

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590252

研究課題名(和文) オートタキシン/リゾホスファチジン酸による免疫細胞トラフィッキング制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of lymphocyte trafficking by the autotaxin/LPA axis

研究代表者

梅本 英司 (Umemoto, Eiji)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90452440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：血中のリンパ球は高内皮細静脈(HEV)という特殊な細静脈を介してリンパ節実質に移動する。リンパ節実質ではリンパ球が効率よく運動することで免疫反応がおこるが、リンパ球の運動性制御因子には不明な点が多い。

オートタキシン(ATX)はリゾリン脂質のひとつリゾホスファチジン酸(LPA)を産生する分泌型酵素である。われわれは、リンパ節のHEV血管内皮細胞およびFRCがATXを選択的に発現し、ATXの最終産物であるLPAがリンパ球のHEVにおける血管外移動および実質内での細胞移動という一連の動きを制御する重要な生理活性因子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Blood-borne naive lymphocytes continually migrate into lymph nodes (LNs) via specialized venules called high endothelial venules (HEVs). Once entering LNs, they actively migrate along the fibroblastic reticular cell (FRC) network scanning for cognate antigens. However, a cell-extrinsic factor regulating lymphocyte migration remains poorly understood.

Autotaxin (ATX) is a secretory enzyme that produces lysophosphatidic acid (LPA), a bioactive lysophospholipid. In this study, we found that HEV endothelial cells and FRCs selectively express ATX and that ATX's end-product LPA promotes lymphocyte migration across HEVs as well as their interstitial migration in LNs. Thus, the ATX/LPA axis critically regulates multiple processes of lymphocyte migration into/within LNs.

研究分野：免疫生物学

キーワード：リゾリン脂質 リゾホスファチジン酸 リンパ球トラフィッキング リンパ節 繊維芽様細胞

1. 研究開始当初の背景

リンパ球は体内を繰り返し循環することで免疫監視を行うが、とりわけリンパ球の血中からリンパ節への移動は高内皮細静脈 (high endothelial venule; HEV) とよばれる特殊な細静脈が媒介する。リンパ球と HEV の相互作用は、リンパ球の「ローリング」「強固な結合」「血管外移動」など連続した異なる過程により制御されるが、なかでもリンパ球の「血管外移動」を制御する構造的基盤および分子機構については殆ど不明であった。

オートタキシン (ATX) はリゾホスファチジルコリンをリゾホスファチジン酸 (LPA) に加水分解する細胞外分泌型リゾホスホリパーゼである。最終産物のリゾリン脂質 LPA は受容体に結合することで細胞遊走や増殖など多彩な生理活性を有する。われわれはそれまで HEV の血管内皮細胞が ATX を高発現することを報告してきた (Nakasaki et al. Am. J. Pathol. 2008)。一方、アメリカのグループは ATX がリンパ球のリンパ節への移行を促進することを報告したが、その分子機構は不明であった (Kanda et al. Nat. Immunol. 2008)。このような状況の中、われわれは LPA が HEV の血管内皮細胞に作用してその細胞形態を変化させることを見出していた。すなわち、LPA はこれまで比較的、静的と考えられていた HEV 血管内皮細胞において細胞形態変化を誘導することで、HEV におけるリンパ球移動を制御する可能性が考えられた。

また、ATX/LPA がリンパ節内部におけるリンパ球動態に果たす役割についても全く不明であった。

2. 研究の目的

(1) ATX/LPA が HEV におけるリンパ球移動を制御するメカニズムを明らかにする。特に、ATX/LPA がリンパ球と HEV の相互作用のどの過程を制御するかを解明し、ATX/LPA が HEV の血管内皮細胞に作用する際の細胞内シグナルを明らかにする。

(2) ATX/LPA がリンパ節内部におけるリンパ球動態を制御する可能性およびその作用機序を解明する。特に、リンパ節における ATX 発現細胞を詳細に解析し、ATX/LPA がリンパ球上の特定の LPA 受容体に作用してリンパ球動態を制御するか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 生体二光子顕微鏡によるリンパ節におけるリンパ球動態の解析

二光子顕微鏡を用いることで組織深部の蛍光シグナルを低侵襲で検出できる。そこで、ATX/LPA 阻害剤を投与したマウスおよび遺伝子改変マウスのリンパ節におけるリンパ球の運動性を、生体二光子顕微鏡を用いて解析した。

(2) イメージング MS によるリンパ節における LPA の局在解析

イメージング MS は組織切片において一定の間隔でレーザーを照射することで、各点における MS データを取得し、切片全体における特定分子の局在を把握する手法である。われわれは野生型および遺伝子改変マウスのリンパ節における LPA 分子種の局在を、イメージング MS を用いて解析した。

(3) 単離 HEV 血管内皮細胞とリンパ球の相互作用のリアルタイム解析

われわれはこれまでにマウスリンパ節から HEV 血管内皮細胞を効率よく単離する方法を開発してきた。単離 HEV 血管内皮細胞を用いて、ATX/LPA が HEV 血管内皮細胞とリンパ球の相互作用に果たす役割をリアルタイムで解析した。

(4) 3次元におけるリンパ球の動態解析

リンパ球を混合したコラーゲンゲルを作成し、3次元におけるリンパ球の運動性を顕微鏡下でタイムラプス解析した。

4. 研究成果

(1) ATX は HEV において LPA を産生する

抗 ATX 抗体を用いた組織解析より、ATX は HEV に高発現することが明らかになった。LPA が HEV において産生されるか検討するために、イメージング MS 解析を行ったところ、LPA 分子種の中でも LPA (18:1)、LPA (18:2)、LPA (20:4) など特定の分子種が HEV 近傍で認められた。特に LPA (18:2) および LPA (20:4) は *in vitro* の実験系でマウスの ATX が高産生することが報告されている分子種であり、生理活性を有する。したがって、ATX はリンパ節 HEV に高発現し、局所で生理活性をもつ LPA を産生すると考えられた。

(2) ATX は HEV においてリンパ球の血管外移動を促進する

ATX 遺伝子欠損マウスは胎生致死であるため、リンパ球トラフィキングの評価に用いることはできない。そこで、われわれは ATX および LPA 受容体の両者に対して阻害作用を有するとされる BrP-LPA をマウス足蹠に投与したところ、所属リンパ節におけるリンパ球トラフィキングが顕著に抑制された。次に、ATX/LPA がリンパ球トラフィキングのどの過程を制御するか検討するため、二光子顕微鏡解析を行った。その結果、BrP-LPA 投与群ではリンパ球のローリングや接着には有意差が認められなかったが、リンパ球の血管外移動が顕著に抑制された。このとき、LPA₁ および LPA₃ のアンタゴニストである Ki16425 の投与はリンパ球血管外遊走に影響を与えなかった (図 1)。電子顕微鏡解析を行ったところ、BrP-LPA 投与群および別の ATX 阻害剤 HA130 投与群では、血管内および血管内皮細胞と基底膜の間に顕著なリンパ球貯留が認

められた。また、このリンパ球貯留に伴い、HEV は肥大化し、管腔の狭窄が見られた。以上より、ATX/LPA は、リンパ球が HEV の基底膜を通過する過程を制御すると考えられた。

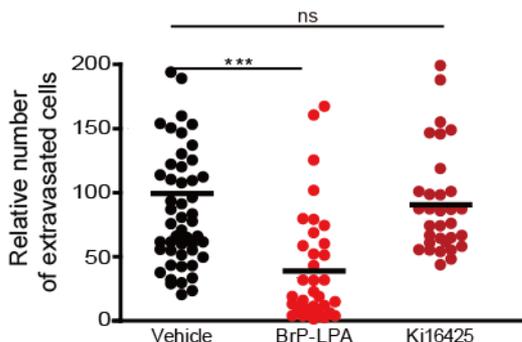


図 1. ATX/LPA は HEV におけるリンパ球の血管外移動を制御する。

次に、われわれは単離した HEV 血管内皮細胞を用いて、ATX 阻害剤存在下におけるリンパ球と HEV 血管内皮細胞の相互作用をリアルタイムで観察した。その結果、まず、阻害剤の非存在下では、リンパ球は活発に内皮細胞の下面を動き回り、時々、内皮細胞から離脱したり、新たに内皮細胞の下面に潜り込んだりすることが観察された。HA130 を添加すると、リンパ球は HEV 血管内皮細胞の下面に閉じ込められ、離脱できなくなった。一方、LPA 添加により、この阻害効果は解除され、再びリンパ球は内皮細胞の下面への出入りを繰り返すようになった。

HEV 血管内皮細胞にはこれまでに同定されている LPA 受容体 LPA₁-LPA₆ のうち、LPA 受容体 LPA₄ および LPA₆ が発現する。これらの LPA 受容体は RhoA - ROCK - myosin II 経路を介してシグナル伝達することから、myosin II の特異的阻害剤 blebbistatin により HEV 血管内皮細胞を前処理したところ、リンパ球は HEV 血管内皮細胞下面から離脱できなくなった。さらに、blebbistatin は HEV 血管内皮細胞の ruffle 膜形成も阻害した。以上より、ATX は LPA を介して、HEV 血管内皮細胞の運動性を制御するとともに、HEV 血管内皮細胞からのリンパ球の離脱を促進すると考えられた。

(3) リンパ節の線維芽様細胞 (FRC) 由来 ATX はリンパ節実質における T 細胞動態を制御する

われわれは HEV 血管内皮細胞だけでなく、リンパ節の他のストローマ細胞サブセットで ATX が発現しているか定量 PCR により解析した。その結果、ATX は GP38⁺ CD31⁻ の線維芽様細胞 (fibroblastic reticular cell; FRC) でも高発現することが明らかになった。そこで、FRC 特異的に ATX を欠損するマウ

ス (CCL19-Cre ATX^{fl/fl}) のリンパ節における LPA の局在をイメージング MS で解析したところ、CCL19-Cre ATX^{fl/fl} マウスのリンパ節では、コントロールマウスに比べて LPA (18:1)、LPA (18:2) および LPA (20:4) の LPA 分子種の発現がリンパ節実質で有意に減少したが、HEV 近傍の LPA の局在に変化は認められなかった。すなわち、リンパ節実質における LPA の産生は FRC 由来の ATX に大きく依存すると考えられた。

次に、われわれは CCL19-Cre ATX^{fl/fl} マウスのリンパ節実質における T 細胞の運動性を生体二光子顕微鏡で解析した。その結果、CCL19-Cre ATX^{fl/fl} マウスではコントロール群と比較して、リンパ節実質における T 細胞の運動性および速度の低下が認められた。したがって、FRC 由来の ATX は LPA を産生することで、リンパ節実質における T 細胞の運動性を制御すると考えられた。

(4) T 細胞上の LPA 受容体 LPA₂ を介したシグナルがリンパ節内部の T 細胞運動性を促進する

次に、われわれは FRC が産生する LPA がリンパ球上の特定の LPA 受容体に結合し、リンパ球の運動性を制御する可能性を検討した。定量 PCR 解析の結果、T 細胞は LPA 受容体のうち、LPA₂、LPA₅ および LPA₆ を発現していた。

そこで、これら LPA 受容体欠損マウスのリンパ球を静脈投与し、リンパ節に移入したリンパ球数を解析したところ、LPA₅ および LPA₆ 欠損 T 細胞はリンパ節への移入に変化は認められなかったが、LPA₂ 欠損 T 細胞は野生型の細胞と比較して、リンパ節に移入した細胞数が増加した。このとき、投与した LPA₂ 欠損 T 細胞の多くは HEV の近傍に局在したことから、LPA₂ 欠損 T 細胞はリンパ節に貯留しやすいと考えられた。

二光子顕微鏡でリンパ節における LPA₂ 欠損 T 細胞の動態を解析したところ、LPA₂ 欠損 T 細胞は野生型リンパ球に比べて、リンパ節での運動性の低下が認められた (図 2)。さらに、CCL19-Cre ATX^{fl/fl} マウスのリンパ節では LPA₂ 欠損 T 細胞の更なる運動性低下は認められなかった。以上より、T 細胞上の LPA₂ シグナルはリンパ節実質における T 細胞の運動性を促進し、この運動性の亢進には FRC 由来の LPA が必要であることが明らかとなった。

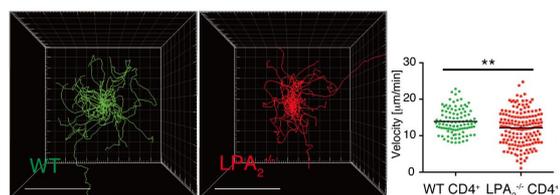


図 2. LPA₂ 欠損マウスのリンパ球はリンパ節実質における運動性が低下する。

(5) LPA₂ シグナルは狭い間隙におけるリンパ球の運動性を促進する

われわれは次に、LPA₂ シグナルによる T 細胞の運動性亢進の作用機序を解析した。これまでに LPA はリンパ球の chemokinesis を誘導することが報告されている (Kanda et al. Nat. Immunol. 2008)。

リンパ節は FRC やリンパ球など数多くの細胞から成る稠密な組織であることから、われわれは LPA₂ を介したシグナルが狭い間隙における 3 次元のリンパ球運動性を制御するという仮説を立てた。まず、Transwell を用いて LPA 添加時の細胞移動を解析したところ、LPA は直径 5 μm の間隙を有する Transwell のフィルターではリンパ球の運動性を変化させなかったが、直径 3 μm の間隙を有するフィルターでは、リンパ球の移動を亢進させた。このリンパ球移動の亢進は ROCK の阻害剤 Y27632 で抑制され、また LPA₂ 欠損リンパ球では認められなかった。

さらに、コラーゲンゲルを用いて 3 次元のリンパ球動態を解析したところ、LPA は LPA₂ シグナル依存的に 3 次元ゲルにおけるリンパ球の運動性を亢進させた(図 3)。したがって、LPA/LPA₂ は 3 次元におけるリンパ球の運動性を Rho-ROCK 経路依存的に促進することが明らかになった。

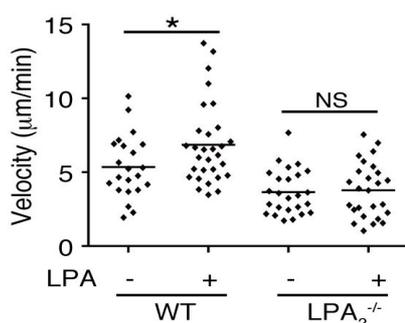


図 3. LPA は LPA₂ シグナル依存的に 3 次元ゲルにおけるリンパ球運動性を亢進させる。

以上の結果より、LPA はリンパ節の HEV 血管内皮細胞および FRC が産生する ATX により生み出され、リンパ球の HEV における血管外移動および実質内での細胞移動という一連の動きを制御する重要な生理活性脂質であると考えられた。

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 9 件)

Rantakari P, Auvinen K, Jäppinen N, Kapraali M, Valtonen J, Karikoski M, Gerke H, Iftakhar-E-Khuda I, Keuschnigg J, Miyasaka M, Tohya K,

Miyasaka M, Elima K, Jalkanen S, Salmi M. The endothelial protein PLVAP in lymphatics controls the entry of lymphocytes and antigens into lymph nodes. Nat Immunol. 査読有 16:386-96. 2015

Tsai SH, Kinoshita M, Kusu T, Kayama H, Okumura R, Ikeda K, Shimada Y, Takeda A, Yoshikawa S, Obata-Ninomiya K, Kurashima Y, Sato S, Umemoto E, Kiyono H, Karasuyama H, Takeda K.

The ectoenzyme E-NPP3 negatively regulates ATP-dependent chronic allergic responses by basophils and mast cells. Immunity 査読有 42:279-293. 2015

Totsuka N, Kim YG, Kanemaru K, Niizuma K, Umemoto E, Nagai K, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Honda S, Miyasaka M, Shibuya K, Shibuya A.

Toll-like receptor 4 and MAIR-II/CLM-4/LMIR2 immunoreceptor regulate VLA-4-mediated inflammatory monocyte migration. Nat Commun. 査読有 5:4710. 2014

Masahata K, Umemoto E, Kayama H, Kotani M, Nakamura S, Kurakawa T, Kikuta J, Gotoh K, Motooka D, Sato S, Higuchi T, Baba Y, Kurosaki T, Kinoshita M, Shimada Y, Kimura T, Okumura R, Takeda A, Tajima M, Yoshie O, Fukuzawa M, Kiyono H, Fagarasan S, Iida T, Ishii M, Takeda K.

Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. Nat Commun. 査読有 5:3704. 2014

Umemoto E, Takeda A, Jin S, Luo Z, Nakahogi N, Hayasaka H, Lee CM, Tanaka T, Miyasaka M. Dynamic changes in endothelial cell adhesion molecule nepmucin/CD300LG expression under physiological and pathological conditions. PLoS One. 査読有 8:e83681. 2013

Watanabe TM, Fujii F, Jin T, Umemoto E, Miyasaka M, Fujita H, Yanagida T.

Four-dimensional spatial nanometry of single particles in living cells using polarized quantum rods. Biophys J. 査読有 105:555-564. 2013

Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, Matsuura Y, Yamamoto M, Takeda K.

Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. J Virol. 査読有 87:9997-10003 2013

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.# (*equally contribution, #equally corresponding)

Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the autotaxin/lysophosphatidic acid axis.

J Immunol. 査読有 190:2036-2048. 2013

Umemoto E*, Otani K*, Ikeno T, Verjan Garcia N, Hayasaka H, Bai Z, Jang MH, Tanaka T, Nagasawa T, Ueda K, Miyasaka M. (*equally contribution)

Constitutive plasmacytoid dendritic cell migration to the splenic white pulp is cooperatively regulated by CCR7- and CXCR4-mediated signaling.

J Immunol. 査読有 189:191-199. 2012

【学会発表】(計 8 件)

Eiji Umemoto, Kayama Hisako, Junichi Kikuta, Ryu Okumura, Akira Takeda, Masaru Ishii, Kiyoshi Takeda

The cecal patch is a major site for generation of colonic IgA-secreting cells.

第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 10-12 日 京都

Erina Hata, Naoko Sasaki, Akira Takeda, Eiji Umemoto, Haruko Hayasaka, Masayuki Miyasaka

The role of LPA4/6 receptors in lymphocyte trafficking across high endothelial venules of lymph nodes

第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 10-12 日 京都

Szandor Simmons, Eiji Umemoto, Shigetomo Fukuhara, Yusuke Kitazawa, Michiyo Okudaira, Asuka Inoue, Shota Nakamura, Tetsuya Iida, Junken Aoki, Kenjiro Matsuno, Masayuki Miyasaka, Kiyoshi Takeda, Masaru Ishii

Lymphocytes caught before the act - how Spinster-homologue-2 (Spns2) controls S1P-driven lymphocyte egress from lymphoid organs

第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 10-12 日 京都

Ryu Okumura, Eiji Umemoto, Hisako Kayama, Makoto Kinoshita, Kiyoshi Takeda

Lypd8 maintains gut homeostasis by preventing pathobiont attachment to the colonic epithelia

第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 10-12 日 京都

梅本英司: 脾臓におけるケモカインの発現と白血球動態

第 119 回日本解剖学会学術集会 2014 年 3 月 29 日 宇都宮

Akira Takeda, Eiji Umemoto, Erina Hata, Naoko Sasaki, Masayuki Miyasaka

The role of LPA receptors on lymphocytes in lymphocyte trafficking across high endothelial venules of lymph nodes

第 43 回日本免疫学会学術集会 2013 年 12 月 11-13 日 千葉

梅本英司: オートタキシン/リゾホスファチジン酸は、リンパ節高内皮細静脈の基底膜におけるリンパ球の通過を制御する

第 37 回日本リンパ学会学術集会 2013 年 6 月 15 日 福岡

Akira Takeda, Eiji Umemoto, Erina Hata, Masayuki Miyasaka

Autotaxin-derived lysophosphatidic acid acts on high endothelial cells to promote lymphocyte-endothelial cell interactions

第 42 回日本免疫学会学術集会 2012 年 12 月 5-7 日 神戸

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・准教授

研究者番号：9 0 4 5 2 4 4 0

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

杉浦 悠毅 (Sugiura Yuki)

慶応義塾大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：3 0 5 9 0 2 0 2

東家 一雄 (Tohya Kazuo)

関西医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：9 0 1 8 3 4 9 1

宮坂 昌之 (Miyasaka Masayuki)

大阪大学・未来戦略機構・特任教授

研究者番号：5 0 0 6 4 6 1 3