腸管上皮細胞間T細胞 (IEL) の腸管内発達分化

金森 豊¹⁾, 石川 博通²⁾

1) 東京大学医学部小児外科

2) 慶應義塾大学医学部微生物学教室

Intraintestinal development of intestinal intraepithelial T lymphocytes (IEL)

Yutaka Kanamori¹⁾, Hiromichi Ishikawa²⁾

1) Department of Pediatric Surgery, Faculty of Medicine, Tokyo University

2) Department of Microbiology, Keio University School of Medicine

One and a half thousand tiny clusters, filled with one thousand closely packed lymphocytes can be found throughout the murine small and large intestinal mucosa. They are located in crypt lamina propria (cryptopatches; CPs) and can be first detected at 14~17 days after birth. The frequency of DNA replicating cells in CPs is higher than that in Peyer's patches (PPs), is lower than that in the thymic cortex and in almost comparable with that in the thymic medulla. With respect to histogenesis, lymphocyte composition and tissue level of cellular behavior, neither PPs, isolated lymphoid follicles, peripheral LNs, nor thymus are identical with CPs. An outstanding feature of resident CP cells is the conspicuous concentration (up to 70% cells) of c-kit⁺ IL-7R⁺ Thy1⁺ lymphocytes which, in conjunction with the minimal colonization of TCR⁺ and sIgM⁺ lymphocytes, support the notion of lymphoid tissues consisted primarily of precursor T and/or B lymphocytes. CPs are absent in lamina propria of IL-7R⁻deficient mice, whereas CPs are present in germ-free mice and in athymic (nu/nu), SCID, TCR $\beta \times \delta^{-/-}$, RAG-2^{-/-}, PP-deficient (aly/aly), stem cell factor (Sl/Sl^d) and c-kit (W/W^v) mutant mice. These results indicate that CPs are the first identification of gut-associated murine lymphoid tissues where the generation of IL-7-dependent lymphohematopoietic progenitors for T and/or B cell descendants may start to take place at the age of commencement of weaning.

Key words: cryptopatches, intestinal intraepithelial T cells, extrathymic development

図1 マウス腸管のパイエル板 (PP) とクリプトパッチ (cryptopatches; CP), HE 染色
 (a) PP, $\times 100$, (b) 空腸, $\times 100$, 矢印は CP, (c) 空腸 CP, $\times 200$, (d) 空腸 CP, $\times 400$,
 (e) 回腸 CP, $\times 400$, (f) 大腸 CP, $\times 400$, (g) 空腸, $\times 200$, 矢印は CP, (h) 空腸 CP, $\times 400$

はじめに

腸管に分布するリンパ組織 (gut-associated lymphoid tissues; GALT) にはパイエル板 (Peyer's patches; PP) や孤立リンパ小節 (isolated lymphoid follicle) など, いわゆる集合性リンパ組織と腸管上皮細胞間T細胞 (intestinal intraepith-

elial T lymphocytes; IEL) や粘膜固有層リンパ球 (lamina propria lymphocytes; LPL) などのリンパ球が散在性に分布するリンパ組織が知られている。GALT は生体内でも系統発生学的に極めて古いリンパ組織であることが知られており, 胸腺を持たない脊椎動物にも GALT は存在する。近年 IEL の大多数が胸腺外で発達分化するT細胞であることが

図2 CP中のc-kit陽性細胞

(a)空腸CP：陰性コントロール，×400，(b)空腸CP，×400，(c)回腸CP，×400，(d)大腸CP，×400，(e)空腸CP，×200，(f)PP，×200，(g)腸間膜リンパ節，×200，(h)胸腺，×200

報告された^{1)~3)}。さらに腸管粘膜自体がIEL発達分化の場として機能しうることも提示され⁴⁾⁵⁾，腸管がIEL発達分化局所である可能性が提唱されている。

われわれはIELの発達分化や機能について研究を行ってきたが，最近得られたIELの胸腺外発達分化に関する知見を概説したい。

マウス腸管粘膜にみられるリンパ球前駆細胞の集積，クリプトパッチ (cryptopatches : CP)

われわれはIELが胸腺外で発達分化するT細胞であることを念頭におき腸管内でのIEL発達分化部位を追究した。

その結果、粘膜固有層にリンパ球様細胞の集積する組織を見いだした。ヘマトキシリンエオジン染色 (HE 染色) でこの組織中にまちががなくリンパ球が存在すること (図 1 ; b-f) やこのような小リンパ組織が十二指腸から大腸にかけて散在し (図 1 ; d, e, f), 平均すると直径は約 100 μ m であることが判明した (図 1 ; d)。様々な方向で薄切りした腸管組織切片からその 3 次元構造を推測すると絨毛基部から陰窩底部にかけて長楕球形を呈したリンパ組織であると考えられた (図 1 ; d, h)。さらに、マウス腸管組織切片を数多く作成してこのリンパ組織の数を概算した結果、小腸ではマウス 1 匹あたり約 1,500箇所に及ぶことが明らかとなった。また一つのリンパ組織中には約 1,000個のリンパ球が存在することやこのリンパ組織がパイエル板や末梢リンパ節に存在する濾胞形成を欠くことが確かめられた。われわれはこの陰窩に存在する未報告の小リンパ組織をクリプトパッチ (cryptopatches : CPs, 以下 CP と記載) と命名した⁹⁾。なお胃粘膜には CP は認められなかった。

CP 中に存在するリンパ球の特徴を明らかにするために様々なリンパ球表面マーカーに対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的な検索を行った。CP リンパ球は骨髄の幹細胞、胸腺の未分化 T 細胞 (図 2 ; h) や肥満細胞が発現する c-kit (レセプター型チロシンキナーゼ) (図 2 ; b, c, d, e), 未分化リンパ球に見られる IL-7R (インターロイキン 7 レセプター) 及びマウス T 細胞マーカーである Thy 1 を保持しており、これらはすべて LFA-1 を発現していた。一方、CP リンパ球には成熟 T 及び B 細胞マーカーである CD 3 分子, TCR (T 細胞抗原受容体) や免疫グロブリン μ 鎖及び κ 鎖を発現するのは極めて少数であった (< 2%)。これらリンパ球細胞表面マーカーの特徴は CP リンパ球の大多数が未分化リンパ球であることを示唆するとともに Thy 1⁺で B 220⁻の細胞の多いことから未分化 T 細胞である可能性が高いと考えられる。

胸腺 T 細胞はその発達分化の過程で CD 44 分子 (Pgp-1) や IL-2R α 鎖を一過性に発現すること⁷⁾や heat stable antigen (HSA) は胸腺 T 細胞の発達分化にともなって次第に減少すること⁸⁾が明らかにされている。CP リンパ球も様々な頻度で CD 44, IL-2R α , HSA を発現することが分かった。すなわち胸腺における T 細胞発達分化の過程で見られる細胞表面マーカーとのアナロジーから CP には様々な発達

表 1 cryptopatch リンパ球の細胞表面抗原*

表面抗原	陽性細胞 (%)
LFA-1	70~80
c-kit	60~70
IL-7R	60~70
Thy 1	60~70
Pgp-1	40~50
HSA	20~30
CD 4	15~20
IL-2R α	10~20
Ly-1	5~10
CD8 α	3~5
CD 3	0~2
TCR $\alpha\beta$	0~2
TCR $\gamma\delta$	0~2
μ -chain	0~2
κ -chain	0~2
B220	20~30

*C57BL/6 マウス (8~12週齢) の小腸免疫組織化学染色標本から算出した。

分化段階の未分化 T 細胞の分布することが示唆される。さらに CP では CD 8⁺リンパ球が極めて少数であるのに対し、CD 4⁺リンパ球は 15~20% 存在する。この事実は CP 中に TCR-CD 4⁺リンパ球の存在を意味し、胸腺中の最も未分化な T 細胞と考えられる CD 3⁻CD 4^{low} CD 8⁻リンパ球⁹⁾との比較検討が待たれる。一方、CP にはこれら未分化リンパ球の他に CD 11c 陽性の樹状細胞が 20~30% ほど存在することも明らかとなった。この樹状細胞はリンパ球を取り囲むように CP の周辺に多く分布している。CP の免疫組織化学的所見を表 1 にまとめた。

Rodewald ら¹⁰⁾はマウス胎児血液中の c-kit^{high}, Thy 1^{low} で顆粒に富む細胞が肥満細胞の前駆細胞であると報告している。しかしながら CP リンパ球は顆粒を保持しないことや IL-7 R を発現することからマウス胎児血液中に存在する肥満細胞の前駆細胞とは異なると考えられる。

CP 細胞の増殖とアポトーシス (TUNEL 法) 及び RAG-1 発現

BrdU (20mg/kg) を 6 時間間隔で 5 回腹腔内投与

図3 各種マウスにおける空腸 CP の c-kit 陽性細胞
(a)超高齢マウス (114週齢), (b)無菌マウス, (c)ヌードマウス, (d) SCID マウス,
(e) $\text{TCR}\beta^{-/-}$, $\delta^{-/-}$ マウス, (f) $\text{RAG-2}^{-/-}$ マウス, (g) aly/aly マウス, (h) W/W^v マウス, $\times 400$

したマウスから腸管切片を作成して抗 BrdU モノクローナル抗体による免疫組織染色をおこなった結果, CP には胸腺皮質には及ばないものの胸腺髄質に匹敵する S 期細胞の存在することが明らかとなった。TUNEL 法によってアポトーシス細胞を検索した結果, 胸腺にはアポトーシス細胞が多数存在する

が CP には存在しなかった。さらに, T 及び B 細胞の発達分化に必須である RAG-1 (recombination activating gene-1) 分子の細胞内局在を抗 RAG-1 モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的手法で精査したところ, 胸腺では多数の細胞に RAG-1 が検出されたにもかかわらず, CP では RAG-1 を保持

する細胞は検出限界以下であった。

IELの胸腺外発達分化とCP

IELの大多数が胸腺外で発達分化するT細胞である事実やCPリンパ球は主として未分化T細胞で構成されることから、CPがIELの発達分化局所であることを追究した。

まず胸腺由来T細胞を欠くヌードマウスのCP検索を行った。その結果、ヌードマウス腸管にもc-kit⁺細胞の集積するCPは正常マウスと同程度に存在することが判明した(図3; c)。さらに胸腺が著しく萎縮し、胸腺外発達分化T細胞が増加する超高齢マウス(生後110週齢以上)の腸管にもCPは十分存在することが確かめられた(図3; a)。一方、肝臓での胸腺外T細胞発達分化が活潑となるエストロジェン投与マウス¹¹⁾ではCPも増加することが分かった。これらの知見はCPがIELの胸腺外発達分化局所であることを支持すると思われる。

無菌マウスではパイエル板を含めたGALTは著しく萎縮するにもかかわらず、CPは通常マウスと同程度に存在することが判明した(図3; b)。すなわちCPは腸内細菌叢とは無関係に発達するGALTと言えよう。さらにCPが今までに報告のないむしろ一次リンパ組織に類似したGALTであ

り、そこには極めて未分化なリンパ球が集積することは以下の知見によって一層明らかとなった。リンパ節やパイエル板を欠損するaly/alyミュータントマウスにもCPが確認された(図3; g)。さらにSCIDマウス、TCRミュータントマウス($\beta^{-/-}$, $\delta^{-/-}$)、RAG-2ミュータントマウスにもCPは存在することが判明した(図3; d, e, f)。一方、c-kitミュータントマウス(W/W^vマウス)ではCP細胞のc-kitの発現は減弱するがCPそのものは十分認められた(図3; h)。IL-7RミュータントマウスではCPを見出すことが極めて困難であった。このことからCPの正常な発達にはIL-7/IL-7Rを介するシグナルが重要であると考えられる。

CPの電顕的検索と今後の展望

CPを取り出し電子顕微鏡で微細構造を調べた。CPの中心部には小リンパ球が数多く集積し、周辺部にはマクロファージ様の大型細胞が分布することやCP中には細網細胞や毛細血管が存在することからCPが単なるリンパ球の浸潤ではなく、小さいながらもリンパ組織であることが明らかとなった。

現在、CPリンパ球を分離精製し、FACSscanで解析を行っているが免疫組織化学的検索結果と良く一致する知見を得ている。

文

- 1) Bandeira A, Itohara S, Bonneville M, et al.: Extrathymic origin of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing T-cell antigen receptor $\gamma\delta$. Proc Natl Acad Sci USA 88:43-47 1991
- 2) Guy-Grand D, Cerf-Bensussan N, Malissen B, et al.: Two gut intraepithelial CD8⁺ lymphocyte populations with different T cell receptors: A role for the gut epithelium in T cell differentiation. J Exp Med 173:471-481 1991
- 3) Poussier P, Edouard P, Lee C, et al.: Thymus-independent development and negative selection of T cells expressing T cell receptor α/β in the intestinal epithelium: Evidence for distinct circulation patterns of gut- and thymus-derived T lymphocytes. J Exp Med 176:187-199 1992
- 4) Lin T, Matsuzaki G, Yoshida H, et al.: CD3⁻CD8⁺ intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) and the extrathymic development of IEL.

献

- Eur. J Immunol 24:1080-1087 1994
- 5) Mosley RL and Klein JR: Peripheral engraftment of fetal intestine into athymic mice sponsors T cell development: Direct evidence for thymopoietic function of murine small intestine. J Exp Med 176:1365-1373 1992
- 6) Kanamori Y, Ishimaru K, Nanno M, et al.: Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit⁺ IL-7R⁺ Thy1⁺ lymphohemopoietic progenitors develop. J Exp Med 184:1449-1459 1996
- 7) Godfrey DI, Kennedy J, Suda T, et al.: A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3⁻CD4⁻CD8⁻ triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. J Immunol 150:4244-4252 1993
- 8) Nikolic-Zugic J: Phenotypic and functional

- stages in the intrathymic development of $\alpha\beta$ T cells. Immunol Today 12:65-70 1991
- 9) Wu L, Scollay R, Egerton M, et al.: CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in adult murine thymus. Nature (Lond.) 349:71-74 1991
- 10) Rodewald H-R, Dessing M, Dvorak AM, et al.: Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. Science (Wash. DC.) 271:818-822 1996
- 11) Okuyama R, Abo T, Seki S, et al.: Estrogen administration activates extrathymic T cell differentiation in the liver. J Exp Med 175:661 1992