

学位論文題名

# ヒト舌リンパ管内皮細胞における CCL21, TLR2

## ならびに TLR4の発現

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

Toll-like receptor (TLR) は、病原微生物に存在する特有の分子構造 (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) を認識する受容体である。このうち TLR2 はグラム陽性菌のリポタイコ酸, ペプチドグリカンなどを, TLR4 はグラム陰性菌のリポポリサッカライドを認識して種々のサイトカイン産生を誘導し, 自然免疫および獲得免疫に貢献すると考えられている。一方, 白血球特異的走化性を有するサイトカインは総称してケモカインと呼ばれるが, この中で cys-cys (C-C) chemokine ligand 21 (CCL21) は種々の2次リンパ組織において恒常的に発現し, その受容体である C-C chemokine receptor 7 (CCR7) 陽性の T 細胞および B 細胞の2次リンパ組織への遊走, ならびに組織末梢における CCR7 陽性抗原提示細胞のリンパ管への遊走と2次リンパ組織への移動に関与して獲得免疫に貢献すると考えられている。

従来, 2次リンパ組織の1つであるリンパ管は, 過剰な組織液の取り込み, 白血球の循環ならびに抗原提示細胞の輸送経路としての役割を果たす脈管であると考えられていた。しかし近年, 小腸におけるリンパ管内皮細胞が TLR2 および TLR4 を恒常的に発現することが明らかにされ, TLR と CCL21 の関連性について報告されたが, 口腔諸組織のリンパ管内皮細胞がそのような性質を有するのかは全くの不明である。

そこで本研究では, ①口腔組織リンパ管内皮細胞における TLR2 または TLR4 の発現, ならびに, ② TLR2 または TLR4 を介した, CCL21 による CCR7 陽性免疫細胞の遊走の可能性を検討することを目的とし, ヒト健常および炎症舌組織における CCL21, TLR2 ならびに TLR4 の発現を検索した。

#### 【材料と方法】

##### 1. 抗体の特異性の確認

抗 CCL21 抗体, 抗 TLR2 抗体ならびに抗 TLR4 抗体の特異性は, 近年の小腸組織を用いた検索によりすでに確認済みである。このため本研究では, リンパ管内皮細胞の特異的抗原である Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) に対する抗体の特異性について, 正常ヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞 (HMVEC-dLy) を用いた免疫染色で確認した。また, HMVEC-dLy における LYVE-1 の遺伝子発現を RT-PCR にて検索した。なお, ネガティブコントロールとして, 通常 LYVE-1 を発現しないことが明らかとなっている正常ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (HMVEC-d) を使用した。

##### 2. 培養リンパ管内皮細胞における TLR2 および TLR4 の発現

TLR2 および TLR4 の遺伝子発現に関しては RT-PCR を, また, 抗 TLR2 抗体および抗 TLR4 抗体の反応産物に関しては免疫染色を用い, HMVEC-dLy および HMVEC-d における検索を行った。

##### 3. 組織の免疫染色

ヒト健常および炎症舌組織を用い、凍結 5 連続組織切片を作製した。1 枚目の切片にはヘマトキシリン-エオジン染色 (H-E 染色) を施した。また、2 枚目の切片には、脈管を鑑別するための抗 platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) 抗体と、リンパ管を同定するための抗 LYVE-1 抗体による 2 重染色を行った。さらに 3 枚目以降の切片に対しては、CCL21, TLR2 ならびに TLR4 に対するそれぞれの特異抗体を用い免疫染色を行った。なお、H-E 染色により炎症性細胞浸潤が明らかに認められるものを炎症組織と定義した。

## 【結果】

### 1. 抗体の特異性の確認

HMVEC-dLy では抗 LYVE-1 抗体に反応陽性で、LYVE-1 遺伝子の発現が確認された。一方、HMVEC-d では抗 LYVE-1 抗体に反応陰性であり、LYVE-1 遺伝子の発現は認められなかった。

### 2. 培養リンパ管内皮細胞における TLR2 および TLR4 の発現

HMVEC-dLy では抗 TLR2 抗体および抗 TLR4 抗体に反応陽性で、TLR2 および TLR4 の遺伝子発現が認められた。一方、HMVEC-d では抗 TLR2 抗体ならびに抗 TLR4 抗体に反応陰性で、TLR2 の遺伝子発現は認められず、TLR4 の遺伝子発現が認められた。

### 3. 組織の免疫染色

H-E 染色で炎症性細胞浸潤が認められない健常舌組織においては、抗 PECAM-1 抗体および抗 LYVE-1 抗体により血管と区別された、結合組織乳頭部における毛細リンパ管と粘膜固有層における集合リンパ管のほとんどで、抗 CCL21 抗体、抗 TLR2 抗体ならびに抗 TLR4 抗体に対する反応産物が認められたが、血管におけるこれらの反応産物は全く認められなかった。一方、H-E 染色で炎症性細胞浸潤が認められた炎症舌組織においては、結合組織乳頭部および粘膜固有層におけるすべてのリンパ管ならびに血管で、抗 CCL21 抗体、抗 TLR2 抗体ならびに抗 TLR4 抗体に対する反応産物は全く認められなかった。

## 【考察】

### 1. 抗体の特異性の確認と培養リンパ管内皮細胞における TLR2 および TLR4 の発現

LYVE-1 は通常リンパ管内皮細胞が産生し、血管内皮細胞は産生しないタンパクである。本研究における RT-PCR および免疫染色を用いた検索から、LYVE-1 遺伝子の発現が認められる HMVEC-dLy では抗 LYVE-1 抗体に反応陽性で、LYVE-1 遺伝子の発現が認められない HMVEC-d では抗 LYVE-1 抗体に反応陰性であったことから、本研究で用いた抗 LYVE-1 抗体は、血管内皮細胞ではなくリンパ管内皮細胞に対して特異的に反応性を示すことが確認された。

また、HMVEC-dLy は TLR2 および TLR4 の遺伝子とタンパクを発現したことから、リンパ管内皮細胞は通常 TLR2 および TLR4 を発現することが明らかとなった。

### 2. 舌組織における CCL21, TLR2 ならびに TLR4 の発現について

健常舌組織微小循環系では、血管ではなくリンパ管が CCL21 を優位に発現することが確認され、CCR7 陽性免疫細胞のリンパ管への遊走に貢献する可能性が考えられた。また、TLR2 および TLR4 に関しても血管ではなくリンパ管が、これらの発現に対して優位性を示したことから、小腸と同様に舌においてもリンパ管内皮細胞が PAMPs の認識機構を有することが明らかとなった。さらに、TLR2 および TLR4 陽性リンパ管が CCL21 を同時発現したことから、TLR2 または TLR4 に対する種々のリガンド結合が CCL21 の産生を誘導する可能性が推測された。

一方、炎症舌組織微小循環系では、リンパ管における CCL21, TLR2 ならびに TLR4 の発現が認められなかったことから、①健常時に有する CCL21 と CCR7 との相互作用の消失あるいは減少の可能性、ならびに②TLR2 および TLR4 を介した PAMPs の認識機構の消失あるいはその能力低下の可能性が推測された。さらに、健常時の CCL21, TLR2 および TLR4 のリンパ管における同時発現が、炎症時には同時

消失していたことから、健常状態でのリンパ管における CCL21 の恒常的発現に、TLR2 または TLR4 が関与する可能性が推測された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政  
副 査 教 授 土 門 卓 文  
副 査 教 授 柴 田 健 一 郎

学 位 論 文 題 名

## ヒト舌リンパ管内皮細胞における CCL21, TLR2 ならびに TLR4の発現

審査は、審査委員全員の出席の下に口頭試問の形式により行われた。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試問を行った。審査論文の概要は以下の通りである。

Toll-like receptor (TLR) は病原微生物に存在する特有の分子構造 (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) を認識して、種々のサイトカイン産生を誘導する受容体である。一方、白血球特異的走化性サイトカインの1つである cys-cys (C-C) chemokine ligand 21 (CCL21) は、種々の2次リンパ組織において恒常的に発現し、その受容体である C-C chemokine receptor 7 (CCR7) 陽性の免疫細胞の2次リンパ組織への遊走に貢献すると考えられている。

近年、小腸におけるリンパ管内皮細胞が TLR2 および TLR4 を恒常的に発現することが明らかにされ、TLR と CCL21 の関連性について報告されたが、口腔諸組織のリンパ管内皮細胞がそのような性質を有するのことは全くの不明である。そこで本研究では、①口腔組織リンパ管内皮細胞における TLR2 または TLR4 の発現、ならびに、②TLR2 または TLR4 を介した、CCL21 による CCR7 陽性免疫細胞の遊走の可能性を検討することを目的とし、ヒト健常および炎症舌組織における CCL21、TLR2 ならびに TLR4 の発現を検索した。

抗 CCL21、TLR2、TLR4 抗体の特異性は、近年の小腸組織を用いた検索により確認済みであるため、本研究ではリンパ管内皮細胞の特異的抗原である Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) に対する抗体の特異性を確認するとともに、培養細胞における LYVE-1、TLR2 ならびに TLR4 の発現の検索を目的として、正常ヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞 (HMVEC-dLy) と正常ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (HMVEC-d) を用い、RT-PCR ならびに免疫染色を行った。

ついで、ヒト健常および炎症舌組織を用い、凍結 5 連続組織切片を作製した。1 枚目の切片にはヘマトキシリン-エオジン染色 (H-E 染色) を施した。また、2 枚目の切片には、脈管を鑑別するための抗 platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) 抗体と、リンパ管を同定するための抗 LYVE-1 抗体による 2 重染色を行った。さらに 3 枚目以降の切片に対しては、抗 CCL21、TLR2、TLR4 抗体を用い免疫染色を行った。なお、H-E 染色により炎症性細胞浸潤が明らかに認められるものを炎症組織

と定義した。

培養細胞を用いた検索では、HMVEC-dLy においては抗 LYVE-1、TLR2、TLR4 抗体にすべて反応陽性で、これらの遺伝子発現が確認された。一方、HMVEC-d では抗 LYVE-1、TLR2、TLR4 抗体にすべて反応陰性であり、LYVE-1 および TLR2 の遺伝子発現は認められず、TLR4 の遺伝子発現が認められた。このことから、本研究で用いた抗 LYVE-1 抗体は、血管内皮細胞ではなくリンパ管内皮細胞に対して特異的に反応を示し、リンパ管内皮細胞は通常 TLR2 および TLR4 を発現することが確認された。

健常舌組織においては、抗 PECAM-1 抗体および抗 LYVE-1 抗体により血管と区別された、結合組織乳頭部における毛細リンパ管と粘膜固有層における集合リンパ管のほとんどで、抗 CCL21、TLR2、TLR4 抗体に対する反応産物が認められたが、血管におけるこれらの反応産物は全く認められなかった。一方、炎症舌組織においては、結合組織乳頭部および粘膜固有層におけるすべてのリンパ管ならびに血管で、抗 CCL21、TLR2、TLR4 抗体に対する反応産物は全く認められなかった。以上のことから、健常舌組織微小循環系では、血管ではなくリンパ管が CCL21 を優位に発現することが確認され、CCR7 陽性免疫細胞のリンパ管への遊走に貢献する可能性が考えられた。また、TLR2 および TLR4 に関しても血管ではなくリンパ管が、これらの発現に対して優位性を示したことから、小腸と同様に舌においてもリンパ管内皮細胞が PAMPs の認識機構を有することが明らかとなった。さらに、TLR2 および TLR4 陽性リンパ管が CCL21 を同時発現したことから、TLR2 または TLR4 に対する種々のリガンド結合が CCL21 の産生を誘導する可能性が推測された。一方、炎症舌組織微小循環系では、リンパ管における CCL21、TLR2 ならびに TLR4 の発現が認められなかったことから、①健常時に有する CCL21 と CCR7 との相互作用の消失あるいは減少の可能性、ならびに②TLR2 および TLR4 を介した PAMPs の認識機構の消失あるいはその能力低下の可能性が推測された。さらに、健常時の CCL21、TLR2 および TLR4 のリンパ管における同時発現が、炎症時には同時消失していたことから、健常状態でのリンパ管における CCL21 の恒常的発現に、TLR2 または TLR4 が関与する可能性が推測された。

論文審査にあたって、論文申請者による研究要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について口頭試問を行った。

主な質問事項は、①自然免疫と獲得免疫の概要、②TLR と免疫応答の関連、③TLR と CCL21 との関係、④炎症の TLR ならびに CCL21 への影響、⑤悪性腫瘍の TLR ならびに CCL21 への影響等であった。

これらの質問に対して申請者から適切かつ明快な回答、説明が得られ、研究の立案と遂行、結果の収集とその評価について申請者が十分な能力を有していることが確認された。本研究は、口腔組織リンパ管 TLR の発現、ならびに、TLR を介した CCL21 による CCR7 陽性免疫細胞の遊走の可能性を示したものであり、その内容が高く評価された。申請者は、関連分野にも幅広い学識を有していると認められ、さらに発展的研究へのモチベーションも高く将来性についても評価された。本研究業績は免疫系のみならず関連領域にも寄与すること大であり、博士（歯学）の学位に値するものと認められた。