

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790374

研究課題名 (和文) Nepmucin による白血球動員および免疫反応制御機構の解明

研究課題名 (英文) Regulation of leukocyte trafficking and immune responses by nepmucin

研究代表者

梅本 英司 (UMEMOTO EIJI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90452440

研究成果の概要 (和文) : Nepmucin は Ig ドメインを有し、血管内皮細胞などに発現する接着分子である。本研究課題において、nepmucin は隣接する血管内皮細胞の間隙面に発現し、ホモフィリックな結合を媒介すること、また、Ig ドメインを介してリンパ球の血管外遊走を亢進することが明らかになった。さらに、nepmucin はフォスファチジルセリンに結合し、アポトーシス細胞の取り込みを媒介することも明らかになった。このように nepmucin は生体内において、異なる複数の役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Nepmucin is an Ig-domain-containing adhesion molecule expressed in certain types of vascular endothelial cells. We found that nepmucin is localized to interendothelial contacts and mediates homotypic cell adhesion. Nepmucin showed enhanced lymphocyte transendothelial migration by its Ig domain. We also found that nepmucin mediates uptake of apoptotic cells by the interaction of phosphatidylserine, which appears on the outer leaflet of the plasma membrane in apoptotic cells. These results indicate that nepmucin plays multiple physiological roles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：接着分子、免疫学、白血球動態、免疫応答

1. 研究開始当初の背景

リンパ球はリンパ節やパイエル板などの二次免疫組織に移行する際、高内皮細静脈 (high

endothelial venule: HEV) とよばれる特殊な細静脈に結合し、その血管壁を通り抜ける。リンパ球と HEV との相互作用は、「リンパ球ロ

ーリング」、「強固な接着」、「血管外遊走」など連続した異なる過程から成り立つ。これまでパイエル板の HEV においてはリンパ球のローリングと強固な接着の両者を媒介する分子は知られていたが、末梢リンパ節ではその存在は報告されていなかった。

われわれはこれまで、末梢リンパ節 HEV に発現し、パイエル板 HEV に発現しない新規接着分子 nepmucin を同定した。Nepmucin は細胞外領域にムチン様ドメインと Ig ドメインを有し、nepmucin はムチン様ドメインに適切な糖鎖修飾を受けることによりリンパ球ローリングを媒介する一方、Ig ドメインを介してリンパ球の接着を媒介する。

しかし、nepmucin の白血球動態における生理的意義および nepmucin を介したリンパ球動態の詳細なメカニズムは不明であった。特に nepmucin は末梢リンパ節の HEV において管腔面だけでなく、内皮細胞同士の接着面に発現することから nepmucin はリンパ球の接着作用以外にも別の役割を果たす可能性が考えられた。また、nepmucin は Ig ドメイン依存的にリンパ球に結合するが、そのリガンドは未解明のままであった。

2. 研究の目的

(1) Nepmucin によるリンパ球動態制御機構の解明

Nepmucin と同様に血管内皮細胞同士の接着面に発現し、Ig ドメインを有する CD31 は、ホモフィリックな結合を介して、白血球の血管外遊走を媒介することから、nepmucin も CD31 と同様に nepmucin 自身とホモフィリックに結合し、リンパ球の血管外遊走を媒介する可能性を検討する。

(2) Nepmucin リガンドの同定

Nepmucin が結合する細胞集団および

nepmucin リガンドの同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) Nepmucin がホモフィリックな結合を媒介するか検討するために、nepmucin 発現細胞株による細胞凝集塊の形成能を評価する。また、nepmucin を発現させた血管内皮細胞株を樹立し、nepmucin がリンパ球の血管外遊走を媒介するかどうかトランスウェルを用いて解析する。

(2) Nepmucin リガンドの同定のため、nepmucin の細胞外領域とヒト IgG の Fc 領域を融合した可溶性 nepmucin タンパク質を用いる。

4. 研究成果

(1) まず、nepmucin が nepmucin 自身とホモフィリックに結合するかどうかを検討したところ、Nepmucin 発現 L 細胞株は同種細胞同士で細胞凝集を形成したが、ベクターのみを導入した L 細胞株とは細胞凝集を形成しなかったことから、nepmucin はホモフィリックな細胞接着を媒介することが示唆された (図 1)。この凝集塊の形成は nepmucin の Ig ドメインを認識する抗体により阻害され、この抗 nepmucin 抗体はリンパ球と nepmucin のヘテロフィリックな結合を阻害しなかったことから、nepmucin はホモフィリックおよびヘテロフィリックに結合する際に、それぞれ Ig ドメイン中の異なる結合部位を使用することが示唆された。

次に、内皮細胞に発現する nepmucin のホモフィリックな結合がリンパ球の血管外遊走を媒介する可能性を検討したところ、nepmucin を発現する血管内皮細胞株はコントロール細胞に対して有意に血管外遊走を亢進させた。Nepmucin によるリンパ球血管外遊走の亢進はホモフィリックな結合および

ヘテロフィリックな結合を抑制する抗体のいずれでも阻害された。一方、nepmucin 発現血管内皮細胞に対するリンパ球の接着はヘテロフィリックな結合を阻害する抗体のみにより阻害されたことから、nepmucin のヘテロフィリックな結合はリンパ球の接着および血管外遊走に関与し、ホモフィリックな結合はリンパ球の血管外遊走を制御することが示唆された (図 2)。以上の結果から、nepmucin は二つの異なる結合様式を介してリンパ球の血管外遊走を促進することが示唆された (FEBS Lett. 582:3018-3024, 2008)。

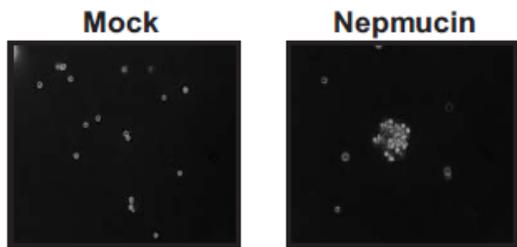


図 1. Nepmucin によるホモフィリックな結合

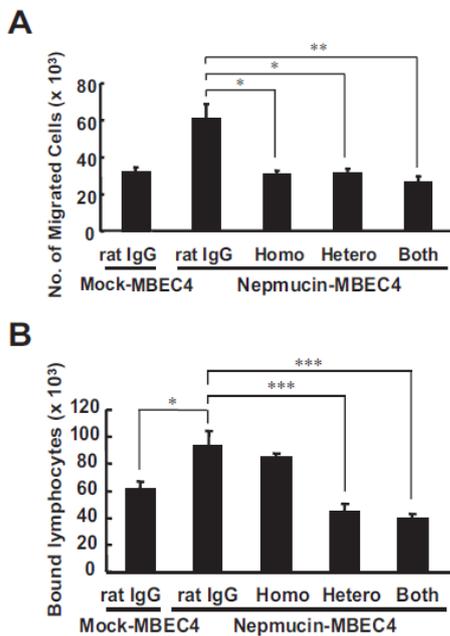


図 2. Nepmucin によるリンパ球の血管外遊走。A. 血管外遊走 B. 細胞接着。Homo は nepmucin のホモフィリックな結合を阻害する抗 nepmucin 抗体、Hetero は nepmucin のヘテロフィリックな結合を阻害する抗 nepmucin 抗体、Both はそれら両者の混合抗体を示す。

(2) Nepmucin はリンパ球に結合する一方、生細胞だけでなくアポトーシス細胞に強く結合を示した。アポトーシスが起ると細胞表面にフォスファチジルセリン (PS) が露出することから、nepmucin の PS に対する結合能を検討したところ、nepmucin は Ig ドメイン依存的に PS に結合を示した。また、nepmucin を強制的に発現した血管内皮細胞株ではアポトーシス細胞の取り込みが見られ、この取り込みは抗 nepmucin 抗体の添加により阻害された (図 3)。さらに nepmucin はアポトーシス細胞の周囲に集積するのが観察された。以上の結果より、nepmucin はアポトーシス細胞上の PS と結合し、アポトーシス細胞を取り込むことが示唆された。マクロファージがアポトーシス細胞を取り込むと免疫抑制的に作用する IL-10 や TGF- β が産生されることから、nepmucin は生体において免疫応答を負に調節する可能性があり、これらの知見は大変興味深い。

リンパ球上に発現する nepmucin のリガンドは PS 以外であると考えられるため、この点については現在、検討中である。

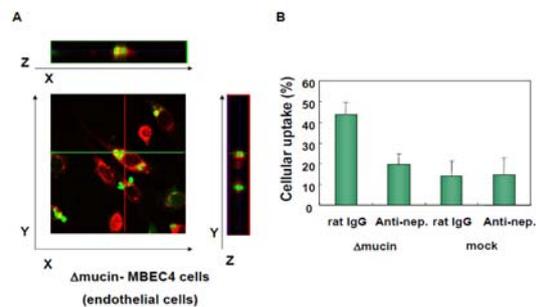


図 3. Nepmucin によるアポトーシス細胞の取り込み

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- Tohya K., Umemoto E. & Miyasaka M., Microanatomy of lymphocyte-endothelial interactions at the high endothelial venules of lymph nodes. *Histol. Histopathol.*, 25:

781-794, 2010、査読有

- ② Nakasaki T, Tanaka, T, Okudaira, S., Hirose, M., Umemoto, E., Otani, K., Jin, S., Bai, Z., Hayasaka, H., Fukui, Y., Aozasa, K., Fujita, N., Tsuruo, T., Ozono, K., Aoki, J. & Miyasaka, M. Involvement of the lysophosphatidic acid-generating enzyme autotaxin in lymphocyte-endothelial cell interactions. *Am. J. Pathol.*, 173:1566-1576, 2008、査読有
- ③ Jin S., *Umemoto E. et al. (* corresponding author) Nepmucin/CLM-9, an Ig domain-containing sialomucin in vascular endothelial cells, promotes lymphocyte transendothelial migration *in vitro*. *FEBS Lett.*, 582:3018-3024, 2008、査読有
- ④ Furukawa Y., Umemoto E., Jang, M.H., Tohya, K., Miyasaka, M. & Hirata, T. Identification of novel isoforms of mouse L-selectin with different carboxyl-terminal tails. *J. Boil. Chem.*, 283:12112-12119, 2008、査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 梅本英司、他、Nepmucin mediates uptake of apoptotic cells in endothelial cells of high endothelial venules. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009.12.2-4、大阪
- ② Umemoto, E. Identification of nepmucin as a phosphatidylserine receptor. 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2009. 2009.6.3-4, Kanazawa
- ③ 陳秀晶、梅本英司、他、Nepmucin/CLM-9, an Ig domain-containing sialomucin in vascular endothelial cells, promotes lymphocyte transendothelial migration. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008.12.1-3、京都
- ④ 國澤啓司、梅本英司、他、Nepmucin mediates uptake of apoptotic cells through binding of phosphatidylserine. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008.12.1-3、京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅本英司 (UMEMOTO EIJI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：90452440

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし