

랑게르한스세포에서 IL-1 β mRNA 발현에 대한 Pedunculagin의 효과

주성수 · 권희승 · 강희철 · 이도익#
중앙대학교 약학대학

Effect of Pedunculagin on IL-1 β mRNA Expression in Langerhans cells

Seong Soo Joo, Hee Seung Kwon, Hee Chul Kang and Do Ik Lee#
College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract — Contact hypersensitivity (CHS) serves as a good model of cell-mediated reaction. Epidermal langerhans cell (LC) are thought to play a crucial role in the regulation of immune reaction of the skin, which elicit the CHS response by presenting Antigen to trafficking Ag-specific T cells within the skin. However, contact hypersensitivity is regarded as a negative side of immunities, caused by increased damaging immune response. Therefore, the study of effector molecule causing immune suppression is thought to be meaningful in the skin immune response. For this aim, this study investigated the influence of pedunculagin on cytokine, IL-1 β expression from langerhans cell (LC). *In vitro* and *in vivo*, pedunculagin up-regulated the expression of IL-1 β mRNA. After PMA stimulation *in vitro* and DNFB sensitization *in vivo*, the expression of IL-1 β mRNA was down-regulated. This results suggested that pedunculagin could be immuno-modulator in skin immune system by modulating IL-1 β expression.

Keywords □ Pedunculagin, contact hypersensitivity, langerhans cell

많은 연구로부터 피부가 단순한 보호막에서 방어, 면역기관의 하나로 점차 그 중요성이 커지고 있다. 피부는 외부, 내부의 침입으로부터 염증, 면역 반응을 통해 자신을 보호하는 기능을 가지고 있다.¹⁻³⁾ 더군다나 자가면역질환(autoimmune disease) 이나 과민반응(hypersensitivity) 같은 피부질환이 면역반응과 관련이 있다고 보고되어 지고 있다.

Contact hypersensitivity(CHS)는 세포 매개성 반응의 좋은 모델로 제공되어진다. 이러한 반응에는 여러 종류의 cell들이 관여하는데 특히, langerhans cell(LC)은 표피내의 극히 적은 cell수에도 불구하고 강력한 항원표시세포 (antigen presenting cell; APC)로서 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{4,5)} 즉, LC가 항원(Ag)을 제공함으로써 Ag-specific T cells을 자극하여 CHS 반응을 일으키는 것으로 이해되고 있다.^{6,7)}

이전의 Matsue H, *et al.*, Daniel N. Sauder, *et al.* 을 포함한 여러 과학자들의 논문에 의하면 LC는 IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α ,

MIP-1 α 등의 cytokine을 분비하는 것으로 알려지고 있으며,⁸⁻¹⁰⁾ 특히, IL-1 β 은 피부 면역 반응 시 최초 면역 반응을 매개하는 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되었다. Enk *et al.* 의 *in vivo* 실험에서는 IL-1 β 을 피하주사 했을 때 hapten에 의한 반응과 똑같은 반응의 발생을 확인하였다.¹¹⁾

이와 관련하여 cytokine 중 IL-1 β 을 조절하고자 하는 실험이 Oshima A, *et al.* 등에 의해 이루어지기도 하였다. 또한 Roxithromycin을 가하였을 때 murine langerhans cell의 IL-1 β 의 생산능력이 감소되었다고 보고되었다.¹²⁾

Pedunculagin(2,3,4,6-(s)-HHDP(Hexahydroxydiphenoyl)-D-gulose, M.W.=784.55)은 오리나무(*Alnus hirsuta* var. *microphylla*, Betulaceae)에서 정제된 ellagitannin의 일종이다.¹³⁾

Ellagitannin은 항암, 항virus 작용 이외에도, blood urea nitrogen저하, ACE억제, 항정신성, 지질의 과산화작용 저해 등 많은 기능을 가지고 있다고 보고되었다.¹⁴⁻¹⁶⁾

본 연구자의 실험 또한 이러한 관점에서 이루어졌다. 본 대학의 생약학 연구실에서 제공받은 천연물질 pedunculagin을 가하였을 때 murine langerhans cell의 IL-1 β 의 발현 여부를 조사하여 pedunculagin이 피부 면역계에서 immunomodulator로

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-860-4218 (팩스) 042-860-4593
(E-mail) dyyoon@kribb.re.kr

서 가능한지를 살펴보았다.

실험방법

Animal - 본 연구에 사용된 실험동물은 5~6주령의 BALB/c 계 생쥐로 한림 실험동물에서 구입하여 실험하였다.

Pedunculagin - 본 연구에 사용한 Pedunculagin(C₃₄H₂₄C₂₂, M.W.=784.55)은 오리나무(*Alnus hirsuta* var. *microphylla*, *Betulaceae*)에서 정제한 ellagitannin으로 중앙대학교 약학대학 생약학 연구실에서 제공받아 사용하였다. 본 연구에서 투여한 pedunculagin은 RPMI 용액에 넣어 완전히 용해시킨 후 0.22 µm filter를 여과 멸균하여 사용하였다.

Reagents - BSA(Sigma Chem. Co., U.S.A), FBS(Gibco BRL, U.S.A), Ficoll(Pharmacia, U.S.A.) Gentamycin(Gibco BRL, U.S.A), HBSS(Sigma Chem. Co., U.S.A), Nylon wool (Wako, Japan), Penicillin-streptomycin(Gibco BRL, U.S.A), RPMI 1640(Sigma Chem. Co., U.S.A), Trypsin(Gibco BRL, U.S.A)을 구입하여 사용하였고 그 밖의 시약은 1등급 시약을 사용하였다.

Instrument - Centrifuge(Vision sci. co., Korea), Clean bench(Vision sci. co., Korea), CO₂ incubator(Vision sci. co., Korea), Deep freezer(Sanyo, Japan), Microscope(Olympus), Electronic balance(Meter toledo, Swizerland), pH meter (Meter toledo, Swizerland), Autoclave(Vision sci. co., Korea)

Preparation of cell suspension - Epidermal cell의 single cell suspension 제조는 standard protocols에 따라 실시하였다.^{17,18)} 먼저, 제 1 부유액(Hank solution, trypsin, antibiotics)과 제 2 부유액(Hank solution, FBS, gentamycin)을 조제하였다. 생쥐를 급살 시켜 귀를 잘라낸 뒤 70% ethanol로 소독하였다. 채취한 귀를 두 조각으로 나누어 사전에 준비한 제 1 부유액을 37°C에서 incubation 시켰다. 30분 후 표피를 진피로부터 분리하고 제 2 부유액에서 incubation하였다. Tube에 옮겨 vortex 하고 분리되지 않은 조직편은 nylon wool로 제거하였다. 제조된 cell suspension은 800 g에서 10분 동안 원심분리하고 10% FBS-RPMI 1640으로 2-3번 washing하였다.

Preparation of langerhans cell enriched epidermal cell - 준비한 cell suspension은 37°C, 5% CO₂에서 72시간 동안 incubation된 후 pipeting에 의해 회수되었다. 고속원심분리용 plastic tube에 4 ml의 ficoll액을 넣고 그 위에 4 ml의 10% FBS-RPMI 1640을 액면이 혼란하지 않게 조용히 떨어뜨렸다. 원심 분리 후 생긴 ficoll과 배양액 층과의 사이에 있는 저밀도 세포를 pasteur pipet으로 회수하였다. 과량의 RPMI를 가하여 교반한 후, 원심분리하여 세포를 washing하고 그 일부를 취하여 세포 수를 계측하였다.

In Vitro - Pedunculagin은 배지에 1, 10, 100 µg/ml 의 농도로 녹여 사용하였다. Langerhans cell에 대한 pedunculagin의 효과를 알아보기 위하여 2개의 실험군으로 나누어 standard protocols에 따라 실험하였다.

제1실험군은 1, 10, 100 µg/ml 농도의 pedunculagin을 투여한 뒤 4, 8, 12, 24시간 동안 배양하였고, 제2실험군은 10 µg/ml 의 PMA로 10분 동안 자극, 활성화시킨 뒤 1, 10, 100 µg/ml 농도의 pedunculagin을 투여하여 4, 8, 12, 24시간 동안 배양하였다. IL-1β의 발현 변화는 RT-PCR을 통하여 확인하였다.

In Vivo - Pedunculagin은 배지에 1, 5, 10 mg/ml의 농도로 녹여 사용하였다. Contact allergen, DNFB는 acetone/olive oil(4:1)에 녹여 0.5% DNFB 500 µg/kg로 준비하였다.¹⁹⁾ Langerhans cell에 대한 pedunculagin의 효과를 알아보기 위하여 2개의 실험군으로 나누어 standard protocols에 따라 실험하였다.

제1실험군은 1, 5, 10 mg/kg 농도의 pedunculagin을 mouse의 귀에 바르고 4, 8, 12, 24시간 후 langerhans cell suspension을 제조하였고, 제2실험군은 0.5% DNFB 500 µg/kg로 자극, 활성화시킨 뒤 1, 5, 10 mg/kg pedunculagin을 바르고 역시 4, 8, 12, 24시간 후 langerhans cell suspension을 준비하여 그 결과를 조사하였다. IL-1β의 발현 변화는 RT-PCR을 통하여 확인하였다.

mRNA extraction - Pharmacia biotech. 의 instruction에 따라 total RNA를 extraction하였다. 세포에 LiCl 용액 350 µl, β-mercaptoethanol 3 µl, extraction buffer 150 µl, CsTFA 500 µl를 가하여 vortex하여 세포를 lysis 시켰다. 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 total RNA를 얻었다. 취하여진 total RNA를 세척하기 위하여 extraction buffer 75 µl, LiCl 용액 175 µl, CsTFA 250 µl를 가하여 세척한 후에 70% ethanol을 제거한 후 실온에서 15분간 건조 시켰다. Total RNA에 DEPC-treated water 50 µl를 가하여 얼음에 15-30분간 방치한 후 vortex하고 65°C에서 10분간 가열하고, vortex 한 후 -20°C에 보관하였다.

RNA analysis (OD analysis) - 취하여진 RNA의 농도는 spectrophotometer를 통하여 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아래 계산방법으로 total RNA농도를 계산한 후 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)에 사용할 total RNA 1 µg을 정량하였다.

$$[RNA] = OD_{260\text{ nm}} \times D \times 40 \mu\text{g/ml} \quad (D = \text{final dilution factor})$$

Reverse transcription & Polymerase chain reaction - 1 µg의 total RNA를 reverse transcription에 사용하였다. 20U의 Moloney Murine Leukemia virus reverse transcriptase, 10U의 RNasin, 1U의 thermostable DNA polymerase, dNTP를 함유하는 20 µl 용 RT-PCR kit을 사용하였다. RT-PCR을 Bioneer의 protocol에 따라 수행하였다. RNA 1 µg, oligo(dT)₁₈ 25 pmole, primer 50 pmole, RNase-free water로 20 µl까지 채

우고 reverse transcription되었고, 42°C에서 60분 동안 incubation 하여 cDNA 합성을 하였으며, 94°C에서 5분 동안 가열하여 reverse transcriptase inactivation한 후 4°C에서 incubation되었다. PCR 증폭은 94°C 0.5분, 55°C 1.5분, 68°C 1분, 34 cycles로 반응시켰다. 3 μ l의 PCR product를 1.8% agarose gel에서 loading 하였다.

결 과

In Vitro - Pedunculagin 1, 10, 100 μ g/ml를 가한 후 4, 8, 12, 24 시간 배양 후에 total mRNA 를 추출하여 RT-PCR 에 의하여 분석하였다. Pedunculagin 투여 후 4, 8시간동안은 baseline 과 비교했을 때 별다른 변화가 나타나지 않았다. 그러나 12시간 후 pedunculagin 10, 100 μ g/ml에서 증가를 보였고 100 μ g/ml pedunculagin에 의해서는 24시간 후에도 지속적인 증가를 나타내었다(Fig. 1).

10 ng/ml PMA로 자극하고 pedunculagin 1, 10, 100 μ g/ml을 가하였을 때에도 4, 8시간동안은 baseline과 비교했을 때 별다른 변화가 나타나지 않았다. 그러나 12시간 후부터 pedunculagin 10, 100 μ g/ml에서 IL-1 β mRNA 발현이 감소하기 시작하여 24시간이 되었을 때는 어느 line에서도 발현이 검출되지 않았다(Fig. 2).

In Vivo - Mouse의 귀에 1, 5, 10 mg/kg pedunculagin을 바르고 각각 4, 8, 12, 24시간 뒤 langerhans cell suspension을 준비하여 그 영향을 조사하였다. 4시간 후 IL-1 β mRNA 발현은 별다른 변화가 없었고 8, 12시간에서는 10 mg/kg pedunculagin에 의한 IL-1 β mRNA 발현이 증가가 조사되었다. 24시간에서는 발

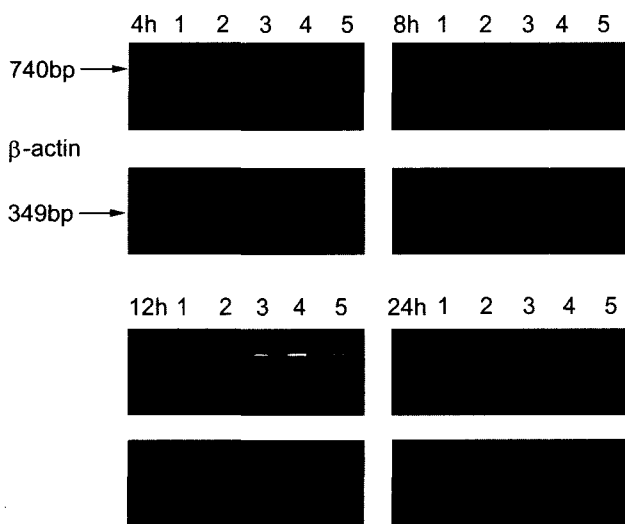


Fig. 1 - Effect of pedunculagin on the induction of IL-1 mRNA in murine langerhans cell in vitro. Total RNA extracted from murine langerhans cell was analyzed by RT-PCR 4, 8, 12, 24 hrs after application 1, 10, 100 μ g/ml pedunculagin. 1: Base signal, 2: Pedunculagin 1 μ g/ml, 3: Pedunculagin 10 μ g/ml, 4: Pedunculagin 100 μ g/ml, 5: PMA 10 ng/ml.

현의 검출되지 않았다(Fig. 3).

CHS에 대한 pedunculagin을 알아보기 위해 contact allergen, DNFB를 사용하였다. 0.5% 500 μ g/kg을 도포한 뒤 1, 5, 10 mg/kg pedunculagin을 바르고 각각 4, 8, 12, 24시간 후 langerhans

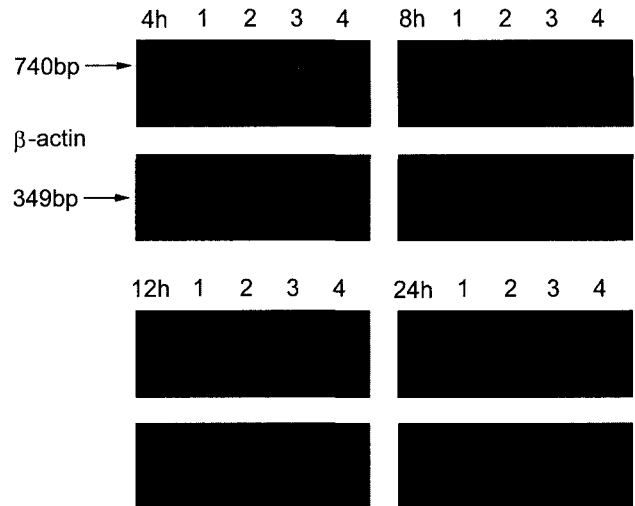


Fig. 2 - Effect of pedunculagin on the induction of IL-1 mRNA after PMA stimulation in murine langerhans cell in vitro. After 10 ng/ml of PMA stimulation for 10 mins, murine langerhans cell was treated with 1, 10, 100 μ g/ml of pedunculagin. Total RNA extracted from murine langerhans cell was analyzed by RT-PCR 4, 8, 12, 24hrs after application 1, 10, 100 μ g/ml pedunculagin. 1: PMA 10 ng/ml treatment, 2: PMA 10 ng/ml + Pedunculagin 1 μ g/ml, 3: PMA 10 ng/ml + Pedunculagin 10 μ g/ml, 4: PMA 10 ng/ml + Pedunculagin 100 μ g/ml.

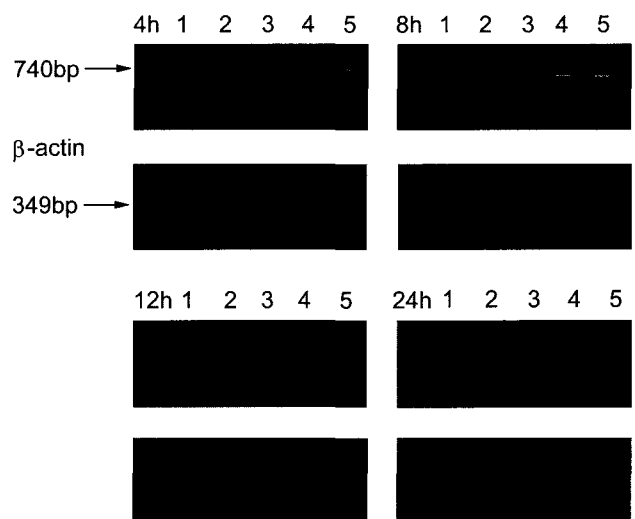


Fig. 3 - Effect of pedunculagin on the induction of IL-1 mRNA in murine langerhans cell in vivo. Total RNA extracted from murine langerhans cell was analyzed by RT-PCR 4, 8, 12, 24hrs after application 1, 5, 10 mg/kg pedunculagin. 1: Base signal, 2: Pedunculagin 1 mg/kg, 3: Pedunculagin 5 mg/kg, 4: Pedunculagin 10 mg/kg, 5: DNFB 500 μ g/kg.

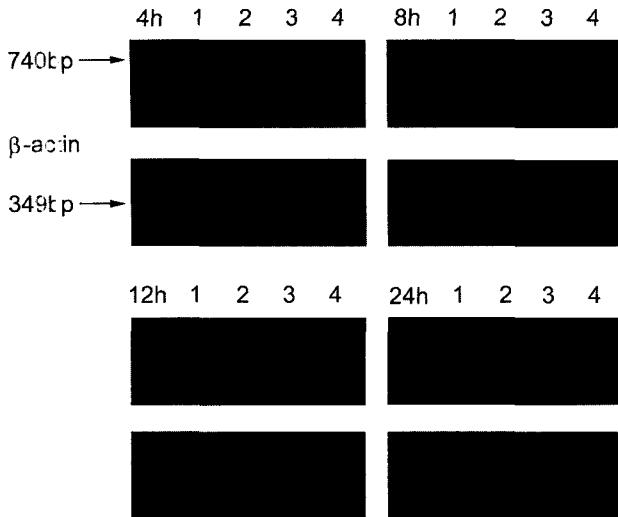


Fig. 4 – Effect of pedunculagin on the induction of IL-1 mRNA after DNFB sensitization in murine langerhans cell *in vivo*. After DNFB 500 μg/kg sensitization, murine langerhans cell was treated with 1, 5, 10 mg/kg of pedunculagin. Total RNA extracted from murine langerhans cell was analyzed by RT-PCR 4, 8, 12, 24hrs after application 1, 5, 10 mg/kg pedunculagin. 1: DNFB 500 μg/kg treatment, 2: DNFB 500 μg/kg + Pedunculagin 1 mg/kg, 3: DNFB 500 μg/kg + Pedunculagin 5 mg/kg, 4: DNFB 500 μg/kg + Pedunculagin 10 mg/kg.

cell suspension을 준비하여 그 영향을 조사하였다. 4, 8시간까지 발현이 별다른 변화를 보이지 않았으나 12시간이 되었을 때 IL-1β mRNA 발현이 감소가 관찰되었다. 5 mg/kg pedunculagin에서 희미한 band가 나타내어 졌고 10 mg/kg pedunculagin에서는 거의 검출되지 않았다(Fig. 4).

고 찰

본 실험의 data는 langerhans cell에서 IL-1β mRNA 발현을 조사한 것이다. Langerhans cell은 표피 내에 극소수 존재함에도 불구하고 피부 면역 반응에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. CHS와 같은 반응에서 antigen을 T-cell 에 제공함으로써 반응을 매개하는 역할을 한다고 보고 된바있다.^{6,7)} 서론에서도 언급하였듯이, LC에서 분비되는 IL-1β은 피부 면역 반응시 최초 면역 반응을 촉발시키는 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되고 있으며,^{4,5)} Enk *et al.*는 *in vivo* 실험에서 IL-1β을 피하 주사 했을 때 hapten에 의한 반응과 똑같은 반응의 발생을 확인 하였고,¹¹⁾ 이와 관련하여 Oshima A, *et al.* 등은 IL-1β을 조절하고자 하는 실험을 실시하기도 하였다. 또한, roxithromycin을 가 하였을 때 murine langerhans cell 의 IL-1β의 생산능력이 감소 되었고,¹²⁾ Josien R., Wong B.R., Li H.L., Steinman R.M., Choi Y. 는 *in vitro*에서 TRANCE(TNF-related activation-

induced cytokine)가 proinflammatory cytokine을 증가시켰다고 보고한바 있다.²⁰⁾

그러나, 지금까지 tannin이 langerhans cell에서 cytokine을 유도했다는 보고는 찾아볼 수 없었으며, tannin이 면역증강작용이 있다는 것은 보고되어있으나 mechanism을 규명하지 못하였다는 점에서 이 실험이 의미를 가진다고 할 수 있다. 이 실험으로 mechanism을 규명하는데 한계가 있으나, mechanism 규명의 기초자료가 될 수 있을 것이다.

본 실험에서는 *in vitro*, *in vivo*에서 LC를 pedunculagin 1, 10, 100 μg/ml으로 처리하여 IL-1β mRNA 유도를 시간과 용량 별로 측정하였다. Murine LC를 취하여 pedunculagin 1, 10, 100 μg/ml 또는 1, 5, 10 mg/kg을 가한 후 4, 8, 12, 24시간 배양하고 total mRNA를 추출하여 RT-PCR에 의하여 분석하였다. 그 결과, IL-1β는 pedunculagin 1 μg/ml 투여군 모두 4, 8, 12, 24 시간 후에 baseline과 비교하여 큰 증감을 나타내지 않았다. 그러나, pedunculagin 10, 100 μg/ml과 10 mg/kg 투여군의 경우 증가를 나타내었다. *In vitro*, PMA 자극, 활성화 후 pedunculagin 1, 10, 100 μg/ml으로 처리했을 때 12시간 후 10, 100 μg/ml pedunculagin에서 IL-1β mRNA의 발현 감소가 관찰되었다. CHS와 같은 피부의 negative immune response에서의 pedunculagin의 영향을 알아보기 위해서 contact allergen, DNFB가 사용되었다. 0.5% DNFB 500 μg/kg을 도포 한 뒤 1, 5, 10 mg/kg pedunculagin을 바르고 각각 4, 8, 12, 24시간 후 langerhans cell suspension을 준비하여 그 영향을 조사하였다. 4, 8시간 때에는 baseline과 비슷하게 발현되었고, 12시간에는 현저히 감소하여 5 mg/kg pedunculagin 희미한 band로 관찰되었고 10 mg/kg pedunculagin에서는 발현이 나타나지 않았다.

본 실험을 종합하면 pedunculagin 1 μg/ml 투여군 모두 4, 8, 12, 24시간 후에 baseline과 비교하여 큰 증감을 나타내지 않았다. 또한 100 μg/ml과 10 mg/kg 같이 고농도에서 발현이 뚜렷한 것으로 나타났다. 이 같은 결과로 볼 때 pedunculagin 1 μg/ml은 IL-1β mRNA의 발현에 영향을 미치는데 충분치 못한 양이며 pedunculagin이 용량 의존성 효과를 가지고 있다고 할 수 있을 것이다.

결과적으로 *in vitro* 및 *in vivo*에서 pedunculagin에 의한 IL-1β mRNA의 발현 증가는 proinflammatory cytokine인 IL-1β 분비가 증가하여 macrophage, NK cell, T cell, B cell 등의 활성이 증가될 것이라는 것을 유추할 수 있으며, 또한 PMA 또는 DNFB에 의해 LC가 활성화 된 후 pedunculagin에 의한 IL-1β mRNA의 발현감소는 피부의 negative reaction에서 억제 물질로써의 가능성을 제시한 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) Williams I. R. and Kupper T. S. : Immunity at the surface:

- Homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Lif. Sci.* **58**, 1485 (1996).
- 2) Salmon J. K., Armstrong C. A., and Angel J. C. : The skin as a immune organ. *West. J. Med.* **160**, 146 (1994).
 - 3) Bos J. D. : The skin as organ of immunity. *Clin. Exp. Immunol.* **107 Suppl.1**, 3 (1997).
 - 4) Bos J. D. and Kapsenberg M. L. : The skin immune system : progress in cutaneous biology. *Immunol. Today.* **14**, 75 (1993).
 - 5) Kalish R. S. : Antigen processing: the gateway to the immune response. *J. Am. Acad. Dermatol.* **32**, 640 (1996).
 - 6) Hogan A. D. and Burks A. W. : Epidermal Langerhans cells and their function in the skin immune system. *Ann. Allerg. Asthma. Immunol.* **75**, 5 (1995).
 - 7) Braathen L. R. and Thorsby E. : Human epidermal Langerhans cells are more potent than blood monocytes in inducing some antigen-specific T-cell responses. *Br. J. Dermatol.* **108**, 139 (1983)
 - 8) Matsue H., Cruz P. D Jr., Bergstresser P. R. and Takashima A. : Langerhans cells are the major source of mRNA for IL-1 beta and MIP-1 alpha among unstimulated mouse epidermal cells. *J Invest Dermatol.*, **99**, 537 (1992).
 - 9) Cumberbatch M, Dearman R. J. and Kimber I. : Constitutive and inducible expression of interleukin-6 by Langerhans cells and lymph node dendritic cells. *Immunology.* **87**, 513 (1996).
 - 10) Sauder D. N, Dinarello C. A. and Morhenn V. B. : Langerhans cell production of interleukin-1. *J Invest Dermatol.* **82**, 605 (1984).
 - 11) Enk A. H., Angeloni V. L., Udey M. C. and Katz S. I. : An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 β beta in the initiation of primary immune responses in skin. *J. Immunol.* **150**, 3698 (1993).
 - 12) Ohshima A., Tokura Y., Wakita H., Furukawa F. and Takigawa M. : Roxithromycin down-modulates antigen-presenting and interleukin-1 beta-producing abilities of murine Langerhans cells. *J. Dermatol. Sci.* **17**, 214 (1998).
 - 13) Lee, M. W., Tanaka, t., Nonaka, G., and Nishioka, I. : hirusinin, an ellagitannin with diarylheptanoid moiety, from *Alnus hirsuta* var. *microphylla*. *Phytochemistry* **31**, 967 (1992).
 - 14) Nonaka, G., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Kashiwada, Y. C., and Lee, K. H. : Anti-ADIS agents,2 : Inhibitory effects of tannins on HIV replication in H9 lymphocyte cells. *J. Nat. Prod.* **53**, 587(1990)15.
 - 15) Yokako, T., Fujioka, K. H., Oura, H., Nonaka, G., and Nisgioka, I. : Effect of rhubarb tannins on uremic toxin. *Nephron.* **58**, 155 (1983).
 - 16) Fujita Y., komagoe, K., Uehara, I., Okuda, T., Yoshida, T. *yakugaku Zasshi.* **108**, 528 (1987).
 - 17) Tamaki K., Stingl G., Gullino M., Sachs DH. and Katz SI. : Ia antigens in mouse skin are predominantly expressed on Langerhans cells. *J. Immunol.* **123**, 784 (1979).
 - 18) Sullivan S., Bergstresser PR., Tigelaar RE. and Streilein JW. : FACS purification of bone marrow-derived epidermal population in mice: Langerhans cells and Thy-1⁺ dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* **84**, 491 (1985).
 - 19) Streilein J. W., Toews G. T., Gilliam J. N. and Bergstresser P. R. : Tolerance or hypersensitivity to 2,4-dinitro-1-fluorobenzene: the role of Langerhans cell density within epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **74**, 319 (1980).
 - 20) Josien R, Li H. L, Ingulli E, Sarma S, Wong BR, Vologodskaia M, Steinman R. M, Choi Y. : TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells *in vivo*. *J Exp Med.* **191**, 495 (2000).