原 著 IV

ヒト濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell : FDC) における接着分子の発現

—特に fibronectin-および laminin-receptor について—

尾形 隆¹⁾, 山川 光徳¹⁾, 山田 和彦¹⁾, 大類 広¹⁾
 柘植 通¹⁾, 新野 恵司¹⁾, 鈴木 明彦¹⁾, 角田 卓哉¹⁾
 湯田 文朗²⁾, 今井 大³⁾, 市毛 明彦⁴⁾

- 1) 山形大学医学部第二病理
- 2) 山形市立病院済生館病理
- 3) 山形市医師会健診センター病理
- 4) 米沢市立病院耳鼻咽喉科

(平成 7 年 7 月 31 日受付)
 (平成 7 年 10 月 2 日受理)

Expression of Adhesion Molecules on Human Follicular Dendritic Cells (FDCs) in
 Germinal Centers, with Special Reference to Fibronectin - and Laminin-Receptors

Takashi Ogata¹⁾, Mitsunori Yamakawa¹⁾, Kazuhiko Yamada¹⁾, Hiroshi Ohru¹⁾
 Tohru Tsuge¹⁾, Keiji Niino¹⁾, Akihiko Suzuki¹⁾, Takuya Tsunoda¹⁾
 Fumiaki Yuda²⁾, Yutaka Imai³⁾, Akihiko Ichige⁴⁾

- 1) Second Department of Pathology, Yamagata University School of Medicine
- 2) Department of Pathology, Yamagata Saiseikan Hospital
- 3) Department of Pathology, Medical Examination Center of Yamagata City Medical Association
- 4) Department of Otorhinolaryngology, Yonezawa City Hospital

The expression of adhesion molecules on human tonsillar follicular dendritic cells (FDCs) *in vivo* on cryostat sections and *in vitro* on isolated FDCs on cytospin preparations was studied. Isolation of FDCs was performed using a magnetic cell sorter (MACS). Immunohistochemically, FDCs were positive for Mac-1 (CD11b), sialyl-Le^x (CD15s), CD22, integrin β 1 (CD29), CD40, VLA- α 3 (CD49c), VLA- α 5 (CD49e), VLA- α 6 (CD49f), ICAM-3 (CD50), ICAM-1 (CD54), B7 (CD80), and VCAM-1 (CD106). These adhesion molecules, except ICAM-3 (CD50) which was weakly positive only in the light zone (LZ), were positive with a lacy pattern in all zones of secondary lymphoid follicle, especially strong in the LZ. ICAM-3 (CD50) was positive on more than half of isolated

FDCs, but other molecules were positive on almost all isolated FDCs. Concerning the ligands on B cells for these adhesion molecules, the Mac-1 (CD11b)—ICAM-1 (CD54), the ICAM-3 (CD50)—LFA-1 (CD11a/18), and the VCAM-1 (CD106)—VLA-4 (CD29/49d) interactions in the LZ, the sialy-Le^x (CD15s)—L-selectin (CD62L) and the VCAM-1 (CD106)—VLA-4 (CD29/49d) interactions in the mantle zone, and the ICAM-1 (CD54)—LFA-1 (CD11a/18) interaction in the entire lymphoid follicle may participate in FDC—B cell adhesion. Furthermore, above mentioned immunohistochemical evidence that FDCs were positive for fibronectin-receptor (CD29/CD49e) and laminin-receptor (CD29/CD49f), was confirmed with a frozen-section binding assay, using isolated FDCs and cryostat sections of tonsils. The numbers of FDCs binding to germinal centers (GCs) were reduced remarkably by pretreatment with monoclonal antibodies for CD29 ($32.8 \pm 4.1\%$ of the control), CD49e ($29.7 \pm 2.5\%$), and CD49f ($18.8 \pm 0.8\%$). These data clearly indicated that FDCs bind to the reticulin or laminin fiber in GCs via either receptor.

Key words: follicular dendritic cell (FDC), adhesion molecules, fibronectin-receptor, laminin-receptor, magnetic cell sorter (MACS)

はじめに

ヒト濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell: FDC) によって支配される二次リンパ濾胞は、光顕的に被殻、外層、暗調部、明調部基部、明調部頂部の5領域に分類することができる¹⁾。FDCも、超微形態学的に、主として明調部に観察される迷路様構造に富むFDCと暗調部に局在する迷路様構造を持たないFDCに二大別できる²⁾。FDCは二次リンパ濾胞内の線維状構造物に絡み付くように存在し、線維を軸として固定され、デスモゾーム様接着によって隣接するFDCと連結されている。濾胞内に広範囲な三次元的網目構造を形成するFDCは、抗原に刺激された末梢B細胞が記憶B細胞と形質芽球になるための増殖と分化の場を提供している³⁾。

FDCが胚中心内でこのような構造を形成し、B細胞との相互作用を維持して行くためには、細胞接着分子の関与が必要と考えられる。特にFDCとB細胞との接着に関してはいくつかの報告があり、intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54)—leukocyte function-associated molecule 1 (LFA-1, CD11a/CD18) および vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1, CD106)—very late antigen 4 (VLA-4, CD29/CD49d) の関与が報告されている^{4)~7)}。しかし、超微形態学的にFDCと線維との相関性が示唆され、Gloghiniら⁸⁾⁹⁾が免疫組織学的に二

次リンパ濾胞における抗FDC抗体(R4/23)と抗ラミニン抗体による染色性の間に深い相関性を示唆しているにも拘わらず、FDCと細胞外基質との接着に関する報告はほとんどない。

今回、我々はFDC上の接着分子の発現を凍結切片で免疫組織化学的に、また、単離FDCのサイトスピン標本で免疫細胞化学的に検討した。その結果、FDCとB細胞の相互作用に関与する接着分子は、二次リンパ濾胞の領域ごとに違いが見られた。さらに、frozen-section binding assayによって、FDCのfibronectin-receptor (VLA-5, CD29/CD49e)¹⁰⁾ および laminin-receptor (VLA-6, CD29/CD49f)¹¹⁾ を介した細網線維とラミニン線維への接着を証明した。

材料と方法

1. 材料

慢性扁桃炎の摘出ヒト口蓋扁桃15例を用いた。免疫組織化学的検討、免疫細胞化学的検討、そして frozen-section binding assay に、それぞれ5例ずつ使用した。

2. 方法

1) 免疫組織化学的検討

扁桃組織を厚さ5mmに細切し、2% paraformaldehyde 含有 periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) で6時間固定した¹²⁾。アセトンとドライア

表1 使用抗体

Antibody/Clone	CD	Subclass		Source
LFA-1 α	11a	Mouse	IgG1	DAKO
Mac-1	11b	Rat	IgG2b	BMB
Leu-M5	11c	Mouse	IgG2b	Becton Dickinson
Lewis ^x	15	Mouse	IgM	Becton Dickinson
Sialyl-Le ^x	15s	Mouse	IgM	Becton Dickinson
LFA-1 α	18	Mouse	IgG1	DAKO
CD22	22	Mouse	IgG2b	Becton Dickinson
CD28	28	Mouse	IgG1	Immunotech
Integrin β 1 (mAb13)	29	Rat	IgG2a	Becton Dickinson
CD40	40	Mouse	IgG1	Immunotech
GP II b/III a	41a	Mouse	IgG1	DAKO
Leukosialin (MT-1)	43	Mouse	IgG1	Bio-Science
Pgp-1	44	Mouse	IgG1	Immunotech
UCHL-1	45RO	Mouse	IgG2a	DAKO
VLA- α 2 (P1E6)	49b	Mouse	IgG1	DAKO
VLA- α 3 (P1E5)	49c	Mouse	IgG1	DAKO
VLA- α 4 (P4G9)	49d	Mouse	IgG3	DAKO
VLA- α 5 (P1D6)	49e	Mouse	IgG3	DAKO
VLA- α 6 (GoH3)	49f	Rat	IgG2a	Cosmo Bio
ICAM-3	50	Mouse	IgG1	DAKO
ICAM-1	54	Mouse	IgG1	Immunotech
NCAM	56	Mouse	IgG1	CRB
LFA-3	58	Mouse	IgG2a	Cosmo Bio
Integrin β 3	61	Mouse	IgG1	DAKO
P-selectin	62P	Mouse	IgG1	Becton Dickinson
E-selectin	62E	Mouse	IgG2a	Becton Dickinson
L-selectin	62L	Mouse	IgG2a	Becton Dickinson
B7	80	Mouse	IgG1	Immunotech
ICAM-2	102	Mouse	IgG2a	Cosmo Bio
Integrin β 4	104	Mouse	IgG1	Becton Dickinson
VCAM-1	106	Mouse	IgG1	Genzyme
Fibronectin		Rabbit	heterologous	DAKO
Laminin		Rat	IgG1	Chemicon
R4/23		Mouse	IgM	DAKO
Ki-M4		Mouse	IgG	BMA
X-11		Mouse	IgG1	Serotec
Bu-10		Mouse	IgM	The Binding Site

LFA: leukocyte function-associated molecule, BMB: Boehringer Mannheim Biochemica, VLA: very late activation antigen, NCAM: neural cell adhesion molecule, CRB: Cambridge Research Biochemicals

表2 FDCに発現する接着分子

Antibody	CD	MZ	OZ	ALZ	BLZ	DZ	isolated FDC
Mac-1	11b	+	+	++	++	+	+
Sialyl-Le ^x	15s	+	+	++	+	+	+
CD22	22	+	+	++	++	+	+
Integrin β 1	29	+	+	++	++	+	+
CD40	40	+	+	++	++	+	+
VLA- α 3	49c	+	+	++	++	+	+
VLA- α 5	49e	+	+	++	++	+	+
VLA- α 6	49f	+	+	++	++	+	+
ICAM-3	50	—	—	+	+	—	+/-
ICAM-1	54	+	+	++	++	+/-	+
B7	80	+	+	++	++	+	+
VCAM-1	106	+	+	++	++	+	+

MZ: mantle zone (被殻), OZ: outer zone (外層), DZ: dark zone (暗調部),
BLZ: basal light zone (明調部基部), ALZ: apical light zone (明調部頂部),
—: negative, +/-: often positive, +: weakly positive, ++: strongly positive

イスを用いて Tissue-Tek optimal cutting temperature compound (Miles Laboratories, USA) 中に包埋し、薄切まで -80°C で保存した。凍結クライオスタット切片 ($6\mu\text{m}$) を表1に示す一次抗体で反応後、avidin-biotinylated peroxidase complex (ABC) 法¹³⁾で 3-3' diamino-benzidine (DAB) を用いて発色した。陰性コントロールには、一次抗体の代わりに PBS を用いた。メチルグリーンで核染を行い、リンパ濾胞を被殻、外層、暗調部、明調部基部、明調部頂部の5つの領域に分けて¹⁾、接着分子の発現を評価した。また、評価の際には、抗 FDC 抗体である R4/23¹⁴⁾による FDC の網目状の陽性像と比較しながら判定した。

2) FDC の単離

Microslicer DTK-1000 (Dosaka EM, Japan) を用いて扁桃を $300\mu\text{m}$ に薄切した後、実体顕微鏡下で胚中心を採取した¹⁵⁾。

その後 Schmitz らの方法¹⁶⁾に従って、magnetic cell sorter (MACS) (Miltenyi Biotec, Germany) を用いて FDC を単離した。簡単に述べると、得られた胚中心を collagenase class IV ($450\text{U}/\text{ml}$, Sigma Chemical, USA) と deoxyribonuclease ($28\text{kU}/\text{ml}$, Sigma Chemical, USA) を含む RPMI 1640 (Gibco, USA) で 37°C にて60分間処理し、RPMI 1640と

Patho-o-cyte 5 (Miles Laboratories, USA) で $1.052\text{g}/\text{ml}$ と $1.030\text{g}/\text{ml}$ に調整した不連続密度勾配を用いて Himac Centrifuge CR26H (Hitachi, Japan) で 4°C , $8500\times g$ にて60分間遠心分離した。得られた細胞浮遊液を、biotinyl N-hydroxy succinimide ester (E-Y Laboratories, USA) と反応させてビオチン化した¹⁷⁾抗 FDC モノクローナル抗体 (表1) (R4/23, Ki-M4, X-11, Bu-10) と、続いてストレプトアビジン標識マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Germany) とそれぞれ 4°C , 30分間反応させた。磁場中に置いた分離カラムを用いてビーズ陰性細胞を十分に流出させた後、カラムを磁場からはずして付着細胞を RPMI 1640 液中に回収し、 1000rpm , 5分でサイトスピンスライド (Shandon, UK) を作成した。

3) 免疫細胞化学的検討

得られたサイトスピンスライドを用いて、免疫二重染色を施行した。単離の過程で反応させたビオチン化抗 FDC モノクローナル抗体を ABC 法¹³⁾によって DAB で褐色に発色した後、それぞれの抗接着分子抗体を alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase (APAAP) 法¹⁸⁾によってニューフクシンで赤色に発色し、ヘマトキシリンで核染した。陰性コントロールは、抗接着分子抗体の代わりに PBS

図1 Sialyl-Le^x (CD15s), ICAM-3 (CD50) 免疫染色

MZ: 被殻, ALZ: 明調部頂部, BLZ: 明調部基部, DZ: 暗調部。

(1a) Sialyl-Le^x 染色: 特に明調部頂部に強い陽性像を認めるが、胚中心全体の FDC に陽性を示す。メチルグリーン核染, $\times 80$ 。

(1b) ICAM-3 染色: リンパ球の強陽性像が目立つが、明調部の FDC にも網目状の弱陽性像を認める。メチルグリーン核染, $\times 130$ 。

(1c) Sialyl-Le^x 染色: 単離細胞でも、ほとんどの FDC (矢印) に陽性像を認める。ヘマトキシリン核染, $\times 600$ 。

(1d) ICAM-3 染色: 半数以上の単離 FDC (矢頭) に陽性像を認める。ヘマトキシリン核染, $\times 600$ 。

のみで反応させた。

4) Frozen-section binding assay

Butcher ら¹⁹⁾および Freedman ら²⁰⁾の方法を基に, frozen-section binding assay を施行した。具体的には, MACS によって単離した FDC を 2×10^{-6} mol/l の PKH26 (Zynaxis Cell Science, USA) で蛍光標識 (4℃, 10分間) した²¹⁾。切片1枚あたり約250個の FDC を各々の抗接着分子抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ と 4℃, 30分間反応させた。なお, 今回我々が binding assay に用いた integrin $\beta 1$ (CD29, clone:

mAb13), VLA- $\alpha 3$ (CD49c, clone: P1E5), VLA- $\alpha 5$ (CD49e, clone: PID6) および VLA- $\alpha 6$ (CD49f, clone: GoH3) は, 接着能を阻害する中和抗体であることが確認されている^{22)~26)}。抗接着分子抗体と反応後の FDC を RPMI 1640 で洗浄し, 細胞浮遊液 $300 \mu\text{l}$ に調整した上で, 1% bovine serum albumin-PBS で 37℃, 1時間前処理した扁桃組織の凍結連続切片と 4℃, 40分間反応させた。コントロールには抗接着分子抗体の代わりに PBS で処理した単離 FDC を用いた。反応後, 3% glutaraldehyde で

図2 (2a) Integrin $\beta 1$ (CD29) 染色, $\times 130$

(2b) VLA- $\alpha 5$ (CD49e) 染色, $\times 160$

(2c) VLA- $\alpha 6$ (CD49f) 染色, $\times 130$

胚中心全体 of FDC に陽性を示すが、特に明調部に強い網目状の陽性像を認める。いずれもメチルグリーン核染。

4℃, 8時間固定し, 蛍光顕微鏡下で切片上の胚中心内に接着している FDC 数を評価した。なお, ビオチン化抗 FDC 抗体を ABC 法¹³⁾で DAB を用いて発色し, メチルグリーンで核染することによって, 蛍光点として数えられたこれらの細胞が FDC であること, ならびにそれが胚中心内に存在することを再確認した。

結 果

免疫組織化学的検討ならびに単離 FDC 上における接着分子の発現の検討の結果を表 2 にまとめた。今回の我々の検討で, 新たに FDC が sialyl-Le^x (CD15s) ならびに ICAM-3 (CD50) に対しても陽性であることが判明した (図 1)。Sialyl-Le^x (CD15

s) 染色では, 二次リンパ濾胞全体の FDC が, R4/23 の陽性像に似た網目状の陽性像を呈し, 特に明調部頂部に強い発現が認められた (図 1a)。また, 濾胞外の顆粒球や単核球にも陽性像を認めた。さらに, ほとんどの単離 FDC が sialyl-Le^x (CD15s) に明らかに陽性だった (図 1c)。ICAM-3 (CD50) 染色では, 濾胞外や被殻のリンパ球や胚中心内のリンパ球の強陽性像の他にも, 弱陽性ながらも明調部のみに局限して FDC の網目状の弱陽性像を認め (図 1b), 単離 FDC においても半数以上の FDC に陽性像を認めた (図 1d)。

Mac-1 (CD11b), CD22, integrin $\beta 1$ (CD29) (図 2a), CD40, VLA- $\alpha 3$ (CD49c), VLA- $\alpha 5$ (CD49e) (図 2b), VLA- $\alpha 6$ (CD49f) (図 2c), ICAM-

図3 (3a) Fibronectin 免疫染色：扁桃組織全体に線維状の陽性像を認め、胚中心内では特に明調部に密な分布を示す。メチルグリーン核染, $\times 130$ 。

(3b) Laminin 免疫染色：血管壁の他にも、胚中心全体に細い線維状の陽性像を認める。メチルグリーン核染, $\times 80$ 。

図4 (4a) Integrin $\beta 1$ (CD29) 染色

(4b) VLA- $\alpha 5$ (CD49e) 染色

(4c) VLA- $\alpha 5$ (CD49f) 染色

ほとんどの単離 FDC で、R4/23陽性を示す褐色と各接着分子陽性を示す赤色の二重陽性像を認める。ヘマトキシリン核染, $\times 600$ 。

1 (CD54), B7 (CD80), VCAM-1 (CD106) に対しても、リンパ濾胞内のほとんどの FDC が陽性だった。これらの陽性像は、R4/23免疫染色の陽性像に似た網目状の陽性像を呈し、特に明調部で強い傾向が見られた。さらに、これらの接着分子は、ほとんどの単離 FDC においても同様に明瞭な陽性像を認めた (図4)。

一方、LFA-1 α (CD11a), Leu-M5 (CD11c),

Lewis^x (CD15), CD28, GP II b/III a (CD41a), leukosialin (CD43), Pgp-1 (CD44), UCHL-1 (CD45 RO), VLA- $\alpha 2$ (CD49b), VLA- $\alpha 4$ (CD49d), NCAM (CD56), LFA-3 (CD58), integrin $\beta 3$ (CD61), P-selectin (CD62P), E-selectin (CD62E), L-selectin (CD62L), ICAM-2 (CD102) および integrin $\beta 4$ (CD104) は、凍結切片の FDC および単離 FDC の両者において陰性であった。

表3 Frozen-section binding assay 法による FDC の胚中心への接着能

FDC treated with	% binding FDC
None	100.0
Integrin β 1	32.8 $\pm$ 4.1
VLA- α 3	91.7 $\pm$ 1.5
VLA- α 5	29.7 $\pm$ 2.5
VLA- α 6	18.8 $\pm$ 0.8

図5 Frozen-section binding assay
抗体処理をしなかった単離 FDC (5 a) に比べ, integrin β 1 (CD29) (5 b), VLA- α 5 (CD49e) (5 c), VLA- α 6 (CD49f) (5 d) で処理した FDC は, 切片への接着が著明に抑制された。PKH26 蛍光標識, $\times 70$ 。

Fibronectin 染色では, 扁桃組織全体に陽性線維を認め, 胚中心内では特に明調部に密な分布を示した(図 3a)。また, laminin 染色では, 血管壁の他にも, 胚中心全体にわたる線維状の陽性像を認めた(図 3b)。両者を比較すると, fibronectin は太い線維と微細な線維を持ち, laminin はやや太い線維が胚中心内に分布していた。

Frozen-section binding assay の結果を表 3 に示

す。FDC は胚中心以外の扁桃組織にも接着したが, 今回の我々の検討では胚中心に接着した FDC 数のみを検討した。抗接着分子抗体で処理しなかったコントロールの FDC の凍結切片胚中心への接着数を 100% とすると(図 5a), 抗 integrin β 1 抗体(CD29) (図 5b), 抗 VLA- α 3 抗体 (CD49c), 抗 VLA- α 5 抗体 (CD49e) (図 5c), そして抗 VLA- α 6 抗体 (CD49f) (図 5d) で処理した FDC の接着数は, そ

表4 二次リンパ濾胞内 FDC および B 細胞上の接着分子の局在

		MZ	OZ	ALZ	BLZ	DZ
FDC	CD11b	+	+	++	++	+
B cell	CD54 ³¹⁾	-	-	+	+	-
FDC	CD15s	+	+	++	++	+
B cell	CD62L ³³⁾	++	-	-	-	-
FDC	CD50	-	-	+	+	-
B cell	CD11a/18 ⁸²⁾	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
FDC	CD54	+	+	++	++	+
B cell	CD11a/18 ^{4~7)}	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
FDC	CD106	+	+	++	++	+
B cell	CD29/49 ^{4~7)}	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-

4~7), 31~33): 文献参照

れぞれ $32.8 \pm 4.1\%$, $91.7 \pm 1.5\%$, $29.7 \pm 2.5\%$, $18.8 \pm 0.8\%$ となり, 抗体での前処理によってFDCの凍結切片胚中心への接着が抑制されることがわかった。特に抗 integrin $\beta 1$ 抗体(CD29), 抗 VLA- $\alpha 5$ 抗体 (CD49e) および抗 VLA- $\alpha 6$ 抗体 (CD49f) で前処理した場合に, 著明な抑制が認められた。なお, 単離 FDC で反応しなかった切片では, 蛍光を発する細胞ならびに DAB で発色する細胞は認められなかった。

考 察

今回の検討で FDC に陽性だった接着分子は, 二次リンパ濾胞の領域によってその発現の程度が異なっていることがわかった。Mac-1(CD11b), CD22, integrin $\beta 1$ (CD29), CD40, VLA- $\alpha 3$ (CD49c), VLA- $\alpha 5$ (CD49e), VLA- $\alpha 6$ (CD49f), ICAM-1 (CD54), B7 (CD80), VCAM-1 (CD106) では, 明調部基部および明調部頂部において強陽性像を認め, 被殻や外層および暗調部では弱陽性を呈した。また, sialyl-Le^x (CD15s) は, 明調部頂部でのみ FDC に強陽性を示し, 明調部基部の FDC では被殻, 外層, 暗調部と同様に弱陽性を呈するにとどまった。さらに, ICAM-3 (CD50) 染色では, FDC の陽性像は明調部基部および明調部頂部のみに限局した弱陽性像を認めるのみだった。

ヒトリリンパ濾胞胚中心の補体活性化現象は明調部でのみ生じており, これは免疫複合体の局在に一致している²⁷⁾²⁸⁾。また, MacLennan ら²⁹⁾³⁰⁾によると, CR2 (CD21) と ICAM-1 (CD54) をより強く発現しているのは明調部基部および明調部頂部の FDC のみであり, Fc ϵ レセプター (CD23) は明調部頂部の FDC では強陽性を呈するが明調部基部の FDC では陰性あるいは弱陽性である。今回の我々の検討でも, FDC に陽性を示した12種の接着分子のほとんどは, 明調部により強い陽性像を示した。

さらに詳細に検討するために, FDC に陽性だった接着分子のうち, そのリガンドがB細胞上に存在するものを表4に示した。ICAM-1 (CD54) —LFA-1 (CD11a/CD18)^{4)~7)}を介した接着は, 被殻, 外層, 暗調部, 明調部基部, 明調部頂部のいずれの領域でも起こりうるのに対して, VCAM-1 (CD106) —VLA-4 (CD29/CD49d)^{4)~7)}を介した接着は被殻と明調部でのみ起こり得ることが指摘されているが, 今回の我々の検討でも再確認された。また, Mac-1 (CD11b) —ICAM-1 (CD54)³⁰⁾や ICAM-3 (CD50) —LFA-1 (CD11a/CD18)³¹⁾を介した両者の接着は, 明調部でのみ生じている可能性が示唆される。さらに, sialyl-Le^x (CD15s) —L-selectin (CD62L)³²⁾を介した FDC と B 細胞の接着は, 被殻でのみ生じることが推察された。

表5 FDC上の細胞外基質レセプターとそのリガンド

ECM	⇔	FDC	ECM receptor on FDC
Collagen ³⁴⁾	⇔	CD49b(−) + CD29 (+)	⇒ (−)
Fibronectin ¹⁰⁾	⇔	CD49e(+) + CD29 (+)	⇒ (+)
Laminin ¹¹⁾	⇔	CD49f(+) + CD29 (+)	⇒ (+)
Collagen, TS ^{35),36)}	⇔	CD36 (?)	⇒ (?)
Fibrinogen ³⁷⁾	⇔	CD41 (−) + CD61 (−)	⇒ (−)
vWF, Thrombin ³⁸⁾	⇔	CD42a(?) + CD42b(?)	⇒ (?)
Vitronectin ³⁹⁾	⇔	CD51 (−) ⁴⁰⁾ + CD61 (−)	⇒ (−)

ECM: Extracellular matrix (細胞外基質), vWF: von Willebrand
Factor, TS: Thrombospondin, 10~11), 34 ~40): 文献参照
今回の検討における評価 (+): positive, (−): negative

このように、FDC—B細胞相互作用に関与する接着分子は、領域によって異なる可能性が大きい。これは、B細胞がこれらの領域間を移動しながら暗調部で増殖し、明調部基部で選択され、明調部頂部で分化して行くという二次リンパ濾胞の領域ごとの機能の違い³⁰⁾を反映しているものと思われた。即ち、被殻でL-selectin (CD62L), LFA-1 (CD11a/CD18), VLA-4 (CD29/CD49d)によってFDC上に存在するそれぞれのリガンドと接着したB細胞は、外層および暗調部でLFA-1(CD11a/CD18)によってFDCと接着し、明調部に入ってICAM-1 (CD54), LFA-1 (CD11a/CD18), VLA-4 (CD29/CD49d)でFDCと接着するものと考えられた。また、特に明調部においてより多くの分子が両者の接着に関与しうることから、FDC—リンパ球クラスターを形成してB細胞に抗原提示するというFDCの機能を果たす上で、この領域がより重要な役割を担っていることが推察された。

表5にFDCの細胞外基質受容体についてまとめた。FDCはintegrin β 1 (CD29), VLA- α 3 (CD49c), VLA- α 5 (CD49e), VLA- α 6 (CD49f)に陽性を示し、fibronectin-receptor (VLA-5, CD29/CD49e)¹⁰⁾, laminin-receptor (VLA-6, CD29/CD49f)¹¹⁾を保持していることが、組織切片上ならびに単離細胞においても確認された。今回、我々はこれを確証するために、frozen-section binding assayによる検討を行った。特に抗 integrin β 1 抗体(CD29), 抗 VLA- α 5 抗体 (CD49e) および抗 VLA- α 6 抗体 (CD49f) で処理することによって、FDCの切片上の胚中心への接着を著明に抑制することができた。

しかし、fibronectin, laminin, collagenなどに非特異的に接着するとされる抗 VLA- α 3 抗体²³⁾で前処理した場合、接着の抑制は91.7%にとどまった。これらの結果から、FDCは、主に fibronectin-receptor (CD29/CD49e) と laminin-receptor (CD29/CD49f) を介して胚中心内に存在する微細な細網線維やより太いラミニン線維に接着していることがわかる。FDCは、これらのレセプターを持った樹枝状の細胞質突起でこれら胚中心内の線維状構造物に絡み付くように接着し、線維を軸として固定される。そして隣接するFDC同士は、その細胞質突起を伸ばし合い、デスモゾーム様接着によってより強固に連結されているものと思われる。二次リンパ濾胞内に広範囲に展開されるFDCの三次元的網目構造は、B細胞に対する抗原提示という機能を果たしているだけでなく、線維とともに胚中心構造の骨格を形成し、B細胞の増殖と分化の場を提供していると言える。そして、これらのいずれの過程においても、接着分子の果たす役割はきわめて大きいものと考えられる。

ま と め

ヒト濾胞樹状細胞の細胞接着分子については、次のように要約される。

1. FDCは、B細胞との接着に関与しうる Mac-1(CD11b), sialyl-Le^x (CD15s), ICAM-3(CD50), ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106), ならびに細胞外基質との接着に関与しうる integrin β 1 (CD29), VLA- α 3 (CD49c), VLA- α 5 (CD49e), VLA- α 6 (CD49f)に陽性を示し、これらの接着分子

は MACS による単離後も消失しなかった。

2. FDC—B細胞相互作用においては、二次リンパ濾胞の領域によって関与する接着分子が異なる可能性が示唆された。

3. FDC は fibronectin-receptor (CD29/CD49e) および laminin-receptor (CD29/CD49f) を保持しており、これらを介して胚中心内の細網線維ならびにラミニン線維に接着する。

謝 辞

稿を終えるにあたり、貴重な扁桃組織をご提供いただいた山形市立病院済生館耳鼻咽喉科、山形県立河北病院耳鼻咽喉科、山形大学医学部耳鼻咽喉科学講座の諸先生に厚く御礼申し上げます。

本論文の一部要旨、第34回日本網内系学会総会（1994年、福島）ならびに第84回日本病理学会総会（1995年、名古屋）で発表した。

文 献

- 1) Hardie DL, Johnson GD, Khan M and MacLennan ICM: Quantitative analysis of molecules which distinguish functional compartments within germinal centers. *Eur J Immunol* 23: 997-1004 1993
- 2) Imai Y, Terashima K, Matsuda M, Dobashi M, Maeda K and Kasajima T: Reticulum cell and dendritic reticulum cell. Origin and function. *Rec Adv Reticuloendothel Soc Res* 21: 51-81 1983
- 3) Kroese FGM, Wubben AS, Seijen HG and Nieuwenhuis P: Germinal centers develop oligoclonally. *Eur J Immunol* 17, 1069-1072 1987
- 4) Koopman G, Parmentier HK, Schuurman HJ, Newman W, Meijer CJ and Pals ST: Adhesion of human B cells to follicular dendritic cells involves both the lymphocyte function-associated antigen 1/intercellular adhesion molecule 1 and very late antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 pathway. *J Exp Med* 173: 1297-1304 1991
- 5) Kosco MH, Pflugfelder E and Gray D: Follicular dendritic cell-dependent adhesion and proliferation of B cells in vitro. *J Immunol* 148: 2331-2339 1992
- 6) Koopman G, Keehnen RM, Lindhout E, Newman W, Shimizu Y, van Seventer GA, de Groot C and Pals ST: Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)—ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)—VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells. *J Immunol* 152: 3760-3767 1994
- 7) Tanaka H, Saito S, Sasaki H, Arai H, Oki T and Shioya N: Morphological aspects of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 adhesion pathways in human lymph nodes. *Pathol Int* 44: 268-279 1994
- 8) Gloghini A, Colombatti Alfonso, Bressan G and Carbone A: Basement membrane Components in lymphoid follicles: Immunohistochemical demonstration and relationship to the follicular dendritic cell network. *Human Pathol* 20: 1001-1007 1989
- 9) Gloghini A and Carbone A: Dendritic reticulum cell-related immunostaining for laminin in follicular and diffuse B-cell lymphomas. *Virchows Arch A Pathol Anat* 416: 197-204 1990
- 10) Ruoslahti E and Pierschbacher MD: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238: 491-497 1987
- 11) Sonnenberg A, Linders CJT, Modderman PW, Damsky CH, Aumailley M and Timpl R: Integrin recognition of different cell-binding fragments of laminin (P1, E3, E8) and evidence that $\alpha 6 \beta 1$ but not $\alpha 6 \beta 4$ functions as a major receptor for fragment E8. *J Cell Biol* 110: 2145-2155 1990
- 12) McLean IW and Nakane PK: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. *J Histochem Cytochem* 22: 1077-1083 1974
- 13) Hsu SM, Raine L and Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580 1981

- 14) Naiem M, Gerdes J, Abdulazizz Z, Stein H and Mason DY: Production of a monoclonal antibody reactive with human dendritic reticulum cells and its use in the immunohistological analysis of human lymphoid tissue. *J Clin Pathol* 36 : 167-175 1983
- 15) Tsunoda R, Yaginuma Y and Kojima M: Immunocytological studies on the constituent cells of the secondary nodules in human tonsils. *Acta Pathol Jpn* 30 : 33-57 1980
- 16) Schmitz J, Petrasch S, van Lunzen J, Racz P, Kleine HD, Hufert F, Kern P, Schmitz H and Tenner-Racz K: Optimizing follicular dendritic cell isolation by discontinuous gradient centrifugation and use of the magnetic cell sorter (MACS). *J Immunol Methods* 159 : 189-196 1993
- 17) Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 27 : 1131-1139 1979
- 18) Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KAF, Stein H and Mason DY: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32 : 219-229 1984
- 19) Butcher EC, Scollay RG and Weissman IL: Lymphocyte adherence to high endothelial venules: characterization of a modified in vitro assay, and examination of the binding of syngeneic and allogeneic lymphocyte populations. *J Immunol* 123 : 1996-1979 1979
- 20) Freedman AS, Munro JM, Morimoto C, McIntyre BW, Rhynhart K, Lee N and Nadler LM: Follicular non-Hodgkin's lymphoma cell adhesion to normal germinal centers and neoplastic follicles involves very late antigen-4 and vascular cell adhesion molecule-1. *Blood* 79 : 206-212 1992
- 21) Munn DH and Cheung NKV: Phagocytosis of tumor cells by human monocytes cultured in recombinant macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 172 : 231-237 1990
- 22) Akiyama SK, Yamada SS, Chen WT and Yamada KM: Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol* 109 : 863-975 1989
- 23) Carter WG, Wayner EA, Bouchard TS and Kaur P: The role of integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *J Cell Biol* 110 : 1387-1404 1990
- 24) Weitzman JB, Pasqualini R, Takada Y and Hemler ME: The function and disinctive regulation of the integrin VLA-3 in cell adhesion, spreading, and homotypic cell aggregation. *J Biol Chem* 268 : 8651-8657 1993
- 25) Wayner EA, Carter WG, Piotrowicz RS and Kunicki TJ: The function of multiple extracellular matrix receptors in mediating cell adhesion to extracellular matrix: preparation of monoclonal antibodies to the fibronectin receptor that specifically inhibit cell adhesion to fibronectin and react with platelet glycoproteins Ic-IIa. *J Cell Biol* 107 : 1881-1891 1988
- 26) Sonnenberg A, Janssen H, Hogervorst F, Calafat J and Hilgers J: A complex of glycoproteins Ic and IIa identified by a rat monoclonal antibody. *J Biol Chem* 262 : 10376-10383 1987
- 27) Yamakawa M and Imai Y: Complement activation in the follicular light zone of human lymphoid tissues. *Immunology* 76 : 378-384 1992
- 28) Yamakawa M, Karube Y, Seki K, Kato H, Takagi S and Imai Y: Complement activation in the germinal center of human Peyer's patches and appendices. *Dendritic Cells* 2 : 21-32 1993
- 29) MacLennan ICM, Johnson GD, Liu YJ and Gordon J: The heterogeneity of follicular reactions. *Res Immunol* 142 : 253-257 1991
- 30) MacLennan ICM, Liu YJ and Johnson GD: Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses. *Immunol Rev* 126 : 143-161 1992
- 31) Larson RS and Springer TA: Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* 114 : 181-217 1990
- 32) de Fougères AR and Springer TA: Intercel-

- lular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J Exp Med* 175 : 185-190 1992
- 33) Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M, Hasegawa A, Asa D and Brandley B: The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis^x oligosaccharide. *J Cell Biol* 117 : 895-902 1992
- 34) Staatz WD, Rajpara SM, Wayner EA, Carter WG and Santoro SA: The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg⁺⁺-dependent adhesion of platelets to collagen. *J Cell Biol* 108 : 1917-1924 1989
- 35) Asch AS, Liu I, Briccetti FM, Barnwell JW, Kwakye-Berko F, Dokun A, Goldberger J and Pernambuco M: Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. *Science* 262 : 1436-1440 1993
- 36) Asch AS, Silbiger S, Heimer E and Nachman RL: Thrombospondin sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding. *Biochem Biophys Res Commun* 182 : 1208-1217 1992
- 37) Pytela R, Pierschbacher MD, Ginsberg MH, Plow EF and Ruoslahti E: Platelet membrane glycoprotein II b/III a: member of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion receptors. *Science* 231 : 1559-1562 1986
- 38) Vicente V, Kostel PJ and Ruggeri ZM: Isolation and functional characterization of the von Willebrand factor-binding domain located between residues His¹-Arg²⁹³ of the α -chain of glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 263 : 18473-18479 1988
- 39) Smith JW and Cheresch DA: The Arg-Gly-Asp binding domain of the vitronectin receptor. *J Biol Chem* 263 : 18726-18731 1988
- 40) Petrasch S, Kosco M, Schmitz J, Wacker HH and Brittinger G: Follicular dendritic cells in non-Hodgkin-lymphoma express adhesion molecules complementary to ligands on neoplastic B-cells. *Br J Haematol* 82 : 695-700 1992