

皮膚および粘膜組織における
マウスランゲリン陽性細胞の動態と機能

(課題番号 13670213)

平成13年度～平成14年度
科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））
研究成果報告書

平成15年3月

研究代表者 高原 和彦
京都大学大学院生命科学研究科

京 都 大 学 図 書



9810059449

附 属 図 書 館

科研

2002

341

はしがき

文部科学省科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））による『皮膚および粘膜組織におけるマウスランゲリン陽性細胞の動態と機能』と課題する研究は、以下の組織および補助のもとに実施された。予定年限の終了に当たり、ここに報告書を作成する。

研究組織

研究代表者：高原 和彦（京都大学大学院生命科学研究科・講師）

研究分担者：稲葉 カヨ（京都大学大学院生命科学研究科・教授）

研究経費

平成13年度	2,000千円
平成14年度	1,600千円
計	3,600千円

研究の背景

免疫系は外敵から生体を守りその恒常性を保つ為に必須の機構である。この機構の中で、樹状細胞は強力な抗原提示細胞として働きその性状・機能が急速に明らかになりつつある。一般に、樹状細胞は定常状態においては未成熟な状態で広く生体内に分布する。しかし、微生物等の侵襲時にはそれらを取り込み自ら成熟すると共にそれ由来する抗原情報を T 細胞に提示することで活性化しエフェクター細胞としての機構を発動させて免疫応答を惹起する。一方、定常状態においても、自己構成成分に由来する種々のペプチドを提示することによって自己に対する免疫寛容を誘導している。このような機能を発揮するため樹状細胞は自己を含め微生物・ウイルス等を認識する多様なレセプターを発現している。例えば Toll-like receptor は侵襲性微生物に由来する物質を識別してそれを排除するためのシグナルを細胞に伝え、自然免疫応答を増強する。また種々のレクチンは侵襲性微生物を捕捉するための受容体としての働きを持っている。また、近年明らかになってきた樹状細胞サブセットにおいて、これらレセプターの発現パターンが異なることが示されつつある。したがって、樹状細胞サブセット特有の機能を考える上でも、これら受容体の機能と役割を理解することが重要である。

研究目的

外界の病原菌や常在菌に接する皮膚や粘膜には多数の樹状細胞が存在している。この内、表皮や粘膜固有層には特にランゲルハンス細胞と呼ばれる一群の樹状細胞の存在が認められる。ランゲルハンス細胞同定の指標は特有の細胞内構造体であるバーベック顆粒を保持することや上皮細胞との接着に関わる E-カドヘリンの発現である。これまで、バーベック顆粒に関してはエンドソーム系の酸性小胞との関連が予想されているのみであり、その機能は明らかではなかった

しかし、最近ヒトランゲルハンス細胞に特異的に発現する II 型 C-タイプレクチンとしてランゲリンが見いだされ、この分子が従来からランゲルハンス細胞に対する特異的抗体として知られている抗 Lag 抗体が認識する分子と同一であることが明らかにされた。さらに、ランゲリン遺伝子導入細胞はその細胞質内にバーベック顆粒様構造体を形成することも示された。これらの結果から、ランゲリンがランゲルハンス細胞固有の異物認識機構をもち、その機能と深く関わっている可能性が予想される。そこで我々は、マウスのランゲリン遺伝子を同定し、その機能を明らかにすると同時に樹状細胞分化経路やランゲリン発現細胞の分布ならびに動態を解析することを目的として研究を行い、以下の結果を得た。

研究概要

1) マウスランゲリン cDNA のクローニング

マウスの系を用いてランゲリンの詳細な解析を進めるために、先ずマウスランゲリン cDNA のクローニングを行った。ヒトランゲリン cDNA の配列をもとに作製したプライマーを用いてマウス表皮細胞 mRNA より作製した cDNA をテンプレートとして RT-PCR を行った。得られた cDNA は、ヒトランゲリンに対して 65% (レクチンドメインでは 75%) の相同性を示す蛋白質をコードしていた。次に、蛍光 in situ ハイブリダイゼーションを用いて遺伝子マッピングを行った結果、本遺伝子がヒトランゲリン遺伝子座 (2p13) と相同なマウス染色体上 (6D1-D2) にマップされた。データベース解析の結果、ランゲリンの遺伝子構造がヒトとマウス間で良く保存されていることが確かめられた。以上のことから、本遺伝子がヒトランゲリンのマウスカウンターパートであることを確認した。

2) マウスランゲリンの発現パターン解析

次に、RT-PCR によって表皮および真皮におけるランゲリン mRNA の発現を検討したところ、両者共にその発現が見られた。しかしながら、ランゲリン抗体によるマウス皮膚の免疫染色を行った結果、表皮ランゲルハンス細胞のみに発現が確認された。このことから、ランゲリンの発現には mRNA の発現誘導とは別に翻訳レベルにおける制御が示唆された。そこで、骨髓由来樹状細胞を用いてランゲルハンス細胞の分化に必要であるとされている TGF- β 1 の影響を検討した。骨髓由来樹状細胞におけるランゲリン mRNA の発現はその未成熟な分化段階において強く、成熟と共に低下したが、ランゲリン蛋白質の発現はいずれの段階においてもわずかであった。しかし、培養過程に TGF- β 1 を加えることで未成熟骨髓由来樹状細胞における蛋白レベルでの発現が上昇した。また、このランゲリン蛋白質の発現は骨髓由来樹状細胞の成熟・活性化と共に低下することが示された。

マウス生体におけるランゲリン mRNA の発現も検討した。その結果、ヒトでは皮膚、扁桃、肺等に限られたランゲリン蛋白の発現が、マウスにおいては皮膚のみならず体表及び腸間膜リンパ節、脾臓、胸腺等のリンパ器官に加え、肝臓等にも広く認められることが明らかとなった。ところが、小腸には mRNA は検出されず、さらに E-カドヘリン、MIP-3 α および TGF- β の発現が認められる Peyer's patches においてもランゲリン mRNA の発現は認められなかった。体表リンパ節、脾臓、肝臓についてさらに詳細に検討した結果、これらの組織の中の CD8 α^{high} CD11b $^{\text{low}}$ 樹状細胞サブセ

ットにランゲリン mRNA だけでなく蛋白の発現が検出された。しかし、脾臓や腸管膜リンパ節には表皮ランゲルハンス細胞に由来する細胞の移動は考えられないことを考慮すると、リンパ器官内の $CD8\alpha^{high}CD11b^{low}$ 樹状細胞サブセットにおけるランゲリン発現には別の制御機構の存在も考える必要がある。

3) ランゲリンをマーカーとした表皮ランゲルハンス細胞の動態解析

末梢の樹状細胞は炎症応答時に速やかに所属リンパ節に移動し、免疫応答を誘導することが知られている。皮膚組織においても、表皮ランゲルハンス細胞や真皮樹状細胞が共に所属リンパ節へと移動する。しかし、これまで両者の動態を比較することは困難であった。そこで、今回同定したランゲリンをランゲルハンス細胞のマーカーとして用いることで両者の比較を試みた。耳殻に FITC を塗布し所属リンパ節への FITC⁺細胞の集積を検討したところ、 $CD11c^{high}CD11b^{high}$ と $CD11c^{int}CD11b^{int}$ サブセットに分けることができた。この内、前者のサブセットは真皮由来の単一の樹状細胞集団であると思われる。一方、後者のサブセットはランゲリン陽性細胞と陰性細胞から成ることか示された。これら 3 群の FITC⁺細胞数の経時的变化を検討したところ、ランゲリン⁺ $CD11b^{int}$ 、ランゲリン⁻ $CD11b^{int}$ およびランゲリン⁻ $CD11b^{high}$ サブセットいずれも FITC 塗布後約 48 時間にピークを迎えるものの、その後ランゲリン⁺ $CD11b^{int}$ サブセットの存在は他のサブセットに比較し長時間認められた。ランゲルハンス細胞と真皮樹状細胞の免疫応答制御における役割の違いについては、現在さらなる検討を継続している。

4) ランゲリン蛋白質の多量体形成と糖・糖タンパク質および微生物への結合性

ランゲリン分子は膜貫通部位と糖結合ドメイン間にネック領域を有するが、ここに規則的に疎水性アミノ酸が出現する heptad repeats の存在が認められる。そのため、この配列を介する多量体形成の可能性が予想される。そこで、この点に関して蛋白架橋剤を用いた実験によって検討した。その結果、組み換えランゲリン分子が二量体、四量体を経て多量体を形成することを確認した。この多量体形成は、ランゲリン分子の標的に対する選択性と結合性増強に働いているものと推測される。

次に、ランゲリンの糖鎖結合性を検討したところ、その一次構造から予想されるようにマンナンへの結合が確認された。さらに、トランスフェクタントを用いて細胞表面ランゲリンを抗体架橋すると細胞内に取り込まれること、またトランスフェクタントのみが糖蛋白質である卵白アルブミンや酵母細胞壁成分 zymosan に対する捕捉能をもつことを確認した。以上の結果から、ランゲリンはランゲルハンス細胞において

糖蛋白抗原や侵襲微生物の取り込みレセプターとして働いている可能性が示唆される。
現在、その特異性に関するさらに詳細な検討が続けている。

研究発表

(1) A-1. 英文 学会誌

- 1) Komuro, H., Mori, M., Hayashi, Y., Fukagawa, M., Makino, S., Takahara, K., Greenspan, D. S. and Momoi, M. (2001) Lack of BMP-1 gene mutations in patient with gastroschisis. *J. Pediatric Surgery* **36**, 885-887.
- 2) *Park, C. G., *Takahara, K., Umemoto, E., Yashima, Y., Matsubara, K., Matsuda, Y., Clausen, B. E., Inaba, K. and Steinman, R. M. (2001) Five mouse homologues of the human dendritic cell C-type lectin, DC-SIGN. *Int. Immunol.* **13**, 1283-1290.
(* the authors contributed equally to this work).
- 3) Takahara, K., Omatsu, Y., Yashima, Y., Yasuhiro, M., Tanaka, S., Iyoda, T., Clausen, B., Matsubara, K., Letterio, J., Steinman, R. M., Matsuda, Y. and Inaba, K. (2002) Identification and expression of mouse Langerin (CD207) in dendritic cells. *Int. Immunol.* **14**, 433-444.
- 4) Ligon, A. H., Scott, I. C., Takahara, K., Greenspan, D. S. and Morton, C. C. (2002) *PCOLCE* deletion and expression analysis in uterine leiomyomata. *Cancer Genet. Cytogenet.* **137**, 133-137
- 5) Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R. M. and Inaba, K. (2002) The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J. Exp. Med.* **195**, 1289-1302.
- 6) *Takahara, K., *Schwarze, U., Imamura, Y., Hoffman, G. G., Toriello, H., Smith, L. T., Byers, P. H. and Greenspan, D. S. (2002) Order of intron removal influences multiple splice outcomes, including α 2-exon skip, in a *COL5A1* acceptor site mutation that results in abnormal pro- α 1(V) N-propeptides and Ehlers-Danlos syndrome type I. *Amer. J. Human Genetics.*

71, 451-465. (* the authors contributed equally to this work)

- 7) Ichioka, N., Inaba, M., Kushida, T., Esumi, T., Takahara, K., Inaba, K., Ogawa, R., Iida, H. and Ikehara, S., (2002) Prevention of senile osteoporosis in SAMP6 mice by intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells. *Stem cells* **20**, 542-551.
- 8) Kang, Y. -S.*, Yamazaki, S*, Iyoda, T.*, Pack, M., Bruening, S. A., Kim, J. Y., Takahara, K., Inaba, K., Steinman, R. M. and Park, C. G. SIGN-R1, a novel C-type lectin expressed by marginal zone macrophages in spleen, mediates uptake of the polysaccharide dextran. *Int. Immunol.* **15**, 177-186.
(* the authors contributed equally to this work)
- 9) Wang, W. -M., Lee, S., Steiglitz, B. M., Scott, I. C., Lebares, C.C., Allen, L., Brenner, M. C., Takahara, K. and Greenspan, D. S. (2003) Transforming growth factor- β induces secretion of activated ADAMTS-2: A procollagen III N-proteinase. *J. Biol. Chem.* **278**, 19549-19557.

和文 総説

- 1) 高原和彦、稲葉カヨ (2002) 樹状細胞による免疫寛容の誘導と維持. 細胞工学. 21, 1294-1297.

学会発表

- 1) 八島佑介、高原和彦、尾松芳樹、伊豫田智典、下山晋、稲葉カヨ
マウスランゲリン蛋白の発現およびそれに対する TGF- β 1 の作用
第 31 回日本免疫学会学術集会 (大阪) 平成 13 年 12 月 13 日
- 2) 前田恭宏、梅本英司、八島佑介、Park ChaeGyu、高原和彦、
Steinman Ralph M、稲葉カヨ
マウス DC-SIGN のホモログのクローニングとその発現の検討
第 31 回日本免疫学会学術集会 (大阪) 平成 13 年 12 月 13 日

- 3) 下山晋、伊豫田智典、尾松芳樹、高原和彦、稲葉カヨ
マウスリンパ節における皮膚由来樹状細胞サブセットの解析
第31回日本免疫学会学術集会（大阪）平成13年12月13日
- 4) 伊豫田智典、Liu Kang、植村泰典、尾松芳樹、木村幸乃、高原和彦、
Steinman Ralph M、稲葉カヨ
マウス脾臓 CD8⁺樹状細胞による死細胞由来抗原の提示
第32回日本免疫学会学術集会（東京）平成14年12月4日
- 5) 木村幸乃、伊豫田智典、植村泰典、高原和彦、稲葉カヨ
樹状細胞の成熟と膜脂質マイクロドメイン（raft）の変化
第32回日本免疫学会学術集会（東京）平成14年12月4日
- 6) 高原和彦、八島佑介、田中周作、吉田英雄、稲葉カヨ
マウス DC-SIGN ホモログの糖鎖結合性と細胞内取り込み
第32回日本免疫学会学術集会（東京）平成14年12月4日
- 7) 八島佑介、高原和彦、田中周作、吉田英雄、稲葉カヨ
マウスランゲリンの糖鎖結合性と多量体形成
第32回日本免疫学会学術集会（東京）平成14年12月4日

招待講演

- 1) K. Takahara, Y.Omatsu, Y.Yashima, T.Iyoda and K. Inaba: Identification and expression of C-type lectin on mouse dendritic cells and possible use as a marker of dendritic cells subsets. The Xth International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages. June 2001, Tokyo