

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791160

研究課題名(和文) ヒトリンパ管内皮細胞におけるLYVE-1 sheddingの誘導

研究課題名(英文) Induction of LYVE-1 shedding in cultured human lymphatic endothelial cells

研究代表者

岡崎 秀規 (Okazaki, Hidenori)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90622382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：アルカリフォスファターゼ融合LYVE-1アデノウイルスをもちいたAP-assayによる評価を行い、培養ヒトリンパ管内皮細胞においてLYVE-1 sheddingが誘導されることを確認した。この実験系においてIL-1の刺激により培養液内のAP活性は増加しており、IL-1によるLYVE-1 sheddingの誘導が確認された。そのシグナル経路においてはMAPKsが重要であり、切断を誘導している酵素としてADAMが働いている事を示した。

研究成果の概要(英文)：We detected LYVE-1 cleavage quantified by generating a fusion protein conjugating alkaline phosphatase (AP) to the N-terminal region of LYVE-1. This fusion protein was expressed in LECs by using an adenovirus vector. After IL-1Beta stimulation, AP activity was detected in the culture supernatant, indicating that LYVE-1 was shed into the supernatant. Furthermore, we elucidated IL-1Beta sheds LYVE-1 in LECs via the activation of MAPKs and ADAMs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：リンパ管内皮細胞 ectodomain shedding 型膜タンパク LYVE-1

## 1. 研究開始当初の背景

LYVE-1 はヒアルロン酸受容体である CD44 と相同性を示す cDNA として発見されたリンパ管内皮細胞に発現する 1 型膜タンパクである。LYVE-1 や CD44 にはヒアルロン酸受容体として働く細胞外領域があり、この領域が結合するヒアルロン酸は細胞外領域を構築する成分である。CD44 は細胞膜表面に存在し、マトリックスメタロプロテアーゼ活性化によって細胞膜貫通領域直上にて切断を受け、細胞外領域と細胞内領域分子に分離される。このイベントは ectodomain shedding と呼ばれており、CD44 shedding は細胞移動や癌細胞の浸潤・転移に関与すると報告されている。CD44 は血管内皮を含む様々な細胞に発現しているが、リンパ管には存在しない。毛細リンパ管内皮に存在するのは LYVE-1 であるが、LYVE-1 において ectodomain shedding が起こるかどうかについては報告がない。接触皮膚炎などの炎症が起きた皮膚を用いた免疫組織染色では、しばしばリンパ管における LYVE-1 の染色性が減弱する。さらに培養ヒトリンパ管内皮細胞を用いた検討において TNF- $\alpha$  の添加により細胞表面の LYVE-1 染色性の減弱化を認める事が報告されている。これらの事象は炎症時には炎症性サイトカインによる LYVE-1 の消化、すなわち ectodomain shedding が起こっている可能性を示唆する。IL-1 $\beta$  は炎症誘発性のサイトカインであり、IL-1 受容体は血管、リンパ管内皮細胞を含む様々な細胞で発現している。しかし、リンパ管内皮細胞が IL-1 $\beta$  により何らかの刺激を受けている可能性についてはこれまで検討がなされていない。これらの知見に基づいて、IL-1 $\beta$  によって培養ヒトリンパ管内皮細胞における LYVE-1 shedding が誘導されうるかについての検討を行った。

## 2. 研究の目的

培養ヒトリンパ管内皮細胞 (LEC) において

LYVE-1 shedding が誘導されうるのか、さらに IL-1 $\beta$  の添加により ectodomain shedding が誘導されうるかの検討を行い、さらに shedding が誘導される際のシグナル経路の検討を行う。

## 3. 研究の方法

LEC においては LYVE-1 の発現が減弱し、蛋白レベルでの評価が困難である。そのためアデノウイルスベクターを用いて LEC に LYVE-1 を過剰発現させ、この外因性 LYVE-1 を用いて検討を行なう。さらに ectodomain shedding の定量を行なうために AP-assay を用いて検討を行う。次に IL-1 $\beta$  による LYVE-1 shedding のシグナル伝達経路を各々の段階に特異的な阻害剤、中和抗体を用いて検討する。さらに shedding において切断酵素として働くマトリックスメタロプロテアーゼである a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) を抑制し、shedding への影響を検討する。

### (1) アデノウイルスの作成

アルカリフォスファターゼ (AP) 融合 LYVE-1 cDNA (AP-LYVE-1 cDNA) の作製には AP-tag HB-EGF-pME18S を用いた。これに LYVE-1 cDNA を挿入し、LYVE-1 及び、AP-LYVE-1 を組み込んだアデノウイルスの作製を行なった。これらのアデノウイルスは MOI 100 にて LEC に感染させた。

### (2) LYVE-1 shedding 誘導の検討

アデノウイルスベクターを用いて LYVE-1 を LEC に過剰発現させ、TPA、IL-1 $\beta$  をもちいて LYVE-1 shedding をウエスタンブロット法で検出した。また、AP 融合 LYVE-1 も同様に過剰発現させ IL-1 $\beta$  添加による AP 遊離を検討した。IL-1 $\beta$  の添加により切断が誘導された場合、培養液中に AP が遊離してくるためこれを測定し、ectodomain shedding を定量した (AP-assay)。

### (3) IL-1 $\beta$ による LYVE-1 shedding のシグナル

#### 伝達経路の検討

IL-1R1阻害剤、MAP KinaseであるJNK、p38、ERKの各阻害剤、ADAMs阻害剤(KB-R7785)を添加することによりIL-1 $\beta$ によるLYVE-1 sheddingが解除されるかどうかについてAP-assayをもちいて検討した。

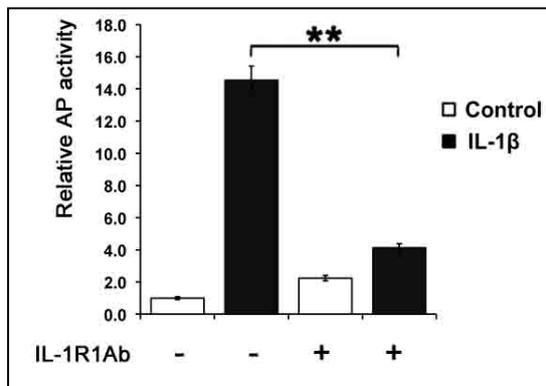
#### (4)ADAMsのノックダウンによるshedding誘導抑制の検討

CD44のsheddingにADAM10、ADAM17が切断酵素として働いていることが過去に報告されている。ADAM10、ADAM17がLYVE-1の切断に関与しているのかについて検討した。各ADAMsのsiRNAによりノックダウンを行ったLECをもちいてAP-assayを行った。

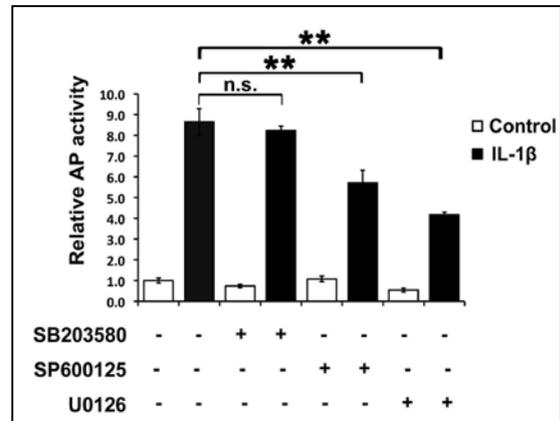
#### 4. 研究成果

#### (1)IL-1 $\beta$ によるLYVE-1 sheddingのシグナル伝達経路の検討

LECにLYVE-1を過剰発現し、TPA (shedding inducer)を添加するとLYVE-1全長にあたる約70kDaのバンドに加え、切断され短くなった17kDaのバンドが検出された。IL-1 $\beta$ の添加でも同様のバンドが認められsheddingの誘導が確認された。AP-assayを用いた検討ではIL-1 $\beta$ の刺激により、AP活性はコントロールと比較して14倍に増加し、LYVE-1 sheddingの誘導が確認された。この変化はIL-1R1阻害剤の添加により有意に抑制された。

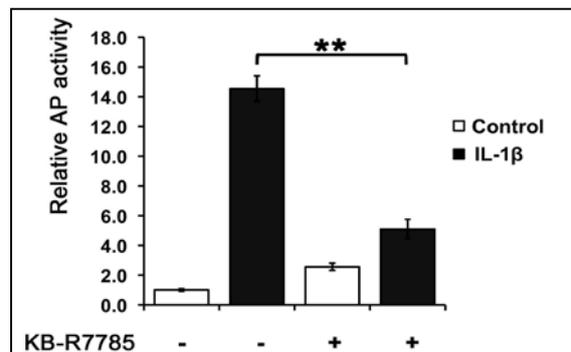


また、シグナル下流の分子であるMAP Kinase (JNK、p38、ERK)の各阻害剤を添加することによっても有意に活性が抑制された。



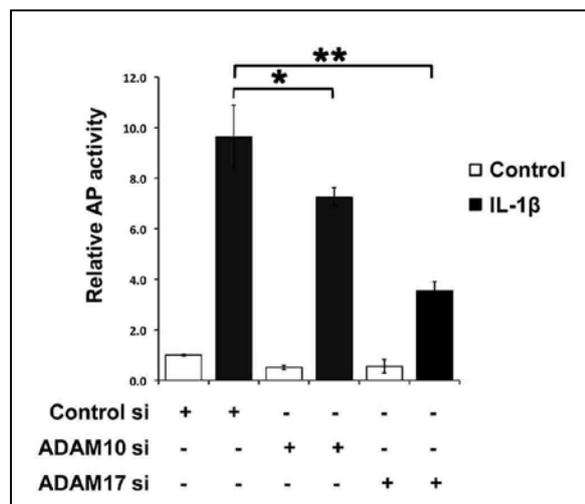
#### 2. ADAMsのノックダウンによるshedding誘導抑制の検討

CD44 sheddingにおける切断酵素であるADAM10、ADAM17が、LYVE-1 sheddingに関与しているのかについて検討をおこなった。ADAMsの阻害剤(KB-R7785)を添加することによりIL-1 $\beta$ によるLYVE-1 sheddingは有意に抑制された。



次にこれら酵素のsiRNAを用いたノックダウンを行った。siRNAを導入した48時間後のLECにおいてADAM10、ADAM17の前駆体型、活性型の発現が減少していることをWestern blot法にて確認後、AP-assayを行った。IL-1 $\beta$ 添加により遊離するAP活性は、ADAM10、ADAM17いずれのノックダウンでも抑制された。特にADAM17ノ

ックダウンにより大きく抑制されており、LYVE-1の切断にはADAM17がより大きく関与しているものと考えられた。以上より、LYVE-1のsheddingがIL-1 $\beta$ によ



り誘導される事が示された。また、そのシグナル経路においてはERK、JNKが重要であり、切断を誘導している酵素は主としてADAM17であり、ADAM10も働いている事が示された。

#### 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3件)

1. Dai X, Okazaki H, Hanakawa Y, Murakami M, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K. Eccrine sweat contains IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-31 and activates epidermal keratinocytes as a danger signal. PLoS One. 2013; 8:e67666. 査読有
2. Yang L, Hashimoto K, Tohyama M, Okazaki H, Dai X, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y. Interactions between myofibroblast differentiation and epidermogenesis in constructing human living skin equivalents. J Dermatol Sci. 2012; 65: 50-7. 査読有

3. Okazaki H, Hirakawa S, Shudou M, Nakaoka Y, Shirakata Y, Miyata K, Oike Y, Hashimoto K, Sayama K. Targeted overexpression of Angptl6/angiopoietin-related growth factor in the skin promotes angiogenesis and lymphatic vessel enlargement in response to ultraviolet B. J Dermatol. 2012; 39: 366-74. 査読有

[学会発表] (計3件)

1. Okazaki H, Autophagy is an innate immune system of epidermal keratinocytes. SID, North Carolina, May, 5-12, 2012
2. Dai X, Okazaki H, Intracellular dsRNA activates inflammasome in the keratinocytes resulting in the release of IL-18. SID, North Carolina, May, 5-12, 2012
3. Dai X, Okazaki H, Autophagy is induced by differentiation in epidermal keratinocytes. 42nd ESDR, Venice, Sep, 19-22, 2012

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等なし。

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 秀規 (Okazaki, Hidenori)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 90622382

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし