

学位論文  
Doctor's Thesis

論文名 : ヒト樹状細胞に発現する遺伝子群の同定と解析  
(Identification and analysis of the genes expressed  
in human dendritic cells)

著者名 : 増田 聖子  
Masuda Masako

指導教官名 : 耳鼻咽喉科学講座教授  
湯本 英二  
免疫識別学講座教授  
西村 泰治

審査委員名 : 分子病理学講座担当教授 山本 哲郎  
分子免疫学講座担当教授 阪口 薫雄  
腫瘍医学講座担当教授 佐谷 秀行  
造血発生学講座担当教授 須田 年生

2002年3月

# 目次

1	要旨	3
2	発表論文リスト	6
3	謝辞	7
4	略語一覧	8
5	研究の背景と目的	9
	(1) 樹状細胞のライフサイクル	
	(2) ヒト樹状細胞のサブセットと機能	
	(3) 樹状細胞を標的とした免疫療法	
	(4) 樹状細胞に発現する遺伝子とその機能	
	(5) 本研究の目的	
6	実験方法	18
	(1) 細胞の調整	
	(2) 細胞表面マーカーの解析	
	(3) PCR を用いた cDNA サブトラクション法	
	(4) 樹状細胞 cDNA サブトラクションライブラリーのディファレンシャルスクリーニング	
	(5) シークエンス解析	
	(6) 同定された既知の遺伝子の各抗原提示細胞における発現解析	
	(7) 新規遺伝子のクローニング	
	(8) 新規遺伝子の抗原提示細胞群、組織における発現解析	
	(9) 新規分子に対するウサギポリクローナル抗体の作製	
	(10) 新規分子の細胞内局在の解析	
	(11) DCNP1 の正常組織における発現の解析	
7	実験結果	26
	(1) In vitro で分化誘導されたヒト樹状細胞の表現型	
	(2) ヒト樹状細胞 cDNA ライブラリーの構築	
	(3) ディファレンシャルスクリーニングで同定された遺伝子	
	(4) 既知の遺伝子群の RT-PCR	
	(5) 新規遺伝子 DCNP1 の同定	
	(6) DCNP1 遺伝子の発現解析	

(7) DCNP1 分子の細胞内局在の解析	
(8) DCNP1 分子の組織分布	
(9) 新規遺伝子 DC1373 の同定	
(10) DC1373 遺伝子の発現解析	
(11) DC1373 の細胞内局在の解析	
(12) 新規遺伝子 DC1458 の同定	
(13) DC1458 遺伝子の発現解析	
8 考察	33
(1)サブトラクション法のストラテジー	
(2)樹状細胞で遺伝子発現が増加していた既知の遺伝子群	
(3)新規遺伝子 DCNP1 について	
(4)その他の新規遺伝子について	
9 終わりに	39
10 図およびその説明	40
11 表およびその説明	63
12 参考文献	67

## 1 要旨

樹状細胞はナイーブ T 細胞を活性化することができる唯一の抗原提示細胞であり、適応免疫系において重要な役割を果たしていることが知られている。最近では末梢における免疫寛容の維持にも関わっているという報告が相次いでいる。このような樹状細胞の特性から悪性腫瘍や自己免疫疾患の治療、移植臓器の拒絶反応回避などに樹状細胞を利用しようという試みが活発になされている。

本研究は樹状細胞に特異的な機能を遺伝子レベルで解析することを目的とし、樹状細胞に発現する遺伝子のプロファイリングを試みた。ヒト CD34 陽性幹細胞から *in vitro* で分化誘導した樹状細胞に由来する cDNA と末梢血単球に由来する cDNA の間で cDNA サブトラクションを行い、樹状細胞のサブトラクションライブラリーを作製した。このライブラリーを樹状細胞 cDNA プロブと単球 cDNA プロブを用いてディファレンシャルスクリーニングを行い、単球よりも樹状細胞に高発現する遺伝子群を多数同定した。この中には今まで樹状細胞における発現の報告のない遺伝子も含まれており、これらの遺伝子に対して RT-PCR を行い、樹状細胞および単球における遺伝子発現の検討を行った。さらにディファレンシャルスクリーニングの結果、単球より樹状細胞で発現量が増加していると思われたクローンから、3 種類のヒト新規遺伝子のクローニングを行った。DCNP1 (dendritic cell nuclear protein 1)、DC1373 および DC1458 である。

これらの新規遺伝子のノザンプロット解析の結果、DCNP1 と DC1458 は B 細胞と単球には遺伝子の発現が同定できず、樹状細胞にのみ強い発現を認めた。さらにヒト各種正常組織においても、発現している臓器は限定されていた。一方 DC1373 はこれらのどの細胞にも発現しており、またほとんどの臓器において発現を認め、ユビキタスに発現する遺伝子である可能性が高いと考えられた。次にこれらの新規遺伝子に対するウサギポリクローナル抗体の作製を行った。樹状細胞に対する免疫組織化学解析を行った結果、DCNP1 は核、特に核の周辺部に局在していた。また DC1373 は細胞全体に染色が見られた。さらに DCNP1 に対して、ヒト脾臓、リンパ節、肝臓、脳の切片の免疫染色を試みた。すべての組織でごく少数の陽性細胞が見られた。陽性細胞の組織分布は赤脾髄、リンパ節髄質、肝類同内に限局しており、大脳ではミクログリアの一部に染色がみ

られた。この分布は樹状細胞やマクロファージなどのミエロイド系細胞に特異的なマーカーである CD68 陽性細胞の分布と類似しており、CD68 陽性細胞のごく一部に DCNP1 陽性細胞があることが確認された。

本研究のデータは DCNP1 が樹状細胞に特異的に発現する新規分子であることを示唆する。また DC1458 も樹状細胞の成熟化に伴って発現する分子である可能性がある。

## Summary

Dendritic cells (DC) are potent antigen-presenting cells (APCs). Among so-called professional APCs, only DCs can activate naive T cells to initiate immune response. To better understand the molecular mechanisms underlying unique function of DCs, we searched for genes specifically expressed in human DCs, using PCR-based cDNA subtraction in conjunction with differential screening. cDNAs generated from CD34<sup>+</sup> haematopoietic stem cell-derived CD1a<sup>+</sup> DC were subtracted with cDNA from monocytes and used for generation of a cDNA library. The cDNA library was differentially screened to select genes expressed in DCs more abundantly than in monocytes.

Most of selected genes were those previously implicated in DC function, but among of them, some of DC-specific genes which had not been reported before were included. We performed RT-PCR for such genes in dendritic cells and monocytes. Furthermore, we identified three novel genes. One gene encoding a protein composed of 244 amino acids, which we designated as DCNP1 (dendritic cell nuclear protein1). In Northern blot analysis, DCNP1 mRNA was highly expressed in mature DCs and at lower level in immature DCs. In contrast, monocytes and B cells do not express the gene. In multiple human tissue Northern blot analysis, expression of DCNP1 was detected evidently in brain and skeletal muscle. To examine subcellular localization of DCNP1, we did immunofluorescence analysis using anti-DCNP1 polyclonal antibody and found that the molecule is localized mainly in the perinucleus. By immunohistochemical analysis, we compared the expression of DCNP1 with CD68, a marker for DC and macrophage, in spleen, lymph node, liver, and brain. DCNP1-positive cells showed a similar tissue distribution to CD68-positive cells. However, the number of DCNP1-positive cells were much smaller than that of CD68-positive cells. The result consistent to that DCNP1 is specifically expressed in DCs. We also identified DC1373 and DC1458 and performed northern blot analysis of these genes. DC1373 mRNA was expressed in various blood cells and tissues, suggesting that it is a ubiquitous gene. DC1458 was composed 1073 amino acids and had a RGD motif. DC1458 mRNA expressed in mature DCs, but not detected in immature DCs, monocytes and B cells. The data suggest the potential involvement of DC1458 in function of DCs.

## 2 発表論文リスト

Masako Masuda, Satoru Senju, Shin-ichiro Fujii, Yasuhiro Terasaki, Motohiro Takeya, Shin-ichi Hashimoto, Kouji Matsushima, Eiji Yumoto, and Yasuharu Nishimura. Identification and Immunocytochemical Analysis of DCNP1, a Dendritic Cell-Associated Nuclear Protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications** . (2001) in press.

### 3 謝辞

本研究を行うにあたり、御指導くださいました熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座西村泰治教授、同耳鼻咽喉科学講座湯本英二教授に深く感謝致します。また、研究方法に関して直接御指導をいただいた熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座千住覚講師および入江厚助手に深く感謝致します。樹状細胞の培養方法を御指導くださいました国立熊本病院臨床研究部藤井真一郎先生、清水加奈子先生、樹状細胞の cDNA ライブラリーを御提供くださいました東京大学大学院医学研究科分子予防医学講座松島綱治教授、橋本真一助手、および免疫組織化学解析の御指導をいただいた熊本大学医学部病理学第二講座竹屋元裕教授、寺崎泰弘助手、田中真紀子技能補助員の方々に深謝いたします。また、臍帯血を御供与くださいました医療法人愛育会福田病院福田稠理事長および松井和夫院長、熊本市立熊本産院松尾勇院長に御礼申し上げます。ヒトリコンピナント IL-4 を御提供くださいました小野薬品工業株式会社山崎真一先生、TNF- $\alpha$  を御提供くださいました旭化成工業株式会社ライフサイエンス基礎研究所坂野誠治先生、GM-CSF を御提供くださいましたキリンビール株式会社今村寛司先生、田中義裕先生、曾我博先生に深謝致します。



## 4 略語一覽

bp: base pair

cDNA: complementary DNA

DC: dendritic cell

EST: expressed sequence tag

FITC; fluorescein isothiocyanate

GM-CSF; granulocyte-macrophage colony stimulating factor

HLA: human histocompatibility leukocyte antigen

IFN: interferon

Ig: immunoglobulin

Ii: invariant chain

IL: interleukin

KLH: keyhole limpet hemocyanin

LPS; lipopolysaccharide

MHC: major histocompatibility complex

mRNA: messenger RNA

PBMC: peripheral blood mononuclear cell

PBS: phosphate-buffered saline

PE; phycoerythrin

5' -RACE: 5'- rapid amplification of cDNA ends

RT-PCR; reverse transcriptase-polymerase chain reaction

TCR: T cell receptor

TGF: transforming growth factor

TNF: tumor necrosing factor

## 5 研究の背景と目的

### (1) 樹状細胞のライフサイクル (図 1)

T 細胞に抗原を提示して、これを活性化する抗原提示細胞には B 細胞、マクロファージ、そして樹状細胞の 3 種類があるが、この中で樹状細胞だけが、まだ一度も抗原に感作されたことがないナイーブ T 細胞を活性化する能力を持っている。したがって樹状細胞は抗原特異的な免疫応答の開始に不可欠な細胞であるといえる。

骨髄で作られた樹状細胞の前駆細胞は、GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)などの造血サイトカインによって樹状細胞に分化し、皮膚や粘膜などの病原微生物の侵入門戸となる組織に分布する(1)。これらのいわゆる末梢組織に存在する樹状細胞は“未熟な”樹状細胞であり、T 細胞を活性化する能力は低い、抗原をさかんに取り込み、消化する能力をもっている。微生物が侵入すると、未熟樹状細胞は様々な方法でそれを取り込み、菌体成分 LPS (lipopolysaccharide)や炎症性サイトカイン IL (interleukin)- $1\beta$ 、TNF (tumor necrosing factor)- $\alpha$ などの刺激を受けて活性化し、“成熟”樹状細胞になるとともに、リンパ管に入り、所属リンパ節の T 細胞領域に移動する。この過程で成熟樹状細胞は抗原を取り込む能力を失うが、抗原由来のペプチドと主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex ; MHC) 分子の複合体を形成し(2)、この複合体は CD80、CD86 などの共刺激分子とともにクラスターを作り、細胞表面に運ばれる(3)。樹状細胞の最終的な成熟の完成には、T 細胞との相互作用が重要な役割を演じている。すなわち抗原提示を受けた T 細胞が活性化する過程で発現してくる TNF/TNFR ファミリーの膜表面分子や IFN (interferon)- $\gamma$ などのサイトカインが樹状細胞の成熟を誘導する。そして逆に樹状細胞からの補助刺激により T 細胞の活性化や寛容の誘導、Th1 細胞や Th2 細胞への分化が調節される(1, 4)。T 細胞を活性化した樹状細胞はすみやかにアポトーシスにより死滅し、抗原特異的 T 細胞応答は終息に向かう(5)。

このように、樹状細胞は抗原刺激を引き金に局在や機能をダイナミックに変化させてゆき、抗原特異的な免疫反応を惹起する重要な役割を担っている。

### (2) ヒト樹状細胞のサブセットと機能

樹状細胞は当初は別々の細胞として同定された細胞が、MHC クラス II を発現しており、しかも骨髄幹細胞に由来することから樹状細胞としてまとめられたものである。ヒトの樹状細胞については起源の違いによる分類がよく用いられているが、組織分布、機能、最終的に免疫応答を正負のどちらに制御するか、などを考慮すると、非常に多様な細胞集団である。最近の知見では、同じ起源の樹状細胞でも、成熟段階、炎症の有無、影響するサイトカインやケモカイン、取り込む抗原の種類や状態などにより、異なる機能や免疫応答を発現すると考えられている。ここでは便宜上、前駆細胞による分類を述べる。

ヒト樹状細胞は CD11c の発現の有無により、陽性細胞はミエロイド系樹状細胞(DC1)に、陰性細胞はリンパ球系樹状細胞(DC2)に分類される。ミエロイド系樹状細胞に所属する細胞としてランゲルハンス細胞や間質細胞 (Interstitial cell) があるが、組織に至る以前の前駆細胞が末梢血中に存在し、CD11c、CD1a、MHC クラス II が陽性であることが知られている(6)。また、末梢血中の単球も GM-CSF、IL-4 存在下にミエロイド系樹状細胞に分化する能力がある。一方、未熟な DC2 は形質細胞様細胞などと呼ばれ、IL-3 依存性に CD40 を介した刺激により成熟するが、未熟な細胞はウイルス感染の際に、非常に多量の I 型インターフェロン(IFN- $\alpha/\beta$ )を産生することを特徴とし、自らの IFN- $\alpha/\beta$ 、TNF- $\alpha$ の作用によっても成熟することが報告されている(7, 8)。

また免疫応答が誘導され、リンパ節において胚中心が形成されて B 細胞が活発に増殖を始めると、この領域に CD11c<sup>+</sup>の樹状細胞が出現してくることが示されている。この細胞は胚中心樹状細胞と呼ばれており、その表現型はリンパ節胚中心に分布する濾胞樹状細胞とは大きく異なっている(9)。これらの細胞は末梢血の前駆細胞が血行性に直接リンパ節の T 細胞領域に入り、胚中心へと移動し分化したものと考えられている。

### (3) 樹状細胞を標的とした免疫療法

樹状細胞の強力な抗原提示能、T 細胞活性化能に着目して、抗腫瘍免疫応答や感染免疫応答を誘導しようとする試みが、臨床的に開始されている。

今までに様々なヒト癌抗原が同定されており(10, 11)、担癌患者にこれらのペプチドや蛋白を投与すると生体内で主に樹状細胞を介して抗原提示が行われ、抗原特異的 T 細胞や B 細胞が誘導される。これらの免疫療法はある程度の効果が認められているが、本来免疫原性の弱い癌抗原に対して強い免疫応答を惹起

させるのは容易ではなく、今後様々な免疫効果を高める工夫が必要である。その効率を上げるための重要な要素の一つは、癌抗原を認識する T 細胞を活性化させる樹状細胞をどのように活用するかである。実験動物では体外で癌抗原（ペプチド、蛋白）で感作した樹状細胞(12, 13)や、癌抗原を遺伝子導入により強制発現させた樹状細胞を投与することにより(14, 15)、ペプチドの直接投与よりも癌抗原に対するワクチン効果が高まることが知られている。欧米ではすでに樹状細胞を用いた臨床試験が盛んに行われている(16-18)。しかし、樹状細胞の使用法については、(1)種類（末梢血単球由来、骨髄造血幹細胞由来）、(2)単離法、(3)成熟度（未熟、成熟、活性化）、(4)投与方法(静脈内、皮内、皮下、リンパ節、腫瘍内)、(5)ターゲットにすべき癌抗原の種類、ならびに(6)癌抗原の感作方法、など検討すべき課題が多く残されている。

従来、樹状細胞は免疫応答を増強させるためのアジュバントとして注目されてきた。しかし肝臓の樹状細胞(19, 20)、in vitro で IL-10 投与を繰り返し行われた樹状細胞(21)、マウス CD8 $\alpha$ 陽性のリンパ球系樹状細胞(22)などは、いずれも免疫寛容を誘導できるという報告がなされている。これらのサブセットはいずれも未熟な状態の樹状細胞であり、CD80 や CD86 などの共刺激分子の発現が低く、T 細胞にアナジーを誘導している可能性がある。また樹状細胞は絶えず生体内のアポトーシスに陥った細胞を取り込んでいるが、これらの本来 MHC クラス II 経路に入るべき外来性抗原をクラス I 経路にのせる、クロスプライミングと呼ばれている反応により CD8 陽性 T 細胞に提示し、この T 細胞にトランスを誘導しているという報告もある(23)。この場合に、LPS や炎症性サイトカインなどのいわゆる danger signal が加わると、樹状細胞は成熟化をおこし、T 細胞や B 細胞を活性化するようになると考えられている(24)。また、肺の樹状細胞が抗原に暴露されると IL-10 を産生し、調節性 T (Tr) 細胞様の細胞を誘導するという報告もあり(25)、樹状細胞は多種多様な方法で免疫寛容の誘導を行っている可能性がある。このような樹状細胞の特性を利用して、自己免疫疾患の治療や移植臓器に対する拒絶反応の予防に用いようとする試みも、実験動物レベルで行われはじめている(26)。

抗原遺伝子やサイトカイン遺伝子、細胞表面分子などをコードする遺伝子を樹状細胞へ導入し、樹状細胞による特異的免疫誘導効果を増強あるいは抑制する試みも盛んに行われている。抗原遺伝子が同定されていない場合、サイトカインや細胞表面分子などにより樹状細胞のアジュバント効果を高めることがで

できれば、非常に有効である。IL-12 (27)や IL-18 (28)などの遺伝子を導入した樹状細胞を癌抗原で感作して体内に投与することにより、特異的 T 細胞の活性増強や CD4<sup>+</sup>T 細胞の Th1 細胞へのシフトがみられたり、Fas リガンド(29)や CTLA-4 (30)、IL-10/TGF- $\beta$  (31)を強制発現させた樹状細胞の投与によりアロ臓器に対する拒絶反応の抑制に効果があったという報告がみられる。また IL-4 遺伝子を導入した樹状細胞投与により、コラーゲン誘導性関節炎の発症を抑制することができる(32)など、Th1/Th2 バランスを調整することで自己免疫疾患の治療にも応用できる可能性がある。ただし分化した樹状細胞はほとんど増殖能がないことから、樹状細胞への遺伝子導入は効率が悪く、現状ではアデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターなどのウイルスベクターを用いなければならず、安全性のうえで問題が残されている。また自己正常組織に対する免疫応答や、逆に免疫不全状態をおこさないようにするためには、抗原特異的な免疫応答を正確に誘導する必要があり、まだ解決すべき問題点は多い。

#### (4) 樹状細胞に発現する遺伝子とその機能

これまでに述べたような樹状細胞の機能は当然様々な遺伝子により担われていると考えられ、その中には樹状細胞に特異的に発現している遺伝子も含まれるであろう。樹状細胞の機能を理解するうえで、樹状細胞に発現する遺伝子の解析は興味のもたれるところであり、また現在精力的に行われている遺伝子改変樹状細胞ワクチンの開発においても重要な情報を提供すると考えられる。

これまでに樹状細胞において同定された遺伝子が数多く報告されており、その主なものを表 1 に示す(33-56)。樹状細胞に発現する遺伝子の同定は数年前よりさかんに行われているが、そのほとんどについて機能は確認されていない。

##### (a) 樹状細胞による抗原の取り込みに関連する分子

未熟な樹状細胞はマクロファージに比べると貪食能では劣るが、多様な食細胞機能をもつことが知られている。0.1~0.5 $\mu$ m の可溶性抗原や液体は液相エンドサイトーシス・飲作用により細胞内に取り込まれ、0.5~3 $\mu$ m の比較的大型の物質はマクロエンドサイトーシス・大飲作用により捕食され、さらに大型の粒子状抗原は貪食作用によって細胞内に輸送される。未熟樹状細胞は大飲作用により細胞外の液体を摂取・濃縮しているが、アクアポリンファミリーに属する AQP3 および AQP7 が細胞膜を介する液体の速やかな交換に関与している(57)。

また各種レセプターによる吸着性エンドサイトーシスが認められる。Fc レセプターや補体レセプターによる抗原抗体複合体の取り込み(58)、インテグリン分子を介するもの(59)、さらに C 型レクチンとして糖鎖を認識するマンノースレセプターまたはスカベンジャーレセプターなど(60)が知られている。最近樹状細胞に発現する C 型レクチンが幾つか同定された(33-35, 39, 41, 43)。DEC-205 はマウス I 型 C 型レクチンであり、抗原の取り込み及びプロセッシングに関わる(43)。Langerin はヒトランゲルハンス細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体が認識している分子として同定された II 型 C 型レクチンであり、吸着した抗原とともに細胞質内に取り込まれ、バーベック顆粒の形成に関わることがわかっている。しかし Langerin は MHC クラス II 分子と会合しないことから、外来性抗原を MHC クラス I 経路にのせる、いわゆるクロスプレゼンテーションに関わっている可能性がある(35)。Dectin-2 (33)、CLEC-1 (34)なども樹状細胞関連 C 型レクチンとしてクローニングされたが、糖鎖抗原の取り込みに関わっていることが予想される。また、クロスプレゼンテーション機能に関わるとされているレセプターにインテグリン $\alpha\beta 5$  /スカベンジャーレセプター CD36 と CD91 がある。未熟樹状細胞は $\alpha\beta 5$  / CD36 複合体を介してアポトーシス細胞を取り込み、MHC クラス I および MHC クラス II の両方の分子にペプチドを負荷し、CD4/CD8 陽性 T 細胞に抗原を提示する(59)。また CD91 は gp96, hsp90, hsp70 などの熱ショック蛋白質に共通するレセプターであり(61)、抗原と結合したこれらの熱ショック蛋白質を認識して細胞内に取り込み、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞を活性化するとされている(62)。

#### (b) 樹状細胞の成熟化およびリンパ組織への遊走に関連する分子

抗原刺激は未熟な樹状細胞に形態的および機能的変化、いわゆる成熟化を誘導する。樹状細胞の成熟化を制御する因子は多数報告されている。(a) 菌体成分 LPS (4)や大腸菌 DNA (63, 64)、ウイルス 2 本鎖 RNA (65)などの病原体に関連する分子。(b) TNF、IL-1、IL-6、IL-10、TGF- $\beta$  などの局所の炎症性および抗炎症性のサイトカイン。(c) T 細胞から受けるシグナル、などである。成熟化に伴い、樹状細胞には (a)抗原の取り込みに関わるレセプターの減少、(b)CD40、CD58、CD80、CD86 などの共刺激分子の発現増加、(c)形態の変化、(d)ライソソームにおける CD68 分子の減少と DC-LAMP の発現増加(40)、などの様々な変化が起こる。Actin-bundling protein である p55/fascin は成熟樹状細胞で発現が

上昇しており(36)、ランゲルハンス細胞に p55/fascin のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入したところ、成熟化が阻害されたという報告があり(66)、形態的变化が成熟化に関わることが想定される。

成熟化の過程で樹状細胞は血管から末梢組織、末梢組織からリンパ管、リンパ管から所属リンパ節、さらにその T 細胞領域へと局在を変化させていくが、これに関わるケモカイン群が明らかになりつつある(67)(図 1)。最近の知見では、樹状細胞の前駆細胞は CCR6 を発現しており、MIP-1 $\beta$ 、MIP-5、MCP-3、MCP-4、RANTES、TECK、SDF-1 などのケモカインに反応することが知られている。この前駆細胞が CCR6 を介して MIP-3 $\alpha$ /LARC に反応することが、表皮への遊走に重要であると考えられている(68)。この表皮のランゲルハンス細胞が成熟すると CCR6 の発現は減少し、かわりに CCR7 が発現するようになる(69)。CCR7 は SLC と ELC の受容体で、SLC はリンパ管の内皮細胞、リンパ節 T 細胞領域に存在するストローマ細胞、細静脈の高内皮細胞などに発現しており、ELC は樹状細胞自身が分泌する(70)。これらのケモカインが樹状細胞のリンパ管、さらにはリンパ組織の T 細胞領域への遊走を促す。

#### (c) MHC クラス II 分子による抗原の提示と関連する分子 (図 2)

種々のメカニズムにより取り込まれた抗原はエンドソームからリソソームへと運搬される過程でタンパク質分解酵素により消化・分解され、これによって生じた抗原ペプチドが細胞内で生成されてくる MHC クラス II 分子に結合する。

取り込まれた外来抗原は、まず初期エンドソーム内で分解が開始される。この小胞内の pH は 6.0 程度であるが、初期エンドソームが次第に細胞質内へと移動していく過程で小胞内の pH が次第に低下し、この中にゴルジ装置を経て輸送されてきた MHC クラス II 分子が見られるようになる。このような小胞は初期 MIIC (MHC class II compartment) と呼ばれ、ここから最終的に MHC クラス II 分子/抗原ペプチド複合体が形成され細胞表面へと運ばれる過程は、MHC クラス II 分子とインバリアント鎖の結合様式の変化および小胞の性状の変化を伴う。

粗面小胞体で合成された MHC クラス II 分子は抗原結合部位である $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の先端にあるペプチド収容溝にインバリアント鎖(Ii)と呼ばれる蛋白質を結合する。さらにおのおのの3分子が会合し9量体を形成して粗面小胞体から初期MIICに輸送される。初期MIICが後期エンドソームへと変遷していく過程で、Iiは

アスパラギン酸プロテアーゼによる分解、さらにシステインプロテアーゼによる分解を受け、SLIP (small leupeptin-induced protein)となり、MHC クラス II  $\alpha$ 鎖  $\beta$ 鎖分子と 3 量体を形成する。この段階で樹状細胞に成熟刺激が加わるとカテプシン S の作用により、Ii の N 末端が切断されて CLIP (class II associated invariant chain peptide) となる。この成熟刺激が加わらなかった場合はカテプシン S の抑制因子であるシスタチン C の作用によりカテプシン S の作用が抑制されるため、Ii の N 末端が切断が行われず、このままりソソームへと輸送され、分解される。成熟刺激を受けた樹状細胞ではシスタチン C によるカテプシン S の抑制作用が低下し、また MHC クラス II 分子の合成速度も一過性に上昇するため、CLIP を結合した MHC クラス II 分子が多数生成されることになる。その後 CLIP は触媒として機能する MLA-DM(マウスでは H-2M)の作用を受けて MHC クラス II 分子より離れ、代わりに抗原ペプチドが結合する。MHC クラス II 分子/ペプチド複合体は CIIV(class II vesicle)を経て、細胞表面へと輸送される(71)。

#### (d) MHC クラス I 分子による抗原の提示と関連する分子 (図 2)

外来物質由来の抗原ペプチドが MHC クラス II 分子に結合するのに対し、MHC クラス I 分子には感染したウイルスが産生する抗原や癌抗原といった内因性抗原に由来するペプチドが結合する。細胞質内で生成された抗原はユビキチン化された後、プロテアソームにより分解される。プロテアソームは 7 個のサブユニットで形成されるドーナツ状の輪が 4 つ重なった円筒状をしており、円筒構造の内側にはタンパク質分解の活性中心を持つことがわかっている。ユビキチン化された内因性抗原はこの内側を通過することにより、ペプチドに分解される。プロセッシングを受けた内因性抗原ペプチドはシャペロンとして機能する hsp70 や hsp90 の働きにより TAP トランスポーターを通過して粗面小胞体内に輸送され、生成された MHC クラス I 分子に結合する。

新たに合成された MHC クラス I 分子は  $\beta_2$  ミクログロブリン( $\beta_2m$ )を結合しておらず、カルネキシンと呼ばれる小胞体膜結合タンパク質と N-グリカンを介して複合体を形成し、粗面小胞体に結合している。グリコシダーゼ II によりカルネキシンが遊離すると、 $\beta_2m$  およびカルレティキュリンが結合し、S-S 結合ならびに  $\alpha$ 鎖の会合がおこる。その後 TAP-associated glycoprotein であるタパシンと結合する。タパシンは TAP トランスポーターに結合し、カルレティキュリン-MHC クラス I 分子-タパシン-TAP トランスポーターの複合体が形成される。タ



パシンはシャペロンとしての活性を有するため、TAP トランスポーター内部を通過して輸送されているペプチドは近傍の MHC クラス I 分子に結合することになる。その後、ペプチド-MHC クラス I 結合体は粗面小胞体を離れて、ゴルジ装置を経て、エクソサイトーシスにより細胞表面へ運ばれる。

#### (e) T 細胞との相互作用にかかわる分子 (図 3)

T 細胞による MHC/抗原ペプチド複合体の認識には 2 次シグナルとして多くの接着分子、共刺激分子がかかわることが明らかにされている。MHC/抗原ペプチド複合体およびこれらの接着・共刺激分子は免疫シナプスと呼ばれる局所的相互作用領域を形成する(72)。この T 細胞と樹状細胞の最初の接着に重要な役割を果たしている可能性がある分子として、最近 DC-SIGN が同定された(39)。DC-SIGN は T 細胞の ICAM-3 に高親和性を示し、DC-SIGN からシグナルを受けた ICAM-3 は LFA-1 の活性化を誘導し、樹状細胞表面の ICAM-1 への結合性を高めていると推測されている。LFA-1/ICAM-1 の結合は CD28 分子と CD80/CD86 分子、CD2 分子と LFA-3 分子が集合し、さらに TCR 由来のシグナルにより TCR 周辺に LFA-1/ICAM-1 が移動して、この高親和性結合により免疫シナプスが形成される。最近 B7 ファミリーの新しい分子が幾つか見つかった。B7-RP1 分子は T 細胞上の ICOS と結合する(73)。B7-H1 (74)と B7-DC (75) は PD-1 と結合するが、T 細胞に抑制性のシグナルを伝達するとされている。また Sema4A はごく最近クローニングされたセマフォリンのファミリー分子であるが樹状細胞に強く発現しており、活性化 T 細胞に一過性に発現するリガンドに活性化シグナルを送る。

T 細胞との相互作用にもいくつかのケモカインが関わっている。T 細胞領域の成熟樹状細胞は ELC、DC-CK1 などもケモカインを産生してナイーブ T 細胞を引きつけ、抗原を認識する T 細胞のスクリーニングを行う。また樹状細胞は RANTES、IP-10、TARC、MDC などのケモカインを産生し、接触する T 細胞の分化や反応様式に影響を及ぼす。例えば Th 細胞の場合、Th1/Th2 への分化誘導のシグナルを伝えている。

#### (5) 本研究の目的

本研究は、*in vitro* で誘導されるヒト骨髄系樹状細胞と末梢血単球の遺伝子発現を比較検討し、樹状細胞で発現の増強している遺伝子のプロファイリング、

および、樹状細胞に特異的に発現する新規遺伝子を同定して解析することを目的とする。

## 6 実験方法

### (1) 細胞の調整

#### (a) 末梢血単球

健康人ボランティアの末梢血からフィコールを用いた比重遠心法により末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)を分離し、Dynabeads M-450 CD14 (Dyna) もしくは CD14 microbeads (Miltenyi Biotec)を用いて CD14 陽性単球を分離した。

#### (b) 末梢血単球由来樹状細胞 (図 4C)

上記(a)の方法で分離した単球を 6 穴プレートに  $5 \times 10^5$  個/ml になるように調整して培養を開始した。培養にはヒトリコンビナント GM-CSF (100 ng/ml)と IL-4 (100 U/ml)を加えた 10%ウシ胎児血清入り RPMI1640 をメディウムに用いた。培養 5 日目の細胞を回収して未熟樹状細胞として用いた。成熟樹状細胞は培養 5 日目に TNF- $\alpha$  を 20 ng/ml になるように加えて、更に 2 日間培養した細胞を用いた。

#### (c) 臍帯血 CD34 陽性幹細胞由来樹状細胞 (図 4B)

健康人臍帯血は医療法人福田病院、熊本市立熊本産院より御供与いただいた。臍帯血はクエン酸ナトリウム入り血液バック(テルモ)に採取し、2 日以内に使用した。臍帯血は RPMI1640 メディウムで 3~4 倍に希釈してから、フィコールによる比重遠心を行い、単核球層を分離採取した。DYNAL CD34 PROGENITOR CELL SELECTION SYSTEM を用いて、CD34 陽性幹細胞を分離した。CD34 陽性幹細胞は 12 穴プレートに  $1 \times 10^5$  個/ml になるように調整して培養を開始した。培養にはヒトリコンビナント GM-CSF (100 ng/ml)と TNF- $\alpha$  (2.5 ng/ml)を加えた 10%ウシ胎児血清入り RPMI1640 をメディウムとして用いた(76)。培養中、2、3 日おきにこのメディウムを適量追加した。培養 11 日目から 14 日目の間に、培養細胞を抗ヒト CD1a モノクローナル抗体をコートしたマグネットビーズ (Dyna)と反応させ、CD1a 陽性樹状細胞を採取した。

#### (d) 末梢血 B 細胞

上記(a)の単球と同様の方法で、PBMC よりヒト CD19 陽性マグネットビーズ (Dyna)を用いて B 細胞を精製した。なお、上記細胞分離の際に生じた残渣血液はオートクレーブ処理後焼却処分とした。

## (2) 細胞表面マーカーの解析

調整された細胞はフローサイトメトリー(FACSscan, Becton Dickinson)を用いて、細胞表面マーカーの解析を行った。本研究に用いた抗ヒトモノクローナル抗体は以下の通りである。

PE-CD1a(PHARMINGEN)  
FITC-CD3(PHARMINGEN)  
CD11c(IMMUNOTECH)  
FITC-CD14(PHARMINGEN)  
CD15(PHARMINGEN)  
FITC-CD19(PHARMINGEN)  
PE-CD83(IMMUNOTECH)  
FITC-CD86(PHARMINGEN)  
FITC-HLA-DR(PHARMINGEN)

蛍光標識一次抗体を用いる場合は直接法、未標識精製一次抗体の場合は各々のイムノグロブリンイソタイプを認識する蛍光標識二次抗体を反応させる間接法を用いて染色を行った。ネガティブコントロール染色では各々の特異抗体とイムノグロブリンイソタイプが一致する抗体を一次抗体として用いた。

## (3) PCR を用いた cDNA サブトラクション法

CD14 陽性単球と CD1a 陽性樹状細胞から TRIZOL reagent (GIBCO BRL)を用いて総 RNA を精製した。500  $\mu$ g の総 RNA からオリゴ(dT)セルロースカラム法 (mRNA Purification Kit, Amersham)によりポリ(A)RNA を精製した。

cDNA サブトラクションに用いる単球由来 mRNA と樹状細胞由来 mRNA を等量にするために、抽出された両 mRNA はホルムアルデヒドを用いた変性アガロースゲルに電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色をして、蛍光強度が同程度であることを確認した。また分光光度計を用いて吸光度測定を行い、等量の mRNA を使用した。

cDNA サブトラクション法は、CLONTECH 社の PCR-Select™ cDNA

Subtraction Kit を用いたが、樹状細胞由来 cDNA をテスターとして、単球由来 cDNA をドライバーとして用いた。図 5 にこの方法の概要を示す。また以下の幾つかの点で改良を加えた。①単球由来 mRNA と樹状細胞由来 mRNA を 2  $\mu$ g ずつ用いて、ファーストストランド cDNA の合成を行ったが、逆転写酵素はキットに含まれる AMV reverse transcriptase ではなく、SuperScript™ II reverse transcriptase (GIBCO BRL)を用い、より長い cDNA が合成されるようにした。②セカンドストランド cDNA の合成後、各々の 2 本鎖 cDNA を一部とって、 $\beta$ アクチン特異的プライマーにより PCR を行い、2 本鎖 cDNA の合成を確認してから次のステップへ進んだ。cDNA サブトラクションの効率を確認は、サブトラクションを行った樹状細胞 cDNA と、サブトラクション(単球 cDNA とのハイブリダイゼーション)を行わなかった樹状細胞 cDNA に対して同様に 2 回の PCR を行い、その PCR 産物をテンプレートにして、樹状細胞に特異的に発現するとされる DC-LAMP (40)と、単球から樹状細胞への分化過程で遺伝子発現量が増大するとされる gelsolin (77)に特異的な PCR を行った。

#### (4) 樹状細胞 cDNA サブトラクションライブラリーのディファレンシャルスクリーニング

cDNA サブトラクションにより生じた PCR 産物を pGEM-T Easy ベクター (Promega)へライゲーションして、樹状細胞 cDNA サブトラクションライブラリーを作製した。引き続きディファレンシャルスクリーニング法を行ったが、これは CLONTECH PCR-Select Differential Screening Kit の方法を参考にして行った。

T/A クローニングで得られた大腸菌コロニーを個別の LB 培地に移し、それぞれのコロニーについて 96 穴プレート内で LB 液体培地 100  $\mu$ l を用いて 37°C、16 時間で培養を行った。それぞれの大腸菌液 1  $\mu$ l をテンプレートにしてインサート cDNA の PCR を行った(Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600)。PCR 終了後、アガロースゲルで電気泳動を行い、PCR による増幅の有無を確認した。PCR がうまく行われていないクローンについては、PCR の条件を変え、再度ホットスタート法による PCR を行った。

cDNA クローン(PCR 終了後のサンプル)を、2 枚のポジティブチャージナイロンメンブレン(Hybond N<sup>+</sup>, Amersham)にそれぞれ 1  $\mu$ l ずつのせていった。こうして作製された 2 枚のメンブレンは 0.5M NaOH を含む溶液でアルカリ変性を行い、中和溶液で中和したあと、洗浄、固定を通常の方法で行った。

ディファレンシャルスクリーニングで用いたプローブは、等量の単球由来総 RNA と樹状細胞由来総 RNA から SuperScript™ II RT によりファーストストランド cDNA 合成する際に、<sup>32</sup>P-dCTP を用いてラジオアイソトープ標識を行った。プローブのラベルはオリゴ(dT)プライマーによるプライミングを行った。各々の標識 cDNA は液体シンチレーションカウンターを用いて比活性の測定を行い、ラベリングの効率を確認した。両者の比活性が異なる場合は、同程度の比活性になるように、ハイブリダイゼーションの時に使用するプローブの液量を調節した。

ハイブリダイゼーション液は MicroHyb Solution (Research Genetics) を用いたが、プレハイブリダイゼーションの時に poly dA と COT1 DNA (Research Genetics) を加えておき、非特異的結合を減少させるようにした。プレハイブリダイゼーションを 42℃、2 時間行った後、プローブを加えて 42℃、16 時間反応を行った。メンブレンの洗浄はハイブリダイゼーション液に適した洗浄方法を用いた。最後にオートラジオグラフィーによりシグナルを検出した。

#### (5) シークエンス解析

オートラジオグラフィーで検出されたシグナルの強度を肉眼的に比較して、樹状細胞プローブを用いた方で単球よりも強いシグナルが見られた cDNA クローンを選別した。それぞれの cDNA クローンに対応する大腸菌コロニーを(4)で記した個別の LB 培地から選択して増殖させ、大腸菌培養液をシークエンス反応のテンプレートとして用いた。シークエンス反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing, FS (Perkin-Elmer) を使用してプロトコールに従って行い、塩基配列の解析は ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer) を用いた。得られた塩基配列の検索は BLAST software を用いて行った。

#### (6) 同定された既知の遺伝子の各抗原提示細胞における発現解析

塩基配列の検索の結果、既知のヒト遺伝子との相同性が確認された cDNA クローンの中で、樹状細胞における遺伝子発現の報告のないものを選択して、各抗原提示細胞における遺伝子発現の有無を RT-PCR 法により確認した。単球、臍帯血 CD34 陽性細胞由来 CD1a 陽性樹状細胞、末梢血単球由来未熟および成熟樹状細胞から抽出した総 RNA からランダムヘキサマープライマーを用いて SuperScript™ II RT により cDNA を合成した。各々の遺伝子に特異的なプライ

マーは ORIGO 4.0 software を用いて設計したが、ゲノム DNA の増幅は検出されないよう、増幅される領域にイントロンを含むように配慮した(表 3)。一部の増幅がうまくいかなかった遺伝子については、過去の文献で増幅が確認されているプライマーを用いた(78)。比較対象のために  $\beta$  アクチン特異的なプライマーも同時に用いた。PCR は 95°C 1 分間、それぞれのプライマーに適したアニーリング温度(表 3)で 1 分間、72°C 1.5 分間でそれぞれ 18, 23, 28, 33, 38 サイクル行い、1% アガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイドで染色してバンドを検出した。

## (7) 新規遺伝子のクローニング

### (a) DCNP1

新規遺伝子(DCNP1)の cDNA を単離するために、ヒト単球由来未熟樹状細胞 cDNA ライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングを行った。このヒト樹状細胞 cDNA ライブラリーは共同研究の東京大学大学院医学研究科分子予防医学講座の橋本真一助手、松島綱治教授より御提供いただいた。cDNA サブトラクションおよびディファレンシャルスクリーニングにより単離された cDNA クローン 13-75 と相同性の高い、ヒト EST クローンの一つである EST clone IMAGE: 2345401 (GenBank Accession No. AI673027) から EcoRI と NotI の部位で切断した 1024bp の cDNA 断片をプローブとして用いた。このプローブを用いた未熟樹状細胞 cDNA ライブラリーとのハイブリダイゼーションスクリーニングにより得られた複数のファージクローンについて、in vivo エキシジョンを行い、続いて塩基配列を決定した。

### (b) DC1373

DC1373 の遺伝子全長のクローニングの方法の詳細を図 6 に示す。まず DC1373 の cDNA を単離するために DCNP1 と同様にヒト単球由来未熟樹状細胞 cDNA ライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングを行った。プローブは DC1373 cDNA クローンと相同性の高いヒト EST clone IMAGE: 2091438 (GenBank Accession No. AI376801) から EcoRI と NotI の部位で切断した 738bp の cDNA 断片をプローブとして用いた。さらに上流の塩基配列の同定に、EST データベースを参考にして作製した図 6 に示すような数種類のプライマーペアによる PCR を行い、PCR 産物のシーケンスをおこなった。次に 5' RACE 法 (5'

RACESystem for Rapid Amplification of cDNA Ends, ver.2; GIBCO BRL)を行い、さらに Jurkat cell cDNA ライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングを行った。

(c) DC1458

新規遺伝子 DC1458 についてもハイブリダイゼーションスクリーニングによるクローニングを行ったが、ヒト精巣由来 cDNA ライブラリー (Clontech)を用いた。DC1458 と相同性の高い KIAA1350 cDNA クローンをかずさ DNA 研究所より入手し、Sal I と EcoRI の部位で切断した 1813bp の cDNA 断片をプローブとして用いた。

(8) 新規遺伝子の抗原提示細胞群、組織における発現解析

ヒト単球由来未熟および成熟樹状細胞、末梢血単球、末梢血 B 細胞から TRIZOL reagent を用いて総 RNA を抽出した。分光光度計を用いて吸光度測定を行い、それぞれ 20 $\mu$ g ずつの総 RNA を変性アガロースゲルに電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイド染色及びアルカリ変性、中和・脱色を通常の方法で行い、ポジティブチャージナイロンメンブレン(Hybond N<sup>+</sup>)にトランスファーして、ノザンプロット解析用メンブレンを作製した。また正常組織における遺伝子発現を解析するために、Human 12-Lane MTN Blot (Clontech)を用いた。これらのメンブレンとハイブリダイズさせる遺伝子特異的プローブは各々以下のものを <sup>32</sup>P で標識して用いた。

(a)DCNP1: クローニングをする際にハイブリダイゼーションスクリーニング

のプローブとして用いた 1024bp の EST clone IMAGE: 2345401 断片、及び DCNP1 のアミノ酸基末端部分の PCR 産物 (センスプライマー、5'-CAGAACCCAAGGGCTTACCTGT -3'、アンチセンスプライマー、5'-CACTGCTGCTTTTCATCAGACC -3') 209bp を用いた。

(b)DC1373: クローニングをする際のハイブリダイゼーションスクリーニング

に用いたヒト EST clone IMAGE: 2091438 から EcoRI と NotI の部位で切断した 738bp の cDNA 断片。

(c)DC1458; KIAA1350 cDNA クローンから BamHI と EcoRI の部位で切断した 436bp の断片。



#### (9) 新規分子に対するウサギポリクローナル抗体の作製

新規遺伝子がコードする蛋白質に対する抗体を得るために、抗ペプチド抗体の作製を行った。ペプチドは蛋白質のアミノ酸基末端もしくはカルボキシル基末端近傍で、親水性の高いアミノ酸を多く含む領域を選択するようにした。まず、ペプチド合成機 (PSSM8、島津製作所) を使って、FMOC 法により以下のようなペプチドを合成した。後述の keyhole limpet hemocyanin (KLH) との結合のため、システインを含まないペプチドはアミノ酸基末端にシステインを付加した。

DCNP1: 10-25 CQNSRSHGLETVPGHQR

DC1373: 118-133 ETTCSSHSSPGEGASPQ

合成したペプチドは HPLC 精製を行い、PIERCE の Inject Maleimide Activated mcKLH を用いてキャリアプロテインである KLH と結合させた。KLH 結合ペプチドはアジュバントと混合してウサギに数回にわたり免疫を行い、血清は免疫に使用したペプチドを用いて、アフィニティーカラム精製を行った。なお、ペプチドの免疫および抗体の精製はトランスジェニック社に依頼した。

#### (10) 新規分子の細胞内局在の解析

(9) で作製されたポリクローナル抗体を用いて、免疫組織化学解析を行った。染色を行った単球由来成熟樹状細胞は、ポリ L リジンをコーティングしたチャンバースライド上で分化を誘導した。一次抗体は 200 倍に希釈して用いた。ネガティブコントロールとして、ウサギポリ IgG を 400 倍希釈したものを一次抗体として使用した。また抗体の特異性を確認するために、一次抗体を反応させる前に抗体の 100 倍のモル濃度のフリーのペプチドを抗体に加えて 30 分間反応させたものを一次抗体として使用し、染色がブロックされるか検討を行った。

反応はすべて室温で行った。樹状細胞を付着させたスライドを PBS (phosphate-buffered saline) 溶液で 3 回洗浄したあと、4%パラホルムアルデヒドを含む PBS 溶液で 10 分間固定し、PBS 溶液で 3 回洗浄、その後 0.1% Triton-X/PBS と 100% エタノールで 2 分間ずつ処理し、パーミアビリゼーションを行った。続いて 2% ウシ血清・2% ウシ血清アルブミン/PBS にて 30 分間ブロックし、一次抗体を室温で 1 時間反応させた。PBS 溶液で 3 回洗浄後 Cy3 で標識した抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham) で 30 分間反応させ、再び PBS 溶液で 3 回洗浄した。これを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### (11) DCNP1 の正常組織における発現の解析

ヒト正常組織における DCNP1 分子の発現を免疫染色により検討した。熊本大学医学部第二病理学講座竹屋元裕教授、寺崎助手、田中補助員に御協力いただき、ヒト脾臓、リンパ節、肝臓、脳における DCNP1 の免疫組織化学解析を行った。またマウス抗ヒト CD68 モノクローナル抗体(KP1, DAKO)(79)による染色も行った。

各組織は剖検例もしくは手術時に採取され、2%の periodatelysine paraformaldehyde で固定を行い、液体窒素中で凍結され、-80℃に保存されたものを使用した。凍結組織を 6 $\mu$ m のスライスに切断しあと、0.3%過酸化水素を含むメタノールで室温、30 分間処理を行い、内因性のペルオキシダーゼ活性をブロックした。引き続き 5%の正常ロバもしくはヒツジ血清によるブロックを 15 分間行った後、一次抗体を一晩反応させた。2 次抗体はペルオキシダーゼ標識ロバ抗ウサギイムノグロブリン (DCNP1)もしくはヒツジ抗マウスイムノグロブリン (KP1)を用いた。洗浄後、3,3'-ジアミノベンチジンを基質として発色させた。

未固定凍結標本を用いて、DCNP1 と CD68 の二重蛍光抗体染色も行った。切片を 5%ヤギ血清で 10 分間ブロックしたあと、一次抗体を 1 時間反応させ、洗浄し、二次抗体を反応させた。二次抗体は Alexa 546 標識ヤギ抗ウサギ IgG および Alexa 488 標識ヤギ抗マウス IgG を用いた。対比染色に TOTO3<sup>®</sup> (Molecular Probes) を用いた。

## 7 実験結果

### (1) In vitro で分化誘導されたヒト樹状細胞の表現型

臍帯血 CD34 陽性幹細胞から GM-CSF、TNF- $\alpha$  を用いて分化誘導した樹状細胞、末梢血単球から GM-CSF、IL-4 を用いて分化誘導した未熟樹状細胞、それに TNF- $\alpha$  を加えて成熟化を誘導した成熟樹状細胞の細胞表面分子の発現をフローサイトメトリーで解析した(図 7)。単球由来樹状細胞群は均一な細胞集団が形成されるのに対して、CD34 陽性幹細胞の培養では不均一な細胞集団が見られた。CD34 陽性細胞を GM-CSF、TNF- $\alpha$  を用いて培養を行うと、培養 5 日目頃より多数の突起をもった細胞が出現し、最初は単独で浮遊しているが、次第に大きくなり、突起の数も増え、9 日目頃よりクラスターを形成しプラスチックディッシュに付着した。また 9 日目頃からは一部紡錘形の強い付着を示す細胞の混在もみられた。細胞数は培養開始より増加を続け、11 から 14 日目には少なくとも 10 倍以上に増加した。また培養中サイトカイン及びメディウムを 2、3 日おきに適宜加えたが、培養中にサイトカインを追加しないものはこのような樹状突起をもつ大型の細胞の出現は少数にとどまり、増殖も軽度であった。しかし培養 14 日目以降は、サイトカイン及びメディウムを加えなくても細胞はコンフルエントの状態のまま樹状細胞様の形態を維持し、1ヶ月以上生存し続けた。

CD34 陽性幹細胞培養 11 日から 14 日目の細胞表面マーカーの解析を図 7A に示す。サンプルにより大きく異なるが、CD1a、CD83 陽性細胞は 20~70%に見られた。CD86 陽性細胞は 80%を越え、培養日数とともに陽性を示す細胞の数、細胞表面の発現量ともに増大した。HLA-DR 分子は 90%以上の細胞に発現を認めたと、細胞表面の発現量は非常に強いものから、軽度のものまで様々な程度のもが見られた。CD11c 分子は 50%以上の細胞に認められた。CD14、CD15、CD3、CD19 分子の発現はいずれも見られなかった。

CD14 陽性単球に GM-CSF、IL-4 を加えて分化を誘導した樹状細胞は均一な細胞集団を形成した。培養 2、3 日目から細胞に突起が出現し、培養 5 日目に TNF- $\alpha$  を加えた後、一部クラスターを形成したが、ほとんどの細胞はクラスターは形成せず、付着性を示す細胞も少数にとどまった。また TNF- $\alpha$  添加 3 日目以降は細胞死を示す細胞が増えはじめ、7 日目にはほとんどの細胞は死滅した。培養中に細胞の増殖はほとんどみられなかった。

培養開始時の CD14 陽性末梢血単球(図 7B-A)、培養 5 日目の未熟樹状細胞(図 7B-B)、培養 5 日目に TNF- $\alpha$ を加えた 7 日目の成熟樹状細胞(図 7B-C)の細胞表面マーカーの解析結果を示す。CD1a 分子は成熟とともに発現量が低下した。CD83 分子は成熟樹状細胞のみに発現し、CD86 分子は成熟化とともに発現量が非常に増大した。HLA-DR 分子は未熟樹状細胞でも発現を認めたが、成熟化により発現量が増大した。

## (2) ヒト樹状細胞 cDNA ライブラリーの構築

CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit を用いて、臍帯血 CD34 陽性細胞由来 CD1a 陽性樹状細胞 cDNA と末梢血単球 cDNA の間で cDNA サブトラクションを行った。サブトラクションの効率は方法にあるように、DC-LAMP と gelsolin に対する PCR により確認した。DC-LAMP はサブトラクションを行ってない樹状細胞 cDNA では PCR 産物を検出できなかったのに対し、サブトラクションを行い、さらに 2 回の PCR を行った後の樹状細胞 cDNA の PCR ではかなり強いバンドを認めた。Gelsolin に対する PCR ではどちらも PCR 産物が検出されたが、サブトラクション後の cDNA の方でシグナルの増強が見られた。cDNA サブトラクションの効率は良いと判定し、T/A クローニングを行い、ヒト樹状細胞 cDNA ライブラリーを作製した。

## (3) ディファレンシャルスクリーニングで同定された遺伝子

樹状細胞 cDNA サブトラクションライブラリーからランダムに約 1500 個の cDNA クローンを選択して、ディファレンシャルスクリーニングを行った。オートラジオグラフィにより検出されたシグナルの例を図 8 に示す。肉眼的に比較して樹状細胞プローブの方で単球よりも強いシグナルが見られた cDNA クローンは 200 個あった。また発現量に差異がみられても、どちらにも比較的高発現しているクローンはハウスキーピング遺伝子である可能性が高いと考え、選択から除外した。選ばれた 200 個の cDNA クローンのシーケンス解析を行った結果を表 2 に示す。サブトラクションライブラリー中に高頻度に含まれる遺伝子群は予想通り、今まで樹状細胞において遺伝子発現量が多いとされているものであった(例: CD1c 分子、S100、HLA クラス II 分子群など)。しかし、今までに樹状細胞における発現が報告されていない既知の遺伝子やデータベース上相同性の高い既知の遺伝子が存在しない、新規遺伝子と思われるものの断片

も複数含まれていた。新規遺伝子と思われるもののうち、1 個のクローンはヒト EST データベースにて相同性の高い EST の存在が確認された。

#### (4) 既知の遺伝子群の RT-PCR

樹状細胞における発現が報告されていなかった既知の遺伝子群について、樹状細胞と単球の総 RNA を用いて RT-PCR を行った。PCR に定量性をもたせるために、サイクル数を 18、23、28、33、38 サイクルにふり、全てアガロースゲルに電気泳動を行い、指数増加期にあると思われるサイクル数を採用した。結果を図 9 に示す。CD1a 陽性樹状細胞は入手が不安定な臍帯血をサンプルとして利用しているため、他の細胞群より確保できる細胞数が圧倒的に少なく、従って RT-PCR に用いることの出来た総 RNA 量も少なかった( $\beta$ アクチンの PCR バンドを参照)。単球よりも樹状細胞で発現量が高いものが多いが、一部の遺伝子(DAP5、PAPSS、PDHA、SDFR-1)は発現量の違いを認めなかった。ADAM12、autotaxin-t、IRF4、osteopontin、PON2 は単球では発現が同定されず、樹状細胞に分化してはじめて発現してくる可能性が示唆された。また、MIHC は未熟よりも成熟樹状細胞で発現量が増大しており、逆に osteopontin は成熟化により発現量が減少していた。

#### (5) 新規遺伝子 DCNP1 の同定

ディファレンシャルスクリーニングで単球より樹状細胞でシグナルの高かった cDNA クローンのうち、複数のヒト EST と高い相同性を示したものは遺伝子として機能している可能性が高いと考え、全長クローニングを試みた。その内の一つであるクローン 13-75 の塩基配列は約 400bp であり、この配列を BLAST 検索したところ、複数の EST (GenBank Accession No.AI141949, AI673027, AW136257, AA342611) と相同性が高いことがわかった。EST clone IMAGE; 2345401 をプローブにして未熟樹状細胞 cDNA ライブラリーのスクリーニングした結果、12 個のファージクローンを単離することができた。in vivo エキシジョンを行った後、各々の cDNA クローンの塩基配列の長さを制限酵素で切り出すことにより確認し、2.5kb 以上の塩基配列を含む 3 クローンを選んで全長のシークエンスを行い、図 10 のように塩基配列を決定した。我々はこの遺伝子を DCNP1 (dendritic cell nuclear protein 1, Accession No.AB074498 で GenBank に登録) と命名した。DCNP1 mRNA は 3144bp で 244 アミノ酸の蛋白質をコード

しており、データベース検索により、ヒト 5 番染色体上に位置するイントロンをもたない遺伝子であることがわかった。BLAST 検索、FASTA 検索においてヒトおよび他の生物種の既知の分子との相同性は認められなかった。またヒト以外の生物種の cDNA とも一致しなかった。モチーフ検索も行ったが、既知のモチーフは認めなかった。

#### (6) DCNP1 遺伝子の発現解析

DCNP1 の遺伝子発現のノザンプロット解析の結果を図 11 に示す。DCNP1 の遺伝子発現は B 細胞及び単球では同定されなかったが、樹状細胞で発現を認めた(図 11A)。また樹状細胞の成熟に伴い、発現量は増大していた。ヒト正常組織においては脳と骨格筋においてのみ弱い発現が認められた(図 11B)。さらに DCNP1 と相同性を示す EST クローンの起源を調べたところ、胸腺、肺、胎児脾臓、胎児心臓であった。

#### (7) DCNP1 分子の細胞内局在の解析

DCNP1 の 10~25 番アミノ酸に相当するペプチドをウサギに免疫して抗ヒト DCNP1 ポリクローナル抗体を作製した。精製した抗体の希釈配列を作って単球由来成熟樹状細胞の免疫染色を行い、最適希釈濃度を決定した。樹状細胞の染色像を図 12 に示す。核、とくに核周囲の部分に強い染色が見られた。また細胞質もわずかに染色された。同程度の濃度の非免疫ウサギ IgG を 1 次抗体として免疫染色を行ったが、DCNP1 染色で見られた特異的なシグナルは検出できなかった。また抗体を過剰量のフリーペプチドと反応させた後に染色を行った場合でもやはり特異的シグナルは消失し、抗体の特異性を確認できた。

#### (8) DCNP1 分子の組織分布

ヒトの脾臓、リンパ節、肝臓、脳の凍結切片を用いた DCNP1 の免疫組織化学解析では、すべての組織で DCNP1 陽性細胞の存在が確認された(図 13A-D)。DCNP1 陽性細胞は赤脾髄、リンパ節髄質、肝類洞に分布しており、脳ではミクログリアの一部が染色された。マクロファージや樹状細胞などのミエロイド系細胞のマーカーである CD68 分子に対する抗体による染色と比較すると、陽性細胞の分布している領域は類似していたが、明らかに DCNP1 陽性細胞の数の方が少なかった。また CD68 と DCNP1 の二重蛍光染色を行った結果、CD68 陽

性細胞の一部に DCNP1 が発現していた(図 14)。

#### (9) 新規遺伝子 DC1373 の同定

ディファレンシャルスクリーニングで単球より樹状細胞でシグナルが強かった cDNA クローン 13-73 の全長クローニングを行った。cDNA クローン 13-73 の塩基配列約 300bp の BLAST 検索では多くの様々な組織由来のヒト EST クローンと高い相同性が見られた。まず EST clone IMAGE: 2091438 をプローブにして未熟樹状細胞 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い 16 個の cDNA クローンが単離できたが、最長のクローンでも約 1.5kb であり、EST データベース解析から予想された塩基配列約 3.6kb よりも短かった。そのため予想される塩基配列を元に数種のプライマーペアを図 6 に示すように設計して、予想される全長を網羅するオーバーラッピング PCR 産物を合成した。PCR において一定の頻度で変異が起こることを想定して、同じプライマーペアで増幅される PCR 産物について複数の cDNA クローンのシーケンスを行い、データベースとも照らし合わせて、塩基配列を決定していった。この方法で同定した塩基配列は約 3.6kb に及んだが、アミノ酸コード配列の最上流に終止コドン配列は認められず、アミノ酸基末領域に未知の配列が残されている可能性があった。そのため、5' RACE 法を行い、さらに上流の約 130bp の塩基配列を同定したが、やはりアミノ酸コード配列の最上流に終止コドン配列は認められなかった。そのためその時点での上流部分 863bp の PCR 産物をプローブにして Jurkat 細胞由来 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。Jurkat 細胞の cDNA ライブラリーから単離した 5 個のクローンのシーケンス解析の結果、2 個のクローンに未知の塩基配列が含まれており、これから上流約 300bp の塩基配列を同定した。これにより図 15 に示す全長 4088bp の遺伝子を同定することができた。この遺伝子は 1088 アミノ酸をコードしており、プロリンを多く含む配列である。データベース解析では各種コラーゲンに低い相同性を示したが、コラーゲンのファミリー分子ではない。またヒト 12 番染色体上に局在し、13 個のエクソンからなることがデータベース解析により予想された。

#### (10) DC1373 遺伝子の発現解析

DC1373 についても DCNP1 と同様のノザンプロット解析を行った。結果を図 16 に示す。程度の差はあるが、DC1373 は検索した全ての血球細胞と組織に発

現が見られた。組織では脾臓、腎臓、胎盤に発現が高く、心臓、直腸、小腸、肺では比較的発現が低かった。この結果より DC1373 は樹状細胞に特異的に発現する遺伝子ではないことが示唆された。

#### (11) DC1373 の細胞内局在の解析

DC1373 分子に対する抗ペプチド抗体を作製して、樹状細胞の免疫染色を試みた。抗体希釈濃度の決定、抗体の特異性については DCNP1 の場合と同様に行い、確認した。図 17 に示すとおり、核に比較的強い発現を認めたが、細胞質にも発現が見られた。

#### (12) 新規遺伝子 DC1458 の同定

ディファレンシャルスクリーニングで同定した新規遺伝子断片と思われるもののうち、約 900bp のクローン 14-58 は多くのヒト EST クローンと相同性を認めたが、ヒト cDNA クローン KIAA1350 とほぼ 100% の相同性が見られた。しかしクローン KIAA1350 は cDNA の全長を含んでいなかったため、全長のクローニングを行った。ヒト精巣由来の cDNA ライブラリーを用いて、方法に示すようにスクリーニングを行った。9 個の cDNA クローンが単離できたが、このうち 2 つのクローンは未知の配列を含んでおり、シーケンスの結果、DC1458 の最上流部より更に上流約 600bp の塩基配列があることがわかった。決定された DC1458 の全長 4758bp を図 18 に示す。1073 アミノ酸をコードしており、約 120 キロダルトンの分子量であると予想される。BLAST 検索および FASTA 検索で既知の分子との相同性は認められないが、様々な生物の cDNA 配列から予測されるアミノ酸配列と相同性の高い部分が認められ、下等動物から保存されているよく保存されている遺伝子である可能性がある。モチーフ検索では 737-739 番アミノ酸に RGD 配列を持ち、またアミノ酸基末付近に膜貫通ドメインの可能性の高い配列があり、2 型の膜蛋白質である可能性が示唆された。ヒトゲノムデータベース解析では DC1458 はヒト第 4 染色体上に局在し、15 個のエクソンからなることが予測された。

ヒト精巣由来の cDNA ライブラリーから単離した cDNA クローンのうち、2 つのクローンで、それぞれ第 7 エクソンと第 10 エクソンと思われる部分が欠損していた。このことから DC1458 は少なくとも 2 つのスプライシングバリエーションを持つ可能性が示された。



### (13) DC1458 遺伝子の発現解析

DC1458 におけるノザンプロット解析の結果を図 19 に示す。血球細胞では成熟樹状細胞にのみ強い発現が認められた。またヒト組織間では発現量が大きく異なっており、骨格筋に非常に強い発現を認め、次いで心臓、直腸、腎臓、肝臓、胎盤、肺にも発現が認められた。一方脳、胸腺、脾臓、小腸、リンパ球には弱い発現しか認められなかった。

## 8 考察

### (1) サブトラクション法のストラテジー

本研究ではヒトミエロイド系樹状細胞と末梢血単球の間で遺伝子発現の比較を行った。単球は *in vitro* で樹状細胞への分化誘導が可能であり、*in vivo* でも単球由来の樹状細胞の性格の解析が行われている。樹状細胞と単球の遺伝子発現を比較することは、樹状細胞の分化・成熟に伴うダイナミックな機能の変化を理解するうえで有用であると考えられる。樹状細胞における遺伝子発現解析についてはいくつかの報告があるが、そのほとんどが樹状細胞と単球・マクロファージ系の細胞を比較検討したものである。用いられている樹状細胞は単球由来の樹状細胞や樹状細胞ライン、胚中心樹状細胞などであり、我々が用いた造血幹細胞由来の樹状細胞を用いた報告もある。サブトラクションを行うには比較的少量の RNA が必要であることから、*in vitro* で大量の樹状細胞を誘導する方法が確立されている造血幹細胞由来の樹状細胞を用いた。

本研究では遺伝子発現を比較する方法として、PCR を用いたサブトラクション法を行った。この方法は通常サブトラクションの後に 2 回の PCR を行うことにより、比較する 2 つの組織（細胞）間の遺伝子発現量の差が僅少なもので同定できるという利点がある。一方で両者の遺伝子発現量の違いを定量化することができないという欠点がある。我々はディファレンシャルスクリーニングの際に用いるプローブとして同量の RNA から合成した first strand cDNA を用いることにより、この定量性がないという欠点の改良を試みた。結果としてサブトラクションライブラリーに含まれる樹状細胞により多く発現していると思われる遺伝子のうち、ディファレンシャルスクリーニングの結果でも樹状細胞に多く発現していると同定できたのは約 13% であり、そのなかには重複するものが多数含まれていた。残りの遺伝子の中にも実際には僅かに樹状細胞で発現量が増加しているものが含まれていたと考えられるが、樹状細胞と単球は同じ分化経路上にある細胞であり、発現している遺伝子は両者間でそれほど大きな違いはないと考えられる。この中で発現量に大きな違いのある遺伝子は樹状細胞のユニークな機能に関連している可能性があると思われる。他の遺伝子発現の比較法として SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 法を用いた報告があり (77)、この方法は数万単位の大量の遺伝子の解析が可能で、しかも遺伝子のコ

ピー数までわかるという利点がある。しかし 10 数塩基の塩基配列の情報から遺伝子を同定しなければならないことから、今回我々が目的とした新規遺伝子の同定には我々のとった方法が有利であると考えた。

## (2) 樹状細胞で遺伝子発現が増加していた既知の遺伝子群

本研究において単球では発現が同定されず、樹状細胞で発現量が増加する遺伝子をいくつか同定できた。以下にこれらの遺伝子について文献的考察を加え、樹状細胞における機能について予測してみた。

樹状細胞が抗原提示能に優れている理由として MHC クラス II 分子の高発現があるが、今回のデータでもそれが示された。また樹状細胞の遊走や T 細胞活性化に関わるとされる多くのケモカインも同定された。最も頻度の高かった CD1c 分子は CD1 ファミリーの一つであり、脂質抗原を T 細胞に提示することが知られている(80)。これらの遺伝子が同定できたことは cDNA サブトラクションとディファレンシャルスクリーニングを組み合わせた我々の方法の妥当性を示すものである。 $\beta$ アクチンや tubulin などの細胞骨格を構成する分子も同定されたが、樹状細胞は多くの突起をもった独特の形態を示し、また細胞運動能も高いことからこれらの分子の発現も上昇しているものと考えられ、同様の報告が散見される(77)。gelsolin は アクチンフィラメントの切断を行う分子だが、樹状細胞で非常に発現が高いという報告があり(77)、これらの細胞骨格関連遺伝子の高発現が樹状細胞の特徴的な形態を作っていると考えられる。

ADAM ファミリーは I 型膜蛋白質であり、最初はマウスのマクロファージに特異的な分子として同定された(81)。その後多くのファミリー分子が同定され、そのモチーフから ADAM(A disintegrin and a metalloprotease domain)として呼ばれるようになった(82)。ADAM ファミリーの分子はその名のとおり disintegrin モチーフと metalloprotease モチーフを持つことを特徴とし、基本的な構造はよく保存されているが、個々の分子の組織発現や機能は異なっている(83)。ADAM8 (CD156)、15、17 はマクロファージに発現することがわかっているが、CD156 は LPS や IFN- $\gamma$  の刺激を受けると発現量が増加することが知られている(84)。また ADAM10 および 17 は細胞表面に発現する TNF- $\alpha$  前駆体を切断して遊離型 TNF- $\alpha$  を分泌することが報告されている(85、86)。今回樹状細胞で発現量の多かった ADAM12 は胎生期の筋組織や骨組織に発現しており(87)、myotube の形成に関わると予測されている。ADAM12 の免疫担当細胞での発現、機能につ

ハテの報告はないが、樹状細胞の産生する様々なサイトカインやケモカインの分泌や樹状細胞の遊走、T 細胞との接着に関わっている可能性は十分に考えられる。

Paraoxonase(PON)は LDL 酸化による脂質の変性に抵抗する HDL 関連酵素であり、抗酸化作用、抗炎症作用を持つ(88)。PON は PON1, 2, 3 のファミリーからなるが、遺伝子多型をもつことが知られており、冠動脈疾患(89)や NIDDM(noninsulin-dependent diabetes mellitus)(90)との相関が示されている。今回樹状細胞において Thioredoxin と PON2 の遺伝子発現亢進が認められたが、抗原提示細胞におけるレドックス状態が局所炎症像の質を規定していることが知られている。羽室らは細胞内の還元型グルタチオン含量の高いものを還元型マクロファージ、低いものを酸化型マクロファージと規定しその性質について解析しているが、酸化型マクロファージからは全く IL-12 の産生が認められず、還元型からのみ産生を認めている。また Th1 サイトカインは還元型マクロファージを誘導し、Th2 サイトカインは酸化型マクロファージを誘導するという報告もあり(91)、Th1/Th2 バランスと抗原提示細胞の酸化還元状態が密接に関係していることをうかがわせる。樹状細胞は Thioredoxin や PON2 などの発現により細胞内を還元状態に保つことで、多量の IL-12 を産生できるのかもしれない。あるいは取り込んだ抗原蛋白質を還元することにより、抗原プロセッシングに関与している可能性も考えられる。

Interferon regulatory factor (IRF)ファミリーに属する転写因子は現在までにヒトで 9 種同定されているが、IRF4 は PU.1 と結合する因子、あるいはリンパ球特異的もしくは ATL 細胞株に発現する IRF として発見された(92)。その欠損マウスの表現型は T および B 細胞の重篤な機能不全であることが報告されているが(93)、抗原提示細胞についての解析はなされていない。その後 IRF-4 の発現はリンパ球に限定されずマクロファージでも発現がみられることが確認され(94)、同じファミリーの IRF-8 と複合体を形成し、IFN- $\gamma$  誘導性遺伝子の発現を負に制御することが報告されている。樹状細胞において IRF-4 の発現は重要な意味をもつと思われる。Cytokine-inducible SH2-containing protein1 (CIS1)は STAT5 により転写活性され、プロラクチンレセプターや IL-2 レセプターなどのサイトカインレセプターと会合して STAT5 を抑制する、負のフィードバック制御因子である(95, 96)。CIS1 トランスジェニックマウスの表現型は STAT5 ノックアウトマウスと類似しており、T 細胞および NK 細胞の分化異常を示し、ヘルパー T

細胞はほとんど Th2 細胞に分化する(96)。CIS1 のミエロイド系細胞における機能はわかっていないが、GM-CSF も CIS1 の発現を誘導することから(97)、樹状細胞の分化に関係する可能性がある。

Osteopontin (Opn)は RGD モチーフをもつサイトカインであり、骨組織のリモデリング、腫瘍転移に関係することが知られていたが、最近免疫応答にも関わることがわかってきた(98)。Opn はマクロファージや T 細胞の遊走や接着に関与しており、Opn を皮下に投与すると局所にマクロファージの集積が見られる(99)。Opn のレセプターとして、RGD 依存性の  $\alpha_v\beta_1$  インテグリンと非依存性の CD44 が知られており、この結合がマクロファージによる granuloma の形成に関わっている(100, 101)。Opn ノックアウトマウスではマクロファージのリクルートメントに障害をきたし、炎症局所の granuloma 形成が阻害されるという報告がある(102)。つい最近、Opn はハプテンを塗布した皮膚で発現が増加し、 $\alpha_v$  インテグリンと CD44 を介してランゲルハンス細胞を表皮から輸入リンパ管へ遊走させることが示された。また Opn ノックアウトマウスの皮膚にハプテン塗布を行ったが、予想通りランゲルハンス細胞の所属リンパ節への遊走が阻害されており、接触性皮膚炎が起こらなかった。これにより Opn は樹状細胞の遊走にも関わる分子であることが示された(103)。Opn の機能はこれだけにはとどまらず、Opn 刺激を受けたマクロファージは IL-12 の産生増加、IL-10 の減少という Th1 パターンのサイトカイン産生を誘導する(104)。また活性化 T 細胞に IFN- $\gamma$  産生と CD40L の発現を促す(105)など、初期の細胞性免疫応答に重要な分子である。

Autotaxin-1 は分泌型酵素で腫瘍細胞の不死化に関係することがわかっているが、その機能はほとんどわかっていない(106)。SURF1 も機能は知られていないが、ライ症候群患者で SURF1 遺伝子の様々な変異が見られることが報告されている(107)。このことから SURF1 はチトクローム c オキシダーゼ活性に関わる遺伝子である可能性がある。これらの遺伝子が樹状細胞で特別な機能を果たしているかどうかは現在のところ予測できず、機能解析が待たれる。

### (3)新規遺伝子 DCNP1 について

我々が同定した新規遺伝子 DCNP1 は 244 アミノ酸をコードしており、予想分子量 28kD の比較的小さな蛋白質である。DCNP1 について各種データベースによる解析を行ったが、既知の分子との相同性は全く認められなかった。また、

他の生物種で相同性の高い配列を持つものも見つからなかった。またノザンブロット解析でも遺伝子を発現している組織は脳と骨格筋しか同定されず、免疫染色においてもこの分子を発現している細胞の数はかなり少数であったことから、この遺伝子および分子の発現は非常に限定されていると考えられる。ミエロイド系細胞のマーカーである CD68 の陽性細胞の一部に DCNP1 が発現しており、末梢組織における樹状細胞の分布はマクロファージと比べてごくわずかであることから、我々は DCNP1 は生体内で樹状細胞に特異的に発現している可能性があると考えている。樹状細胞からクローニングされた新規遺伝子は多いが、核に存在する分子の報告はない。樹状細胞のプロファイリングを行っている他のグループから幾つかの転写因子について樹状細胞で発現が増加しているという報告はある(108)。DCNP1 は DNA 結合モチーフを持っていない。

DCNP1 の機能については現在のデータからは予測できない。しかし単球由来成熟樹状細胞の免疫染色ではほとんどの樹状細胞に発現を認め、データには示していないが、生体内では非常に発現が限定されているにも関わらず、様々な細胞株でも樹状細胞と同様に核、特に核周囲に強い染色が見られた。この結果から DCNP1 は増殖のさかんな細胞の核に発現する分子である可能性がある。また DCNP1 は特に核周囲に強い染色を認めることから核膜の蛋白質である可能性もある。近年アラキドン酸カスケードにおいてロイコトリエンやプロスタグランディンの合成に関わる酵素である FLAP は核膜に局在することが報告され(109)、本研究において樹状細胞での発現増加が認められた。また 5-リポオキシゲナーゼ合成酵素も核膜に局在する(109)。DCNP1 もこれらの炎症のメディエーターのひとつかもしれない。核膜の蛋白質は核膜孔を形成している構成蛋白質以外にはほとんど研究がすすんでいないのが現状である。DCNP1 の機能については今後更なる解析が必要である。

#### (4)その他の新規遺伝子について

本研究では DCNP1 の他に 2 つの遺伝子のクローニングも行った。DC1373 はノザン解析の結果からユビキタスに発現する遺伝子であることが示唆され、プロリンに富む蛋白質である。樹状細胞において特別な機能を担っているかどうかはわからないが、生理的な役割を担っていることは十分考えられる。DC1458 は 1073 アミノ酸からなる分子量 120kD の分子である。N 末端付近に膜貫通ドメインのモチーフをもち 2 型の膜蛋白質である可能性があり、さらにその細胞

外ドメインの部分に RGD モチーフがある。ノザン解析の結果では DC1458 は未熟樹状細胞では遺伝子の発現を認めず成熟した細胞のみに発現してくることから、T 細胞との接着やリンパ球へのホーミングに関わる分子である可能性は十分に考えられる。またこの遺伝子は特に骨格筋において非常に強い発現を認め、コードしている蛋白質の N 末端より約 350 アミノ酸残基の部分はショウジョウバエ由来 cDNA の塩基配列から予測されるアミノ酸配列と相同性を示し、また線虫にも低い相同性を示すアミノ酸配列があり、下等動物からよく保存されている分子である。このことは DC1458 は免疫応答以外の生理的役割も果たしていることを示唆するものである。

## 9 終わりに

本研究は、ヒト樹状細胞に発現している遺伝子の同定を行うことにより、樹状細胞の機能を遺伝子レベルで解析しようと試みたものである。この研究で樹状細胞に発現する既知および未知の遺伝子を同定することが出来た。クローニングを行った3つの新規遺伝子のうち2つの遺伝子は樹状細胞に比較的特異的に発現することが示されたが、これらの遺伝子が樹状細胞においてどのような役割を果たしているかは今後さらなる検討を要する。同様の樹状細胞に発現する遺伝子の解析は現在さかんに行われているが、これらがどのように樹状細胞の機能に関わっているのかは未だほとんど解明されていない。このようなデータの蓄積およびその機能解析は樹状細胞の生物学的特性の解明のみならず、既に始まっている樹状細胞を用いた免疫療法の治療効果改善に寄与するものと期待される。



図1

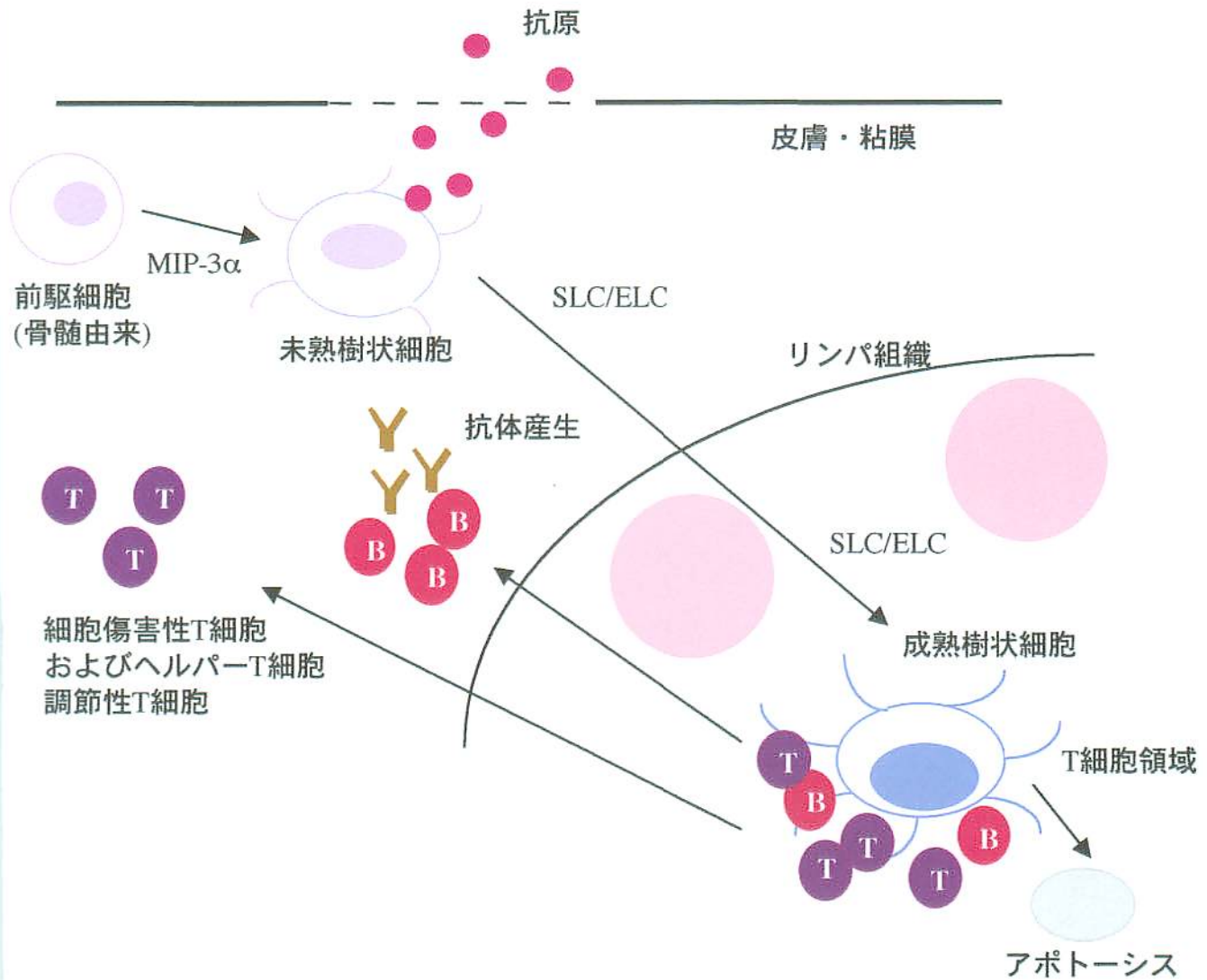


図1；樹状細胞のライフサイクル。血中の樹状細胞の前駆細胞はMIP-3 $\alpha$ の作用を受けて組織中に入り未熟樹状細胞となる。未熟樹状細胞はウイルスなどの病原体を取り込むとIFN- $\alpha$ などのサイトカインを産生し、好酸球、マクロファージ、NK細胞などを活性化する。抗原を取り込んだ未熟樹状細胞は、SLCやELCなどのケモカインの作用により、リンパ組織へ遊走し成熟化をおこす。リンパ組織の成熟樹状細胞はMHC/ペプチド複合体を高発現しており、循環しているT細胞の中から抗原特異的T細胞を選択して活性化する。活性化されたT細胞は分化、増殖して傷害部位へ遊走し、ヘルパーT細胞はサイトカインを産生してマクロファージ、NK細胞および好酸球を活性化する。また細胞傷害性T細胞は感染細胞に直接の傷害を与える。B細胞もT細胞や樹状細胞との接触により活性化され形質細胞に分化し、抗原特異的な抗体を産生する。リンパ球との相互作用をおこした樹状細胞はその後アポトーシスをおこすと考えられている。

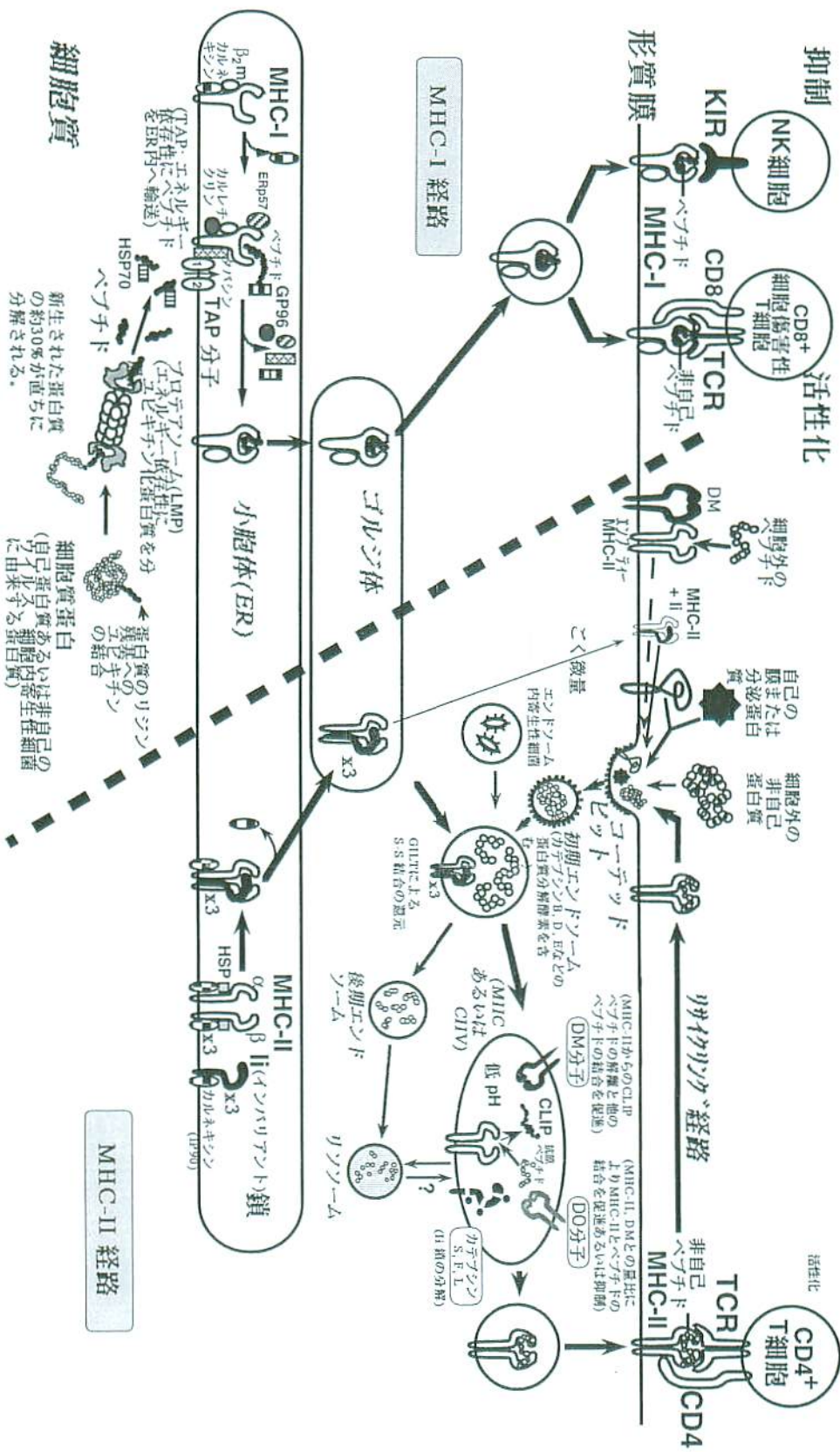


図2；抗原提示細胞における抗原のプロセッシング

図3

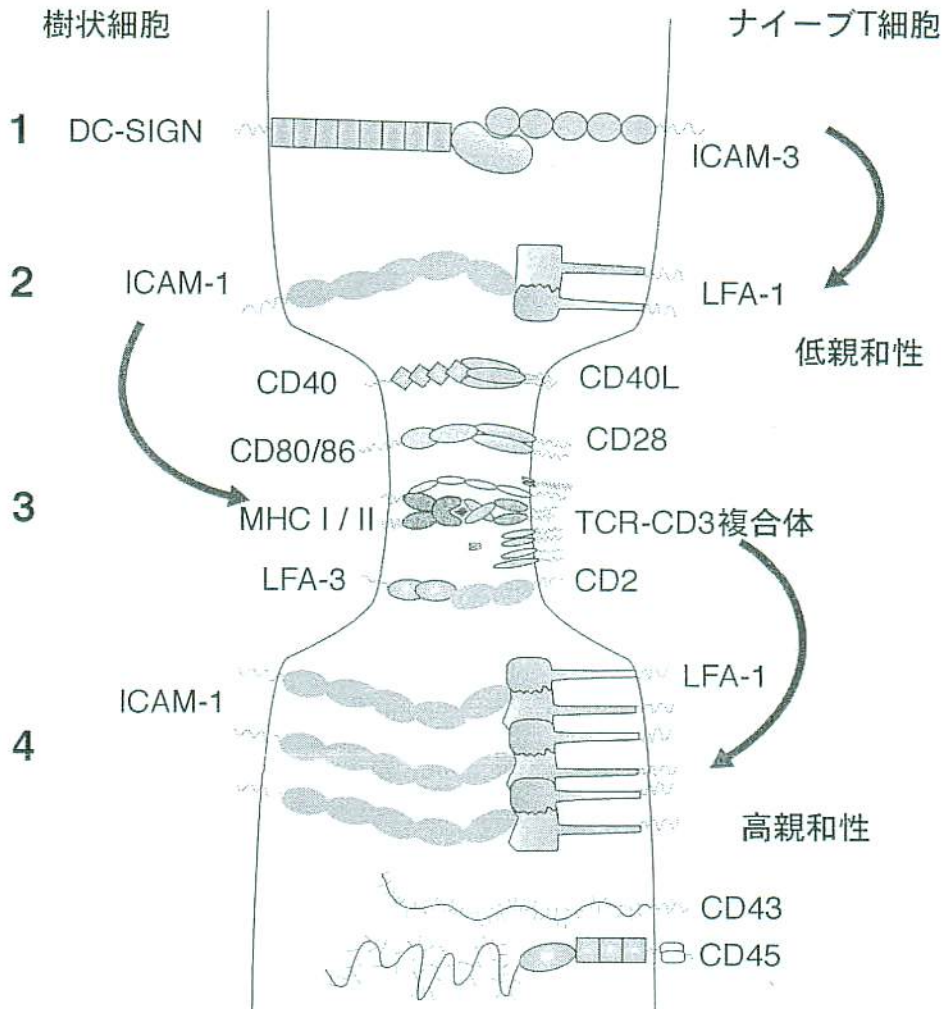
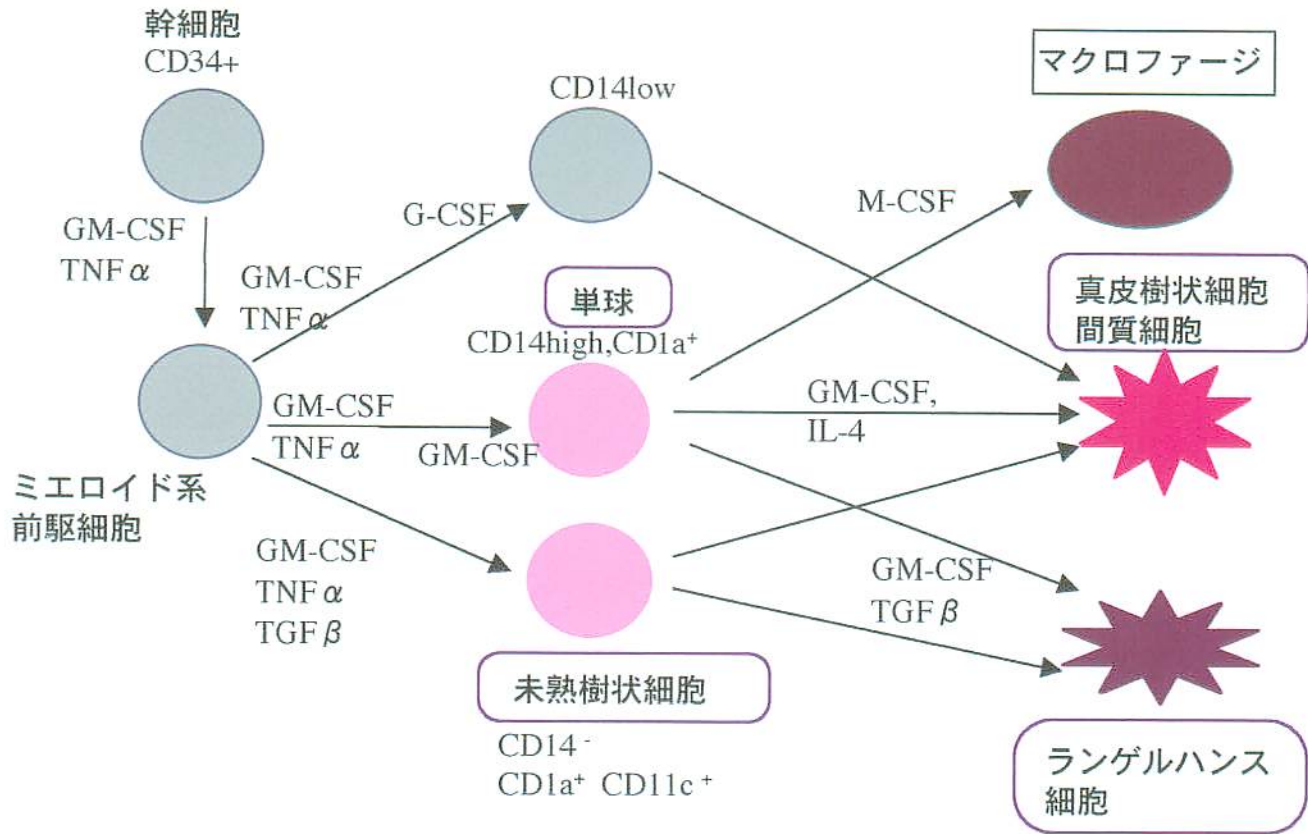


図3; 樹状細胞とナイーブT細胞の相互作用(参考文献より)  
免疫シナプスの形成に至る一連の接着分子の結合を番号で示す。  
矢印はそれぞれの分子の結合が次の接着分子のペアの結合を促進することを示す。



B 臍帯血CD34陽性幹細胞由来樹状細胞の誘導

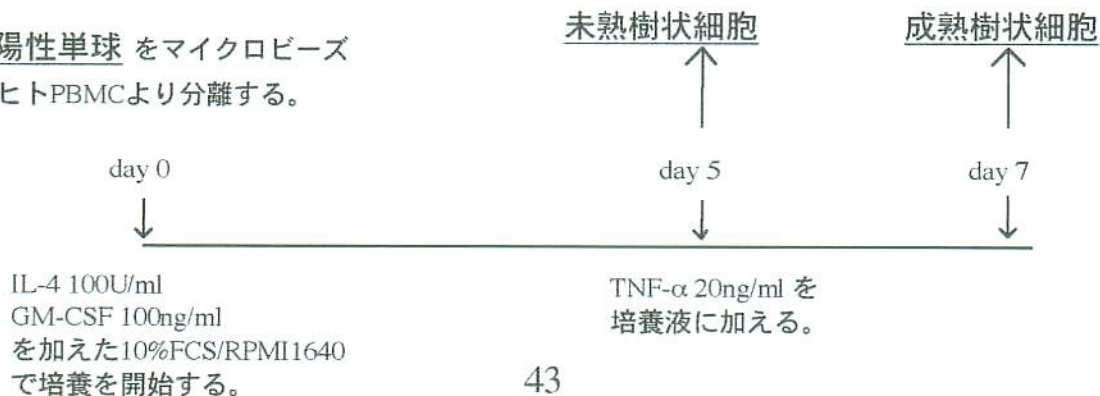
CD34陽性幹細胞をマグネットビーズによりヒト臍帯血から分離する。

CD1a陽性樹状細胞をマグネットビーズにより分離する。



C 末梢血単球由来樹状細胞の誘導

CD14陽性単球をマイクロビーズによりヒトPBMCより分離する。



# 図5

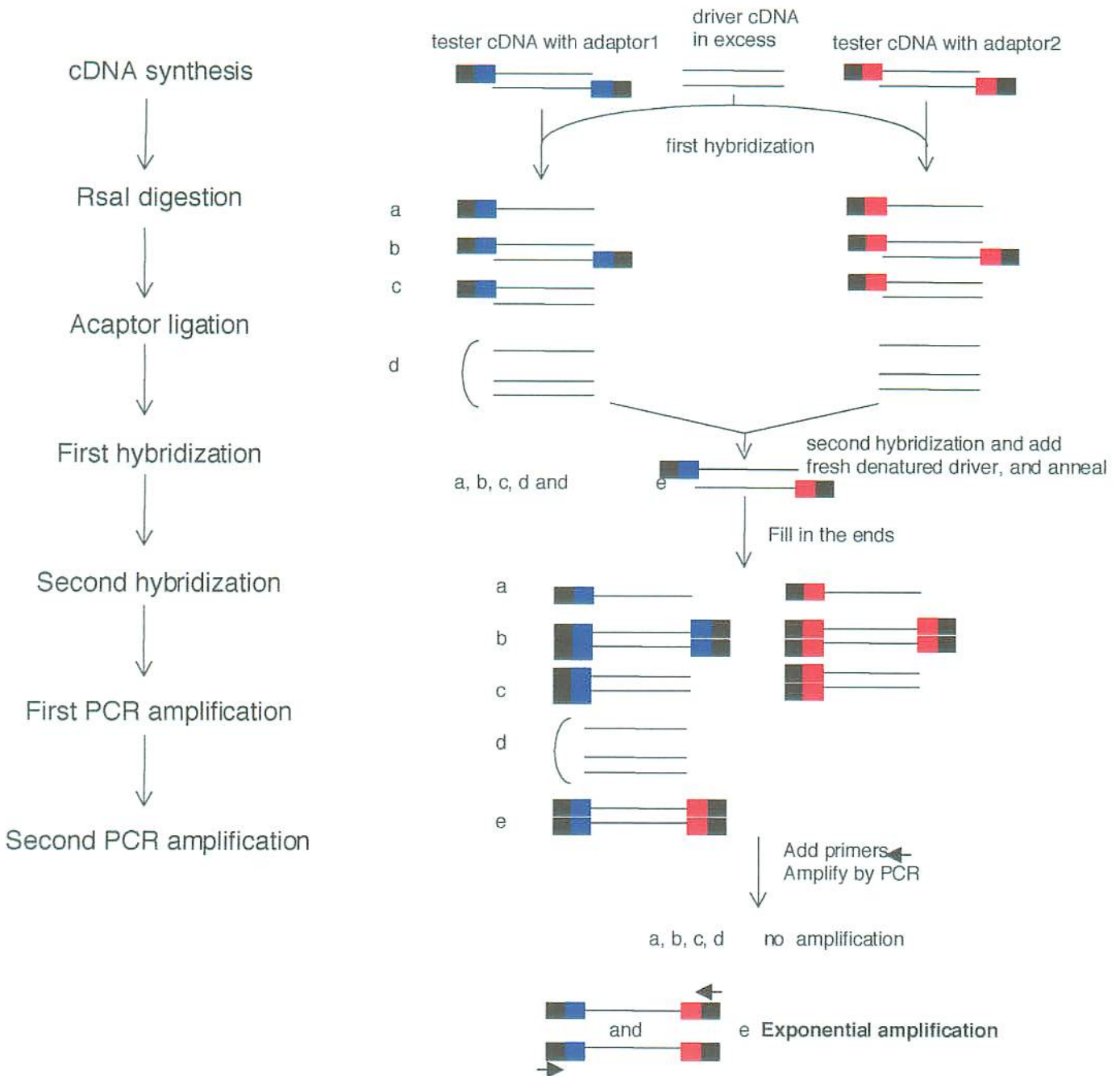


図5 ; PCR-based cDNAサブトラクションの原理。(クロンテックのマニュアル参照)  
 ハイブリダイゼーション後にPCRを行うことにより、テスターに多く含まれる配列のみが  
 増幅され、さらに発現量の多い遺伝子と少ない遺伝子が平衡化される。

図6

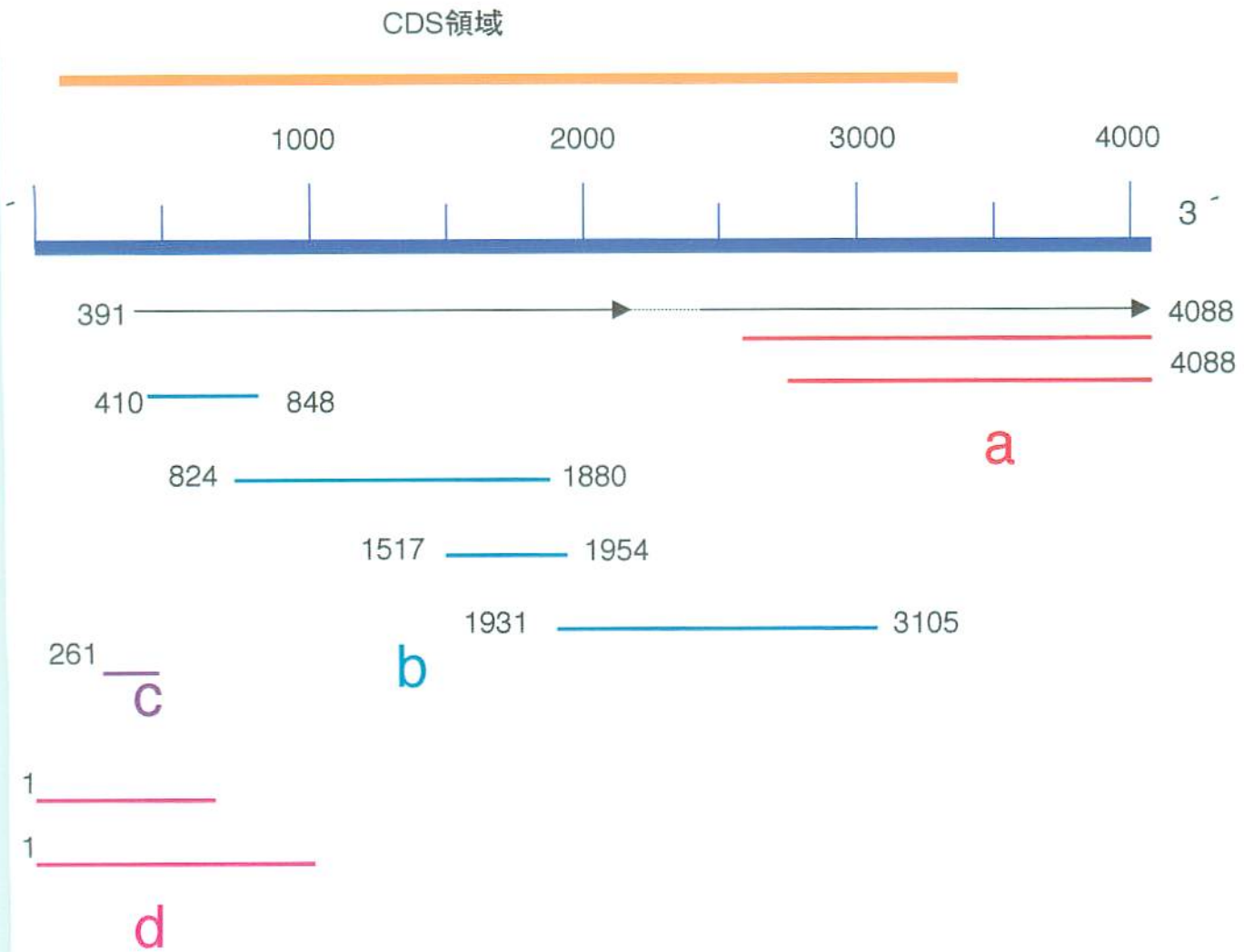


図6 ; DC1373の遺伝子のクローニングの方法。未熟樹状細胞cDNAライブラリーから2個のクローン(赤線)をとったが全長はとれなかった(a)。次にデータベースによる検索で予想される塩基配列(→で示す部分はヒトESTクローンのデータベースによりクローニングできたが、破線部分は不明であった)からプライマーを設計し、緑線のようなPCR産物を合成して、シーケンス解析を行った(b)。さらに5' RACE法を用いて、130bp上流の配列を同定した(c)。それでも5'末に終止コドン配列がないことから、さらに上流の配列の存在が否定できないため、次はヒトJurkat cell cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、未知の配列を含む2個のクローン(桃色)を得て、全長を同定した。

図7A

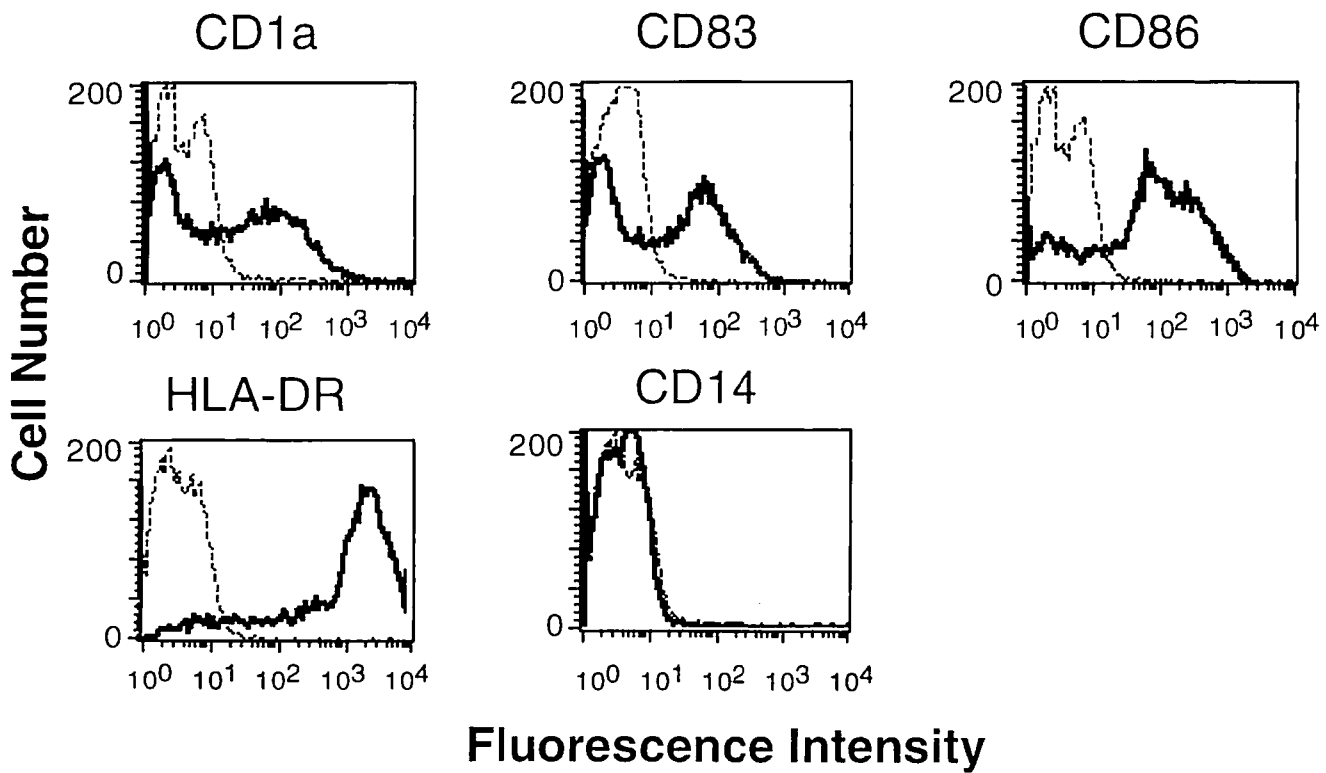


図7A ; 臍帯血CD34陽性細胞をGM-CSF、TNF- $\alpha$ で培養して11-14日目の細胞のフローサイトメトリー。不均一な細胞集団を形成する。この細胞集団からCD1a陽性細胞をマグネットビーズにより分離して用いた。

図7B

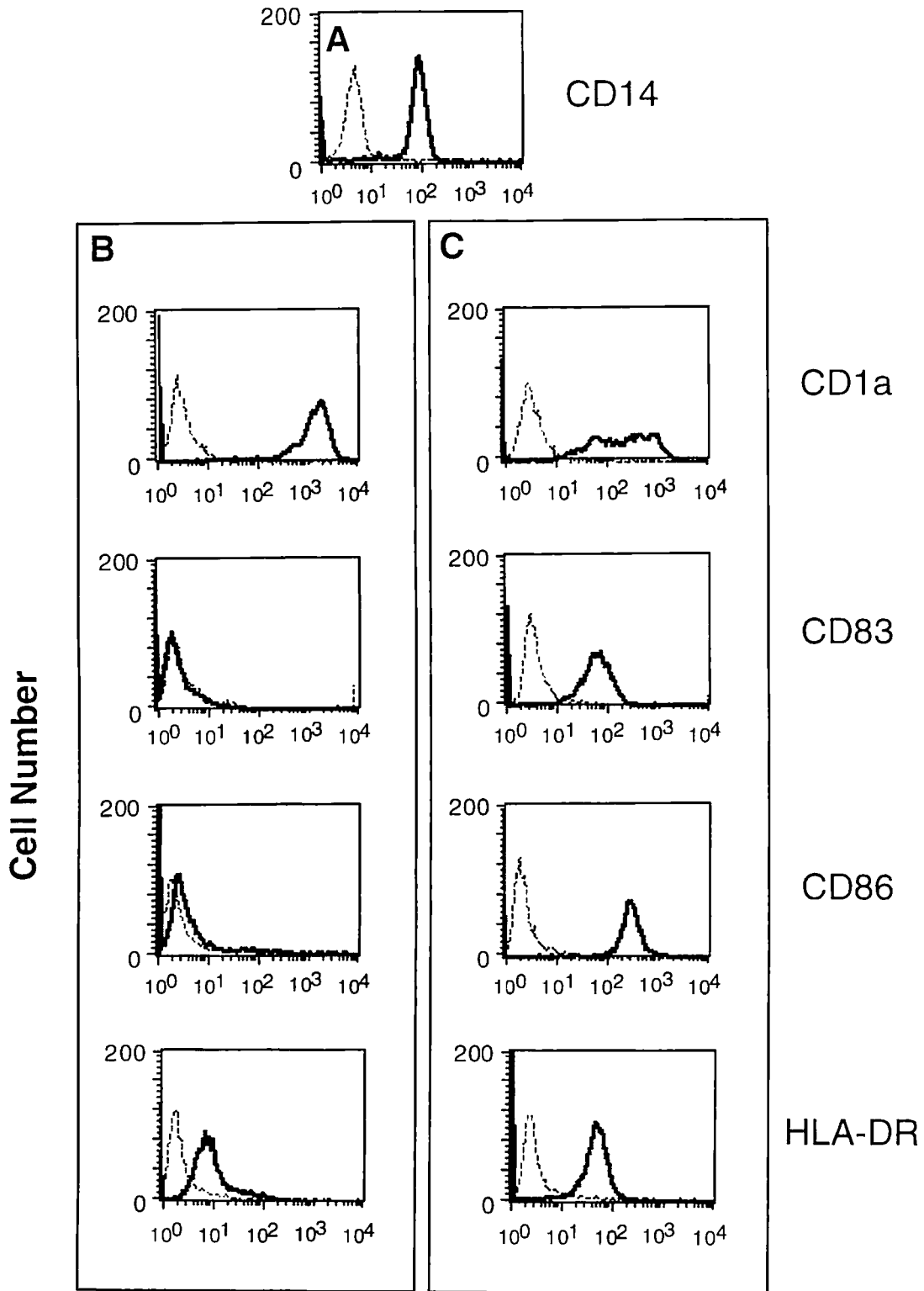
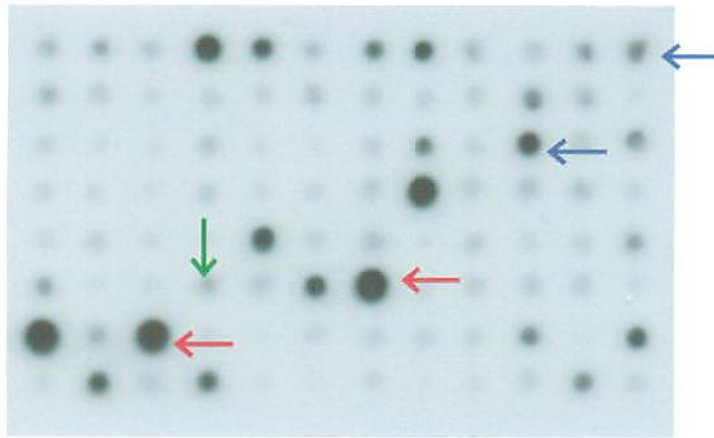
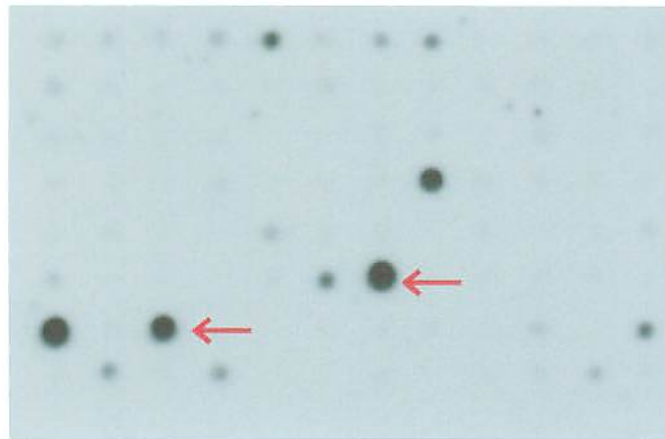


図7B；末梢血単球(A)、単球由来未熟樹状細胞(B)、単球由来成熟樹状細胞(C)の細胞表面マーカーの解析。均一な細胞集団を形成している。





樹状細胞cDNAプローブ



単球cDNAプローブ

図8；樹状細胞と単球における遺伝子発現のディファレンシャルスクリーニング。  
 このような2枚のレプリカを肉眼的に比較して、単球と比べて樹状細胞の方でシグナルが強い  
 遺伝子を選択した。赤矢印(←)のように単球でも高発現している遺伝子はユビキタスな遺伝子  
 である可能性が高いので除外し、青矢印(←)のように単球ではほとんど出ていない遺伝子を選択  
 した。しかし、このように明らかに樹状細胞のみに高発現している遺伝子は、すでに樹状細胞  
 における発現や機能が知られている遺伝子ばかりであった。そこで樹状細胞での発現が  
 比較的弱く、しかし単球では肉眼的にシグナルが同定できないクローン(↓)も選択して、  
 クロニングを行った。

図9

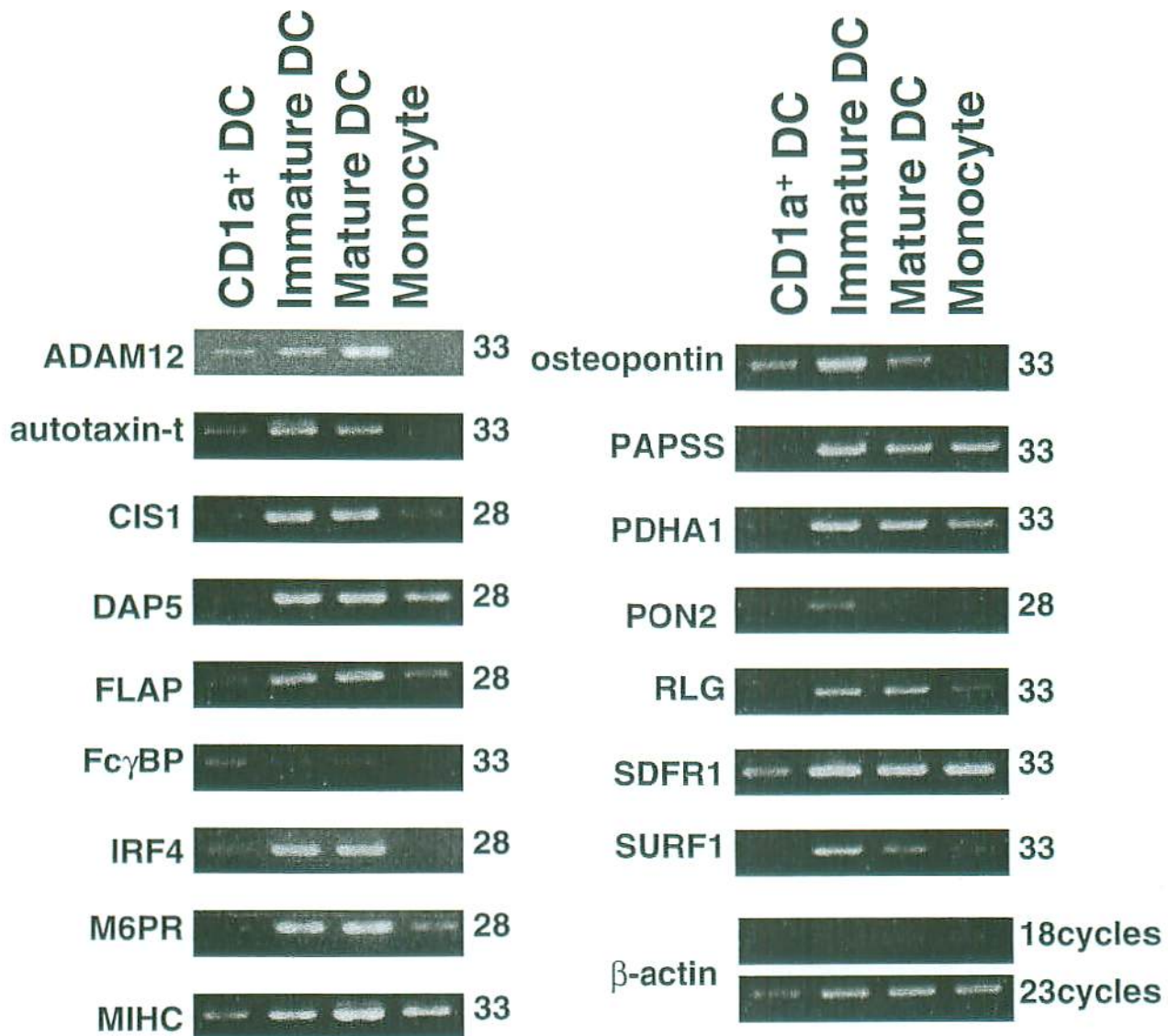


図9； 既知の遺伝子の単球および樹状細胞のRT-PCR解析の結果。  
 RT-PCRは臍帯血幹細胞由来CD1a陽性樹状細胞、単球由来未熟及び成熟樹状細胞、末梢血単球から抽出した総RNAを用いて行った。  
 PCRのサイクル数はそれぞれのサンプルにおいて18、23、28、33、38サイクル行い、アガロースゲル電気泳動による分離でPCR産物が指数関数的増加期にあると考えられるサイクル数を選択し、定量性をもたせるようにした。  
 略号；表2を参照。

☒ 10

```

CAGAACCCAGGGCTTACCTGTGCTGTGATTCGCCACTAAGGATTTAGTTGTAGCCACGGACTGGTAACAAACAGGAGGGGATTTTAACTCTCTCTGCTTCAGAGGTCCAAATP 120
AGCCACGGTTAGTATATGGGAGTGGCCCTGGTAGGGCTGGCAAGGAGAGAGCCACATGTATTTGGTCTGATGAAAGCAGCAAGTGTATCTGTCACTTACCAAAATGGTCCCGACT 240
ATGCAATTAAGGGAGCAACCCATACAGAACTGGAGAGCCACGGCTGGGACTGTACTGGACACCAAGGACTGGAGAGAGAGCTGGTGGGAAACCCAGGATTCOCAGGGTCC 360
M H Y G A A T H I Q N S R S H S H L E T V P G H O R L E R G A G G E T P E F P G C
CACTCCCGCTCCACCAAGAACTTTGGAAATGAGCTCTGCCCTGGTGGCCCTCTCCAGGGCTCAGTAAAGGTCTTAACTTCCAGGGAGAAJAAAOCTTGGCCACTGGGGTC 480
H S P A P P E N F G N E L L P L S A P L Q G L S E G L Y P P G R N K T L P A G V
CTCGAGAGGGGGGATTCAACTCCCTCCAGAGGACTCTGAACTCCAGCTTTTGGAGTGAAGCATCTGGAGGGCCCTCAGGGACCCAGGRTGACTCCATAGCGCAGAGGAGGCA 600
L R E G A V O F L H R G L C N S N L S S E A S A R P E G T Q D E L H S S R R K T
GGCCAGACAGGGGGAGGGGAGGGGAAACATCTGGTTTGTAGTTTCAGACTTACCCGTTTACAGTTTACACAGTCTCAGGGGAAACTCAGACTTTGCCCTGTACCAAGTTTTPBAG 720
G O T R R E G A R K H L V C S F R L Y P P T V H T V S P G N S H L A L Y Q V F K
CGAGTAAAGCTTGGCCAGGCTTCAATTTTCTGTAGTGAANAATCACTGAATCATCAGATCCATGGACCCACTTTCACITTTCTCTAAGCAGCTGGAAACCTCAGGCTGGCTTC 840
A V K L C P S E T S F P L S R K S L K S S D P W H P P S L S P N S W N R Q A G F
AGGGGCTGGCTTCCACTTGTATCTATCTTCCCTCAGCTCTCAGCAGCCAGGAGGGGGTGGTTCCTCCAGCAGCTCAGCTCAGTCTCTCAGCTCCACAGCCAGGGCCAGCC 960
R A W S S H L I S L S L T C S D S O S R R V S S S Q Q P P L H S L S S S H R R A A
CACGTCCCTCAGTGAACATGTGGCTGTCCACACAGCAGTATCCACAGCACTACTAAACACGACATACAGTCCCATGAACCTCTCTCCAGCTTAGGGCCCTCTCTCCAGACTG 1080
H V P E *
CTCCCTGGGTGAGAAATCTTGTCCCAACCCACTTACTTATAGTTCGTGKTCCTGACAGTAACTGAATCTCTCCGACACAGTTTCTTCTGTGAAANAACGGGAAGTTCACAGTA 1200
CTTACTCTCTTACATCAATTTGTGAAGTTCAGTTTGGAGCCATCAGAAATTTAAGCCACCCAGCATAAGGGTCAACAGGGTTACTTATCACTTCCAGTTTGGTGGGAGAACTGAAGCA 1320
TGTAGGCACTGTGACCCAGCTTACTCAGCCAGCAAAAGGAGCTTACATTTAGTTACATTCAGCCATGACCCAGCACTACAATTTCTGTAGCATTGTCTGGAAATCTAGAAATCACTTC 1440
CTTCCCTTTTAAAGTATTTTAAACCCACCATCTCTCTCTTTTCCAAAGAGTGAATCTTGGCAAGCTTGTCCGTGAGGACACCCCTCCCTCCAGGAGACTTGAATTCCTCAGAA 1560
ACAGCCACAGTCTGGCCCTCTCCCAAGGAGTCAAGCAGCAGCCTAGCAGCCATAGTCCCTGGATCCACCTGGAGGAGGGAGGGCCAGTGGTAGCCTTCACTCCCTTCCCTCT 1680
GGCCGCTGAGCCTCAAGTCTCTGACAGAAAGCCCTGGGTTGTGGCTCTGTGTTCCTCCGCTGGCCCTCCAGCTGAAACAGAGCAGATCCACAGACCCGGGGCTCTCTGGTGT 1800
CANAGCAGCTTCCCTTGGATACAAAGTCTGAGCCAGGACCCCTCAGCCCGGCATGGCCAGTGGAGGGCCATAGTGGTGGGAAACCCAGTGGCCAGCTGGGGTGGAGAGCCGGAA 1920
GCCATGGCCAGCAGGAAAGTGGAGTGAATGTCTCTCCCTCTGTAGCCCTCAGCAGGGCAGCCAGCCCTCTGGCTGGCCAGCCAGCCCTTACTTCCGGTGAACAGCCCTGG 2040
TCTCTCTCTCTAGTCTTGGACTTTGTACTCTAATCTCAGCAGAGCCCTGGGGTTTGGGATTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT 2160
GAGCAGTCTCAGTCAAGCTTCTGTCCCTGGAGGCTCATAGGGGACGGCCCTCCAGAGGAGCCCTGGAGGGCTCTGAGGATAGCAATCAGAGGTTGGCCCTCTCTGGCTGA 2280
GCCAGGCTGTGTCCCAAGTCTCCATAGTTCATGCTGTAGCTGTAGCCCTCTCCAGCCCTGGGCTATCCAGCCAGCCCTGGAGCCACCCCGGACCCCTCCACTTCCAGCAACCCG 2400
TCCTGTCCCAAGCTTCCATCCAGCAGGAAAGGACTGAGAACCTGATCTTTAACCCAAAGGAGTGTGTTCATAGGATGGGTGGCTTTTACAGTTTCCAGCCAGGCACTGAGGGAAITA 2520
TPTTCCCTATCCCTCAATGGAGGGTCACTACAGAAAGCTGTAGAGCAAGCTTTGTCCAGCCGCTGTGTCCAGCTTCCCGGTGTCTAAATAGCAGAGCTGGAGGGAGCTGAGAAC 2640
GATTTCTTCCAGAGCCCGCCTGAGCCAGAGCTTCCAGCCAGCAAGGTTGGGGAGCCAGCAGCTCCATGTGTGGGAGAGCCAGTGGGACTTCCAGCCACCCCTCCAGTGGCC 2760
TGGCAGCTGGGCACTGTCTCCAGCTTCTACTGTAGCTGTAGCCCTCTCCAGCCCTGGGCTATCCAGCCAGCCCTGGGCTATCCAGCCAGCCCTGGGCTATCCAGCCAGCT 2880
ADCATGAGGTTACAGGCTTCCCTCCAGCTTCCCTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT 3000
TAAACACCCAGCCCTTAAAGGAGGATCCCGAATTTAATGAACCCCTATTTGAATTCAGCCCTGTGATTTCTTACTTTTAACTGAACTCAGAGCCGGATTAAGTGAATTA AAC 3120
CTACACTTTGATTAATAAAAAA 3144

```

図 10; DCNP1 の塩基配列および予測されるアミノ酸配列。アミノ酸配列を 1 文字表記で示した。開始コドン直前の Kozak 配列を下線で表記した。

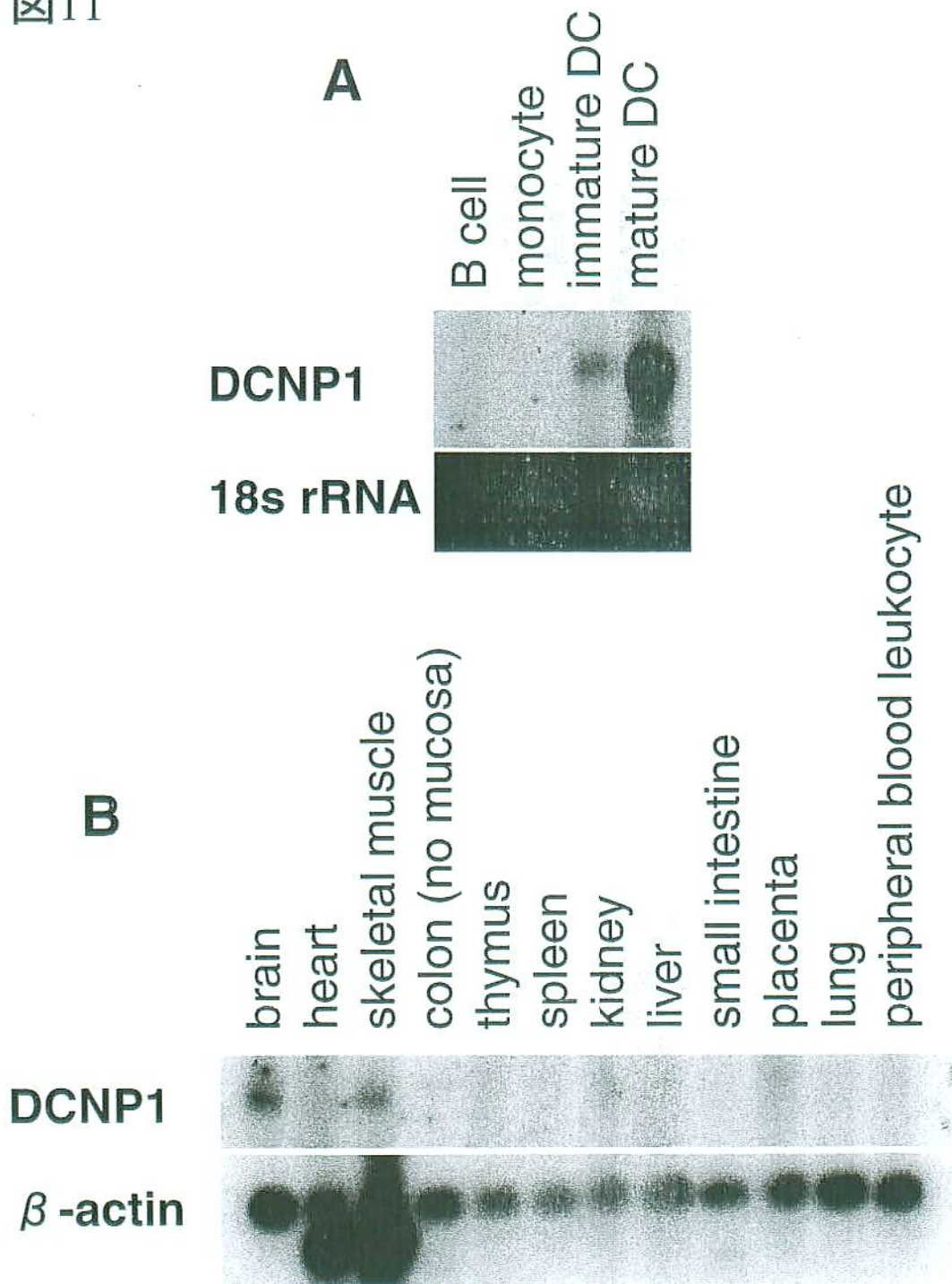


図11；ノザンブロットによる各種プロフェッショナル抗原提示細胞(A)とヒト正常組織(B)におけるDCNP1遺伝子の発現解析。定量コントロールとしてブロット前のアガロースゲル中の18S ribosomal RNAのエチジウムブロマイド染色(A)と $\beta$ -アクチンのプローブによるブロット(B)を行った。

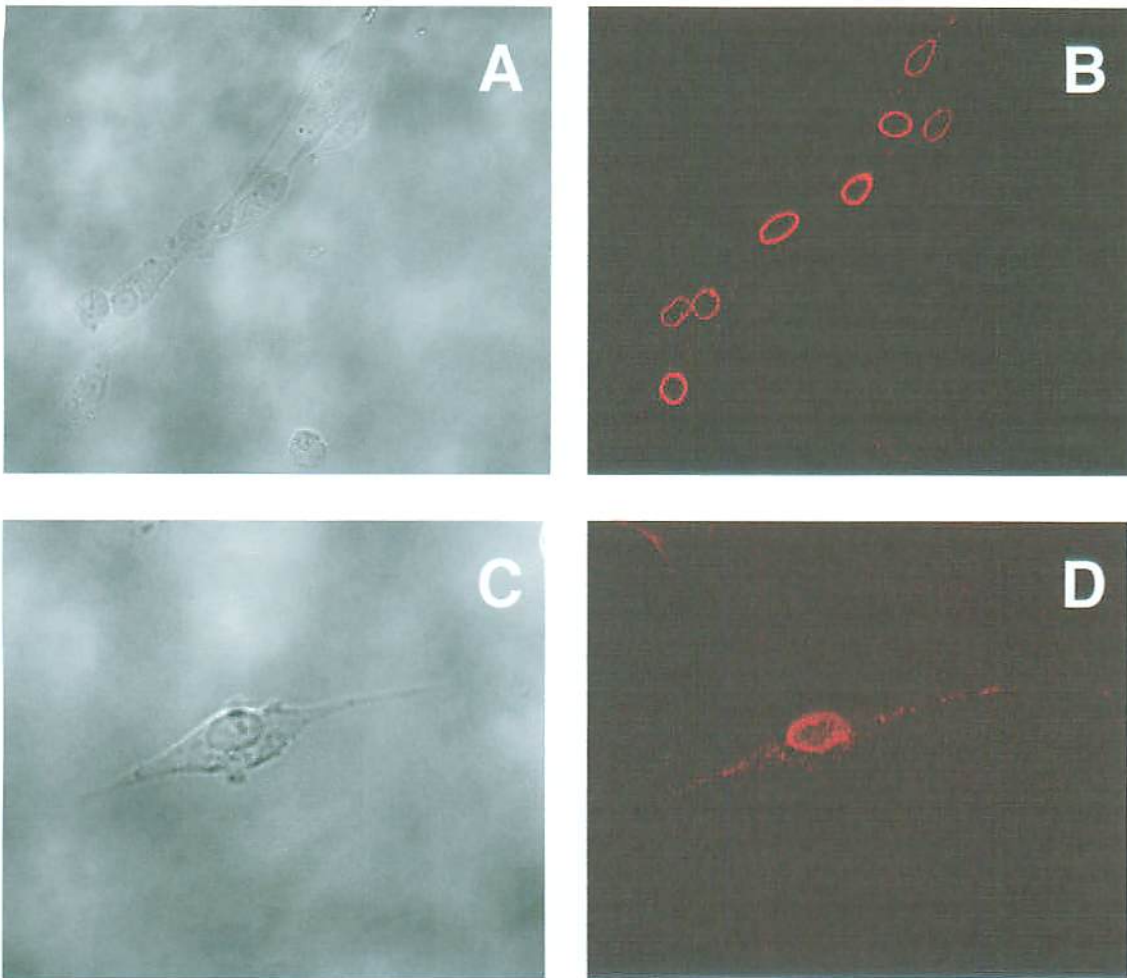


図12；単球由来成熟樹状細胞の抗DCNP1ポリクローナル抗体による免疫染色。AとB、CとDはそれぞれ同一視野である。DCNP1分子は樹状細胞において核、特に核周辺に強い染色を認めた。

# 図13A

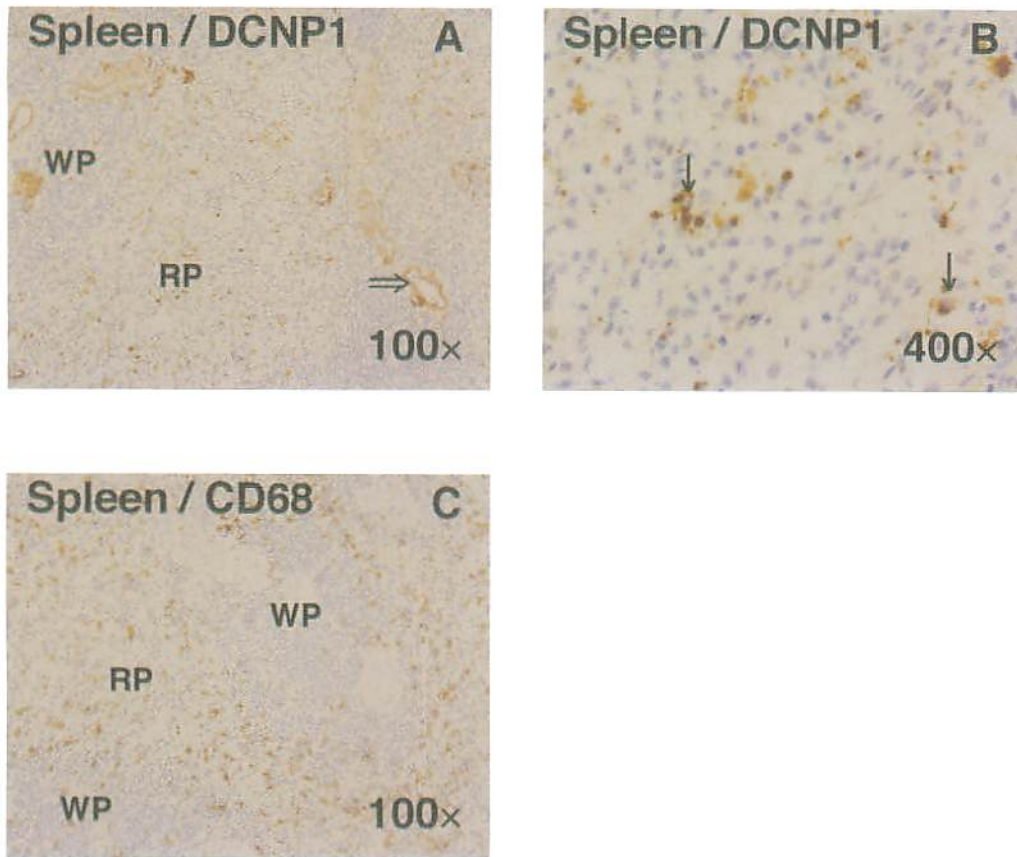


図13A ; ヒト正常脾臓におけるDCNP1分子の免疫組織化学的発現解析。  
DCNP1陽性細胞は赤脾髄に分布している(↓)。CD68陽性細胞も赤脾髄に分布するが、  
DCNP1陽性細胞の方が、明らかに数が少ない。またDCNP1は動脈の中膜と思われるところ  
⇒)にも染色が認められた。

## 図13B

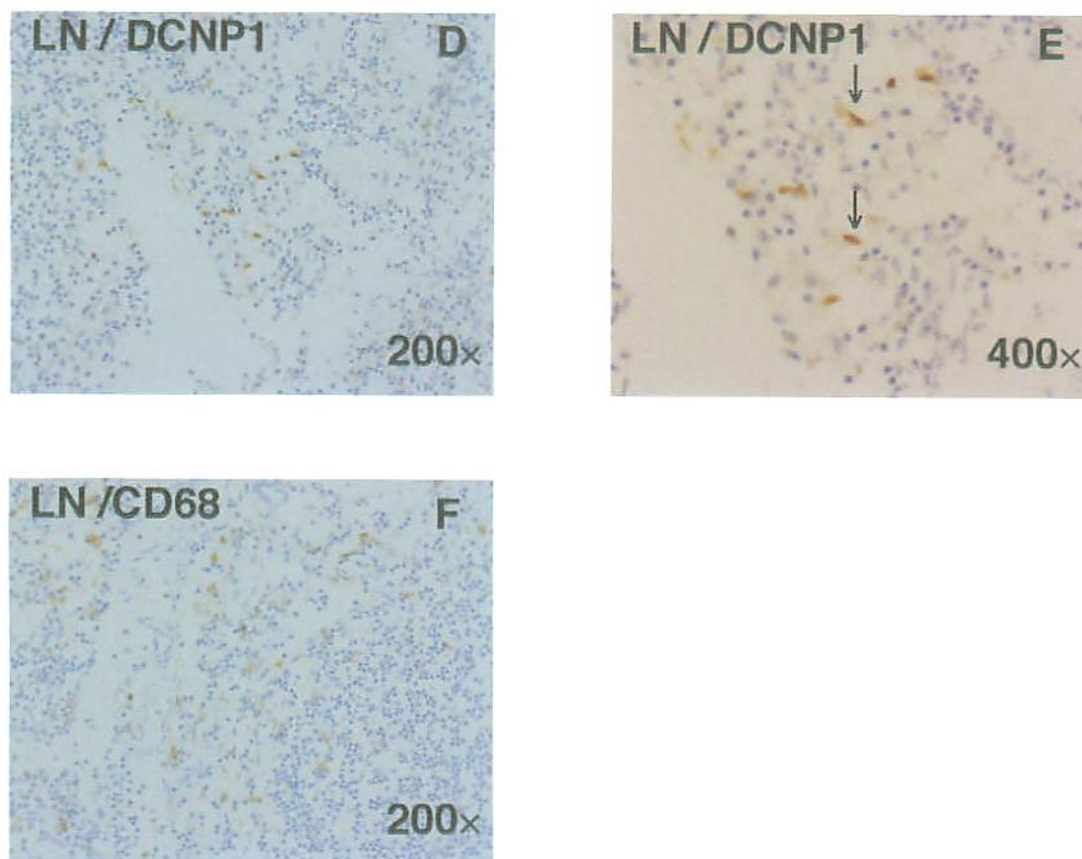


図13B；ヒト正常リンパ節におけるDCNP1分子の免疫組織化学的発現解析。  
DCNP1陽性細胞は髄質に分布している(↓)。CD68陽性細胞も髄質に分布するが、  
DCNP1陽性細胞の方が明らかに数が少ない。

## 図13C

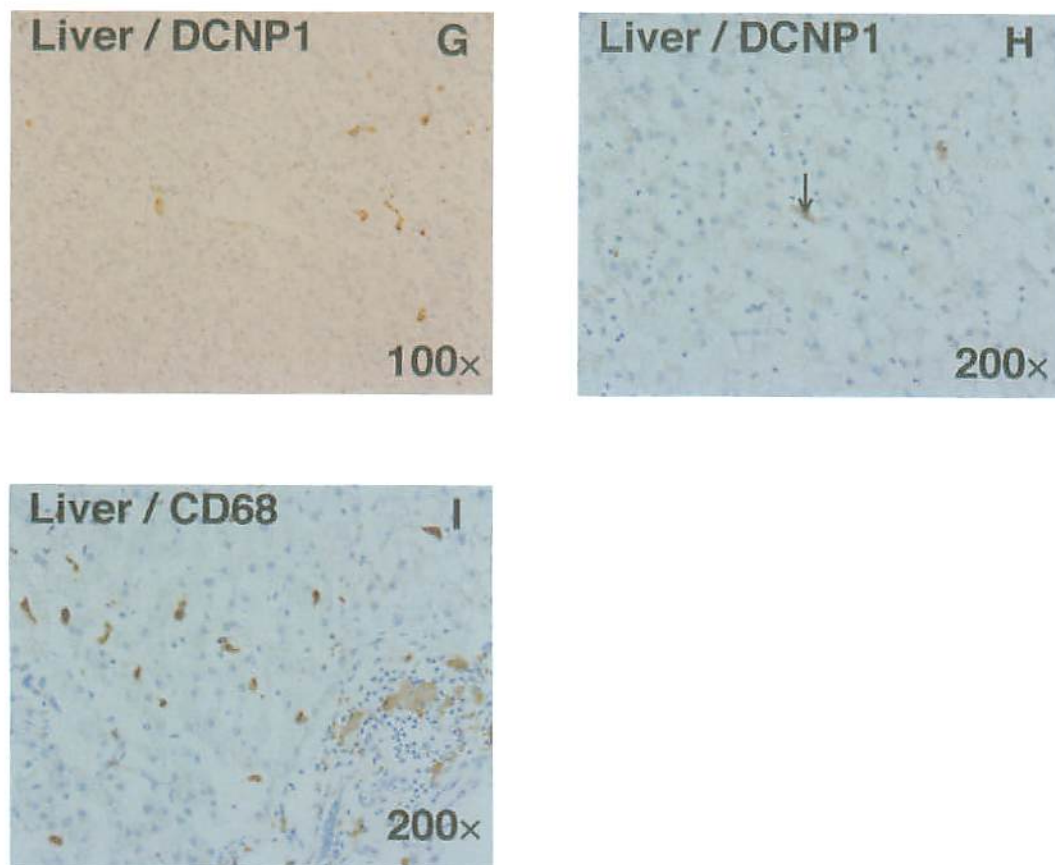


図13C；ヒト正常肝臓におけるDCNP1分子の免疫組織化学的発現解析。  
DCNP1陽性細胞は類洞に分布している(↓)。CD68陽性細胞も類洞に分布するが、  
DCNP1陽性細胞の方が明らかに数が少ない。



## 図13D

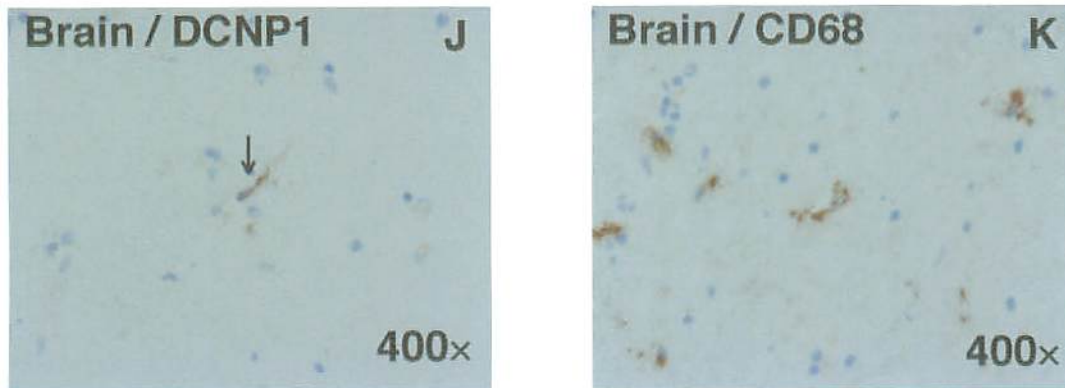


図13D；ヒト正常大脳におけるDCNP1陽性細胞の分布。CD68陽性であるミクログリアの一部にDCNP1陽性のものが認められる(↓)。

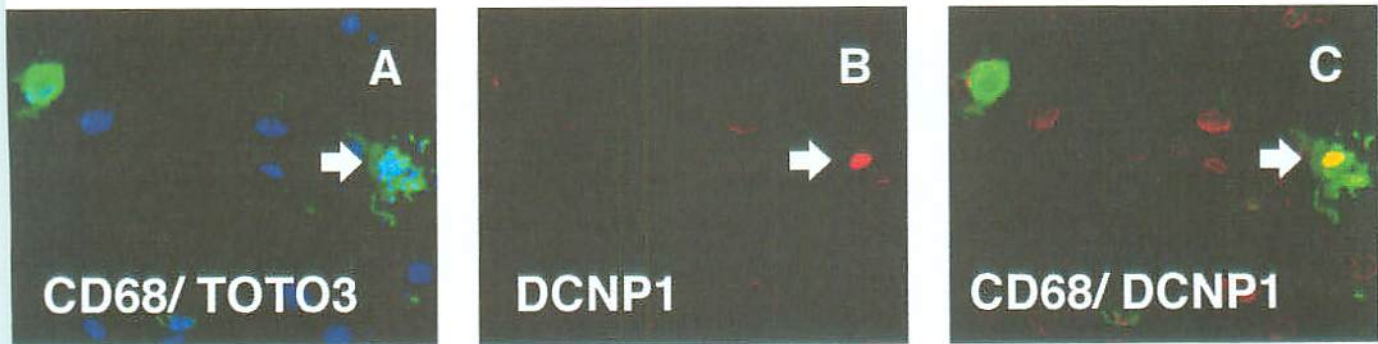


図14；ヒト肝臓凍結切片の蛍光三重染色。

A, B, Cは同一切片である。視野の中にCD68陽性細胞(緑)が2個認められる(A)。DCNP1陽性細胞は赤で標識されている(B)。2個のCD68陽性細胞のうち1個がDCNP1陽性である(C, 黄色、矢印)。青染しているのはTOTO3により染色された核である。

☒ 15

```

CCACGAGCGGCTTTAGCTGGACCCCAATGTTTCCAGAGTGTTCAGCCACCCGGGACTGATAGCAGCAATGATGCGCCCAATGAGACCACTGGAGCAGACAGACTCGGGGCTC 120
M N G G N E S S G A D R A G G P
CTATGCCCACATCTGTCCCAATCGGCTGGCAGCCCTGTGTCCAGCGGGTCTGTGCTCTACATCAGTCCAGTGGCAGCAGGCTTTCTTCTTGGACCAAAACCCGGCTACCTCTCA 240
V A T S V P I G W Q R C V R E G A V L Y I S P S G T E L S S L E Q T R S Y L L S
GGATGGGACTTCGAGTGGGGTCTGGGGTCCACTTAATGTCCCAAGGTTTCAACTTTGACCCCTTTGGCCCGGTGACCCCGGTGGGGCTGGGGTGGGGCCAGCATCAGAGGG 360
D G T E K C G L E C P L N V P K V F N F D P L A P V T P G G A G V G P A S E R D
ACATGACCAAGCTGTCCAGCCAGCCGGGAAGCTGTCTTATGGCACTCTGTACCGCAGCATGGAGACCACTGCTCAGCCTCTCTCTCGAGAGGGAGCGAGCCCAATGTTC 480
M T K L C N H R R K A V A N A T L Y R S M E T T C S H S S P G E G A S P O M F H
ACACTGTGTCCCAAGGGGGGGCTGTGGGGGGGGCTCCCTGTGGAGTTCCTCAGCACTCACTTAATGGGGTCTCTGCTTCCCTCCCGCAGAACCACTCAGTTTCCAGGGCTTT 600
T V S P G P P S A R P P C R V E P P T T P L N G G S L P P E P P S V S O A P P
CCACTTACGAGGGCTTGGGGGGCTTTTCCCGCCAGGCTTCTGACCCAGTCCCTTCTGGGGGAGTAGACCCCGGCTTCCCGCCAGGGCAATGCCCCCTCTCCAGCCCACTC 720
T L A G P G G L F P P R L A D P V P S G G S S S P R P L P R G N A P S P A P P P
CTCCACTCTCTCTCACTCACTTCCCTCCCTCACTCACTGGGAGCTGCCCCTAGATCCAGCTGGTGGCTTCTGACTGGGCTCTCTCTCCGGGGCTCTAGGCTCTCTCTCACTCACT 840
P P A I S L N A P S L N A L R S L N A L R S S L V P S D L G S P P A P H A S S P P S
CAGAGCTCTCTCTCTCACTTCTAGTGTCTTAAACCCCGCTCCCTGCCCCGAGCAATATCTCCCGCCCGCCCTGGTCCCTCTCGAGCCAGAGTGTCTTCCAGCCACTTCTC 960
D P P L F H C S D A L T P P P L P P S N N L P A H P G P A S Q P P V S S A T M H
ACCTGCCCCCTGTCTGGGGGGCTGGGAGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGG 1080
L P L V L G P L G A P P P F L A P P P F L A P P P F L A P P P F L A P P P F L A P P P F L A P P P F L A P P P F L A P P P F L A P P P F L
CCCTCCCACTTTTACAGGGCCGAGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGG 1200
P P S T L Q G R R P R A Q A P S A S H S S S L R P S Q R R R P R R P P T V F R L L
TAGAGGGAGAGGGGGCTTAAACCCCTTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGG 1320
E G R G P Q T P R A P V P P Q P P F S L P E P S Q P I L P S V L S L L
TGGAGTCCCGCCCTGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGG 1440
G L P T P G P S H S D G S F N L L G S D A H L P P P P T L S S G S P P Q P R H P
CCTCCAGCCCTTCCCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGGCTGGGGGGGGGG 1560
I Q P S L P G T T S G S L S S V P G A P A P P A A S K A P V V P S P V L Q S P S
CCGAGGACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 1680
E G L G M G A G P A C P L P P L A G G E A F P P P S P E Q G L A L S G A G F P G
GGATCTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 1800
M L G A L P L P L S L G C P P P P S P L L N H S L F G V L T G G G G Q P P P E P L
TCTTACCCCTCCAGAGGAGCTGGTCTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCC 1920
L P P P G G P P P L A P G E P E G P S L L V A S L L P P P P S D L L P P P S A
CACTTCCAGGACTCTTGGCTTCTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCC 2040
P P S N L L A S F L L L A L G P T A G D G E G S A E G A G G P S G E P F S G L
TGGAGAGCTGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 2160
G D L S P L L P P P L S A P P T L I A L N S A L L A A T L D P P S G T P P Q P C
GTGCTGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 2280
V L S A P O P G P P T S S V T T A T T D P G A S S L G K A P S N S G R P P Q L L
TTAGCCCTTCTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 2400
S P L L G A S L L G D L S S L T S S P G A L P S L L Q F P G P L L S G Q L G L Q
AGCTTCCAGGACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 2520
L L P G G G A P P P L S E A S S P L A C L L Q S L Q Q I P P E Q P E A P C L P P
CCGAGGACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 2640
E S P A S A L E P E P A R P P L S A L A P P H G S P D P P V P E L L T G R G S G
CGAAAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 2760
K R G R R G G G G L R G I N G E A R P A R G R K P G S R R E P G R L A L K W G T
CACTTCCAGGACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 2880
R G G F N G Q M E R S P R R T H H W Q H N G E L A E G G A E P K D P P P P G P H
ATCTCCAGGACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 3000
S E D L K V P P G V V R K S R R G R R R K Y N P T R N S N S S R O D I T L E P S
CCCTTCCAGGACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 3120
P T A R A A V P L P P R A R P G R A C Q K Q E E T G P I A A I P G A G S D P D
MTGGGAGAGCTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 3240
W G E L S A E P W E P L P A T C T C G O W V G A L L P T Q S T N A T P S P T I P
CACTTCCAGGACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 3360
S *
CCCTAAGGGGACACCCCTTCCCGAGGCTTTTATTTGTTTAAAGTATTTTTCACAAATGACTCTTTTATATTTAATTCGATTTTATTTGCTTCCCTTCTTAAAGCCACAGCTCAGT 3480
TTACAAACTCTGTGACTACTTGTGGCTTGTGCTTCTTCCCGATGAGGGTACAAAGCANTAGCATCTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCC 3600
CTCAAGGCACAGTCTCTTTCCCGGTCCCGAGTTTGAACACATAGCCCTCTTCAAGGTGAGCGAGGTTCCCGGACTTCTCTGGGATATAAAAAAGGGGGTAAAGGGGGAA 3720
AGAGAGGCTCTGGGGCTCTCTCCCGATCAGACTACTACTCTCTCCCGCCATCAAAAGCTTCCAGGAGGTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT 3840
GGCCAGCAGGACAGCTGTCCAGGGCTGCTCTCTCTTTCTTTTGTAAAGCAGAGCCCTGGGGGTTTTAATCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT 3960
ACCTTGGGGGTTTTAATCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT 4080
AAAAAAA

```

図 15: DC1373 の塩基配列および予測されるアミノ酸配列。

Kozak 配列を下線で表記した。

図16

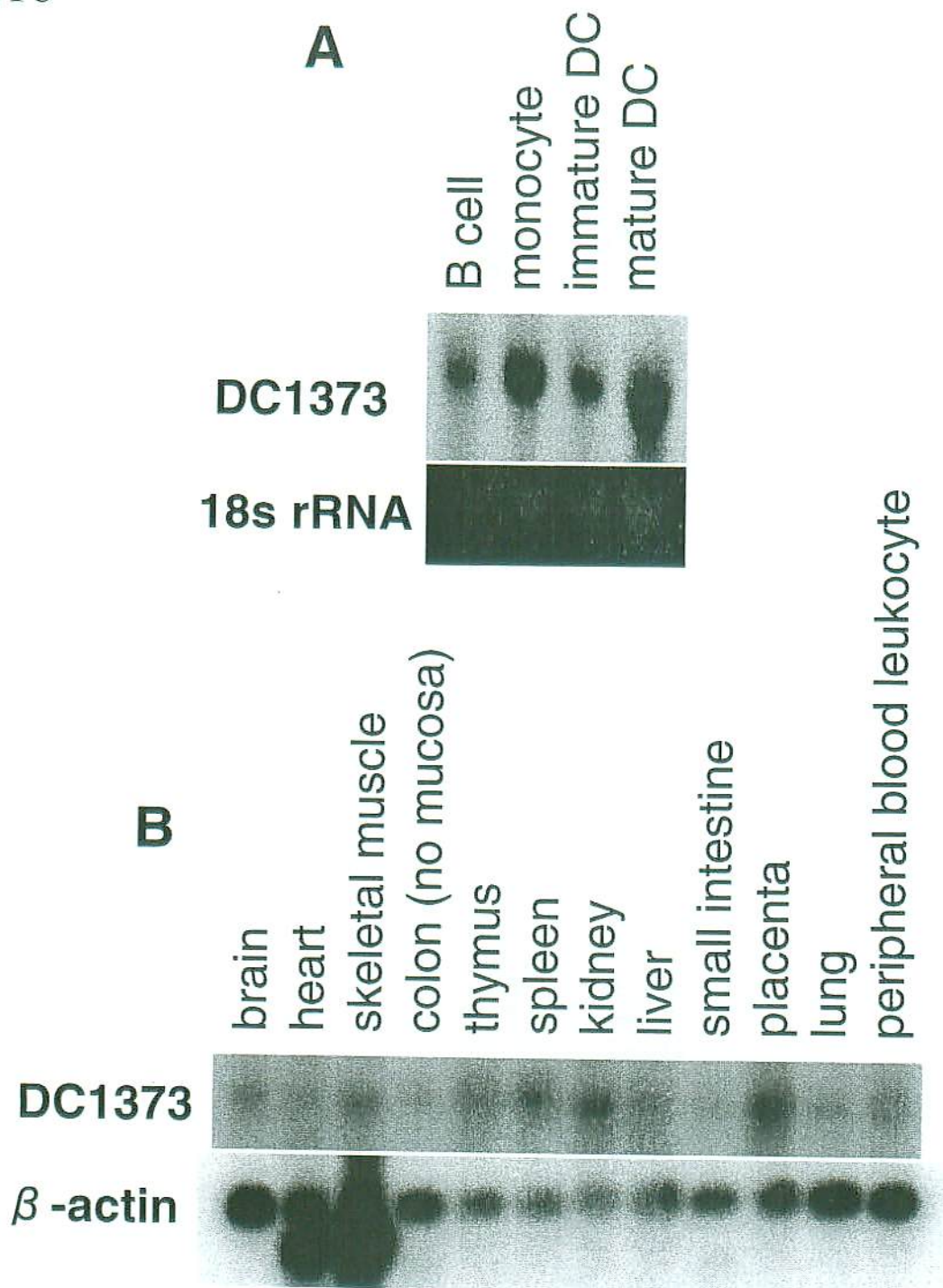


図16 ; ノザンブロットによる各種プロフェッショナル抗原提示細胞(A)とヒト正常組織(B)におけるDC1373遺伝子の発現解析。定量コントロールとしてブロット前のアガロースゲル中の18S ribosomal RNAのエチジウムブロマイド染色 (A)と $\beta$ -アクチンのプローブによるブロット (B)を行った。

図17



図17；単球由来成熟樹状細胞の抗DC1373ポリクローナル抗体による免疫染色。DC1373分子は樹状細胞において核および細胞質に局在を認めた。この抗体の抗原特異性は、過剰量の可溶性ペプチドを加えた場合に抗体反応が阻害されることにより確認された。

☒ 18

```

CATTATTAAATAGACTGCAGTGGATTTAATGGACATTCAGACATCCATTTTATTGTCCAAAATATTACATAAAGTGTACGTTTTTACCCATAATCCAAACAAAGTTCCCTGGAA
240
ATGGCATGGTAAATTTCTACGGAAACCTGGTGGCATTCTTGGAAAGTTTTCAGCCCTGGAAATATCTCTATCTACCTACCCCTACCAAGCCCTTTTAAATGAACCAAGCAAAACACC
MAWVKFLRKPFGGNLKGKVVYQPGSMLSLAPTCKGLLENEPQONS
360
TGCTTTCTAAAGCCCTGTACAGTTTAAAGGCATTTGGATATTTGGGAGACCTTGGGGTTTTGACTGGACATTTTGTCCGGAGATCCCTGTATATTTGTCCATCGAAGCG
CFLNSAVQVLWQLDIFRRSLRVLVLTGHVCOGDACIPCALKKT
480
ADTTTTCAGGTTCCACAGTGGAGAAAGCACTTCCCTCAGATACATAGGCGATCCCTTTCGGAAGTTTCAAGATCAGCAGGATTTCAACTTGGCCCTATGGATGAGTCT
IFAQFQHSREKALPSSDNIRHALAESFKDEQRFQLGLLHDDA
600
GGGGATCCTTTGAAATATGTTGGACAGGATTCATTTTCCATATGTCCCAAGCAGATGTCAGACATGTGTACTCTCAATCTTGTATCACTACCCAGAGTTTGTATGACTCTGTAT
AECFENMLERIHPHIVPSRDAADMCTCTSKSCITHQKFAMTLY
720
GACAGTGTGTGTGGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCT
EQCVCRSFCGASSDPLPPTFEFVRYISTTALCNEVERMLERH
840
GAGCCCTTAAACCTGAAATGTTTCCAGATTTCTACACGACGAAATACACAGATGACTATAGAAATGCTTAGTACTGTGGCCAAAATTAATAAATTTCCCGTGTTTTAAATGAT
ERPKPEMFAELQAAANTTDDYRKCPCSNCGQKIKIRRVLMN
960
TCCCAAGCTGTTCACAGTTGTTAGTCTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCT
CPEIVTIGLVWDSHSDLTEAVVRNLATHLYLPLGLFYRV
1080
GATGAAATCCAAAATAGTGAATTAACCTGTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCT
DENAKHSELNVLVGHICYTSHYCAFAFHTKSSKWFVFD DA
1200
AATGTAGAGATGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCT
NVKEIQTGRWKD VVSKIRCHFQPLLLLFYANPDGTA VSTED
1320
GCCTCAGGAGTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCT
ALCRQV I S W S H Y K S V A E H M G C E K P V I H K S D N L K E N G F G D Q A
1440
AAGCAGAGAAATCAGAAATCAGAAATCAGAAATCAGAAATCAGAAATCAGAAATCAGAAATCAGAAATCAGAAATCAGAAATCAGAAATCAGAAATCAGAAATCAGAAAT
KQRENQKFPPTDNISSSNRSHSHHTGVGKGP AKLSHIDQREK
1560
ATAAAGACATTCAGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCT
IKDISRECALAIEQKHLSSQRKDL EK GQRKDLGRHRDL
1680
GTGGAGAGCTTTTCACTTCCAACTGGATCCCTCCCGAAATGGTTTTAAACACTGGGATCCACATCTATATCTGTCAAGGAAAGATCAGATTAACATGACCGA
VDEDLDSHFOSGSPAPNGFKQHG NPHLYHSQ GKGSYKHDR
1800
GTGTACCTCAGGTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCT
VVPQSRASAQIISSSKSOILA PGEKITGKVKSDNGTGYDT
1920
GACCCAGCCAGATTTAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
DSSQDSRDRGNSCDSSSKSRNRNGWKPHRETLNVD SIFSES
2040
GAAAAAGCAGCAGTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCT
EKQRQHS PRHKPNISNKPKSSKDPSPFSNWPKENPKQKGLMT
2160
ATATATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
IYEDEHKQEI GSRSSLESNGKGA EK NEGLVEGKVHGD NWO
2280
ATCCAAAGGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCT
MQRTESSGYESSDHI SNGSTNLDS PVIDGNHGTVM DI S QVKE
2400
ACAGTATCCTCAGTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCT
TVCFSDQIT TSNL NKERGDCTSLQS QEHLEGF RKE LRNL E
2520
GAGCCCTATTAATCTCATGATTCACCCAGATTCATTTACAAATAAAATCATTTGATAAAAGATCACATGTACATGAGCAATGGAAATTTTCTCTCCATCCAGCTACCA
AGYKKSLEFHPESHLOIKNHLIKRSHVHEDNGK LFPSSSLO
2640
AAGCCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
IPKDHNA REHIHQSDLEKLEKPN ECKFSEWLNIE NSERTG
2760
TTCCTTTTACGTTGATTAATCTCTCTGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
LPFHVDNSASGRVNSNEPSSSLWSSHLRLTVGLKPE TAPLI
2880
CAGCAACAAATATCATGATTCATTTAGACTCTCTATCCAGATGTATATTCGGTCCAGCCAGAGCTGATGGGTGTAGTGGCAAACTTTTTCAGAGATCTA
OQQONIMDQCYFENLSLSTECIIRSASRSDG CQMPKLFQONL
3000
CCAGCCCTTTGCCAAAGAGATTCCTTCAGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCTGTGGAGCT
PPPLP P K K Y A I T S V P Q S E K S E S T P D V K L T E V F K A T S H L P K
3120
CACAGTTTATGTCAGCTTTCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
HRLSTASEP S L E V S T H M N D E R H K E T F Q V R E C P G N T P N C P S
3240
AGCTCTCAACTAACGTTTCAGCCAACTCAGTGGATGTGGAGCTTTTCCAAACAGACTGAGCTTATTTCTACTGTCCAAATGAGCAGTTTCACTACTACTTTTCA
SSSSTNDPQANS G A I D A F C Q P E L D S I S T C P N E T V S L T T Y F S
3360
GTGTATATTCAGCAGCAGATATAGATTAATGATCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
VDSCMTD TYRLKYHQRPKLSFP ES S G F C H N S L S *
3480
CTGTGTACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
TATATAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
3600
TGATCATCTCTGAGTTTTCAGAAATCCCTTTGAGAGCTTTGGGTCCTGAAAATAGAAAATCAGGAGAGATATATCTCTTTGATATCTACAGTTGAATAAAAATTA
AGTTTGTCCCTTATTTTGGCCAGTACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
3840
TTTGTCAAGAGATGCTTTTGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
3960
AAAAATGACTTATGATTTTGTGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
4080
TATCTAGTTAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
4200
TTCTTAAATTTTATGATTAATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
4320
TTCCCTACCTTTCTCTGATATTTACTCTGTATGGTGTGACCCATTTTATCTGATTTGAAAATCTATCTAGTTTCCAGATTAATTTCTACTTTCATATAGAGAGTTTA
4440
ATTTTAAATAAGTTTATTTAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
4560
TATGGTAACCTTGTGATTAATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
4680
GATACTGTGAAACAGCAATTAAGTTTCTTACATTCCTAAATGGTAAACCTCTATTAATTAACCTAAATGAT

```

図18； DC1458の塩基配列及び予測されるアミノ酸配列。 アミノ酸配列を1文字表記で示した。開始コドン直前の Kozak 配列を下線で表記した。

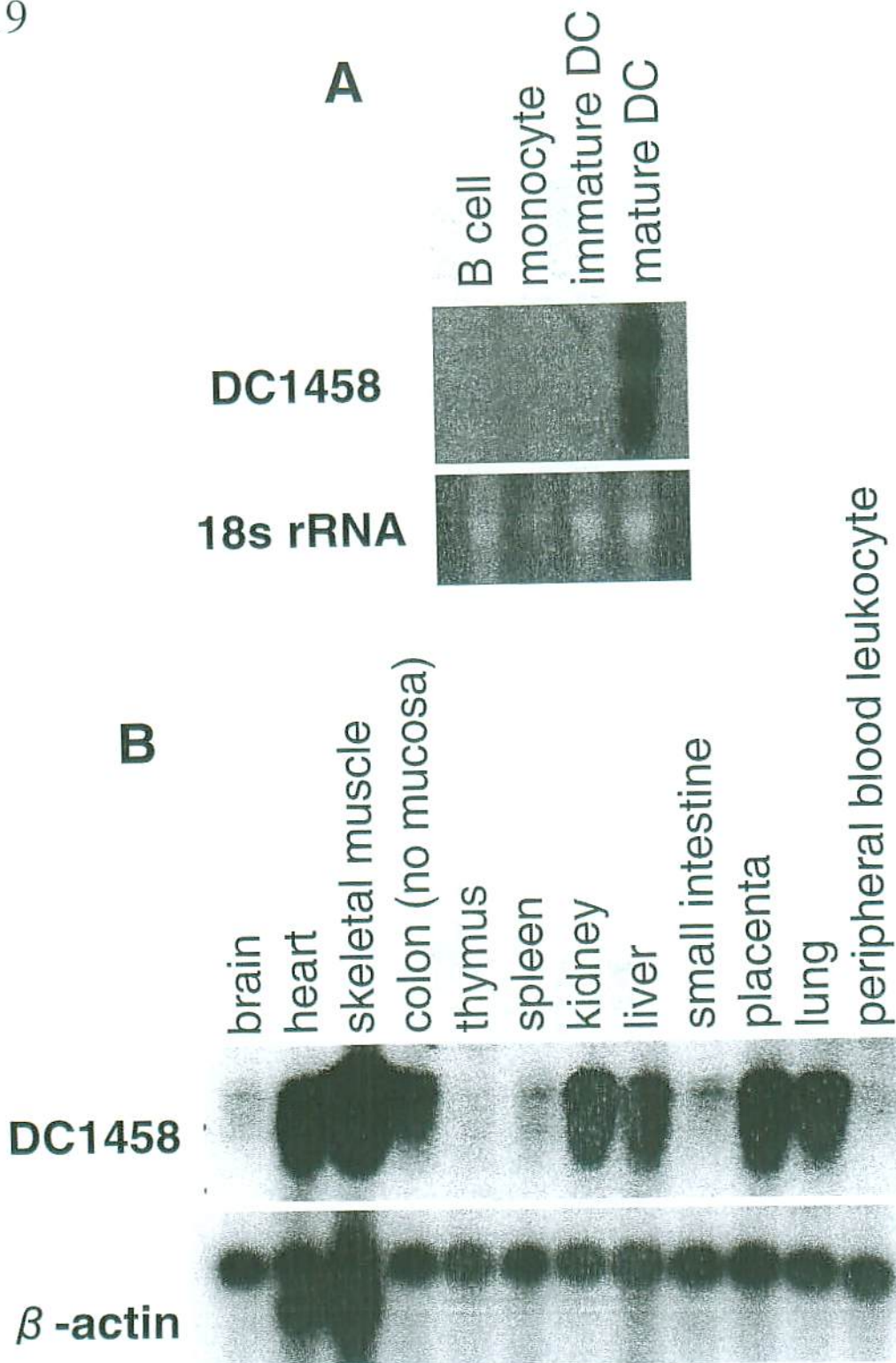


図19；ノザンブロットによる各種プロフェッショナル抗原提示細胞(A)とヒト正常組織(B)におけるDC1458遺伝子の発現解析。定量コントロールとしてブロット前のアガロースゲル中の18S ribosomal RNAのエチジウムブロマイド染色(A)と $\beta$ -アクチンのプローブによるブロット(B)を行った。

## 11 表およびその説明

**表 1** 既に報告されている樹状細胞に発現している遺伝子

抗原名	分子の性質	樹状細胞における 発現特異性	予測される機能	参考文献
Dectin-2	Type II C-type lectin	+++	Antigen uptake	33
CLEC-1	Type II C-type lectin	+++	Antigen uptake	34
Langerin	Type II C-type lectin	+++	Formation of BG	35
p55/fascin	Actin bundling protein	+++	Migration	36
TECK	Chemokine	+++	Migration	37
DC-CK1	Chemokine	+++	Attraction of naive T cells	38
DC-SIGN	Type II C-type lectin	+++	Initial T cell interaction	39
DC-LAMP	Lysosomal glycoprotein	+++	Antigen presentation	40
Dectin-1	Type II C-type lectin	+++	T cell interaction	41
M1204	Olygoadenylate synthase	+++	Unknown	42
DEC-205	Type I C-type lectin	++	Antigen uptake	43
DORA	IgG superfamily	++	Antigen uptake	44
DC-HIL	Adhesion molecule	++	Migration	45
TARC	Chemokine	++	Attraction of activated and memory T cells	46
decysin	Disintegrin proteinase	++	Antigen presentation	47
DC-STAMP	Multimembrane spanner	++	Unknown	48
CMRF-56	Unknown	++	Unknown	49
Sema4A	Adhesion molecule	++	T cell activation	50
di-ubiquitin	Ubiquitin	+	Antigen processing	51
MDC	Chemokine	+	Attraction of activated and memory T cells	52
PI-11	Serpin	+	Antigen presentation	53
CD83	IgG superfamily	+	Antigen presentation	54
ILT3	IgG superfamily	+	Antigen presentation	55
DPZF	Zinc finger protein	+	Unknown	56
CMRF-44	Unknown	+	Unknown	57

遺伝子発現の特異性の表記は+++；樹状細胞のみに発現、++；主に樹状細胞に発現、+；リンパ球などの他の血球細胞にも発現。機能については確認されているものはほとんどない。



表 2 単球よりも樹状細胞で高発現していた遺伝子

Accession	Blast identity	Frequency
M28827	thymocyte antigen CD1c	15
M59488	S100 protein beta-subunit (S100B)	13
AF111198	DC-CK1	13
J05550	mannose receptor	12
D43767	TARC	9
L23808	metalloproteinase (HME)	8
	HLA-DQ	8
X13694	osteopontin	6
U52682	interferon regulatory factor 4 (IRF4)	3
L11015	lymphotoxin-beta	3
M29696	interleukin-7 receptor (IL-7R)	3
	HLA-DR	3
AB004064	tomoregulin	2
X87212	cathepsin C.	2
M11313	alpha-2-macroglobulin	2
K00558	alpha-tubulin	2
X89713	death associated protein 5 (DAP-5)	2
L46720	autotaxin-t (atx-t)	2
AJ132502	Z39Ig	2
J05070	type IV collagenase	2
M16750	pim-1 proto-oncogene	1
D84239	IgG Fc binding protein (FcγBP)	1
D14657	KIAA0101 gene	1
AF070674	inhibitor of apoptosis protein-1 (MIHC)	1
X00351	beta-actin	1
Y13286	GDP dissociation inhibitor beta (GDI2)	1
J04026	thioredoxin	1
U53447	PAPS synthase (PAPSS)	1
M16985	mannose-6-phosphate receptor (cation dependent) (M6PR)	1
X93334	Homo sapiens mitochondrial DNA	1
AF109127	stromal cell derived factor receptor 1 (SDFR1)	1
X52195	five-lipoxygenase activating protein (FLAP)	1
X04412	gelsolin	1

表 2 のつづき

AB033023	KIAA1197 protein	1
AF001601	paraoxonase (PON2)	1
AF060219	RCC1-like G exchanging factor RLG	1
Z35093	SURF-1	1
AK026425	Homo sapiens cDNA: FLJ22772 fis, clone KA1A1395	1
X14768	monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)	1
AF023476	meltrin-L precursor (ADAM12)	1
AK022799	Homo sapiens cDNA FLJ12737 fis, clone NT2RP2000337	1
AF097514	stearoyl-CoA desaturase (SCD)	1
D89053	Acyl-CoA synthetase 3	1
U83171	macrophage-derived chemokine precursor (MDC)	1
AF035947	cytokine-inducible inhibitor of signalling type 1b (CIS1)	1
L13318	pyruvate dehydrogenase E1-alpha subunit (PDHA1)	1
	HLA-DP	1
	ESTs	7
	sequence error	19
	repetitive element only	17
	no match	13

Frequency はディファレンシャルスクリーニングで樹状細胞で発現量が増加していると判定したクローンの重複を示しており、この頻度順に掲載した。EST はヒト EST にのみ相同性があったものを示す。HLA 遺伝子については複数のボランティアから採取した末梢血を用いているため様々なタイプがみられたが、DQ, DR, DP 分子に分類して表示した。

表 3 既知の遺伝子群の RT-PCR に使用したプライマー

抗原	上段；センスプライマー 下段；アンチセンスプライマー	PCR 産物 サイズ(bp)	アニーリング 温度(℃)
ADAM12	TTGTCAGTGCCCTCTGTTCGGAGTG TTCCTTGCCTCTGAAACTCTCGGT	569	58
autotaxin-t	AGCCTTACTTTGAAACAGCACCTTC CAGACCCGTTTCAAAGCAGGATAAC	873	56
CIS1	CTTTGCTGGCTGTGGAGCGGACTG GACGGAAGCTGGAGTCGGCATACT	366	64
DAP5	GGGGGTGCTTCTCGTTTCAGTGCT TTCTCGCAACTCTACGGTATCCTG	896	58
FLAP	GGATCAAGAAACTGTAGGCAATGT GGAAATGAGAAGTAGAGGGGAGAT	480	56
FcγBP <sup>#78</sup>	ACCACTCCTTCGATGGCC TGGTGCCGAGGGCAGCCACG	186	60
IRF4	GGTGTGGGAGAACGAGGAGAAGAG CTCAGGTGGGCACAAGCATAAAA	558	58
M6PR	TGGAGGACTGGACTGCTACTACTA CGAGGTTTGAACGGCAGACAAAG	724	58
MIHC	CTTTTCTGCTGGGGTTCCTGTCT GGCTTGAACCTTGACGGATGAACTC	895	58
Osteopontin	GGCTGATTCTGGAAGTTCTGAGGA GACTGCTTGTGGCTGTGGGTTTCA	665	58
PAPSS	CAGAGAGCAACCAATGTCACCTAC GACACCTCCATCCAGAAGACAATC	836	58
PDHA1	GGAGGTTGTGCTAAAGGGAAAGGA TCAAAAGGTGGGTTCGCTGGAGTAG	700	58
PON2	GTAGACCTTCCACACTGCCACCTG GCTGAATCAAACTCTTCTGCTACC	556	56
RLG	GTCAGGCTTGTGTCTTTGGCAGTG ACAGTGACAGGAGTAGGATAGGAC	778	60
SCDR1	CCCTCTCGCTGTTCGCTGGTCTCTG CCTGCCCTTCATTCCTTGTCTCAC	380	58
SURF1	TTTGGCTTGGGGACATGGCAGGTC TATCCAGGGACAGGGCTTCAGCAG	715	63

# : 過去の文献で用いられていたプライマーとその文献。

## 12 参考文献

1. Banchereau, J. et.al : Annual Review of Immunology **18** : 767-811, 2000
2. Inaba, K. et.al : Journal of Experimental Medicine **191** : 927-36, 2000
3. Turley, S. J. et.al : Science **288** : 522-7, 2000
4. Rescigno, M. et.al : Immunology Today **20** : 200-3, 1999
5. Matsue, H. et.al : Journal of Immunology **162** : 5287-98, 1999
6. Banchereau, J. et.al : Nature **392** : 245-52, 1998
7. Grouard, G. et.al : Journal of Experimental Medicine **185** : 1101-11, 1997
8. Siegal, F. P. et.al : Science **284** : 1835-7, 1999
9. Grouard, G. et.al : Nature **384** : 364-7, 1996
10. Kawakami, Y. : Microbiology & Immunology **42** : 801-13, 1998
11. Kawakami, Y. et.al : Immunologic Research **16** : 313-39, 1997
12. Flamand, V. et.al : European Journal of Immunology **24** : 605-10, 1994
13. Mayordomo, J. I. et.al : Nature Medicine **1** : 1297-302, 1995
14. Kaplan, J. M. et.al : Journal of Immunology **163** : 699-707, 1999
15. Ishida, T. et.al : Clinical & Experimental Immunology **117** : 244-51, 1999
16. Hsu, F. J. et.al : Nature Medicine **2** : 52-8, 1996
17. Nestle, F. O. et.al : Nature Medicine **4** : 328-32, 1998
18. Dhodapkar, M. V. et.al : Journal of Clinical Investigation **104**: 173-80, 1999
19. Thomson, A. W. et.al : Immunology Today **20** : 27-32, 1999
20. Thomson, A. W. et.al : Transplantation Proceedings **31** : 2738-9, 1999
21. Steinbrink, K. et.al : Journal of Immunology **159** : 4772-80, 1997
22. Kronin, V. et.al : International Immunology **12** : 731-5, 2000
23. Albert, M. L. et.al : Nature Immunology **2** : 1010 - 1017, 2001
24. Gallucci, S. et.al : Current Opinion in Immunology **13** : 114-9, 2001
25. Akbari, O. et.al : Nature Immunology **2** : 725-31, 2001
26. Hackstein, H. et.al : Trends in Immunology **22** : 437-42, 2001
27. Nishioka, Y. et.al : Cancer Research **59** : 4035-41, 1999
28. Ju, D. W. et.al : Cancer Research **61** : 3735-40, 2001
29. Min, W. P. et.al : Journal of Immunology **164** : 161-7, 2000
30. O'Rourke, R. W. et.al : Transplantation **69** : 1440-6, 2000

31. Gorczynski, R. M. et.al : *Clinical Immunology* **95** : 182-9, 2000
32. Kim, S. H. et.al : *Journal of Immunology* **166** : 3499-505, 2001
33. Ariizumi, K. et.al : *Journal of Biological Chemistry* **275** : 11957-63, 2000
34. Colonna, M. et.al : *European Journal of Immunology* **30** : 697-704, 2000
35. Valladeau, J. et.al : *Immunity* **12** : 71-81, 2000
36. Sonderbye, L. et.al : *Advances in Experimental Medicine & Biology* **417** : 41-6, 1997
37. Vicari, A. P. et.al : *Immunity* **7** : 291-301, 1997
38. Adema, G. J. et.al : *Nature* **387** : 713-7, 1997
39. Geijtenbeek, T. B. et.al : *Cell* **100** : 575-85, 2000
40. de Saint-Vis, B. et.al : *Immunity* **9** : 325-36, 1998
41. Ariizumi, K. et.al : *Journal of Biological Chemistry* **275** : 20157-67, 2000
42. Tiefenthaler, M. et.al : *Journal of Immunology* **163** : 760-5, 1999
43. Jiang, W. et.al : *Nature* **375** : 151-5, 1995
44. Bates, E. E. et.al : *Molecular Immunology* **35** : 513-24, 1998
45. Shikano, S. et.al : *Journal of Biological Chemistry* **276** : 8125-34, 2001
46. Imai, T. et.al : *International Immunology* **11** : 81-8, 1999
47. Mueller, C. G. et.al : *Journal of Experimental Medicine* **186** : 655-63, 1997
48. Hartgers, F. C. et.al : *European Journal of Immunology* **30** : 3585-90, 2000
49. Hock, B. D. et.al : *Tissue Antigens* **53** : 320-34, 1999
50. Bates, E. E. et.al : *European Journal of Immunology* **27** : 2471-7, 1997
51. Godiska, R. et.al : *Journal of Experimental Medicine* **185** : 1595-604, 1997
52. Mueller, C. G. et.al : *European Journal of Immunology* **27** : 3130-4, 1997
53. Zhou, L. J. et.al : *Journal of Immunology* **154** : 3821-35, 1995
54. Cella, M. et.al : *Journal of Experimental Medicine* **185** : 1743-51, 1997
55. Zhang, W. et.al : *Biochemical & Biophysical Research Communications* **282** : 1067-73, 2001
56. Hock, B. D. et.al : *Immunology* **83** : 573-81, 1994
57. de Baey, A. et.al : *Journal of Experimental Medicine* **191** : 743-8, 2000
58. Regnault, A. et.al : *Journal of Experimental Medicine* **189** : 371-80, 1999
59. Albert, M. L. et.al : *Journal of Experimental Medicine* **188** : 1359-68, 1998
60. Sallusto, F. et.al : *Journal of Experimental Medicine* **182** : 389-400, 1995
61. Basu, S. et.al : *Immunity* **14** : 303-13, 2001

62. Binder, R. J. et.al : *Nature Immunology* **1** : 151-5, 2000
63. Akbari, O. et.al : *Journal of Experimental Medicine* **189** : 169-78, 1999
64. Hartmann, G. et.al : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96** : 9305-10, 1999
65. Cella, M. et.al : *Journal of Experimental Medicine* **189** : 821-9, 1999
66. Ross, R. et.al : *Journal of Investigative Dermatology* **115** : 658-63, 2000
67. Sozzani, S. et.al : *Journal of Leukocyte Biology* **66** : 1-9, 1999
68. Dieu, M. C. et.al : *Journal of Experimental Medicine* **188** : 373-86, 1998
69. Sozzani, S. et.al : *Journal of Immunology* **161** : 1083-6, 1998
70. Ngo, V. N. et.al : *Journal of Experimental Medicine* **188** : 181-91, 1998
71. Pierre, P. et.al : *Nature* **388** : 787-92, 1997
72. Grakoui, A. et.al : *Science* **285** : 221-7, 1999
73. Ozkaynak, E. et.al : *Nature Immunology* **2** : 591-6, 2001
74. Dong, H. et.al : *Nature Medicine* **5** : 1365-9, 1999
75. Tseng, S. Y. et.al : *Journal of Experimental Medicine* **193** : 839-46, 2001
76. Caux, C. et.al : *Nature* **360** : 258-61, 1992
77. Hashimoto, S. et.al : *Blood* **94** : 845-52, 1999
78. Harada, N. et.al : *Journal of Biological Chemistry* **272** : 15232-41, 1997
79. Pulford, K. A. et.al : *Journal of Clinical Pathology* **42** : 414-21, 1989
80. Porcelli, S. A. et.al : *Annual Review of Immunology* **17** : 297-329, 1999
81. Yoshida, S. et.al : *International Immunology* **2** : 585-91, 1990
82. Wolfsberg, T. G. et.al : *Developmental Biology* **180** : 389-401, 1996
83. Primakoff, P. et.al : *Trends in Genetics* **16** : 83-7, 2000
84. Kataoka, M. et.al : *Journal of Biological Chemistry* **272** : 18209-15, 1997
85. Lunn, C. A. et.al : *FEBS Letters* **400** : 333-5, 1997
86. Rosendahl, M. S. et.al : *Journal of Biological Chemistry* **272** : 24588-93, 1997
87. Yagami-Hiromasa, T. et.al : *Nature* **377** : 652-6, 1995
88. Watson, A. D. et.al : *Journal of Clinical Investigation* **96** : 2882-91, 1995
89. Sanghera, D. K. et.al : *American Journal of Human Genetics* **62** : 36-44, 1998
90. Hegele, R. A. et.al : *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **82** : 3373-7, 1997
91. Hamuro, J. et.al : *Monograph of Japan Journal of Cancer Research* **48** : 153-64, 1999

92. Yanagata, T. et.al : *Molecular & Cellular Biology* **16** : 1283-94, 1996
93. Mittrucker, H. W. et.al : *Science* **275** : 540-3, 1997
94. Rosenbauer, F. et.al : *Blood* **94** : 4274-81, 1999
95. Matsumoto, A. et.al : *Blood* **89** : 3148-54, 1997
96. Matsumoto, A. et.al : *Molecular & Cellular Biology* **19** : 6396-407, 1999
97. Yoshimura, A. et.al : *EMBO Journal* **14** : 2816-26, 1995
98. O'Regan, A. W. et.al : *Immunology Today* **21** : 475-8, 2000
99. Giachelli, C. M. et.al : *American Journal of Pathology* **152** : 353-8, 1998
100. Patarca, R. et.al : *Critical Reviews in Immunology* **13** : 225-46, 1993
101. Weber, G. F. et.al : *Science* **271** : 509-12, 1996
102. Ophascharoensuk, V. et.al : *Kidney International* **56** : 571-80, 1999
103. Weiss, J.M. et.al : *Journal of Experimental Medicine* **194** : 1219-1230, 2001
104. Ashkar, S. et.al : *Science* **287** : 860-4, 2000
105. O'Regan, A. W. et.al : *Journal of Leukocyte Biology* **68** : 495-502, 2000
106. Goding, J. W. et.al : *Immunological Reviews* **161** : 11-26, 1998
107. Zhu, Z. et.al : *Nature Genetics* **20** : 337-43, 1998
108. Le Naour, F. et.al : *Journal of Biological Chemistry* **276** : 17920-31, 2001
109. Woods, J. W. et.al : *Journal of Experimental Medicine* **178** : 1935-46, 1993