

## 免疫応答を現場で見る

### Visualization of in situ Immune Responses

松野 健二郎, 上田 祐司

Kenjiro Matsuno and Hisashi Ueta

獨協医科大学解剖学マクロ講座

**要 旨** リンパ節などの免疫臓器は高度に組織化された美しい構造を持っている。そこでは、病原体や異常細胞が体内に出現した時、適切な免疫応答が最も効率的におこり、異物を排除してわれわれの体を守ってくれている。本稿では接着分子、細胞分裂や抗体などの機能分子、細胞マーカーと組織骨組み等を特異的に染色する多重免疫染色法を用いて、in situ、切片レベルで trafficking (免疫細胞の棲み分けと動態) の実態やクラスター形成・増殖性応答などの細胞間相互作用を含む免疫応答の現場を示した。本手法は、現場を見ることにより真実に迫る解析ができるので、多くの未解明の病態究明の糸口を発見する可能性を持っている。

**キーワード**：多重免疫染色、リンパ節、免疫細胞の細胞交通、クラスター形成と抗原提示、GvH 病

#### 1. はじめに

リンパ節などの免疫臓器は高度に組織化された美しい構造を持っている。そこでは、病原体や異常細胞が体内に出現した時、適切な免疫応答が最も効率的におこり、異物を排除してわれわれの体を守ってくれている。この効率性は、マクロファージ、抗原提示細胞 (dendritic cell, DC), T cell, B cell などの免疫担当細胞が法則性をもって特定の場所に棲み分けていること、そして法則性を持って生体内を盛んに行き来しているためと思われる。本稿ではこの棲み分けと動態をまとめて免疫細胞の細胞交通 (immune cell trafficking) と定義する。この trafficking は細胞接着分子とケモカインおよびその受容体といった一連の機能分子 (trafficking molecules) によって調節されている。この免疫応答の本態に迫るには、in vivo の現場を見る必要があり、それには形態学的な解析法が不可避である。われわれは、現場での免疫応答を可視化するため、接着分子、細胞分裂や抗体などの機能分子、細胞マーカーや組織骨組み (IV型コラーゲン) 等を特異的に染色する多重免疫染色法を確立した<sup>1,2)</sup>。具体的には、一番目のマーカーを標識二次抗体による間接 alkaline phosphatase 抗体法で青色 (基質: Vector Blue キット) に、次に type IV collagen を間接 peroxidase 抗体法で茶色 (基質: diaminobenzidine) に、三番目に thymidine analogue の BrdU (Bromodeoxyuridine) を間接 alkaline phosphatase 抗体法で赤色 (基質: New Fuchsin キット) で三重染色するものである。これにより、増殖性応答や抗体産生応答を各種細胞の空間的位置関係の中で観察できる。本稿では、ラットのリンパ節を用いて、基本構造と

trafficking を解説し、GvH 病モデルを使って、移植免疫応答の現場をお示したい。

#### 2. リンパ節の構造と trafficking を支える分子的構造<sup>3)</sup>

浅皮質は B cell 領域で、リンパ濾胞とその周辺部に主として B cell が棲み分けている。深皮質は T cell 領域で、高内皮細静脈 (high endothelial venule, HEV) が存在し、主に T cell と DC が棲み分けている。髄質にはプラズマ細胞と B cell が、リンパ洞には多数の洞内マクロファージが棲み分けている (図 1a)。

T cell 領域の間質細胞は CCL19, 21 などのケモカインを分泌し、ICAM1 接着分子を持つ。それにより、対応するケモカイン受容体の CCR7 と接着分子の LFA1 を持つ T cell を深皮質に引きつけ、とどめることで棲み分けさせている。一方 B cell 領域の間質細胞は CXCL13 ケモカインを分泌し、ICAM-1 や VCAM-1 接着分子を持つ。それにより、対応する CXCR5 と LFA1 を持つ B cell や濾胞 T cell を浅皮質のリンパ濾胞に引きつけ、棲み分けさせているという<sup>4)</sup>。

T cell 領域に存在する HEV は背の高い内皮細胞からなる独特の構造をとり、再循環リンパ球が直接その壁を通して血液からリンパ節に入る (transmigration する)。HEV はその内腔面に ICAM-1 (図 1b) や selectin ligands などの接着分子を発現しており、対応する LFA-1 や L-selectin を持つリンパ球がそれを介して結合した後、深皮質に局在する DC などが分泌する CCL21 などのケモカインにより引きつけられて、HEV 壁を通して実質内に transmigration する<sup>5)</sup>。消化管などの粘膜組織付属リンパ節やパイエル板においては、HEV は MAdCAM-1 という接着分子を選択的に持つ (図 1c)。それに対応するリガンドの  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンを持つリンパ球のみが transmigration の前段階として結合できるという。

もう一つのリンパ節の入り口は辺縁洞（被膜下洞）で、末梢臓器の排導リンパ中のリンパ球やDCが輸入リンパ管を經由して入ってくる。辺縁洞は一層のリンパ洞内皮細胞によって浅皮質から境され、さらに一層のマクロファージによって裏打ちされている（図1a）。

リンパ節の出口は、髓洞から輸出リンパ管へのルートであり、リンパ節の実質から髓洞に出るためにはリンパ球がリンパ液中に存在する sphingosine-1-phosphate というケモカインに対する受容体 (S1P<sub>1</sub>) を持っていることが重要とされる。実際に再循環リンパ球の多くが S1P<sub>1</sub> 陽性である<sup>6)</sup>。

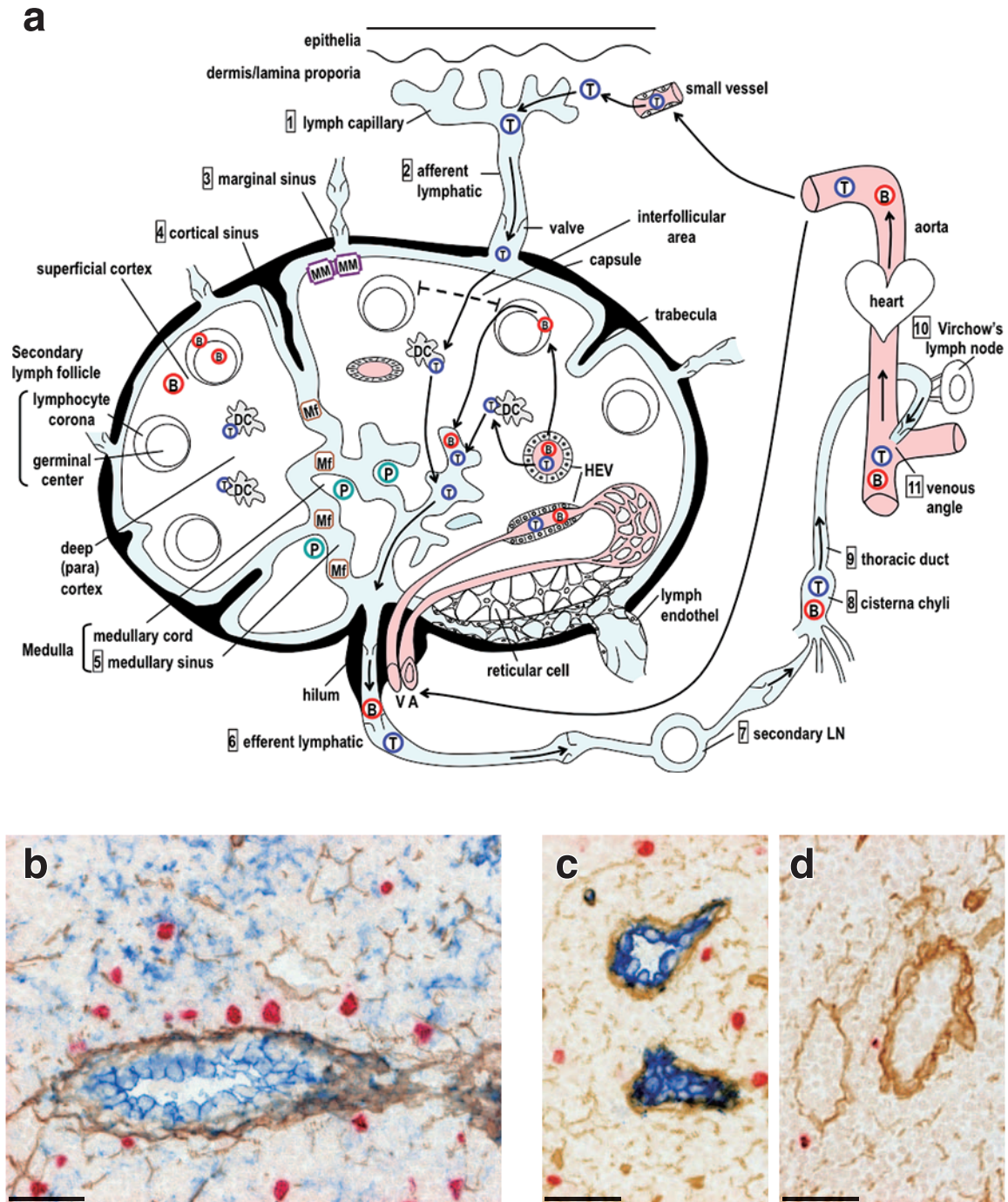


図1a (文献3より転載). リンパ節の基本構造とT cell (T) とB cell (B) の trafficking 経路の模式図. 四角数字は末梢臓器のリンパ毛細管から排導リンパ節までと、リンパ本管（胸管）を經由して血流に入るまでのリンパ液の流れを示す. DC: T cell 領域の樹状細胞, HEV: 高内皮細静脈, Mf: マクロファージ, MM: 辺縁洞に外接するマクロファージ, P: プラズマ細胞. 図1b-c (文献3より転載). 高内皮細静脈に発現する接着分子. ICAM-1 (青) は普遍的に発現し (b), MAdCAM-1 (青) は消化管のリンパ臓器 (c) や粘膜固有層の細静脈に選択的に発現する. 一方, 皮膚所属リンパ節 (d) はMAdCAM-1 陰性である. 茶色: IV collagen, 赤色: BrdU, scale bar = 40 μm.

### 3. 再循環リンパ球の trafficking

恒常状態では、抗原に出会ったことが無い naive T cell が、主に血液とリンパ液の間を常に再循環し、抗原に出会うと免疫応答をおこす。これを免疫学的監視という。そのため、リンパ液中のリンパ球を集めると、この再循環する naive T cell がほとんどを占める。

実際、ラットで、リンパ管本幹である胸管内のリンパ球は約 80% が T cell で、そのうち 90% 以上が naive T cell であり、生体内 trafficking を調べるには最適な材料となる<sup>3)</sup>。ここで、組織適合抗原 (rat では RT antigen という) でマイナー抗原のみが異なるラットの組み合わせ (congenetic combination, RT7<sup>b</sup> versus RT7<sup>a</sup>) を使えば、拒絶反応がおこらず自己のリンパ球と変わらない動きをするので、静脈投与後、ドナー細胞のコンジュニックマーカー (RT7<sup>b</sup>) を染色することにより、恒常状態でのリンパ球のレシピエント内の動きを容易に観察することができる<sup>7)</sup>。

ドナー細胞は投与後 15 分ほどで全身のリンパ節やパイエル板の HEV の内面に接着している像が見られ (図 2a)、一部はすでに HEV を越えて実質の深皮質内に transmigration している。このように血液中の再循環リンパ球が二次リンパ組織に遊走するスピードは極めて早い。3-6 時間で、リンパ節内のドナー細胞数は最高に達し、12 時間以降には減少し始める。これは、深皮質から髄洞に出て輸出リンパ管に入り再び再循環を始めるためである。

一方少数のドナー細胞は、肝臓などの末梢臓器に入った後、排導リンパに移動し、所属リンパ節の辺縁洞に達する。そこから浅皮質のリンパ濾胞の無い部位 (interfollicular area 濾胞間域) を通過して浅皮質に進入する (図 1a, 2b)。肝臓ではこの transit time が 3-4 時間ときわめて早く、門脈領域を中心とした免疫監視が効率よく行われていることを示唆する<sup>7)</sup>。

興味深いことに、深皮質の T cell 領域に遊走したドナー細胞の多くは、そこに住んでいるレジデント DC と会合し細胞集塊 (クラスター) を形成する (図 2c)。これらの DC は恒常状態では抗原を持っていないので、ドナー細胞は活性化を起こさず、数時間後にクラスターの外に出る。DC が抗原を持っている場合は、このクラスターの中で抗原特異的 T cell が選択され、DC による抗原提示が起こることになる (後述)。

### 4. GvH 反応時の再循環リンパ球の trafficking

一般に抗原がリンパ節に入った時、上に述べた再循環リンパ球の動きは一変する。HEV や輸入リンパ管からのリンパ球の流入が増加する一方で、輸出リンパ中のリンパ球排出数は抗原刺激後 24 時間以上にわたり大きく減少する。これを lymphocyte trapping という<sup>3)</sup>。これは抗原特異的なリンパ球を最大限、全身から動員して免疫応答を効率化するためであろう。さらに抗原提示を受けた抗原特異的なリンパ球の増殖・分化が起こり、エフェクター細胞が作られる。これらの結果、リンパ節の重量と細胞数は一気に増加する。これが免疫応答

の現場そのものとなる。

では、どのようにして免疫応答が起こっているのであろうか。ドナーに親の胸管リンパ球 (主要組織適合抗原 RT1<sup>c</sup> のもの) を用い、レシピエントに F<sub>1</sub> (RT1<sup>c</sup> × RT1<sup>l</sup>) 一代雑種ラットを使うと、レシピエントはドナー細胞を自己と見なし拒絶しないが、ドナー細胞はレシピエント細胞に発現する片親の RT1<sup>l</sup> 抗原を異物と見なすので、ドナー細胞が一方向的にレシピエントを攻撃する graft-versus-host (GvH) 病が起こる。ここで、RT1<sup>c</sup>RT7<sup>b</sup> ラットのドナー細胞を F<sub>1</sub> (RT1<sup>c</sup>RT7<sup>a</sup> × RT1<sup>l</sup>) レシピエントに静脈投与する組み合わせにしてやると、コンジュニックマーカー (RT7<sup>b</sup>) で追跡できる。

初期にはドナー T cell は congenetic combination の時と同様にふるまい、すばやく HEV を transmigration して深皮質でレシピエントのレジデント DC とクラスターを形成する。異なるのは、この後クラスターを形成したドナー T cell の一部がそこにとどまり、増殖性応答を起こすことである。ここで、チミジンアナログの Bromodeoxyuridine (BrdU) を予めレシピエントに投与しておけば、抗 BrdU 抗体で免疫染色することにより、DNA 合成している増殖細胞の核のみを選択的に染め出すことができる。あとは、多重染色によりコンジュニックマーカーやレシピエント DC の同時観察が可能となる。

全身のリンパ節の増殖性応答はこのクラスターの中から始まり (図 2d)、その後 T cell 領域全体に広がる。故に、このクラスターは組織適合抗原 (アロ抗原) の提示の現場であり、この中で、ドナーの抗原特異的 T cell のみがレシピエント DC の細胞膜表面に発現する RT1<sup>l</sup> 抗原と鍵と鍵穴の関係で結合することにより選択され、直接に抗原提示を受けて GvH 病のエフェクター T cell に増殖・分化するわけである。

増殖により生まれたたくさんのエフェクター T cell は、深皮質から髄洞に流れ込み (図 2e)、輸出リンパ管からリンパ節を出て、胸管や右リンパ本幹などを經由して血流に入る (図 2f)。その後、GvH 病の標的臓器である皮膚 (図 2g)、腸管 (図 2h) や肝臓に遊走し、そこで組織障害を起こすことになる<sup>8)</sup>。

エフェクター T cell は自身の細胞膜表面の L-selectin や CCR7 分子を減少させるが、それに代わって、腸管もしくは皮膚組織への遊走に必要な trafficking molecules を増加させるようになるという<sup>4)</sup>。腸管遊走性のエフェクター T cell は  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンと CCR9 を増加させ、粘膜固有層の細静脈に発現する MAdCAM-1 ( $\alpha 4\beta 7$  インテグリンのリガンド) を介して内皮に接着し、間質細胞が分泌する CCL25 ケモカイン (CCR9 のリガンド) により引きつけられて、transmigration して粘膜に入ると言われる。マウスでは皮膚遊走性のエフェクター T cell は E/P-selectin リガンドや CCR4/10 を、真皮の細静脈はそれに対応する E/P-selectin や CCR4/10 リガンドを発現すると言われ、ラットでも真皮の細静脈が E/P-selectin を発現する<sup>3)</sup>。

ラットでは、GvH 病で小腸上皮内に浸潤し、上皮を破壊するドナー T cell は CD8<sup>+</sup> $\alpha$ E インテグリン (CD103)<sup>+</sup> が大部



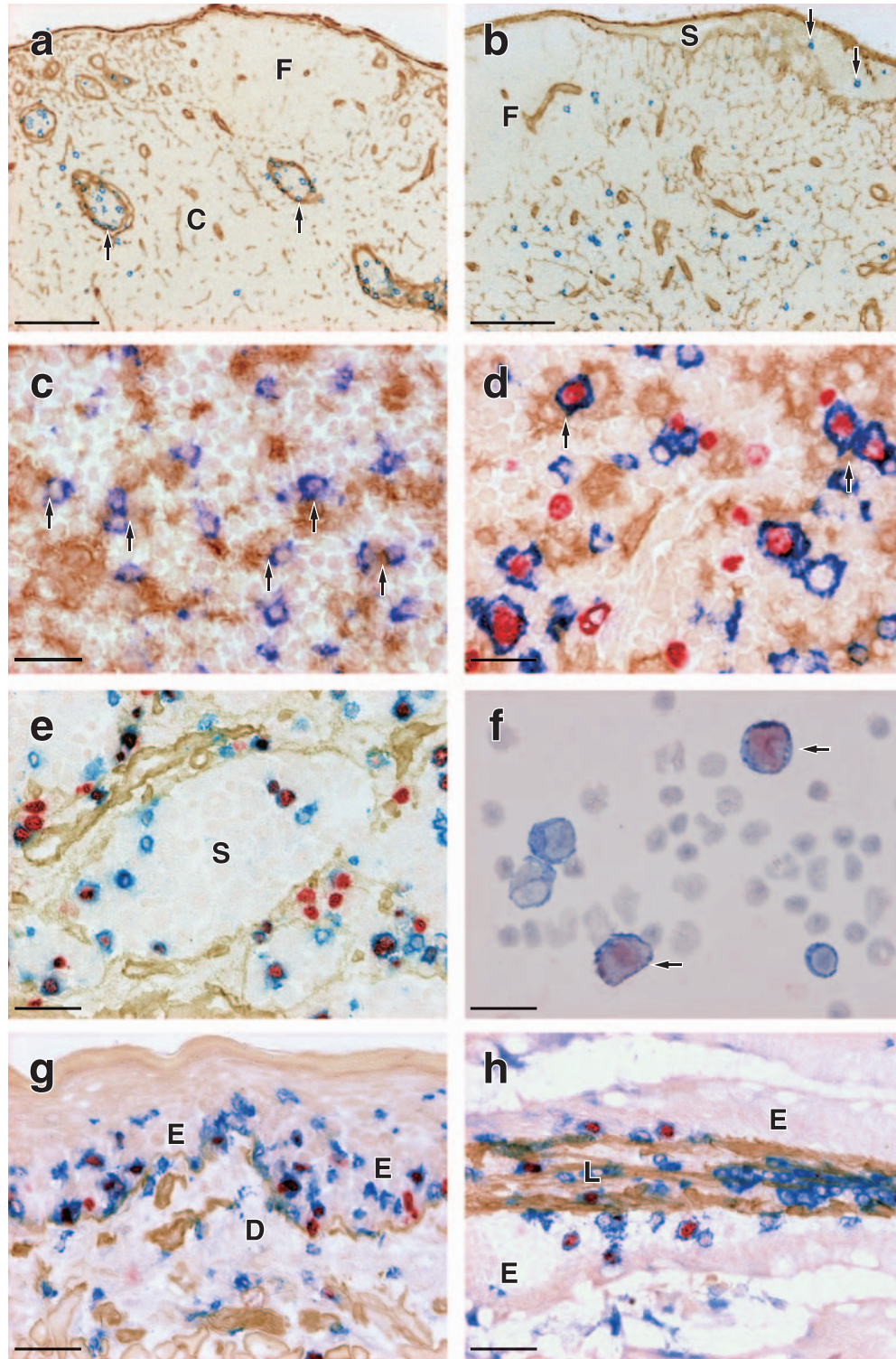


図2 (文献3より転載) a-c: コンジェニックリンパ球を投与後15分 (a), 3時間後 (b) と24時間後 (c) のリンパ節. d-h: GvH病を起こしたレシピエントの2日目 (d) と3日目 (e) のリンパ節と3日目の血液白血球分画の塗抹標本 (f), 6日目の皮膚 (g) と8日目の小腸 (h). 青: ドナー細胞 (a-d, fはコンジェニックマーカー, e, g, hはドナーI型組織適合抗原), 赤: BrdU<sup>+</sup>細胞, 茶色: IV型コラーゲン染色による基底膜などの組織の骨組み (a, b, e-h) またはレシピエントDC (c, d, レシピエントII型組織適合抗原). Scale bar = 100  $\mu$ m (a, b), 20  $\mu$ m (c, d, f), 40  $\mu$ m (e, g, h). a. ドナー細胞は速やかにHEV (矢印)に接着し, transmigrationする. C: 深皮質, F: リンパ濾胞. b. 肝臓の所属リンパ節にリンパ行性に辺縁洞 (S)に入ってきたドナー細胞 (矢印). F: リンパ濾胞. c. ドナー細胞は恒常状態でも深皮質のレシピエントDC (茶色)とクラスターを形成するが小型のままでは活性化していない (矢印). d. 抗原特異的ドナー細胞は深皮質のレシピエントDCとクラスターを形成して抗原提示を受け, 大型化してエフェクター細胞に分化・増殖する (矢印). e. 活性化したエフェクター細胞 (青)はリンパ節の髄洞から輸出リンパに出る. f. 血液中に出現したエフェクター細胞 (青). 一部はまだ増殖中 (矢印)である. g. 標的臓器の皮膚ではエフェクター細胞 (青)は真皮 (D)の血管から出て, 多数表皮 (E)内へ浸潤する. h. 標的臓器の小腸絨毛ではエフェクター細胞 (青)は粘膜固有層 (L)に多数浸潤し, さらに上皮内 (E)に入っている.

分を占めており、これが消化管の GvH 病の重症度に比例する<sup>8)</sup>。このエフェクター T cell の前駆細胞と考えられる CD8<sup>+</sup>α4 インテグリン<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> 細胞は腸管付属リンパ節（腸間膜根リンパ節）で選択的に産生されている。そこで、本モデルの抗原提示期（細胞移入後 3 日）にこのリンパ節を手術的に取り除くと消化管 GvH 病のみを抑制することができた。皮膚の GvH 病には影響はないので、消化管 GvH 病が腸管付属リンパ節に依存していることを証明したことになる<sup>8)</sup>。

この消化管もしくは皮膚への選択的遊走能の意義は何であろうか？ 一つの解釈としては、消化管感染症などの免疫応答は消化管付属リンパ臓器で起こり、そこで生まれたエフェクター細胞は輸出リンパ管から出て一旦血液中に入るので、血行性に消化管に遊走してそこで感染を防御する必要がある。そのためこのような器官特異的遊走能が局所のリンパ臓器で付与されるという考え方で、合目的性がある。実際、消化管の DC は retinoic acid を介して腸管遊走性の trafficking molecules を誘導すると報告されている<sup>9)</sup>。

## 5. これからの展望

多重免疫染色法により、in situ, 切片レベルで trafficking の実態やクラスター形成・増殖性応答などの細胞間相互作用を含む免疫応答の現場を観察し、真実に迫る解析ができることをお示しした。これにより、いつ、どこで、どのような反応が起こっているかがわかり、通常はたくさんの標本を必要とする細胞・分子・遺伝学レベルの解析についても、本所見

に基づいて狙いすませた標本を採取することにより、最小の経費とエネルギーで真実を含むデータ取得が可能となることも大きな利点である<sup>2)</sup>。言い換えれば、種々の研究において、本手法をパイロット的な予備実験として取り入れることにより、多くの未解明の病態究明の糸口を発見する可能性が高いことになる。

臨床では白血病治療のための骨髄移植で、GvH 病が起こることにより白血病の再発が減少する効果（Graft-versus-Leukemia）が知られている。GvH 病は特に消化管障害が致命的になることが多いので、上記のように消化管 GvH 病を選択的に抑制すれば、安全に Graft-versus-Leukemia 効果を利用できるかもしれない。

## 文 献

- 1) Saiki, T., Ezaki, T., et al.: *J. Leukoc. Biol.*, **69**, 705–712 (2001)
- 2) Ueta, H., Shi, C., et al.: *Hepatology*, **47**, 1352–1362 (2008)
- 3) Matsuno, K., Ueta, H., et al.: *Arch. Histol. Cytol.*, **73**, 1–21 (2010)
- 4) Mora, J.R. and von Andrian, U.H.: *Trends Immunol.*, **27**, 235–243 (2006)
- 5) Miyasaka, M. and Tanaka, T.: *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 360–370 (2004)
- 6) Cyster, J.G.: *Annu. Rev. Immunol.*, **23**, 127–159 (2005)
- 7) Xu, X.D., Ueta, H., et al.: *Liver Int.*, **28**, 319–330 (2008)
- 8) Zhou, S., Ueta, H., et al.: *Int. Immunol.*, **20**, 385–394 (2008)
- 9) Mora, J.R., Iwata, M. and von Andrian, U.H.: *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 685–698 (2008)