

## 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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590440

研究課題名（和文）高内皮細静脈特異的な細胞動員シグナルによる自然免疫と獲得免疫を繋ぐ細胞動態制御

研究課題名（英文）Trafficking of immune-competent cells mediated by high endothelial venule-associated cell trafficking signals and regulation of innate and acquired immune responses.

研究代表者

田中 稔之 (TANAKA TOSHIYUKI)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：30217054

研究成果の概要（和文）：

免疫細胞の生体内動態は自然免疫と獲得免疫の連携に重要な役割をはたす。高内皮細静脈（HEV）はリンパ球のリンパ節への動員を制御する。HEV に発現する細胞動員分子に着目し免疫細胞の動態制御機構を解析した結果、リンパ球の HEV からの血管外遊走に autotaxin (ATX) と呼ばれる酵素とこれが産生する生理活性脂質 LPA が重要であることが示された。また形質細胞様樹状細胞の脾臓への動員と組織内遊走が特定のケモカイン受容体（CCR7 および CXCR4）により制御されることが示された。さらに血管内皮細胞は局所で進む自然免疫応答に呼応して細胞動員シグナルの発現をダイナミックに制御することが示された。

研究成果の概要（英文）：

Trafficking of immune-competent cell is crucial for efficient linkage between innate and adaptive immune responses. High endothelial venues (HEVs) recruit lymphocyte to lymph nodes, and express various tissue-specific cell trafficking signals. In this study, we found followings; 1) lymphocyte transmigration across the basal lamina of the HEVs is regulated, at least in part, by autotaxin (ATX) and its end-product, lysophosphatidic acid (LPA), 2) plasmacytoid dendritic cells employ both CCR7 and CXCR4 as critical chemokine receptors to migrate into the splenic white pulp under steady-state conditions, and 3) endothelial cells recognized regional inflammatory status and regulate expression of cell trafficking-associated molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫学、細胞動員、血管内皮細胞、自然免疫、獲得免疫

## 1. 研究開始当初の背景

高内皮細静脈（high endothelial venule: HEV）はリンパ球のリンパ節へのホーミングを支配する特異的な小静脈である。また HEV

は末梢組織の自然免疫情報の投射を受け、樹状細胞などのリンパ節への動員をダイナミックに制御して自然免疫と獲得免疫を機能的に連結する役割をもつ。しかし、HEV を

介する免疫細胞動員の制御機構には不明な点が多い。

研究代表者らは HEV の遺伝子発現プロファイル解析を世界に先駆けて成功させ、HEV が多彩な細胞動員シグナルを発現することを明らかにした。本研究は、研究代表者らが独自に見いだした HEV に発現する細胞動員分子群に焦点を絞り、効果的な免疫応答に必要な自然免疫と獲得免疫を連結する免疫細胞の動員制御機構の解明を目的として立案された。

## 2. 研究の目的

リンパ節 HEV は特異的な細胞動員機構をもち、リンパ球のリンパ節へのホーミングを制御している。この HEV 特異的な細胞動員機構は末梢組織から輸入リンパ管を経て投射される自然免疫情報に応答して動的に再編成され、樹状細胞を含む免疫細胞サブセットの動員をダイナミックに制御して、効率的な免疫応答の成立に必須の役割をになっている。

本研究は HEV 特異的に発現する細胞動員シグナルによる自然免疫と獲得免疫をシームレスに連結する細胞動態制御機構の解明をめざす。そこで HEV 特異的に発現する細胞動員分子による構成的な二次リンパ組織への免疫細胞動員機構と HEV における免疫細胞動員の再編成が自然免疫と獲得免疫の機能的な連繋にはたす役割を明らかにするために、以下の解析を行った。

## 3. 研究の方法

**(1) HEV に発現する活性脂質産生酵素 Autotaxin/lysoPLD による免疫細胞動員：**  
HEV は活性脂質 LPA 産生の鍵酵素 Autotaxin/lysoPLD (ATX) を選択的に発現する。LPA がリンパ球や樹状細胞の細胞接着や遊走を制御することに注目し、ATX および LPA 受容体に対する特異的阻害剤や特異抗体の投与実験などにより、HEV に発現する ATX のリンパ球および樹状細胞のリンパ節および脾臓への動員における機能的意義を解析する。またリンパ節における部位特異的な LPA 産生を質量分析法を用いて解析する。

**(2) 自然免疫と獲得免疫の連結する pDC の二次リンパ組織への動員：**自然免疫と獲得免疫の連繋に重要な形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell: pDC) の

HEV を介するリンパ節への動員機構を種々の遺伝子欠損マウスや特異的阻害剤を用いて解析する。また、脾臓などの二次リンパ組織への動員とリンパ組織内の pDC の遊走を解析する。あわせて二次リンパ組織におけるケモカイン発現を免疫組織学的に解析する。

**(3) 感染刺激が惹起する HEV に特異的な免疫細胞動員機構の再編成：**HEV は末梢組織から輸入リンパ管を介して感染に対する自然免疫情報の投射をうけ、細胞動員分子の発現をダイナミックに再編成する。そこで種々の TLR リガンドやサイトカインを用いて血管内皮細胞を刺激し、刺激応答性に誘導される細胞動員シグナルの再編成を解析する。また組織侵襲や感染刺激に対する表皮細胞の応答を解析する。

## 4. 研究成果

**(1) HEV に発現する活性脂質産生酵素 Autotaxin/lysoPLD による免疫細胞動員：**  
リンパ球の HEV からの血管外遊走は免疫系の恒常性維持に必須のステップであるが、その分子機構については不明な点が多い。HEV がリンパ球や樹状細胞の動態を制御する生理活性脂質 LPA 産生の鍵酵素 ATX を選択的に発現することに注目し、その機能的な意義を解析した。

その結果、リンパ球と HEV の多段階接着反応のうち、リンパ球が HEV 基底膜を通過する血管外遊走過程が生理活性脂質 LPA と ATX によって、すくなくともその一部が制御されていることを見いだした。ATX は HEV に選択的に発現しており、これと一致して経静脈的に投与した抗 ATX 抗体は HEV 管腔面に特異的に結合した。また、リンパ節組織標本を用いた部位特異的な質量分析の結果、LPA は HEV に隣接する部位に選択的に検出された。また種々の阻害剤を用いて生体内で ATX および LPA 受容体を阻害するとリンパ球の HEV を経由する血管外遊走が抑制され、血管内皮細胞の下層にリンパ球の蓄積が認められた。これに対して、血管外遊走に先立つ、リンパ球ローリングやリンパ球接着には明らかな影響は認められなかった。さらに、高内皮細胞とリンパ球を用いた transmigration assay で、ATX を阻害すると高内皮細胞の下層に潜り込んだリンパ球の遊出が阻害された。

これらの結果は、HEV に発現する ATX が HEV 局所で LPA を産生し、LPA がリンパ球と HEV の動的な相互作用を制御し、リンパ

球の HEV からの血管外遊走を促進することが示された。

(2)自然免疫と獲得免疫の連結する pDC の二次リンパ組織への動員：自然免疫と獲得免疫の連携に重要な pDC のリンパ節や脾臓などの二次リンパ組織への動員機構には不明な点が多い。種々の遺伝子欠損マウスを用いて、pDC の二次リンパ組織への動員機構を解析した結果、pDC の HEV を介するリンパ節への構成的な動員に CCR7 および CCR7 リガンドケモカインが重要な役割をはたすことが示された。また、pDC の脾臓への動員を解析した結果、CCR7 および CCR7 リガンドケモカインの欠損は pDC の脾臓への血行性の流入には明らかな影響を示さないのに対し、脾臓内での pDC の動態を変動させ、pDC の白脾髄への集積を著しく減少させることが示された。

pDC はケモカイン受容体として CCR7 に加えて CXCR4 を発現している。そこで pDC に対する二次リンパ組織に発現するケモカインの協調作用を解析した結果、CCR7 リガンドである CCL21 は CXCL4 リガンドである CXCL12 に対する pDC の応答を増強すること、および pDC の白脾髄への動員に CCR7 と CXCR4 の両者が重要な役割を果たすことが示された。また免疫組織学的な解析から、二次リンパ組織のストロマ細胞に CCL21 と CXCL12 の共局在することが示された。

これらの結果から、pDC の二次リンパ組織への動員や組織内遊走に CCR7 と CXCR4 を介するシグナルの両者が重要な役割を有すると考えられた。

(3)感染刺激が惹起する HEV に特異的な免疫細胞動員機構の再編成：HEV を構成する特徴的な血管内皮細胞である高内皮細胞は末梢組織の自然免疫情報の投射を受け、免疫細胞のリンパ節への動員をダイナミックに制御して自然免疫と獲得免疫を機能的に連結する役割をもつ。血管内皮細胞による自然免疫情報の受容機構と免疫細胞の動態制御機構を明らかにすることを目的に、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を種々のサイトカイン (12 種) や TLR リガンド (8 種) で刺激し、細胞接着分子・ケモカインなどの発現の変動を解析した。その結果、刺激応答性の発現変化が明らかなケモカイン (CCL5, CXCL10 および CCL26) および細胞接着分子 (E-selectin, P-selectin, ICAM-1, および

VCAM-1) が特定された。Th1 サイトカインである  $\text{INF}\gamma$  によって CXCL10 が、Th2 サイトカインである IL-4 および IL-13 によって CCL26 が誘導されるなど局所で進行する免疫反応に呼応する細胞動員分子の発現が認められたが、今回用いた刺激条件では高内皮細胞に特異的な細胞接着分子 MAdCAM-1 やケモカイン CCL21 および CXCL13 などの発現は検出されなかった。一方、TLR3 リガンドである polyI:C は HUVEC に作用して細胞接着分子 (E-selectin, ICAM-1, VCAM-1) およびケモカイン (CCL5 および CXCL1) の発現を強く誘導した。この結果は血管内皮細胞が局所で産生されるサイトカインに応答するばかりでなく、PAMPs/DAMPs を danger signal として直接感知して免疫細胞の動員を制御することを示唆している。

感染および侵襲刺激に対する表皮細胞の応答を解析したところ、polyIC とヒアルロン酸 (HA) 刺激により表皮細胞におけるヒアルロン酸合成酵素 HAS2 の発現が増強することが示された。HAS2 を介して産生される HA は局所で進行する自然免疫反応に伴い生理活性の高い HA 断片に変換され、二次リンパ組織へ投射される自然免疫シグナルの増幅に関与すると考えられた。

今後、血管内皮細胞による局所のサイトカインシグナルと danger signal の統合による細胞動員制御機構などについてさらに解析を進める必要があると考えられた。

## 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 8 件)

- ① Bai Z, Cai L, Umemoto E, Takeda A, Tohya K, Komai Y, Veeraveedu PT, Hata H, Sugiura Y, Kubo A, Suematsu M, Hayasaka H, Okudaira S, Aoki J, Tanaka T, Albers HMHG, 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*, 190:2036-2048, 2013. 査読有. DOI:10.4049/jimmunol.1202025
- ② Bobbala D, Chen XL, Leblanc C, Mayhue M, Stankova J, Tanaka T, Chen YG, Ilangumaran S, Ramanathan S. Interleukin-15 plays an essential role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia*, 55:3010-3020, 2012. 査読有. DOI:10.1007/s00125-012-2675-1

- ③ Hara K, Ueda S, Ohno Y, Tanaka T, Yagi H, Okazaki S, Kawahara R, Masayuki T, Enomoto T, Hashimoto Y, Masuko K, Masuko T. NIH3T3 cells overexpressing CD98 heavy chain resist early G1 arrest and apoptosis induced by serum starvation. *Cancer Sci*, 103:1460-1466, 2012. 査読有.  
DOI:10.1111/j.1349-7006.2012.02304.x
- ④ Umemoto E, Otani K, Ikeno T, Verjan Garcia N, Hayasaka H, Bai Z, Jang MH, Tanaka T, Nagasawa T, Ueda K, Miyasaka M. Constitutive plasmacytoid dendritic cell migration to the splenic white pulp is cooperatively regulated by CCR7- and CXCR4-mediated signaling. *J Immunol*, 189:191-199, 2012. 査読有.  
DOI:10.4049/jimmunol.1200802
- ⑤ Ohkawa M, Ohno Y, Masuko K, Takeuchi A, Suda K, Kubo A, Kawahara R, Okazaki S, Tanaka T, Saya H, Seki M, Enomoto T, Yagi H, Hashimoto Y, Masuko T. Oncogenicity of L-type amino-acid transporter 1 (LAT1) revealed by targeted gene disruption in chicken DT40 cells: LAT1 is a promising molecular target for human cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun*, 406:649-655, 2011. 査読有.  
DOI:10.1016/j.bbrc.2011.02.135
- ⑥ Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Takenaka K, Teshima T, Tanaka T, Inagaki Y, Akashi K. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*, 7:708-717, 2010. 査読有.  
DOI:10.1016/j.stem.2010.11.014
- ⑦ Satoh K, Takahashi H, Matsuda C, Tanaka T, Miyasaka M, Zeniya M, Kohara M. Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. *J Med Virol*, 82:1545-1553, 2010. 査読有.  
DOI:10.1002/jmv.21859
- ⑧ Tanaka T, Moriwaki K, Murata S, Miyasaka M. LIM domain-containing adaptor, leupaxin, localizes in focal adhesion and suppresses the integrin-induced tyrosine phosphorylation of paxillin. *Cancer Sci*, 101: 363-368, 2010. 査読有.  
DOI:10.1111/j.1349-7006.2009.01398.x
- ② Ohno Y, Ueda H, Tanaka T. The study of mesothelioma cancer stem cells using in vivo proliferation and sphere culture models. The 21<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association for Metastasis Research. July 13, 2012. Oriental Hotel Hiroshima (Hiroshima).
- ③ Bai Z, Cai L, Umemoto E, Tohya K, Takeda A, Hata E, Hayasaka H, Tanaka T, Miyasaka M. The autotaxin/lysophosphatidic acid axis regulates lymphocyte extravasation at lymph node high endothelial venules. Keystone Symposia Conference on Chemokines and Leukocyte Trafficking. Jan. 9, 2012. Colorado, USA.
- ④ Umemoto E, Ikeno T, Verjan Garcia N, Hayasaka H, Bai Z, Jang, M.H, Tanaka T, Miyasaka M. Constitutive pDC migration to the splenic white pulp is cooperatively regulated by CCR7 ligands and CXCL12. The 40th annual meeting of the Japanese Society for Immunology. Nov. 29, 2011. Makuhari Messe (Chiba).
- ⑤ Umemoto, E., Kunizawa, K., Jin, S., Yonekura, S., Jang, M.H., Tanaka, T, Miyasaka, M. Nepmucin mediates uptake of apoptotic cells in the endothelial cells of high endothelial venules. 14th International Congress of Immunology. Aug. 24, 2010. Kobe International Conference Center (Kob).

[その他]

ホームページ等

<http://www2.huhs.ac.jp/~h070015t/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 稔之 (TANAKA TOSHIYUKI)  
兵庫医療大学・薬学部・教授  
研究者番号：30217054

### (2) 研究分担者

上田 晴康 (UEDA HARUYASU)  
兵庫医療大学・薬学部・准教授  
研究者番号：10330458  
大野 喜也 (OHNO YOSHIYA)  
兵庫医療大学・薬学部・助教  
研究者番号：40509155

[学会発表] (計5件)

- ① Ohno Y, Tanaka T. Stem cell-like properties in CD133+ cells isolated from xenografted human malignant mesothelioma in immunodeficient mice. The 71<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Sept. 19, 2012. Royton Sapporo (Sapporo).