

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 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790466

研究課題名（和文） シアロムチン nepmucin による自己免疫応答調節機構の解明

研究課題名（英文） Regulation of autoimmune response by an Ig domain-containing sialomucin, nepmucin

研究代表者

梅本 英司 (UMEMOTO EIJI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90452440

研究成果の概要（和文）：Nepmucinは主に血管内皮細胞に発現するIgドメインを有する接着分子であり、少なくともin vitroにおいてリンパ球の血管外移動を媒介する。また、nepmucinはIgドメインを介してアポトーシス細胞の表面に露出するホスファチジルセリンに結合する。本研究課題において、私は、nepmucinがリンパ節のHEV内皮細胞によるアポトーシス細胞の取り込みを促進することを見出した。また、nepmucin欠損マウスでは加齢に伴い、血清中の自己抗体価が上昇した。これらの知見より、nepmucinは自己免疫応答に関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Nepmucin is an Ig-domain-containing adhesion molecule expressed in certain types of vascular endothelial cells and promotes lymphocyte transendothelial migration in vitro. We found that nepmucin binds to phosphatidylserine, which appears on the outer leaflet of the plasma membrane in apoptotic cells. Nepmucin promotes the uptake of apoptotic cells by endothelial cells of lymph node high endothelial venule. Nepmucin-deficient mice showed elevated autoantibody production in an age-dependent manner. Collectively, our findings indicate that nepmucin is involved in autoimmune response.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：免疫寛容・自己免疫、高内皮性静脈、リンパ球トラフィックング

1. 研究開始当初の背景

リンパ球と末梢リンパ節高内皮細静脈（HEV）との相互作用はリンパ球の「ローリング」、「強固な結合」、「血管外遊走」など連続した異なる過程により制御される。しかし、ローリングや強固な結合に比べ、血管

外遊走を媒介する分子機構については不明な点が多い。私は、HEV細胞の遺伝子発現解析を通じて、リンパ節HEVには発現するが、パイエル板HEVに発現が認められないシアロムチン nepmucin を同定した。Nepmucinは他の多くのシアロムチンと異なり、ムチン様

ドメインと Ig ドメインを有する。私は、nepmucin がムチン様ドメインを介して L-セレクトリン依存的リンパ球ローリングを行うだけでなく、Ig ドメインを介して白血球上の未同定リガンドとヘテロフィリックに相互作用し、リンパ球接着を促進することを見出した (Umemoto E. et al., *J. Exp. Med.*, 2006)。さらに私たちは、nepmucin が Ig ドメインを介して、nepmucin 自身とホモフィリックに結合し、血管外遊走を媒介することを明らかにした (Jin S, *Umemoto E. et al. *FEBS Lett.*, 2008 *corresponding author)。すなわち、nepmucin はムチン様ドメインを介してリンパ球ローリングを、Ig ドメインを介してリンパ球結合および血管外遊走を媒介する多機能分子であることが示唆される。

一方、私は nepmucin 結合性分子を探索する過程で、nepmucin がアポトーシス細胞の表面に露出するホスファチジルセリンに結合することを見出した。

2. 研究の目的

HEV 血管内皮細胞は、他の血管内皮細胞と異なり、肥厚した細胞質を有し、種々の異物を取り込むことが知られている。そこで、本研究では HEV 血管内皮細胞が nepmucin 依存的にアポトーシス細胞を取り込むかどうか検討を行った。また、生体におけるアポトーシス細胞の除去不全は自己抗体産生を始めとする自己免疫疾患様症状を引き起こすことから、本研究は nepmucin によるホスファチジルセリンの認識が自己免疫疾患に関与するかどうか検討した。

3. 研究の方法

Nepmucin のアポトーシス細胞への結合を検討するために、nepmucin の細胞外領域をヒト IgG の Fc 部分に結合させた可溶性 nepmucin を作成し、フローサイトメトリー解析を行った。Nepmucin を強制発現させた細胞株を用いて、アポトーシス細胞の取り込みを検討した。また、HEV 血管内皮細胞が nepmucin 依存的にアポトーシス細胞を取り込むかどうか共焦点顕微鏡等を用いて検討した。生体内において、HEV 内皮細胞が nepmucin 依存的にアポトーシス細胞を取り込むかどうか検討するため、ステロイド投与により胸腺細胞にアポトーシスを誘導し、nepmucin 欠損マウスの HEV 内皮細胞のアポトーシス細胞取り込み能を検討した。さらに、nepmucin 欠損マウスにおける自己抗体産生を検討した。

4. 研究成果

フローサイトメトリー解析の結果、アポトーシス細胞の表面に露出するホスファチジルセリンに Ig ドメインを介して結合した (図 1)。

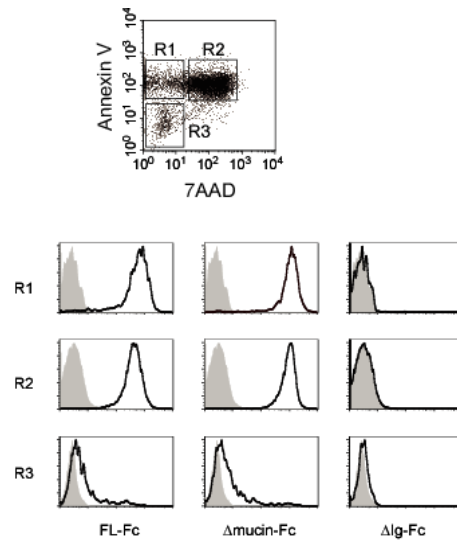


図 1. Nepmucin のアポトーシス細胞への結合。UV 照射によりアポトーシスを誘導した Jurkat 細胞に Nepmucin FL-Fc、 Δ mucin-Fc、 Δ Ig-Fc を添加し、二次抗体を用いてこれらの結合を検出した。R1: 早期アポトーシス細胞、R2: 後期アポトーシス細胞およびネクローシス細胞、R3: 生細胞。

また、リンパ節から単離した HEV 内皮細胞は少なくとも部分的に nepmucin 依存的にアポトーシスリンパ球を取り込んだ (図 2)。これまで HEV 内皮細胞によるアポトーシス細胞の取り込みは着目されてこなかったが、電子顕微鏡解析の結果、HEV 内皮細胞は糸状仮足様の突起を伸ばし、アポトーシスを包み込む過程が観察されたことから、HEV 内皮細胞は積極的にアポトーシス細胞の取り込みに関与する可能性が示唆された。

また、*in vivo* において、野生型マウスの HEV 内皮細胞は、ステロイド投与により誘導したアポトーシスリンパ球を取り込んだが、nepmucin 欠損マウス由来の HEV 内皮細胞ではその割合は減少した。さらに、nepmucin 欠損マウスでは、加齢に伴い自己抗体産生の上昇が認められた。これらの知見より、nepmucin は自己免疫応答に関与する可能性が示唆された。

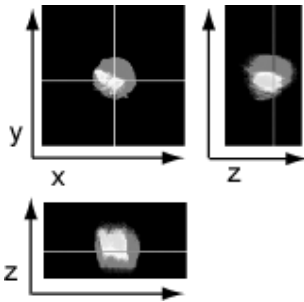


図 2. HEV 血管内皮細胞によるアポトーシス細胞の取り込み。
マウスリンパ節から HEV 細胞を単離し、4 時間培養した後、アポトーシス胸腺細胞を添加した。HEV 細胞 (灰色) は PNAd の発現により、アポトーシス細胞 (白色) は TUNEL 反応により可視化した。3D 共焦点顕微鏡解析の結果、アポトーシス細胞は完全に HEV 細胞に取り込まれているのが観察された。

また、nepmucin は脾臓において辺縁洞の血管内細胞に選択的に高発現することから、抗 nepmucin 抗体を用いると白脾髄および赤脾髄の境界を容易に染め分けることができる。私は、自身の作製した抗 nepmucin モノクローナル抗体を用いて、定常状態で免疫反応制御に関与する形質細胞様樹状細胞 (pDC) がケモカイン受容体 CCR7 および CXCR4 依存的に脾白脾髄に移動することを見出した (図 3) (Umemoto E. et al. *J. Immunol.* In press)。したがって nepmucin は制御性免疫細胞を含む種々の免疫細胞の動態を解析する上で有用な指標となる可能性がある。

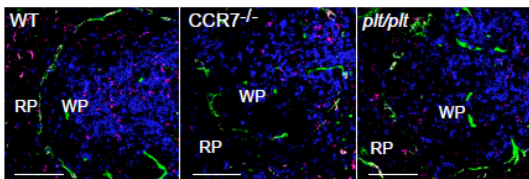


図 3. CCR7 欠損マウスおよび *plt/plt* (CCR7 リガンド欠損) マウスにおける pDC の分布。Nepmucin⁺血管内皮細胞、pDC、CD4⁺T 細胞をそれぞれ緑、赤、青で示す。Nepmucin は白脾髄 (WP)、赤脾髄 (RP) の境界に位置する辺縁洞の血管内皮細胞に選択的に発現する。CCR7 欠損マウスおよび *plt/plt* マウスにおいて、白脾髄の pDC 数は有意に減少していた。

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 4 件)

1. *Umemoto E., *Otani K., Ikeno T., Garcia N.V., Hayasaka H., Bai Z., Jang M.H., Tanaka T., Nagasawa T., Ueda K., & Miyasaka M. (*equal contribution) Constitutive plasmacytoid dendritic cell migration to the splenic white pulp is cooperatively regulated by CCR7- and CXCR4-mediated signaling. *J. Immunol.* In press, 2012 査読有り
2. Garcia N.V., Umemoto E., Saito Y., Yamasaki M., Hata E., Matozaki T., Murakami M., Jung Y.J., Woo S.Y., Seoh J.Y., Jang M.H., Aozasa K., & Miyasaka M. SIRP α /CD172a Regulates Eosinophil Homeostasis. *J. Immunol.* 187:2268-2277, 2011 査読有り
3. 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.* 31:147-169, 2011 査読有り
4. Tohya K., Umemoto E., & Miyasaka M. Microanatomy of lymphocyte- endothelial interactions at the high endothelial venules of lymph nodes. *Histol. Histopathol.* 25:781-794, 2010 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

1. Umemoto E. et al. Constitutive pDC migration to the splenic white pulp is cooperatively regulated by CCR7 ligands and CXCL12. Keystone Symposia, 2012.01.08-13, Colorado, USA
2. 梅本英司他, Constitutive pDC migration to the splenic white pulp is cooperatively regulated by CCR7 ligands and CXCL12. 第 40 回日本免疫学会 2011. 11. 27-29、千葉
3. 竹田彰、梅本英司他, Nepmucin/CD300LG promotes LPA-induced lymphocyte transcellular migration across HEV endothelial cells. 第 40 回日本免疫学会 2011. 11. 27-29、千葉

4. 池野嵩、梅本英司他、The role of PV-1 and neuropilin-1 in lymphocyte transendothelial migration across HEVs. 第40回日本免疫学会 2011. 11. 27-29、千葉
5. Verjan Garcia N, 梅本英司他、Signal regulating protein alpha (SIRP α)/CD172a regulates eosinophil homeostasis. 第40回日本免疫学会 2011. 11. 27-29、千葉
6. 秦枝里奈、白忠彬、蔡林君、梅本英司他、In vivo inhibition of the autotaxin/LPA axis results in inhibition of lymphocyte transmigration across high endothelial venules. 第40回日本免疫学会 2011. 11. 27-29、千葉
7. 梅本英司他 Nepmucin mediates uptake of apoptotic cells in the endothelial cells of high endothelial venules. 14th International Congress of Immunology, 2010. 08. 23-27, 神戸
8. Verjan Garcia N, 梅本英司他 SIRP α /SHPS-1 is strongly expressed in mouse eosinophils. 14th International Congress of Immunology, 2010. 08. 23-27, 神戸
9. 梅本英司、宮坂昌之 The role of a novel HEV-associated sialomucin, nepmucin. 第34回日本リンパ学会 2010. 06. 25-27、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし