



**札幌医科大学学術機関リポジトリ *ikor***

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title	樹状細胞における Sialyl Lewis X 発現の免疫組織化学的検討
Author(s)	笠井, 潔;今, 信一郎;松浦, 晃洋;菊地, 浩吉
Citation	札幌医科大学保健医療学部紀要,第 1 号: 9-13
Issue Date	1997 年
DOI	10.15114/bshs.1.9
Doc URL	<a href="http://ir.cc.sapmed.ac.jp/dspace/handle/123456789/6594">http://ir.cc.sapmed.ac.jp/dspace/handle/123456789/6594</a>
Type	Journal Article
Additional Information	
File Information	n1344919219.pdf

- コンテンツの著作権は、執筆者、出版社等が有します。
- 利用については、著作権法に規定されている私的使用や引用等の範囲内で行ってください。
- 著作権法に規定されている私的使用や引用等の範囲を越える利用を行う場合には、著作権者の許諾を得てください。

## 樹状細胞における Sialyl Lewis X 発現の免疫組織化学的検討

笠井 潔<sup>1</sup>, 今 信一郎<sup>2</sup>, 松浦晃洋<sup>2</sup>, 菊地浩吉<sup>2</sup>

札幌医科大学保健医療学部看護学科基礎臨床医学講座<sup>1</sup>

札幌医科大学医学部第一病理学<sup>2</sup>

### 要 旨

各種の悪性腫瘍で増加する糖鎖である sialyl Lewis X (SLEX) が正常リンパ組織、末梢血や皮膚においてどのような発現をしているのかを免疫組織化学やフローサイトメトリーにて検索した。SLEXは末梢血のリンパ球において、NK細胞やT細胞の一部に発現していた。リンパ節では傍皮質やリンパ洞の一部の組織球に発現しており、特に皮膚病性リンパ節炎ではS100陽性の樹状細胞 (Langerhans細胞) の一部にSLEXが陽性であった。また、皮膚表皮でもCD1a陽性Langerhans細胞の一部がSLEX陽性であった。以上の所見から、従来指摘されていた表皮の抗原提示細胞であるLangerhans細胞のリンパ節への移行が確認された。更にこのLangerhans細胞移行の機序には内皮細胞E-selectinとLangerhans細胞SLEXの相互反応が関与する可能性が示唆された。

<索引用語> Sialyl Lewis X、ランゲルハンス細胞、樹状細胞、CD1抗原

### 緒 言

各種の悪性腫瘍で増加する糖鎖である sialyl Lewis X (SLEX) は癌患者血清中で増加する腫瘍マーカーとして臨床上有用であるが、白血球や一部のリンパ球、組織球にも発現することが報告されている<sup>1, 2)</sup>。近年、SLEX が血管内皮細胞の細胞接着因子である E-selectin のリガンドであることが明らかにされ、炎症や免疫反応の局所におけるSLEX保有細胞と内皮細胞の E-selectin を介する反応の重要性が注目されている<sup>3) 4)</sup>。従って、炎症や免疫に関与する細胞において、SLEX の発現を詳細に検討することはその細胞の機能を検討する上でも重要なことと思われる。既に、我々は悪性リンパ腫の特殊型である CD30 (Ki-1) 陽性大細胞型リンパ腫において SLEX が発現することを報告しているが<sup>5)</sup>、今回、更に SLEX の末梢血、リンパ節、皮膚を含む正常組織での発現を免疫組織化学的方法やフローサイトメトリーを用いて解析し、SLEXの発現と意義について検討を加えた。

### 材 料

#### (a) 検索組織

1993年から1996年までに札幌医科大学第一病理学教室

で取り扱った各種正常組織を検索の材料とした。以上の材料について凍結標本と通常のホルマリン固定パラフィン包埋標本やアセトン固定パラフィン包埋標本から AMeX 切片を作成した。病理組織学的検索は全例のパラフィン包埋材料を 4 μm に薄切し、それぞれ Hematoxylin-eosin (HE) 染色を行なった。細胞表面マーカーの検索は全例のパラフィン包埋標本を 3 μm に薄切し、キシレンで脱パラフィンして、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加メタノールで30分間内因性 peroxidase を除去してから以下の方法にて免疫染色した。一部のリンパ節や皮膚生検組織標本では連続切片を作成し、免疫染色した。

#### (b) 抗体

抗 sialyl Lewis X モノクローナル抗体である CSLEX-1 は UCLA Tissue Typing Labo より供与された<sup>6)</sup>。更に一次抗体として、Leu2 (CD8)、Leu3 (CD4)、Leu4 (CD3)、Leu6 (CD1a)、LeuM1 (CD15) (以上、Becton-Dickinson社)、L26 (CD20; DAKO社)、UCHL1 (CD45RO: ニチレイ) を用いた。各一次抗体は20倍から100倍の間の希釈倍数で使用した。

(c) 免疫組織化学

上記の1次抗体を反応させた後、Avidin-Biotin Complex 法にて免疫染色した<sup>7)</sup>。二次抗体のビオチン化抗マウスウサギ血清の希釈倍数は100倍とした。ABC complex は100倍希釈で用い、反応時間は室温で一次抗体を1時間、二次抗体を30分、ABC complex を30分とした。PBS緩衝液にて洗浄後、0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加 Diaminobenzidine (DAB) トリス緩衝液 (0.05M, pH 7.6) にて発色させ、Methylgreen にて核染色を行なった。なお、一次抗体を除いて二次抗体だけで反応させたものと二次抗体を除いて反応させたものを陰性コントロールとして用いた。

(d) Flow cytometry による末梢血リンパ球の two color analysis

末血リンパ球の分離は Ficoll-Conray 比重遠心法にて行なった。蛍光抗体法は試験管に1万個のリンパ球を入れ、各抗体50 μlを加えて行った。SLEXの場合はCSLEX-1と反応させた後、PBSにて洗浄し、50 μlのfluorescence isothiocyanate (FITC) 標識抗マウス抗体50 μlを添加し、間接蛍光抗体法を施行した。この後、phycoerythrin (PE) 標識の抗CD3, 抗CD16, 抗CD20, 抗CD56の各抗体を加え、直接蛍光抗体法を施行した。二重染色した各試験管内リンパ球をフローサイトメトリー (Coulter Epics profile V) にて計測した。FITC にて染色された CSLEX1陽性細胞に対してPE標識-CD3, PE標識-CD56, PE標識-CD16, PE標識-CD20 (以上、Becton - Dickinson社) について two color analysis を行った。横軸にCD56, CD16, CD3, CD20の蛍光強度、縦軸に SLEX の蛍光強度をとった。各マーカー陽性細胞数と陰性細胞数は点で表している。

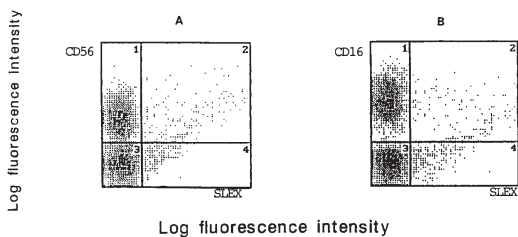


図1：Flow cytometry による末梢リンパ球の二重染色：  
A：末梢リンパ球の二重染色を施行し、縦軸にCD56の蛍光強度、横軸にSLEXの蛍光強度をとった図である。カラム1はCD56のみ陽性、カラム2は両者共陽性、カラム3は両者陰性、カラム4はSLEXのみ陽性を示す。  
B：同様に縦軸にCD16の蛍光強度、横軸にSLEXの蛍光強度をとった図である。カラム1はCD16のみ陽性、カラム2は両者共陽性、カラム3は両者陰性、カラム4はSLEXのみ陽性を示す。

結 果

(a) SLEXの正常組織分布

Flow cytometry では末梢血リンパ球の8%がSLEX陽性であった。そのリンパ球亜群解析では、末梢血リンパ球の3.4%が、CD56陽性やCD16陽性で且つSLEX陽性のnatural killer (NK) 細胞であった (図1カラム2の分画)。また、末梢血リンパ球の4.4%がCD3陽性かつSLEX陽性のT細胞であった。SLEXと共にCD20も陽性であるB細胞はみられなかった。

(b) 正常及び炎症性病変組織切片の免疫組織化学

リンパ節ではSLEXは傍皮質やリンパ洞の一部の組織球に発現していた。大部分のS-100陽性細胞には発現していなかったが、その一部に発現していた (図2矢印)。



図2：リンパ節のSLEXの免疫染色。傍皮質領域に散在性細胞質にSLEX陽性の細胞 (組織球) をみる。x200

リンパ濾胞胚中心の細胞はSLEX陰性であった。扁桃では濾胞間の一部の組織球がSLEX陽性であり、脾では赤脾髄の少数の組織球にSLEXが発現していた。肝ではクッパー細胞はSLEX陰性であり、骨髄では杆状核や分節核をもつ骨髄球系細胞がSLEX陽性であったが、赤芽球と巨核球はSLEX陰性であった。

(c) S100ないしCD1a陽性の樹状細胞 (Langerhans細胞) におけるSLEX発現の検討

皮膚及び皮膚病性リンパ節炎におけるS100ないしCD1a陽性の樹状細胞 (Langerhans細胞) にSLEXが発現しているか否かを知るためにこれらの連続切片を用いて免疫組織化学的に検索した。皮膚病性リンパ節炎ではその傍皮質にS-100陽性の組織球が多数出現するが、この病変の連続切片を用いて、S100陽性細胞におけるSLEX発現を検討した。大半のS100陽性組織球にはSLEXは発現していないが、その一部にSLEXが発現している組織球がみられた (図3矢印)。

次に皮膚のアセトン固定パラフィン包埋切片 (AMeX切片) の連続切片を用いて、皮膚樹状細胞における



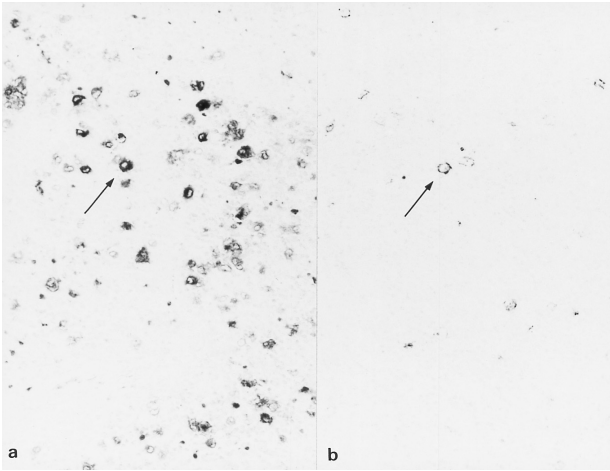


図3：皮膚病性リンパ節炎におけるS100 (a) 及びSLEX (b) の免疫染色。S100陽性の樹状細胞 (Langerhans 細胞) の一部にSLEXも発現している (矢印)。x400

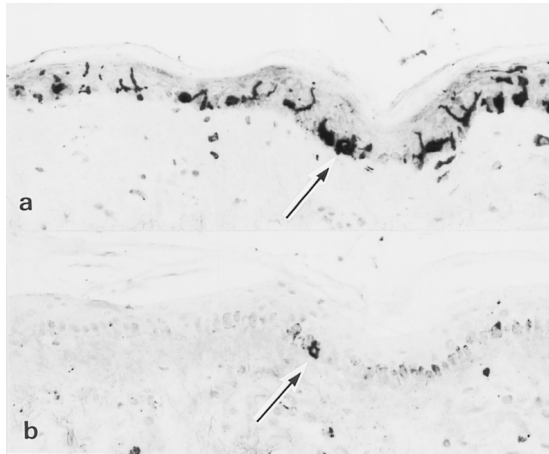


図4：皮膚の樹状細胞におけるCD1a 抗原 (a) と SLEX (b) の免疫染色。CD1a 陽性の樹状細胞 (Langerhans 細胞) の一部に SLEX も発現する (矢印)。x200

CD1a 抗原と SLEX の局在を観察した。図4に示す様に表皮内には多数 CD1a 陽性の樹状細胞である Langerhans 細胞が分布しているが、これらは皮膚の炎症の際にT細胞に対し、抗原提示しうる細胞と考えられている<sup>3,4)</sup>。この AMeX 切片の連続切片による CD1a, SLEX の免疫染色では一部の Langerhans 細胞が SLEX 陽性であることが判明した (図4矢印)。

### 考 案

本報告ではホルマリン固定パラフィン包埋標本や AMeX 標本を用いて各種抗体による細胞表面マーカーの検索を行ない、リンパ組織や末梢血リンパ球における SLEX 陽性細胞の特徴を免疫学的に検討した。リンパ組織、造血組織、末梢血リンパ球における SLEX 発現は従来報告されていた所見と一致したが<sup>2) 6)</sup>、表皮内樹状細胞

や皮膚病性リンパ節炎樹状細胞における SLEX 発現の所見に関する報告はこれが初めてである。皮膚の表皮内樹状細胞や皮膚病性リンパ節炎の傍皮質の樹状細胞は Leu6 (CD1a) や S100 陽性であり、免疫学的に Langerhans 細胞であると考えられた。この Langerhans 細胞は形態学的には樹状細胞の形を呈し、皮膚表皮内や皮膚病性リンパ節炎傍皮質領域に出現し、その核がコーヒー豆様構造を示し、S100 や CD1a 等の細胞マーカーを有している<sup>8-10)</sup>。また、電子顕微鏡による観察ではその細胞質内に Birbeck 顆粒を含む特徴ある超微形態を示す。

皮膚病性リンパ節炎傍皮質に存在する CD1a 陽性樹状細胞はそのリンパ節近傍の皮膚表皮の Langerhans 細胞ないし Langerhans 細胞の前駆細胞から由来していると従来考えられており、Langerhans 細胞が皮膚からリンパ節へ移行する可能性が指摘されている<sup>8, 9)</sup>。本研究で皮膚及びリンパ節の両部位において SLEX 陽性樹状細胞が証明されたことは、Langerhans 細胞が皮膚からリンパ節へ移動するという説に合致する所見と思われる。一方、末梢血を循環する Tリンパ球の中でメモリー T細胞の一部が SLEX 陽性であることが報告されている<sup>1)</sup>。このような T細胞は皮膚等の炎症局所に回帰する T細胞と指摘されているが、血管内皮細胞の E-selectin に常時結合する能力を有するので、炎症発生に際し、メモリー T細胞の即応しうる能力と考えられている<sup>4) 11)</sup>。本研究においても末梢血 Tリンパ球の一部に SLEX 発現を観察したが、この説を支持する所見と思われる。樹状細胞における SLEX 発現においてもこの SLEX 陽性メモリー T細胞と同じ様な機構が存在し、SLEX を発現した Langerhans 細胞が SLEX を介して皮膚血管内皮細胞の E-selectin へ接着し、皮膚からその近傍リンパ節へ移行する可能性が示唆される。

免疫系の主役であるリンパ球に対して抗原提示機能を担う樹状細胞は極めて重要であり、CD1 抗原は皮膚樹状細胞である Langerhans 細胞に特徴的で有用なマーカーであることが知られている<sup>12)</sup>。しかし、樹状細胞に発現する CD1 分子の機能は長い間不明であった。CD1 分子は Major histocompatibility complex (MHC) クラス I 抗原に類似した構造をもつが、多形性に乏しいことから、MHC クラス Ib 抗原として分類されていた<sup>13)</sup>。クラス I 様の分子構造をもつことや胸腺特異的な発現を呈することから、抗原提示能や T細胞分化への関与が推測されてきた。近年、この CD1 の機能に関する、幾つかの報告がなされ、注目されている<sup>13, 14)</sup>。CD1 抗原は MHC クラス I 抗原とは異なり、多形性に乏しい為、限られた特定の抗原を抗原提示することが推測されていた<sup>13)</sup>。最近、ヒト CD1b が結核菌体成分の mycolic acid やらい菌の lipoglycan を結合し、double negative T細胞に抗原提示することが報告された<sup>15)</sup>。CD1b がペプチド抗原ではなく、特定の脂質を結合して抗原提示することは CD1 抗

原の乏しい多形性に合致する現象と考えられる。また、CD1抗原がT細胞にリガンドとして機能することも報告されている<sup>16)</sup>。すなわち、CD1a,CD1cが腸粘膜上皮のCD8<sup>+</sup>T cell lineのリガンドとして機能することで粘膜局所の免疫機能を調節しているとされている。マウスCD1はNK1<sup>+</sup>T細胞のリガンドとして働き、NK1<sup>+</sup>Tcellのpositive selectionに関与している。ランゲルハンス細胞に発現するCD1a抗原に関しても同様な抗原提示能ないしはリガンドとしての機能があることが推測されている<sup>14)</sup>。すなわち、皮膚の炎症局所で抗原感作を受けたCD1a陽性かつSLEX陽性のランゲルハンス細胞がSLEXを介して、内皮に接着し、リンパ節のT細胞依存領域へ移動し、リンパ節内のT細胞に抗原提示をしたり、免疫調節をしている可能性が示唆される。

### 結 語

1. sialyl Lewis X (SLEX) の正常リンパ組織、末梢血や皮膚における発現を免疫組織化学及びフローサイトメトリーにて検索した。
2. SLEXは末梢血ではリンパ球の中で、NK細胞やT細胞の一部に発現していた。
3. SLEXがリンパ節では傍皮質やリンパ洞の一部の組織球に発現しており、特に皮膚病性リンパ節炎ではS100陽性の樹状細胞 (Langerhans 細胞) の一部に陽性であった。
4. 皮膚表皮でもCD1a陽性 Langerhans 細胞の一部がSLEX陽性であった。
5. 表皮の抗原提示細胞であるLangerhans細胞のリンパ節への移行に、内皮細胞のE-selectinとLangerhans細胞のSLEXとの相互反応が関与する可能性が示唆された。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際し、多大なる御協力をいただきました病理学教室の諸先生及び病理学教室技術員の方々及び中央組織技術室の方々に深く感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Ohmori K, Takada A, Yoneda T et al : Differentiation-dependent expression of sialyl stage-specific embryonic antigen-1 and I-antigens on human lymphoid cells and its implications for carbohydrate-mediated adhesion to vascular endothelium. *Blood* 81: 101-111, 1993
- 2) Ohmori K, Yoneda T, Ishihara G et al : Sialyl SSEA-I antigen as a carbohydrate marker of human natural killer cells and immature lymphoid cells. *Blood* 74 : 255-261, 1989

- 3) Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FC et al : ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, Sialyl-Lex. *Science* 250 : 1130-1132, 1990
- 4) Paavonen T, Renkonen R : Selective expression of sialyl-Lewis X and Lewis A epitopes, putative ligands for L-selectin, on peripheral lymph-node high endothelial venules. *Am J Pathol* 141 : 1259-1264, 1992
- 5) Kasai K, Kameya T, Ono M. et al : Relationships among expression, transcription and rearrangement of T-cell receptor gene in T-cell lymphomas. *Virchows Archiv A [Pathol Anat]* 417 : 57-65, 1990
- 6) Fukushima K, Hirota M, Terasaki PI et al : Characterization of sialosylated Lewis X as a new tumor-associated antigen. *Cancer Res* 44 : 5279-5285, 1984
- 7) Hsu S-M, Raine L, Fanger H : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29 : 577-580, 1981
- 8) Takahashi K, Yamaguchi H, Ishizeki J et al : Immunohistochemical and immunoelectron microscopic localization of S-100 protein in the interdigitating reticulum cells of the human lymph node. *Virchows Arch B [Cell Pathol]* 37 : 125-135, 1981
- 9) Weiss L, Beckstead JH, Warnke RA et al : Leu-6-expressing cells in lymph nodes: Dendritic cells phenotypically similar to interdigitating cells. *Hum Pathol* 17 : 179-184, 1986
- 10) Ruco LP, Pulford KA, Mason DY et al : Expression of macrophage-associated antigens in tissues involved by Langerhans' cell histiocytosis (histiocytosis X). *Am J Clin Pathol* 92 : 273-279, 1989
- 11) Munro JM, Lo SK, Corless C et al : Expression of sialyl-Lewis X, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes, and lymphoid tissues. *Am J Pathol* 141 : 1397-1408, 1992
- 12) Streilein JW, Grammer SF, Yoshikawa T. et al : Functional dichotomy between Langerhans cells that present antigen to naive and to memory/effector T lymphocytes. *Immunol Rev* 117 : 159-183, 1990
- 13) 松浦晃洋、菊地浩吉. CD1ファミリー分子の新展開 - 抗原提示分子としての再認識 - 免疫

- Immunology frontier 6 : 203-212, 1996
- 14) Bendelac A : CD1 : Presenting unusual antigens to unusual T lymphocytes. Science 269 : 185-186, 1995
- 15) Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA et al : CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. Science 269 : 227-230 , 1995
- 16) Porcelli S, Brenner MB, Greenstein JL et al : Recognition of cluster of differentiation 1 antigen by human CD4-8-cytolytic T lymphocytes. Nature 341 : 477-450, 1989

## Immunohistochemical Localization of Sialyl Lewis X Expression in Dendritic Cells

Kiyoshi KASAI<sup>1</sup>, Shinichiro KON<sup>2</sup>, Akihiro MATSUURA<sup>2</sup>, Kokichi KIKUCHI<sup>2</sup>

Department of Nursing, School of Health Sciences, Sapporo Medical University<sup>1</sup>

Department of 1st Pathology, School of Medicine, Sapporo Medical University<sup>2</sup>

### Abstract

Tissue distribution of sialyl Lewis X (SLEX) in the lymphoid tissues and peripheral blood lymphocytes was studied by immunohistochemistry and flow cytometry. SLEX was expressed in the subpopulation of T cells and natural killer cells of peripheral blood and histiocytes of paracortical areas of lymph nodes. In the dermatopathic lymphadenopathy, some S100+dendritic cells of the paracortical area were positive for SLEX. A subpopulation of CD1a-positive epidermal dendritic cells expressed SLEX. These results showed that SLEX was expressed in a subpopulation of Langerhans cells, which are antigen-presenting cells to T-cells. The migration of Langerhans cells from skin to lymph nodes is thought to be performed via the interaction of SLEX of Langerhans cells and E-selectin of the endothelial cells.

Key words : Sialyl Lewis X, Langerhans cells, Dendritic cells, CD1 antigen