ラット各種臓器組織における 抗樹状細胞抗体が認識する抗原の分布

長谷恭子・井上博雅・安西裕一
福泉隆喜・安民鎬・内山長司

九州歯科大学口腔細菌学講座（主任：内山長司教授）

平成5年10月26日受理

The Distribution of an Antigen Recognized by Anti-Dendritic Cells in Rat Organ Tissues

Kyoko Hase, Hiromasa Inoue, Yuichi Anzai,
Takaki Fukuizumi, Min-Ho Ahn and Choji Uchiyama

Department of Oral Bacteriology (Chief: Prof. Choji Uchiyama)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Dendritic cells (DC) are a group of cells which are constantly expressing MHC class II antigen, that is essential to antigen presentation for initiating immune responses.

DC include many types of cells which are named separately for the reason of investigative processes and distribution, such as Langerhans cells, follicular dendritic cells, interdigitating cells, lymphoid dendritic cells, interstitial cells, veiled cells, indetermined dendritic cells and so on. Because these cells are very similar to each other, these cells are classified as a family of cells.

On the other hands, some differences were also found among these cells, and it is not clear whether the classification is suitable or not. Previously, we made a monoclonal antibody, KO 3, against rat DC in lymph nodes, and reported that KO 3-positive cells were distributed in several tissues.

In this paper, we examined the distribution of the cells reacting with KO 3, 1F119, which was the other type of antibody to DC in rat, and anti-MHC class II in rats, also studied the relation between the distribution of KO 3-positive cells in tissues and the molecular weight of KO 3-positive band in western blotting.

The results were as follows :

1. MHC class II-antigen appeared at the appropriate cells reacting with KO 3 in various tissues of rats.
2. The distribution of KO 3-positive cells in tissues was very similar to that of 1F119-positive cells, with the except of brain and bone marrow.
3. KO 3-positive band, in western blotting, appeared at 3 different parts equivalent for 28, 33, and 35 kDa in molecular weight in tissue extracts.

4. There were no DC subfamilies having specific KO3-positive band alone.

Key words : Dendritic cells / Antigen presenting cell / Rat

緒 言

樹状細胞 (Dendritic cell : DC) は、抗原情報の提示に必須である主要組織適合抗原複合体 MHC クラス II (Ia) 抗原を恒常的に発現し、免疫応答誘起に重要な役割を果たしている細胞群である。現在までに DC に分類される細胞群には、ランゲルハンス細胞 (Langerhans cell : LC), リンパ濾胞内樹状細胞 (Follicular dendritic cell : FDC), 胸腺髄質やリンパ節 T 細胞領域の相互連結性細胞 (Interdigitating cell : IDC), リンパ系器官樹状細胞 (Lymphoid dendritic cell : LDC), 非リンパ系器官の間質細胞 (Interstitial cell : ISC), 輸入リンパ管中のベール細胞 (Veiled cell : VC), 皮膚の未同定樹状細胞 (Indeterminated dendritic cell : IDDC) 等がある¹⁾。DC は、分布域や発見・同定のいきさつから異なる名称で呼ばれているが、種々の面では類似点が多いことから互いに関係の深い細胞集団であると考えられている。しかし、他方で個々の DC についての性状を調べてみると、必ずしも同一ではなく、相互の関連性については明らかにされていない。

著者らは、これまでにラット顎下リンパ節の樹状細胞に対するモノクローナル抗体 KO3 を作製し²⁾、いくつかの組織に KO3 陽性細胞が分布することを報告してきた³⁾。本論文では、ラット各臓器組織中における KO3 陽性細胞の分布を免疫組織学的、蛋白化学的に検索した。免疫組織学的分析では、KO3 と市販の抗樹状細胞抗体 (1F119) を用いて樹状細胞の局在部位を確認し、一方蛋白化学的分析では、KO3 の抗原物質が各臓器組織で異なる分子量パターンを示し、若干の興味ある知見を得たので報告する。

実験材料および方法

I. 実験材料

A. 実験動物

動物は 8 週齢の Wistar 系雄性ラット (九動) より購入し、九州歯科大学動物研究施設で十分に環境に順応させた後実験に供した。

B. 一次抗体

以下の抗体を一次抗体として使用し、蛋白化学的方法として Western Blot 法、免疫組織学的方法として間接

酵素抗体法を行った。

1. 抗樹状細胞抗体

本講座で作成したモノクローナル抗体 KO3²⁾、またラット胸腺、リンパ節、脾臓の樹状細胞を認識するモノクローナル抗体 (1F119 : Holland biotechnology 社) の 2 種類の抗樹状細胞抗体を使用した。

2. 抗ラット・マウス Ia 抗体

樹状細胞の表面マーカーの一つである Ia 抗原の発現を確認するため、ラット・マウスの Ia 抗原と特異的に反応するモノクローナル抗体 OX-3 (Serotec 社) を使用した。

C. 二次抗体

Western Blot 法および間接酵素抗体法では、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG および Ig 抗体 (Cappel 社) を二次抗体として使用した。

D. 発色基質

Western Blot 法では発色基質として 3, 3'-ジアミノベンチジン 4 塩酸塩 (DAB) 10 mg, イミダゾール 14 mg を 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 20 ml に溶解し、使用直前に 30% 過酸化水素水 4 μ l を加えて DAB 基質溶液として使用した。また間接酵素抗体法では DAB 2 mg, イミダゾール 7 mg を 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) 10 ml で溶解し、使用直前に最終濃度 0.05% になるように過酸化水素水を添加し使用した。

II. 実験方法

A. 試料の調製

ラットは、エーテル麻酔下で心臓穿刺により安楽死させた。直ちに、脳、耳、顎下リンパ節、胸腺、肺、食道、肝臓、小腸 (パイエル板)、脾臓、腎臓を摘出し、湿重量を測定して約 20 倍量の Lysis Buffer 中でホモジネイトした。なお、Lysis Buffer の組成は 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0), 150 mM 塩化ナトリウム, 0.02% アジ化ナトリウム, 100 μ g/ml ジチオスレイトール, 1% ノニデット P-40 である。また、脛骨に適量の Lysis Buffer を注入して骨髓細胞を取り出し、同様にホモジネイトした。以上のホモジネイト液を 4°C, 18,000 $\times$ g で 10 分間遠心し、その上清を可溶性画分として得た。なお、蛋白定量はプロテインアッセイキット (BIO-RAD 社) を用いて行った。

B. Western Blot 法

各臓器組織より調製した試料は, Laemmli (1970)⁴⁾の方法に基づいて10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後のゲルをメンブレンフィルター (Immobilon-P, Millipore 社) に電氣的に転写させ, 転写後フィルターは1% 脱脂粉乳加 TTBS, すなわち10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.8), 250 mM 塩化ナトリウム, 0.05% トゥイーン 20 で30分間ブロックした。続いてTTBSで1,000倍に希釈したKO3抗体と4℃で一晩反応させた。TTBSで3回洗浄後, フィルターは2,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGを加えて室温で40分間反応させた。再びTTBSで3回洗浄後, DAB 基質溶液を用いて発色させた。

C. 間接酵素抗体法

摘出したラットの各臓器組織の一部はリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) で軽く洗浄後, Compound (BRIGHT 社) に包埋し, クリオスタットを用いて厚さ6 μ mの凍結切片を作成し, 4℃アセトンで10分間固定した。また, 骨髓細胞は適量を6穴プレートに分注し, 4℃で一晩乾燥させた後3.7%ホルムアルデヒドで固定した。PBSで洗浄後, 内因性ペルオキシダーゼを除去するために, 0.03% 過酸化水素水加メタノールに

30分間浸漬し, 冷PBSで5分間の洗浄を3回行った。続いて室温で30分間ブロックエース (大日本製薬社) を用いてブロックキングし, 冷PBSで15分間の洗浄を3回行った。PBSで500倍に希釈したKO3, 1F119抗体あるいは100倍に希釈したOX3抗体と室温で1時間反応させた後, 冷PBSにて1時間洗浄した。次にPBSで200倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG, またはIg抗体に0.02% ウシ血清アルブミン, 1% ラット正常血清を加えて室温で1時間反応させた。冷PBSによる洗浄は4℃で2時間以上行ない, その後DAB 基質溶液と10分間反応させた。対比染色としてメチルグリーン核染色を行った。

結 果

I. 一次リンパ系器官

A. KO3の Western blotting

一次リンパ系器官, すなわち胸腺では35 kDa, 骨髓細胞では28, 35 kDaの分子量の蛋白質とそれぞれ反応していた (図1-A)。

B. 免疫組織染色

胸腺では, 被膜の続きである小葉間結合組織にKO3,

図1 一次リンパ系器官におけるKO3のWestern blot分析およびKO3陽性細胞の分布

A; Western blotting B; 免疫組織染色
B-1; 胸腺 (×4) B-2; 骨髓細胞 (×10)

図2 二次リンパ系器官における KO3 の Western blot 分析および KO3 陽性細胞の分布

A ; Western blotting B ; 免疫組織染色
B-1 ; 顎下リンパ節 (×10) B-2 ; 脾臓 (×4)

1F119陽性細胞とも集積していた (図1-B-1)。しかしこの部位での Ia 抗原の発現は極めて弱かった。また、骨髓細胞中に KO3陽性細胞が観察され (図1-B-2)、しかも Ia 抗原強陽性であった。しかし、1F119陽性細胞は観察されなかった。

II. 二次リンパ系器官

A. KO3の Western blotting

二次リンパ系器官、すなわち顎下リンパ節、脾臓では 35 kDa の分子量の蛋白質と反応していた (図2-A)。

B. 免疫組織染色

顎下リンパ節では辺縁洞から傍皮質領域に KO3, 1F119陽性細胞が分布しており (図2-B-1)、同じ部位に OX3陽性細胞が認められた。また、脾臓では動脈周囲リンパ組織鞘付近に KO3, 1F119, Ia 抗原陽性細胞が散在していたが、いずれも反応は弱かった (図2-B-2)。

III. その他の臓器組織

A. KO3の Western blotting

その他に肺、腎臓では顎下リンパ節と同様に 35 kDa の蛋白質と反応し、皮膚、肝臓では骨髓細胞と同じ 28, 35 kDa の蛋白質と反応していた。さらに食道は 28 kDa

のみで、パイエル板を含む小腸は 33 kDa の蛋白質と反応していた。なお、脳、心臓は検出されなかった (図3-A)。

B. 免疫組織染色

肝臓は肝細胞が全体的な染色性を示し、肝細胞中に KO3, 1F119陽性細胞が存在しているかどうかは強拡大でも判定が困難であった。その中で、KO3, 1F119陽性細胞ともに小葉間結合組織に集積しているのが明確に観察されたが、数は比較的少なかった (図3-B-1)。また、KO3, 1F119陽性細胞が観察された部位において Ia 抗原の発現は弱く、クーパー細胞が存在している類洞壁においても同様であった。

食道では管腔周囲にある粘膜固有層に KO3, 1F119陽性細胞が集積していた (図3-B-2)。KO3よりも1F119抗体の方が食道に存在する樹状細胞と若干強く反応した。また、同部位で Ia 抗原の発現も著しく強かった。

腎杯は腎実質から突出している腎乳頭の各先端に連結しており、尿の受け口となっている。この腎杯周囲の結合組織や腎洞の脂肪組織に KO3, 1F119陽性細胞は若干認められ、腎皮質、髓質部位には観察されなかった (図3-B-3)。

図3 その他の器官における KO3 の Western blot 分析および KO3 陽性細胞の分布

A ; Western blotting

B ; 免疫組織染色 B-1 ; 肝臓 (× 10) B-2 ; 食道 (× 10) B-3 ; 腎臓 (× 10) B-4 ; 心臓 (× 10)

心臓は Western blotting では測定できなかったが、左心室の心筋線維に沿って KO3, 1F119, Ia 抗原陽性細胞が多数観察された (図3-B-4)。

さらに今回データは示していないが、肺、皮膚 (耳介) においても KO3, 1F119, Ia 抗原陽性細胞が認められた。また、脳においても大脳髄質部位に少数の KO3 陽性細胞が認められたが、1F119, Ia 抗原陽性細胞は

観察できなかった。

考 察

DC に関する研究はマウスにおいて、組織学的、形態学的に早くから行われてきた⁵⁾。マウスリンパ節、脾臓の DC に特異的なモノクローナル抗体33D1は、Nussenzweig ら (1982)⁶⁾ によって初めて報告された。続い

表1 ラット各臓器組織におけるKO3を認識する抗原の分布

	胸腺	骨髄細胞	顎下リンパ節	脾臓	肺	小腸	皮膚(耳)	肝臓	食道	脳	心臓	腎臓
存在するDC群	LC IDC	(CD1a ⁺ cell)	LDC, IDDC LC, IDC FDC	LDC IDC FDC	LC	LDC FDC	LC, ISC	ISC	LC	unknown	ISC	ISC
KO3 抗原蛋白質 M.W.(KDa)	35	35, 28	35	35	35	33	35, 28	35, 28	28	ND	ND	35
KO3 ⁺ 細胞	+	+	+	±	+	±	+	+	+	±	+	+
1F119 ⁺ 細胞	+	—	+	±	+	±	+	+	+	—	+	+

LDC;Lymphoid dendritic cells, IDC;Interdigitating cells, LC;Langerhans cells, IDDC;Indeterminated dendritic cells, ISC;Interstitial cells. FDC;Follicular dendritic cells, +;存在, ±;非常に弱い, ND;検出不能

てKraalら(1986)⁷⁾は、マウスLC, VC, IDCを特異的に認識するモノクローナル抗体NLDC-145を作製し、リンパ系組織、非リンパ系組織におけるNLDC-145陽性細胞の分布を免疫組織学的方法で報告した。これら組織内の陽性細胞の分布は今回のラットの免疫組織染色の結果(KO3, 1F119陽性細胞の局在部位)と非常によく似ていた。しかし、KO3との反応性の違いも明らかとなった。KO3, 1F119陽性細胞はラット生体内に広く分布しており、恒常的にMHCクラスII抗原を発現していたが、NLDC-145はあくまでもLC, VC, IDCを特異的に認識するもので、それらの細胞が存在している脾臓、顎下リンパ節、パイエル板、胸腺、皮膚での反応は認められるが、それ以外の臓器組織では全く陰性であった。また、KO3に陽性であった骨髄と血中の前駆細胞ともNLDC-145は反応しなかった。

さらに、Kraalら(1986)⁷⁾は、免疫沈降とSDS-PAGEによって、顎下リンパ節より抽出したNLDC-145陽性抗原は145 kDaのシングルバンドで、非常に高分子量の蛋白質であることも示唆している。

今回の蛋白化学的解析の結果、KO3は各臓器組織で分子量の異なる、少なくとも3つの抗原蛋白質(28, 33, 35 kDa)と反応することが示された。

これらの分子量の違いは、各臓器組織に存在するDC群の種類の相違による可能性も考えられたが、表1に示

すように、KO3が認識する各々の分子量の抗原蛋白質と個々のDCは必ずしも対応していなかった。例えば、LCのみが存在する肺(35 kDa)と食道(28 kDa)では、明らかに分子量が異なっているし、また、LDC, FDCが存在する脾臓(35 kDa)、小腸(33 kDa)でも同様であった。すなわち、同じ分子量を示す臓器間に一貫性のあるDCは存在していなかった。

一方、mRNAがコードしている遺伝子から転写され、スプライシングを受けて成熟mRNAになる際、スプライシングの違いによって異なる蛋白質が合成される場合がある。これは、オルターナティブスプライシングといわれ、IgMとIgD、また膜型と分泌型のIgは共通の遺伝子から作られている。各臓器組織におけるKO3の抗原蛋白質の分子量の違いは、蛋白の合成成熟過程で生じたものなのか、あるいはもともとコードしている遺伝子自体が異なっていたのか現在のところ明らかではない。また、DCに関する分子生物学的研究は、現在のところ皆無であり、手掛かりとなる報告はない。

DCは、骨髄細胞に由来すると言われているが⁸⁾、単離することが非常に困難で、それらの成熟過程や分化の条件等は、まだ完全に特徴づけられていない。Cauxら(1992)⁹⁾は、*in vitro*の系でヒトにおいてTumor Necrosis Factor- α とGranulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factorの共同作用によって、造

血系前駆細胞から LC が分化してくることを示し、Reid ら (1992)¹⁰⁾ も同様な結果を報告した。また、Schuler ら (1985)¹¹⁾ は、マウスにおいて皮膚組織中から得られた LC を 2～3 日間培養すると、細胞内のバーベック顆粒は消失し、それと同時に最初発現していたマクロファージ抗原や、Fc レセプターなどの細胞表面マーカーも消失し、LDC と同程度もしくはそれ以上 T 細胞増殖刺激能が増大したことを示した。また、ウサギ足蹠に感作原を塗布したり、注入したりすると 2～3 時間後に LC は輸入リンパに移行し、そこでは、細胞膜のベールをより大きく伸ばしている VC が観察されている¹²⁾。これらの結果から、骨髄細胞→LC→VC→LDC という一連の成熟過程が推定される。今回の結果を、この過程にあてはめてみると、KO3 の抗原蛋白質の分子量は、骨髄細胞 (28, 35 kDa) →皮膚 (28, 35 kDa) →リンパ節、脾臓 (35 kDa) へと変化していた。また、骨髄細胞や皮膚と同じ 28, 35 kDa の分子量を示す臓器として肝臓が挙げられる。T 細胞が主に胸腺で分化してくることはよく知られているが¹³⁾、近年 T 細胞の胸腺外分化の場として、肝臓が注目され始め、一部で肝臓を骨髄や胸腺と同じ一次リンパ系器官とする見方もある¹⁴⁾。肝臓が免疫臓器として細胞分化の場としての役割を担うと考えるなら、KO3 が未分化な DC をも認識している可能性が推察される。また、市販の抗樹状細胞抗体 (1F119) は、骨髄細胞では反応が認められず、KO3 抗体が今後 DC の分化を研究する上で有用である可能性が示唆された。

DC は、遠心分離において他の細胞に比べて比重が低いという点から、単離、精製方法が確立されたが¹⁵⁾、実験に用いる動物種によって DC の性質、例えば付着性などは異なっており、同じように適用できるわけではない。特にラットに関する報告は少なく、不明な点が多い。各臓器に存在する DC について既に報告されている DC のなかにもヒト、ラット、マウス間で異なっている可能性もあり、まだ未確認の DC が存在している可能性も考えられ、今後さらに検討を必要とするものと思われる。

結 論

ラット DC に対するモノクローナル抗体を用いて、各臓器組織における DC の分布を蛋白化学的、免疫組織学的に検索し、以下の結論を得た (表 1)。

1. 抗樹状細胞抗体 (KO3, 1F119) 陽性細胞は MHC クラス II 陽性であり、正常ラット生体内に広く分

布していることを確認した。

2. 二種類の抗樹状細胞抗体 (KO3, 1F119) を用いて免疫組織学的検索を行った結果、脳、骨髄細胞を除く全ての組織で陽性細胞はほぼ同様な分布を示すことが明らかとなった。

3. 蛋白化学的検索の結果、KO3 が認識する抗原物質は異なる分子量の蛋白質 (28, 33, 35 kDa) と交叉反応した。

4. KO3 が認識する各々の分子量の抗原蛋白質と、個々の DC は必ずしも対応していなかった。

本論文の要旨の一部は平成 5 年 5 月 8 日第 53 回九州歯科学会総会、平成 5 年 10 月 12 日第 35 回日本歯科基礎医学会総会において発表した。

引用文献

- 1) Steinman, R. M.: The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 271–296, 1991.
- 2) 岡 知子, 井上博雅, 高井 寛, 内山長司: ラット顎下リンパ節樹状細胞の免疫組織化学的観察—新しいモノクローナル抗体 KO3—。 *歯基礎誌* 32: 238–245, 1990.
- 3) 指宿良朗: ラット各組織における樹状細胞とマクロファージの分布。 *九州歯会誌* 45 (4): 446–455, 1991.
- 4) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227: 680–685, 1970.
- 5) Hart, D. N. J. and Fabre, J. W.: Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J. Exp. Med.* 153: 347–361, 1981.
- 6) Nussenzweig, M. C., Steinman, R. M., Witmer, M. D. and Gutchinov, B.: A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells. *Proc. Natl. Sci. USA* 79: 161–165, 1982.
- 7) Kraal, G., Breel, M., Janse, M. and Bruin, G.: Langerhan's cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J. Immunol.* 133: 981–997, 1986.
- 8) Bowers, W. E. and Berkowitz, M. R.: Differentiation of dendritic cells in cultures of rat bone marrow cells. *J. Exp. Med.* 163: 872–883, 1986.
- 9) Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. and Banchereau, J.: GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360: 258–261, 1992.
- 10) Reid, C. D. L., Stackpoole, A., Meager, A. and Thkeroae, J.: Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

- and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD 34⁺ progenitors in human bone marrow. *J. Immunol.* 149 (8) : 2681 - 2688, 1992.
- 11) Schuler, G. and Steinman, R. M. : Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immune stimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* 161 : 526 - 546, 1985.
- 12) Knight, S. C. : Veiled cells—dendritic cells of the peripheral lymph. *Immunobiol.* 168 : 349 - 361, 1984.
- 13) 須田貴司 : 胸腺と T 細胞分化. T 細胞系の免疫学 (藤原 大美編). 中外医学社, 東京, 1993, 22 - 27.
- 14) 土田正則, 安保 徹 : 肝臓における T 細胞分化. *Med. Immunol.* 25 (3) : 201 - 208, 1993.
- 15) 稲葉カヨ : 抗原提示細胞. 免疫研究法ハンドブック (藤原 大美, 淀井淳司編). 中外医学社, 東京, 1992, 32 - 39.