

学 位 論 文 題 名

Immuno-electron microscopic study of PECAM-1 expression
on the lymphatic endothelium of human tongue

ヒト舌リンパ管内皮細胞における
PECAM-1 発現に関する免疫電子顕微鏡的研究

学位論文内容の要旨

血管系において白血球が血流中から組織内へ移動する際には、血管内皮細胞が発現する種々の白血球接着因子が重要な役割を担っている。これまでの研究から、この移動に際して血管内皮細胞は platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), および endothelial cell-selectin (ELAM-1) を発現することが知られている。

一方、リンパ管系は組織液や高分子蛋白質あるいは脂質などの吸収に関わるとともに、炎症時におけるリンパ球の移動、さらには癌の転移にも大きく関わっていることが知られている。しかしながら、脈管系におけるリンパ球の移動に関する研究は血管系については盛んに行われているものの、リンパ管系についてはほとんど行われていない。この大きな理由の1つは、組織切片におけるリンパ管の同定が困難であったことによるものである。

ところが近年、組織切片におけるリンパ管の同定法として 5'-nucleotidase-alkaline phosphatase (5'-Nase-ALPase) 酵素二重染色法、および desmosome 構成蛋白の1つである desmoplakin に対する抗体を用いた免疫組織化学的染色法が開発された。そこで本研究では、これらの染色法を用いてリンパ管を同定し、ヒト舌のリンパ管における白血球接着因子の発現を光学顕微鏡および透過電子顕微鏡を用いて検索した。

本研究では、材料として外科的に切除されたヒト正常舌を用いた。光学顕微鏡用にはクリオスタットを用いて厚さ 10 μ m の凍結連続切片を作製し、5'-Nase-ALPase 酵素二重染色法あるいは抗 desmoplakin 抗体を用いた免疫組織化学的染色法によってリンパ管の同定を行った。次に、その隣接切片に PECAM-1, ICAM-1 および ELAM-1 のそれぞれに対する特異抗体を用いて免疫染色を施し、リンパ管におけるこれら接着因子の発現を検索した。

電子顕微鏡用には厚さ 16 μm の凍結連続切片を作成し、2 枚の連続切片のうち 1 枚は抗 PECAM-1 抗体、もう 1 枚は抗 desmoplakin 抗体を一次抗体として用いた後、金粒子で標識された抗体を二次抗体として用いて免疫染色を施した。次いで、この 2 枚の連続切片をそれぞれエポキシ樹脂に包埋して準超薄切片を作成し、両者を比較することによって PECAM-1 を発現しているリンパ管を光学顕微鏡的に同定した後、通法に従って超薄切片を作成して、リンパ管における PECAM-1 の発現を透過電子顕微鏡により観察した。

光学顕微鏡による観察では、リンパ管は上皮直下とその周辺、ならびに粘膜固有層の中央部に分布しており、すべてのリンパ管が PECAM-1 を発現していることが明らかとなった。また、一部のリンパ管には ICAM-1 や ELAM-1 の発現も認められた。これは先に我々が行った報告、すなわち炎症の存在する組織におけるリンパ管は PECAM-1、ICAM-1、および ELAM-1 を発現するが、正常組織におけるリンパ管は PECAM-1 のみを発現し、ICAM-1 や ELAM-1 は発現しないという結果とは異なっている。このことは、舌のように常にある程度の外来刺激を受けている組織のリンパ管では、炎症の存在する組織ほど強くはないものの、正常組織であっても ICAM-1 や ELAM-1 を発現している可能性を示唆しているものと思われる。

一方、これら白血球接着因子の発現様式から、舌のリンパ管は大きく 3 つのタイプ、すなわち①PECAM-1、ICAM-1、ELAM-1 のすべてを発現するもの（タイプⅠ）、②PECAM-1 と ICAM-1 の 2 つを発現するもの（タイプⅡ）、および③PECAM-1 のみを発現するもの（タイプⅢ）の 3 タイプに分けられることが明らかとなった。また、タイプⅠのリンパ管はすべて上皮直下とその周辺に、タイプⅡとタイプⅢのリンパ管は粘膜固有層の中央部に認められた。このことは、起始部に近いリンパ管は PECAM-1、ICAM-1、ELAM-1 のすべての白血球接着因子を発現するが、リンパ管が集合するにつれてまず ELAM-1 の発現、次いで ICAM-1 の発現が減少する可能性を示唆するとともに、組織からリンパ管内へのリンパ球の移動は、リンパ管起始部でより活発に行われていることを意味しているのではないかと推測される。

以上の結果から、ヒト舌におけるリンパ管はすべて PECAM-1 を発現し、起始部に近いリンパ管では ICAM-1 や ELAM-1 の発現も認められることが明らかとなった。一方、リンパ管におけるこれら白血球接着因子の発現が、組織からリンパ管内へのリンパ球の移動に関与しているのであれば、その発現部位は血流中から組織内へとリンパ球が移動する血管系とは当然異なっているはずであると考えられる。そこで、次に、舌を含めたすべての組織のリンパ管が発現することが知られている PECAM-1 の発現の局在を免疫電顕により検索した。

抗 desmoplakin 抗体と抗 PECAM-1 抗体を用いてそれぞれ免疫染色を施した 2 枚の準超薄切片像の比較により PECAM-1 を発現していると同定されたリンパ管には、anchoring filament, overlapping junction, end-to-end junction, 菲薄で非連続的な基底膜など、リンパ管の微細構造学的特徴が観察された。また、血管内皮細胞における PECAM-1 の発現が管腔側の細胞膜表面のみに認められたのに対し、リンパ管内皮細胞における PECAM-1 の発現は管腔側と非管腔側の両者に認められた。このリンパ管内皮細胞の非管腔側における PECAM-1 の発現は、リンパ球が PECAM-1 の接着機能を介して組織からリンパ管内へと移動することに寄与していると思われる。一方、リンパ管内皮細胞の管腔側における PECAM-1 の発現は、組織からリンパ管内に移動した白血球が、リンパ管内皮細胞と接着することによって管腔内に留まり、リンパ管内に取り込まれた抗原に対応するためではないかと推測された。

なお、リンパ管内皮細胞の非管腔側における抗 PECAM-1 抗体に反応した金粒子の数は、血管内皮細胞の管腔側における金粒子の数に比べて明らかに少なかった。これは、血流中を流れている白血球が血流に逆って内皮細胞に接着しなければならない血管に比べて、流れの少ない組織内のリンパ球が内皮細胞に接着するリンパ管では、多くの接着因子を必要としないためであろうと推測された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 向 後 隆 男

副 査 教 授 吉 田 重 光

学 位 論 文 題 名

Immuno-electron microscopic study of PECAM-1 expression on the lymphatic endothelium of human tongue

ヒト舌リンパ管内皮細胞における

PECAM-1 発現に関する免疫電子顕微鏡的研究

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

本研究は、リンパ管における白血球接着因子の発現を免疫学的手法を用いて光学顕微鏡および透過電子顕微鏡で検索したものである。

材料として手術時に切除されたヒト舌の正常部分を用いた。光学顕微鏡用には厚さ10 μm の凍結連続切片を作製し、5'-nucleotidase-alkaline phosphatase (以下、5'-Nase-ALPase) 酵素二重染色法、あるいは抗desmoplakin抗体を用いた免疫組織化学的染色法を用いてリンパ管の同定を行った。次に、その隣接切片にplatelet endothelial cell adhesion molecule-1 (以下、PECAM-1)、intercellular adhesion molecule-1 (以下、ICAM-1)およびendothelial cell-selectin (以下、ELAM-1)に対する特異抗体を用いて免疫染色を施し、リンパ管におけるこれら接着因子の発現を検索した。

電子顕微鏡用には厚さ16 μm の凍結連続切片を作成し、2枚の連続切片のうち1枚は抗PECAM-1抗体、もう1枚は抗desmoplakin抗体を一次抗体として用いた後、金コロイド標識二次抗体を用いた免疫染色を施した。次いで、この2枚の連続切片をそれぞれエポキシ樹脂に包埋して準超薄切片を作成し、両者を比較することによってPECAM-1を発現しているリンパ管を光学顕微鏡的に同定した後、通法に従って超薄切片を作成して、リンパ管におけるPECAM-1の発現を透過電子顕微鏡により観察した。

光学顕微鏡による観察では、リンパ管は上皮直下とその周辺、ならびに粘膜固有層の中央部に分布しており、すべてのリンパ管がPECAM-1を発現していた。また、一部のリンパ管にはICAM-1やELAM-1の発現も認められた。さらにこれら白血球接着因子の発現様式から、舌のリンパ管は、PECAM-1、ICAM-1、ELAM-1のすべてを発現するタイプI、PECAM-1とICAM-1の2つを発現するタイプII、およびPECAM-1のみを発現するタイプ

IIIの3のタイプに分けられた。タイプIのリンパ管はすべて上皮直下とその周辺に、タイプIIとタイプIIIのリンパ管は粘膜固有層の中央部に認められた。このことは、起始部に近いリンパ管はPECAM-1、ICAM-1、ELAM-1のすべての白血球接着因子を発現するが、リンパ管が集合するにつれてまずELAM-1の発現、次いでICAM-1の発現が減少する可能性を示唆するとともに、組織からリンパ管内へのリンパ球の移動は、リンパ管起始部でより活発に行われていることを意味していると推測された。

次に、リンパ管におけるPECAM-1の発現の局在を免疫電顕により検索した。抗desmoplakin抗体と抗PECAM-1抗体を用いてそれぞれ免疫染色を施した2枚の準超薄切片像を比較することによりPECAM-1を発現していると同定されたリンパ管には、anchoring filament、overlapping junction、end-to-end junction、菲薄で非連続的な基底膜など、リンパ管の微細構造学的特徴が観察された。また、血管内皮細胞におけるPECAM-1の発現が管腔側の細胞膜表面のみに認められたのに対し、リンパ管内皮細胞におけるPECAM-1の発現は管腔側と非管腔側の両者に認められた。このリンパ管内皮細胞の非管腔側におけるPECAM-1の発現は、リンパ球がPECAM-1の接着機能を介して組織からリンパ管内へと移動することに寄与していると思われる。一方、リンパ管内皮細胞の管腔側におけるPECAM-1の発現は、組織からリンパ管内に移動した白血球が、リンパ管内皮細胞と接着することによって管腔内に留まり、リンパ管内に取り込まれた抗原に対応するためではないかと推測された。

なお、リンパ管内皮細胞の非管腔側における抗PECAM-1抗体に反応した金粒子の数は、血管内皮細胞の管腔側における金粒子の数に比べて明らかに少なかった。これは、血流中を流れている白血球が血流に逆って内皮細胞に接着しなければならない血管に比べて、流れの少ない組織内のリンパ球が内皮細胞に接着するリンパ管では、多くの接着因子を必要としないためであろうと推測された。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、これまで不明であったリンパ管における白血球接着因子の発現を明らかにしたことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。