

学位論文

**Doctor's Thesis**

移植前ドナー血輸血による免疫学的不応答状態の誘導、  
樹状細胞のフェノタイプ及び脾臓への特異的遊走・局在に関する研究

(Induction of immunological unresponsiveness by donor blood transfusion prior to liver  
transplantation in rat - Role of dendritic cell migration from donor liver to recipient spleen)

古橋 隆

Takashi Furuhashi

熊本大学大学院医学研究科博士課程外科系専攻外科学第二

指導：小川 道雄 前教授

紹介：馬場 秀夫 教授

2005年度

## 目 次

目 次	P 1
要 旨	P 2～3
発表論文リスト	P 4～5
謝 辞	P 6
略語一覧	P 7
研究の背景と目的	P 8～9
序 論	P10～12
実験方法	P13～14
実験結果	P15～31
1) ラット移植肝の生着期間	
2) 抗ラット樹状細胞抗体を用いた肝臓の組織学的免疫染色	
3) 肝移植後の脾臓における樹状細胞の分布	
4) 白脾髄及び赤脾髄における樹状細胞数の定量	
5) 移植後の脾臓におけるドナー由来の細胞の分布	
6) 移植後に脾臓から単離した樹状細胞の解析	
7) 移植後の脾臓における2つの樹状細胞群における白血球共通抗原 (CD45RC) の発現	
8) CD45R <sup>high</sup> OX62 <sup>+</sup> 細胞とCD45R <sup>low</sup> OX62 <sup>+</sup> 細胞の二つのフェノタイプの形態学的特徴	
9) 樹状細胞の二つのフェノタイプにおけるサイトカイン・プロフィール	
10) 樹状細胞の二つのフェノタイプにおけるケモカイン・レセプター CCR5 及びCCR7mRNAの発現	
11) 樹状細胞の二つのフェノタイプにおけるL-selectin (CD62L) の発現	
12) 樹状細胞の二つのフェノタイプにおけるケモカイン・レセプター CCR5 及びCCR7の発現	
13) 移植後の脾臓におけるMIP-3 $\beta$ の発現	
14) 移植後の脾臓におけるMAdCAM-1の発現	
15) 樹状細胞の2つのフェノタイプにおけるサイトカイン、ケモカイン、及び接着分子のリガンドの発現	
考 察	P32～35
結 語	P36
参考文献	P37～42

## 要 旨

肝移植後には、ドナーの樹状細胞がレシピエントの脾臓に遊走する。ラット同種肝移植では、移植前ドナー血輸血により免疫学的不応答状態が誘導される。この機序を解明する目的で、本研究では、移植前ドナー血輸血を行ったラット肝移植モデルを用いて、脾臓に遊走するドナーの樹状細胞のフェノタイプ及びその脾臓内分布を検索した。

ドナーの樹状細胞は、ラット抗樹状細胞抗体(OX62)と抗ラットclass II 組織適合性抗原抗体(OX76)を用いて同定した。抗CD45RC抗体、抗L-selectin抗体、抗CCR5 及びCCR7ケモカイン・レセプター抗体により、樹状細胞のフェノタイプを決定した。さらに、樹状細胞のサイトカイン分泌動態をRT-PCR法にて検索した。

移植前ドナー血輸血により、移植肝は有意に生着延長した。免疫組織染色により、ドナー血輸血群では、OX62陽性細胞が、赤脾髄に多数局在していることが判明した。無処置群では、OX62陽性細胞は、主に白脾髄に認められた。OX62陽性細胞のほとんどはOX76陽性でドナー由来であった。脾臓に遊走した樹状細胞にはCD45RChighOX62+細胞、CD45RClowOX62+細胞の2種類のフェノタイプが存在していた。RT-PCR法では、CD45RClowOX62+細胞にはIL-10 mRNAが発現し、CD45RChighOX62+細胞では、IL-2 mRNAの発現が認められた。CD45RChighOX62+細胞表面上にケモカイン・レセプターCCR5及びCCR7が強く発現していた。CD45RClowOX62+細胞では、これらのケモカイン・レセプターの発現は弱かった。CCR7 [Epstein-Barr virus-induced molecule 1 (EBI-1)] のリガンドであるELC/MIP3-βは主に白脾髄に発現していた。L-セレクチン(CD62L)のリガンドであるMucosal addressin-cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1)は脾臓の辺縁帯と白脾髄に発現していた。ドナー血輸血群では白脾髄におけるMAdCAM-1の発現は弱かった。MAdCAM-1のリガンドであるL-セレクチン(CD62L)はCD45RChighOX62+細胞表面上に強く発現していたが、CD45RClowOX62+細胞表面ではその発現は非常に弱かった。

以上の結果から、移植前ドナー血輸血による免疫学的不応答状態を誘導したラットで

は、移植後にCCR5<sup>low</sup>CCR7<sup>low</sup>CD62L<sup>low</sup> CD45RC<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞が赤脾髄に遊走・局在していることが判明した。このような現象が、移植前ドナー輸血による免疫学的寛容状態の誘導に深く関与していると考えられた。

## 学位論文の骨格となる発表論文及び過去の発表論文リスト

### 学位論文の骨格となる発表論文

Furuhashi T, Yamaguchi Y, Wang FS, Uchino S, Okabe K, Ohshiro H, Kihara S, Yamada S, Mori K, Ogawa M.

Hepatic CCR7<sup>low</sup>CD62L<sup>low</sup>CD45RC<sup>low</sup> Allograft Dendritic Cells Migrate to the Splenic Red Pulp in Immunologically Unresponsive Rats

J Surg Res 124:29-37, 2005.

### 過去の発表論文リスト

Ohshiro H, Yamaguchi Y, Okabe K, Takai E, Goto M, Zhang JL, Uchino S, Yamada S, Ishihara K, Furuhashi T, Mori K, Ikeda S, Sera Y, Ogawa M.

Differential Splenic Migration of Dendritic Cells after Immunologic Unresponsiveness in Rat Hepatic Allografts Induced by Pretransplant Donor-Specific Transfusion.

J Surg Res. 101:29-36, 2001.

Yamaguchi Y, Ohshiro H, Nagao Y, Odawara K, Okabe K, Hidaka H, Ishihara K, Uchino S, Furuhashi T, Yamada S, Mori K, Ogawa M.

Urinary Trypsin Inhibitor Reduces C-X-C Chemokine Production in Rat Liver Ischemia/Reperfusion.

J Surg Res 94:107-115, 2000.

Okabe K, Yamaguchi Y, Takai E, Ohshiro H, Zhang J-L, Hidaka H, Ishihara K, Uchino S, Furuhashi T, Yamada S, Mori K, Ogawa M.

CD45RC<sup>-</sup>  $\gamma$   $\delta$ <sup>+</sup> T-Cell Infiltration Is Associated With Immunologic Unresponsiveness Induced by Prior Donor-Specific Blood Transfusion in Rat Hepatic Allografts.

Hepatology 33:877-886, 2001.

Zhang JL, Yamaguchi Y, Mori K, Okabe K, Hidaka H, Ohshiro H, Uchino S, Ishihara K, Furuhashi T, Yamada S, Ogawa M.

A Serine Protease Inhibitor, N- $\alpha$ -Tosyl-L-lysine Chloromethyl Ketone, Prolongs Rat Hepatic Allograft

Survival.

J Surg Res 96:296-303, 2001.

Uchino S, Yamaguchi Y, Furuhashi T, Wang FS, Zhang JL, Okabe K, Kihara S, Yamada S, Mori K, Ogawa M.

Steatotic Liver Allografts Up-Regulate UCP-2 Expression and Suffer Necrosis in Rats.

J Surg Res 120:73-82. 2004.

## 謝 辞

本研究は熊本大学大学院医学研究科外科系外科学第二講座において、小川道雄教授の御指導の下に行われました。研究並びに多面のご指導を賜りました小川道雄教授に深甚なる謝意を捧げます。

また、研究並びに論文作成に直接御指導、御助言をいただきました外科学第二講座助教授山口康雄博士に深く感謝いたします。

さらに、研究にあたり、御指導、御協力下さった教室員諸兄の皆様方にも感謝の意を捧げます。

## 略語一覧

MAdCAM-1, mucosal addressin-cell adhesion molecule-1

EBI-1, Epstein-Barr virus-induced molecule 1

DC, dendritic cells

DST, donor-specific blood transfusion

MIP-3  $\beta$  , macrophage inflammatory protein-3  $\beta$

HEV , high endothelial venules



## 研究の背景と目的

臓器移植における拒絶反応は最も重大な問題である。移植免疫研究の究極の目標は、免疫学的寛容状態を誘導するような治療戦略の確立である。移植前にドナー抗原を注入してドナー特異的免疫学的寛容状態を誘導できることが多数報告されてきた。しかし、その免疫学的機序については不明の点が多い。樹状細胞はT細胞を活性化する抗原提示細胞である。静脈内に投与された樹状細胞は、主にT細胞領域である白脾髄に遊走・局在する(1)。血管吻合により血液が流入する移植臓器では、移植前ドナー抗原投与による感作が問題であった。Larsenら(2)は、マウス心移植モデルで、ドナー由来のMHC class II陽性の樹状細胞が、白脾髄に遊走・局在し、そこでT細胞と免疫反応を起こすことを報告した。これは、移植臓器から血流を介して遊走する樹状細胞により引き起こされる中心性感作の新しい免疫経路であることが示唆されている(2)(3)。

白血球共通抗原であるCD45には、mRNAのスプライシングに由来する多くのアイソフォームが存在する。cDNAクローンからABC、AB、BC、B、C、Oの6種類の異なったCD45のアイソフォームが同定された。さらに、ハイブリダイゼーション法によりAアイソフォームの存在も報告されている(4)。ラットではCD45R<sup>high</sup>及びCD45R<sup>low</sup>のCD4<sup>+</sup>T細胞のフェノタイプが存在する(5)。我々は、移植前ドナー血輸血によるラット肝移植における免疫学的不応答状態の誘導時には、CD45R<sup>low</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞が移植肝内に持続的に浸潤していることを報告した(6)。従って、樹状細胞にもCD45RCの発現に基づくフェノタイプの存在が想定される。

樹状細胞は炎症性メディエータによって刺激され、非リンパ組織からリンパ組織へ遊走し、T細胞を介して、免疫反応を引き起こす。樹状細胞の遊走と局在は、ケモカインによって制御されている。CCケモカインにより樹状細胞は遊走し、血管内皮を介して局所へ浸潤する。このような遊走能は樹状細胞の成熟度に密接に関連している。未成熟の樹状細胞はCCR1、CCR2、CCR5、CXCR1などのケモカイン・レセプターを発現し、炎症局所で産生されるそれぞれのリガンドであるケモカインと反応する。CCR7(EBI-1)のリガンドであるELC/MIP3 $\beta$ は2次リンパ組織のT細胞領域に強く発現し、免疫担当細胞の遊走・局

在に強く関与している(7)(8)。CCR7(EBI-1)は樹状細胞のケモカイン・レセプターの一つとして同定され、細胞の分化に伴いその発現が増強する(9)。一方、細胞分化に伴って、樹状細胞のCCR1及びCCR5のmRNAの発現が抑制される。これらのケモカイン・レセプターの発現動態は、樹状細胞によって引き起こされる種々の免疫反応動態と一致している(10)。

ドナー由来の樹状細胞は、同種移植における寛容状態の誘導に深く関与していることが示唆されてきた(11)。樹状細胞が白脾髄 (T細胞領域) へ遊走・局在すると、臓器移植後に急性拒絶反応を引き起こす(12)。ドナー由来の樹状細胞の遊走・局在パターンは免疫学的不応答状態の誘導に重要な役割を演じていることが推察される。そして、樹状細胞の免疫組織への遊走・局在は、局所のホーミング・レセプターの発現と関連している。

Mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1)は免疫グロブリン・スーパーファミリーの一つで、白血球のホーミング・レセプターであるL-セレクチンや $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する血管内皮細胞のリガンドである(13)(14)。MAdCAM-1は脾臓の辺縁洞の細胞に強く発現している(15)(16)。白血球は白脾髄に遊走し、MAdCAM-1を発現する網状構造を通過する(17)。

本研究ではラット肝移植後の脾臓におけるMAdCAM-1の発現及び樹状細胞におけるL-セレクチンの発現についても検討した。

## 序論

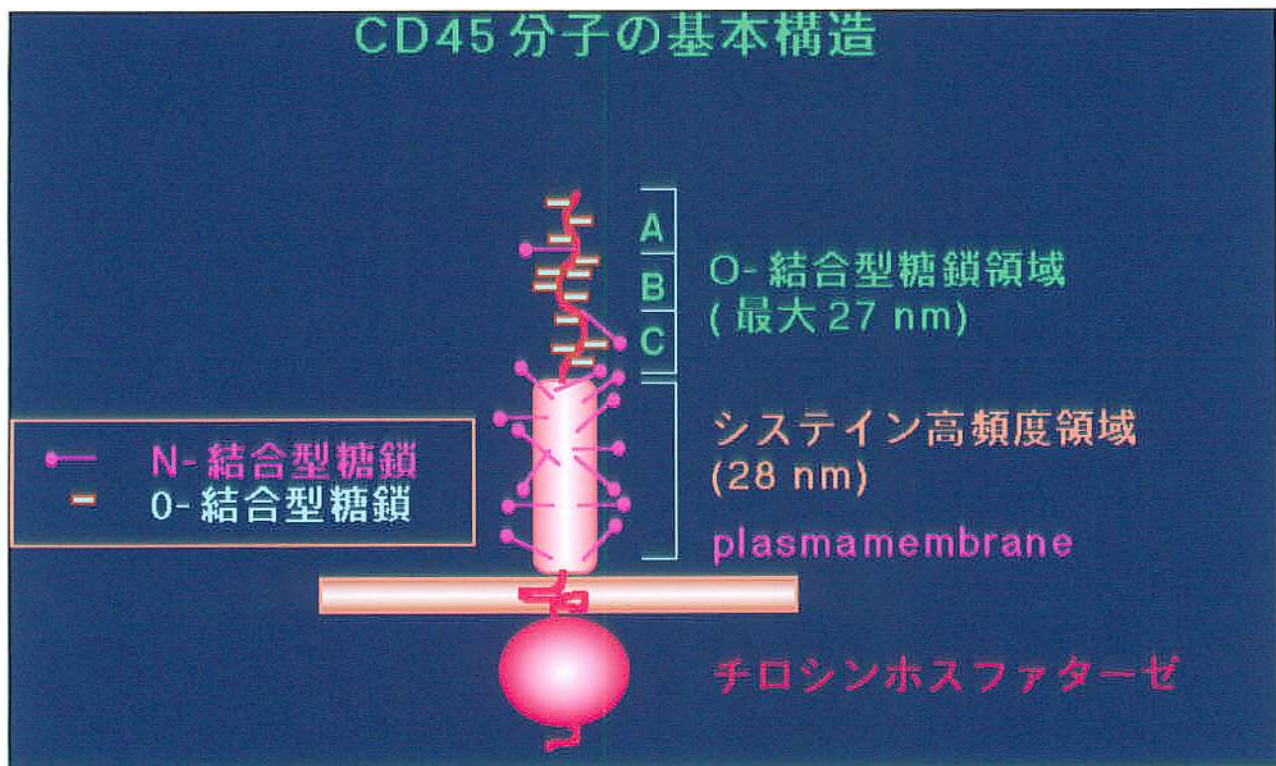
免疫反応機構には、細胞性免疫と体液性免疫が関与している。急性拒絶反応時には、免疫担当細胞間のネットワークとサイトカインや補体などの液性因子が重要な役割を演じている。T細胞による抗原認識は、抗原提示細胞上に発現する主要適合性抗原複合体とT細胞抗原受容体との結合に伴うシグナルと、T細胞上に発現する補助分子と抗原提示細胞上に発現するそのリガンドとの結合によるシグナルが必要不可欠である。抗原提示細胞とT細胞の抗原認識機構を免疫学的に操作し、その後の抗原刺激により急性拒絶反応を惹起できない状態を、免疫学的寛容状態という。ヒトの臓器移植における免疫寛容の誘導は、移植免疫の究極の目標である。

レシピエントに対する移植前ドナー血輸血やドナー骨髄細胞の静注投与などの移植前ドナー抗原投与による移植片の生着延長効果が多数報告されている。近年、抗原提示細胞として樹状細胞が注目され、各種の免疫操作により免疫寛容状態の誘導が可能であることが報告されている。

樹状細胞は、樹状突起を有する細胞の総称である。生体内に広く分布し、主要組織適合性抗原class II分子を強く発現している。樹状細胞はT細胞とクラスターを形成し、強力なT細胞刺激活性を有する。同種・異種リンパ球混合培養ではT細胞の増殖刺激活性を示す。現在、樹状細胞群には、リンパ組織樹状細胞、相互連結性樹状細胞、濾胞性樹状細胞、ヴェール細胞、ランゲルハンス細胞、未同定樹状細胞、間質細胞などが含まれる。

CD45は白血球共通抗原のひとつで膜型チロシンホスファターゼであり、成熟赤血球や血小板を除くすべての血球とその前駆細胞に発現している。CD45は1番染色体にコードされ、7種類のアイソフォームに分類される。CD45の基本構造は棒状の細胞外ドメイン、膜貫通型ドメイン及び球状の細胞内ドメインから構成される(図1)。CD45はT細胞抗原レセプター(TCR)とB細胞抗原レセプター(BCR)を介したリンパ球のシグナル伝達に深く関与している。ナイーブT細胞のマーカーは、ヒトではCD45RA、マウスではCD45RB、ラットではCD45RCであることが報告されている。ヒトでは、T細胞はCD45の発現の有無により CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (resting/naive) T細胞と CD45RO<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (activated/memory) T細胞の2種類のフェノタイプに分けられる。

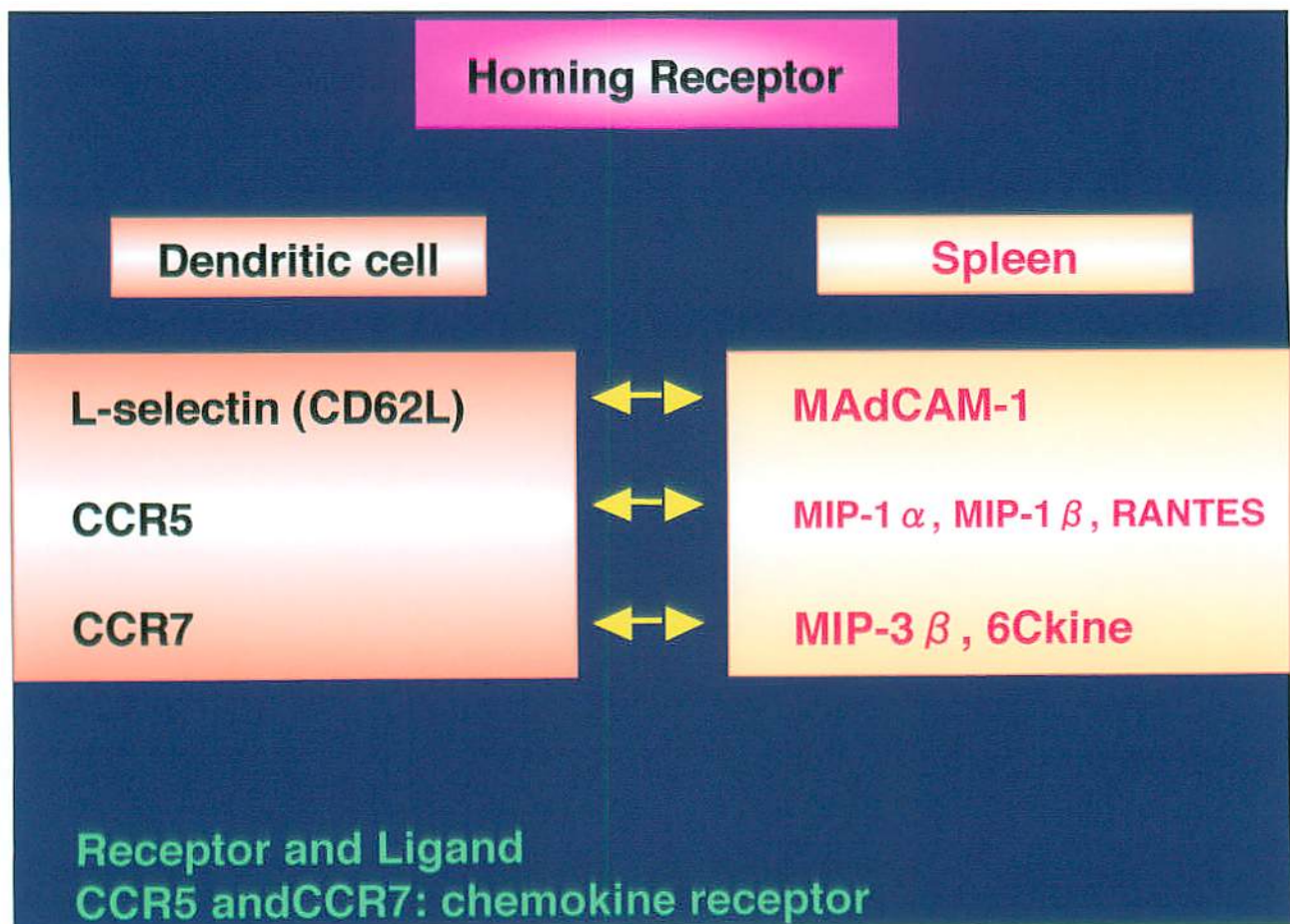
図 1



強力な好中球遊走活性を有するヒトinterleukin (IL)-8の精製ならびにcDNAクローニングに引き続き、IL-8と同様に分子量が8-12kDaで、保存された位置にシステイン残基をもつ

サイトカインが続々と発見された。これらのサイトカインの多くは、特定の種類の白血球の遊走能をはじめとする種々の活性を亢進させることから、ケモカイン(chemotactic cytokine)と総称される。これらのケモカインはシステイン残基の構造から、(a) C-X-C ( $\alpha$ -chemokine)、(b) C-C ( $\beta$ -chemokine)、(c) C、(d) C-X3-C、に大別される。現在までに報告されているケモカイン・レセプターは、7回細胞膜貫通型のG蛋白会合型レセプター構造を有する。末端部分は $\alpha$ ヘリックスを形成する。ケモカイン・レセプターをコードする遺伝子産物が単離されているが、これらのレセプターは複数のケモカインと結合する。つまり一つのケモカインが複数のレセプターと結合することが可能であるという特性を有する。従って、複数のケモカインが共通のレセプター成分に結合したり、細胞内信号伝達機構においても共通の蛋白を標的としており、多くのケモカインが類似の生物活性(redundancy)を示すことになる。標的細胞上に発現するレセプターの種類或いはそれらの有無により、各種ケモカインの生物活性が異なってくる。

## 図2



## 実験方法

### ラット同所性肝移植

ACI (RT1B<sup>a</sup>) ラットをドナー、LEW (RT1B<sup>l</sup>) をレシピエントとしてカフ法を用いて、同所性肝移植を行った。

### 免疫学的寛容状態の誘導

移植7日前にACIドナー・ラットから採取したヘパリン加新鮮血1 mLをLEW レシピエント・ラットの陰茎静脈に注入した (Donor-specific blood transfusion: DST)。またBN(RT1B<sup>u</sup>) ラットから採取したヘパリン加新鮮血1 mLをLEW レシピエント・ラットの陰茎静脈に注入し、対照群とした。

### 実験群

無処置群、DST群、BN血輸血群に分けて、生存期間及び移植肝の病理組織学的検査を行った。

### 病理組織学的検査

拒絶死における移植肝を採取し、ホルマリン固定後、HE染色を行い病理組織検索を実施した。拒絶反応の程度は盲検法により病理学者によって判定された。門脈の炎症所見、胆管の破壊、静脈血管内皮細胞の3つのカテゴリーをもとに、Banff schemaによる組織学的拒絶反応の程度を判定した。

### モノクローナル抗体

脾臓に分布する樹状細胞は抗ラット樹状細胞モノクローナル抗体 (OX62) によって同定した。ドナー由来の樹状細胞はラットのRT1B<sup>a</sup> class II 主要組織適合性抗原を認識するOX76を用いて同定した。CD45の発現は抗CD45RC抗体を用いて検索した。樹状細胞表面上のケモカイン・レセプターの発現を、抗CCR5抗体及び、抗CCR7抗体を用いて検索した。CCR7のリガンドであるELC/MIP-3 $\beta$ の発現は免疫組織学的染色法を用いて検討し

た。

#### 樹状細胞の同定

赤脾髄、辺縁洞、白脾髄におけるOX62陽性の樹状細胞数を算定した。

#### 樹状細胞の単離

脾臓内に遊走した樹状細胞をFACSCAN及び、FACSCaliberを用いて単離し、OX62、OX76、CD45RC、CCR5、CCR7、CD62Lに対するモノクローナル抗体を用いて、それぞれの発現により、樹状細胞のフェノタイプを同定した。

#### 脾臓からのCD45R<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞及びCD45R<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞の単離

FACSCAN及びFACSCaliberを用いて、肝移植後の脾臓からCD45R<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞及びCD45R<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞をそれぞれ単離した。

RT-PCR法を用いて、それぞれの細胞群におけるサイトカイン及びケモカイン・レセプターのmRNAの発現を検索した。

## 実験結果

### 1) ラット移植肝の生着期間

実験に使用したラットにおける class II組織適合性抗原は、LEW(RT1B<sup>l</sup>)、ACI(RT1B<sup>a</sup>)、BN(RT1B<sup>n</sup>)である。ACI(RT1B<sup>a</sup>)ラットをドナーとした同所性肝移植では、急性拒絶反応が認められた(生着期間:  $10.0 \pm 0.7$ 日)。一方、移植7日前にドナーACI血輸血を実施したDST群では、生着期間が  $>70.4 \pm 23.2$ 日と著明に延長した。また、third-party strainであるBNラット血を移植7日前に輸血したBN輸血群では、生着期間が  $10.6 \pm 1.4$ 日で無処置群と比較して有意差は認められなかった。従って、移植7日前にACIドナー血を輸血したDST群における著明に生着延長した移植肝では、ドナー特異的免疫学的不応答状態が誘導されることが判明した。

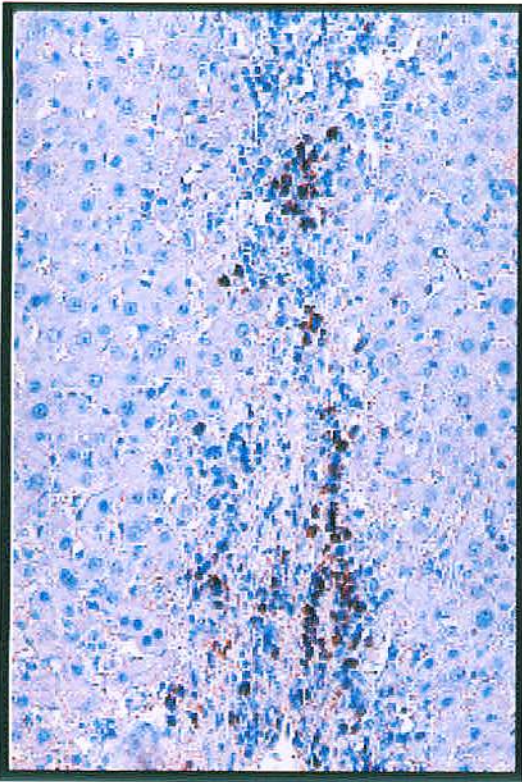
### 2) 抗ラット樹状細胞抗体を用いた肝臓の組織学的免疫染色

ヒト肝臓の樹状細胞は、Glisson鞘の門脈領域などの間質に分布することが報告されている。抗ラット樹状細胞抗体(OX62)を用いた正常肝組織の免疫染色では、OX62<sup>+</sup>細胞が門脈領域(図3A)及び中心静脈周囲(図3B)に多数認められた。

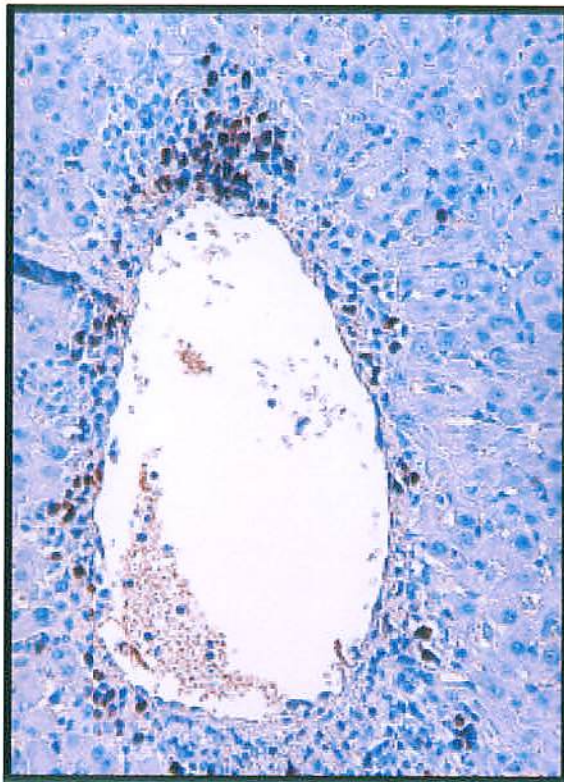


图3 Immunostaining with anti-rat dendritic cell (OX62) monoclonal antibody in the liver

**A**



**B**



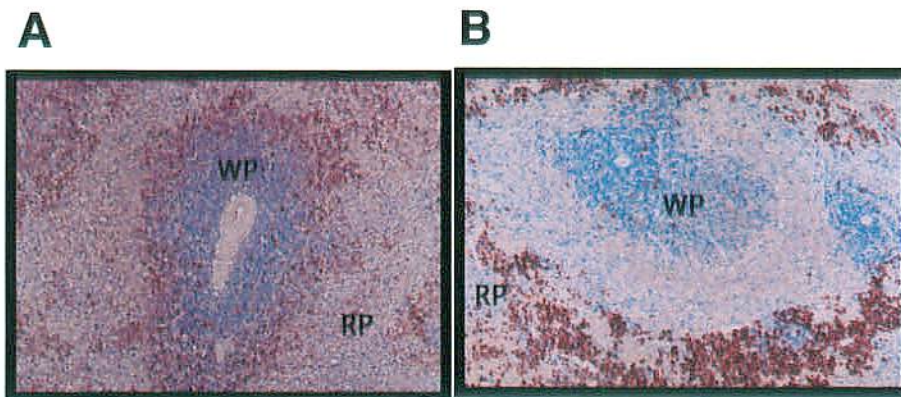
### 3) 肝移植後の脾臓における樹状細胞の分布

脾臓は赤脾髄と白脾髄からなる。白脾髄は動脈系の血管周囲に発達したT細胞領域である。赤脾髄は脾洞とよばれる血管と、その間の脾索とよばれる組織からなるB細胞領域である。免疫反応は細胞性免疫と液性免疫に分かれ、細胞性免疫反応は、主に白脾髄（T細胞領域）に起因する。赤脾髄（B細胞領域）は液性免疫に深く関与している。白脾髄と赤脾髄の間の移行領域は、辺縁部（marginal zone）とよばれ、白脾髄のなかの動脈を通ってきた免疫担当細胞や、血液中の各種成分が最初に赤脾髄（脾臓実質）に接する場所である。

抗ラット樹状細胞抗体（OX62）を用いて、移植後の脾臓における樹状細胞の分布を検索した。無処置（急性拒絶群）では、OX62<sup>+</sup>細胞は主に白脾髄（T細胞領域）に存在していた。一方、DST群ではOX62<sup>+</sup>細胞は主に赤脾髄（B細胞領域）に局在していた。このことから、移植前ドナー抗原（ドナー血輸血）により、樹状細胞はB細胞領域である赤脾臓に局在することが判明した(図4A,4B)。

#### 図4 Immunostaining with anti-rat dendritic cell (OX62) monoclonal antibody in the spleen.

Untreated rats (A) and recipient rats pretreated with DST (B), both on 7 days after transplantation . WP: white pulp. RP: red pulp. (X20).

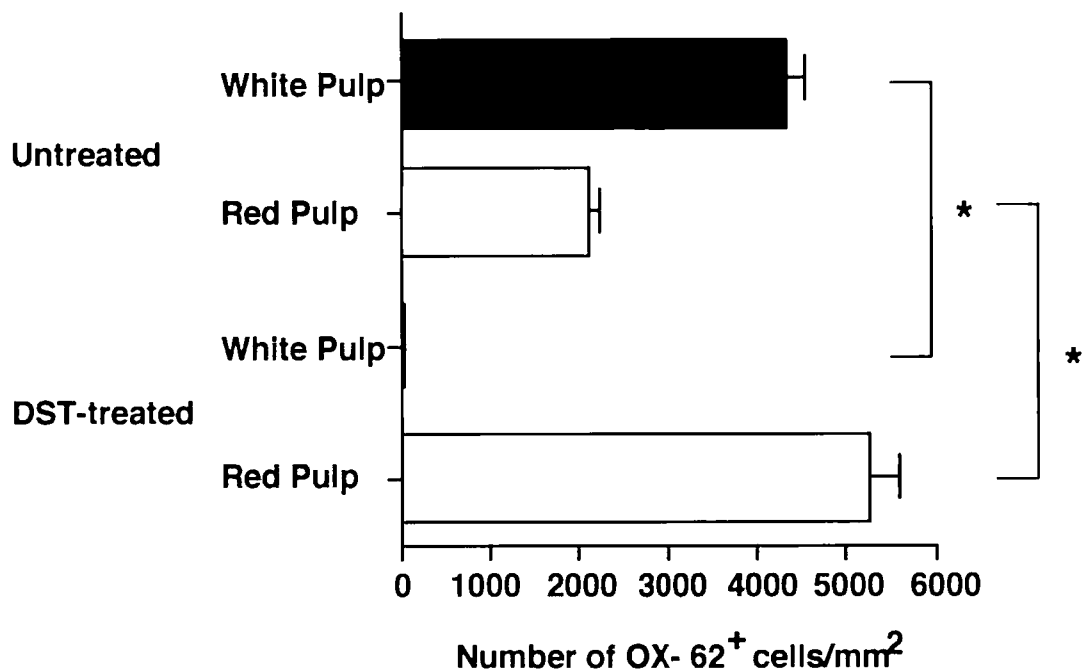


#### 4) 白脾髄及び赤脾髄における樹状細胞数の定量

免疫組織学的染色にて、無処置（急性拒絶）群とDST（免疫学液寛容状態）群では、樹状細胞の局在が明確となった。そこで、免疫染色を行った標本を用いて、白脾髄及び赤脾髄における樹状細胞数を算定した。移植後7日目、無処置群では、樹状細胞数は主に白脾髄に存在し、赤脾髄にはその約1/2の樹状細胞数が認められた。一方、DST群では、白脾髄の樹状細胞数は極めて少なく、赤脾髄に多数の樹状細胞が局在することが判明した（図4C）。

図4C Number of dendritic cells (OX62<sup>+</sup>cells) in the spleen .

Untreated rats and recipient rats pretreated with DST, both on 7days after transplantation  
Data represent the mean  $\pm$  SE. \*p< .01.

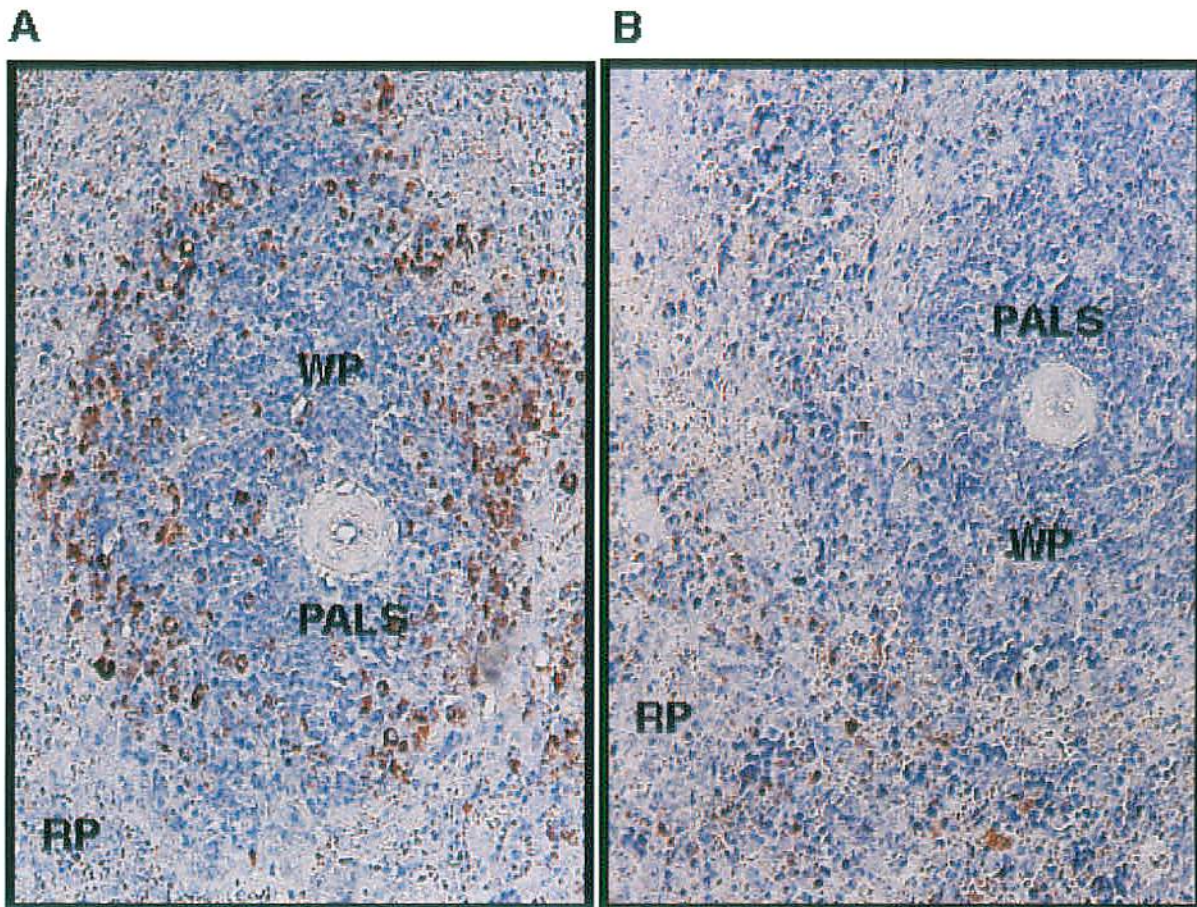


## 5) 移植後の脾臓におけるドナー由来の細胞の分布

ドナーACI ラットの抗 MHC class II RT1B<sup>a</sup>抗体 (OX76)を用いて、脾臓におけるドナー由来の細胞の局在について検討した。免疫組織染色では、無処置 (急性拒絶) 群では、OX76<sup>+</sup>細胞が主に白脾髄に局在していた (図5A)。一方、DST (免疫学的寛容状態) 群では、OX76<sup>+</sup>細胞が主に赤脾髄に局在していた (図5B)。これらの所見は、移植後の樹状細胞の脾臓内局在をほぼ一致するものであった。使用した抗ラット樹状細胞抗体 (OX62) 及び抗 MHC class II RT1B<sup>a</sup>抗体 (OX76)は、抗マウス抗体のために、免疫多重染色による鮮明な標本を作製することはできなかった。

図5 Immunostaining with anti-MHC class II RT1B<sup>a</sup> (OX76) monoclonal antibody.

Untreated animals (A) and pretreated with DST (B), both on 7 days after hepatic transplantation. WP: white pulp. RP: red pulp. PALS: periarterial lymphoid sheath. (X40).



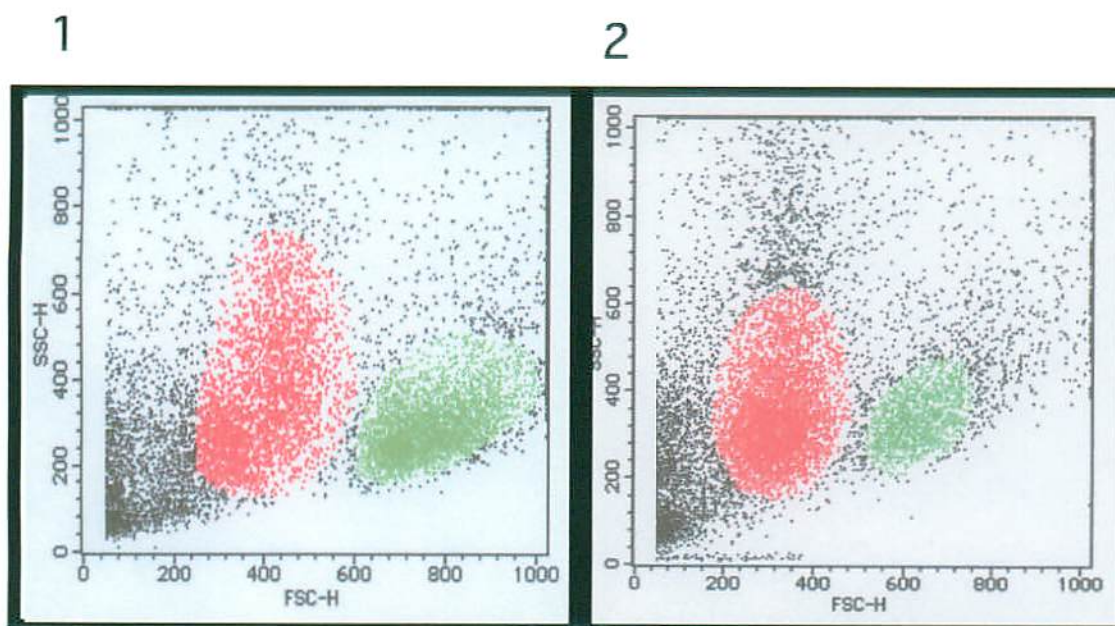
## 6) 移植後に脾臓から単離した樹状細胞の解析

移植後に脾臓から樹状細胞を単離し、Flow cytometryにより解析した。サイズが大小の2群の樹状細胞が認められた。無処置（急性拒絶）群では、DST（免疫学液寛容状態）群に比較して、サイズが大きい樹状細胞数が多数認められた(図6A-1、6A-2)。

図6A Flow cytometric analysis.

Sorted OX62<sup>+</sup> cells in spleens after hepatic transplantation.

untreated (1) and DST-treated animals (2).

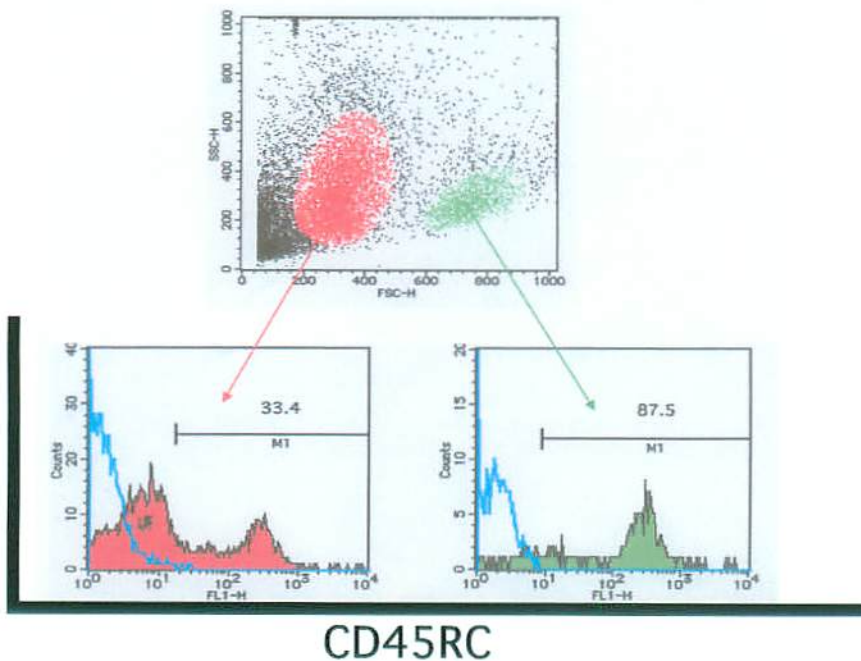


## 7) 移植後の脾臓における2つの樹状細胞群における白血球共通抗原 (CD45RC) の発現

肝移植後、脾臓から単離された樹状細胞のうち、小さなサイズのOX62<sup>+</sup>細胞は、主にCD45RC<sup>low</sup>細胞であった。大きいサイズのOX62<sup>+</sup>細胞は、主にCD45RC<sup>high</sup>細胞で構成されていた。肝移植後の脾臓内には、DST群及び無処置群ともにCD45RC<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞とCD45RC<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞の二つのフェノタイプが存在していた(図6B)。

### 図6B Flow cytometric analysis.

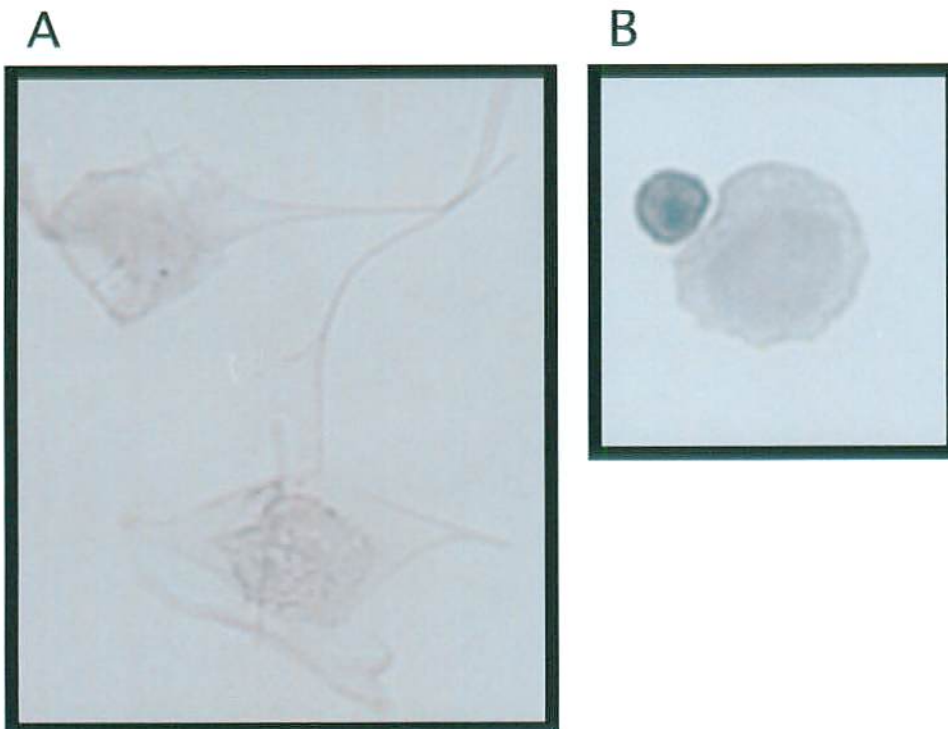
Two phenotypes, CD45RC<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup> and CD45RC<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup> cells, which migrated into the spleens of allograft recipients with or without DST (6-B).



8) CD45RC<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞とCD45RC<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞の二つのフェノタイプの形態学的特徴

脾臓より単離したCD45RC<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞はサイズが大きく、突出した樹状突起が認められ、成熟樹状細胞であった(図7A)。一方、CD45RC<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞は小さく類円形あり、未熟樹状細胞であった(図7B)。樹状細胞の成熟過程におけるCD45RCの発現が異なることが判明した。

図7 Histology of CD45RC<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup> (A) and CD45RC<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup> (B) cells.

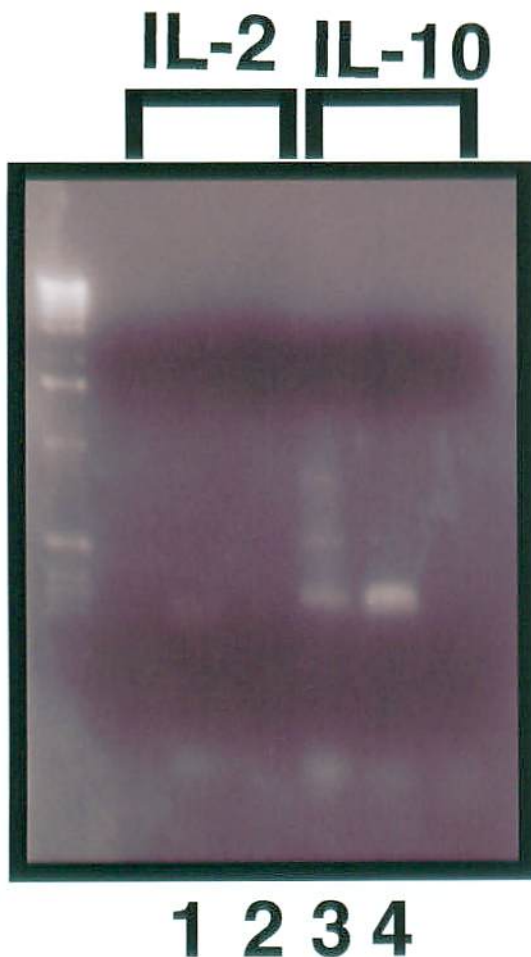


## 9) 樹状細胞の二つのフェノタイプにおけるサイトカイン・プロフィール

RT-PCRでは、CD45R<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞はIL-10 mRNAを発現していたが、IL-2は発現していなかった。一方、CD45R<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞ではIL-2 mRNAが強く発現し、IL-10の発現は低レベルであった(図8)。移植後、DST群及び無処置群の脾臓から単離されたCD45R<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞とCD45R<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞におけるサイトカイン・プロフィールは同様であった。CD45R<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞及びCD45R<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞には、それぞれTh1サイトカイン、Th2サイトカインのmRNAが発現しており、DC1細胞及びDC2細胞と類似するサイトカイン・プロフィールを有することが判明した。

図8 Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Lanes 1 and 3: CD45R<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup> cells      Lanes 2 and 4: CD45R<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup> cells





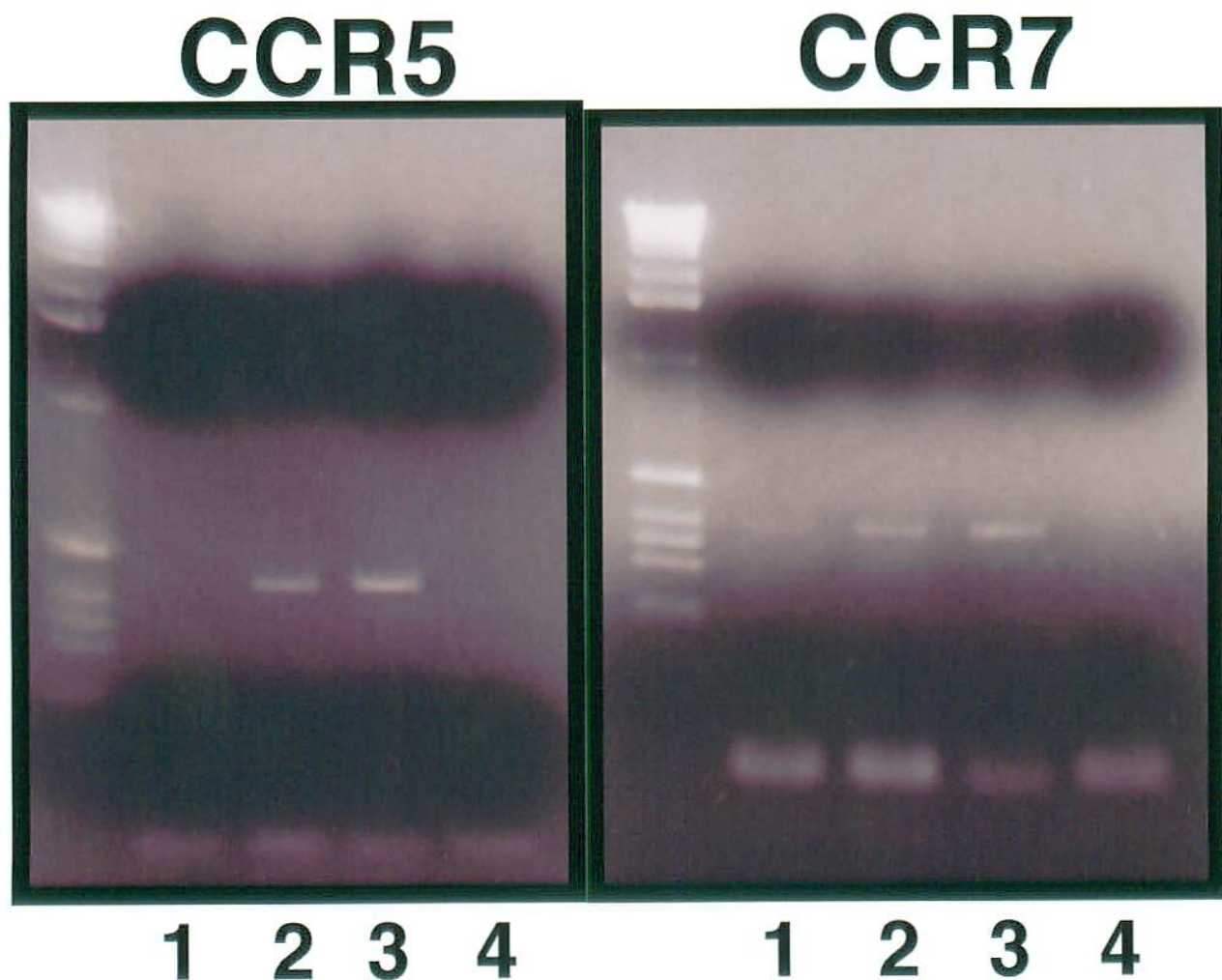
### 10) 樹状細胞の二つのフェノタイプにおけるケモカイン・レセプターCCR5 及びCCR7 mRNAの発現

樹状細胞の遊走と局在は、ケモカインによって制御されている。CCケモカインにより樹状細胞は遊走し、血管内皮を介して局所へ浸潤する。そこで、RT-PCR法を用いて、樹状細胞の二つのフェノタイプについて、CCR5 及びCCR7 mRNAの発現を検索した。

その結果、CD45R<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞におけるCCR5及びCCR7のmRNA発現は、CD45R<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞における発現に比較して、有意に高かった(図9)。このことから、樹状細胞の二つのフェノタイプの脾臓内への遊走と局在が異なる可能性が示唆された。

図9 Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Lane 1: CD45R<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup> cells    2: CD45R<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup> cells  
3: positive control                      4: negative control



## 1 1) 樹状細胞の二つのフェノタイプにおけるL-selectin (CD62L) の発現

樹状細胞の二つのフェノタイプについて、白血球のホーミング・レセプターであるL-セレクトインの発現を検索した。Flow cytometryを用いて、術後3、5、7日目に脾臓から単離した樹状細胞の二つのフェノタイプでは、L-セレクトイン (CD62L) の発現は、 $CD45RC^{low}OX62^{+}$ 細胞より $CD45RC^{high}OX62^{+}$ 細胞の方が有意に強かった。(図10、11)。従って、この二つの樹状細胞のフェノタイプでは、ホーミング・レセプターの発現が明らかに異なることが判明した。

図10 Flow cytometric analysis.

CD62L expression on sorted  $CD45RC^{high}OX62^{+}$  cells and  $CD45RC^{low}OX62^{+}$  cells.

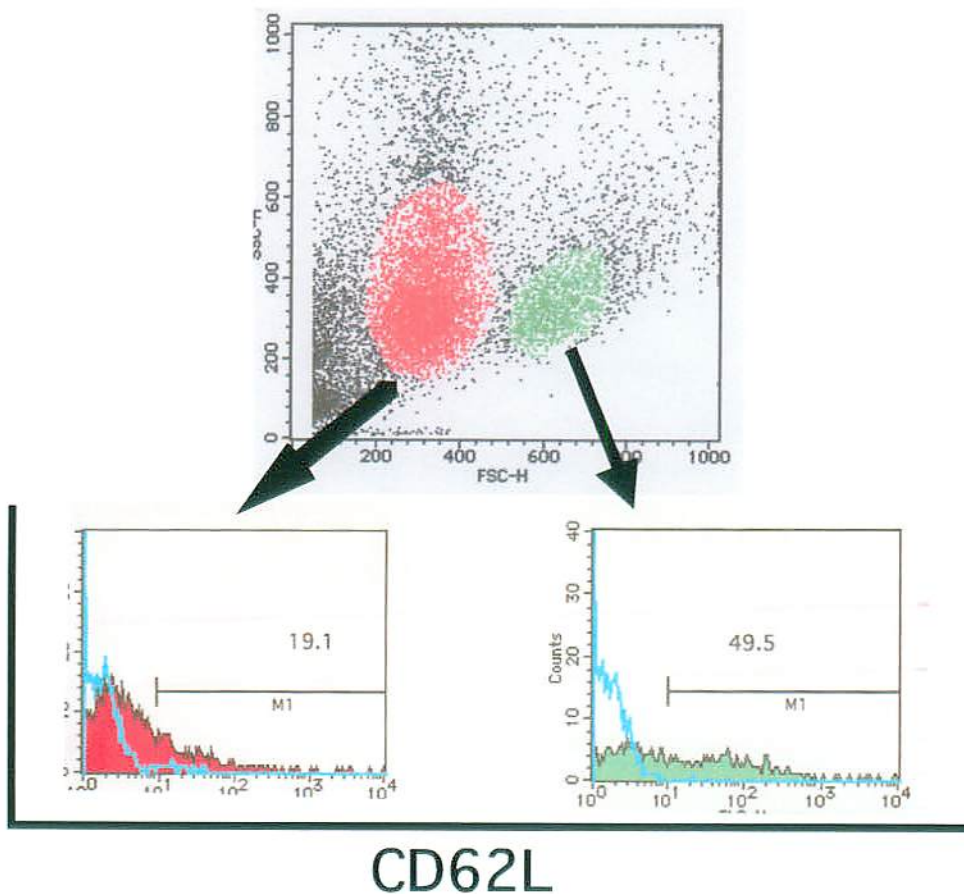
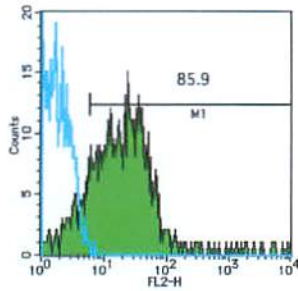


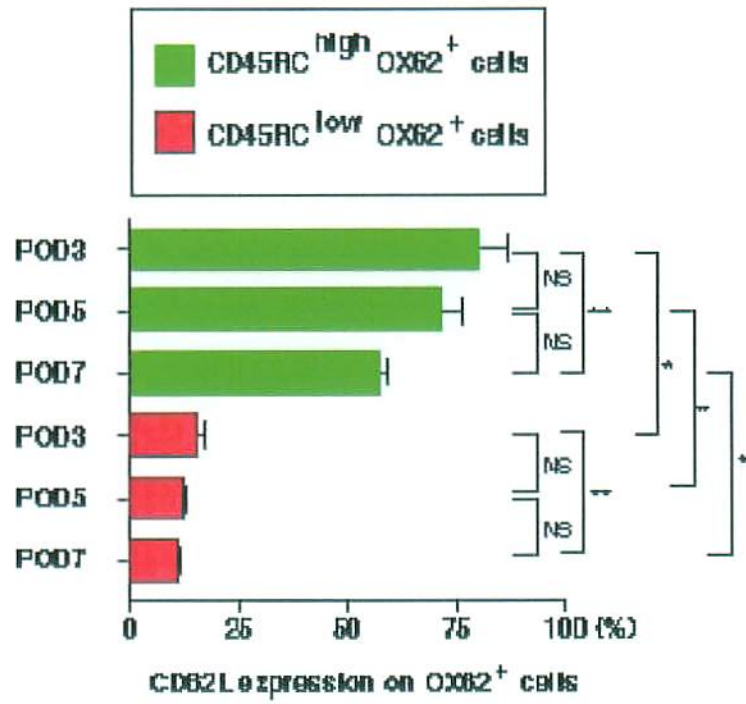
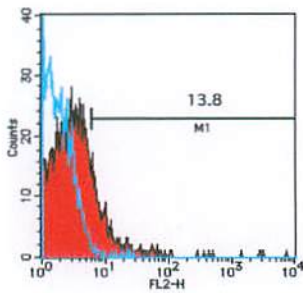
図 11 CD62L expression on sorted CD45RC<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup> cells and CD45RC<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup> cells.

Four animals were studied at each time point. Data represent the mean  $\pm$  SE. \* $p < .01$ . \*\* $p < .05$ .

CD45RC<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞



CD45RC<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞



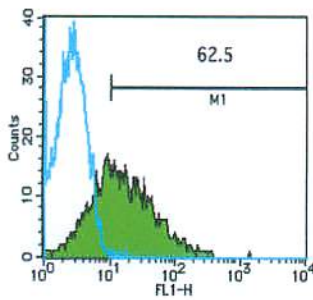
## 1 2) 樹状細胞の二つのフェノタイプにおけるケモカイン・レセプターCCR5 及びCCR7の発現

Flow cytometryを用いて、術後3、5、7日目に脾臓から単離した樹状細胞の二つのフェノタイプについて、ケモカイン・レセプターCCR5及びCCR7の発現を検索した。CD45RC<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞上のCCR5及びCCR7の発現は、CD45RC<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞より有意に強かった(図12、13)。この結果は、ケモカイン・レセプターCCR5及びCCR7 mRNAの発現(図9)とほぼ一致していた。

**図12** CCR5 expression on sorted CD45RC<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup> cells and CD45RC<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup> cells.

Four animals were studied at each time point. Data represent the mean  $\pm$  SE. \* $p < .01$ . \*\* $p < .05$ .

### CD45RC<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞



### CD45RC<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞

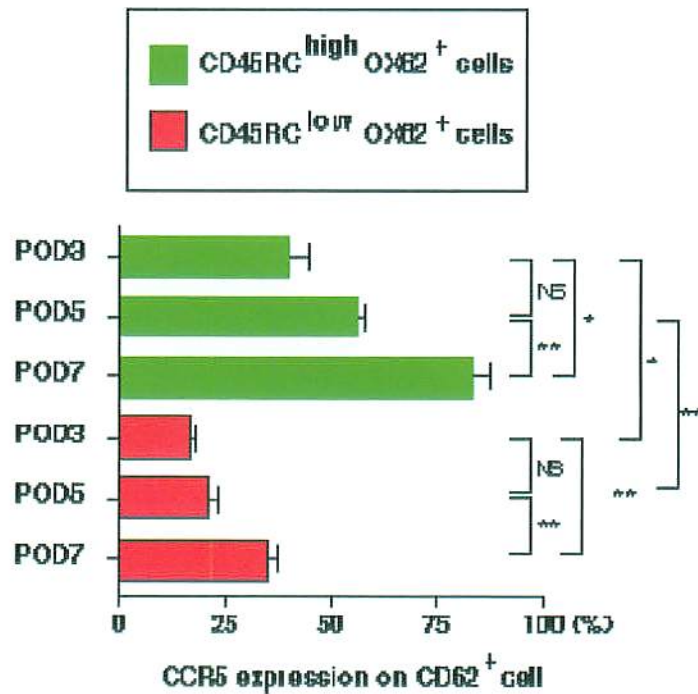
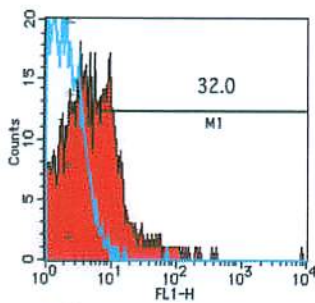
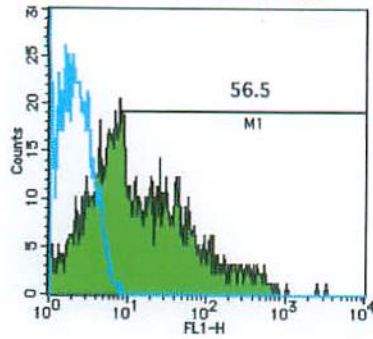


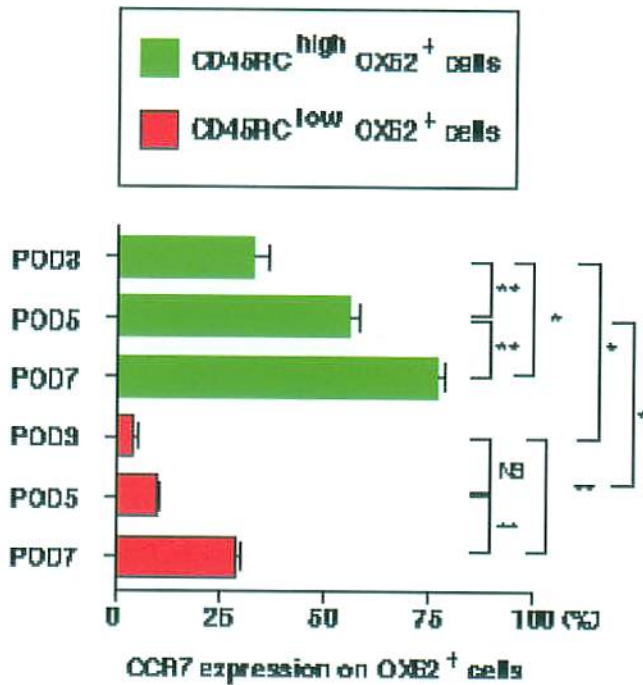
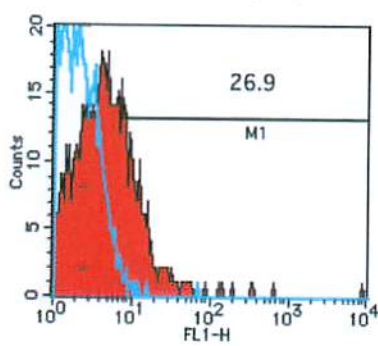
図13 CCR7 expression on sorted CD45RC<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup> cells and CD45RC<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup> cells.

Four animals were studied at each time point. Data represent the mean  $\pm$  SE. \*p< .01. \*\*p< .05.

CD45RC<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞



CD45RC<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞



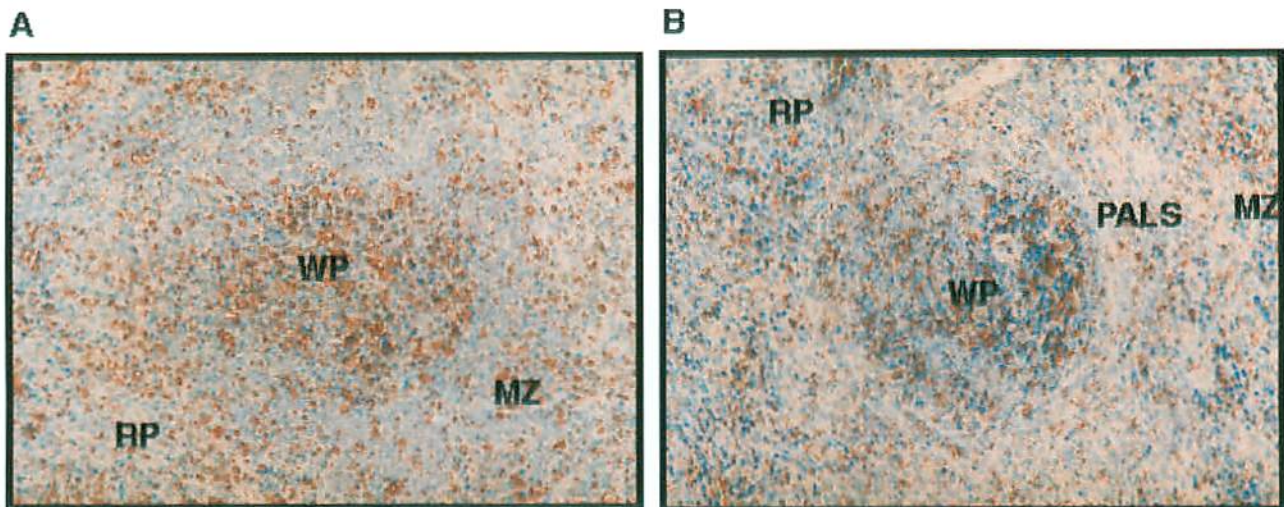
### 13) 移植後の脾臓におけるMIP-3 $\beta$ の発現

MIP-3 $\beta$ はCCR7のリガンドであり、成熟樹状細胞の遊走を強力に誘導すると言われており、そのMIP-3 $\beta$ の移植後の脾臓内発現について検索した。肝移植後、脾臓におけるMIP-3 $\beta$ の発現は主に白脾髄（T細胞領域）に認められた。しかし、MIP-3 $\beta$ の白脾髄における発現は、無処置群及びDST群間で有意な差は認められなかった（図14）。このことから、肝移植後の脾臓内における樹状細胞の白脾髄への遊走は、組織のリガンド発現よりも遊走細胞のケモカイン・レセプター発現に依存していることが示唆された。

図14 Splenic expression of MIP3- $\beta$ .(Immunostaining)

Untreated (A) and DST-treated (B) recipient rats after hepatic transplantation.

WP: white pulp, PALS: periaarterial lymphoid sheath, MZ: marginal zone, RP: red pulp



#### 14) 肝移植後の脾臓におけるMAdCAM-1の発現

MAdCAM-1は白血球のホーミング・レセプターであるL-セレクチンや $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する血管内皮細胞のリガンドである。免疫染色にて移植後の脾臓におけるMAdCAM-1の発現を検索した。肝移植後、白脾髄及び辺縁洞におけるMAdCAM-1の発現は、DST群に比較して無処置群では有意に強かった(図15-C)。一方、DST群では赤脾髄にMAdCAM-1の発現が強かった(図15-B)。しかし、DST群におけるMAdCAM-1の発現は移植後24日目には消退した(図15-D)。このことから、MAdCAM-1とL-セレクチンも、急性拒絶時の樹状細胞の白脾髄への局在、免疫寛容状態での赤脾髄への局在に関与していることが示唆された。

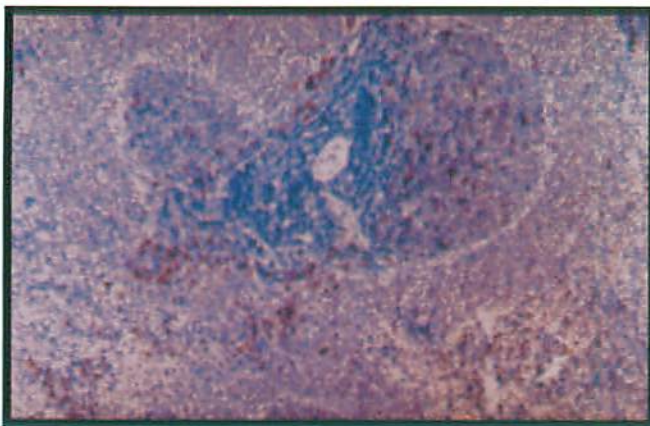
図15 Splenic expression of MAdCAM-1.(Immunostaining)

A; naive control

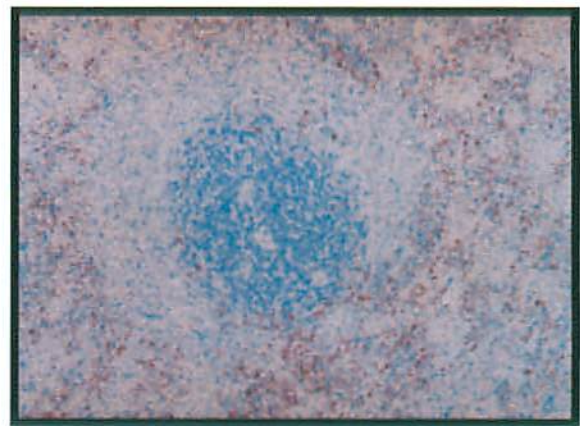
B; DST-treated animals 7 days after transplantation

C; Untreated animals 7 days after transplantation D; DST-treated animals 24 days after transplantation

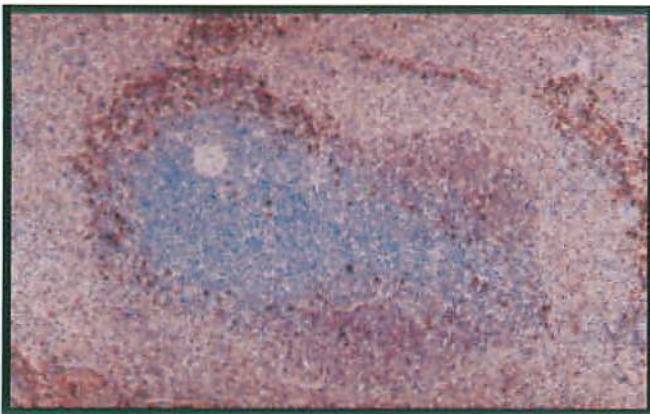
**A**



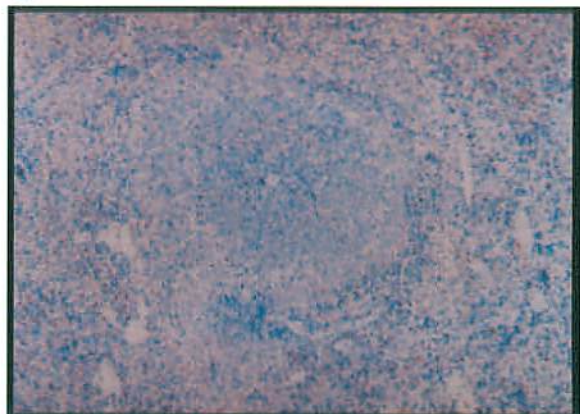
**B**



**C**



**D**



15) 樹状細胞の2つのフェノタイプにおけるサイトカイン、ケモカイン、及び接着分子のリガンドの発現

移植後、脾臓から成熟度の異なる2つの樹状細胞フェノタイプが単離された。それぞれの樹状細胞ではサイトカイン・プロフィールやホーミング・レセプターの発現が異なり、白脾臓及び赤脾臓への特異的な遊走・局在に起因する。このようなそれぞれの樹状細胞の免疫組織への局在は、細胞性免疫或いは液性免疫を惹起するものと思われる。このような現象が、移植前ドナー抗原投与における免疫学的寛容状態の誘導に深く関わっていることが示唆される。樹状細胞の2つのフェノタイプにおけるサイトカイン、ケモカイン、及び接着分子のリガンドの発現を表1に示す。

## 表 1

Table 1. Expression profiling of cytokines, chemokines, and adhesion ligands of Dendritic cells.

Dendritic cells	Size	Shape	Dendrites	CD45RC	Chemokines		Cytokine production	Adhesion ligands (CD62L)
					<u>CCR5</u>	<u>CCR7</u>		
Immature	small	round	scanty	low	low	low	IL-10	low
mature	large	prominent	prominent	high	high	high	IL-2	high



## 考察

本研究では、ラット肝移植モデルを用いた急性拒絶時には、ドナー肝の樹状細胞が白脾髄（T細胞領域）へと遊走・局在することが判明した。一方、移植7日前にヘパリン加新鮮ドナー血の輸血を行い免疫学的不応答状態を誘導すると、ドナー肝の樹状細胞は赤脾髄へと遊走・局在した。この相違を明らかにする目的で、白血球共通抗原（CD45RC）、ケモカイン・レセプター（CCR5、CCR7）、接着分子（L-セレクチン）などの発現を検索し、樹状細胞のフェノタイプの存在について検討した。

白血球共通抗原の一つであるCD45は、細胞内プロテイン・チロシン・キナーゼを活性化因子として作用し、T細胞の抗原レセプター（TCR）を介する情報伝達(28)に重要な役割を演じており、srcファミリーのp56lck、p59fynやSykファミリーのZAP-70を含む細胞内蛋白チロシンキナーゼの陽性制御に関わっている(29)(30)。CD45が欠損したヒトやマウスのT細胞はTCRを介する情報伝達ができない(31)。CD45アイソフォームはサイトカイン分泌を活性化するcostimulatory signalを引き起こす(32)。ラットのCD4<sup>+</sup>T細胞は、細胞表面上の高分子量のCD45R<sup>high</sup>の発現及び低分子量のCD45R<sup>low</sup>の発現によって、それぞれnaive T細胞とmemory T細胞のフェノタイプに分けられることが報告されている(33)(34)。

CD45は免疫反応を調節しており、抗CD45RB抗体の投与により免疫反応は抑制される(35)(36)(37)。CD45アイソフォームを標的とした抗体療法は、寛容状態を誘導する。マウスの樹状細胞におけるCD45の発現や酵素活性が異なる細胞群の局在が報告されている(39)。本研究では、樹状細胞はCD45R<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞とCD45R<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞の2つのフェノタイプを有することが判明した。移植後の脾臓内におけるCD45R<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞数に対するCD45R<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞数比は、無処置群に比較してDST群では有意に高かった。CD45はT細胞の成熟や分化に関与していることが報告されている。本研究では、形態学的に、CD45R<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞は樹状突起を有する大きな細胞であるが、CD45R<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞は樹状突起なく小さな類円形の細胞であり、これらの樹状細胞はそれぞれ成熟及び未成熟な細胞であると推察された。

ラット肝移植モデルでは、移植7日前にヘパリン加ドナー新鮮血を輸血すると、免疫学的寛容状態が誘導され、この時ドナー肝由来の樹状細胞は赤脾髄へ特異的に遊走・局在することが判明した。マイトマイシンCで処理したドナー脾細胞やドナーのクラスI主要組織適合性抗原を移植7日前に投与すると、同様に免疫学的寛容状態が誘導される。寛容状態の誘導における種々の機序が提唱されている。レセプターからのシグナルは、樹状細胞における成熟を調節したり、寛容状態の誘導を引き起こす。これらの樹状細胞はT細胞に対する免疫反応の結果、エフェクターT細胞の減少を惹起する。樹状細胞に発現する抗原レセプターは寛容状態の誘導・維持に重要な役割を演じていると考えられる。樹状細胞の赤脾髄（B細胞領域）への遊走パターンは、寛容状態の誘導のメカニズムの一つであるかもしれない。

樹状細胞のフェノタイプによる脾臓局所への異なった遊走パターンは、2次リンパ組織のホーミング・ケモカイン・レセプターのリガンドと密接な関連があると思われる(43)。成熟した樹状細胞はCCR7の発現が増強している(44)。CCR7に反応するリガンドであるELC/MIP3-βはリンパ組織の白脾髄（T細胞領域）に常に発現している(8)。免疫組織染色により、CCR7のリガンドであるMIP-3βは赤脾髄よりも白脾髄に発現していることを確かめた。CCR7のリガンドは脾臓内における免疫反応を引き起こす機能的な微小環境を形成する一つの重要な分子である。CCR7リガンドを発現するプラスミドDNAは二次リンパ組織における樹状細胞数を増加させる(45)(46)。この事実は、MIP-3βは白脾髄（T細胞領域）での樹状細胞とT細胞のクラスター形成の中心的役割を演じていることが示唆される。本研究では、移植後の脾臓から単離された2種類の樹状細胞はCCR5<sup>high</sup>CCR7<sup>high</sup>CD45R<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞とCCR5<sup>low</sup>CCR7<sup>low</sup>CD45R<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞であった。従って、CCR7が樹状細胞の遊走・局在を調節する一つの重要なシグナル・ケモカイン・レセプターであることが示唆された。

メモリーT細胞の分化は、CD45RAとCCR7の発現に関連している(48)。樹状細胞の成熟過程で、CCR5やCCR7などのケモカイン・レセプターの異なった発現パターンを伴っている。DSTにおける免疫学的寛容状態の誘導には、IL-10やtransforming growth factor

(TGF)- $\beta$  1が重要な役割を演じていると考えられている(49)(50)。IL-10は樹状細胞の成熟を抑制し、抗原提示細胞としての樹状細胞の機能を調節することが報告されてきた。IL-10はCCR7の発現を抑制し、CCR1、CCR2及びCCR5の発現を促進する(51)(52)。これらの、CCR7、CCR5の発現の程度により、それぞれのリガンドであるMIP3- $\beta$ とMIP1- $\alpha$ への遊走能を抑制あるいは増強する。IL-10はDCの成熟過程を制御するだけでなく、ケモカイン・レセプターの発現を調節することにより、樹状細胞の遊走能を抑制している(49)。TGF- $\beta$  1も同様に樹状細胞の成熟を抑制することが報告されている(54)。我々は、肝移植後の血漿中TGF- $\beta$  1濃度が、DST群では、無処置群に比較して有意に高いことを報告した(55)。TGF- $\beta$  1は、樹状細胞のCCR7発現を抑制し、MIP3- $\beta$ への結合を制御する。ケモカインとケモカイン・レセプターの発現は樹状細胞の遊走能を調節し、TGF- $\beta$  1は、樹状細胞の成熟過程を抑制する(56)。移植肝内で産生された抗炎症性サイトカインにより樹状細胞のフェノタイプであるCCR5<sup>low</sup>CCR7<sup>low</sup>CD45R<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞が誘導されることが、免疫学的不応答状態の誘導に深く関与していることが示唆された。

リンパ球の high endothelial venules (HEV) を経由したリンパ節内への遊走は、リンパ球のCD62Lの発現に依存している。HEVはCD34、GlyCAM-1、MAdCAM-1などのL-セレクチンのリガンドを発現している(57)(58)。L-セレクチンを高発現したDCは、HEVを経由してリンパ組織内に侵入する(59)。リンパ球が脾臓内に侵入する際はHEVを介さない。辺縁帯のマクロファージはHEVと同様の機能を有し、白脾髄へのリンパ球の侵入を調節している(60)。リンパ球は、MAdCAM-1を発現した細胞を通り抜け、白脾髄に侵入する。さらに、reticular meshwork (RM) が辺縁帯と白脾髄の間に存在し、RMはリンパ球の白脾髄への遊走を調節している。MAdCAM-1は濾胞周囲のRMを構成している線維形成網状細胞にのみ発現している(15)(17)(61)。リンパ球の白脾髄へのホーミングは、RMの欠損や、MAdCAM-1の低発現より著明に抑制される(62)。これらの要因が樹状細胞の指向的遊走能を調節していると思われる(15)。本研究では、DST群における白脾髄のMAdCAM-1の発現が、無処置群に較べて低発現であることが判明した。また、DST群では移植後24日目には、MAdCAM-1の赤脾髄における発現は消退していた。CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞の遊走はL-セレクチン (CD62L) の発現に依存している(63)。同様に、ドナー由来の2種類の樹状細胞フェノタイプの脾臓内への遊走・局在にも、CD62Lの発現が深く関連していると思われ

る。

## 結語

今回の研究では、1) ラット肝移植後のレシピエント脾臓内にはCD45R<sup>high</sup>OX62<sup>+</sup>細胞とCD45R<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞の二種類の樹状細胞フェノタイプが存在すること。2) DSTにより免疫学的不応答が誘導された状態では、CCR7及びCD62Lを低発現のCD45R<sup>low</sup>OX62<sup>+</sup>細胞が主に赤脾髄（B細胞領域）に遊走・局在していることが明らかになった。

## 参考文献

1. Austyn J.M., Kupiec-Weglinski J.W., Hankins D.F., and Morris P.J.. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Homing to T cell-dependent areas of spleen, and binding within marginal zone. *J. Exp. Med.* 167: 646, 1988.
2. Larsen C.P., Morris P.J., and Austyn J.M.. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J. Exp. Med.* 171: 307, 1990.
3. Larsen C.P., Austyn J.M., and Morris P.J.. The role of graft-derived dendritic leukocytes in the rejection of vascularized organ allografts. Recent findings on the migration and function of dendritic leukocytes after transplantation. *Ann. Surg.* 212: 308, 1990.
4. Streuli M., Hall LR., Saga Y., Schlossman S.F., and Saito H.. Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human common antigens. *J. Exp. Med.* 166:1548, 1987.
5. McCall M.N., Shotton D.M., Band arclay A.N.. Expression of soluble isoforms of rat CD45. Analysis by electron microscopy and use in epitope mapping of anti-CD45R monoclonal antibodies. *Immunology* 76:310. 1992.
6. Miyanari N., Yamaguchi Y., Matsuno K., Tominaga A., Goto M., Ichiguchi O., Mori K., ad Ogawa M.. Persistent infiltration of CD45RC- CD4+ T cells, Th2-like effector cells, in prolonging hepatic allografts in rats pretreated with a donor-specific blood transfusion. *Hepatology* 25:1008, 1997.
7. Sozzani S., Allavena P., D'Amico G., Luini W., Bianchi G., Kataura M., Imai T., Yoshie O., Bonecchi R.,and Mantovani A.. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.* 161:1083, 1998.
8. Ngo V.N., Tang H.L., and Cyster J.G.. Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J. Exp. Med.* 188:181, 1998.
9. Yanagihara S., Komura E., Nagafune J., Watarai H., and Yamaguchi Y..EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J. Immunol.* 161:3096, 1998.
10. Sallusto F., Schaerli P., Loetscher P., Schaniel C., Lenig D., Mackay .CR., Qin S., and Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 28:2760, 1998.
11. Starzl T.E., Demetris A.J., Murase N., Thomson A.W., Trucco M., and Ricordi C.. Donor cell

- chimerism permitted by immunosuppressive drugs: a new view of organ transplantation. *Immunol. Today* 14:326, 1993.
12. Chen-Woan M., Delaney C.P., Fournier V., Wakizaka Y., Murase N., Fung J., Starzl T.E., and Demetris A.J.. A new protocol for the propagation of dendritic cells from rat bone marrow using recombinant GM-CSF, and their quantification using the mAb OX-62. *J. Immunol. Methods* 178:157, 1995.
  13. Wang C.C., Biben C., Robb L., Nassir F., Barnett L., Davidson N.O., Koentgen F., Tarlinton D., and Harvey R.P.. Homeodomain factor Nkx2-3 controls regional expression of leukocyte homing coreceptor MAdCAM-1 in specialized endothelial cells of the viscera. *Dev. Biol.* 224:152, 2000.
  14. Palecanda A., Marshall J.S., Li X., Briskin M.J., and Issekutz T.B.. Selective antibody blockade of lymphocyte migration to mucosal sites and mast cell adhesion. *J. Leukoc. Biol.* 65:649, 1999.
  15. Crowley M.T., Reilly C.R., and Lo D.. Influence of lymphocytes on the presence and organization of dendritic cell subsets in the spleen. *J. Immunol.* 163:4894, 1999
  16. Du M.Q., Peng H.Z., Dogan A., Diss T.C., Liu H., Pan L.X., Moseley R.P., Briskin M.J., Chan J.K., and Isaacson P.G.. Preferential dissemination of B-cell gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma to the splenic marginal zone. *Blood* 90:4071, 1997.
  17. Kraal G., Schornagel K., Streeter P.R., Holzmann B., and Butcher E.C.. Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, on sinus-lining cells in the spleen. *Am. J. Pathol.* 147:763, 1995.
  18. Yamaguchi Y., Harland R.C., Wyble C., Mori K., and Bollinger R.R.. Variable allograft responses to pretreatment with donor splenocytes treated with Mitomycin C in the rat. *Transplantation* 47:360, 1989.
  19. Yamaguchi Y., Kikuchi N., Miyanari N., Ichiguchi O., Goto M., Mori K., and Ogawa M.. A technique for orthotopic reduced-size hepatic transplantation combined with *ex vivo* liver cut down in the rat. *Dig. Dis. Sci.* 41:1713, 1996.
  20. National Institutes of Health. Guide for the care and use of laboratory animals. Public Health Service. NIH Publication No. 86-23, Bethesda, Maryland, 1985.
  21. Brenan M., and Puklavec M.. The MRC OX-62 antigen: a useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin. *J. Exp. Med.* 175:1457, 1992.
  22. Brenan M., and Rees D.J.. Sequence analysis of rat integrin  $\alpha$  E1 and  $\alpha$  E2 subunits: tissue expression reveals phenotypic similarities between intraepithelial lymphocytes and dendritic cells in

lymph. *Eur. J. Immunol.* 27:3070, 1997.

23. Spickett G.P., Brandon M.R, Mason D.W., Williams A.F., and Woollett G.R.. MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leukocyte-common antigen. *J. Exp. Med.* 158:795, 1983.
24. Rossi D.L., Vicari A.P., Franz-Bacon K., McClanahan T.K., and Zlotnik A.. Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3alpha and MIP-3beta. *J. Immunol.* 158:1033, 1997.
25. Goto M., Yamaguchi Y., Ichiguchi O., Miyanari N., Akizuki E., Matsumura F., Matsuda T., Mori K., and Ogawa M.. Phenotype and localization of macrophages expressing inducible nitric oxide synthase in rat hepatic allograft rejection. *Transplantation* 64:303, 1997.
26. Ruiz R., Fuller J., and Sanfilippo F.. Donor-specific cellular immunity in rejecting and long-term-surviving class I-disparate rat renal allograft recipients. *Transplantation* 49:175, 1990.
27. Frohman M.A., Dush M.K., and Martin G.R.. Rapid amplification of full-length cDNA from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8998, 1988.
28. Leitenberg D., Boutin Y., Lu D.D., and Bottomly K.. Biochemical association of CD45 with the T cell receptor complex: regulation by CD45 isoform and during T cell activation. *Immunity* 10:701, 1999.
29. Altin J.G., and Sloan E.K.. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol. Cell Biol.* 75:430, 1997.
30. Pingel S., Baker M., Turner M., Holmes N., and Alexander D.R.. The CD45 tyrosine phosphatase regulates CD3-induced signal transduction and T cell development in recombinase-deficient mice: restoration of pre-TCR function by active p56(lck). *Eur. J. Immunol.* 29:2376, 1999.
31. Chu D.H., Spits H., Peyron J.F., Rowley R.B., Bolen J.B., and Weiss A. The Syk protein tyrosine kinase can function independently of CD45 or Lck in T cell antigen receptor signaling. *E.M.B.O. J.* 1996;15:6251, 1996.
32. Shanafelt M.C., Soderberg C., Allsup A., Adelman D., Peltz G., and Lahesmaa R.. Costimulatory signals can selectively modulate cytokine production by subsets of CD4+ T cells. *J Immunol* 154:1684, 1995.
33. Bunce C., and Bell E.B.. CD45RC isoforms define two types of CD4 memory T cells, one of which depends on persisting antigen. *J. Exp. Med.* 185:767, 1997.
34. Yang C.P., and Bell E.B.. Persisting alloantigen prevents primed CD45RC- CD4 T cells from inducing allograft rejection: implications for immunological memory. *Eur. J. Immunol.* 29:2177, 1999.



35. Lazarovits A.I., Poppema S., Zhang Z., Khandaker M., Le Feuvre .CE., Singhal S.K., Garcia B.M., Ogasa N., Jevnikar A.M., White M.H., Singh G., Stiller .CR., and Zhong R.Z.. Prevention and reversal of renal allograft rejection by antibody against CD45RB. *Nature* 380:717, 1996.
36. Gao Z., Zhong R., Jiang J., Garcia B., Xing J.J., White M.J., and Lazarovits A.I.. Adoptively transferable tolerance induced by CD45RB monoclonal antibody. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10:374, 1999.
37. Lazarovits A.I., Visser L., Asfar S., LeFeuvre-Haddad C.E., Zhong T., Kelvin D.J., Kong C., Khandaker M.H., Singh B., White M., Jevnikar A.M., Zhang Z., and Poppema S.. Mechanisms of induction of renal allograft tolerance in CD45RB-treated mice. *Kidney Int.* 55:1303, 1999.
38. Basadonna G.P., Auersvald L., Khuong C.Q., Zheng X.X., Kashio N., Zekzer D., Minozzo M., Qian H., Visser L., Diepstra A., Lazarovits A.I., Poppema S., Strom T.B., and Rothstein D.M.. Antibody-mediated targeting of CD45 isoforms: a novel immunotherapeutic strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3821, 1998.
39. Haidl I.D., Ng D.H., Rothenberger S., Johnson P., and Jefferies W.A.. Detection of restricted isoform expression and tyrosine phosphatase activity of CD45 in murine dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 25:3370, 1995.
40. Tchilian E.Z., Wallace D.L., Imami N., Liao H.X., Burton C., Gotch F., Martinson J., Haynes B.F., and Beverley P.C.. The exon A (C77G) mutation is a common cause of abnormal CD45 splicing in humans. *J. Immunol.* 166:6144, 2001.
41. Kastrup J., Lauritsen J.P., Menne C., Dietrich J., and Geisler C.. The phosphatase domains of CD45 are required for ligand induced T-cell receptor downregulation. *Scand. J. Immunol.* 51:491, 2000.
42. Mahnke K., Knop J., and Enk A.H.. Induction of tolerogenic DCs: 'you are what you eat'. *Trends Immunol.* 24:646, 2003.
43. Penna G., Sozzani S., and Adorini L.. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 167:1862, 2001.
44. Parlato S., Santini S.M., Lapenta C., Di Pucchio T., Logozzi M., Spada M., Giammarioli A.M., Malorni W., Fais S., and Belardelli F.. Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. *Blood* 98:3022, 2001.
45. Eo S.K., Kumaraguru U., and Rouse B.T.. Plasmid DNA encoding CCR7 ligands compensate for dysfunctional CD8+ T cell responses by effects on dendritic cells. *J. Immunol.* 167:3592, 2001.
46. Eo S.K., Lee S., Kumaraguru U., and Rouse B.T.. Immunopotential of DNA vaccine against herpes simplex virus via co-delivery of plasmid DNA expressing CCR7 ligands. *Vaccine*

2001;19:4685, 2001.

47. Randolph G.J.. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin. Immunol.* 2001;13:267, 2001.

48. Champagne P., Ogg G.S., King A.S., Knabenhans C., Ellefsen K., Nobile M., Appay V., Rizzardi G.P., Fleury S., Lipp M., Forster R., Rowland-Jones S., Sekaly R.P., McMichael A.J., and Pantaleo G.. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 410:106, 2001.

49. Chung S.W., Yoshida E.M., Cattral M.S., Hu Y., and Gorczynski R.M.. Donor-specific stimulation of peripheral blood mononuclear cells from recipients of orthotopic liver transplants is associated, in the absence of rejection, with type-2 cytokine production. *Immunol. Lett.* 63:91, 1998.

50. Josien R., Douillard P., Guillot C., Muschen M., Anegon I., Chetritt J., Menoret S., Vignes C., Souillou J.P., and Cuturi M.C.. A critical role for transforming growth factor- $\beta$  in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J. Clin. Invest.* 102:1920, 1998.

51. Takayama T., Morelli A.E., Onai N., Hirao M., Matsushima K., Tahara H., and Thomson A.W.. Mammalian and viral IL-10 enhance C-C chemokine receptor 5 but down-regulate C-C chemokine receptor 7 expression by myeloid dendritic cells: impact on chemotactic responses and in vivo homing ability. *J. Immunol.* 166:7136, 2001.

52. D'Amico G., Frascaroli G., Bianchi G., Transidico P., Doni A., Vecchi A., Sozzani S., Allavena P., and Mantovani A.. Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nat. Immunol.* 1:387, 2001.

53. Barratt-Boyes S.M., Zimmer M.I., Harshyne L.A., Meyer E.M., Watkins S.C., Capuano S. 3rd, Murphey-Corb M., Falo L.D. Jr., and Donnenberg A.D.. Maturation and trafficking of monocyte-derived dendritic cells in monkeys: implications for dendritic cell-based vaccines. *J. Immunol.* 164:2487, 2000.

54. Yamaguchi Y., Tsumura H., Miwa M., and Inaba K.. Contrasting effects of TGF- $\beta$  1 and TNF- $\alpha$  on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells* 1997;15:144, 1997.

55. Yamaguchi Y., Okabe K., Matsumura F., Akizuki E., Matsuda T., Ohshiro H., Liang J., Ishihara K., Mori K., and Ogawa M.. Expression of the c-kit proto-oncogene in rat hepatic allografts during acute rejection. *Hepatology* 29:133, 1999.

56. Ogata M., Zhang Y., Wang Y., Itakura M., Zhang Y.Y., Harada A., Hashimoto S., and Matsushima K.. Chemotactic response toward chemokines and its regulation by transforming growth

factor-beta1 of murine bone marrow hematopoietic progenitor cell-derived different subset of dendritic cells. *Blood* 93:32251999.

57. Hiraoka N., Petryniak B., Nakayama J., Tsuboi S., Suzuki M., Yeh J.C., Izawa D., Tanaka T., Miyasaka M., Lowe J.B., and Fukuda M.. A novel, high endothelial venule-specific sulfotransferase expresses 6-sulfo sialyl Lewis(x), an L-selectin ligand displayed by CD34. *Immunity* 1999;11:79, 1999.

58. Derry C.J., Faveeuw C., Mordsley K.R., and Ager A.. Novel chondroitin sulfate- modified ligands for L-selectin on lymph node high endothelial venules. *Eur. J. Immunol.* 29:419, 1999.

59. Jahnsen F.L., Lund-Johansen F., Dunne J.F., Farkas L., Haye R., and Brandtzaeg P.. Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123high) dendritic cells in human nasal allergy. *J. Immunol.* 165:4062, 2000.

60. Lyons A.B., and Parish C.R.. Are murine marginal-zone macrophages the splenic white pulp analog of high endothelial venules? *Eur. J. Immunol.* 25:31651995.

61. Du M.Q., Peng H.Z., Dogan A., Diss T.C., Liu H., Pan L.X., Moseley R.P., Briskin M.J., Chan J.K., and Isaacson P.G.. Preferential dissemination of B-cell gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma to the splenic marginal zone. *Blood* 90:4071, 1997

62. Tanaka H., Hataba Y., Saito S., Fukushima O., and Miyasaka M.. Phenotypic characteristics and significance of reticular meshwork surrounding splenic white pulp of mice. *J. Electron Microsc.* 45:407, 1996.

63. Oehen S., and Brduscha-Riem K.. Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division. *J. Immunol.* 161:5338, 1998.