

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 5月10日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390151

研究課題名（和文） 免疫細胞トラフィッキングを制御するリゾリン脂質シグナリング依存性機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism underlying immune cell trafficking dependent on lysophospholipid signaling

研究代表者

宮坂 昌之（MIYASAKA MASAYUKI）

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50064613

研究成果の概要（和文）：

リンパ節へのリンパ球トラフィッキングを制御する血管である高内皮細静脈 HEV の内皮細胞に高発現するリゾリン脂質産生酵素 autotaxin (ATX) の機能を *in vitro*, *in vivo* で解析した。ATX はリンパ球の血管外移動と高い相関を示し、ATX およびリゾホスファチジン酸 (LPA) 受容体の阻害実験から、ATX は LPA の産生を介して、リンパ球の血管外移動を正に制御していることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the role of a lysophospholipase D, autotaxin (ATX), which produces a bioactive lipid mediator, lysophospholipid (LPA). ATX is highly expressed in the high endothelial venules (HEVs) that mediate lymphocyte trafficking into lymph nodes. We found that ATX expression is highly correlated with lymphocyte extravasation at HEVs and that inhibition of ATX and LPA receptors resulted in strong impairment of lymphocyte trafficking into lymph nodes. LPA abrogated this suppression. These data strongly suggest that the ATX/LPA axis is a positive regulator of lymphocyte extravasation at HEVs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：リンパ球ホーミング、血管内皮細胞、リゾリン脂質、細胞接着、ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

2002年頃からリゾリン脂質の一つスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) がリンパ節からのリンパ球流出を負に制御することが明らかになり始め、リゾリン脂質が免疫細胞の動態に広く関与する可能性が考えられ始めた。われわれは2007年から2008年にかけて、(1) リゾリン脂質の一つであるリゾホスファチ

ジン酸(LPA)を産生する酵素 autotaxin (ATX) がリンパ節へのリンパ球トラフィッキングを媒介する血管（高内皮細静脈；high endothelial venule; HEV）の内皮細胞に高発現すること、(2) 免疫系成熟の過程でリンパ節へのリンパ球トラフィッキングの出現時期と HEV 内皮細胞での ATX の出現時期がほぼ同一であること、(3) HEV 以外にも生理的リンパ球トラ

フィッキングを司る血管に ATX の発現が見られること、(4) 病的なリンパ球浸潤が見られる血管にも ATX 発現が誘導されてくること、などを明らかにした (Nakasaki T et al. *Am. J. Pathol.* 2008)。さらに、当研究室からアメリカに留学した神田英伸博士は Steve Rosen 博士と共同で、ほぼ同時期に、われわれと同様の知見を報告するとともに、ATX はリンパ球上に結合してその動態を変化させる可能性について示唆した (Kanda H et al. *Nat. Immunol.* 2008)。

これらのことから、ATX が何らかの機構を介して HEV におけるリンパ球トラフィッキングを制御することが想定されたが、ATX の作用機序、すなわち、果たして ATX が LPA 依存的に働くのか、あるいは ATX の標的細胞は何か？などの問題については全く不明のままであった。

2. 研究の目的

ATX のリンパ球動態制御の分子機構を明らかにすることを目的とした。特に、(1) ATX は LPA を産生することによってリンパ球動態制御機能を担うのか？(2) ATX/LPA は HEV においてリンパ球のローリング、接着、通り抜け、のいずれのプロセスを制御するのか？(3) ATX/LPA の標的細胞は何か？すなわち、リンパ球に働くのか？HEV 内皮細胞に働くのか？(4) 関与する LPA 受容体は LPA₁ ~ LPA₆ のいずれか？などの問題について解明することを試みた。

3. 研究の方法

(1) ATX の発現解析：凍結切片およびパラフィン切片をモノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体を用いて免疫組織学的解析を行った。

(2) LPA の発現解析：慶応大学の末松誠博士、杉浦悠毅博士、久保亜紀子博士との共同研究によりリンパ節の *imaging mass spectrometry* を行った。

(3) ATX の機能阻害：ATX 阻害機能をもつ HA130, BrP-LPA, 3-ccPA をマウス足蹠に投与し、その後の膝窩リンパ節へのリンパ球トラフィッキングを FACS 法、*whole-mount* 解析法、および二光子顕微鏡法を用いて解析した。

(4) 解析後、リンパ節を固定し、関西医療大学の東家博士との共同で、透過型電子顕微鏡を用いた形態学的観察を行った。

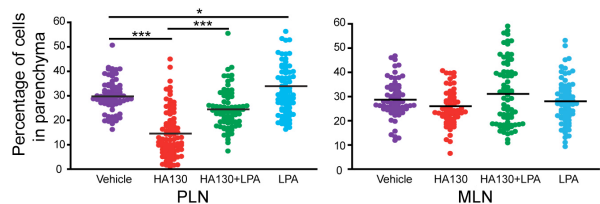
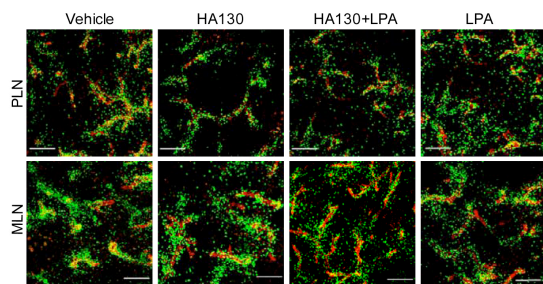
4. 研究成果

(1) 免疫組織学的解析の結果、ATX はリンパ節 HEV 内皮細胞に強く発現していた。また、抗 ATX 抗体を静脈内注射後、マウスを全身灌流固定後、リンパ節を回収した。その結果、投与した抗 ATX 抗体は HEV の内腔側に結合していたことから、ATX が HEV 内腔

に露出した形で発現していることが明らかになった。また、単離 HEV 内皮細胞を FACS 解析した結果、ATX は HEV 内皮細胞表面に構成的に結合しており、HEV 内皮細胞から放出された ATX は何らかのメカニズムにより内皮細胞表面に結合することが示唆された。

(2) ATX の産物である LPA の存在の有無について *imaging mass spectrometry* を用いて解析した結果、約 7 割の HEV の近傍に LPA シグナルが検出された。このことは、ATX の発現部位のきわめて近傍に局限して LPA が産生されていることを示唆する。

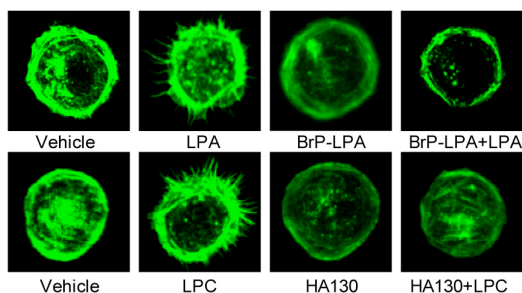
(3) ATX 阻害剤を足蹠に投与することにより、局所リンパ節における ATX の阻害実験を行った。その結果、BrP-LPA 投与により局所リンパ節へのリンパ球トラフィッキングが強く阻害されたが、LPA₁, LPA₃ 受容体を阻害する Ki16425 の投与ではリンパ球トラフィッキングは阻害されなかった。そして、*whole-mount* 解析の結果、ATX 阻害により、静脈内投与された蛍光標識リンパ球は HEV 内腔には接着していたが、リンパ節実質への移動が抑制されていることが示唆された。そして、この抑制は LPA 投与により解除された。しかし、このような変化は局所リンパ節である膝窩リンパ節 (PLN) のみで見られ、非局所リンパ節である腸間膜リンパ節 (MLN) では見られなかった。



このことは、ATX/LPA axis がリンパ球の血管外移動を正に制御している可能性を示唆する。そこで、二光子顕微鏡を用いて投与蛍光標識リンパ球の HEV 領域における運動性について解析したところ、ATX 阻害により、リンパ球の血管外移動が選択的に阻害され、LPA によりこの抑制が解除されることが明らかになった。さらに、阻害剤投与部位を支配する局所リンパ節の電顕的解析を行った

ところ、阻害剤投与により、リンパ球が HEV 内皮細胞層の中に著しく蓄積していることが観察された。以上のことから、ATX/LPA axis の阻害によりリンパ球の血管外移動が阻害されることが強く示唆された。

(4) ATX/LPA axis の標的細胞の同定のために、リンパ球に対して LPA を添加し、chemokinesis, chemotaxis に対する影響を解析したところ、chemokinesis に弱い影響は見られたが chemotaxis に対しては殆ど影響が見られなかった。このことから、ATX/LPA axis



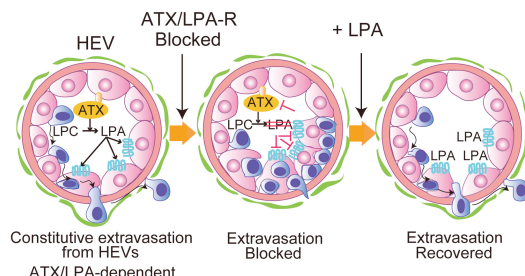
の主な標的は HEV 内皮細胞と考え、以下の解析を行った。まず、HEV 内皮細胞を分離・精製し、LPA あるいは LPC (リソホスファチジルコリン) を添加したところ、強い細胞骨格変化が誘導された。LPC による形態変化は ATX 阻害により抑制され、LPA による変化は ATX と LPA 受容体を阻害する BrP-LPA により抑制された。このことは、添加された LPC が HEV 内皮細胞由来の ATX により LPA に変化し、LPA が LPA 受容体を介して内皮細胞にシグナルを送り、その細胞骨格を変化させたことを示唆する。

同様の実験を、HEV 内皮細胞とリンパ球の共存下で行ったところ、ATX 阻害により、リンパ球の HEV 内皮細胞下面への潜り込み (transmigration) は軽度には抑制されなかったが、一度内皮細胞下面へ取り込まれたリンパ球の細胞外への脱出は強く抑制された。しかし、この抑制は LPA 添加により解除された。このことは、ATX/LPA axis は主に HEV 内皮細胞に働いてその運動性を制御するとともに、HEV 内皮細胞とリンパ球の動的な相互作用を調節し、ATX/LPA axis の阻害により HEV 内皮細胞からリンパ球が脱離するプロセスが選択的に阻害されることが明らかになった。

以上の解析結果から、ATX/LPA axis のリンパ球トラフィッキングに対する作用機序として次のシナリオが考えられる。

- ① ATX は HEV 内皮細胞により産生され、細胞表面に提示されている。
- ② ATX は血流中の LPA 前駆体 (=LPC) に働き、局所的に LPA を産生する。
- ③ 生成された LPA は、エフェクター分子として LPA 受容体を介して HEV 内皮細胞

に働き、その運動性を制御するとともに、リンパ球 - HEV 内皮細胞間の動的な相互作用を促進する。これにより、リンパ球は内皮細胞層から脱離し、基底膜を通り抜けて、リンパ節実質に移動する。この最後の運動には、ATX/LPA axis 以外にケモカインなどが働いているかもしれない。



現在、HEV 内皮細胞上の責任 LPA 受容体は同定を進めているが、RT-PCR 解析では、LPA₄ と LPA₆ が HEV 内皮細胞に強く発現することがわかっている。また、最近の解析では、ATX は HEV 内皮細胞以外の間質細胞にも発現しているらしいことから、ATX は HEV 内皮細胞由来のもののみが重要なのかについて、血管特異的 ATX ノックアウトマウスを作成することにより明らかにしていく予定である。

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 13 件)

- ① Umemoto, E., Hayasaka, H., Bai, Z., Cai, L., Yonekura, S., Peng, X., Takeda, A., Tohya, K. & Miyasaka, M.: Novel regulators of lymphocyte trafficking across high endothelial venules. *Crit. Rev. Immunol.* (Review), 31:147-169, 2011, 査読有。
- ② Hayasaka, H., Taniguchi, K., Fukai, S. & Miyasaka, M.: Neogenesis and development of the high endothelial venules that mediate lymphocyte trafficking. *Cancer Sci.* (Review) 101:2302-2308, 2010, 査読有。
- ③ Tohya, K., Umemoto, E., & Miyasaka, M.: Microanatomy of lymphocyte-endothelial interactions at the high endothelial venules of lymph nodes. *Histol. Histopathol.*, (Review) 25:781-794, 2010, 査読有。
- ④ *Ebisuno, Y., *Katagiri, K., Katakai, T., Ueda, Y., Nemoto, T., Inada, H., Nabekura, J., Okada, T., Kannagi, R., Tanaka, T., Miyasaka, M., Hogg, N. & Kinashi, T.

(*equal contribution): Rap1 controls lymphocyte adhesion cascade and interstitial migration within lymph nodes in RAPL-dependent and -independent manners. *Blood*, 115:804-814, 2010, 査読有.

- ⑤ *Bai, Z., *Hayasaka, H., Kobayashi, M., Li, W., Guo, Z., Jang, M.H., Kondo, A., Choi, B., Iwakura, Y. & Miyasaka, M. (*equal contribution): CXC chemokine ligand 12 promotes CCR7-dependent naïve T-cell trafficking to lymph nodes and Peyer's patches. *J. Immunol.*, 182:1287-1295, 2009, 査読有.

[学会発表] (計 20 件)

- ① Bai, Z., et al.
The autotaxin/lysophosphatidic acid axis regulates lymphocyte extravasation at lymph node high endothelial venules. Keystone Symposia Conference on Chemokines and Leukocyte Trafficking. Jan. 8-13, 2012. Colorado, U.S.A.
- ② Cai, L., et al. Inhibition of the Autotaxin/LPA axis results in inhibition of lymphocyte release from the endothelial cells of high endothelial venules in vitro. The 40th annual meeting of the Japanese Society for Immunology. Nov. 27-29, 2011. Chiba.
- ③ Hata, E., et al. In vivo inhibition of the autotaxin/LPA axis results in inhibition of lymphocyte transmigration across high endothelial venules of lymph nodes. The 40th annual meeting of the Japanese Society for Immunology. Nov. 27-29, 2011. Chiba.
- ④ Takeda, A., et al. Nepmucin/CD300LG promotes LPA-induced lymphocyte transcellular migration across HEV endothelial cells. The 40th annual meeting of the Japanese Society for Immunology. Nov. 27-29, 2011. Chiba.
- ⑤ Miyasaka, M. Regulation of lymphocyte trafficking by lysophospholipids. Invited lecture. POSTECH IBB – Osaka Univ. IFRc exchange seminar. June 24, 2011. Korea.
- ⑥ 蔡 林君、他. HEV 依存性リンパ球トラフィックの autotaxin による制御. 第 35 回日本リンパ学会総会. 2011.6.3-5. 東京.

- ⑦ 宮部斉重、他. リゾフォスファチジン酸を標的とした関節リウマチの新規治療法開発. 第 32 回日本炎症・再生医学会. 2011.6.2-3. 京都.
- ⑧ Miyasaka, M., et al. Autotoxin, a new regulator of lymphocyte trafficking across high endothelial venules. Invited lecture. JSICR-MMCB2011 joint meeting. May 25-27, 2011. Osaka.
- ⑨ Miyasaka, M., et al. The functional role of a lipid-generating enzyme, autotaxin, in lymphocyte trafficking across the venules of lymphoid tissues. Invited lecture. 2nd Synthetic Immunology Workshop. Dec. 17-18, 2010. Kyoto.
- ⑩ Miyasaka, M. How does a lipid mediator-generating enzyme, autotaxin, regulate lymphocyte trafficking across high endothelial venules? Invited lecture. 14th International Congress of Immunology. Aug. 22-27, 2010. Kobe.
- ⑪ Bai, Z., et al. Luminal expression of autotaxin and its role in lymphocyte trafficking across the venules of lymphoid tissues. 14th International Congress of Immunology. Aug. 22-27, 2010. Kobe.
- ⑫ Cai, L., et al. The role of an LPA-generating enzyme autotaxin in lymphocyte trafficking across the venules of lymphoid tissues. The 31st Meeting of the Japanese Society of Inflammation and Regeneration. Aug. 5-6, 2010. Tokyo.
- ⑬ Miyasaka, M. How do immune cells cross the endothelial barrier? ニュージーランド研究科学技術省ワークショップ. 2010.6.17-18. 大阪.
- ⑭ Miyasaka, M., et al. How do immune cells cross the endothelial barrier? Invited lecture. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Dec. 2-4, 2009. Osaka.
- ⑮ Bai Z., et al. Luminal expression of autotaxin and its role in high endothelial venules. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Dec. 2-4, 2009. Osaka.
- ⑯ Miyasaka, M., et al. Autotaxin, a new modulator of lymphocyte trafficking into lymph nodes. 2nd European Congress of Immunology (ECI) 2009. Sep. 13-16, 2009. Berlin, Germany.

- ⑰ 宮坂昌之. リンパ球トラフィッキングを制御する血管 HEV の機能制御機構. 招待特別講演. 第 33 回日本リンパ学会総会. 2009.7.17-19. 大阪.
- ⑱ Bai, Z., et al. How do immune cells cross the endothelial barrier? – Dogmas and Enigmas. Invited lecture. Singapore -Osaka, 1st Joint SIgN-IFReC Meeting. June18-19, 2009. Singapore.
- ⑲ Bai, Z., et al. CXCL12 (SDF-1 alpha) Promotes CCR7-Dependent Naïve T Cell Trafficking to Lymph Nodes and Peyer's Patches. The First International Kishimoto Foundation Symposium. May 25-27, 2009. Osaka.
- ⑳ 宮坂昌之. リンパ球、樹状細胞の動態を決める分子機構. 招待講演. 第 36 回佐島シンポジウム. 2009.4.24-25. 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮坂 昌之 (MIYASAKA MASAYUKI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：50064613

(2) 研究分担者

早坂 晴子 (HAYASAKA HARUKO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70379246

梅本 英司 (UMEMOTO EIJI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：90452440

白 忠彬 (BAI ZHONGBIN)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・
特任助教 (常勤)
研究者番号：10512840

ベルハンガルシア ノエル
(VERJAN GARCIA NOEL)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・
特任研究員 (常勤)
研究者番号：90533216

蔡 林君 (CAI LINJUN)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・
特任研究員 (常勤)
研究者番号：90584079
(H22 から研究分担者として参画)

(3) 連携研究者 なし