The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Expression profile of active genes in mouse lymph node high endothelial cells
Author(s)	伊澤, 大
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41733
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 9 】

氏　　名	伊　澤　　大（いざわ　だい）
博士の専攻分野の名称	博　　士（医　　学）
学 位 記 番 号	第　14977　号
学位授与年月日	平成11年10月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科　病理系専攻
学 位 論 文 名	Expression profile of active genes in mouse lymph node high endothelial cells **（マウスリンパ節高内皮細静脈の遺伝子発現プロファイルの解析）**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授　宮坂　昌之 （副査） 教 授　平野　俊夫　　教 授　菊谷　　仁

論 文 内 容 の 要 旨

［目的］

高内皮細静脈（HEV）はリンパ節やパイエル板などの二次リンパ組織に存在する特殊な血管である。体内を再循環しているリンパ球はHEVを介して血管系からリンパ組織実質へと移行する（リンパ球ホーミング）。リンパ球に特異的なホーミングの制御にはHEVに発現する接着分子やリンパ球特異的ケモカインなどの分子が関与すると考えられている。しかしながら、HEVはリンパ組織中にごく少数のみ存在し、in vitroでは急速に本来の機能や形態を失うことから、HEVとリンパ球の特異的な相互作用の分子機構には未だ不明な点が残されている。そこで本研究では、生理的条件下でHEVがどのような分子を発現しているのか明らかにするために、1）マウスリンパ節からin vitroの培養を経ずにHEVを精製し、2）3′-directed cDNAライブラリ解析の手法を用いて、HEVにおける遺伝子発現プロファイルの把握と特異的遺伝子の同定を試みた。

［方法ならびに結果］

酵素消化したマウスリンパ節を材料として、末梢リンパ組織HEV特異的モノクローナル抗体MECA-79を用いて磁気ビーズ法により90％の純度でMECA-79陽性細胞を精製した。半定量的RT-PCRにより、HEVに特異的に発現するGlyCAM-1 mRNAは精製MECA-79陽性細胞で有意に濃縮されていることを確認した。また、精製MECA-79陽性細胞由来の初代培養細胞ではendoglin、CD31、CD34、MECA-32などの内皮細胞マーカーの発現が認められた。この培養細胞は高頻度にリンパ球を接着させ、さらにtransmigrateさせる活性を示した。以上の結果より、HEV細胞が高純度で精製されたと結論した。

次に精製HEV細胞より3′-directed cDNAライブラリを作成し無作為に抽出した1,495クローンの3′-末端の塩基配列を決定することで、HEVの遺伝子発現プロファイルの解析を行った。これらの塩基配列は同一の塩基配列ごとにgene signature（GS）として分類した。得られた754種類のGSの配列をGenBankに登録されている塩基配列に対して相同性検索を行った結果、335種類は既和の遺伝子由来のGSで、残りはESTデータベースにのみ登録されている配列もしくは新規遺伝子であった。

HEV 特異的に発現する遺伝子を同定するため、HEV の遺伝子発現プロファイルを新生仔マウス心臓より精製したCD31陽性血管内皮細胞およびリンパ球の解析結果と比較した。その結果、endoglin、CD63、ICAM-1、CD34等内皮細胞に発現する遺伝子の GS は、HEV と CD31陽性血管内皮細胞の両者で出現していた。一方、HEV のライブラリには Duffy 抗原、mac25/TAF などが選択的に出現したほか、サイトカインやサイトカインレセプターおよび活性化内皮細胞で発現する遺伝子などが、HEV のライブラリに選択的に出現した。これらのうち最も出現頻度の高かった mac25/TAF 遺伝子について in situ hybridization を行ない、リンパ節 HEV での mac25/TAF 遺伝子の発現を確認した。また、すでに解析の終了している他の35種類の組織や細胞の遺伝子発現プロファイルとの比較から、HEV 特異的に 2 回以上の頻度で出現した22GS は GenBank に未登録の配列であった。このうち EST データベースにも登録されていない新規遺伝子の GS は 4 種類であった。

[総括]

培養系での維持が困難な HEV 細胞を高純度で精製し、培養を経ずに 3′-directed cDNA ライブラリ解析を行うことで、生体内での HEV の分化形質を反映する遺伝子発現プロファイルが得られた。HEV に選択的に出現した GS には活性化内皮細胞で発現する遺伝子が多く認められた。このことは HEV が炎症局所の内皮細胞と部分的に類似の性質を持つことを示唆している。たとえば mac75/TAF は腫瘍血管に強く発現することが報告されており、これまでに報告されている抗接着分子と似た構造的特徴を持つことから、HEV の内皮細胞に特徴的な discontinuous junction の形成に関わっている可能性がある。また Duffy 抗原は炎症局所の内皮細胞でケモカインを提示することが示唆されているが、HEV においても同様にケモカインを提示することで、リンパ球特異的なホーミングに関与する可能性がある。以上本研究により HEV を介したリンパ球ホーミングの機構を解明するための多くの手がかりが得られた。

論文審査の結果の要旨

HEV を介したリンパ球のホーミングは生体を外来の病原体から防御するための必須の機構である。しかしながら、HEV は培養系での維持が困難であるため、リンパ球ホーミングにおける HEV とリンパ球の特異的相互作用および HEV の機能的特徴を規定する分子機構には不明な点が残されている。本研究において生体内での HEV 本来の機能的特徴を損なうことなく解析するため、in vitro での培養を経ずに高純度の HEV 細胞を分離する方法を確立した。精製した HEV 細胞の初代培養細胞は内皮細胞マーカーを発現しており、in vitro でリンパ球の接着と transmigration 活性を示したことから、今後 in vitro でリンパ球特異的なホーミングの機構を解析する上で有用な材料になると考えられる。また 3′-directed cDNA library を用いた HEV の遺伝子発現プロファイルの解析によって、HEV の機能的特徴に関連すると思われる遺伝子が新規の遺伝子も含め数多く見いだされた。既知遺伝子ではリンパ球特異的ケモカインの提示への関与が示唆されている DARC や、mac25などの炎症や腫瘍細胞の浸潤との関連が示唆されている既知遺伝子が多くみられた。とくに mac25は、リンパ組織内で HEV に選択的に発現するという結果と、同分子が抗接着分子と似た構造をもつことから、この分子が HEV の内皮細胞に特徴的な discontinuous junction の形成に関わっている可能性が示唆された。今後、新規遺伝子のみならず、炎症や腫瘍の浸潤に関連する既知遺伝子のリンパ球ホーミングにおける役割を明らかにすることで、将来、癌や炎症性疾患の治療への応用も期待できるものと考えられる。以上、マウス HEV の分離法の確立および HEV 特異的遺伝子候補の同定は世界に先駆けて行われたものであり、本研究は学位に価するものと認める。