、選択過程も胸腺で受けるものと異なる経路を経て成熟したものであることが示唆される。

MHCクラスI分子は $\beta_2$ -ミクログロブリン( $\beta_2$ -microglobulin;  $\beta_2M$ )と細胞表面で会合しており、またMHCクラスI分子への抗原ペプチドの結合とMHCクラスI分子

の細胞表面への輸送にはTAP (transporter associated with Ag processing)分子が必要である。そこで、IELの発達分化におけるMHCクラスIの重要性を調べるため、 $\beta_2M$ 分子欠損マウス( $\beta_2M^{-/-}$ )(-/-:欠損遺伝子ホモ接合体、+/-:ヘテロ接合体、+/+:野生型ホモ接合体を示す)やTAP1欠損マウス(TAP $^{-/-}$ )におけるIELの構成が調べられた。また、IELの発達分化におけるMHCクラスIIの重要性を調べるため、MHCクラスII欠損マウス(MHCクラスII $^{-/-}$ )マウスにおけるIELの構成も調べられた(表2)。 $\beta_2M^{-/-}$ マウスやTAP $^{-/-}$ マウスではCD8 $\alpha\beta^+$ やCD8 $\alpha\alpha^+$ の $\alpha\beta$ -IELは激減するが、CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$ -IELは増加する。しかしながら、 $\beta_2M^{-/-}$ マウスと $\gamma\delta$ T細胞を欠損する $\delta^{-/-}$ マウスを交配して作製した $\beta_2M \times \delta^{-/-}$ マウスでは、CD8 $\alpha\alpha^+$ の $\alpha\beta$ -IELは増加した。これに対し、CD8 $\alpha\beta^+$   $\alpha\beta$ -IELは依然として検出限界以下であった。MHCクラスII $^{-/-}$ マウスでは全ての $\alpha\beta$ -IELと $\gamma\delta$ -IELは正常に発達分化していた。以上のこ

	TCR	CD4/CD8	MHC class I $^{-/-}$		MHC class II $^{-/-}$
			TAP $^{-/-}$	$\beta_2M^{-/-}$	
末梢	$\alpha\beta$	CD4 $^+$ CD8 $\alpha^+$	○	○	△
		CD4 $^+$ CD8 $\alpha\beta^+$	×	×	○
IEL	$\alpha\beta$	CD4 $^+$ CD8 $\alpha^+$	◎	○	○
		CD4 $^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$	◎	○	
		CD4 $^+$ CD8 $\alpha\beta^+$	×	×	
		CD4 $^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$	△	×+1	
		CD4 $^+$ CD8 $\alpha^+$	×	×	
	$\gamma\delta$	CD4 $^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$	○	○	○
		CD4 $^+$ CD8 $\alpha^+$			

◎:細胞数が増加      △:僅かに存在  
○:変化なし      ×:消失

\*1 ただし、 $\beta_2M \times \delta^{-/-}$ マウスでは増加

表2. MHC欠損マウスにおけるT細胞のサブセットの変化

とから、 $CD8\alpha\beta^+ \alpha\beta$ -IEL の発達分化には MHC クラス I 分子が必要であるのに対し、 $CD8\alpha\alpha^+ \alpha\beta$ -IEL や  $CD8\alpha\alpha^+ \gamma\delta$ -IEL の発達分化には MHC クラス I 分子は不必要であること、また全ての IEL に対し MHC クラス II 分子は不必要であることが確かめられた。

最近、MHC クラス I 分子に類似の分子群が存在することが明らかになってきた。これらは従来の古典的 MHC クラス I 分子に対して非古典的 MHC クラス I 分子と呼ばれている。これらには TL 抗原、CD1 分子などがある。ナチュラルキラー (NK) 細胞と T 細胞との両方の表現型を持ち T 細胞の Th1/Th2 分化における IL-4 産生細胞として近年注目を浴びている NK-T 細胞の発達分化は CD1 分子拘束性であることがわかっている。マウス小腸上皮細胞には TL 抗原の発現が認められることから、 $CD8\alpha\alpha^+ \alpha\beta$ -IEL や  $CD8\alpha\alpha^+ \gamma\delta$ -IEL がこれらの非古典的 MHC クラス I 分子との相互作用によって発達分化する可能性がある。

IEL に自己反応性クローンが存在することに関して次のような報告がある。Poussier らは MHC クラス I の一つである  $H-2^b$  分子に結合した雄マウスに特異的な抗原 (H-Y 抗原) を認識する TCR を優先的に発現する遺伝子導入マウスの IEL を探索した。 $H-2^b$  を持つマウスにこの TCR を発現させた  $H-2^b$  TCR 遺伝子導入マウスの雄 ( $H-2^b + H-Y$  抗原<sup>+</sup>) では TCR が自己を認識するため、胸腺では T 細胞は負の選択を受け、末梢には現れない。一方、雌マウスの  $H-2^b$  TCR 遺

伝子導入マウス ( $H-Y$  抗原<sup>-</sup>) では T 細胞は機能的な細胞として正常に選択されて末梢にも存在する。このマウスの IEL を検索した結果、 $CD8\alpha\beta^+$  IEL は雄マウスでは消失していたが、雌マウスでは存在し、抗原特異的な増殖応答をもっていた。さらに、MHC が  $H-2^b$  ではなく  $H-2^d$  であるマウスにこの TCR を発現させた遺伝子導入マウスでは、この TCR は  $H-2^d$  には結合できないため正の選択を受けず (選択なし)、末梢では T 細胞は消失したが、IEL は正常に存在した。しかし  $CD8\alpha\beta^+$  IEL は抗原に対する応答性を失っていた。どのマウスの場合にも  $CD8\alpha\alpha^+$  IEL は存在していたが、全ての場合で抗原に対する応答を示さなかった。この実験結果は  $CD8\alpha\beta^+$  IEL は負の選択を受けるが正の選択が正常でないこと、 $CD8\alpha\alpha^+$  IEL は選択を受けないことを示唆している。最近、TCR 遺伝子導入マウスに RAG (recombination-activating gene) 欠損マウス ( $RAG^{-/-}$ ) をかけあわすことにより内在性の TCR の発現を完全に抑えた TCR 遺伝子導入マウスを用いてより厳密な IEL の解析が行われた。この実験により、 $CD8\alpha\alpha^+$  IEL が自己反応性クローンが負の選択を受けずに成熟する理由として、 $CD8\alpha\alpha$  分子は  $CD8\alpha\beta$  分子と比較し TCR の MHC/ペプチド複合体の認識を補助する共受容体としての寄与が少なく、その結果として自己抗原に対して負の選択が起きるほど強い刺激が入らないことによると示唆された。これらのことは  $CD8\alpha\alpha^+$  IEL における選択は胸腺で起きている機構と異なることを意味している。

## IELの胸腺非依存的分化

IELが胸腺由来の末梢T細胞と異なる性質を持つことは、IELが胸腺由来T細胞とは異なる発達分化をする細胞であることを強く示唆している。GALTは系統発生的に見てヤツメウナギなどの最も原始的な脊椎動物においても存在している(図2)。哺乳類

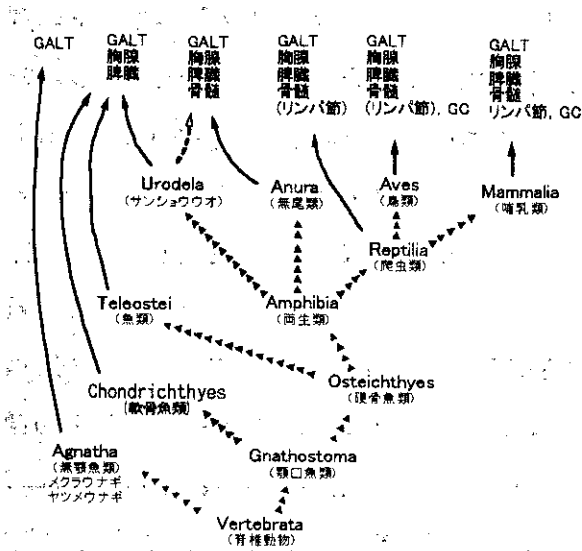


図2. 脊椎動物におけるリンパ組織の発達

GALT:腸管リンパ組織, GC:腸中心

(Pasquier LD: Fundamental Immunology, p199, Raven Press, 1993より)

においては胸腺をT細胞の供給源とする脾臓、リンパ節を中心とする全身免疫系が発達しているが、系統発生の系譜を考えるとGALTの一部が胸腺非依存的に独自の発達分化過程を維持していると考えられることは自然なことである。

実際、胸腺を欠損するヌード(nu/nu)マウスでは脾臓やリンパ節のほか、粘膜固有層やパイエル板においてもT細胞が消失しているが、IELは存在している。更に、正常マウスの胸腺を外科手術で摘出し、致死量のX

線を照射して成熟T細胞を除去した後、T細胞の前駆細胞を含んでいる胎児肝造血幹細胞または骨髄細胞を移入すると、4週間ほどでIELは再構成されるが、粘膜固有層、パイエル板のT細胞は再構成されない。また、TCR遺伝子を再構成するRAG-1のmRNAがIELで見られるという報告もある。これらの報告はIELが胸腺非依存的に分化すること、そしておそらくは腸管局所にT細胞分化の場があることを示唆している。

IELの特徴的な表現型やnu/nuマウスに存在するIELの解析から、 $\gamma\delta$ -IELや $CD8\alpha^+ \alpha\beta$ -IELは胸腺非依存性IELと考えられている。

## クリプトパッチの同定

我々のグループはマウス腸管をシート状に開き、これをろ紙の上へのばして平らに包埋し、切断面が筋層に対し水平になるように切片を作製することにより、陰窩部を広く検索する手法を開発した。我々は、この手法を用いてマウス腸管組織をヘマトキシリン-エオジン染色にて注意深く観察することにより、絨毛基部から陰窩の粘膜固有層中に多数のリンパ球小集積が存在するのを見出した(図3)。このリンパ球小集積は直径約100 $\mu\text{m}$ であり、十二指腸から大腸にかけて分布し、小腸あたり約1,500個存在することが確かめられた。我々このリンパ球小集積を陰窩の粘膜固有層に分布するリンパ組織という意味でクリプトパッチ(cryptopatch; CP)と命名した。