

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291026

研究課題名(和文) インテグリンとそのリガンドによる細胞機能制御の分子機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of cellular functions by integrins and their ligands

研究代表者

関口 清俊 (Sekiguchi, Kiyotoshi)

大阪大学・たんぱく質研究所・寄附研究部門教授

研究者番号：50187845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：インテグリンリガンドとして同定されたポリドムのノックアウトマウスを作出し、以下のことを見いだした。1) ポリドムは間葉系細胞から分泌され、リンパ管周囲で線維状に組織化される。2) ノックアウトマウスではリンパ管叢が集合リンパ管へと成熟できず、リンパ管の排出機能不全を呈する。その結果、重度の浮腫を発症して、出生直後に死亡する。3) ノックアウトマウスでは、リンパ管の成熟を制御する転写因子Foxc2の発現が低下している。4) ポリドムはアンジオポエチン-2に結合する。以上の結果から、ポリドムはアンジオポエチン-2との結合を介して、リンパ管の成熟を制御するFoxc2の発現を正に制御すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mice deficient of polydom, a newly identified integrin alpha9beta1 ligand, were generated to study the function of polydom. We found that i) polydom was secreted from mesenchymal cells and deposited around lymphatic vessels; ii) the lymphatic plexus failed to remodel into collecting lymphatic vessels in polydom-deficient mice and thereby died immediately after birth due to severe edema; iii) the expression of Foxc2, a transcription factor involved in lymphatic vessel remodeling, was reduced in polydom-deficient mice; iv) polydom was capable of binding to angiopoietin-2 that has been known to regulate lymphangiogenesis. These results indicate that polydom regulates lymphatic vessel remodeling through binding to angiopoietin-2, thereby promoting the expression of Foxc2.

研究分野：生化学・細胞生物学

キーワード：細胞外マトリックス 細胞接着 幹細胞 細胞増殖 ニッチ リンパ管

1. 研究開始当初の背景

ポリドム (polydom) はインテグリン 9 1 の新規リガンドとして 2012 年に我々のグループが報告した細胞外マトリックスタンパク質であるが、その生体内における機能は不明であった。インテグリン 9 1 のノックアウトマウスは浮腫を発症して、生後 1~2 週間で死亡することが報告されている。ポリドムがインテグリン 9 1 の生理的リガンドとして機能しているのであれば、ポリドムのノックアウトマウスも浮腫を発症して、出生後死亡すると予想される。この点を明らかにするため、我々はポリドムノックアウトマウスを作製し、本研究開始時には同マウスが出生直後に呼吸不全で死亡することを見いだしていた。

2. 研究の目的

我々が作製したポリドムノックアウトマウスの解析を通じて、ポリドムの生理機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ポリドムノックアウトマウスとインテグリン 9 ノックアウトマウスをそれぞれ作製して、両者の表現形質を浮腫の原因となるリンパ管の形成不全に着目して解析した。リンパ管の解析は whole-mount 染色法を主に用い、リンパ管マーカーとしては VEGFR3, LYVE1, Prox1 等を用いた。リンパ弁のマーカーとしてはラミニン 5 を用いた。また、ポリドムノックアウトマウスからリンパ管内皮細胞を分離し、リンパ管形成に関わる因子の発現を RT-PCR 等により調べた。必要に応じて、市販されているリンパ管内皮細胞も使用した。ポリドムとアンジオポエチンとの結合は固相結合アッセイにより定量した。アンジオポエチンは R&D 社より購入した。ポリドム遺伝子のプロモーター下で lacZ 遺伝子を発現する遺伝子改変マウス (*Polydom^{lacZ}* マウス)

は The Jackson Laboratory から入手した。

4. 研究成果

(1) ポリドムノックアウトマウスの表現型：ポリドムノックアウトマウスは出生直後に死亡するため、胎生 18 日で胎児を回収し、遺伝子型を調べた。野生型マウス、ヘテロマウス、ホモマウスはメンデル比で得られており、ポリドムノックアウトマウスが胎生致死ではないことを確認した。ホモマウスでは皮下および胸腔で重度の浮腫を認めた (図 1)。

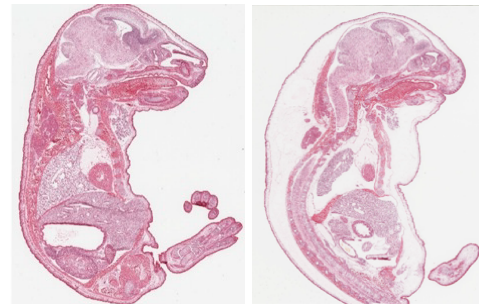


図1: 胎生 18.5日の野生型マウス (左)とポリドムノックアウトマウス (右)

(2) リンパ管の解析： リンパ管は胎生 12 日から 15 日の間に網目状のリンパ管叢が形成され、これが融合や剪定を経て径の太い集合リンパ管にリモデリングされる (図 2 左)。また、リンパ弁も形成される。ポリドムノックアウトマウスでは、胎生 15.5 日においてリンパ叢が皮下や腸間膜で観察されるものの、胎生 18.5 日においてもリモデリングがおこらず、網目状のままであった (図 2 右)。リンパ弁の形成も認められなかった。これら

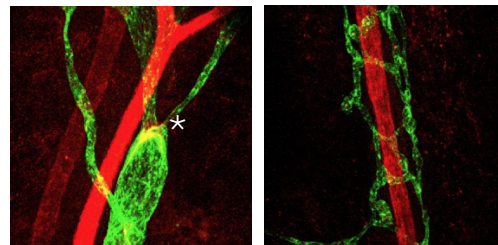


図2: 胎生 18.5日の野生型マウス (左)とポリドムノックアウトマウス (右)の腸間膜リンパ管

リンパ管を VEGFR3 抗体 (緑) とラミニン 5 抗体 (赤) で染色した。* はリンパ弁の位置を示す。

の結果は、ポリドムがリンパ管のリモデリングに関わる因子であることを示している。

(3) ポリドムの発現細胞の同定： ポリドムの発現部位を免疫組織化学的に検索した結果、リンパ管の周囲にポリドムが局在することを見いだした(図3)。一方、*Polydom^{lacZ}* マウスを用いてポリドム発現細胞を lacZ 活性により可視化したところ、リンパ管内皮細胞ではなく、近傍の間葉系細胞がポリドムを発現することが判明した(図4)。また、マウス胎児皮膚から PDGFR- 陽性細胞を分離するとポリドムの高い発現が認められた。以上の結果から、ポリドムは間葉系細胞(特に PDGFR- 陽性細胞)から発現・分泌され、近傍のリンパ管周囲に組織化されて、リンパ管形成を制御すると考えられる。

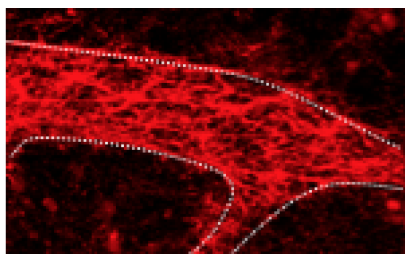


図3: 野生型マウスのリンパ管周囲に線維状に局在するポリドム

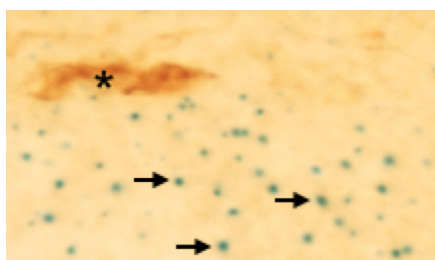


図4: *Polydom^{lacZ}* マウスを用いたポリドム発現細胞の可視化
VEGFR3抗体でリンパ管(*)を、X-Galでポリドム発現細胞(矢印)を染色した。

(4) ポリドムによる転写因子 *Foxc2* の発現制御： ポリドムがどのようにリンパ管のリモデリングを制御しているかを調べるため、リンパ管のリモデリングに関わる転写因子 *Foxc2* の発現を免疫組織染色および RT-PCR

により調べた。その結果、リンパ管の初期発生に必要な転写因子 *Prox1* の発現には変化がなく、*Foxc2* の発現が選択的にポリドムノックアウトマウスで低下していることがわかった。ポリドムは *Foxc2* の発現を正に制御する因子であると考えられる。

(5) インテグリン $\alpha 9$ ノックアウトマウスとの比較： ポリドムノックアウトマウスが呈するリンパ管形成不全がインテグリン $\alpha 9$ リガンドとしてのポリドムの機能を反映しているかを検証するため、インテグリン $\alpha 9$ ノックアウトマウスを作製して、その表現型を解析した。その結果、同ノックアウトマウスではリンパ管のリモデリングがおこり、集合リンパ管が形成されていた。また、*Foxc2* の発現低下も認められなかった。一方、リンパ管の形成には異常が認められた。これらの結果は、ポリドムノックアウトマウスで見られる *Foxc2* の発現低下およびリンパ管のリモデリング不全はポリドムのインテグリン $\alpha 9$ リガンドとしての機能を反映するものではなく、ポリドムの未知の機能を反映する可能性が高いと考えられた。

(6) アンジオポエチンとポリドムの相互作用： ポリドムがリンパ管形成を制御する液性因子と結合する可能性を検証するため、VEGF-C、アンジオポエチン-1およびアンジオポエチン-2との結合活性を固相結合アッセイで測定した。その結果、アンジオポエチン-2が選択的にポリドムと結合することがわかった。また、培養したリンパ管内皮細胞にアンジオポエチン-2を作用させると *Foxc2* の発現の増加が認められた。以上の結果を踏まえて、リンパ管周囲に集積したポリドムがアンジオポエチン-2を結合して、リンパ管内皮細胞表面の *Tie1/Tie2* 受容体を介して *Foxc2* の発現を高めるシグナルを導入するモデル(図5)を提唱した。

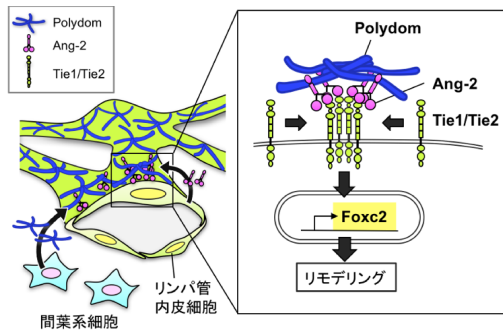


図5: リンパ管リモデリングにおけるポリドムの作用機構 (作業仮説)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20 件)

Morooka, N., Futaki, S., Sato-Nishiuchi, R., Nishino, M., Totani, Y., Shimono, C., Nakano, I., Nakajima, H., Mochizuki, N., and Sekiguchi, K. Polydom is an extracellular matrix protein involved in lymphatic vessel remodeling. *Circ. Res.*, 査読有、120巻、2017、1276-1288
DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308825.

Kärpanen, T., Padberg, Y., van de Pavert, SA., Dierkes, C., Morooka, N., Peterson-Maduro, J., van de Hoek, G., Adrian, M., Mochizuki, N., Sekiguchi, K., Kiefer, F., Schulte, D., and Schulte-Merker, S. An evolutionarily conserved role for polydom/svep1 during lymphatic vessel formation. *Circ. Res.*, 査読有、120巻、2017、1263-1275
DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308813.

Ohta, R., Niwa, A., Taniguchi, Y., Suzuki, N. M., Toga, J., Yagi, E., Saiki, N., Nishinaka-Arai, Y., Okada, C., Watanabe, A., Nakahara, T., Sekiguchi, K., and Saito, M. K. Laminin-guided highly efficient endothelial commitment from

human pluripotent stem cells. *Sci. Rep.*, 査読有、6巻、2016、35680
DOI: 10.1038/srep35680.

Ozawa, A., Sato, Y., Imabayashi, T., Uemura, T., Takagi, J., and Sekiguchi, K. Molecular basis of the ligand-binding specificity of $\alpha\beta 8$ integrin. *J. Biol. Chem.*, 査読有、291 巻、2016、11551-11565
DOI: 10.1074/jbc.M116.719138.

Kiyozumi, D., Sato-Nishiuchi, R., and Sekiguchi, K. In situ detection of integrin ligands. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 査読有、65巻、2014、10.19.1-10.19.17
DOI: 10.1002/0471143030.

Kurata, Y., Futaki, S., Nakano, I., Tanemura, A., Murota, H., Katayama, I., and Sekiguchi, K. Isolation and characterization of sweat gland myoepithelial cells from human skin. *Cell Struct. Funct.*, 査読有、89巻、2014、101-112
DOI: org/10.1247/csf.14009.

Yamada, M., and Sekiguchi, K. Disease-associated single amino acid mutation in the calf-1 domain of integrin $\alpha 3$ leads to defects in its processing and cell surface expression. *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有、441巻、2013、988-993
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.11.003.

Yamada, M., Mugnai, G., Serada, S., Yagi, Y., Naka, T., and Sekiguchi, K. Substrate-attached materials are enriched with tetraspanins and are analogous to the structures associated with rear-end retraction in migrating cells. *Cell Adh. Migr.*, 査読有、7巻、2013、304-314

DOI: 10.4161/cam.25041.

〔学会発表〕(計 9 件)

Morooka, M., Futaki, S., Totani, Y., Sato-Nishiuchi, R., Itsuko Nakano, I., and Sekiguchi, K. Polydom is an extracellular matrix protein essential for lymphatic vessel remodeling. American Society for Matrix Biology Biennial Meeting, November 13-16, 2016. Florida, USA.

Yamada, M., Nagano, Y., Usami, S., Tomimoto, C., Iwamura, A., Sato-Nishiuchi, R., and Sekiguchi, K. Restoration of epithelial polarity of human cancer cells by laminin-binding integrin. American Society for Matrix Biology Biennial Meeting, November 13-16, 2016. Florida, USA.

Sekiguchi, K. Molecular basis of laminin recognition by integrins. 9th International Conference on Proteoglycans and 10th Pan-pacific Connective Tissue Societies Symposium, August 23-27, 2015. Seoul, Korea.

Yamada, M., Shitamichi, H., Sato-Nishiuchi, R., Kusumoto, K., Morooka, N., Tamai, K., Ezo, S., Futaki, S., and Sekiguchi, K. The involvement of the extracellular matrix protein polydom in the regulation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells. International Society for Stem Cell Research Annual Meeting, June 24-27, 2015. Stockholm, Sweden.

Morooka, N., Futaki, S., Sato-Nishiuchi, R., Nakano, I., Sekiguchi, K. Polydom is an extracellular matrix protein

involved in lymphatic vessel remodeling. The 18th International Vascular Biology Meeting, April 13, 2014. Kyoto, Japan.

〔図書〕(計 1 件)

下野知性、関口清俊、バイオマテリアル：その基礎と先端研究への展開(田畑泰彦、埴隆夫編)東京化学同人、2016、316-318

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/matrixome/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

関口 清俊 (SEKIGUCHI, Kiyotoshi)
大阪大学蛋白質研究所・寄附研究部門教授
研究者番号：5 0 1 8 7 8 4 5

(2)研究分担者

山田 雅司 (YAMADA, Masashi)
大阪大学蛋白質研究所・助教
研究者番号：9 0 3 0 4 0 5 5

二木 杉子 (FUTAKI, Sugiko)
大阪大学蛋白質研究所・助教
研究者番号：0 0 4 0 3 0 1 4