

論文の内容の要旨

論文題目 接触過敏症を誘導する抗原提示細胞は表皮ランゲルハンス細胞ではなく真皮樹状細胞である
氏名 隈本 洋介

【背景】

樹状細胞(DC)は自然免疫系において最も強力な抗原提示能をもつ細胞群である。マウスを用いた解析から、現在 *in vivo* の DC に関して機能的、発生学的あるいは解剖学的に異なる最低 6 種類の亜集団が知られているが、各亜集団間の *in vivo* での抗原提示における機能的差異は不明な点が多い。一般的な *in vivo* の免疫応答では、抗原は皮膚または呼吸器、消化器、生殖器の粘膜上皮を經由して個体内に侵入し、DC によってプロセッシングされた後、各臓器の所属リンパ節(LN)においてリンパ球へと提示され、抗原特異的な免疫応答を誘導する。このような *in vivo* の免疫応答のうち、FITC 等のハプテン溶液をマウス皮膚に塗布することで生じる接触皮膚炎(CHS)は、その簡便性から経皮感作による免疫応答モデルとして最もよく利用されるものの一つである。ハプテン誘導性 CHS では経皮投与されたハプテンが皮下 LN でハプテン特異的 T 細胞に提示され、一定期間後に同一のハプテンで惹起することにより惹起部位の皮膚に T 細胞依存的な炎症が誘導される。CHS の感作過程において表皮特異的な DC 亜集団である LC が所属 LN へと遊走すること、また *in vitro* でハプテンと共培養した表皮由来 LC の受動移入により CHS を誘導できることなどから、古典的に LC が CHS における抗原提示細胞(APC)であるとされてきた。しかし、近年 LC 特異的な細胞表面分子として langerin (CD207)が同定され、*langerin* プロモーターを用いて遺伝子工学的に *in vivo* で LC を除去したマウスが複数のグループにより作製されたが、これらのマウスで CHS の発症が認められたことから CHS の感作過程には LC 以外の DC 亜集団が APC として機能する可能性が指摘された。免疫解剖学的に、経皮的に侵入した抗原を提示する DC 亜集団は、LC、真皮樹状細胞(DDC)および所属 LN の常在性 CD8 α 陽性 DC であると考えられている。このうち常在性 CD8 α 陽性 DC はヘルペスウィルスの経皮感染時に主要な APC として機能することが示されているが、DDC には現在特異的なマーカー分子が知られておらず、*in vivo* における DDC の機能を直接的に証明した例はない。一方、当研究室ではこれまでに、マクロファージ(M ϕ)ガラクトース型 C 型レクチン(MGL、

CD301)を発現する真皮の細胞が CHS 感作時に所属 LN へと遊走することが見出されたが、MGL 陽性細胞の免疫学的機能は不明であった。私は CHS 感作時における MGL 分子および MGL 陽性細胞の機能を研究する過程で、最近同定された MGL ファミリー分子である MGL2 が DDC 特異的に発現することを発見し、これを指標として CHS の経皮感作過程における DDC の動態と機能を明らかにしたのでここに報告する。

【結果および考察】

皮膚免疫系において MGL1 が複数の DC/Mφ 亜集団に発現する一方 MGL2 は DDC 特異的に発現する

MGL は分子内にガラクトース結合型の C 型レクチンドメインをもち、マウスには MGL1 と MGL2 の 2 種類が存在する。これまでに、MGL の発現が皮膚では真皮にのみ認められ、FITC による CHS 感作時に MGL 陽性細胞が所属 LN へと遊走することが報告されているが、近年 MGL2 が新規にクローニングされ、従来組織学的検討に多用された抗 MGL モノクローナル抗体 (mAb) LOM-14 が MGL1 と MGL2 を区別しないことが明らかになった。CHS 感作過程においては、リコンビナント MGL1 の LN への結合パターンと MGL 陽性細胞の LN 内分布の類似性から MGL が細胞間相互作用に寄与すると予想されたが、MGL2 の発見を受け、私は分子機能の解析に先立って MGL1 および MGL2 の発現パターンに関する詳細な検討が必要と考えた。そこで、当研究室で最近樹立された MGL2 特異的 mAb

URA-1 および MGL1 特異的 mAb LOM-8.7 を用いて MGL 陽性細胞がどの亜集団に帰属されるのかを検討した。その結果、これまでの知見と同様、皮膚では MGL1、MGL2 共に真皮にのみ発現が認められ、いずれも MHC class II 高発現の DDC 様細胞集団に限局していた(図 1A および B)。一方皮下 LN の組織学的な検討では、MGL1 が髄洞、辺縁洞および皮質 T 細胞領域の外側に発現するのに対し、MGL2 は主に皮質 T 細胞領域の外側に限局して発現が認められた(図 1A)。この結果から、皮下 LN において MGL2 陽性細胞が MGL1 陽性細胞の亜集団であることが予想された。さらに皮下 LN 細胞のフローサイトメトリー(FCM)によって、MGL1 陽性の細胞集団には MHC class II および CD11c 低発現かつ B220 および Gr-1 陽性の形質細胞様 DC と、CD8 α 低発現かつ CD11c および CD11b 陽性かつ MHC class II 高発現の間質性 DC が含まれるが、MGL2 陽性の細胞集団は MGL1 陽性の間質性 DC のみから成ることが明らかになった(図 1C)。皮下 LN の間質性 DC は LC または DDC に由来することが報告されているが、MGL2 が表皮に検出されないことから、私は MGL2 が DDC 亜集団の新規マーカー分子として利用できるかと結論した。

MGL2 陽性 DDC は共刺激分子を高発現するユニークな DC 亜集団である

先述のように、末梢から個体内に侵入した抗原は遊離の状態もしくは APC に捕捉された状態で所

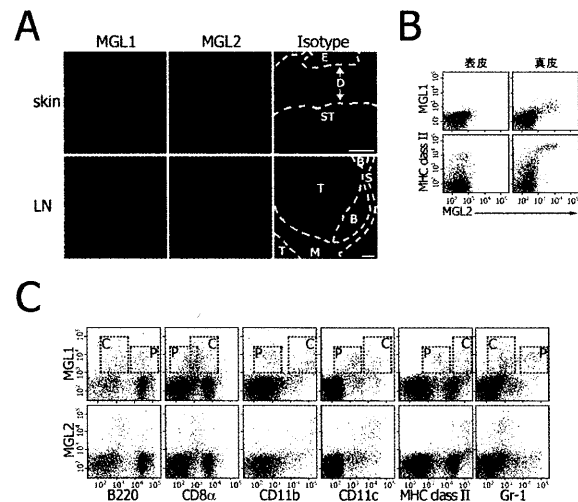


図 1 皮膚免疫系における MGL 陽性細胞の同定 (A) 皮膚および皮下 LN における MGL 陽性細胞の分布。赤は核染色。E: 上皮, D: 真皮, ST: 皮下組織, T: 皮質 T 細胞領域, B: B 細胞濾胞, S: 辺縁洞, M: 髄洞。スケールバーは 100 μ m を示す。(B) 皮膚から単離した細胞の FCM。MGL2 は真皮の MGL1 および MHC class II 高発現細胞にのみ発現が認められる。(C) 皮下 LN の細胞の FCM。MGL1 陽性細胞には形質細胞様 DC (画分 P) および間質性 DC (画分 C) が含まれるが、MGL2 陽性細胞は間質性 DC のみからなる。

属 LN に輸送され、経皮的に侵入した抗原は皮下 LN で、腸管より侵入した抗原は腸間膜 LN あるいは腸管

関連リンパ組織でリンパ球に提示される。したがって、所属する器官によって各リンパ組織における DC 亜集団の構成は異なり、皮下 LN には脾臓、胸腺、パイエル板等の他のリンパ組織には見られない DC 亜集団が存在する。これらの皮下 LN に特徴的な DC 亜集団は皮膚に由来するとされており、未感作の状態でもリンパ球活性化に必要な共刺激分子を高発現することが知られている。そこで私は、共刺激分子である CD40 または CD86 とリンパ球系 DC のマーカーである CD8 α の発現により皮下 LN の CD11c 陽性 DC をフローサイトメトリーで分類し、MGL2 陽性 DDC がどの画分に帰属されるのかを調べた。CD40 と CD11c の発現による分類では、これまでの報告で皮下 LN に特有とされている CD40 中発現かつ CD11c 高発現

(図 2 亜集団 I)、CD40 高発現かつ CD11c 中発現(図 2 亜集団 II)、CD40 高発現かつ CD11c 高発現(図 2 亜集団 III)の 3 種類の DC 亜集団が検出された。このうち CD40 高発現かつ CD11c 高発現の亜集団(亜集団 III)が MGL2 陽性 DDC と一致した(図 2)。同様にして、MGL2 陽性 DDC は CD86 高発現かつ CD8 α 低発現のほぼ均一な DC 亜集団であることが示された(図 2)。これまでの報告では、亜集団 III のごく一部に LC 特異的な細胞内小器官であるバーベック顆粒をもつ細胞が電子顕微鏡で観察されたことから、この集団は表皮由来であるとされてきた。しかしながら、MGL2 をマーカーとして用いることで皮下 LN の CD40 高発現かつ CD86 高発現かつ CD11c 高発現の細胞のほぼ全てが真皮由来であることが強く示唆された。このように MGL2 陽性 DDC に共刺激分子が高発現していることは、これまで LC が中心的な役割を果たすと考えられていた皮膚における免疫応答の中であって、DDC の APC としての機能を強く示唆する結果である。

ハプテンを保持した MGL2 陽性 DDC が CHS 感作過程の早期に皮下 LN に集積する

これまで皮下 LN における皮膚由来の DC は、LC が CD205 高発現かつ CD207 陽性であるのに対し、DDC は CD205 中発現かつ CD207 陰性であるとされていた。しかし、この知見自体が経皮的に投与した蛍光物質を取り込んだ細胞の解析から得られており未感作の状態を反映している保証がないこと、CD207 の発現が LN の常在性 CD8 α 陽性 DC の一部にも認められること、CD205 の発現強度を組織学的に可視化することが困難であることから、これまで DDC の動態が直接的に解析された例は無かった。そこで、FITC による CHS 感作時の DDC の動態を MGL2 をマーカーとして観察したところ、MGL2 陽性 DDC は未感作の LN で CD11c 陽性 DC の約 10% を占め、FITC 感作 1 日後には約 50% となり、感作 4 日後で再び約 10% に減少することが分かった(図 3A)。このことから、一般に 5 日程度かかるとされる CHS 感作過程において、MGL2 陽性 DDC が感作後 24 時間という比較的早期に LN へ遊走することが示唆された。また、感作 1 日後の MGL2 陽性 DDC の約 80% が FITC を取り込むことが確認された(図 3A)。一方、MGL1 陽性細胞についても検討した結果、MGL1 陽性細胞

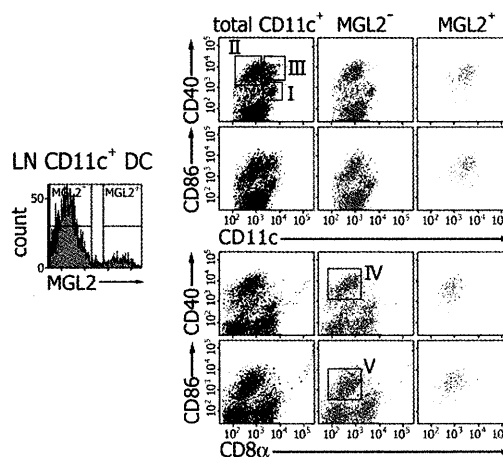
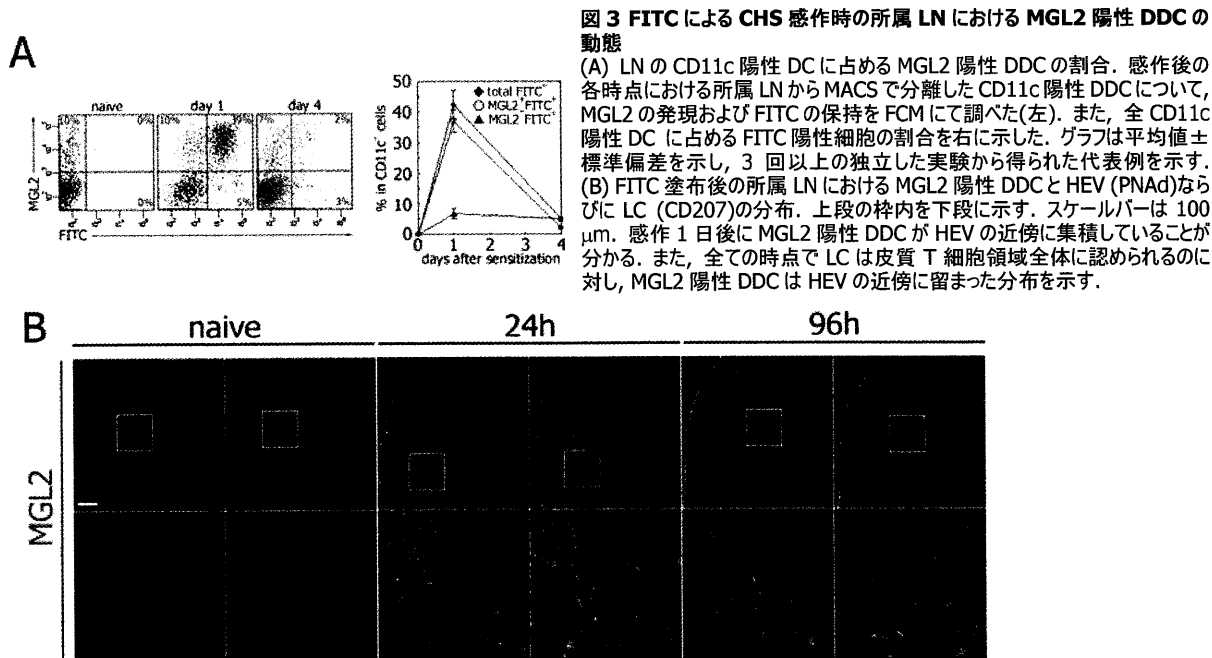


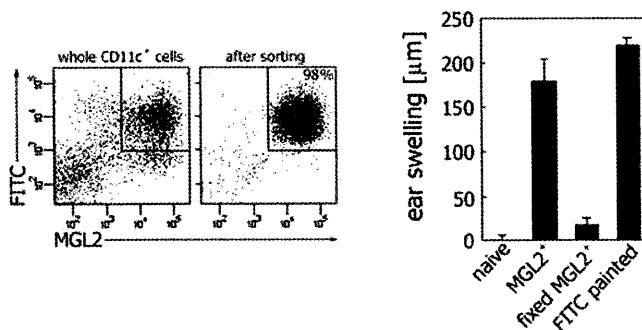
図 2 皮下 LN における MGL2 陽性 DDC による共刺激分子の発現
皮下 LN から Magnetic cell sorting (MACS) により分離した CD11c 陽性 DC (>95% CD11c 陽性) を標記のマーカーに対する mAb で染色した。左のパネルに示すように全 DC を MGL2 陰性(MGL2⁻)および MGL2 陽性(MGL2⁺)の画分にわけ、各々について各マーカー分子を染色したパターンを右に示す。亜集団 I, II および III はいずれも皮下 LN に特異的に認められる DC 亜集団である。MGL2⁺ DDC は亜集団 III と一致し、CD86 も高発現するほぼ単一の集団である。MGL2⁻ DC の中でも CD8 α 低発現かつ CD40(亜集団 IV)および CD86(亜集団 V) 高発現の亜集団が存在するが、MGL2⁺ DDC と比較して CD8 α 染色時の平均蛍光強度が有意に低い異なる亜集団である。

のうち DDC 様垂集団のみが所属 LN への集積および FITC の取り込みに関して MGL2 陽性 DDC と同様の挙動を示すことが明らかになった。さらに、未感作、感作 1 日後および感作 4 日後の所属 LN において MGL2 陽性 DDC の分布を組織学的に CD207 陽性 LC と比較すると、全ての時点で DDC が T 細胞領域と B 細胞濾胞の境界に存在する高内皮静脈(HEV)の近傍に集中的に分布していたのに対し、LC は T 細胞領域全体に分散して存在することが判明した(図 3B)。これは、同様に皮膚から皮下 LN へ遊走する LC と DDC について、その挙動が定常的に異なる機構により制御されていることを示唆するものである。経皮的に侵入した抗原に特異的な CD4 陽性ナイーブ T 細胞の活性化は感作 2 日以内に HEV の近傍で生じること、また、CHS における LC の LN への遊走が早くとも感作後 3 日目以降であることを複数のグループが報告していることを考慮すると、CHS において最初に T 細胞を活性化する APC は LC ではなく MGL2 陽性 DDC であると予想される。



FITC 感作 1 日後の LN 由来 MGL2 陽性 DDC は CHS を誘導する

上記の結果から、皮下 LN において MGL2 陽性細胞が DDC 由来であること、CHS 感作において LC の遊走よりも早期に HEV 近傍に集積することが示されたが、ハプテンを捕捉した MGL2 陽性 DDC が実際に皮膚から皮下 LN へ遊走し、APC として機能することは示されていない。そこで、CHS 感作における MGL2 陽性 DDC の機能を検討するために、FITC 感作 1 日後の LN から FITC を捕捉した MGL2 陽性 DDC を精製し、未感作のマウスに受動移入した。受動移入 6 日後にマ



ウス耳介に FITC 溶液を塗布し、その 24 時間後の耳介の厚さを測定した。その結果、FITC 陽性 MGL2 陽性 DDC を移入したマウスで耳介の腫脹が確認され、FITC 感作 1 日後の LN に存在する MGL 陽性 DDC が CHS を誘導できることが示された(図 4)。さらに、MGL2 陽性 DDC の受動移入による感作の成立は、グルタルアルデヒドで細胞表面を固定した FITC 陽性 MGL2 陽性 DDC を移入した場合には認められず、移入した MGL2 陽性 DDC の細胞表面分子を介する FITC の提示とそれに伴うリンパ球の活性化に依存的であると考えられた(図 4)。本実験では、MGL2 陽性 DDC の受動移入による CHS 誘導は最少で 10^4 個程度の DDC を移入した場合から認められたが、これまでの報告によると FITC を塗布した表皮の LC を移入した場合は最少 10^6 個程度の LC が必要であるとされており、 10^4 個程度の移入で CHS の誘導が認められる MGL2 陽性 DDC の抗原提示能は極めて高いものと考えられる。以上の結果を併せて考慮すると、*in vivo* の CHS における抗原提示は DDC によって感作後 24 時間以内に HEV の近傍で生じることが強く示唆される。

【結論】

私は本研究で、MGL2 が皮膚と皮下 LN を結ぶ皮膚免疫系において DDC 亜集団特異的なマーカーとなることを示した。これまでマウス DDC 特異的なマーカーは全く知られておらず、DDC マーカーを発見したことの有用性は大きい。さらに、皮下 LN において MGL2 陽性 DDC が T 細胞活性化に必要な共刺激分子を高発現し、CHS 感作過程において LC よりも早期に所属 LN に集積することを明らかにした。また、LC が LN の皮質 T 細胞領域全体に散在した分布を示すのに対し、MGL2 陽性 DDC が HEV 近傍に局在することを示した。この領域は HEV から末梢 LN に流入した未感作 T 細胞が DC により走査される場所として知られ、抗原特異的 T 細胞クローンの増殖が生じる領域である。さらに私は、FITC で感作した LN より分離した MGL2 陽性 DDC を受動移入すると、レシピエントマウスが FITC 特異的な CHS を発症することを示し、CHS の感作過程において、DDC が LC よりも初期に CHS を誘導することを示した。これは、LC が優位な APC であるという従来の CHS 発症機構の概念を覆す発見であり非常に重要なものである。