

Title	オートタキシン/リゾホスファチジン酸による高内皮細静脈を介したリンパ球血管外移動の制御機構の解析
Author(s)	竹田, 彰
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/34588">https://doi.org/10.18910/34588</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

博士論文

**Constitutive lymphocyte transmigration  
across the basal lamina of high endothelial venules is regulated  
by the autotaxin/lysophosphatidic acid axis**

オートタキシン/リゾホスファチジン酸による高内皮細静脈を介した  
リンパ球血管外移動の制御機構の解析

大阪大学大学院生命機能研究科生命機能専攻

竹田 彰

2014年3月修了

## 目次

要旨	P. 3
序論	P. 4
結果	P. 6
考察	P. 12
実験材料、手法	P. 16
図表注釈	P. 20
謝辞	P. 24
参考文献	P. 25
業績一覧	P. 28
図表	P. 30

## 要旨

血中のリンパ球がリンパ節などの二次リンパ組織に移行する際、リンパ球は高内皮細静脈 (high endothelial venule: HEV) と多段階的に相互作用してリンパ節実質へと移行するが、その最終ステップである血管外移行を制御する分子機構には不明な点が多い。本研究において私は、HEV 基底膜の通りぬけがオートタキシン (autotaxin: ATX) およびその産物であるリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid: LPA) によって制御されることを見いだした。ATX は血中に多量に存在するリゾホスファチジルコリン (lysophosphatidylcholine: LPC) を LPA に変換する分泌型酵素である。HEV における ATX の選択的な発現と合致して、特定の LPA の分子種は HEV の周囲に選択的に局在することがイメージングマスペクトロメトリー解析により明らかになった。ATX の選択的阻害剤をマウスに投与すると、リンパ球のリンパ節への移動が抑制され、HEV 血管内皮細胞と基底膜層の間にリンパ球の蓄積が誘導された。このリンパ球の貯留は ATX の産物である LPA の投与により解除された。また、LPA および LPC を単離 HEV 血管内皮細胞に添加すると、血管内皮細胞の運動性が顕著に亢進した。LPC の効果は ATX 阻害剤により阻害され、LPA の効果は ATX/LPA 受容体阻害剤により阻害された。単離 HEV 血管内皮細胞とリンパ球を共培養し、その相互作用をタイムラプス解析すると、ATX 阻害剤はリンパ球の血管内皮細胞からの脱着を抑制し、LPA の添加はこの抑制効果を解除した。また、この LPA によるリンパ球の HEV 血管内皮細胞からの脱離促進は、血管内皮細胞自身のミオシン II 活性に依存的であった。これらの結果より、HEV 上の ATX は局所的に LPA を産生し、LPA は HEV 血管内皮細胞に作用することで、血管内皮細胞の運動性およびリンパ球の脱離をミオシン II 依存的に促進させる。以上より、ATX/LPA は HEV 基底膜を通りぬけ、組織実質へとリンパ球が移行する過程を正に制御することが明らかになった。

## 序論

リンパ節など二次リンパ組織へのリンパ球の恒常的な移動は、免疫系において必要不可欠な現象である。リンパ球がリンパ節に移動することで、リンパ球は樹状細胞が提示する抗原と出会い、免疫応答が開始する。ナイーブなリンパ球のリンパ節への移行は、高内皮細静脈 (high endothelial venule: HEV) と呼ばれる特殊な血管を介して行われる。リンパ球と HEV との相互作用は多段階のステップから成り立つ。リンパ球はまず、リンパ球上の L-selectin を介して、血管内皮細胞上をローリングする。その後、HEV が産生するケモカインによってリンパ球上のインテグリンが活性化され、リンパ球は HEV に強く接着する [1,2]。そして、リンパ球は血管内皮細胞間をくぐりぬけ組織実質へと移行する (血管外移動)。リンパ球のローリングおよび接着に関しては詳細な分子機構が解析されているが、最終ステップである血管外移動に関しては不明な点が多い [3]。

HEV は通常の血管と異なり、丈の高い血管内皮細胞と厚い基底膜をもつ。HEV 血管内皮細胞は発達したゴルジ小体および多数の粗面小胞体を有することから、タンパク質の合成能が高いと考えられている [4]。HEV は周皮細胞および線維芽細胞様細胞 (fibroblastic reticular cell: FRC) に囲まれており、これらの細胞が HEV 周囲に作り出す間隙は血管周囲腔 (perivenular channel) と呼ばれる [5]。リンパ球はその間隙を通過して、HEV の基底膜側からリンパ節実質へと移行する。

オートタキシン (autotaxin: ATX) は 110~125 kDa の分子量をもつ分泌型酵素である。ATX はリゾホソホリパーゼ D 活性を有し、血中に多量に存在するリゾリン脂質であるリゾホスファチジルコリン (lysophosphatidylcholine: LPC) を加水分解し、生理活性脂質であるリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid: LPA) を産生する [6]。ATX の活性中心は最近の結晶構造解析によりトレオニン 210 を含んだ疎水性ポケットであると同定された [7,8]。私が所属するグループは以前に ATX がリンパ節およびパイエル板の HEV 血管内皮細胞に恒常的に発現することを報告した。ATX の発現は発生的に制御されており、新生児期において ATX の発現とリンパ球のリンパ節への移動は同時期に起こる [9]。Kanda らは活性中心のトレオニンをアラニンに置換した ATX を血中に投与すると、リンパ節、パイエル板および脾臓へのリンパ球の移動が抑制されることを見いだした [10]。しかし、ATX および LPA が HEV を介したリンパ球のリンパ節への移動を制御するメカニズムにおいては不明な点が多い。

ATX の産生物である生理活性脂質 LPA は、種々の細胞に対して移動、増殖および生存などの多様な機能を持つ [6,11]。LPA の受容体として、これまでに LPA<sub>1</sub>-LPA<sub>6</sub> が知られている。これらの LPA 受容体はすべて G タンパク質共役型受容体であり、G<sub>i</sub>, G<sub>12/13</sub>, G<sub>q</sub> および G<sub>s</sub> といった多様な G タンパク質と共役することで、Rho および Rac GTPase を介した種々の細

胞内シグナル伝達を行う [11]。LPA は T 細胞においてケモキネシスを誘導する一方 [10]、Rho シグナル依存的に血管内皮細胞の透過性を促進し [12]、その移動を促進する [13]。これらの報告から、ATX により産生された LPA は、リンパ球および血管内皮細胞の両者に作用することで、細胞間相互作用を制御すると推測される。

本研究において、私は LPA が HEV 血管内皮細胞に恒常的に産生されることを見出した。マウスに ATX 阻害剤を投与すると、リンパ球が HEV 基底膜を通りぬける過程が阻害されたが、LPA の投与はこの阻害効果を解除し、リンパ球はリンパ節実質へ移動するようになった。単離 HEV 血管内皮細胞を用いた *in vitro* の実験より、LPA は血管内皮細胞に働き、血管内皮細胞の運動性やリンパ球の血管内皮細胞からの脱離を促進することが明らかになった。これらの知見より、ATX および LPA が HEV を介したリンパ球血管外移動を制御することが明らかになった。

## 結果

### ATX は HEV の血管内皮細胞および周囲の細胞により産生され、血管内皮細胞表面に固相化される

はじめにリンパ節においてどの細胞が ATX を産生するかを検討した。免疫組織染色の結果、ATX はこれまでの報告 [9,10] と同様に、HEV で高発現していた (図 1A)。電子顕微鏡解析により、ATX は HEV の血管内皮細胞に発現が認められたが、血管内皮細胞だけでなく血管内皮細胞を囲む周皮細胞にも同様に発現していた (図 1B)。

LPC からのコリン基解離能を指標に ATX 活性を測定すると、図 1C で示すように、単離 HEV 血管内皮細胞の培養上清中に ATX 活性が認められた。われわれの用いた HEV 血管内皮細胞の単離方法では  $\alpha$ -SMA 陽性の周皮細胞の混入は 2% 以下なので、本実験により検出された ATX 活性において周皮細胞の寄与はほとんどないと考えられる。また、ATX 活性は、ATX を強制発現させたマウス血管内皮細胞株 MBEC4 (MBEC4-ATX) の培養上清中にも検出された。これらの結果から、ATX は恒常的に HEV 血管内皮細胞から、機能を保持した形で分泌されることが示唆された。

次に、ATX の細胞への結合について解析した。その結果、ATX は単離 HEV 血管内皮細胞の表面に恒常的に結合しており、その結合は二価イオン非依存的であった (図 1D)。精製 ATX を単離 HEV 血管内皮細胞に添加しても、細胞表面上の ATX 発現レベルは殆ど変化しなかった。これらの結果から、HEV 血管内皮細胞は ATX を表面上に結合させるメカニズムを持っており、自身が産生した ATX により細胞表面の ATX の結合領域が飽和状態にあることが示唆される。MBEC4-ATX をヘパラン硫酸分解酵素であるヘパリチナーゼおよびヘパラナーゼで処理すると細胞表面の ATX の発現が低下するという予備的知見 (data not shown) および ATX はヘパリンアガロースカラムにより精製されるという過去の報告を考慮すると [14]、ATX は血管内皮細胞表面に、少なくとも一部はグリコサミノグリカンを介して固相化されていると考えられる。

これらの結果と一致して、血中に投与した抗 ATX 抗体は選択的に PNA<sup>d</sup> 陽性の HEV に結合し、その血管には静脈内投与した GFP 陽性リンパ球が多数結合していた。この現象は末梢リンパ節 (図 2A) および腸間膜リンパ節 (図 2B) でも同様に認められた。GFP 陽性リンパ球を投与後 15 分から 120 分の間で、リンパ球は血管からリンパ節実質深部へと段階的に移動したことから、ATX を発現する HEV はリンパ球を結合させ、血管外移動させることができることが明らかになった。

## ATX の生成物である LPA は HEV 局所で作られる

次に、MALDI イメージングマスマスペクトロメトリーを用いて、ATX の生成物である LPA が組織において局所的に HEV 近傍で産生されるかについて検討した [15]。この目的のために、まず、末梢リンパ節と骨格筋から LPA (18:0)、LPA (18:1)、LPA (18:2)、LPA (20:4) のシグナルをそれぞれ含む前駆イオン  $m/z$  437、435、433、457 の MS/MS スペクトルを得た。LPA (18:2) および LPA (20:4) はマウスリコンビナント ATX により産生される主な LPA 分子種である [16]。LPA を選択的に検出するため、LPA イオンを衝突誘起解離によってフラグメント化した後に生成されるシグナルを分析した (図 3A)。その結果、LPA は、末梢リンパ節において、LPA (18:0) > LPA (18:1) > LPA (18:2) ~ LPA (20:4) の順に多く検出された。図 3B で示すように、実際、 $m/z$  437、435、433、457 の MS/MS スペクトルは  $m/z$  153 に相当する LPA 特異的なフラグメントイオンを多く含んでいた。 $m/z$  435、433、457 の MS/MS スペクトルにおいて  $m/z$  153 のシグナル強度は、骨格筋よりも末梢リンパ節の方が顕著に高かった。一方、 $m/z$  435 のスペクトルにおける  $m/z$  255、および  $m/z$  433 のスペクトルにおける  $m/z$  239 のような非特異的イオンは、これらの組織間で検出レベルに差は認められなかった。これらのことから、LPA (18:1)、LPA (18:2)、LPA (20:4) に対応するシグナルは、骨格筋より末梢リンパ節に多く存在することが示された。一方、ATX に安定的に結合しない LPA (18:0) [17] シグナルを含む  $m/z$  437 のスペクトルにおいて、LPA 特異的シグナル ( $m/z$  153) の強さはこれらの組織間で同等であった。これらの結果は、生理学的に重要である LPA 分子種が HEV において特異的に作られていることを支持する。

次に、 $m/z$  435、433 および 457 に含まれる  $m/z$  153 イオンを可視化することにより、末梢リンパ節における LPA (18:1)、LPA (18:2) および LPA (20:4) の分布を調べた。図 3C に示すように、LPA (18:1)、LPA (18:2) および LPA (20:4) のシグナルは濾胞領域よりも傍皮質領域で多く検出された。そして、52%から 63% の LPA シグナルは PNA<sup>+</sup> 陽性の HEV から 50  $\mu$ m 以内に検出された (図 3D)。これらの知見から、特定の LPA 分子種は恒常的に HEV の近傍において産生されることが示唆された。

## 局所的な ATX/LPA の阻害は、リンパ球のリンパ節への移入を抑制する

ATX および LPA が HEV において高発現することから、次にリンパ球のリンパ節への移入における ATX および LPA の影響について調べた。ATX ノックアウトマウスは胎生致死であり [7,18]、コンディショナルノックアウトマウスは現在作成中であるため、この解析では構造的に異なる 3 種の ATX および LPA 受容体の阻害剤を用いた。すなわち、ATX および LPA 受容体の両者を阻害する BrP-LPA [IC<sub>50</sub>=100-200 nM] [19]、ATX 選択的阻害剤である 3-



ccPA [IC<sub>50</sub>=620 nM] [20]、および LPA 受容体 LPA<sub>1</sub> と LPA<sub>3</sub> のアンタゴニスト Ki16425 [IC<sub>50</sub>< 50 nM] [21] である。

BrP-LPA をマウス足蹠から投与後、GFP 陽性リンパ球を静脈内投与し、その 30 分後にリンパ節および脾臓における GFP 陽性リンパ球数を測定した。その結果、局所的な BrP-LPA の投与により所属リンパ節へのリンパ球の移動は顕著に抑制された (図 4A)。しかし、脾臓への移動には変化が見られなかった。脾臓へのリンパ球移動に抑制効果が認められなかったのは、阻害剤が十分な濃度で脾臓に到達しなかったためと考えられる。さらにこの阻害効果は BrP-LPA の濃度が至適濃度より低い時には見られなかった (10 μM)。また、リンパ球投与 2 時間後のリンパ節において、阻害剤によるリンパ球トラフィッキングの抑制効果は微弱ながら観察されたが、投与 3 時間後にはリンパ球トラフィッキングの効率は通常のベースラインまで戻っていた。このことから、阻害剤の抑制効果は一過的および可逆的であると考えられる。一般的に分子量の小さい阻害剤は血中から急速に除去されるので、時間が経過することで阻害剤の抑制効果が減少したと思われる。ATX 阻害剤である 3ccPA の投与もまた、BrP-LPA よりも弱くではあるが、所属リンパ節へのリンパ球の移動を抑制した。これらの阻害剤はいずれもリンパ節における血流の速度 (図 4B) および、CCL21 に対する T 細胞のケモタキシスに影響を与えなかった (data not shown) ので、これらの阻害効果は特異的であると考えられる。

一方、LPA<sub>1</sub> および LPA<sub>3</sub> の選択的阻害剤である Ki16425 の投与は、所属リンパ節および脾臓へのリンパ球移動に影響を与えなかった。Ki16425 は *in vivo* において機能的 LPA 受容体を阻害できることが以前に示されている [22,23]。これらの結果から、ATX および LPA はリンパ球のリンパ節への移動を正に制御しており、LPA<sub>1</sub> および LPA<sub>3</sub> 以外の LPA 受容体はその制御に関与することが示唆された。

### ATX/LPA はリンパ球の基底膜通過を促進する

次に、ATX/LPA 受容体の阻害が、リンパ球トラフィッキングにおけるリンパ球ローリング、接着および血管外移行のどのステップを阻害しているかを検討した。二光子顕微鏡を用いた解析から、BrP-LPA、3ccPA および Ki16425 は、ローリングの頻度、速度 (図 5A) や接着の頻度 (図 5B) には影響を与えなかった。次に、ATX の選択的阻害剤である HA130 [IC<sub>50</sub> = 28 nM [24]] を足蹠に投与し、所属リンパ節のホールマウント顕微鏡解析を行った。その結果、HA130 投与により、所属リンパ節の HEV 近傍にリンパ球の蓄積が誘導され、リンパ節実質へのリンパ球の血管外移動が抑制された。このリンパ球の蓄積は所属リンパ節以外 (腸間膜リンパ節) では観察されなかった (図 5C)。また、BrP-LPA の投与においても、同様にリンパ球の蓄積が観察された (data not shown)。さらに、HA130 によるリンパ球の蓄積

は LPA の足蹠への投与により解除され、リンパ節実質へのリンパ球の移動が再び観察されるようになった。実際、これらの知見は、リンパ節実質へと血管外移動したリンパ球数を定量化することによって確かめられた。HA130 はリンパ節実質内に移動したリンパ球の割合をおよそ 50%程度低下させたが、HA130 および LPA を同時に投与すると 80%にまで回復した。LPA 単独投与は実質内の移動リンパ球数を 20%ほど増加させた。また、これら阻害剤/LPA の投与の影響は、所属リンパ節以外のリンパ節 (腸間膜リンパ節) では観察されなかった (図 5D)。これらの結果は、ATX/LPA が HEV におけるリンパ球の血管外移動に重要であり、LPA は ATX の下流分子として働くという仮説を強く支持する。

さらに、われわれは生体二光子顕微鏡を用いて ATX 阻害剤が HEV と GFP 陽性リンパ球の相互作用にどのような影響を与えるか検討した。Imaris ソフトウェアを用いた 4 次元の解析を行うと、対照群のマウスでは、HEV を通過する GFP 陽性リンパ球が多数観察され、その細胞体の一部は内腔側および基底膜側に突出していた。一方、BrP-LPA あるいは 3-ccPA を投与すると、血管外移動するリンパ球の頻度が顕著に減少した。Ki16425 の投与ではリンパ球移動に変化は見られなかった (図 5E, F)。二光子イメージングのデータを定量化したところ、BrP-LPA あるいは 3-ccPA 投与によりリンパ球の HEV を介した血管外移動はそれぞれ 55%、45% 減少した (図 5F)。図 4A におけるリンパ球トラフィックアッセイの結果と同様に、Ki16425 は血管外移動に影響を与えなかった。

さらにこの過程を詳細に検討するため、透過型電子顕微鏡による解析を行った。HA130 あるいは BrP-LPA の足蹠への投与 45 分後に所属リンパ節を回収したところ、HEV 血管内皮細胞下層に顕著にリンパ球が蓄積し (図 6)、また、内腔が狭窄した HEV が多数観察された。この現象は、血管内皮細胞下層にリンパ球の蓄積が多く観察される HEV で顕著であった。また、非 HEV 型血管や、溶媒投与時における HEV ではこのような現象は観察されなかった。これらの結果から、内皮細胞下層へのリンパ球の蓄積と HEV 内腔の狭窄は ATX 阻害剤を投与した所属リンパ節において選択的に観察され、血管内皮細胞下層へのリンパ球の蓄積が内腔の狭窄化につながったと考えられる。上記で示したように、リンパ節内の血流は阻害剤投与により変化しなかったため、HEV 内腔の狭窄化はリンパ節内の血流に影響を与えず、したがって HEV に運ばれるリンパ球数にも影響を与えていないと考えられる。また、血管内皮細胞に接着、および血管内皮細胞間隙に潜りこみ始めるリンパ球の頻度は ATX 阻害剤の投与により減少しなかったため、ATX 阻害剤は主にリンパ球の血管内皮細胞下層から組織実質への移動を抑制しており、リンパ球の接着および血管内皮細胞への初期の潜りこみには影響を与えていないと考えられた。二光子イメージングにより観察されたように、ATX 阻害剤 HA130 により誘導された HEV 血管内皮細胞下層におけるリンパ球の蓄積

は LPA の投与により解除された。これらの結果から、ATX/LPA はリンパ球の基底膜の通りぬけを促進することで血管外移動を促進することが示された。

### **ATX/LPA は HEV 血管内皮細胞の運動性を亢進し、ミオシン II 依存的にリンパ球と血管内皮細胞の活発な相互作用を促進する**

われわれは次に、どのように ATX/LPA がリンパ球の HEV 基底膜からの通りぬけを促進するかについて検討した。私の属する研究室では以前に、LPA は HEV 血管内皮細胞の形態変化を誘導すると報告していることから [9]、まず、HEV 血管内皮細胞に対する LPA の影響を検討した。単離 HEV 血管内皮細胞に LPA および LPC を添加したところ、これまでの報告と同様に [9]、LPA および LPC はいずれも HEV 血管内皮細胞に顕著な細胞骨格の変化を誘導した (図 7A)。HA130 および BrP-LPA は LPC により誘導される形態変化を抑制したが、HA130 は LPA により誘導される形態変化を抑制しなかった。これらの結果は、HEV 由来の ATX によって LPC が LPA に変換され、LPA は HEV 血管内皮細胞に作用してその運動性を促進するという仮説と合致する。

われわれは次に、HEV 血管内皮細胞とリンパ球の相互作用における ATX/LPA の作用を、ライブイメージングの手法を用いて検討した。図 7B に示すように、タイムラプス解析の結果、単離 HEV 血管内皮細胞は非常に活発にリンパ球の血管内皮細胞への結合および血管内皮細胞下面への潜り込みを誘導した。血管内皮細胞に結合したリンパ球は細胞下面へと潜り込み、一旦下面でしばらくとどまった後に、下面から細胞外へと移動した。この実験系に ATX 阻害剤 HA130 を添加すると、血管内皮細胞下面に潜り込んだリンパ球の細胞外への移動が主に抑制され、次いで LPA を添加すると、その抑制効果は解除され、再びリンパ球の血管内皮細胞との活発な相互作用が認められるようになった。

HEV 血管内皮細胞は LPA 受容体の中で LPA<sub>4</sub> および LPA<sub>6</sub> を発現しており (data not shown)、これらの受容体は Rho/Rho-associated kinase (ROCK)-ミオシン II 依存的にシグナルを伝えることが報告されている [11]。そこで、ATX/LPA 依存的なリンパ球と血管内皮細胞との相互作用における ROCK-ミオシン II シグナリングの関与について検討した。図 7C で示すように、HEV 血管内皮細胞およびリンパ球をミオシン II 阻害剤であるブレビスタチンで同時に処理すると、リンパ球の血管内皮細胞からの脱離が顕著に抑制されたが、この抑制効果は G タンパク質 G<sub>i</sub> 阻害剤である百日咳毒素では見られなかった (data not shown)。HEV 血管内皮細胞のみをブレビスタチンで処理すると、HEV 血管内皮細胞のラッフル膜形成が抑制され (図 7D)、また ATX 阻害剤の添加時に見られたような血管内皮細胞下面から細胞外へのリンパ球の移動が抑制されたことから (図 7E)、少なくとも血管内皮細胞における ROCK-ミオシン II シグナルがリンパ球の血管内皮細胞からの脱離に重要であることが示唆

された。これらの結果は、ATX の生成物である LPA は、ミオシン II 依存的、G<sub>i</sub>非依存的に HEV 血管内皮細胞の運動性を制御しており、この制御は可逆的なリンパ球と HEV 血管内皮細胞の接着および脱離に重要であるという考えを支持する。

以上の結果をもとに、HEV を介したリンパ球の血管外移動における ATX/LPA の役割を模式的に示す (図 9)。ATX/LPA はリンパ球のローリング、接着および血管内皮細胞の潜り込みの初期には作用しないが、リンパ球の HEV 基底膜から組織実質への血管外移動に重要な役割を果たす。まず、ATX は HEV 血管内皮細胞から分泌され、ヘパラン硫酸のようなグリコサミノグリカンによって血管内皮細胞上に固相化される。固相化された血管内皮細胞上の ATX は血中に循環する LPC を局所的に LPA に変換し、LPA は血管内皮細胞上の LPA 受容体 (おそらく LPA<sub>4</sub> または LPA<sub>6</sub>) に結合する。LPA 受容体を介したシグナルは、血管内皮細胞の運動性、透過性およびリンパ球の血管内皮細胞からの脱離を亢進することで、リンパ球の HEV 基底膜側からリンパ節実質への移動を促進する。

## 考察

本研究では、HEV を介したリンパ球の潜り込みにおいて、その最終ステップである血管外移行 (すなわち、HEV 基底膜からの通り抜け) が ATX/LPA により制御されることを示した。HEV 血管内皮細胞は LPA 産生活性をもつ ATX を分泌しており、分泌された ATX は生体内で HEV の内腔側に固相化されていた。この知見と合致して、ATX の産物である LPA は *in vivo* で HEV 近傍に局在していた。さらに、ATX および LPA 受容体の阻害剤である BrP-LPA [25] を投与すると HEV を介したリンパ球の血管外移動が顕著に抑制され、選択的 ATX 阻害剤である 3-ccPA [20] や HA130 [24] の投与も同様に血管外移動を抑制し、その抑制効果は ATX の最終産物である LPA の投与によって解除された。

3-ccPA よりも BrP-LPA による抑制効果が高かったことに関して、少なくとも 2 つの可能性が考えられる。一つ目は、BrP-LPA は ATX および LPA 受容体の両方を阻害するので、3-ccPA のような選択的 ATX 阻害剤よりも HEV 血管内皮細胞に強い効果を発揮したという可能性である。二つ目は、LPA 受容体はリンパ節の HEV 血管内皮細胞以外にも発現しているので、BrP-LPA は LPA 受容体阻害によって他の細胞にも作用していたのかもしれないという可能性である。この可能性を完全に除外することはできないが、結晶構造解析より ATX の活性中心に嵌り込むことが示されている選択的 ATX 阻害剤 HA130 [24] もホールマウント顕微鏡解析や電子顕微鏡を用いた解析において BrP-LPA と同様の効果を示しているため、この可能性は少ないと考えられる。また、3-ccPA は LPA<sub>5</sub> の弱いアゴニストとしても報告されているが [26]、HEV 血管内皮細胞には LPA<sub>5</sub> は発現していない。

生体二光子イメージング、ホールマウント顕微鏡、電子顕微鏡を用いた解析により、HA130 の皮下投与は、所属リンパ節の HEV 血管内皮細胞下層におけるリンパ球の著しい蓄積が誘導されることが明らかになった。これらの結果から、HA130 は主にリンパ球が HEV 基底膜を通り抜ける過程を阻害しており、リンパ球のローリング、接着および血管内皮細胞への初期の潜り込みには殆ど作用していないと判断される。また、HA130 を皮下投与後の所属リンパ節における濃度に相当すると考えられる濃度で用いても、リンパ球の CCL21 に対するケモタキシスに影響は見られなかったことから、HA130 が非特異的にリンパ球の移動を阻害したという可能性は考えにくい。

私が所属する研究グループは以前に、LPA<sub>1</sub> および LPA<sub>3</sub> の阻害剤である Ki16425 が単離 HEV 血管内皮細胞の運動性を抑制すると報告しているが [9]、今回、予想に反して、Ki16425 は *in vivo* においてリンパ球の血管外移動を阻害しなかった。HEV 血管内皮細胞は LPA 受容体の中で Ki16425 非感受性の LPA<sub>4</sub> および LPA<sub>6</sub> しか発現していないことから (data not shown)、LPA<sub>4</sub> および LPA<sub>6</sub> を介したシグナルがリンパ球と HEV 血管内皮細胞の相互作用

用に重要である考えられる。また、LPA<sub>1</sub>はHEV血管内皮細胞には発現していないがHEV周囲の網状細胞であるFRCに高発現していることから、以前の報告では、非HEV血管内皮細胞が「単離」HEV血管内皮細胞の集団にわずかに混入し、Ki16425により阻害効果が観察された可能性が考えられる [9]。

本研究では、ATX阻害剤を皮下投与したときの所属リンパ節においてのみリンパ球トラフィッキングにおける抑制効果が観察された。一方、これらの阻害剤を静脈投与した際には、リンパ球のトラフィッキングにあまり影響が認められなかった。これは、おそらく、阻害剤血中投与の場合には、阻害剤が急速に血中から除去されたからであると考えられる。阻害剤の一つであるHA130は*in vitro*では効果が持続するが、マウス投与時には投与後数分しか血中LPA濃度を減少させることはできない [24]。それゆえ、われわれは阻害剤を足蹠から投与し、所属リンパ節においてその阻害効果を検討したところ、阻害剤は徐々に皮下から所属リンパ節に流れ込み、その効果を1時間以上保持させることができた。しかし、一旦血中に流れこむと、阻害剤は急速に分解されると考えられるので、全身的な作用は認められなかった。このような理由により、静脈投与よりも皮下投与の方が効果を長く持続させることができると考えている。また、上記で述べられたように今回使われたATX阻害剤はどれも同じ効果を誘導しており、これらの効果は特異的な効果であると思われる。

本研究から考えられる明らかな疑問は、「ATX/LPAはどのようなメカニズムにより、リンパ球の基底膜からの通りぬけを制御しているのか」ということである。ATX/LPAは積極的に移動を促進するのか、または、リンパ球の局所的な停滞などリンパ球トラフィッキングにネガティブに作用するシグナルを抑制するのだろうか。一つの可能性は、LPAシグナルが血管内皮細胞下へと潜り込んだリンパ球と血管内皮細胞の接着を弱めることにより、リンパ球の血管内皮細胞下面からリンパ節実質への移動を促進しているということである。この点に関して、Mionnetらは [27]、HEV血管内皮細胞がポケット状の構造を血管内皮細胞下面に持っておりリンパ球はリンパ節実質に入る前の数分間その構造の中で保持されると報告をしている。ATXの阻害はHEV血管内皮細胞下層へのリンパ球の顕著な蓄積を誘導し、その蓄積は局所的LPA投与により解除されたという結果は、HEVのポケット状構造における一過的なリンパ球の蓄積がATX/LPAにより制御されるという可能性を示唆する。リンパ球とHEV血管内皮細胞の接着を弱めるメカニズムに関しては、LPA<sub>4</sub>およびLPA<sub>6</sub>の下流にあるG<sub>12</sub>の関与が考えられる。G<sub>12</sub>は、接着斑キナーゼ (focal adhesion kinase) およびパキシリンの脱リン酸化を誘導することで接着斑からインテグリンの解離を誘導することが報告されている [28]。また、LPAが血管内皮細胞の運動性を促進することにより、リンパ球と血管内皮細胞の接着を抑制しているという可能性も考えられる。この点に関して、LPAはRhoシグ

ナル依存的に血管内皮細胞の形態変化を誘導することで血管透過性を促進するという報告もある [13,29]。最近の研究により、HEV 血管内皮細胞にも発現している LPA<sub>6</sub> が G<sub>13</sub>-Rho シグナル依存的に血管内皮細胞の形態変化を誘導することが明らかになった [30]。LPA 受容体を介したシグナリングおよび ATX/LPA を介したリンパ球の血管内皮細胞下面からの脱離のメカニズムに関しては、さらなる研究が必要である。

LPA は *in vitro* では生体で作用する濃度で ATX による LPA の産生を抑制しうること [31] が報告されていることから、HEV において ATX/LPA 活性を恒常的に制御する可能性が考えられる。この点、新しく産生された LPA は血中において血管内皮細胞などが発現する脂質リン酸ホスファターゼにより、すみやかに分解されることが報告されている [32]。また、内腔側の血液の流速が HEV における LPA の過剰な蓄積を妨げている可能性も考えられる。

本研究では、LPA の HEV 血管内皮細胞に対する影響を検討したが、以前に Kanda らは、LPA がヒトの末梢血 T 細胞のケモキネシスを誘導することを示している [10]。この論文によると、LPA はマウスリンパ球に対してケモタキシスは誘導せず弱いケモキネシスを誘導した。私の予備的検討では、リンパ球は LPA<sub>2</sub>、LPA<sub>5</sub> および LPA<sub>6</sub> を発現しており (data not shown)、LPA<sub>5</sub> および LPA<sub>6</sub> ノックアウトのリンパ球を移入しても、野生型と同程度にしかリンパ節に移入しなかったが、LPA<sub>2</sub> ノックアウトマウスのリンパ球は野生型のリンパ球よりも効率的にリンパ節へと移動した (data not shown)。このことは、LPA<sub>2</sub> はリンパ球の HEV を介したリンパ節への移動を負に制御する因子であることを示唆するとともに、リンパ球トラフィッキングを正に制御するリンパ球上の受容体は別に存在するのか、あるいは HEV 血管内皮細胞上の LPA 受容体がリンパ球トラフィッキングにおいて重要であるという可能性を提示している。Zhang ら [33] は、マウスナイーブリンパ球は Mn<sup>2+</sup> によって活性化されうる ATX の受容体を発現しており、リコンビナント ATX で前処理したリンパ球は、少なくとも *in vitro* で血管内皮細胞層により効果的に潜り込んだと報告している。また、リンパ球の ROCK-ミオシン II シグナルを阻害すると、*in vivo* においてリンパ球の HEV を介した血管外移動が抑制されると報告されている [34]。これらのことから、HEV 血管内皮細胞単独あるいは血管内皮細胞とリンパ球の両者のシグナルが HEV を介した血管外移動を正に制御するのか今後の検討が必要である。また、HEV 血管内皮細胞を裏打ちする周皮細胞も ATX を発現していることから、今後、周皮細胞由来の ATX がリンパ球の血管外移行を制御している可能性に関しても検討を行う必要がある。

以上の結果から、ATX/LPA は HEV を介したリンパ球血管外移行の重要な制御因子であることが明らかになった。ATX/LPA の阻害により、リンパ球は急速に血管内皮細胞下層に蓄積し、リンパ節実質へのリンパ球の移動が抑制された。LPA はこの阻害効果を解除し、

リンパ球の組織実質への移動を誘導した。本研究は、リゾリン脂質がリンパ球のトラフィッキングを促進するという概念を強く支持するとともに新たな展開をもたらすものである。すなわち、スフィンゴシン-1-リン酸がリンパ球のリンパ洞からリンパ節外への移動を制御するのに対して [35]、ATX/LPA はリンパ球の HEV からリンパ節実質への移動を制御する。リンパ球トラフィッキングにおける ATX/LPA の生物学的重要性をさらに検討するため、現在われわれは ATX のコンディショナルノックアウトマウスを作成中である。



## 実験材料、手法

### マウス

C57BL/6J マウスは、日本 SLC およびクレアから購入した。CAG-GFP トランスジェニック マウスは、岡部勝教授から譲渡を受けた [36]。マウスは大阪大学医学部動物実験施設で飼育され、すべての動物実験は大阪大学医学系研究科の動物実験委員会の規定に従い実施した。

### 試薬

HA130 は過去の文献に従って合成された [24]。BrP-LPA は Echelon Biosciences より購入した。3-ccPA 18:1 (3-ccPA) および Ki16425 は Cayman Chemical より購入した。Ki16425 および HA130 は DMSO に溶解後、0.1% (w/v) fatty acid-free ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) (PBS-BSA) で希釈した。BrP-LPA は直接 PBS-BSA に溶解した。3-ccPA はクロロホルムに溶解し、クロロホルムを揮発させた後に PBS-BSA に溶解し、5 分間、超音波処理を行った。これらの阻害剤は実験に使う直前に至適濃度に希釈した。Fatty acid-free BSA は Sigma から購入し、LPA は Biomol international から購入した。1-Myristoyl-LPC (14:0) および 1-lynoleoyl-LPC (18:2) はそれぞれ Avanti Polar Lipids および Doosan Serdary Research Laboratories より購入した。百日咳毒素およびブレビスタチンはそれぞれ Calbiochem および Sigma から購入した。抗 PNA<sub>d</sub> 抗体 (MECA79; ラット IgM) は、ハイブリドーマを接種したマウスの腹水からゲルろ過クロマトグラフィーにて精製した (Toyopearl TSK HW55: Tosoh)。抗 PV-1 抗体 (MECA32; ラット IgG) および抗 ATX 抗体 (S9A9; ラット IgG) [9] は HiTrap Protein G カラムを用いて精製した (GE Healthcare)。

### 透過型電子顕微鏡による解析

ATX の局在は、抗 ATX モノクローナル抗体 S9A9 [9] を用いて免疫電子顕微鏡法により検討した [37]。ATX の阻害によるリンパ球の局在への影響を検討するためには、透過型電子顕微鏡を用いて解析した。この目的のため、マウスの足蹠に BrP-LPA (200  $\mu$ M)、HA130 (1  $\mu$ M)、HA130 + LPA (200  $\mu$ M) あるいは溶媒を投与し、その 45 分後に心臓に 2% グルタルアルデヒド、4% パラホルムアルデヒド溶液を投与することにより、マウスを灌流固定した。摘出した上腕リンパ節および鼠径リンパ節を洗浄後、2% 四酸化オスミウムでさらに固定し、段階的な高濃度エタノール処理により脱水した。ついで、酸化プロピレンを浸透させ、Quetol 812 エポキシ樹脂に包埋した。超極薄切片は 2% 酢酸ウラニルおよびレイノルズ処方のクエン酸鉛溶液によって染色後、JEM-1230 電子顕微鏡 (JEOL) により解析した。

### マウスリンパ節からの HEV 血管内皮細胞の単離

PNAd 陽性の HEV 血管内皮細胞は、プールしたマウスの腸間膜リンパ節および末梢リンパ節から、過去の文献に従って単離した [38]。その純度は 86%以上であり、 $\alpha$ -smooth muscle actin 陽性周皮細胞の混入率は 2%以下であった。

### HEV 血管内皮細胞の培養上清に含まれる ATX 活性測定

単離 PNAd 陽性 HEV 血管内皮細胞をコラーゲン I コーティング済み 96 ウェルプレート (BD Bioscience) に播種し ( $\sim 2 \times 10^5$  cells/well)、ATX 除去済みの 15% ウシ胎児血清 (fatal bovine serum: FCS) を添加したフェノールレッドフリーのダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium: DMEM) で培養した。4 時間培養した後、培養上清中の ATX 活性をコリン基解離能を指標に測定した [9]。

### イメージングマスマスペクトロメトリーおよびタンデム質量スペクトル分析

凍結組織切片 (厚さ 5  $\mu$ m) を、酸化インジウムスズによってコーティングされたガラススライド (Bruker Daltonics) にマウントした。マトリックスコンパウンドとして 70%エタノールに溶解した 9-アミノアクリジン (10 mg/ml) を用いた。塩の除去のため、マトリックス噴霧の前に、組織切片を 0.03%ギ酸塩で 30 秒間洗浄した。各組織の連続切片を MALDI イメージングマスマスペクトロメトリー (IMS) および免疫組織染色により解析した [15]。IMS 解析は、過去の文献に従い、355 nm の Nd:YAG レーザーを装着した MALDI-QIT-TOF-質量分析装置を用いて行った [39]。LPA 特異的シグナルの同定および検出のため、LPA (18:0)、LPA (18:1)、LPA (18:2)、LPA (20:4) のシグナルを含んだ  $m/z$  437, 435, 433, 457 のイオンを衝突誘起解離によりフラグメント化し、その生成イオンを解析した。 $m/z$  153 のイオンシグナルは LPA 特異的フラグメントイオンに対応する。タンデム質量分析 (MS/MS) イメージング解析は、陰イオン検出モードにて、40  $\mu$ m のレーザースキャン間隔で行った。画像の再構築は BioMap ソフトウェア (Novartis) を用いて行った。IMS に使用した切片の連続切片は Alexa Fluor 488-標識 MECA-79 およびヘキスト 33342 で免疫組織染色した。

### FACS 解析によるリンパ球トラフィックングアッセイ

BrP-LPA (200  $\mu$ M)、3-ccPA (250  $\mu$ M)、Ki16425 (200  $\mu$ M) あるいは溶媒をマウス足蹠に皮下投与した (前足には 30  $\mu$ l、後足には 50  $\mu$ l)。60 分後、これらのマウスに GFP 陽性リンパ球を経静脈的に投与した ( $2 \times 10^7$  cells/mouse)。細胞投与 30 分後、上腕リンパ節、鼠径リンパ節および脾臓を回収し、これらの組織における GFP 陽性の細胞の割合をフローサイトメータ

ー (FACSCanto II; BD Biosciences) にて解析した。得られたデータは GraphPad Prism 4 (GraphPad Software) を用いて解析した。

#### ホールマウント解析によるリンパ球トラフィックアッセイ

GFP 陽性のリンパ球 ( $2 \times 10^7$ /mouse) および Alexa Fluor 594 標識された MECA32 抗体 (10  $\mu$ g) を静脈投与し、その 15 分後にマウスを安楽死させてから PBS および 4%パラホルムアルデヒドで灌流した。回収したリンパ節は段階的に濃度を上げたスクロースで処理した (10, 20, 30%) 後に共焦点レーザー顕微鏡にて観察した (FV1000-D: Olympus)。HEV 内あるいはリンパ節実質内に存在する GFP 陽性細胞数は ImageJ ソフトウェアを用いて定量した。

#### HEV における血液流速測定

血液の流速は過去の文献に従って定量した [40]。6 箇所 HEV から流速を測定した。

#### リンパ球のローリングおよび接着の解析

BrP-LPA (200  $\mu$ M)、3-ccPA (250  $\mu$ M)、Ki16425 (200  $\mu$ M) あるいは溶媒をマウスの足蹠に皮下投与した (前足には 30  $\mu$ l、後足には 50  $\mu$ l)。その 60 分後に、GFP 陽性のリンパ球 ( $2 \times 10^7$ /mouse) を静脈投与した。HEV は 5 つのセグメントに分けることができ [40]、セグメント III から V (直径は 20 から 60  $\mu$ m である) においてローリングしたリンパ球数とその流速および接着リンパ球数をそれぞれ、蛍光顕微鏡 (IX71; Olympus) 下でビデオレコーダー (DCR-TRV50; Sony) に記録して解析した。

#### 生体多光子顕微鏡を用いた解析

マウスを 2.5%イソフルランにて全身麻酔し、顕微鏡下で PE-10 ポリエチレンカテーテルを左内頸静脈に挿入した。BrP-LPA、3-ccPA、Ki16425 をマウスの右足蹠に投与後、右鼠径リンパ節を外科的に露出させ、多光子顕微鏡下に固定した。その後、ローダミン B イソチオシアネート-デキストラン (分子量 70 kDa、Sigma、10  $\mu$ g/ml、100  $\mu$ l/mouse) および GFP 陽性リンパ球を頸静脈から投与した。実験の間、マウスの体温を 37°C に保ち、2.5%イソフルランにより麻酔下においた。画像は Leica TCS SP5 多光子顕微鏡において 20 倍の水浸対物レンズを用いて取得した。二光子励起はチタンサファイアレーザー Mai Tai (Spectra-Physics) によって行い、レーザー光は分散補正装置 FemtoControl (Angewandte Physik und Elektronik) により波長 800 nm に調整した。500-550 nm (GFP)、565-605 (ローダミン) の蛍光波長は NDD 検出器 (non-descanned detection) により獲得した。また、各 xy 平面の画像は 0.377  $\mu$ m/pixel の分解能、387 x 193  $\mu$ m の範囲で、z 軸の画像は 3  $\mu$ m の間隔で 19 枚の画像をタイムラプス

で(30秒ごと、合計30分間)取得した。得られた画像データはImarisソフトウェア(Bitplane)により解析した。

#### HEV 血管内皮細胞におけるアクチンフィラメントの可視化

単離 HEV 血管内皮細胞をコラーゲン I でコーティングした 8-ウェルスライドに播種し ( $5 \times 10^4$  cells/well)、20% FCS を含む DMEM 中で 2 時間培養した。非接着細胞を PBS で洗浄して取り除いた後に、BrP-LPA、3-ccPA、HA130 あるいは溶媒を含む培地で 1 時間培養し、さらに LPA あるいは LPC ( $10 \mu\text{M}$ ) を含んだ培地で培養した。洗浄後に、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 20 分間固定し、0.1% Triton X-100 を含んだ PBS で 3 分間、透過処理をした。1% BSA を含む PBS で処理した後に、Alexa Fluor 488-phalloidin (1 U/ml; Life Technologies) を 15 分間添加し、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP5) にて観察した。形態的に変化した HEV 血管内皮細胞は、顕著な糸状仮足 (filopodia) あるいは葉状仮足 (lamellipodia) を示した細胞として定義した。

#### HEV 血管内皮細胞とリンパ球との相互作用の in vitro タイプラプス解析

リンパ節のストローマ画分およびリンパ球を、20% FCS を含む DMEM 培地で再懸濁し、コラーゲン I でコーティングした 8-ウェルカバーガラススライド (Lab-Tek chambered cover glass; Thermo Scientific) に播種した。4 時間後、非接着細胞を除去し、MECA79 陽性 HEV 血管内皮細胞およびリンパ球は、100 倍の対物レンズ (Olympus) および CCD カメラ (ORCA-03G; Hamamatsu Photonics) を装着した位相差顕微鏡 (IX71; Olympus) を用いて、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の環境下で 1 秒ごとに 30 分間、撮影した。

#### 統計学的解析

データは数値±標準偏差として表した。2 群間の比較はスチューデント t 検定を用いて行った。

## 図表及び注釈

### 図 1. ATX は HEV 血管内皮細胞および周皮細胞により産生され、血管内皮細胞表面に固相化される

(A) 末梢リンパ節を抗 ATX 抗体 (S9A9) あるいはラット IgG2a (Alexa Fluor 594; 赤) および抗 PV-1 抗体 (MECA32, Alexa Fluor 647; 青) を用いて免疫組織染色した。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を表す。(B) 免疫電子顕微鏡解析により、ATX は血管内皮細胞および周皮細胞に発現することが示された。スケールバーは 2  $\mu\text{m}$  を表す。(C) HEV 血管内皮細胞は生理的活性をもつ ATX を分泌する。コントロールとして培養細胞株 MBEC4 および MBEC4-ATX を用いた。データは 3 回の独立した実験の代表であり、数値士標準偏差として表す。(D) 単離 HEV 血管内皮細胞を精製 ATX (200 nM) と 0.2% BSA を含む DMEM 中で 2 時間培養した。実験によっては、2 価イオンをキレートするために 10 mM EDTA を加えた。ブロッキングした後に、細胞を Alexa Fluor 647-ラット抗 ATX 抗体あるいは Alexa Fluor 647-ラット IgG で染色した。2 回の独立した実験の代表的なデータを示す。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 、スチューデント t 検定により p 値を算出した。

### 図 2. ATX はリンパ球の接着や血管外移動を起こす HEV の管腔面に発現する

Alexa Fluor 594 標識 MECA-79 抗体 (15  $\mu\text{g}$ ) および Alexa Fluor 647 標識抗 ATX 抗体 (20  $\mu\text{g}$ ) を、マウスを安楽死させる 10 分前に静脈投与した。GFP 陽性の脾臓細胞 ( $2 \times 10^7$ /mouse) を静脈投与し、図中に表記された時間後に末梢リンパ節 (A) および腸間膜リンパ節 (B) を回収し、ホルマウント顕微鏡解析した。Alexa Fluor 594-ラット IgM および Alexa Fluor 647-ラット IgG (15  $\mu\text{g}$ ) は抗体投与のネガティブコントロールとして用いた。3 つの独立した実験の代表を示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を表す。

### 図 3. LPA はリンパ節の HEV 近傍に局在する

(A) MALDI-MS/MS 解析による LPA 種の検出。LPA (18:0)、LPA (18:1)、LPA (18:2) および LPA (20:4) のシグナルを含む  $m/z$  437、435、433 および 457 の前駆イオンを衝突誘起解離によりフラグメント化し、生成したシグナルを解析した。 $m/z$  153 におけるシグナルは LPA 特異的フラグメントイオンを表す。(B) 末梢リンパ節および骨格筋における  $m/z$  437、435、433 および 457 である前駆イオンの MALDI-MS/MS スペクトル。これらのスペクトルには LPA 特異的シグナル ( $m/z$  153) および非特異的シグナル ( $m/z$  435 のスペクトルにおける  $m/z$  255 および  $m/z$  433 のスペクトルにおける  $m/z$  239) が観察される。(C) リンパ節における LPA 分子種の分布。LPA (18:1)、LPA (18:2)、LPA (20:4)由来シグナルは、末梢リンパ節の連

続切片上において MECA79 陽性シグナルと重なる頻度が高かった。 **(D)** HEV から表記の距離に局在する LPA シグナルの割合。 データは 2 回の独立した実験の代表である。 F; Follicle (濾胞)

#### 図 4. 局所的な ATX/LPA の阻害はリンパ球のリンパ節への移入を抑制する

**(A)** BrP-LPA (200  $\mu$ M)、3-ccPA (250  $\mu$ M)、Ki16425 (200  $\mu$ M) あるいは溶媒 (0.1% BSA, 0.2% DMSO in PBS) をマウス足蹠に皮下投与し (前肢に 30  $\mu$ l、後肢に 50  $\mu$ l)、その 60 分後に GFP 陽性リンパ球 ( $2 \times 10^7$ /mouse) を静脈投与した。細胞投与 30 分後、上腕および鼠径リンパ節を回収し、フローサイトメーターで解析した。縦軸は、阻害剤を投与したマウスにおける GFP 陽性細胞の割合/溶媒を投与したマウスにおける GFP 陽性細胞の割合の比率である。 **(B)** HEV における血中の流速を ATX/LPA の阻害剤投与 30 分後および 60 分後に測定した。6 つの HEV から各々の流速を測定した。 **(A)** のデータは 3 回の独立した実験の代表であり (各々の実験は 1 群につき 3 匹のマウスを用いた)、 **(B)** のデータは 1 群につき 3 匹のマウスを用いた実験の平均値を表す。 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 、ns は有意差なしを表す。

#### 図 5. ATX/LPA はリンパ球の血管外移動を制御する

**(A, B)** BrP-LPA (200  $\mu$ M)、3-ccPA (250  $\mu$ M)、Ki16425 (200  $\mu$ M) あるいは溶媒をマウス足蹠に皮下投与し、60 分後に GFP 陽性のリンパ球 ( $2 \times 10^7$ /mouse) を静脈注射した。HEV は 5 つのセグメントに分けることができ、セグメント III から V 間でローリングするリンパ球の頻度 (左図)、および速度 (右図)、同じセグメントに接着したリンパ球数を生体顕微鏡を用いて解析した。 **(C)** HA130 (1  $\mu$ M) あるいは溶媒をマウスの足蹠に投与した 45 分後に LPA (200  $\mu$ M) あるいは溶媒を投与した。その 30 分後、GFP 陽性のリンパ球 ( $2 \times 10^7$ /mouse) および Alexa Fluor 594-MECA32 (10  $\mu$ g) を静脈投与し、15 分後にマウスを安楽死させた。ホールマウント顕微鏡解析は、末梢リンパ節および腸間膜リンパ節において行った。スケールバーは 100  $\mu$ m を表す。 **(D)** これらリンパ節の画像を解析して (一つのリンパ節において 60 枚以上) リンパ球の組織実質への移動を定量化した。一枚の画像における全体の GFP 陽性リンパ球数は ImageJ ソフトウェアを用いて算出した。HEV 内部および周囲の細胞は手作業で数え、この数を全体の細胞数から差し引くことでリンパ節実質に移動したリンパ球数とした。また、各々の群において HEV の数に違いはなかった。組織実質内に存在する細胞の割合は、組織実質に移動した細胞数/全体の細胞数の比率として計算した。 **(E)** 二光子顕微鏡を用いた鼠径リンパ節のタイムラプス観察の代表的画像を示す。血管は、ローダミン-デキストラン (赤) を静脈投与することにより可視化し、HEV はその形態学的特徴から識別した。得られた画像を Imaris ソフトウェアによって解析し、光学的切片を 4D イメージへと変換した。この解

析により、ローダミン-デキストランで満たされた HEV の基底膜側もしくは内腔側のどちらに GFP 陽性リンパ球がいるのか識別可能である。すなわち、基底膜側のリンパ球は背景の赤いシグナルが検出されず、緑に見える。(F) BrP-LPA、3-ccPA、Ki16425、溶媒を皮下投与したマウスの鼠径リンパ節において、HEV から血管外移動したリンパ球の定量的解析を行った。(A-E) のデータは 3 回以上の独立した実験から得ており、(F) は 8 回以上の独立した 4D データから得た。

#### 図 6. ATX/LPA はリンパ球の HEV 基底膜における通りぬけを促進する

(A) BrP-LPA、HA130、HA130 および LPA、あるいは溶媒を投与したマウスの所属リンパ節における HEV の透過型電子顕微鏡像。スケールバーは 2  $\mu\text{m}$  を表す。リンパ球 (緑) の HEV 血管内皮細胞 (黄) 下面あるいは血管周囲腔内における局在を示すために色を付けている (各々のパネルの右図)。基底膜は青く色付けした。阻害剤の投与 45 分後に、リンパ節を回収した。内腔の狭窄化および HEV 血管内皮細胞下層におけるリンパ球の蓄積は、BrP-LPA あるいは HA130 を投与したマウスにおいて様々な程度で観察された (slight、moderate、prominent)。LPA の同時投与は内腔の狭窄化およびリンパ球の蓄積を解除した。(B) 一つの HEV 血管内皮細胞あたりの内皮細胞下層に蓄積したリンパ球数。各々の群において 5 から 13 の HEV を定量的に解析した。

#### 図 7. ATX/LPA は血管内皮細胞の運動性を亢進させ、ミオシン II 依存的にリンパ球の血管内皮細胞からの脱離を促進する

(A) LPA あるいは LPC により誘導される HEV 血管内皮細胞の形態変化および ATX/LPA 阻害剤の形態変化に対する効果。単離 HEV 血管内皮細胞を BrP-LPA、HA130 あるいは溶媒と共に培養し、その後、10  $\mu\text{M}$  LPA、10  $\mu\text{M}$  LPC あるいは溶媒を添加した。Y 軸は形態変化を示した HEV 血管内皮細胞/通常の HEV 血管内皮細胞の比率を表す。形態変化を示した HEV 血管内皮細胞は、顕著な糸状仮足あるいは葉状仮足をもつ細胞として定義した。各々の群は、100 個以上の HEV 血管内皮細胞を計測した。データは 2 回の独立した実験の代表的なものであり、平均値±標準偏差として表した。(B) リンパ球と HEV 血管内皮細胞の相互作用の *in vitro* タイムラプスイメージング。画像は連続的なタイムラプス動画の 1 フレームである。リンパ節のストローマ画分をリンパ球と共にディッシュに播種し、血清含有培地で 4 時間培養した後に、位相差顕微鏡下に置いた。非接着細胞を洗浄後、MECA-79 抗体によって同定した HEV 血管内皮細胞 (黄色、点線) とリンパ球の相互作用を 30 分間、撮影した (untreated, 上段)。HA130 (500 nM) を添加した後、同一の HEV 血管内皮細胞を 30 分間、撮影し (中段)、さらに LPA (20  $\mu\text{M}$ ) を添加し 30 分間、撮影した (下段)。HEV 血管内皮細胞下

面を動きまわるリンパ球を青、血管内皮細胞下面に潜り込むリンパ球を緑、下面から外に出るリンパ球を赤で示した。(C) ミオシン II の阻害がリンパ球と HEV 血管内皮細胞の相互作用に与える影響。HEV 血管内皮細胞を血清含有培地で培養した後、20 分間撮影した (untreated、上段)。ミオシン II の阻害剤であるブレビスタチンを添加後、同一の HEV 血管内皮細胞をさらに撮影した (50  $\mu$ M、下段)。(D) ブレビスタチンが HEV 内皮細胞の運動性に与える影響。HEV 血管内皮細胞を血清含有培地で培養した後、20 分間撮影した (untreated、上段)。同じ HEV 血管内皮細胞をブレビスタチンの存在下でさらに 20 分間撮影した (下段)。アローヘッドは HEV 血管内皮細胞のラッフル膜を指し、血管内皮細胞の細胞膜を点線で描いた。(E) HEV 内皮細胞におけるミオシン II シグナリングの阻害が、リンパ球と HEV 血管内皮細胞の相互作用に与える影響。リンパ節のストローマ画分およびリンパ球を血清含有培地で 4 時間培養した後、溶媒あるいはブレビスタチンで 30 分間処理した。細胞を洗浄後、薬剤処理を行っていない GFP 陽性リンパ球を添加し、リンパ球と HEV 血管内皮細胞の相互作用を観察した。薬剤未処理群 (上段) では、血管内皮細胞下面にリンパ球が観察され、下面へと潜り込むリンパ球 (赤アローヘッド) および、下面から外に出てくるリンパ球 (青矢印) が観察された。HEV 血管内皮細胞をブレビスタチンで処理すると (下段)、リンパ球の血管内皮細胞下面から細胞外への移行に影響を受けた。ブレビスタチンで処理されたリンパ球 (白い点線で囲んでいる) に加えて、新しく血管内皮細胞に添加された薬剤未処理の GFP 陽性のリンパ球 (赤い点線で囲んでいる) もまた、HEV 血管内皮細胞下面にトラップされたままであり、細胞外へと出ることができなかった。(B-E) 1000 倍の倍率で観察した。  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

#### 図 8. HEV を介したリンパ球の血管外移動における ATX/LPA の作用様式

リンパ球は多段階的に HEV と相互作用し、血管外移動する。[上段] (1)リンパ球はまずローリングおよび接着し、(2) 血管内皮細胞間隙へと潜り込み、(3) 血管内皮細胞下面においてとどまり、(4)血管周囲腔を通過して、(5) HEV から組織実質へと移動する。ATX/LPA はリンパ球と HEV 内皮細胞との初期の相互作用には関与しないが (ステップ 1、2)、HEV を介した血管外移行には必要不可欠である (ステップ 3、4、5)。HEV 内皮細胞およびその周囲の細胞によって産生された ATX は、少なくとも一部はヘパラン硫酸のようなグリコサミノグリカンによって HEV の管腔側に固相化される。HEV 内皮細胞に提示された ATX は血中の LPC を LPA に変換し、LPA は内皮細胞の運動性、透過性およびリンパ球の HEV 内皮細胞からの脱離を亢進し、リンパ球の HEV 基底膜からリンパ節実質への移動を促進する。[下段] ATX あるいは LPA 受容体の阻害は HEV 内皮細胞下面におけるリンパ球の貯留を誘導し、リンパ球のリンパ節実質への移動を抑制する。



## 謝辞

本研究の実施および論文執筆にあたってご指導ご鞭撻を賜りました未来戦略機構・宮坂昌之特任教授、免疫制御学・梅本英司准教授に深謝致します。また本研究において、実際の実験および解析にご協力頂いた Bai Zhongbin 博士、Linjun Cai 博士、イメージングマスペクトロメトリー解析にご協力頂いた慶応大学医学部・末松誠教授、杉浦悠毅講師、生体二光子顕微鏡解析においてご協力頂いた免疫学フロンティアセンター駒井豊准教授、電子顕微鏡解析においてご協力頂いた関西医療大学・東家一雄教授に深く感謝いたします。

## 参考文献

1. von Andrian UH, Mempel TR (2003) Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 3: 867-878.
2. Miyasaka M, Tanaka T (2004) Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol* 4: 360-370.
3. Umemoto E, Hayasaka H, Bai Z, Cai L, Yonekura S, et al. (2011) Novel regulators of lymphocyte trafficking across high endothelial venules. *Crit Rev Immunol* 31: 147-169.
4. Anderson ND, Anderson AO, Wyllie RG (1976) Specialized structure and metabolic activities of high endothelial venules in rat lymphatic tissues. *Immunology* 31: 455-473.
5. Gretz JE, Anderson AO, Shaw S (1997) Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. *Immunol Rev* 156: 11-24.
6. van Meeteren LA, Moolenaar WH (2007) Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Prog Lipid Res* 46: 145-160.
7. Tanaka M, Okudaira S, Kishi Y, Ohkawa R, Iseki S, et al. (2006) Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 281: 25822-25830.
8. Hausmann J, Kamtekar S, Christodoulou E, Day JE, Wu T, et al. (2011) Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat Struct Mol Biol* 18: 198-204.
9. Nakasaki T, Tanaka T, Okudaira S, Hirose M, Umemoto E, et al. (2008) Involvement of the lysophosphatidic acid-generating enzyme autotaxin in lymphocyte-endothelial cell interactions. *Am J Pathol* 173: 1566-1576.
10. Kanda H, Newton R, Klein R, Morita Y, Gunn MD, et al. (2008) Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs. *Nat Immunol* 9: 415-423.
11. Okudaira S, Yukiura H, Aoki J (2010) Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie* 92: 698-706.
12. van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, van Hinsbergh VW (2000) Role of RhoA and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: E127-133.
13. Panetti TS (2002) Differential effects of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid on endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1582: 190-196.
14. Ferry G, Tellier E, Try A, Gres S, Naime I, et al. (2003) Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-

- regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem* 278: 18162-18169.
15. Sugiura Y, Shimma S, Konishi Y, Yamada MK, Setou M (2008) Imaging mass spectrometry technology and application on ganglioside study; visualization of age-dependent accumulation of C20-ganglioside molecular species in the mouse hippocampus. *PLoS One* 3: e3232.
  16. Yukiura H, Hama K, Nakanaga K, Tanaka M, Asaoka Y, et al. (2011) Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish. *J Biol Chem* 286: 43972-43983.
  17. Nishimasu H, Okudaira S, Hama K, Mihara E, Dohmae N, et al. (2011) Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat Struct Mol Biol* 18: 205-212.
  18. van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, et al. (2006) Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* 26: 5015-5022.
  19. Xu X, Prestwich GD (2010) Inhibition of tumor growth and angiogenesis by a lysophosphatidic acid antagonist in an engineered three-dimensional lung cancer xenograft model. *Cancer* 116: 1739-1750.
  20. Baker DL, Fujiwara Y, Pigg KR, Tsukahara R, Kobayashi S, et al. (2006) Carba analogs of cyclic phosphatidic acid are selective inhibitors of autotaxin and cancer cell invasion and metastasis. *J Biol Chem* 281: 22786-22793.
  21. Ohta H, Sato K, Murata N, Damirin A, Malchinkhuu E, et al. (2003) Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 64: 994-1005.
  22. Pradere JP, Klein J, Gres S, Guigne C, Neau E, et al. (2007) LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 18: 3110-3118.
  23. Ma L, Matsumoto M, Xie W, Inoue M, Ueda H (2009) Evidence for lysophosphatidic acid 1 receptor signaling in the early phase of neuropathic pain mechanisms in experiments using Ki-16425, a lysophosphatidic acid 1 receptor antagonist. *J Neurochem* 109: 603-610.
  24. Albers HM, Dong A, van Meeteren LA, Egan DA, Sunkara M, et al. (2010) Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7257-7262.
  25. Zhang H, Xu X, Gajewiak J, Tsukahara R, Fujiwara Y, et al. (2009) Dual activity lysophosphatidic acid receptor pan-antagonist/autotaxin inhibitor reduces breast cancer cell migration in vitro and causes tumor regression in vivo. *Cancer Res* 69: 5441-5449.
  26. Tigyi G (2010) Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets. *Br J Pharmacol* 161: 241-270.

27. Mionnet C, Sanos SL, Mondor I, Jorquera A, Laugier JP, et al. (2011) High endothelial venules as traffic control points maintaining lymphocyte population homeostasis in lymph nodes. *Blood* 118: 6115-6122.
28. Kong T, Xu D, Yu W, Takakura A, Boucher I, et al. (2009) G alpha 12 inhibits alpha2 beta1 integrin-mediated Madin-Darby canine kidney cell attachment and migration on collagen-I and blocks tubulogenesis. *Mol Biol Cell* 20: 4596-4610.
29. Wojciak-Stothard B, Ridley AJ (2002) Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* 39: 187-199.
30. Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, et al. (2009) Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *J Biol Chem* 284: 17731-17741.
31. van Meeteren LA, Ruurs P, Christodoulou E, Goding JW, Takakusa H, et al. (2005) Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* 280: 21155-21161.
32. Brindley DN, Pilquil C (2009) Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J Lipid Res* 50 Suppl: S225-230.
33. Zhang Y, Chen YC, Krummel MF, Rosen SD (2012) Autotaxin through lysophosphatidic acid stimulates polarization, motility, and transendothelial migration of naive T cells. *J Immunol* 189: 3914-3924.
34. Soriano SF, Hons M, Schumann K, Kumar V, Dennier TJ, et al. (2011) In vivo analysis of uropod function during physiological T cell trafficking. *J Immunol* 187: 2356-2364.
35. Lo CG, Xu Y, Proia RL, Cyster JG (2005) Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J Exp Med* 201: 291-301.
36. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407: 313-319.
37. Tohya K, Kimura M (1998) Ultrastructural evidence of distinctive behavior of L-selectin and LFA-1 (alphaLbeta2 integrin) on lymphocytes adhering to the endothelial surface of high endothelial venules in peripheral lymph nodes. *Histochem Cell Biol* 110: 407-416.
38. Izawa D, Tanaka T, Saito K, Ogihara H, Usui T, et al. (1999) Expression profile of active genes in mouse lymph node high endothelial cells. *Int Immunol* 11: 1989-1998.
39. Kubo A, Ohmura M, Wakui M, Harada T, Kajihara S, et al. (2011) Semi-quantitative analyses of metabolic systems of human colon cancer metastatic xenografts in livers of superimmunodeficient NOG mice. *Anal Bioanal Chem* 400: 1895-1904.
40. von Andrian UH (1996) Intravital microscopy of the peripheral lymph node microcirculation in mice. *Microcirculation* 3: 287-300.

## 業績一覧

### 学術雑誌

1. Umemoto E, **Takeda A**, Jin S, Luo Z, Nakahogi N, Hayasaka H, Lee CM, Tanaka T and Miyasaka M. Dynamic changes in endothelial adhesion molecule nepmucin/CD300LG expression in physiology and pathology. *PLoS One* 8: e83681, 2013
2. Bai Z\*, Cai L\*, Umemoto E\*, **Takeda A\***, Tohya K, Komai Y, Veeraveedu PT, Hata E, Sugiura Y, Kubo A, Suematsu M, Hayasaka H, Okudaira S, Aoki J, Tanaka T, Albers HM, Ovaa H and Miyasaka M. (\*Z.B., L.C., E.U and A.T. contributed equally to this article): Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the autotaxin/lysophosphatidic acid axis. *Journal of Immunology* 190: 2036-2048, 2013.
3. Umemoto E, Hayasaka H, Bai Z, Cai L, Yonekura S, Peng X, **Takeda A**, Tohya K and Miyasaka M.: Novel regulators of lymphocyte trafficking across high endothelial venules. *Critical Reviews in Immunology* 31: 147-169, 2011.

### 国内雑誌

1. 白 忠彬、蔡 林君、梅本 英司、竹田 彰、池野 嵩、秦 枝里奈、早坂 晴子、宮坂 昌之 “リンパ球トラフィッキングをつかさどる新しい分子機構—生理活性脂質産生酵素オートタキシンとその産物リゾホスファチジン酸の役割— “、『炎症と免疫』、先端医学社、19号、450-455、2011

### 国際学会

Bai Z, Cai L, Umemoto E, Tohya K, Takeda A, Hata E, Hayasaka H, Tanaka T and ○Miyasaka M: “The autotaxin/lysophosphatidic acid axis regulates lymphocyte extravasation at lymph node high endothelial venules”, Keystone Symposium, 249, Colorado, USA (2012)

### 国内学会

#### 口頭発表

1. Takeda A, Umemoto E, Hata E, Sasaki N and Miyasaka M: “The role of LPA receptors in lymphocyte trafficking across high endothelial venules of lymph nodes”, 第42回日本免疫学会, 3-J-W56-6-O/P (2013)
2. Takeda A, Umemoto E and Miyasaka M: “The ATX/LPA axis regulates constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules”, 第3回Vivid Workshop, 20 (2013)

3. Takeda A, Umemoto E, Hata E and Miyasaka M: “Autotaxin-derived lysophosphatidic acid acts on high endothelial venule endothelial cells to promote lymphocyte-endothelial cell interactions”, 第41回日本免疫学会, 2-D-W28-4-O/P (2012)
4. Takeda A, Bai Z, Cai L, Hata E, Miyasaka M and Umemoto E: “The autotaxin/lysophosphatidic acid axis regulates lymphocyte-endothelial cell interaction in lymph node high endothelial venules”, 第3回Synthetic Immunology (2012)

ポスター発表

1. Takeda A, Umemoto E, Hata E and Miyasaka M: “Autotaxin-derived lysophosphatidic acid acts on high endothelial venule endothelial cells to promote lymphocyte-endothelial cell interactions”, TCUID, P14 (2012)
2. Takeda A, Umemoto E, Ikeno T, Bai Z and Miyasaka M: “Nepmucin/CD300LG promotes LPA-induced lymphocyte transcellular migration across HEV endothelial cells”, 第40回日本免疫学会, 3-L-W68-4-P (2011)