

# 論文要旨

Expression of endothelia and lymphocyte adhesion molecules in bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in adult human lung

成人ヒト肺組織の気管支関連リンパ組織における  
血管内皮細胞とリンパ球の接着分子の発現

河俣 仲秋

## 【背景・目的】

下気道は種々の抗原や微生物に暴露されているが、肺の恒常性は生来の免疫や適応免疫によって保持されている。しかし、喘息や結核等において、適応免疫の過敏反応が肺や気管支に傷害を引き起こすこともある。気管支関連リンパ組織：bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) は、細気管支粘膜にみられる肺二次リンパ組織であり、nasopharynx-associated lymphoid tissue や gut-associated lymphoid tissue のような粘膜関連リンパ組織である。BALT は細胞性免疫、液性免疫、免疫寛容において重要な役割をはたすと考えられる。

リンパ組織間のリンパ球の再循環は血管、リンパ管を介して行われ、リンパ球表面の接着分子とリンパ組織内にある高内皮細静脈：high endothelial venules (HEVs) の接着分子の発現で調整されている。リンパ球の再循環における接着分子の関与は、すでに、腸のパイエル板では、 $\alpha_4\beta_7$  / mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1)、末梢リンパ節ではL-selectin / peripheral node addressin (PNAd)、炎症部位では $\alpha_4\beta_1$  / vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) が知られている。

種々の実験動物においては BALT の存在が明らかにされ、その解明が進んでいる。しかし、ヒトにおける BALT の存在については疑問視する報告も多く、その構造の詳細やリンパ球が BALT 内に再循環する際のリンパ球と HEVs の接着分子については明らかでない。

この研究の目的は、ヒト BALT におけるリンパ球と HEVs に、どのような接着分子が発現しているかを決定することである。

### 【材料・方法】

49 例の肺癌で肺葉切除した健常肺組織を凍結保存した後、BALT の検索をおこなった。BALT の同定は次の定義によった。1) 気管支粘膜内のリンパ濾胞の存在。2) 近隣の気管支の損傷がなく、周囲と区別できる。3) HEVs が存在し、胚中心はないか小さい。4) 色素で満たされたマクロファージは存在してもよいが、好中球や好酸球は存在しない。5) 上皮の損傷はない。

次にBALTの確認された肺組織において、HEVsの細胞接着分子であるPNAd、MAdCAM-1、VCAM-1の発現を酵素抗体法と2重蛍光抗体法にて、BALTにおけるリンパ球サブセット間の位置関係、リンパ球サブセットにおけるナイーブ、エフェクター／メモリーT細胞の割合、リンパ球サブセットにおけるL-selectin、a4 integrinの発現の割合を2重蛍光抗体法にて観察した。

### 【結果】

得られた結果は以下のとおりである。

- ① 健常肺組織 49 例中 17 例 (35%) において BALT の存在を確認した。BALT では B 細胞領域の周囲に T 細胞領域があり、T 細胞領域内に HEVs が見られた。
- ② ほとんどの CD4 陽性 T 細胞は、CD45RO 陽性のメモリー細胞であった。T 細胞の 43% が a4 integrin を、20% が L-selectin を発現していた。
- ③ すべての B 細胞は a4 integrin と L-selectin を発現していた。
- ④ ほとんどのリンパ球は lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) を発現していた。
- ⑤ すべての BALT の HEVs に PNAd の発現が、多くの HEVs に VCAM-1 の発現がみられたが、MAdCAM-1 の発現はみられなかった。

### 【結論・考察】

本研究により、成人ヒト BALT の存在とその構造の詳細が明らかにされた。さらにエフェクター／メモリーリンパ球の BALT への再循環に関与するリンパ球と HEVs の接着分子として、L-selectin と PNAd、a4 integrin と VCAM-1 の組み合わせが明らかにされた。これらの接着分子は、BALT における適応免疫や気管支肺疾患の病態に関与すると考えられ、これらの接着分子機能の選択的除去は、炎症性気管支肺疾患の治療に有効かもしれない。

# 論 文 審 査 の 要 旨

報告番号	医論第 <b>1469</b> 号	氏名	河俣 仲秋
審査委員	主査	米澤 傑	
	副査	夏越 祥次	丸山 征郎

**Expression of endothelia and lymphocyte adhesion molecules in  
 bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in adult human lung**  
 (成人ヒト肺組織の気管支関連リンパ組織における  
 血管内皮細胞とリンパ球の接着分子の発現)

BALT は、細気管支粘膜にみられる粘膜関連リンパ組織である。リンパ組織間のリンパ球の再循環は血管、リンパ管を介して行われ、リンパ球表面の接着分子とリンパ組織内にある高内皮細静脈 high endothelial venules (HEVs) の接着分子の発現で調整されている。リンパ球の再循環における接着分子の関与は、すでに、腸のパイエル板では、 $\alpha_4\beta_7$  / mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1)、末梢リンパ節では L-selectin / peripheral node addressin (PNAd)、炎症部位では  $\alpha_4\beta_1$  / vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) が知られているが、成人ヒト BALT においては不明である。本研究の目的は、成人ヒト BALT のリンパ球や HEVs に発現している接着分子の種類を明らかにすることである。

49 例の肺癌患者の肺葉切除の際、得られた健常肺組織を凍結保存した後、BALT の検索をおこなった。Bienenstock らの組織学的判定基準に合致するものを、BALT と同定し、HEVs において PNAd、MAdCAM-1、VCAM-1 の発現を酵素抗体法と2重蛍光抗体法にて観察した。また、BALT におけるリンパ球サブセット間の位置関係、リンパ球サブセットにおけるナイーブ、エフェクター/メモリー T 細胞の割合、リンパ球サブセットにおける L-selectin、 $\alpha_4$  integrin の発現の割合を2重蛍光抗体法にて観察した。

本研究で得られた新知見は次の3点である。

1. 健常肺組織 49 例中 17 例 (35%) において BALT が存在した。
2. BALT の CD4 陽性 T 細胞のほとんどは、メモリー細胞であった。T 細胞の 43% が  $\alpha_4$  integrin を、20% が L-selectin を発現していた。また、すべての B 細胞は  $\alpha_4$  integrin と L-selectin を発現していた。
3. すべての BALT の HEVs に PNAd の発現が、多くの HEVs に VCAM-1 の発現がみられたが、MAdCAM-1 の発現はみられなかった。

本研究において、成人ヒト肺に BALT が存在することが明らかにされた。また、エフェクター/メモリーリンパ球の BALT への再循環に関与するリンパ球と HEVs の接着分子として、L-selectin と PNAd、 $\alpha_4$  integrin と VCAM-1 の組み合わせが関与していることが明らかにされた。

本研究から、これらの接着分子機能の選択的除去は、炎症性気管支肺疾患の治療に有効であることが示唆され、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 <b>1469</b> 号	氏名	河俣 仲秋
審査委員	主査	米澤 傑	
	副査	夏越 祥次	丸山 征郎

主査および副査の3名は、平成22年1月20日、学位請求者 河俣 仲秋君 に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

【質問1】BALTは、ヒトでも豊富に発現しているものと思っていましたが、ヒトの成人での発現は少ないのですか。

[回答]生後時にはなく、抗原暴露で幼児期・小児期では発達し、大人では少ないと報告されています。

【質問2】HTLVキャリアーに肺疾患が多いのですが、今回検討した患者の中にHTLVキャリアーはいましたか。

[回答]検討しておりません。

【質問3】BALTは気道分岐部の乱流の起こるところに多いとのことですが、今回もその傾向は見られましたか。

[回答]BALTの発現は、乱流が起こりやすい細気管支の分岐部に多い傾向がみられました。

【質問4】光顕でどのようにしてHEVを同定されましたか。

[回答]BALTの傍濾胞領域にある血管の内皮をHEVとしました。

【質問5】接着分子の制御による肺疾患の治療の可能性について、具体的なアイデアはありますか。

[回答]たとえばVCAM-1を標的とする抗体で、肺の炎症を防ぐことができるかもしれません。

【質問6】GALT、NALTの診断基準はBALTと一緒ですか。また、意義は一緒ですか。

[回答]診断基準は各臓器で若干異なります。分泌型IgA産生による粘膜免疫としての意義は同じです。

【質問7】癌のステージによるBALTの発現に差はありませんでしたか。

[回答]今回は手術可能な早期肺癌のみでの検討ですので不明です。

【質問8】サンプリング部位と癌との距離で、BALTの発現に差はありませんでしたか。

[回答]今回は検討しておりません。

【質問9】BALTと気管分岐部リンパ節との関連は報告されていますか。

[回答]検索した範囲ではありませんでした。

【質問10】炎症の程度によって、BALTの発現は流動的に動くものでしょうか。

[回答]そう思います。び慢性汎細気管支炎が、マクロライド少量療法により軽快すると、BALTが減少したという報告があります。また、マクロライドはVCAM-1の発現を抑えるという報告もあります。

【質問11】切除肺癌組織の健常部位での検討なので、普通は大人で見られないBALTが35%あったのかと思いましたが、炎症性肺疾患でないものでBALTがこれだけ存在するという、最初の論文になるのですか。

[回答]剖検等での検討では、BALTが多く存在したという報告もありますが、健常組織を用いた検討という意味では、初めての報告です。

【質問12】パラフィン切片でなく凍結切片にされた理由は何でしょうか。

[回答]多くの抗体がパラフィン切片では反応しないためです。

【質問 13】PNA<sub>d</sub> は HEVs だけ染色されていますが、VCAM-1 は HEVs 周囲の組織も染色されているのはなぜですか。HEVs の周囲に VCAM-1 が発現しているのでしょうか。それとも VCAM-1 抗体の特徴でしょうか。

【回答】VCAM-1 の抗体は可溶性 VCAM-1 にも反応するので、 $\alpha 4 \beta 1$  を発現している T 細胞も染色されます。また、活性化した線維芽細胞も染色されます。

【質問 14】パイエル板の HEVs での MAdCAM-1 の発現は、消化管に特有な現象ですか。

【回答】消化管の HEVs では MAdCAM-1 が発現しています。パイエル板だけではなく腸管粘膜固有層にも MAdCAM-1 の発現した HEVs があり、リンパ球の再循環がなされています。

【質問 15】HEVs の接着分子について、NALT は消化管と肺の間に位置するから両方の性格があるのでしょうか。

【回答】その可能性が考えられます。

【質問 16】BALT の PNA<sub>d</sub> 陽性 HEVs で、VCAM-1 陽性:陰性が 2:1 である意味はなんのでしょうか。

【回答】比率の意味合いは不明ですが、ナイーブ細胞の再循環は PNA<sub>d</sub>、メモリー T 細胞の再循環は VCAM-1 が関与すると考えられます。

【質問 17】B 細胞は CD45RA 陽性であるとの判断は、B 細胞領域が、緑色に発光しているからでしょうか。同様に、B 細胞は LFA-1、 $\alpha 4$  integrin、L-selectin が陽性であるとの判断は、B 細胞領域が、赤く発光しているためでしょうか。CD19 との二重染色をしたら黄色に発光するのでしょうか。

【回答】そのとおりです。

【質問 18】 $\alpha 4$  integrin は  $\alpha 4 \beta 1$ 、 $\alpha 4 \beta 7$  のサブユニットですが、今回は  $\alpha 4 \beta 1$  と考えてよろしいでしょうか。

【回答】BALT の HEVs に MAdCAM-1 が発現していないため、 $\alpha 4$  integrin は  $\alpha 4 \beta 1$  であろうと考えられます。

【質問 19】BALT 内のメモリー T 細胞は BALT 内で出現したものでしょうか、それとも再循環したものでしょうか。

【回答】BALT 内での抗原提示によってナイーブ T 細胞がメモリー T 細胞に分化、増殖し、全身の免疫を賦活させるために血管内に移行し、肺の粘膜免疫のため BALT に再循環すると考えられます。

【質問 20】同じ粘膜関連リンパ組織でも、HEVs の接着分子の発現が異なるため、そこに再循環するリンパ球は、あらかじめ決定されているのでしょうか。

【回答】リンパ球と HEVs の接着分子の発現によって、再循環は決定されています。

【質問 21】今回の免疫染色の結果を BALT の診断基準に使いませんか。

【回答】その可能性はあります。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。