

## 第一章 樹状細胞分離方法確立および細胞表面分子発現解析

### 序

樹状細胞は研究に必要十分量の細胞を調製するのが困難であったことから、その機能や分化などについて長年明らかではなかった。しかしながら、1990年代の初めに *in vitro* における前駆細胞からの分化誘導系が確立されたことにより、研究は飛躍的に進むこととなった。

マウスの樹状細胞は骨髄や末梢血中の前駆細胞を GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) 存在下で培養することにより増殖分化誘導が可能であるが、この条件で誘導される樹状細胞はマクロファージや顆粒球と同じコロニーから出現することから、骨髄系樹状細胞であると考えられている(63)。これに対して、胸腺前駆細胞を TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-3、IL-7、SCF (c-kit リガンド) の5種類のサイトカインの存在下で培養すると、増殖を経た後に CD11c、DEC-205、CD80、CD86 陽性の樹状細胞が誘導されることが報告されており、この培養系で誘導される樹状細胞はリンパ球系として扱われている。

このような *in vitro* 分化誘導系の開発により、異なる前駆細胞からの樹状細胞の分化とその機能に関して飛躍的に研究が進んだ。しかしながら、脾臓以外の組織特有の樹状細胞についてはその機能について未解明な点が多く残されている。組織内に存在する樹状細胞はその組織特有なサイトカイン環境などによって成熟を受けて組織ごとに異なる機能を与えられていると考えられる。本研究では、パイエル板における免

疫応答誘導能の特異性に樹状細胞が大きな寄与をしていると考え、その性質を調べることを目的としている。したがって、可能な限り生体内と近い状態で樹状細胞を精製する必要がある。

そこで第一章では、初めにマウスパイエル板および脾臓樹状細胞とその細胞群である CD11b<sup>+</sup> 樹状細胞および CD8α<sup>+</sup> 樹状細胞を高純度に精製する方法を検討した。まず、樹状細胞の付着性を利用した Steinman の方法により CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> 細胞の濃縮を試みた。次に、密度勾配遠心法と磁気ビーズを結合させた抗体で細胞を染色して洗浄した後、専用の磁石に固定したカラムを利用して目的の細胞を分離する MACS 法による濃縮を試みた。最後にセルソーター FACS Vantage を用いた樹状細胞の精製を試みた。

そしてさらに、パイエル板樹状細胞の細胞表面分子の発現における特異性を調べた。パイエル板樹状細胞の細胞表面分子の発現について解析し、その成熟度合いについて脾臓と比較した。また、パイエル板樹状細胞中の各細胞群の割合、各細胞群の成熟度合いについても検討した。

## 材料および方法

### 動物

BALB/c マウスは日本クレア（東京）より購入した。

### 培地

RPMI1640（日水製薬、東京）に 100 U/ml のペニシリン（明治製菓、東京）、100  $\mu\text{g/ml}$  のストレプトマイシン（萬有製薬、東京）、 $5 \times 10^{-5}$  M の 2-メルカプトエタノール（東京化成工業、東京）、2%炭酸水素ナトリウム（和光純薬、大阪）、0.03%グルタミン（和光純薬）を加えたものを使用した（以下この培地を RPMI と略す）。また、必要に応じて牛胎児血清 (fetal calf serum; FCS, Life Technologies, Gaithersburg, MD あるいは Sigma, St Louis, MO) を添加したものを使用した。

### パイエル板および脾臓細胞の調製

マウスパイエル板および脾臓をそれぞれ無菌的に摘出し、1 mg/ml のコラゲナーゼ (Type I, SIGMA, St Louis, MO) および 10% の FCS を含む RPMI 溶液中、37°C で 20-30 分間攪拌し、上部懸濁液を得た。下部懸濁液には同様に新たな溶液を加え、この操作を計 3-4 回行った。回収した上部懸濁液は RPMI で洗浄し、RPMI に浮遊した細胞懸濁液を得た。

### フローサイトメトリー

樹状細胞 (CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>) の純度検定には、FITC 標識抗

CD11c mAb (ATCC から購入したハイブリドーマを腹水化し Protein G カラムにて精製後、標準的な方法で FITC 標識した) および PE 標識抗 CD45R/B220 mAb RA3-6B2 (BD PharMingen) を用いて染色した。または、まずビオチン化抗 CD11c mAb (ATCC から購入したハイブリドーマを腹水化し Protein G カラムにて精製後、標準的な方法でビオチン化した) および FITC 標識抗 CD45R/B220 mAb RA3-6B2 (BD PharMingen)、その後、ストレプトアビジン結合 PE を用いて染色した。また、分離した細胞に含まれる CD11b および Thy-1.2 陽性細胞の割合を解析するために、PE 標識抗 CD11b mAb M1/70 (Caltag, Burlingame, CA) および PE 標識抗 Thy-1.2 mAb 30-H12 (BD PharMingen) を用いて染色した。また、樹状細胞の各細胞表面分子の解析には、ビオチン化抗 I-A<sup>d</sup> mAb M5 (ATCC から購入したハイブリドーマを腹水化し Protein G カラムにて精製後、標準的な方法でビオチン化した)、PE 標識抗 CD8 $\alpha$  mAb 53-6.7 (BD PharMingen)、ビオチン化標識抗 CD80 mAb 16-10A1 (BD PharMingen)、ビオチン化抗 CD86 mAb GL1 (BD PharMingen)、PE 標識抗 CD4 mAb H129.19 (BD PharMingen)、ビオチン化抗 CD40 mAb 3/23 (BD PharMingen)、ビオチン化抗 CD44 mAb IM7 (BD PharMingen)、抗 DEC-205 NLDC-145 (Cedarlane, Ontario, Canada) を用いて染色し、ビオチン化抗体で染色したものについては、さらにストレプトアビジン結合 PE、抗 DEC-205 については PE 標識抗ラット IgG (BD PharMingen) をそれぞれ用いて染色した。続いて、ビオチン化抗 CD11c mAb および FITC 標識抗 CD45R/B220 mAb で染色し、ストレプト

アビジン結合 CyChrome (Life Technologies)で染色した。なお、各染色ステップ間は洗浄を行い、染色および洗浄には 1% FCS および 0.1% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 (PBS) (日水製薬) を用いた。

#### 細胞接着法による樹状細胞の濃縮

BSA 溶液は、186 ml PBS、29 ml 1N 水酸化ナトリウム、65 ml 蒸留水を混合した溶液に 106 g のウシ血清アルブミン (BSA) を添加して調製した。脾臓細胞を調製して BSA 溶液にマウス 1 匹の脾臓当たり 1 ml の割合で懸濁し、4°C の RPMI1640 を重層した。4°C, 9500 g, 15 分間遠心して得られた RPMI と BSA 溶液の中間の樹状細胞濃縮層を分離し、細胞を RPMI で洗浄した。次に細胞を  $1 \times 10^7$  cells/ml になるように 5% FCS を含む RPMI で懸濁し、60 mm dish に播種した。37°C で 90 分間インキュベートして樹状細胞を付着させた後、上清を捨てることによって浮遊性の細胞を取り除いた。樹状細胞が優位になるまでインキュベートと洗浄の操作を繰り返し、あらかじめ 37°C に暖めておいた RPMI を添加して 12-20 時間インキュベートした。これにより剥離してきた樹状細胞を回収した。

#### 密度勾配遠心法による樹状細胞の濃縮

Percoll (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いた密度勾配遠心法は、Percoll と PBS(-) を 9:1 で混合した溶液を 100% Percoll 溶液とし、その後の希釈には RPMI1640 を用いた。細胞を 35-60% の Percoll 溶液に懸濁し、RPMI1640

を重層した。15°C, 2500 rpm, 20 分間遠心して得られた RPMI と Percoll 溶液の中間の樹状細胞濃縮層を分離し、RPMI で洗淨した。

OptiPrep (Life Technologies, Gaithersburg, MD) を用いた密度勾配遠心法は、HBSS を用いて希釈した OptiPrep 溶液 4ml に細胞を懸濁し、緩衝液 (0.88% 塩化ナトリウム、1 mM EDTA、10 mM HEPES、0.5% BSA) で希釈した OptiPrep 溶液 4ml を重層し、さらに HBSS 1 ml を重層して 20°C, 600 g, 15 分間遠心して得られた HBSS と中間層との間に得られる樹状細胞濃縮層を分離し、RPMI で洗淨した。

磁気細胞分離システム (Magnetic Cell Sorting and Separation of Biomolecules) を用いた樹状細胞の濃縮

CD11c<sup>+</sup> 細胞をマイクロビーズ結合抗マウス CD11c 抗体 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) および MACS LS<sup>+</sup> 分離カラム (Miltenyi Biotec) を用いて分離した。B220<sup>+</sup> 細胞や Thy-1<sup>+</sup> 細胞を除去する場合は、あらかじめ、MACS Multisort kit (Miltenyi Biotec) を用いてその陰性細胞を分離した。すなわち、 $4 \times 10^7$  個あたり、100 倍希釈した FITC 標識抗マウス CD45R/B220 mAb RA3-6B2 (BD PharMingen) および FITC 標識抗マウス Thy1.2 mAb 30-H12 (BD PharMingen) を 1 ml 添加し、15 分間、4°C で静置した。0.5% BSA と 2 mM EDTA を含む PBS (以下 MACS 緩衝液) で洗淨後、Multisort 抗 FITC マイクロビーズを  $1 \times 10^7$  個あたり 10  $\mu$ l 加え、15 分間、4°C で静置した。MACS 緩衝液で洗淨後、MACS LS<sup>+</sup> 分離カラムに細胞懸濁液を添加し、

B220 陰性かつ Thy1.2 陰性細胞を選択的に回収した。その細胞懸濁液に Multisort release reagent を 20  $\mu$ l 加え、10 分間、4°C で静置し、マイクロビーズを切断した。さらに洗浄後、細胞  $1 \times 10^7$  個あたり Multisort stop reagent を 30  $\mu$ l とマイクロビーズ結合抗マウス CD11c 抗体を 10  $\mu$ l 加え、15 分間、4°C で静置した。同様に洗浄後、MACS LS<sup>+</sup> 分離カラムを用いて、CD11c 陽性細胞を選択的に回収した。

#### FACS Vantage を用いた樹状細胞とその細胞群の分離

CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> 樹状細胞を分離する場合は、まず、前述の方法でパイエル板および脾臓細胞を調製した後、非特異的結合を防ぐ目的で抗マウス CD16/CD32 mAb 2.4G2 (ハイブリドーマを腹水化し Protein G カラムにて精製した) を反応させ、ビオチン化抗 CD11c mAb N418 (ハイブリドーマを腹水化し Protein G カラムにて精製し、標準的な方法でビオチン化した) および FITC 標識抗 CD45R/B220 mAb RA3-6B2 (BD PharMingen)、続いてストレプトアビジン標識 PE (BD PharMingen) を用いて染色し、FACS Vantage (BD Immunocytometries) を用いて蛍光強度によりセルソートすることにより精製した。

CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> および CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>/CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> 樹状細胞を分離する場合は、パイエル板および樹状細胞に抗マウス CD16/CD32 mAb 2.4G2 を反応させ、ビオチン化抗 CD11c mAb、FITC 標識抗 CD45R/B220 mAb (BD PharMingen)、PE 標識抗 CD11b mAb M1/70 (Caltag) または PE 標識抗 CD8 $\alpha$  mAb 53-6.7 (BD PharMingen)、続いてストレプトアビ

ジン標識 CyChrome (BD PharMingen) を用いて染色し、  
FACS Vantage (BD Immunocytometries)を用いて蛍光強度に  
よりセルソートすることにより精製した。



## 結果

### 樹状細胞分離方法確立

コラゲナーゼ溶液を用いて脾臓細胞を調製し、フローサイトメトリーにより解析した結果、全血球系細胞中の CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> 細胞の割合は通常 0.5-2.0%であった (Fig.1-1)。

そこでまず、Fig.1-2 に示したように、BSA 溶液を用いた密度勾配遠心法により樹状細胞を濃縮した後、細胞を FCS を添加した培地を用いてプラスチックプレートに播種すると樹状細胞が一度付着し、その後 FCS 無添加培地に交換すると 10 数時間後に剥がれてくるという性質を利用した Steinman の方法により CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> 細胞の濃縮を試みた。その結果、約 73%の純度が得られたが、B220<sup>+</sup> 細胞が約 19% 残存していた (Fig.1-3)。

次に、Fig. 1-4 (A) に示すように、パーコール溶液を用いた密度勾配遠心法によりまず CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> 細胞を濃縮した後、細胞に磁気ビーズ結合抗 CD11c<sup>+</sup> 抗体を反応させ、専用の磁石に固定したカラムを利用して CD11c<sup>+</sup> 細胞を分離する MACS 法による濃縮を試みた。その結果、約 81%の純度が得られたが、B220<sup>+</sup> 細胞が約 12%残存していた (Fig.1-5)。次に、Fig. 1-4 (B) に示すように、MACS による CD11c<sup>+</sup> のポジティブセレクションを行う前に、MACS MultiSort kit を用いて B220<sup>+</sup> 細胞を除去することを試みた結果、純度の向上は見られず、依然として約 5%の B220<sup>+</sup> 細胞、約 12%の Thy-1<sup>+</sup> 細胞、CD11b<sup>+</sup> 細胞の混入が認められた (Fig.1-6)。

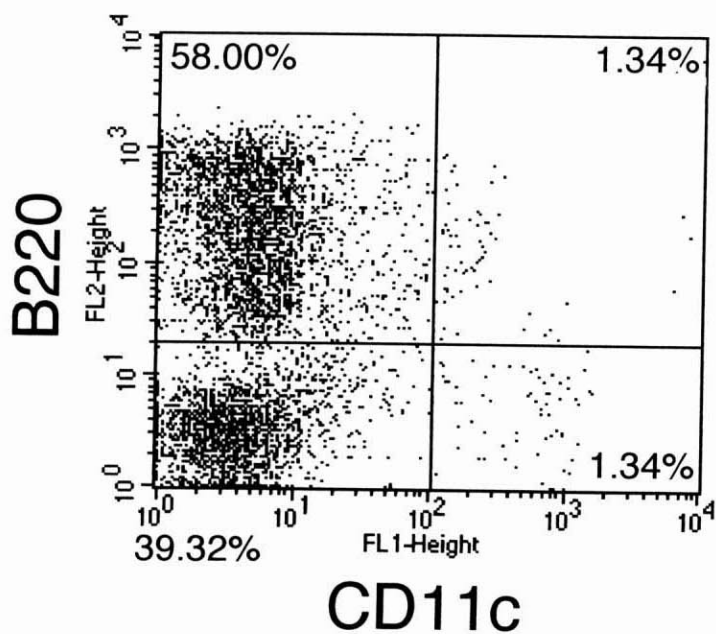


Fig. 1-1. Percentage of CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> cells in collagenase-treated whole splenocytes.

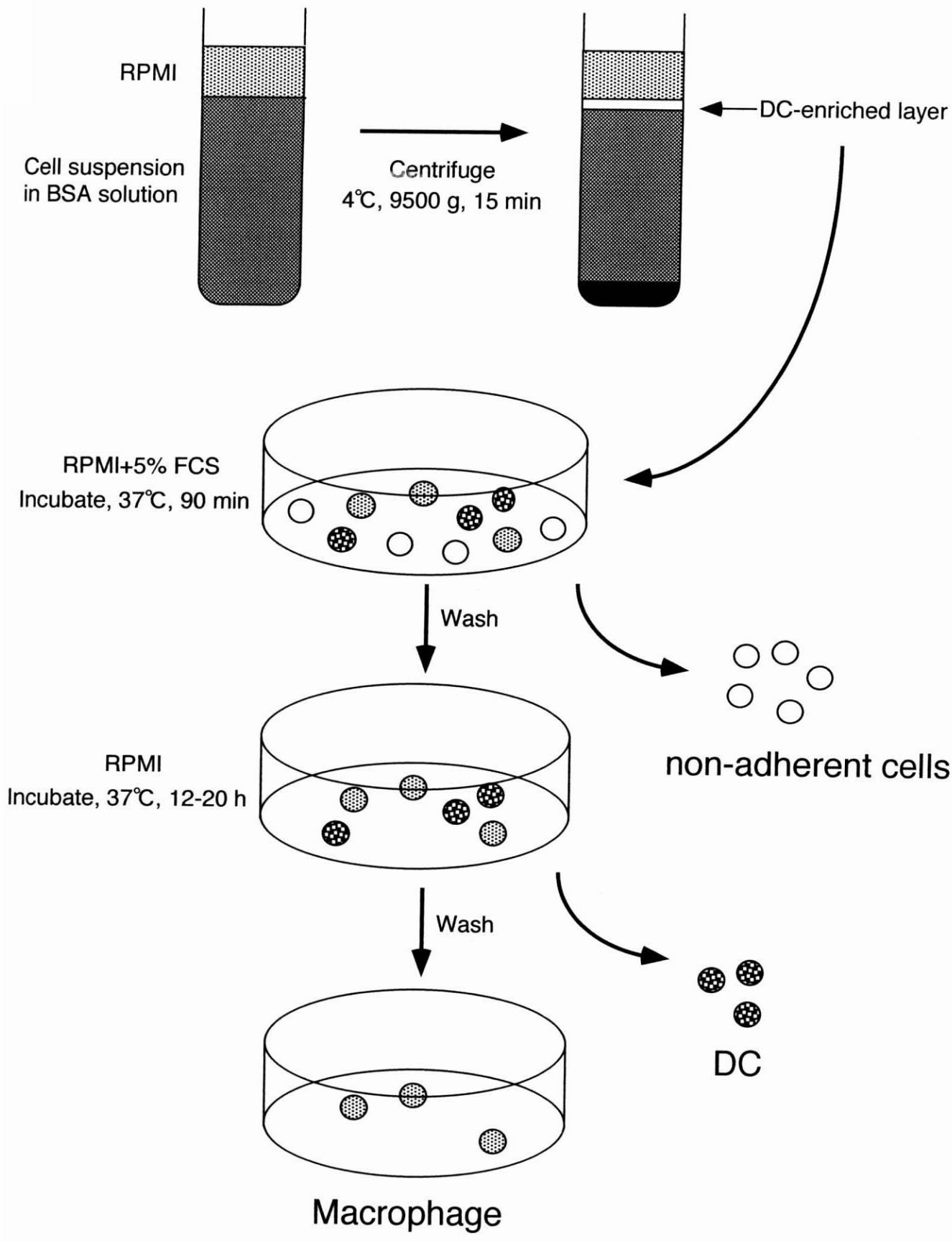
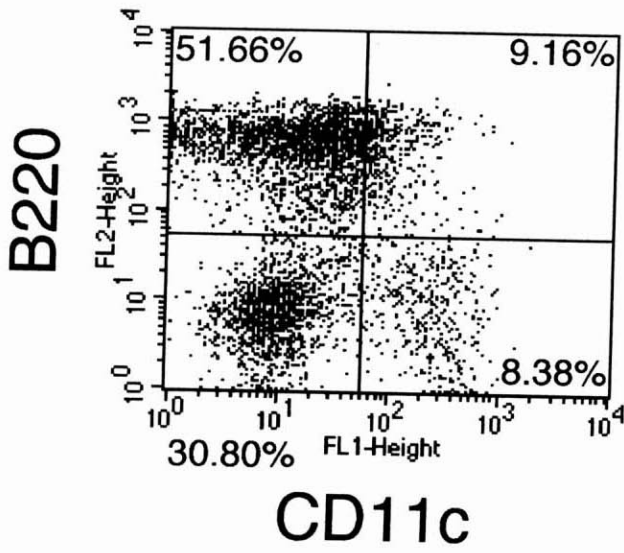


Fig. 1-2. The scheme of Steinman's method.

Isolated cells using dense BSA gradient



DC-enriched cells after plastic adherence

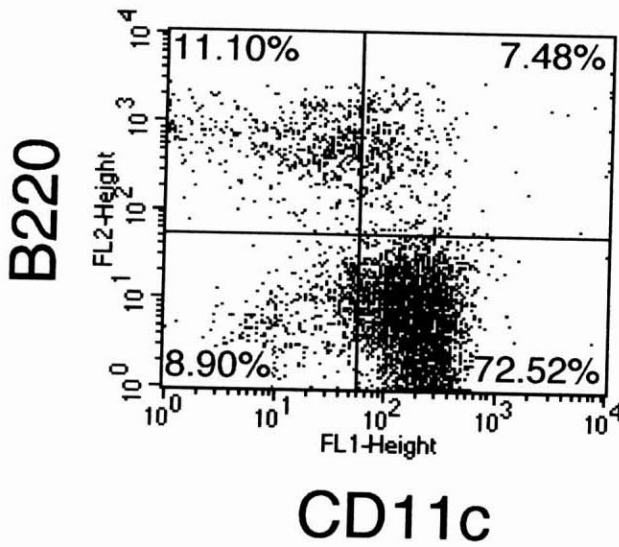


Fig. 1-3. Isolated DCs by Steinman's method.

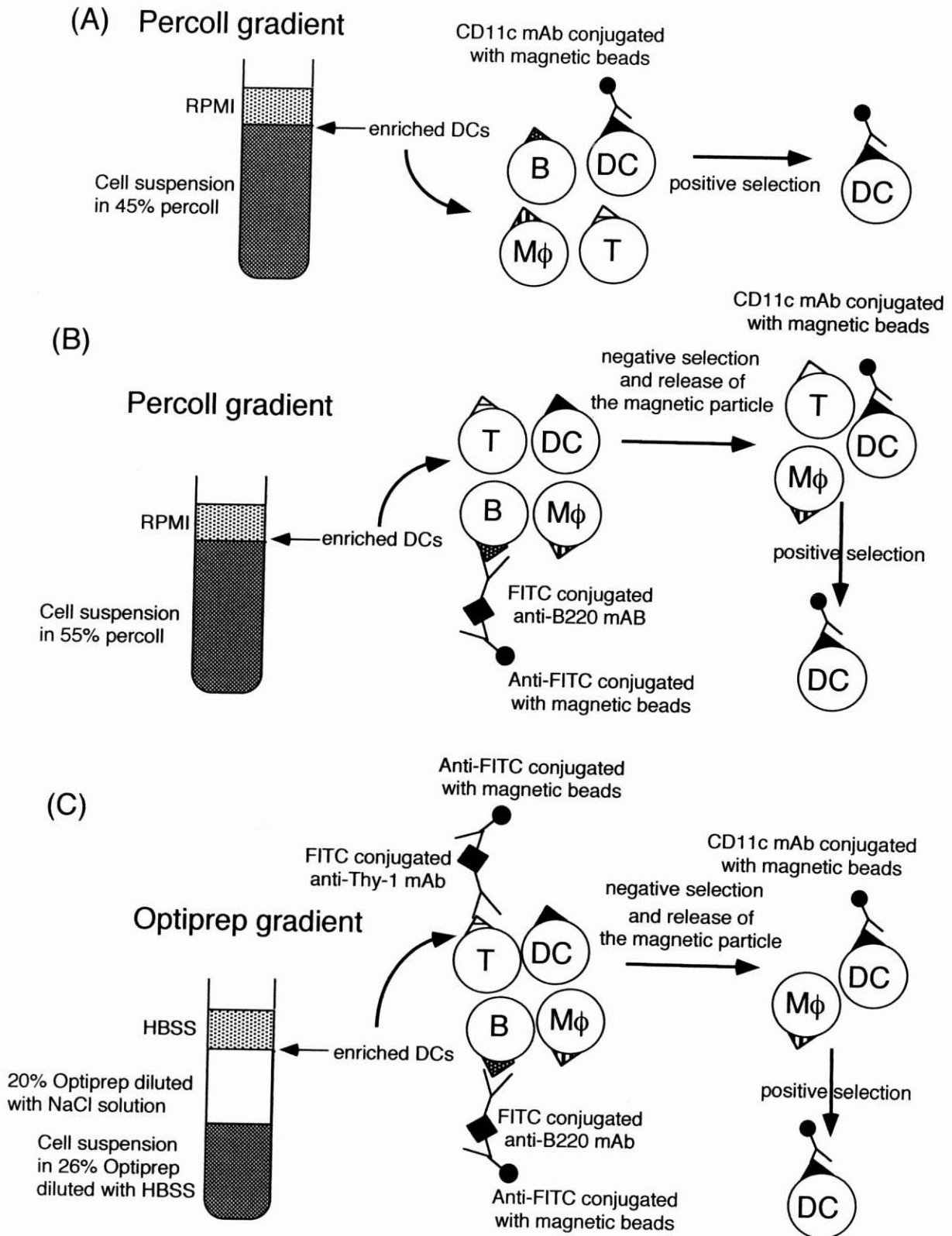
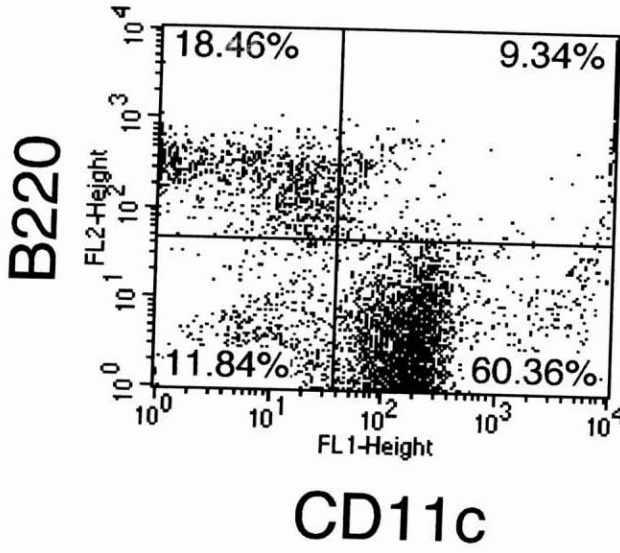


Fig. 1-4. Enrichment of DCs using various methods.

Isolated cells using percoll gradient



Enriched DCs by MACS

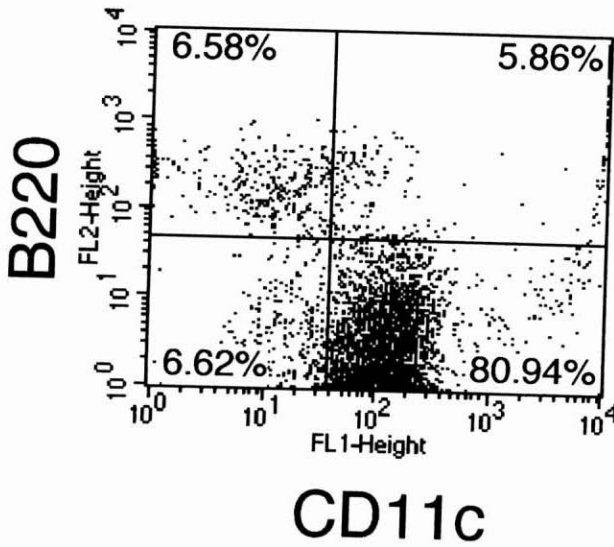
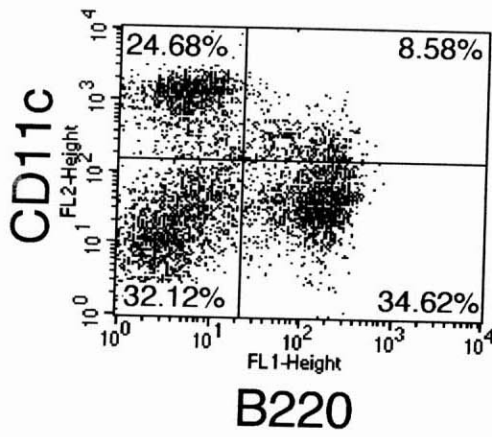
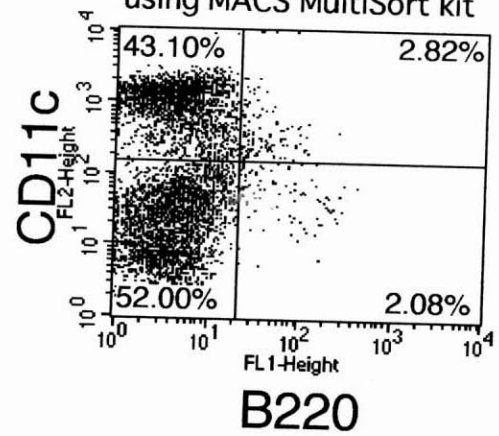


Fig. 1-5. Enriched DCs by percoll gradient and MACS.

A) Isolated cells using percoll gradient



B) B220<sup>-</sup> fraction isolated using MACS MultiSort kit



C) CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> cells enriched using MACS

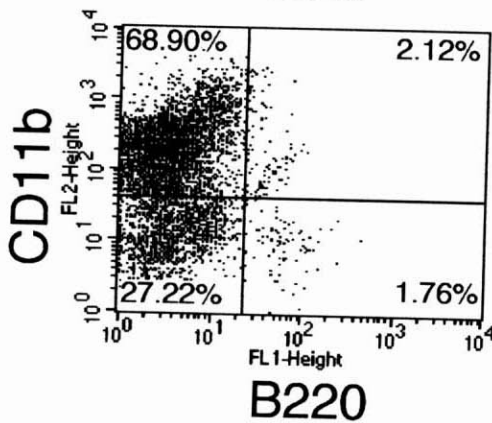
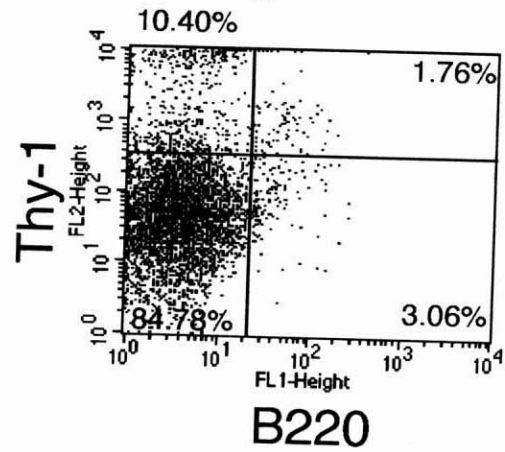
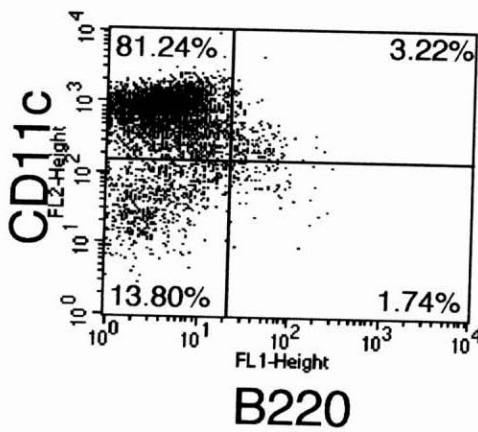


Fig. 1-6. Enriched DCs using percoll gradient and MACS MultiSort kit.

さらに、Fig. 1-4 (C) に示すように OptiPrep 溶液を用いた密度勾配遠心法により CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> 細胞を濃縮した後、MACS MultiSort kit を用いて B220<sup>+</sup> および Thy-1<sup>+</sup> 細胞を除去し、MACS 法により CD11c<sup>+</sup> 細胞を分離した結果、やはり純度の向上は見られず、CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 細胞を除去することができないことが示された (Fig.1-7)。パイエル板細胞より CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> 細胞を分離した場合は脾臓と同条件で行ってもその純度はさらに低く、約 43%程度で脾臓より多くの CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 細胞が残存していた。

そこで、FACS Vantage を用いた CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> 細胞の精製を試みた。FACS Vantage は蛍光標識した抗体を用いて染色した細胞を一つずつ高速で流してそれにレーザーを当てて蛍光強度を解析し、その蛍光強度によりセルソートすることにより細胞を高純度に精製できる。FACS Vantage による細胞分離の効率を上げるため、あらかじめ何らかの方法で目的の細胞を濃縮しておく必要があるので、まず密度勾配遠心法についてパーコール、OptiPrep の濃度を変えて検討した。パーコール溶液を用いた方法では、パーコールの濃度が、45%の時最も純度が高く (Fig.1-8)、OptiPrep を用いた方法では、18%の時が最も純度が高かった (Fig.1-9)。しかしながら、純度が向上するほど回収できる細胞数は減少する傾向が見られた (Table 1-1)。また、OptiPrep を用いた方法では、ロット間のばらつきが非常に大きく純度も実験間で安定しなかった。MACS 法により、通常、脾臓からは 30-40%、パイエル板からは 10-20%の CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> 細胞が安定して得られた (Fig.1-10)。 Table 1-1 に示したように、最も純度の高い濃



PDC

SDC

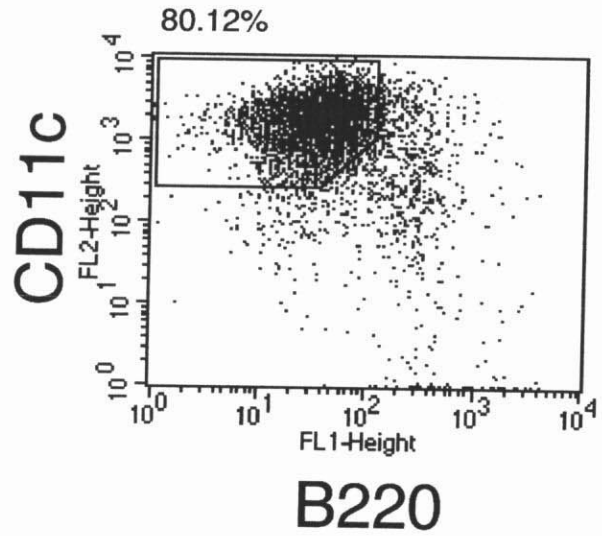
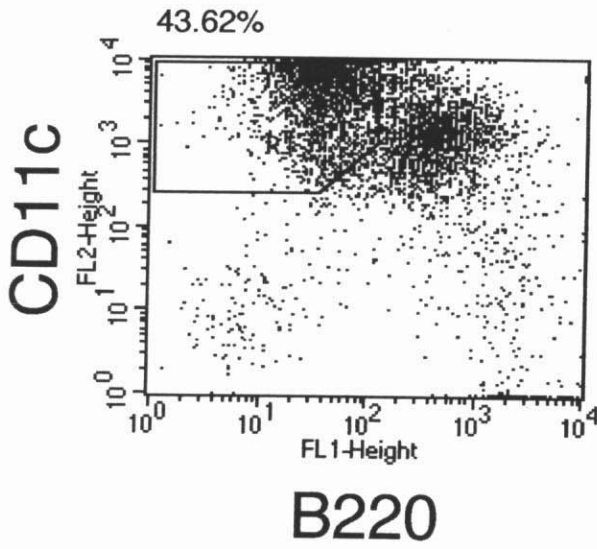


Fig. 1-7. Enriched DCs using Optiprep gradient and MACS MultiSort kit.

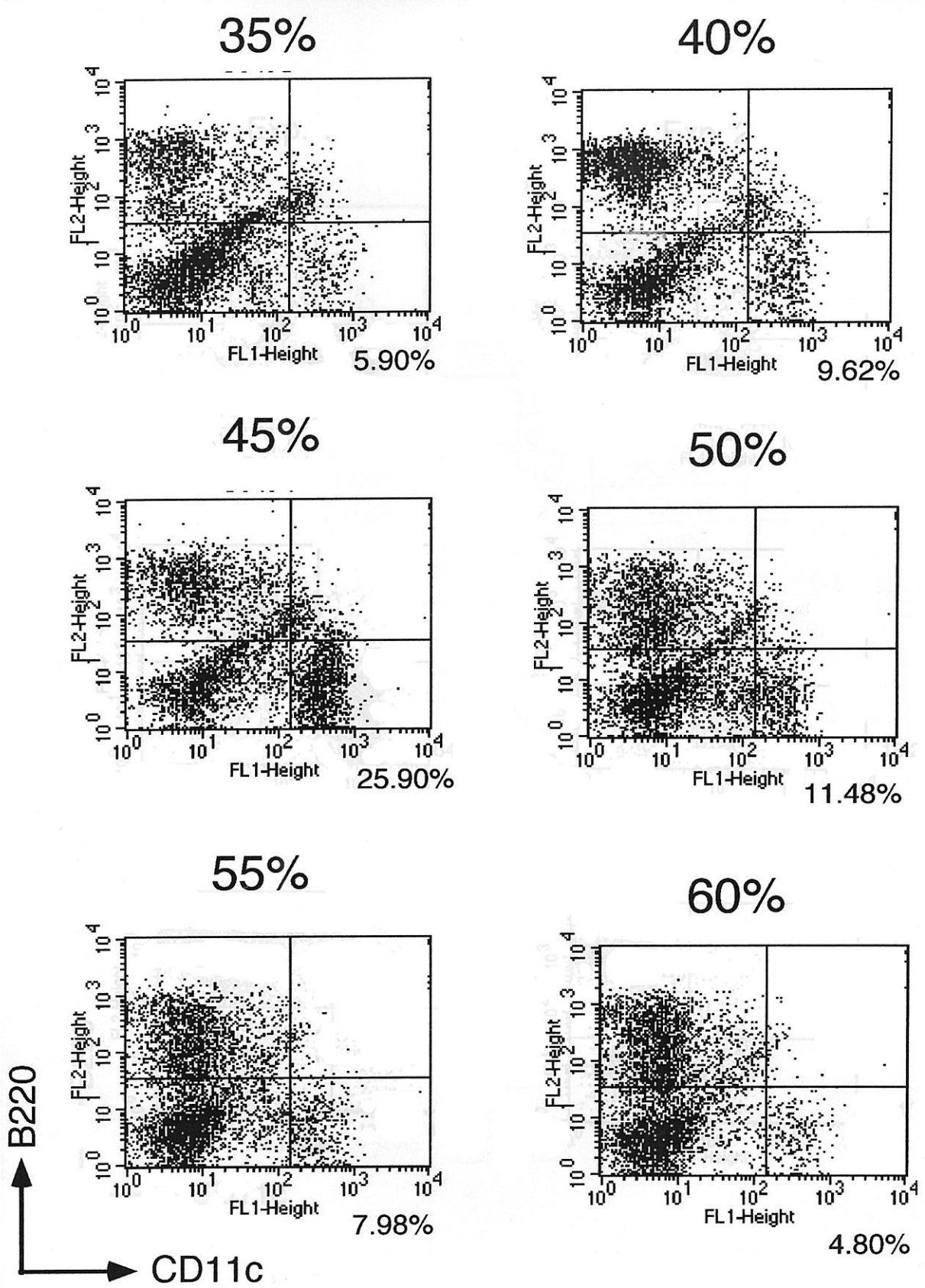


Fig. 1-8. Isolated cells using percoll gradient.

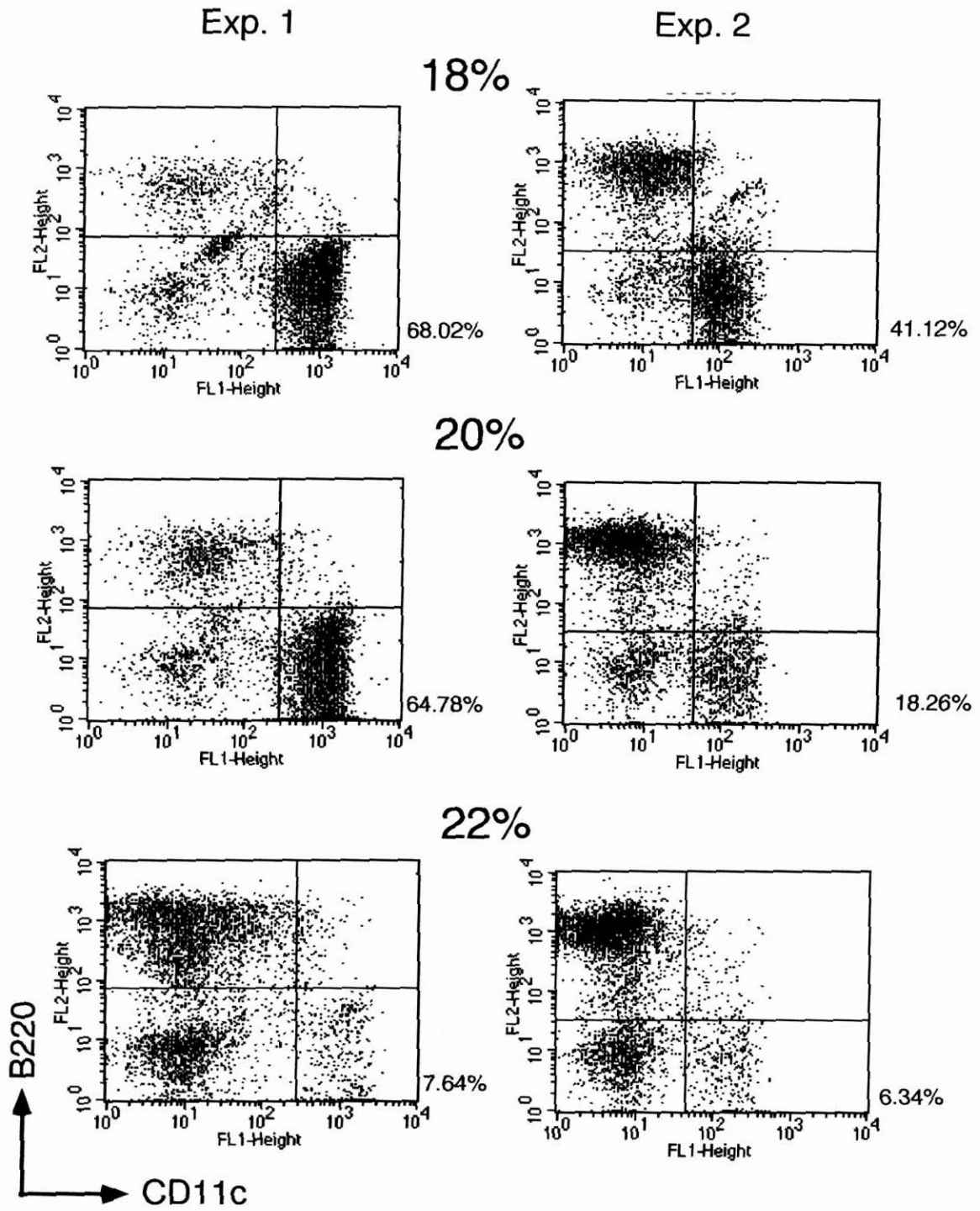


Fig. 1-9. Isolated cells using Optiprep gradient.

Table 1-1 Enrichment of dendritic cells

Percoll

	Whole cells		DC-enriched cells		
	Cell number	Purity	Cell number	Purity	Yeild
35%	$1 \times 10^8$	2.00%	$3.08 \times 10^5$	5.90%	0.9%
40%	$1 \times 10^8$	2.00%	$1 \times 10^6$	9.62%	4.8%
45%	$1 \times 10^8$	2.00%	$1.17 \times 10^6$	25.90%	15.2%
50%	$1 \times 10^8$	2.00%	$4.65 \times 10^6$	11.48%	26.7%
55%	$1 \times 10^8$	2.00%	$1.26 \times 10^7$	7.98%	50.3%
60%	$1 \times 10^8$	2.00%	$3.23 \times 10^7$	4.80%	77.5%

OptiPrep

Exp. 1	Whole cells		DC-enriched cells		
	Cell number	Purity	Cell number	Purity	Yeild
18%	$1.5 \times 10^8$	1.50%	$3.40 \times 10^5$	68.02%	10.3%
20%	$1.5 \times 10^8$	1.50%	$6.39 \times 10^5$	64.78%	18.4%
22%	$1.5 \times 10^8$	1.50%	$1.59 \times 10^6$	7.64%	5.4%
Exp. 2	Cell number	Purity	Cell number	Purity	Yeild
18%	$1.2 \times 10^8$	1.50%	$7.85 \times 10^5$	41.12%	14.4%
20%	$1.2 \times 10^8$	1.50%	$2.36 \times 10^6$	18.26%	19.2%
22%	$1.2 \times 10^8$	1.50%	$7.90 \times 10^6$	6.34%	22.3%

MACS

	Whole cells		DC-enriched cells		
	Cell number	Purity	Cell number	Purity	Yeild
	$1.5 \times 10^9$	1.20%	$2.67 \times 10^7$	35.44%	52.50%

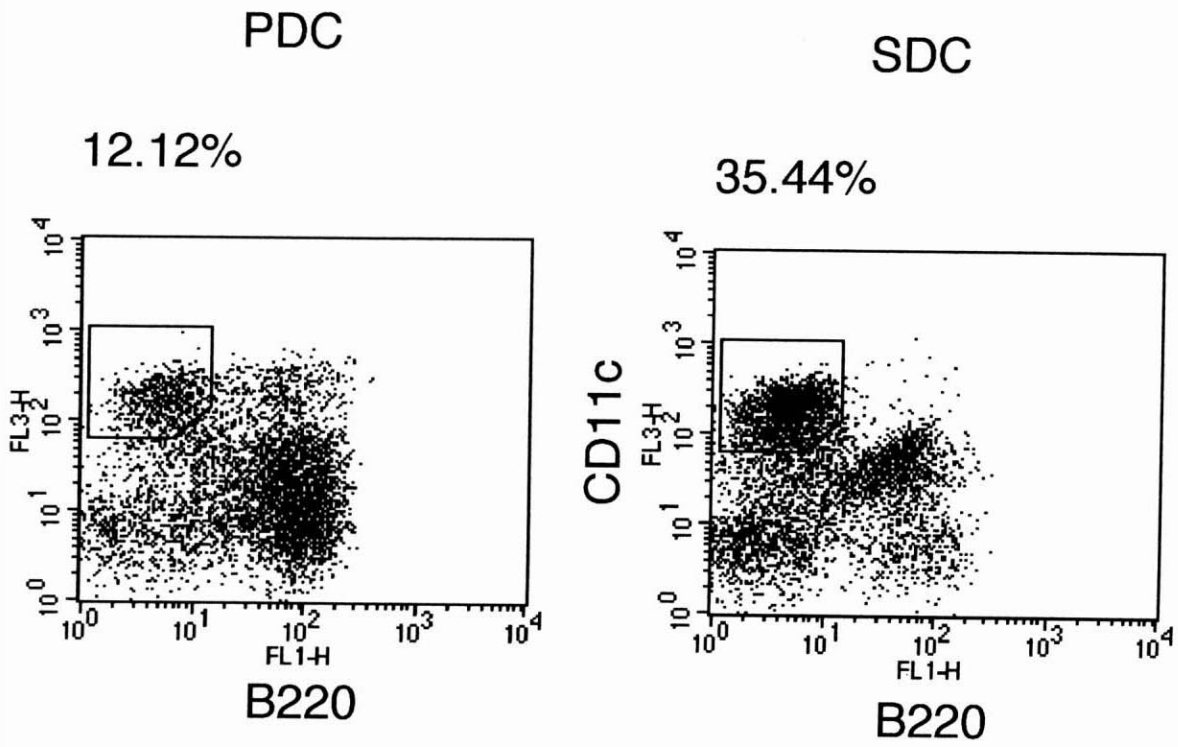


Fig. 1-10. Enriched DCs using MACS.

度で比べるとパーコール溶液は純度 25.9%で収率が 15.2%、OptiPrep は純度 68.0%で収率 10.3%、MACS 法は純度 35.4%で収率 52.5%であった。

そこで、純度、収率とも考慮した場合、MACS 法が最も優れていると考えられたので、MACS 法により CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>細胞を濃縮し FACS Vantage を用いて分離した結果、パイエル板および脾臓細胞から 97-100% の純度で CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>細胞を分離することができた (Fig. 1-11)。

さらに同様にして、樹状細胞の二つの細胞群の分離を行った。パイエル板および脾臓より、CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> 樹状細胞、CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>/CD8α<sup>+</sup> 樹状細胞を分離した。その結果、全て 97%-100% の純度で分離することができた (Fig. 1-12,13)。

### 細胞表面分子発現解析

パイエル板および脾臓樹状細胞の様々な細胞表面分子の発現解析を行った。フローサイトメトリーは細胞一つ一つについて標識された蛍光強度のデータをコンピューターに取り込み、目的の細胞のみを選択して解析することができる。したがって、MACS 法により CD11c<sup>+</sup> 細胞を濃縮したパイエル板および脾臓細胞を用いて、CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> 細胞の細胞表面分子の発現解析を行うことができた。Fig. 1-14 に示すように、パイエル板樹状細胞の MHC クラス II 分子 (I-A<sup>d</sup>)、CD86、CD40、CD44 の発現は脾臓樹状細胞と比較してわずかに高かった。また、樹状細胞の成熟マーカーと言われている DEC-205 の発現が高い細胞がパイエル板樹状細胞の方が脾

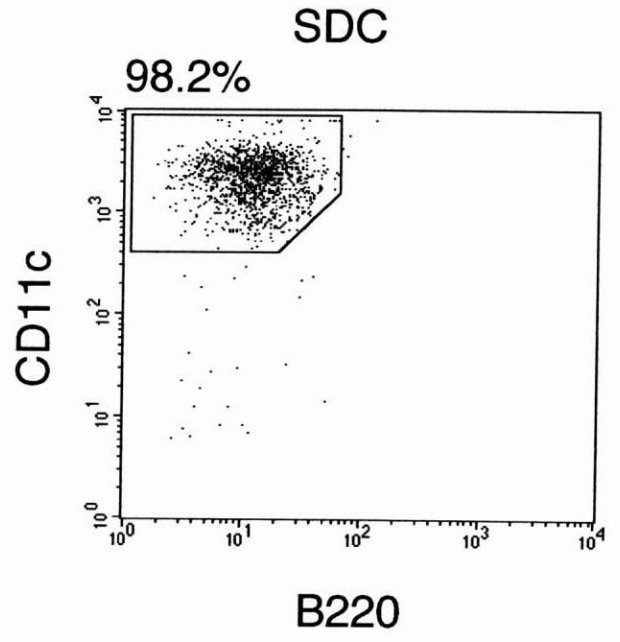
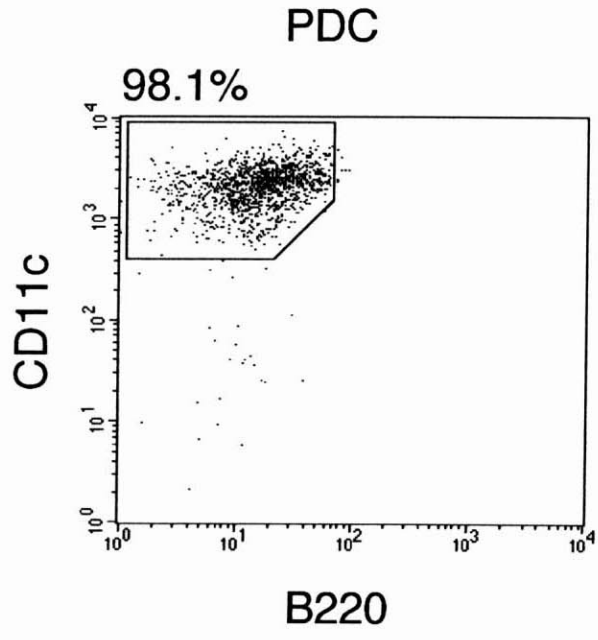


Fig. 1-11. Sorted DCs from PP and SP.

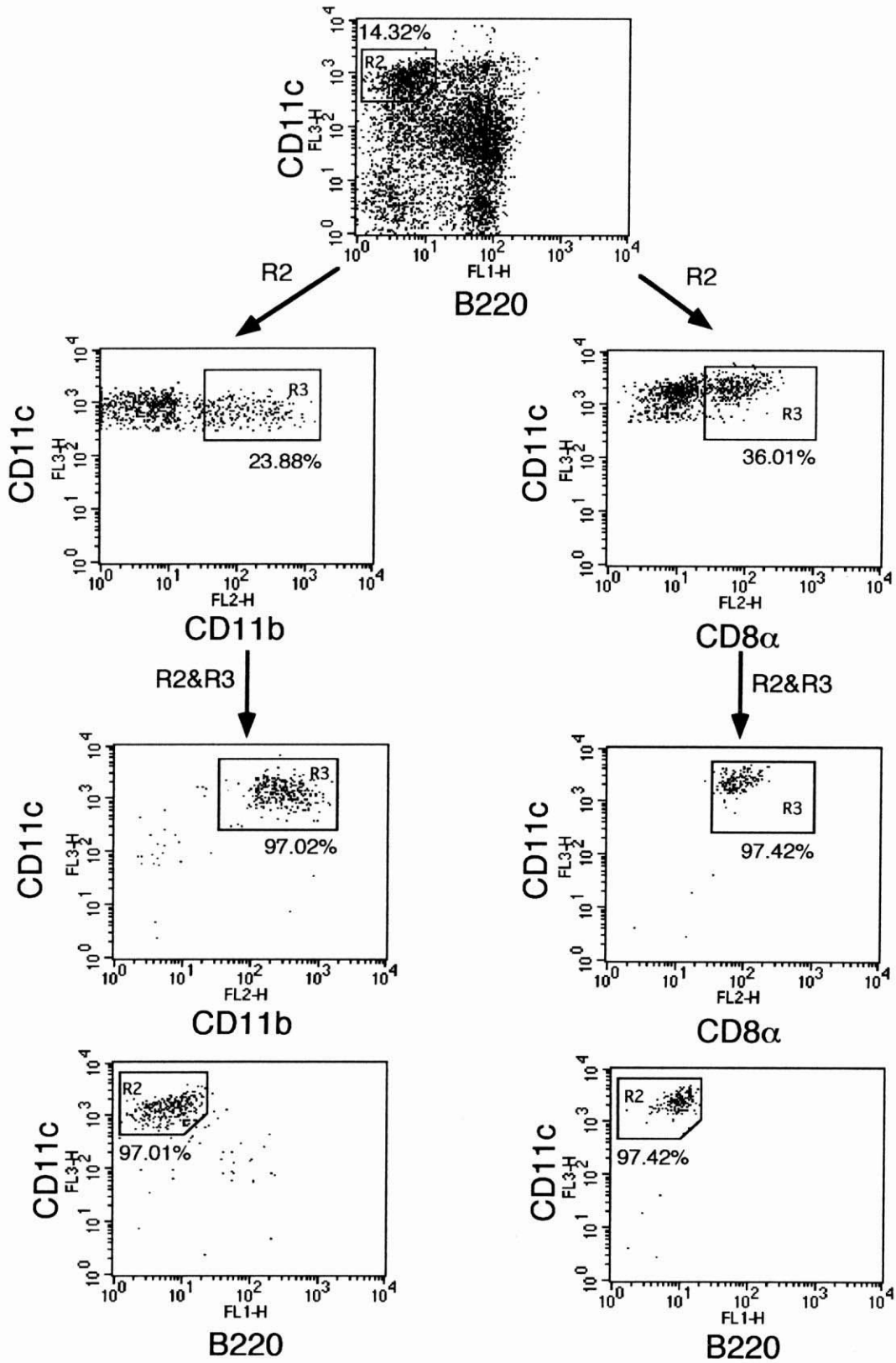


Fig. 1-12. Sorted CD11b<sup>+</sup> DCs and CD8α<sup>+</sup> DCs from PP.



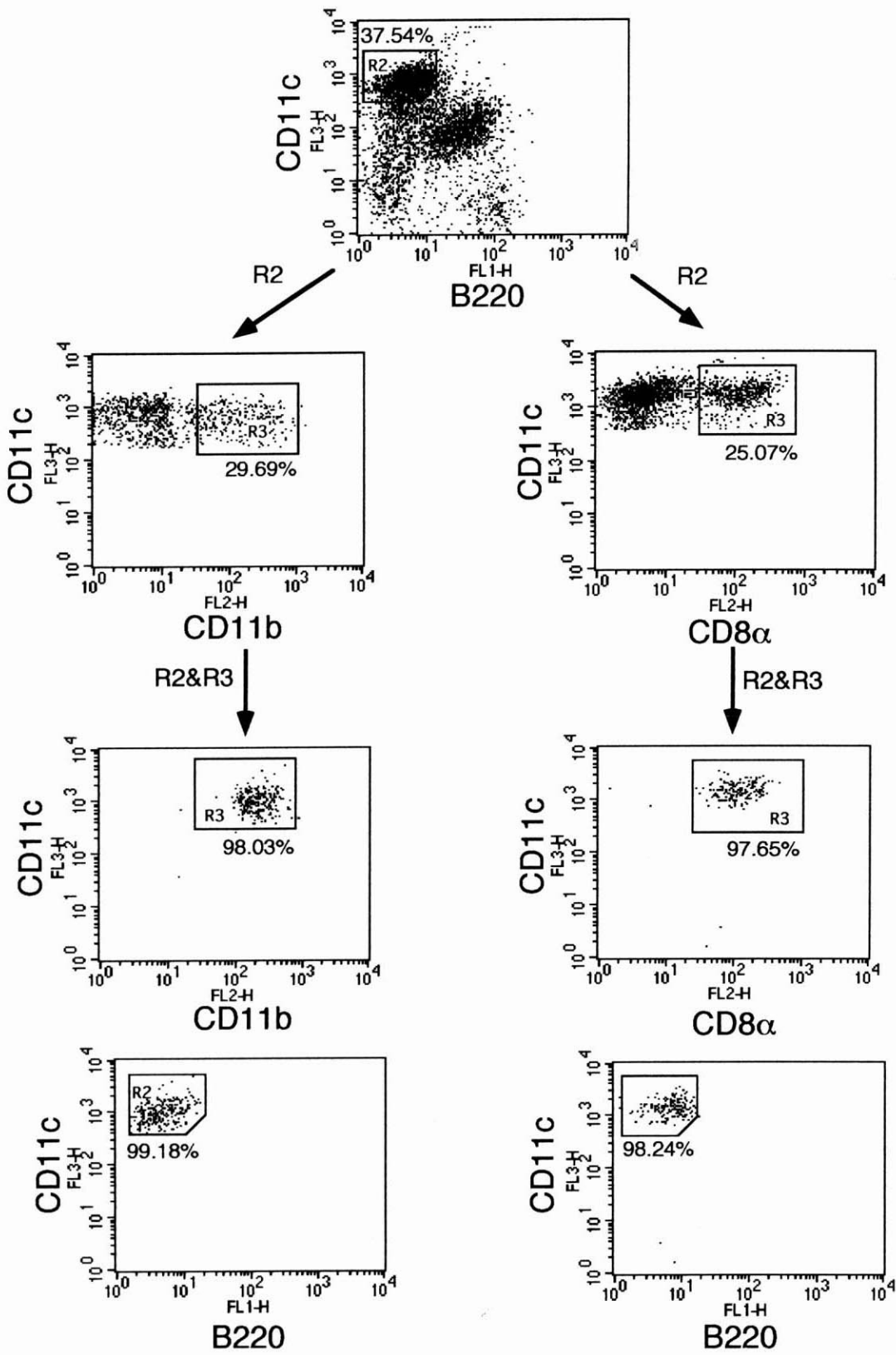


Fig. 1-13. Sorted CD11b<sup>+</sup> DCs and CD8α<sup>+</sup> DCs from SP.

— PDC  
 — SDC

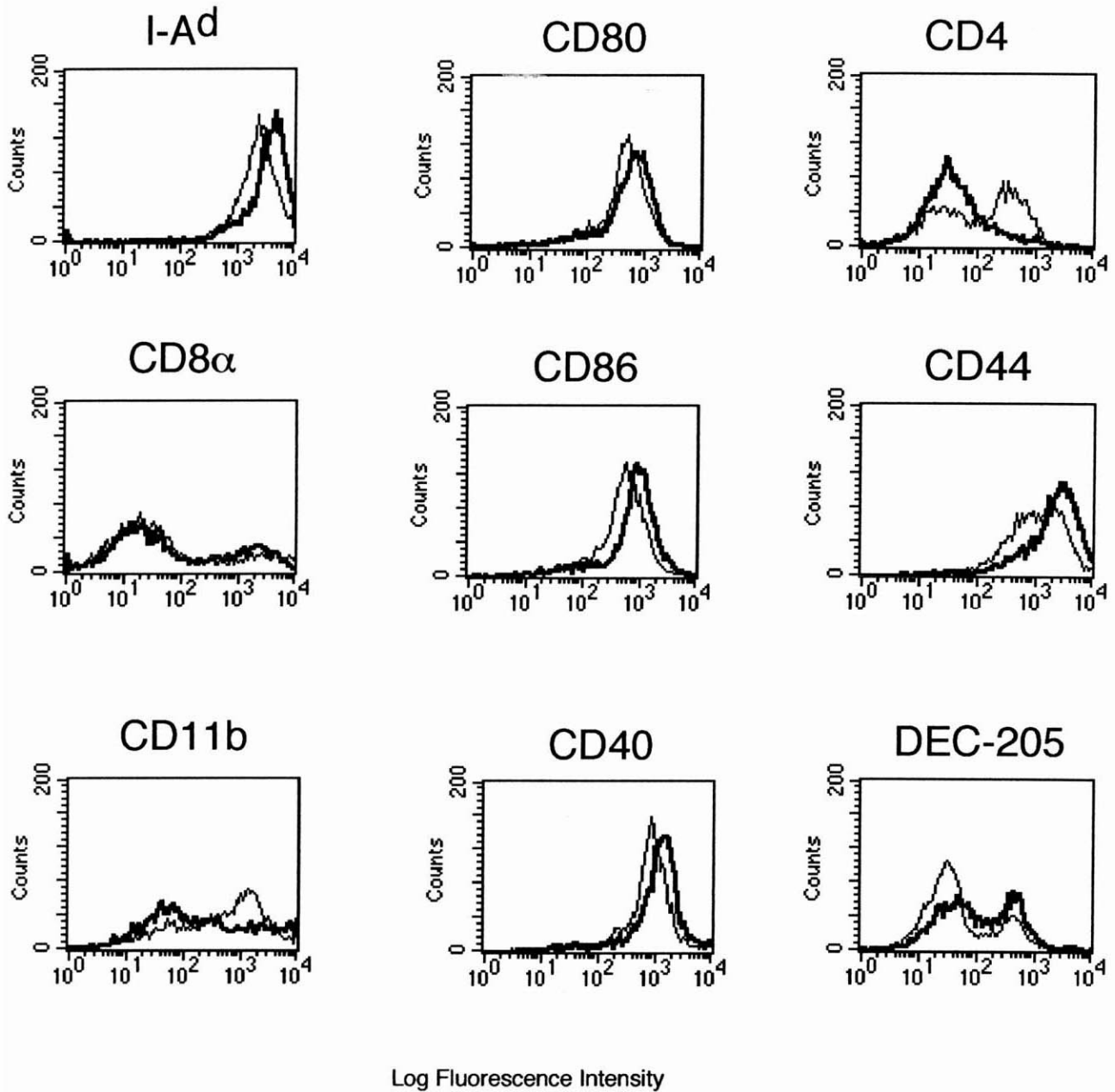


Figure 1-14. Surface phenotype analysis of DC populations (CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>) from PP or SP. DC-enriched fractions from PP and SP were gated on CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> cells and analyzed for expression of various surface molecules. The results are shown as histograms with fluorescence intensity on the x-axis and cell number on the y-axis. The thin lines represent staining of SP DCs, and the thick lines staining of PP DCs. The data depicted here represents five independent experiments producing similar results.

臓樹状細胞より多かった。CD8 $\alpha$ の発現については差がなかった。CD11bの発現に関しては、発現の高い細胞がパイエル板樹状細胞の方が脾臓と比較して少なかった。CD4については、脾臓樹状細胞には発現の高い細胞とそうでない細胞の両方が認められたが、パイエル板には発現の高い細胞は少なかった。

次に、パイエル板および脾臓樹状細胞を FACS Vantage により精製し、それについて CD11b、CD8 $\alpha$ 、DEC-205 の発現を解析した。その結果、Fig. 1-15 に示すように CD11b<sup>+</sup>/CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>細胞の割合は、パイエル板脾臓ともに約 45%だった。そして CD11b<sup>+</sup>/CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>細胞の割合は、パイエル板では約 30%、脾臓では約 40%だった。さらに CD11b<sup>-</sup>/CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>細胞の割合は脾臓では 10%未満だったが、パイエル板では約 20%であった。また、CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>細胞はパイエル板、脾臓ともに大部分の細胞が DEC-205 の発現が高かった。脾臓 CD11b<sup>+</sup>樹状細胞は CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>細胞とは異なり、DEC-205 の発現が低い細胞が多く認められたがパイエル板では DEC-205 の発現が高い細胞が脾臓より多く認められた。

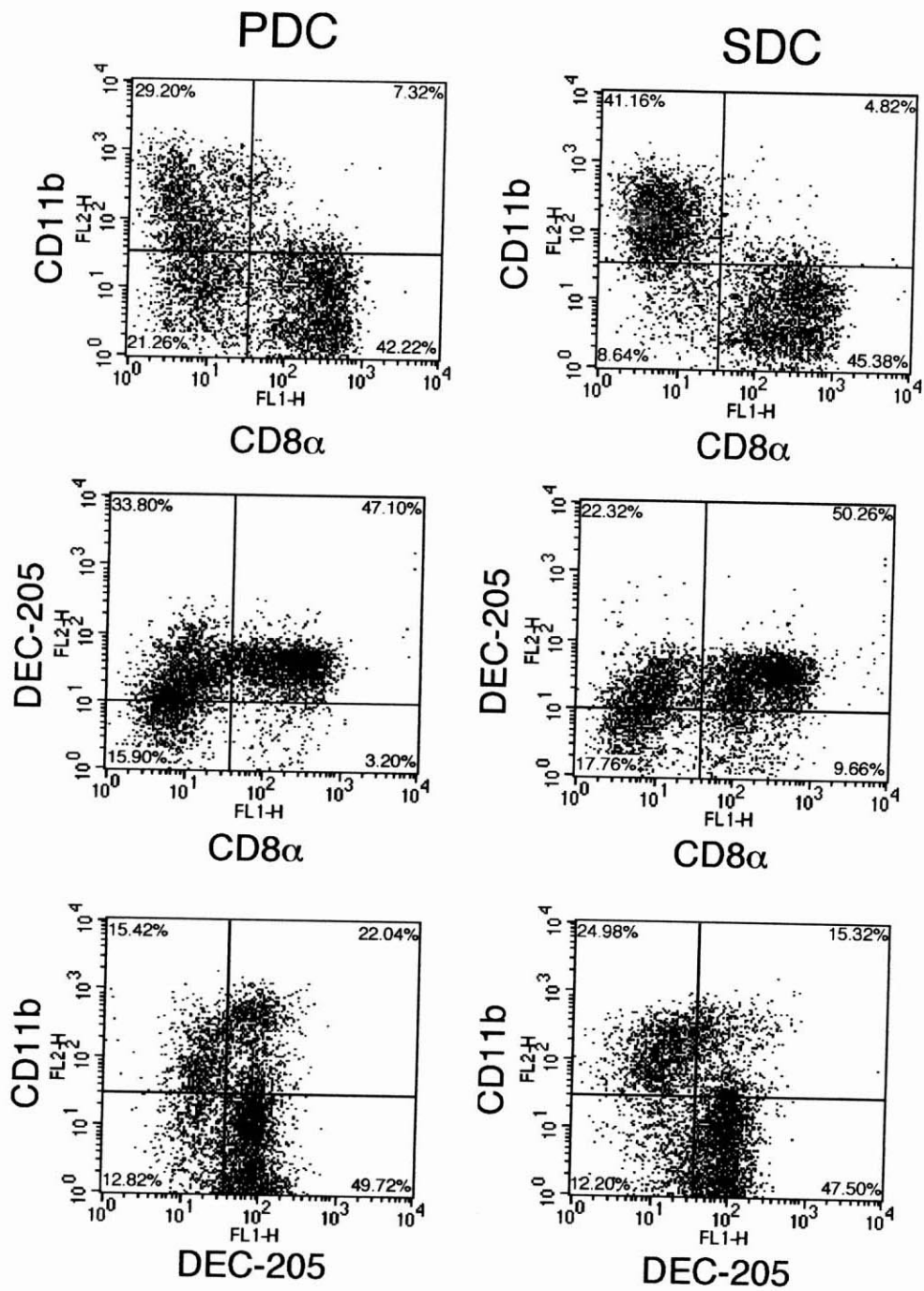


Figure 1-15. Proportions of the three DC subsets were analyzed from PP and SP. CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> cells from the respective organs were analyzed for the expression of CD11b, CD8 $\alpha$ , and DEC-205. The data depicted here represents three independent experiments producing similar results.

## 考察

まず最初に、パイエル板と比較してマウス 1 匹当たりの細胞数が多く粘着質成分も少ない臓器である脾臓を用いて樹状細胞を高純度で分離する方法を検討した。脾臓、パイエル板ともに組織中に全血球系細胞中 0.5-2.0%程度しか存在しない樹状細胞をできるだけ高純度に、特に、他の抗原提示細胞である B 細胞やマクロファージの混入していない状態で分離する目的で、Steinman の方法および磁気ビーズを利用した MACS 法について検討した。

Steinman の方法は、70%以上の純度が得られたが、B220<sup>+</sup>細胞が 20%弱混入しており、純化するに至らなかった。さらに、プラスチックプレートに付着させることで樹状細胞が成熟するという報告もあり(62)、本研究では、樹状細胞をできる限り生体内に存在する樹状細胞と同様な成熟状態を取り出して実験を行いたいという理由から、他の方法により分離することが望ましいと考えられた。そこで次に、密度勾配遠心法と MACS 法により、CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>細胞の濃縮を試みたが、B220<sup>+</sup>細胞の混入がみられ、その前にあらかじめ MACS MultiSort kit により B220<sup>+</sup>細胞、CD11b<sup>+</sup>細胞、Thy1<sup>+</sup>細胞を取り除くことを試みた場合もやはりそれらの細胞の混入が認められ、密度勾配遠心法と MACS 法のみでは樹状細胞の純化には至らなかった。さらに、マクロファージマーカーである CD11b や F4/80 は樹状細胞にもそれらの発現細胞が存在するため、MACS MultiSort kit を用いたネガティブセレクションでは、樹状細胞の一部の細胞群も除去されてしまい、マクロファージのみを選択的に取り除くことは困難であ

ると考えられた。次に、同様の方法により、パイエル板樹状細胞の分離を試みたが、脾臓を用いた場合は CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 細胞を 80%前後まで濃縮できるのに対して、パイエル板を用いた場合は約 40%であった。そして、脾臓より多くの CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 細胞が混入していた。この理由として、調製したパイエル板細胞懸濁液が脾臓と比較して粘着質成分を多く含んでおり、密度勾配遠心法や MACS 法による細胞分離の際に遠心管やカラムに付着しやすいために目的細胞以外の細胞が混入しやすいということが考えられた。混入が認められた CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 細胞は Iwasaki らの報告によると、PCR による検定では CD19 陽性であり、B 細胞が混入していることが示されている (62)。

樹状細胞の性質を解析する場合に、B 細胞がわずかにでも混入しているのは望ましくなく、より高純度に樹状細胞を分離する方法を用いなければならない。FACS Vantage は緩衝液に懸濁された細胞を一つずつ流しながら分離するため、粘着質を多く含むパイエル板細胞からでも高純度で樹状細胞が分離できることが期待された。

まず、樹状細胞の分離効率をあげるため濃縮方法を検討したが、FACS Vantage による細胞分離は他の分離法と比較して収率が著しく減少してしまうため、濃縮する目的としては、純度が良いだけでなく収率の良い濃縮法を用いることが適していると考えられた。二種類の密度勾配遠心法と MACS 法を検討した結果、純度と収率の両方の側面と結果の安定性を考慮すると MACS 法が FACS Vantage による分離前の濃縮法として最も適していると考えられた。

最後に、パイエル板および脾臓より MACS 法により濃縮した後、FACS Vantage により分離した結果、CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> 樹状細胞および樹状細胞群 CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> 樹状細胞、CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>/CD8α<sup>+</sup> 樹状細胞を分離することに成功し、以降の実験に関しては CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> 細胞の細胞表面分子の解析以外は、FACS Vantage により 97%以上の純度で分離した細胞を用いた。

一般的に、抗原特異的未感作 T 細胞が抗原刺激を受けて増殖しエフェクター T 細胞になるには、抗原提示細胞が提示する MHC クラス II 分子と抗原ペプチド複合体を T 細胞レセプターとコレセプター (CD4 または CD8) を介して認識することによって伝達される第一シグナルと副刺激因子を介した第二シグナルが必要である。最も重要な副刺激因子は B7 ファミリーである CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2) であると言われている。これらに対する T 細胞上の B7 分子のレセプターは CD28 である。また、ひとたび未感作 T 細胞が活性化するといくつかの分子が発現し、T 細胞増殖や分化を司る副刺激を保持したり変化させたりするのに働く。その一つが CD40 リガンドであり、抗原提示細胞に発現している CD40 に結合する。CD40 リガンドが CD40 に結合すると T 細胞に活性化シグナルを伝達し、同時に抗原提示細胞も活性化され B7 の発現などが誘導され、成熟する。また、活性化した CD4<sup>+</sup> T 細胞は接着分子である CD2 や LFA-1 を高発現するようになり、CD44 を高発現している細胞とのアビディティが高くなることが知られている。本章でパイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞と比較して MHC クラス II 分子、CD86、CD40、

CD44 の発現が高いことが明らかとなり、パイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞と比較して成熟度合いが高いことが示された。腸管粘膜は絶えず莫大な量の抗原に曝されており、パイエル板は常にそれらの一部を取り込んでいるため、樹状細胞は抗原提示を行うことによって抗原特異的 T 細胞からの刺激を受けやすい環境にいることからこのような結果になると考えられる。これらの結果から、パイエル板樹状細胞の方が脾臓と比較して、成熟度が高く T 細胞の活性化能が高いことが予想された。

一方、近年マウス脾臓 CD11b<sup>+</sup>/CD8α<sup>-</sup> 樹状細胞には CD4 陽性細胞と陰性細胞の両方が存在することが報告されている (64)。Fig. 1-13 に示されたように脾臓樹状細胞には CD4 陽性細胞と陰性細胞の両方が存在していたが、パイエル板には陽性細胞はあまり存在していなかった。しかしながら、この二つの表現型の違う細胞の機能的な違いについては現在のところ解明されていない。

リンパ球系樹状細胞のマーカーであると言われている CD8α の発現頻度はパイエル板と脾臓で差が認められなかった。骨髄系樹状細胞のマーカーである CD11b の発現は、パイエル板樹状細胞の方が脾臓より少なかったが、CD8α も CD11b も発現していないダブルネガティブ細胞が多く存在していた。これはパイエル板を初めとする腸管組織特有の現象であると考えられている (58)。CD8α<sup>+</sup> 樹状細胞は T 細胞領域に多く存在すると言われているが、そのため T 細胞との相互作用により成熟した細胞が多く、パイエル板、脾臓ともに CD8α<sup>+</sup> 樹状細胞の DEC-205 の発現が高いという結果に



なつたと考えられる。また、脾臓では CD11b<sup>+</sup>樹状細胞の DEC-205 の発現は低く、この細胞群は未成熟な細胞の方が多いが、パイエル板では CD11b<sup>+</sup>樹状細胞のうち、DEC-205 の発現が高い細胞が比較的多かつた。パイエル板 CD11b<sup>+</sup> 樹状細胞は抗原を取り込む細胞である M 細胞直下の SED に存在すると報告されており(57)、抗原を受け取りその場で抗原提示を行う樹状細胞と T 細胞領域に移動して抗原提示を行う樹状細胞と両方存在すると考えられるが、いずれにしてもパイエル板 CD11b<sup>+</sup> 樹状細胞は抗原に出会う頻度が高いため、抗原提示により T 細胞からの刺激を受けて成熟している細胞が多いのではないかと考えられる。

以上より、第一章において、樹状細胞とその細胞群の精製方法が確立され、続いてパイエル板樹状細胞の細胞表面分子の発現を成熟マーカーや T 細胞副刺激因子に着目して詳細に解析することができた。その結果、パイエル板樹状細胞は脾臓樹状細胞と比較して成熟度合いが高いこと、そしてその理由の一つとして腸管という抗原に曝される頻度の高い組織に存在するということが考えられた。これらの結果から、パイエル板樹状細胞が脾臓と比較して高い抗原提示能を持つこと、異なる T 細胞応答を誘導することが期待されたため、第二章ではパイエル板樹状細胞が誘導する T 細胞応答について解析を行った。