

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590191

研究課題名（和文）リンパ球動員を媒介する血管内皮細胞の組織選択的分化機構の解明

研究課題名（英文）Understanding of the mechanism underlying the tissue-specific differentiation of high endothelial venule endothelial cells.

研究代表者 早坂 晴子 (HAYASAKA HARUKO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70379246

研究成果の概要（和文）：リンパ節に存在する内皮細胞は主にリンパ管系内皮細胞、血管内皮細胞に大別され、血管内皮細胞はさらに形態的特徴や機能から HEV（高内皮細静脈）内皮細胞、非 HEV 内皮細胞に分類することができる。HEV 内皮細胞は、特異的な接着分子やケモカインを発現しリンパ球のホーミングを媒介するという点で、免疫系において重要な機能をもつ細胞である。HEV 内皮細胞のホーミングにおける機能的解析は多数行われている一方、HEV 内皮細胞がどこから発生し、機能的な細胞に分化するのかという点については未だ不明である。HEV 形成期における HEV 内皮細胞分離技術の開発を行い、初めて胎生期 HEV 内皮細胞の遺伝子発現解析に成功し、選択的に発現する複数の転写因子を同定した。これらの中の一つについて詳細な解析を行ったところ、HEV の成熟が進む胎生後期から新生仔期において HEV 内皮細胞に選択的に発現することが明らかとなった。また、この遺伝子を欠損するマウスは、野生型と比較して新生仔リンパ節が小さく、免疫組織化学的解析から HEV 内皮細胞に特異的に発現する複数の遺伝子発現が低下していた。これらのことから、この転写因子が HEV 内皮細胞分化に機能的に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The high endothelial venules (HEVs) are blood vessels specifically found in lymph nodes and Peyer's patches. Although HEVs express specific chemokines/adhesion molecules which mediate lymphocyte trafficking across the high-walled endothelial cells (HEV-ECs), the mechanism regulating HEVs' development and maintenance of the unique properties remain unclear. We performed microarray and real-time quantitative PCR analyses of HEV-ECs and non-HEV-ECs in neonatal mice mesenteric LNs, and identified five transcription factors which are over fifty times more abundantly expressed in developing HEV-ECs than in non-HEV-ECs. By immunohistochemical analysis, we found that one of them showed a restricted expression pattern in the nucleus of ECs of a substantial proportion of blood vessels of lymph nodes from E17.5 to the date of birth, which corresponds temporally to HEV-EC development. The gene knockout mice of this transcription factor showed reduced expression of several HEV-associated genes, implying the functional contribution of this gene to HEV-EC differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：血管内皮細胞、細胞分化、リンパ節

1. 研究開始当初の背景

高内皮細静脈 (HEV) はリンパ節や小腸パイエル板にのみ存在し、リンパ球トラフィッキングに關与するケモカインや接着分子を選択的に発現する特殊な血管であるこれまでに研究代表者たちや国外のグループによる精力的な研究から、HEV とリンパ球との相互作用に關与する分子群が明らかになった。最近、免疫応答性の変調および慢性炎症性疾患の病態に HEV 形成の亢進や低下が關与する可能性が指摘されている。このことから、HEV 内皮細胞分化の分子メカニズムを明らかにし、二次リンパ組織や慢性炎症巣における HEV 形成調節が可能になれば、適切なリンパ球動員と免疫応答性を誘導する新たな方法の確立につながることを期待された。一方、HEV 内皮細胞分化の分子メカニズムについてはこれまで明らかにされていなかった。この理由として、HEV 内皮細胞はリンパ節構成細胞の約 0.1%以下ときわめて少数ない上、培養により速やかに脱分化するため未分化 HEV 内皮細胞を分離し、性状解析を行うことは極めて困難であるという問題点が挙げら

れる。このため、未分化 HEV 内皮細胞を効率よく分離する方法の開発、分離した HEV 内皮細胞性状解析および遺伝子解析を行うことが必要とされていた。

2. 研究の目的

HEV 内皮細胞分化の分子メカニズムを解析するため、以下の目的で研究をおこなった。

1. HEV 内皮細胞に選択的に発現するマーカー分子の発現および HEV の形態的解析により、マウス発生のどの時期に HEV が出現するかを決定する。
 2. HEV 形成期における HEV 内皮細胞分離技術の開発を行う。
 3. 分化決定期における HEV 内皮細胞の分離を行い、遺伝子発現解析を行う
 4. 特に転写因子に注目し、HEV 内皮細胞分化決定における遺伝子機能を解析する
- 以上の4点を目的として研究をおこなった。

3. 研究の方法

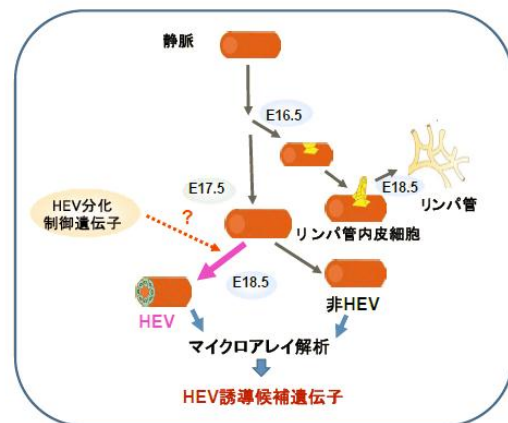
マウス発生のどの時期に HEV が出現するかを決定するため、胎生 16.5 日から新生仔までのマウス腸間膜リンパ節組織の

MAdCAM-1 (成体における HEV マーカー)、CD34 (血管内皮細胞マーカー)、Lyve-1 (成体におけるリンパ管内皮細胞マーカー)、Prox1 (リンパ管内皮細胞マーカー) の発現を免疫組織染色により解析した。次に、新生仔期の HEV 内皮細胞に特異的に発現する遺伝子を同定するため、新生仔マウス腸間膜リンパ節の HEV、非 HEV 内皮細胞をそれぞれフローサイトメーターにて細胞分離し、DNA マイクロアレイにて発現遺伝子解析を試みた。マイクロアレイの結果を基にして定量的 PCR 解析を行い、HEV 内皮細胞において非 HEV 内皮細胞に高発現する転写因子を複数同定した。さらに同定された遺伝子の一つが HEV 内皮細胞分化を調節する可能性について遺伝子導入による細胞生物学的解析、免疫学的解析およびノックアウトマウスの表現型解析をおこなった。

4. 研究成果

研究代表者らは、HEV 内皮細胞マーカー分子を発現する血管構造が胎生 17.5 日以降に出現すること、また成熟 HEV の形態的特徴である肥厚した基底膜が新生仔期以降に完成することを明らかにした。さらに新生仔期マウス腸間膜リンパ節 HEV 内皮細胞を分離し、マイクロアレイ・定量的 PCR 解析を行い、HEV 内皮細胞において非 HEV 内皮細胞より 50 倍以上高発現する 5 つの転写因子を同定した。免疫組織学的解析から、このうちの一遺伝子は HEV の分化、成熟が進む胎生 17.5 日頃から新生仔期において HEV 内皮細胞に選択的に発現するが、生後一日目には急速に発現が消失し、成体リンパ節では発現が検出されないことが明らかとなった。この遺伝子の欠損マウスは生後 24 時間以内に死亡するため、胎生期から生後 1 日目までのリンパ節について解析を行ったところ、形態的に HEV とみられる血管構造は観察されたものの、

HEV に選択的に発現する接着分子の発現低下傾向が見られた。次にこの遺伝子を培養血管内皮細胞へ導入し定量的 PCR 解析を行ったところ、この遺伝子単独導入では明らかな HEV 関連遺伝子の発現誘導はみられなかったが、HEV 内皮細胞の機能維持に重要と考えられるリンフォトキシンシグナリング存在下では、遺伝子発現により HEV マーカー遺伝子 MAdCAM-1 の発現誘導が見られた。このことから、この転写因子は単独で HEV 関連遺伝子の発現を誘導する可能性は低いものの、胎生期から新生仔期の HEV 内皮細胞の分化に伴ってみられる表現型の変化に関与する可能性が考えられた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① ケモカイン受容体の協働作用により効率的なリンパ球移動が誘導される
小林大地、宮坂 昌之、早坂 晴子. 生体の科学 (印刷中)
- ② Bai Z, Cai L, Umemoto E, Takeda A, Tohya K, Komai Y, Veeraveedu PT, Hata E, Sugiura Y, Kubo A, Suematsu M, Hayasaka H, Okudaira S, Aoki J, Tanaka T, Albers HM, Ovaa H, Miyasaka M. (2013) *J. Immunol.* 190:2036-2048. Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the autotaxin/lysophosphatidic acid axis.
- ③ Umemoto E., Otani, K Ikeno, T., Verjan Garcia N, Hayasaka H., Bai, Z., Jang MH.,

Tanaka T., Ueda, K., Miyasaka, M.: Constitutive plasmacytoid dendritic cell migration to the splenic white pulp is cooperatively regulated by CCR7- and CXCR4-mediated signaling. (2012) *J. Immunol.* 189:191-199.

- ④ Umemoto, E., Hayasaka, H., Bai, Z., Cai, L., Yonekura, S., Peng, X., Takeda, A., Tohya, K., and Miyasaka, M. Novel regulators of lymphocyte trafficking across high endothelial venules. (2011) *Crit. Rev. Immunol.* 31, 147-169.
- ⑤ 早坂 晴子、岡田 麻里、白 忠彬、黒田 康嵩、吉田 淳一、宮坂 昌之 (2011) ケモカインによる白血球、癌細胞の生体内移動調節とケモカイン共働作用の関与 生化学 83, 930-937.
- ⑥ 早坂 晴子、宮坂 昌之 (2011) 癌の進展、転移に関与するリンフォイドケモカイン 実験医学 [増刊] . 29, 119-124.
- ⑦ 黒田 康嵩、宮坂 昌之、早坂 晴子 (2011) がんとリンフォイドケモカイン侵襲と免疫 20, 38-39.
- ⑧ Bai, Z., Cai, L., Umemoto E., Takeda A., Ikeno, T., Hata E., Hayasaka, H., Miyasaka, M. 「リンパ球トラフィッキングをつかさどる新しい分子機構- 生理活性脂質産生酵素オートタキシンとその産物リゾホスファチジン酸の役割」 (2011) 炎症と免疫別冊 第19巻、8-13.
- ⑨ Hayasaka, H., Taniguchi, K., Fukai, S. & Miyasaka, M. Neogenesis and development of the high endothelial venules that mediate lymphocyte trafficking. (2010) *Cancer Sci.* 101, 2302-2308.
- ⑩ Ogino, S., Nishida, N., Umemoto, R., Suzuki, M., Takeda, M., Terasawa, H., Kitayama, J., Matsumoto, M., Hayasaka, H., Miyasaka, M., and Shimada, I. Two-state conformations in the hyaluronan-binding domain regulate CD44 adhesiveness under flow condition. (2010) *Structure* 18, 649-656

[学会発表] (計5件)

- ① 早坂 晴子、吉村 洋美、白 忠彬、宮坂 昌之、ケモカインレセプターの準安定状態と細胞動態、蛋白質科学会 2012. 6.16、札幌
- ② Hayasaka H., Yoshimura H., Nakayama E.E., Shioda T., Bai Z., Miyasaka M. The effects of HIV-1 gp120 on CCR7 ligand-induced human CD4 T cell migration The 14th international congress of immunology. 2.10. 2010, Kobe
- ③ Haruko Hayasaka, Shoko Fukai, Masayuki Miyasaka. A transcription factor preferentially expressed in the high

endothelial venule endothelial cells of the perinatal mouse lymph nodes

日本免疫学会 11. 29. 2011、幕張メッセ

- ④ Hayasaka H., Yoshimura H., Kobayashi D., Nakayama E.E., Shioda T., Bai Z., Miyasaka M. The HIV-1 gp120/CXCR4 interaction promotes CCR7-dependent CD4 T cell trafficking into lymph nodes. The Keystone Symposia. 1.13. 2012, Cololado, USA
- ⑤ 早坂 晴子、島津 徳人、青葉 孝昭、宮坂 昌之 乳癌リンパ節転移におけるケモカイン受容体CXCR4およびCCR7の協働作用 日本癌学会 9. 21. 2012、札幌

[その他]
ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/orgct/www/index-jp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早坂 晴子 (HAYASAKA HARUKO)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70379246

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：