

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 24 年 4 月 5 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390023

研究課題名（和文） 高内皮細静脈特異的遺伝子改変マウスを用いたリンパ球ホーミングの分子機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanisms underlying lymphocyte homing using high endothelial venule-specific conditional knockout mice

研究代表者

川島 博人 (KAWASHIMA HIROTO)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：50260336

研究成果の概要（和文）：血流に乗って体内を循環するリンパ球は、高内皮細静脈(HEV)と呼ばれる特殊な血管からリンパ節実質に浸潤する。この浸潤過程において、ケモカインはリンパ球のインテグリンの活性化とそれに引き続いて起こるリンパ球の HEV への強固な接着に重要である。本研究では、新規 HEV 特異的コンディショナルノックアウトマウスを樹立し、ヘパラン硫酸が HEV 上にケモカインを捕捉しリンパ球に提示することによってこの浸潤過程を促進することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Circulating lymphocytes migrate into the parenchyma of lymph nodes through specialized blood vessels called high endothelial venules (HEVs). In this process, chemokines are important for the activation of lymphocyte integrins and the subsequent firm attachment of lymphocytes to HEVs. By generating novel HEV-specific conditional knockout mice, we demonstrate in this study that heparan sulfate sequesters chemokines on the surface of HEVs and presents them to lymphocytes to facilitate this migratory process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：リンパ球ホーミング、ヘパラン硫酸、ケモカイン、高内皮細静脈

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は、高内皮細静脈(HEV)特異的硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 ノックアウトマウスの作製を行い、リンパ球が HEV と接着する際に、*N*-アセチルグルコサミンの 6 位が硫酸化された硫酸化糖鎖が関与するこ

とを報告してきた (*J. Biol. Chem.* 279:3058-3067, 2004)。さらに、それに加えて硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-1 を欠損するダブルノックアウトマウスを作製し、二つの硫酸基転移酵素により合成される硫酸化糖鎖がリンパ球ホーミングおよび免疫応答に

において必須の役割を果たすことを証明した (*Nature Immunology* 6:1096-1104, 2005)。一連の研究で我々が樹立した GlcNAc6ST-2 の遺伝子座に EGFP 遺伝子を挿入したノックインマウスにおいては、EGFP の緑色蛍光はリンパ節 HEV 特異的に認められた。そこで我々は、この特異性に着目し、GlcNAc6ST-2 遺伝子発現調節領域を含む BAC (bacterial artificial chromosome) クローンに Cre リコンビナーゼ遺伝子を挿入した組み換え型 BAC クローンをを用いて、HEV 特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを新たに樹立した (*J. Immunol.* 182:5461-5468, 2009)。一方、海外共同研究者の山口らは、ヘパラン硫酸伸長酵素 EXT1 の flox マウスを樹立し、胎児期の脳神経系の発生におけるヘパラン硫酸の機能を解明している (*Science* 302:1044-1046, 2003)。本研究課題では、我々の作製した HEV 特異的 Cre 発現マウスを EXT1-flox マウスと掛け合わせることで HEV 特異的にヘパラン硫酸を欠損する遺伝子改変マウスを新たに樹立し、HEV におけるヘパラン硫酸の機能解析を行うことを目指す。これまでに、HEV 上においてヘパラン硫酸はケモカインをリンパ球に提示する働きをされると考えられてきたが、動物個体を用いた十分な証明はなされていない。本申請課題によりヘパラン硫酸の重要な生理機能の一端が解明されることが期待される。

2. 研究の目的

血流に乗って体内を循環するリンパ球は、HEV から特異的にリンパ節内に浸潤する。この浸潤過程においては、HEV 上のヘパラン硫酸に提示されたケモカインによるリンパ球の活性化が起こると考えられているが、上述の様にその十分な証明はなされていない。本研究課題では、ヘパラン硫酸を HEV 特異的に欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作製し、ヘパラン硫酸による細胞遊走因子ケモカインの HEV の内腔側での捕捉とリンパ球上のケモカインレセプターへの提示に果たす役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HEV 特異的ヘパラン硫酸欠損マウスの樹立

HEV 特異的 Cre 発現マウス (*J. Immunol.* 182:5461-5468, 2009) をヘパラン硫酸伸長酵

素 EXT1 (図 1 参照) をコードする遺伝子のエキソン 1 の両端が loxP サイトで挟まれた EXT1-flox マウス (*Science* 302:1044-1046, 2003) と交配することにより、HEV 特異的にヘパラン硫酸の発現を欠損する変異マウスを作製した。ヘパラン硫酸の発現が HEV で消失することの確認は、抗ヘパラン硫酸モノクローナル抗体 10E4 を用いた免疫組織染色により行った。

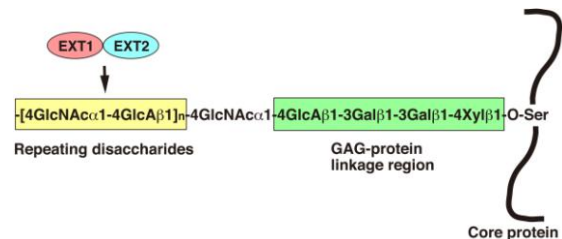


図 1 ヘパラン硫酸鎖の伸長
GlcNAc と GlcA の繰り返し構造は
EXT1/EXT2 ヘテロダイマーによ
り生成される。EXT1 を欠損す
るとヘパラン硫酸鎖は伸長しな
い。

(2) HEV 特異的ヘパラン硫酸欠損マウスにおけるリンパ球ホーミングの解析

野生型マウスより調製したリンパ球を蛍光物質 CMFDA で標識し、野生型マウスおよび HEV 特異的ヘパラン硫酸欠損マウスに静脈内注射した。1 時間後に末梢リンパ節、腸間膜リンパ節、パイエル板、脾臓を採取し、蛍光標識リンパ球の各二次リンパ組織へのホーミングをフローサイトメトリーにより解析した。

(3) HEV 特異的ヘパラン硫酸欠損マウスにおけるケモカインの提示

野生型マウスおよび HEV 特異的ヘパラン硫酸欠損マウスの末梢リンパ節凍結切片を用いて、抗ケモカイン抗体による免疫組織染色を行い、HEV におけるケモカインの局在を観察した。さらに、HEV においてケモカイン遺伝子の転写そのものは起こり、そのヘパラン硫酸による蛋白質レベルでの提示のみが影響を受けるか否かを明らかにするために、HEV を HEV 特異的モノクローナル抗体である MECA-79 抗体を用いた磁気分離法により分離精製した後に、定量的 RT-PCR 解析により HEV に発現するケモカイン mRNA 発現量の解析を行った。

4. 研究成果

(1) HEV 特異的へパラン硫酸欠損マウスの樹立

独自に樹立したHEV特異的にCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスをへパラン硫酸伸長酵素EXT1のfloxマウスと掛け合わせるにより組織特異的コンディショナルノックアウトマウスの作製を行った。抗へパラン硫酸鎖抗体を用いた免疫染色の結果、得られた変異マウスにおいては末梢リンパ節HEVにおけるへパラン硫酸の発現が欠損した。一方、その他の組織の血管や種々の組織の基底膜におけるへパラン硫酸の発現には変化は認められなかった。以上のことから、HEV特異的へパラン硫酸欠損マウスを樹立できたことが確認された。

(2) HEV 特異的へパラン硫酸欠損マウスにおけるリンパ球ホーミングの解析

蛍光物質 CMFDA で標識したリンパ球の末梢リンパ節、腸間膜リンパ節、パイエル板、脾臓へのホーミングを調べたところ、上記コンディショナルノックアウトマウスにおいては、HEV 上のへパラン硫酸の発現が欠損した末梢リンパ節へのリンパ球ホーミングが選択的に阻害されることが明らかとなった。

(3) HEV 特異的へパラン硫酸欠損マウスにおけるケモカインの提示

抗ケモカイン抗体を用いた免疫染色の結果、HEV 特異的へパラン硫酸欠損マウスでは末梢リンパ節の HEV におけるケモカイン CCL21 のタンパク質レベルでの発現量が大きく低下することがわかった。一方、精製した末梢リンパ節 HEV を用いた定量的 PCR 解析の結果、CCL21 の mRNA 発現量には変化は認められなかった。以上より、へパラン硫酸が HEV 上におけるケモカイン CCL21 タンパク質の提示に関与することが示された。

以上の結果より、末梢リンパ節 HEV においてへパラン硫酸はケモカイン SLC のリンパ球への提示を行い、リンパ球ホーミングを促進する働きを持つことが明らかとなった。

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. Ohmichi Y, Hirakawa J, Imai Y, Fukuda M,

and Kawashima H. Essential role of peripheral node addressin in lymphocyte homing to nasal-associated lymphoid tissues and allergic immune responses. *J. Exp. Med.*, 208:1015-1025, 2011. 査読有

[DOI:10.1084/jem.20101786](https://doi.org/10.1084/jem.20101786)

2. Hirose M, Matsumura R, Sato K, Murai T, and Kawashima H. Binding of L-selectin to its vascular and extravascular ligands is differentially regulated by pH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 414:437-442, 2011. 査読有

[DOI:10.1016/j.bbrc.2011.09.123](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.123)

3. Hirakawa J, Tsuboi K, Sato K, Kobayashi M, Watanabe S, Takakura A, Imai Y, Ito Y, Fukuda M, and Kawashima H. Novel anti-carbohydrate antibodies reveal the cooperative function of sulfated N- and O-glycans in lymphocyte homing. *J. Biol. Chem.*, 285:40864-40878, 2010. 査読有

[DOI: 10.1074/jbc.M110.167296](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167296)

4. Bao X, Moseman EA, Saito H, Petryanik B, Thiriot A, Hatakeyama S, Ito Y, Kawashima H, Yamaguchi Y, Lowe JB, von Andrian UH and Fukuda M. Endothelial Heparan Sulfate Controls Chemokine Presentation in Recruitment of Lymphocytes and Dendritic Cells to Lymph Nodes. *Immunity*, 33:817-829, 2010. 査読有

[DOI:10.1016/j.immuni.2010.10.018](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.018)

5. Tobisawa Y, Imai Y, Fukuda M, and Kawashima H. Sulfation of colonic mucins by N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase-2 and its protective function in experimental colitis in mice. *J. Biol. Chem.*, 285:6750-6760, 2010. 査読有

[DOI: 10.1074/jbc.M109.067082](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.067082)

6. Kawashima H. Two roles of mucin sulfation. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 22:211-225, 2010. 査読無

<http://www.jstage.jst.go.jp/article/tigg/22/127/22>

[211/ article](https://doi.org/10.1016/j.tigg.2010.10.018)

7. Kawashima H, Hirakawa J, Tobisawa Y, Fukuda M, and Saga Y. Conditional gene targeting in mouse high endothelial venules. *J. Immunol.*, 182:5461-5468, 2009. 査読有

[DOI:10.4049/jimmunol.0802327](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802327)

8. Hatakeyama S, Sugihara K, Nakayama J, Akama TO, Wong SM, Kawashima H, Zhang J, Smith DF, Ohyama C, Fukuda M, and Fukuda MN. Identification of mRNA splicing factors as

the endothelial receptor for carbohydrate-dependent lung colonization of cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106:3095-3100, 2009. 査読有

DOI:10.1073/pnas.0810110106

9. Murai T, and Kawashima H. Fluorescent probe for measurement of extracellular matrix degradation. *Proceedings of 2008 IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science*, pp.281-284 (2009) 査読無

10. 廣瀬まゆみ、村井稔幸、森田潤司、中川敦史、鈴木守、川島博人、西村公雄 大豆レクチンの結合性を利用した歯周病予防法の開発 大豆たん白質研究 Vol. 12, pp. 149-151 (2009) 査読無

http://www.fujioil.co.jp/daizu/report/pdf/030/30_26.pdf

11. 川島博人、木村文徳 新規ムチン型糖鎖分析技術の開発とIgA腎症早期発見への応用 薬学研究の進歩 (薬学研究奨励財団) Vol. 25, pp. 75-79 (2009) 査読無

[学会発表] (計 25 件)

1. 坪井康一郎、平川城太郎、關愛実子、今井康之、山口祐、福田穰、川島博人 リンパ球ホーミングにおける高内皮細静脈へパラン硫酸の機能解析 日本薬学会第132年会(札幌)、2012年3月29日

2. Ohmichi Y, Hirakawa J, Imai Y, Fukuda M, and Kawashima H. Essential role of peripheral node addressin in lymphocyte homing to nasal-associated lymphoid tissues and allergic immune responses. *Keystone Symposia-Chemokines and Leukocyte Trafficking in Homeostasis and Inflammation*, 2012.1.10, Breckenridge, Colorado, USA

3. Hirakawa J, Tsuboi K, Sato K, Imai Y, and Kawashima H. Novel Anti-carbohydrate Antibodies Reveal the Cooperative Function of Sulfated N- and O-Glycans in Lymphocyte Homing. 第40回日本免疫学会(千葉)、2011年11月29日

4. 坪井康一郎、高倉惇、今井康之、小松雅明、川島博人 大腸特異的 *Atg7* 欠損マウスにおけるデキストラン硫酸誘発性大腸炎の解析 第84回日本生化学会年会(京都)、2011年9月24日

5. 坪井康一郎、高倉惇、今井康之、小松雅明、川島博人 大腸特異的 *Atg7* 欠損マウスにお

けるデキストラン硫酸誘発性大腸炎の増悪化 第75回日本生化学会中部支部例会(静岡)、2011年5月28日

6. 廣瀬まゆみ、川島博人、村井稔幸、川上和之、源利成、岡田雅人、末次志郎、竹縄忠臣、中川敦史 各種 SH3 ドメインと N-WASP プロリンリッチ部位の相互作用の相違により N-WASP のアクチンフィラメント形成と細胞運動の相違が生じる 第63回日本細胞生物学会大会(北海道)、2011年6月27-29日

7. Hirose M, Kawashima H, Murai T, Kawakami K, Minamoto. Elevation of rat plasma P-selectin in acute lung injury. 日本分子生物学会・第11回春季シンポジウム、金沢国際がん生物学シンポジウム(金沢)、2011年5月25-26日

8. Hirakawa J, Tsuboi K, Sato K, Kobayashi M, Watanabe S, Takakura A, Imai Y, Ito Y, Fukuda M, and Kawashima H. Novel Anti-Carbohydrate Antibodies Reveal the Cooperative Function of Sulfated N- and O-Glycans in Lymphocyte Homing. *Keystone Symposia-New Frontiers at the Interface of Immunity and Glycobiology*, 2011.3.8, Lake Louise, Alberta, Canada

9. Ohmichi Y, Hirakawa J, Imai Y, Fukuda M, and Kawashima H. Essential role of peripheral node addressin in lymphocyte homing to nasal-associated lymphoid tissues and allergic immune responses. *Keystone Symposia-New Frontiers at the Interface of Immunity and Glycobiology*, 2011.3.8, Lake Louise, Alberta, Canada

10. 加賀正基、渡部草太、平川城太郎、今井康之、川島博人 B16メラノーマの肺転移に及ぼすケモカイン強制発現の影響 平成22年度日本薬学会東海支部例会(静岡)、2010年11月28日

11. Bao X, Nakayama J, Miller M, Pham A, Kobayashi M, Kawashima H, Broide D, Fukuda M. Deficiency of L-selectin ligand biosynthesis by knocking out of GlcNAc6ST-1 and -2 suppresses asthmatic response in murine model of asthma. *Glycobiology2010*, 2010.11.7-10, St. Pete Beach, FL, USA.

12. 川島博人 新しい抗糖鎖抗体作製法の樹立に基づく硫酸化糖鎖のリンパ球ホーミングにおける機能の解明 CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」平成22年度第3回公開シンポジウム(東京)、2010年10月21日

13. 廣瀬まゆみ、川島博人、村井稔幸、竹縄忠臣、末次志郎、中川敦史 CRIB ドメインと WH ドメインを介した特定の N-WASP 多量体がアクチン骨格形成におよび細胞運動に寄与している 第 33 回日本分子生物学会年会 (神戸)、2010 年 12 月 7-10 日

14. 加賀正基、渡部草太、平川城太郎、今井康之、川島博人 ケモカイン CXCL10 の強制発現による B16 メラノーマの肺転移抑制 第 83 回日本生化学会年会 (神戸)、2010 年 12 月 7-10 日

15. 川島博人 硫酸化糖鎖の組織特異的な機能発現機構の解明 さきがけ 2 領域公開合同シンポジウム 2009.12.15-16, 東京

16. 廣瀬まゆみ、川島博人、岡田雅人、竹縄忠臣、末次志郎、中川敦史 N-WASP の多量体化形成機構と蛋白質精製 第 32 回日本分子生物学会年会 (横浜)、2009 年 12 月 9-12 日

17. 渡部草太、平川城太郎、加賀正基、今井康之、川島博人 リンパ節高内皮細静脈におけるケモカイン CXCL10 の発現とその役割 平成 21 年度日本薬学会東海支部例会 (四日市)、2009 年 11 月 23 日

18. 大槻卓也、吉岡純一、小野田貢、今井康之、川島博人 スギ花粉アレルゲン Cryj1 の N-結合型糖鎖による抗原性の修飾 平成 21 年度日本薬学会東海支部例会 (四日市)、2009 年 11 月 23 日

19. Hirakawa J, Ohmichi Y, Imai Y, Fukuda M, and Kawashima H. Essential role of sulfated-glycans in lymphocyte recruitment to nasal-associated lymphoid tissues and allergic immune responses. *Glycobiology*2009, 2009.11.12-15, San Diego, CA, USA.

20. Tobisawa Y, Imai Y, Fukuda M, and Kawashima H. Sulfation of colonic mucins by N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase-2 and its protective function against colitis in mice. *Glycobiology*2009, 2009.11.12-15, San Diego, CA, USA.

21. Murai T, and Kawashima H. Fluorescent probe for measurement of extracellular matrix degradation. 2009 *International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science*, 2009.11.8-11, Nagoya, Japan.

22. Hirakawa J, Ohmichi Y, Imai Y, Fukuda M, and Kawashima H. Lymphocyte recruitment to nasal-associated lymphoid tissues is regulated by

two sulfotransferases. 2008 *International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages*, 2009.6.3-4, Kanazawa, Japan

23. 飛澤悠葵、今井康之、福田穰、川島博人 硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 によるマウス大腸ムチンの硫酸化とその大腸炎防御機能 第 82 回日本生化学会大会 (神戸)、2009 年 10 月 21-24 日

24. 高倉惇、坪井康一郎、今井康之、小松雅明、川島博人 大腸特異的 Atg7 欠損マウスにおけるデキストラン硫酸誘発性大腸炎の解析 第 82 回日本生化学会大会 (神戸)、2009 年 10 月 21-24 日

25. 飛澤悠葵、今井康之、福田穰、川島博人 マウス GlcNAc6ST-2 による Muc2 ムチンの硫酸化とその大腸炎に対する防御機能の解析 第 29 回日本糖質学会年会 (高山)、講演要旨集、p. 37、2009 年 9 月 9-11 日

〔図書〕 (計 1 件)

1. Kawashima H. Roles of GlcNAc-6-O-sulfotransferases in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Methods in Enzymology* 479:243-256, 2010.

〔その他〕

ホームページ

<http://sys.u-shizuoka-ken.ac.jp/~bisei/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川島 博人 (KAWASHIMA HIROTO)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 50260336

(2)研究分担者

今井 康之 (IMAI YASUYUKI)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号 : 80160034

村井 稔幸 (MURAI TOSHIYUKI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 20311756