

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460268

研究課題名(和文) 血中から組織へのリンパ球移動を担う高内皮細静脈の形成調節シグナルの解明

研究課題名(英文) Analysis of the transcription factor crosstalk in high endothelial venule formation

研究代表者

早坂 晴子 (HAYASAKA, Haruko)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：70379246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：二次リンパ組織への選択的なリンパ球動員は、高内皮細静脈 (High endothelial venules: HEV) と呼ばれる特殊な血管で媒介される。これまでHEV形成の分子メカニズムは不明であったが、私たちの先行研究から、遺伝子XがHEV成熟が進む新生仔期においてHEV内皮細胞に選択的に発現することが明らかになった。遺伝子Xを欠損するマウスを解析したところ、HEV選択的に発現する接着分子の発現が低下していた。さらに遺伝子Xを恒常的に高発現するトランスジェニックマウスを作製したところ、HEV選択的に発現する接着分子発現上昇がみられた。

研究成果の概要(英文)：The high endothelial venules (HEVs) are specialized blood vessels that permit lymphocyte trafficking across their endothelial cells (ECs) and develop in a tissue-specific manner. We previously found that a transcription factor X is preferentially expressed in immature HEV-ECs of lymph nodes and Peyer's patches. We found that neonatal HEVs in the gene X -knockout (KO) mice express lower levels of HEV-EC marker proteins than wild type littermates. In contrast, postnatal HEVs in the gene X-transgenic mice showed an increase in HEV-EC marker proteins. These results support the hypothesis that the gene X contributes to HEV-EC differentiation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：血管内皮細胞

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。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。例えば、慢性炎症組織での HEV 形成増加は、慢性炎症巣にリンパ球浸潤をもたらし、病態の深刻化に關与する可能性がある。一方、加齢による HEV の減少はリンパ球トラフィッキング低下をもたらし、免疫反応低下につながる。もし二次リンパ組織や慢性炎症巣に HEV 形成を任意に調節することができれば、適切なリンパ球動員と免疫応答性の回復が期待できる。

2. 研究の目的

(1) 申請者は HEV 形成期における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。そこで同定された HEV 分化候補遺伝子の一つ (遺伝子 X) について HEV 形成における必要性、十分性を明らかにする。

(2) HEV 分化候補遺伝子の上流発現調節因子、下流転写ターゲットを明らかにする。遺伝子 X の発現調節に Nkx2.3 遺伝子が關与する可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子 X の血管特異的ノックアウトマウスを作製し、リンパ節 HEV の形態的解析、免疫組織学的解析、機能解析をおこない、HEV 内皮細胞分化における役割を明らかにする。また遺伝子 X をウイルス由来プロモーターの制御下で恒常的に発現させたトランスジェニックマウスを作製し、リンパ節における HEV の増加、HEV あるいはリンパ節様構造の異所的形成の有無などについて検討する。

(2) 抗 Nkx2.3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降、プロモーターレポーターアッセイをおこない、遺伝子 X プロモーターに Nkx2.3 タンパク質が結合し、負に調節する可能性を検討する。また、遺伝子 X の発現が、血管内皮細胞分化誘導にともなう HEV 関連遺伝子 (MAdCAM-1 などの接着分子、CCL21 などのケモカイン、糖転移酵素など) 発現を促進する可能性を検討し、転写ターゲット遺伝子を同定する。申請者はこれまでに、胚性幹細胞 (ES 細胞) から血管内皮前駆細胞を誘導する過程で任意の遺伝子発現を誘導する実験系を立ち上げた。この系を利用し、HEV 分化候補遺伝子の発現有無の条件下で、遺伝子発現プロファイリングを行う。

4. 研究成果

遺伝子 X を欠損させたマウスリンパ節の免疫組織学的解析を行った。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。遺伝子 X が HEV 関連遺伝子の発現誘導を直接媒介する可能性を検討するため、遺伝子 X 遺伝子を ES 細胞由来血管内皮細胞で高発現させ定量的 PCR 解析を行ったところ、リンパ節形成に關与するシグナルも同時に活性化させた場合に、HEV 関連遺伝子の発現誘導が見られた。このことから、遺伝子 X 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關与する可能性が考えられた。また遺伝子 X を恒常的に発現する遺伝子改変マウスの組織と野生型とを比較したところ、遺伝子改変の方が形態的に HEV とみられる血管構造が多く存在し、HEV 関連遺伝子の発現が高い傾向がみられた。このことから遺伝子 X が HEV 形成と HEV 関連遺伝子の発現に關与する

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7件)

Takeda A, Kobayashi D, Aoi K, Sasaki N, Sugiura Y, Igarashi H, Tohya K, Inoue A, Hata E, Akahoshi N, Hayasaka H, Kikuta J, Scandella E, Ludewig B, Ishii S, Aoki J, Suematsu M, Ishii M, Takeda K, Jalkanen S, Miyasaka M, Umemoto E. Fibroblastic reticular cell-derived lysophosphatidic acid regulates confined intranodal T-cell motility. *eLife* 査読有、2016、DOI: 10.7554/eLife.10561

Hata E, Sasaki N, Takeda A, Tohya K, Umemoto E, Akahoshi N, Ishii S, Bando K, Abe T, Kano K, Aoki J, Hayasaka H, Miyasaka M. Lysophosphatidic acid receptors LPA4 and LPA6 differentially promote lymphocyte transmigration across high endothelial venules in lymph nodes. *Int Immunol.* 査読有、2015、In press.

Kellermayer Z, Hayasaka H, Kajtár B, Simon D, Robles EF, Martinez-Climent JA, Balogh P. Divergence of vascular specification in visceral lymphoid organs - genetic determinants and differentiation checkpoints. *Int. Rev. Immunol.* 査読有、2015、In press.
Hayasaka H, Kobayashi D, Yoshimura H, Nakayama EE, Shioda T, Miyasaka M. The HIV-1 gp120/CXCR4 axis promotes CCR7 ligand-dependent CD4 T cell migration: CCR7 homo- and CCR7/CXCR4 hetero-oligomer formation as a possible mechanism for up-regulation of functional CCR7. *PLoS ONE* 査読有、2015、DOI:10.1371/journal.pone.0117454

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

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, HMMG., Ovaa, H., Miyasaka, M. Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the autotaxin/lysophosphatidic acid axis. *J. Immunol.*, 査読有、2013、190: 2036-2048.

FAK-related nonkinase is a multifunctional negative regulator of pulmonary fibrosis. Ding, Q., Cai, G-Q., Hu, M., Yang, Y., Zheng, A., Tang, Q., Gladson, CL., Hayasaka, H., Wu, H., You, Z., Southern, BD., Grove, LM., Rahaman, SO., Fang, H., Olman, MA. *Am. J. Pathol.*, 査読有、2013、182: 1572-1584.

〔学会発表〕(計6件)

Haruko Hayasaka, Péter Balogh, Masayuki Miyasaka, A possible role of Dach1 transcription factor in high endothelial venule development 2015年11月19日 札幌コンベンションセンター (札幌市)、日本免疫学会

Daichi Kobayashi, Masayuki Miyasaka, Haruko Hayasaka. CCR7 homo-oligomerization regulates CCR7 ligand dependent cell migration 2015年12月2日 神戸国際会議場 (神戸市)、日本分子生物学会

早坂 晴子、小林 大地、吉村 洋美、中山 英美、塩田 達雄、宮坂 昌之 HIV-1 gp120/CXCR4 シグナルが誘導す

る CCR7 受容体多量体化と CCR7 リガン
ド依存的 CD4 T 細胞遊走の亢進 2014
年 12 月 4 日、大阪国際会議場(大阪市)
日本エイズ学会

Haruko Hayasaka, Masayuki Miyasaka 癌
リンパ節転移研究における毛細リンパ
管モデルの利用、2014 年 12 月 9 日、大
阪大学中之島センター(大阪市)三次元
生体組織構築シンポジウム

Haruko Hayasaka, Daichi Kobayashi,
Masayuki Miyasaka, Chemokine receptor
oligomerization: a potential mechanism
for regulating lymphocyte and cancer cell
migration. 2013 年 10 月 29 日 国立京都
国際会館(京都市)日本生物物理学会

Haruko Hayasaka, Daichi Kobayashi,
Masayuki Miyasaka, CXCR4 ligands
promote CCR7-dependent CD4 T cell
migration -possible involvement of CCR7
oligomerization 2013 年 12 月 13 日 幕
張メッセ(千葉市)日本免疫学会

〔図書〕(計 1 件)

小林 大地, 宮坂 昌之, 早坂
晴子:ケモカイン受容体の協働作
用による効率的なリンパ球移動の
誘導 生体の科学、2013、64:
398-399. (医学書院)

〔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

<http://www.life.kindai.ac.jp/~hhayasaka/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

早坂 晴子(HAYASAKA, Haruko)
近畿大学・理工学部・准教授
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: