

学 位 論 文 題 名

Differential Responsiveness of Langerhans
Cell Subsets of Varying Phenotypic States
in Normal Human Epidermis

(正常ヒト表皮ランゲルハンス細胞サブセットの生物学的反応性の検討)

学位論文内容の要旨

1. 目的

ランゲルハンス細胞は表皮に存在する骨髄由来の抗原提示細胞で、経皮的な抗原刺激による抗原特異的T細胞活性化において重要な役割を演じている。ランゲルハンス前駆細胞は血中に存在すると考えられており、真皮を介して表皮内へと移動したのち、抗原刺激にともない表皮から真皮、リンパ管を介して所属リンパ節へと移動することが明らかとなっているが、その過程において周辺の微小環境の変化に応じてフェノタイプおよびファンクションの特徴が変化することが知られている。例えば、表皮から分離したばかりのフレッシュなランゲルハンス細胞は、ナイーブな蛋白抗原に対するantigen processing活性は高いが、抗原提示能は強くないのに対し、培養ランゲルハンス細胞はclass II MHCの発現量が増加し、抗原提示能が高まり未感作T細胞に対する活性化能を獲得する。また、in vivoにおいてハプテンを塗付したマウス表皮内に、培養した場合と同様な活性化ランゲルハンス細胞が認められ、生体内においても同様の活性化状態をとりうることが報告されている。しかしながら、ヒトの表皮ランゲルハンス細胞についての検討は、ランゲルハンス細胞の単離が技術的に困難であり、いまだ十分にはなされていない。今回我々はフローサイトメトリーを用いて、ヒト表皮ランゲルハンス細胞のフェノタイプおよび活性化状態をシングルセルのレベルで検討した。

2. 方法

1. ヒト表皮細胞浮遊液の調製：正常人臀部から得られたケラトームバイオプシーをDispase (50 U/ml) で処理し、表皮を真皮からシート状に剥離した後、0.25% trypsinで37℃、10分間処理し表皮細胞浮遊液を調製した。

2. 細胞表面抗原の測定：表皮細胞を、HLA-DR、CD1a、CD1c、CD11c、FcγRII及びFcεRIに対するモノクローナル抗体及びコントロール抗体を用いて染色し、その発現量をフローサイトメトリーによって定量した。

3. 細胞内カルシウムの測定：細胞内カルシウムレベルはcalcium indicatorであるindo-1を用いてフローサイトメトリーにより測定した。indo-1はカルシウム濃度によりカルシウム結合型と非結合型の2つの型で存在し、350nmで励起されるとそれぞれ405nmと485nmの蛍光を発する。両波長の蛍光強度を同一の細胞について測定し、485nmの405nmに対する割合をindo-1 ratioとして表わすと、カルシウム濃度の上昇にともない405nmの蛍光強度が相対的に高まるので、カルシウム濃度の上昇をindo-1 ratioの減少として示すことができる。ランゲルハンス細胞を表皮細胞浮遊液から Histopaque を用いた密度遠沈でenrichし、indo-1のエステル型のindo-1AMと共に30℃、30分間インキュベーションしindo-1を細胞内へとりこんだ。ランゲルハンス細胞は抗HLA-DR抗体を用いて蛍光標識し、細胞内カルシウムレベルの測定と並行してHLA-DRの発現を定量した。

3. 結果

正常ヒト表皮細胞中に存在するランゲルハンス細胞について、HLA-DR抗原の発現を検討したところ、その発現量の違いによってDR^{Hi}とDR^{Lo}の2つのサブセットに分かれた。これら2つのランゲルハンス細胞サブセットをHLA-DRとともにCD1a、CD11b、CD11c、FcγRII、またはFcεRIと二重染色すると、DR^{Hi}サブセットはDR^{Lo}サブセットに比べCD11cの発現が有意に高く、また細胞のgranularityを表わすL90LS (cytoplasmic complexity) もより高値だった ($p \leq 0.03$)。また6例中2例のDR^{Hi}サブセットはCD11cを著しく強発現していた。IgEのhigh affinity Fc receptorであるFcεRIとの二重染色では、両サブセット間で有意な発現量の差は見られなかったが、うち1例のDR^{Hi}サブセットでFcεRIが強発現していた。他の細胞表面レセプターでは、DR^{Hi}とDR^{Lo}の両サブセット間に発現量の差はみられなかった。次に、これら表皮ランゲルハンス細胞サブセットの細胞内カルシウムレベルを比較したところ、DR^{Hi}サブセットのベースラインカルシウムがindo-1 ratio 36.4であったのに対し、DR^{Lo}サブセットは47.0とDR^{Hi}サブセットのカルシウムレベルが有意に高かった。更に、カルシウムイオノフォアのイオノマイシンを用いて両細胞を刺激したところ、DR^{Lo}サブセット内に著しく細胞内カルシウム濃度が上昇する集団 (Δ indo-1 ratio = 37.3) とあまりカルシウムレベルが変化しない集団 (Δ indo-1 ratio = 13.2) の2つのサブセットが存在することが明らかになった。一方、DR^{Hi}サブセットは最もイオノマイシンに対する反応性が低かった (Δ indo-1 ratio = 7.6)。以上のことより、正常ヒト表皮内にフェノタイプ及び活性化状態の異なったランゲルハンス細胞サブセットが存在することが明らかとなった。

4. 考察

ランゲルハンス細胞は表皮に存在する抗原提示細胞で、その分化あるいは活性化段階によってフェノタイプおよびファンクションの特徴が変化することが知られている。本研究によって正常ヒト表皮内にHLA-DRおよびCD11cの発現性が異なった2つのランゲルハンス細胞サブセットが存在することが明らかとなった。細胞の活性化状態と関連して、単球のCD11c発現性が変化することが報告されており、ランゲルハンス細胞においても同様の変化が起こっていることが予想される。事実、両サブセットの細胞内カルシウムを測定したところ、DR^{Hi},CD11c^{Hi}サブセットでベースラインのカルシウムレベルが有意に高かった。またDR^{Lo},CD11c^{Lo}サブセットはイオノマイシンに対する反応性によってさらに2つのサブセットに分かれた。細胞内カルシウムはセカンドメッセンジャーとして細胞刺激後のシグナルトランスダクションに関わっており、細胞刺激によりベースラインを含めてカルシウムレベルが変化することがT細胞を始めとした細胞で報告されている。また一方でカルシウムレベルの上昇にともなう細胞の分化が促進することが表皮角化細胞を用いた実験系で報告されており、本研究でみられたランゲルハンス細胞サブセットが*in vivo*における分化あるいは活性化状態と関連していることが強く予想される。

5. 結語

以上より、正常ヒト表皮内にフェノタイプおよびファンクションの特徴の異なったランゲルハンス細胞サブセットが存在することが示唆された。これらサブセットはランゲルハンス細胞の移動にともなう分化あるいは活性化において異なったステージにある細胞であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大河原 章
副 査 教 授 小野江 和 則
副 査 教 授 松 田 英 彦

学 位 論 文 題 名

Differential Responsiveness of Langerhans Cell Subsets of Varying Phenotypic States in Normal Human Epidermis

(正常ヒト表皮ランゲルハンス細胞サブセットの生物学的反応性の検討)

ランゲルハンス細胞は表皮に存在する骨髓由来の抗原提示細胞で、経皮的な抗原刺激による抗原特異的T細胞活性化において重要な役割を演じています。ランゲルハンス細胞は、血中から真皮を介して表皮内へと移動した後、抗原刺激にともない、表皮から真皮、リンパ節へと移動致しますが、その過程で周辺の変化に応じてphenotypeや機能の特徴が変化致します。しかしながら、このことはヒトの表皮ランゲルハンス細胞においては、未だ明かにはされておられません。

そこで申請者は、フローサイトメトリーを用いて、ヒト表皮ランゲルハンス細胞のphenotypeおよび活性化状態をsingle cell levelで検討致しました。

その結果、表皮ランゲルハンス細胞には、HLA-DR抗原の発現量の違いから、高く発現するグループと、発現が低いグループの両者が存在すること； HLA-DR高発現グループの中にはCD11cを著しく強く発現する細胞が存在すること； また両グループ（サブセット）間で、個々のランゲルハンス細胞の細胞内カルシウム濃度を比較検討したところ、高発現サブセット細胞では、低発現サブセット細胞に比べ、細胞内カルシウム濃度が有意に高いことが判明しました。

以上のことから、正常ヒト表皮内にはphenotypeおよび活性化状態の異なるランゲルハンス細胞が存在することが示唆されました。これらランゲルハンス細胞のサブセットの存在は、ランゲルハンス細胞の移動に伴う異なったステージにある細胞がin vivoにおいても存在することを強く示唆するものであります。

口頭発表にあたって、小野江教授から、1。subsetという言葉の使い方、2。ランゲルハンス細胞の同定法、3。他のリンパ系細胞の混入の有無、4。Fc ϵ R1 receptorの役割（発現の意味）について等、また松田教授からはランゲルハンス細胞の分布・局在に年齢差、性差は無いのか、更に皮膚採取部として臀部を選んだ理由、また大浦教授からは皮膚移植の際、移植皮膚の定着に伴って生じてくるランゲルハンス細胞の由来、機能等に関してご質問を受けましたが、申請者は妥当な解答をなしたと思います。

後日副査の小野江教授、松田教授から個別に諮問を受けそれぞれ合格と判定されました。よって本研究はヒト表皮ランゲルハンス細胞は単離が技術的に困難であったため、今まで in vivoでの分化の過程、更にはそれに伴う機能の違いが明かにされませんでした。

たが、本研究はその分野に始めて踏み込んだ貴重な研究であり、博士（医学）に値するものと判定されました。