

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791094

研究課題名(和文)

皮膚樹状細胞の形態および接着分子の解析

研究課題名(英文)

Analysis of morphology and adhesion molecules of skin dendritic cells

研究代表者

大内 健嗣 (OUCHI TAKESHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30528419

研究成果の概要(和文): 免疫染色法および免疫電子顕微鏡法で皮膚における樹状細胞の形態および接着分子の解析を試みた。免疫電子顕微鏡法では抗体の染色性不良に加えて細胞変性が強く樹状細胞の形態を判別することは困難であった。免疫染色法ではランゲリン陽性真皮樹状細胞は毛嚢周囲に多く認められ、真皮における遊走中のランゲルハンス細胞が複数のランゲリン陽性真皮樹状細胞と密に接していることが観察された。局所で樹状細胞サブセットが密に接触し、何らかの情報を交換している可能性が示唆され、今後の研究につながる重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文): We attempted to analyze ultrastructural morphology and localization of adhesion molecules on skin DCs by using immunofluorescent staining and immuno electron microscopy. Precise morphology of skin dendritic cells by immuno electron microscopy could not be observed because of the degeneration of specimen due to fixation processes and poor accessibility of antibody. Immunofluorescence staining revealed accumulation of langerin+ dermal dendritic cells around hair follicles and their interaction with epidermal Langerhans cells in the process of emigration. These findings suggest the possibility of interaction among skin dendritic cell subsets.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：皮膚免疫

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚樹状細胞、形態、接着分子、免疫電顕、蛍光抗体法

1. 研究開始当初の背景

Langerhans 細胞(LC)が表皮の樹状細胞(DC)と同定されて以来、樹状細胞のプロトタイプとして多くの研究がなされ、ランゲリンは LC 特異的なマーカーと考えられてきた。ところが近年、ランゲリンを発現する真皮の DC サブセット(ランゲリン陽性真皮 DC: langerin+ dDC)が新しく発見され、皮膚には LC、langerin+ dDC、langerin- dDC の少なくとも三つのサブセットが存在すること

が示唆された。また、LC は接着分子である EpCAM が、langerin+ dDC は CD103 を発現することが報告され、これにより、LC と langerin+ dDC はこれらの表面マーカーにより区別しうる事が確立されつつある。これまで皮膚の樹状細胞は LC が過半数を占めると考えられていた。しかし、マウス皮膚(表皮+真皮)から細胞浮遊液を作成しフローサイトメトリで解析すると、LC と langerin- dDC はほぼ 1:1 の比率であり、langerin+ dDC も極

少数のサブセットをしめることが示唆された。皮膚免疫の起点とされてきた LC だったが、近年経皮的に感染したヘルペスウイルスに対する抗ウイルス免疫反応や、ハプテンを用いた接触皮膚炎反応に必須ではないことが報告され、LC を中心とした皮膚免疫のドグマは大きく揺れ動いている。

ここで、各サブセットの特徴を接着分子の観点からまとめた。

サブセット	局在	接着分子
LC	表皮に常在 遊走時に真皮へ	EpCAM E-cadherin Claudin-1
langerin ⁺ dDC	真皮	CD103
langerin ⁻ dDC	真皮	不明

表 1 : 樹状細胞が発現する接着分子

E-cadherin は homophilic な接着分子であることは有名だが、調節性 T 細胞に発現していることで知られるようになった CD103 (別名 integrin $\alpha_E\beta_7$) とも接着しうる。この CD103 は langerin⁺ dDC にも発現している。脾臓での langerin⁺ dDC は免疫抑制に働くが、langerin⁺ dDC も皮膚では少数サブセットながら、皮膚免疫において重要な役割を果たしている可能性がある。樹状細胞のサブセットが直接的に接着分子を用いてクロストークを行っている可能性があるのではないかと。マウス皮膚の凍結切片を樹状細胞マーカー (CD11c) やランゲリンで染色すると、定常状態でも多数の樹状細胞が真皮内で観察される。樹状細胞同士が接着するには EpCAM、E-cadherin、CD103 などを介する可能性が考えやすい。

2. 研究の目的

各樹状細胞における Langerin、EpCAM、CD103 の微細局在を明らかにする。真皮樹状細胞における特に Birbeck 顆粒を中心とした微細形態を明らかにする。異種細胞間 (表皮内 LC - ケラチノサイト、表皮内 LC - langerin⁺ dDC) はどのような接着構造を形成しているのか明らかにする。これらの接着部位には何らかの synapse が形成されるのか、接着に関与する分子を明らかにする。これらの細胞生物学的および免疫学的に興味深い観察事項の意味を我々は主として免疫電顕を中心に明らかにしていきたい。

3. 研究の方法

(1) マウス表皮・真皮シートの免疫染色

樹状細胞サブセットの局在を把握するためにマウス耳介の表皮・真皮シートを作成し、

安定した免疫染色を得ることのできる系を整えるため、表皮・真皮シートを抗 MHC class II 抗体、抗 CD103 抗体、抗 Langerin 抗体で染色した。

(2) マウス皮膚の凍結切片の免疫染色

マウス皮膚の凍結切片を樹状細胞マーカー (CD11c) やランゲリンで染色し、樹状細胞の局在を観察した。

(3) 免疫電顕による標的抗原の局在解析

免疫電顕用ブロックの作成: C57BL/6 マウスの耳介より採取した皮膚を pre-embedding 免疫電顕の基質として使用する。

pre-embedding 免疫電顕ブロック作成方法: 基質となる組織を一塊にして染色する en-block 法を用いる。検体皮膚を 1mm 以下程度の大きさに切りだし、組織全体に免疫染色を施した後、通常の電顕標本作製過程に沿って固定、脱水、置換、包埋する。

免疫染色: 一次抗体として 抗 CD11c 抗体、Langerin (CD207) 抗体、抗 EpCAM (CD326) 抗体、抗 CD103 抗体をそれぞれ反応させた後、金コロイド標識抗 IgG 抗体を反応させる。

in vivo における標的抗原の局在解析: 透過型電子顕微鏡にて免疫染色を施した切片を観察し、写真撮影を行う。標的抗原の樹状細胞における詳細な局在を明らかにし、その細胞膜表面および細胞内分布の特徴を把握する。

(4) 骨髄移植による皮膚樹状細胞サブセットノックアウトモデルマウスの作成

皮膚に存在する 3 つの樹状細胞サブセット (Langerhans 細胞、langerin⁺ 真皮樹状細胞、langerin⁻ 真皮樹状細胞) をノックアウトする系を用いて皮膚樹状細胞の形態を解析することを試みている。具体的には、樹状細胞全般に発現する表面マーカーである CD11c 遺伝子、および Langerhans 細胞に特異的に発現する Langerin 遺伝子にジフテリア毒素をノックインした CD11c-DTR マウス、

Langerin-DTR マウスを用い、以下に述べる 3 群のマウスを作成した。: 野生型マウスに野生型マウスの骨髄を移植 (コントロール)、

: 野生型マウスに Langerin-DTR マウスの骨髄を移植、: Langerin-DTR マウスに CD11c-DTR マウスの骨髄を移植した。骨髄移植の結果、真皮樹状細胞はドナー由来に置換されるが、表皮内の Langerhans 細胞は放射線感受性が低いためレシピエントのままである。ジフテリア毒素を投与すると、各々の群のマウスは : langerin⁺ 真皮樹状細胞のみ、: 皮膚樹状細胞サブセット全てが除去される。

4. 研究成果

(1) マウス表皮・真皮シートの免疫染色

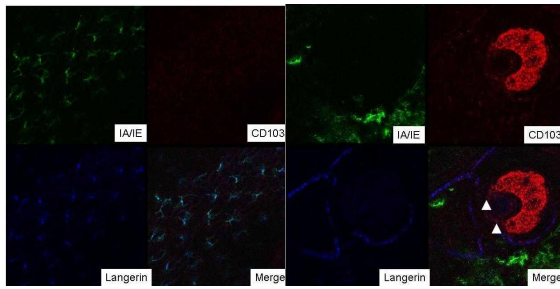


図 1 a 表皮シート 図 1 b 真皮シート

表皮シートではこれまでに得られた知見と矛盾しない所見が確認された。真皮シートの観察からは特にランゲリン陽性真皮樹状細胞(右図: arrow head)は毛嚢周囲に多く認められる重要な知見が得られた。

(2) マウス皮膚の凍結切片の免疫染色

マウス皮膚の凍結切片を樹状細胞マーカー(CD11c)やランゲリンで染色すると、定常状態でも多数の樹状細胞が真皮内で観察された。

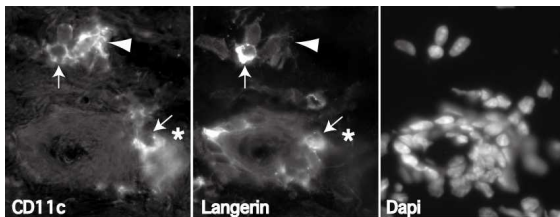


図 2 マウス皮膚凍結切片の水平断

興味深いことに、図 2 に示すごとく、真皮に遊走した LC (CD11c+ Langerin^{high}: arrow) は複数の langerin+ dDC (CD11c+ Langerin^{low}: arrowhead) と密に接していることが観察された。さらに、langerin - dDC (: *) も毛嚢内に存在する LC と接触する像がしばしば観察され、局所で樹状細胞サブセットが密に接触し、何らかの情報を交換していると考えられる。樹状細胞同士が接着するには EpCAM、E-cadherin、CD103 などを介する可能性が考えやすい。

(3) 免疫電顕による標的抗原の局在解析

電子顕微鏡レベルで樹状細胞を同定するため、post-embedding 法での免疫電子顕微鏡を試行した。しかし、表皮細胞(図点線上)の変性が強く細胞形態が保たれないこと、および抗体の染色性不良があり、詳細な観察が困難であった。

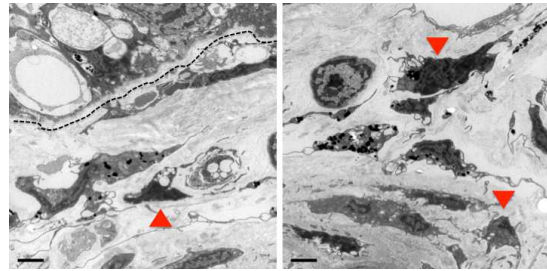


図 3 a 表皮 / 真皮 図 3 b 真皮

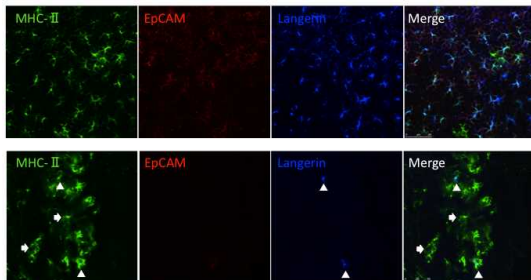
メラノサイトの有無から真皮メラノサイトおよび真皮樹状細胞(: 赤三角)は判別可能であるが、標識した金コロイドは視認できなかった。

樹状細胞の観察のためには、目的以外の樹状細胞をロックアウトし、ターゲットを絞る必要があると考えた。

(4) 骨髄移植による皮膚樹状細胞サブセットノックアウトモデルマウスの作成

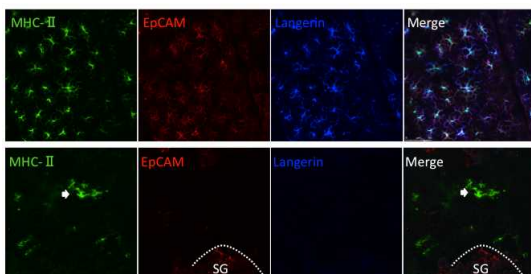
各々の群にジフテリア毒素を投与し、24 時間後に表皮真皮シートを作成した。樹状細胞サブセットの消失を免疫染色で確認した。

: 野生型マウスに野生型マウスの骨髄を移植(コントロール)



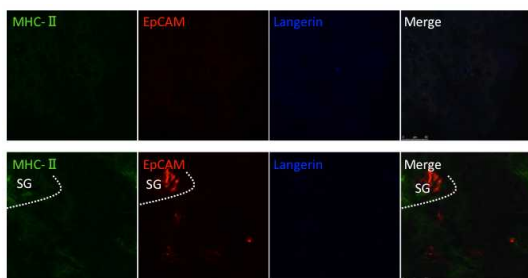
上段: 表皮シート LC が確認される
下段: 真皮シート Langerin+ dDC (: arrow), Langerin - dDC (: arrowhead) が確認される

: 野生型マウスに Langerin -DTR マウスの骨髄を移植



上段: 表皮シート LC が確認される
下段: 真皮シート Langerin - dDC (: arrow) は認めるが、Langerin+ dDC は消失している
SG: Sebaceous Gland

: Langerin -DTR マウスに CD11c -DTR マウスの骨髄を移植



上段：表皮シート LCは消失している
下段：真皮シート dDCは Langerin+ dDC、
Langerin - dDCともに消失している
SG: Sebaceous Gland

すでに骨髄移植は終了し、高い生存率を得られている。このマウスの皮膚を whole mount で post-embedding 免疫電顕の基質として使用し、樹状細胞の形態および局在を詳細に検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大内 健嗣 (OUCHI TAKESHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30528419

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし