The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A high endothelial venule-expressing promiscuous chemokine receptor DARC can bind inflammatory, but not lymphoid, chemokines and is dispensable for lymphocyte homing under physiological conditions
Author(s)	柏崎, 正樹
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45217
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

氏　　名　柏崎正樹（かしわざきまさき）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学　位　記　番　号　第　18485　号

学位授与年月日　平成16年3月25日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

医学系研究科分子病態医学専攻

学　位　論　文　名　A high endothelial venule-expressing promiscuous chemokine receptor DARC can bind inflammatory, but not lymphoid, chemokines and is dispensable for lymphocyte homing under physiological conditions
（高内皮細静脈に発現するケモカイン共通レセプターDARCのリンパ球ホーミングにおける機能的意義）

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】

リンパ球が血行性にリンパ節やパイエル板に移住するとき（リンパ球ホーミング）、リンパ球は高内皮細静脈（HEV）に結合し、その内皮細胞（HEV細胞）間隙を通過する。このHEVとリンパ球の相互作用は、接着分子とケモカインにより制御された多段階の接着反応であるが、HEV細胞上でのケモカインの空間配置や活性を制御する分子機構には不明な点が多い。我々はマウスHEV細胞の3′末端特異的cDNAライブラリ解析を通じて、広いケモカイン結合特異性を示すケモカイン共通レセプターDARC（Duffy antigen receptor for chemokines）がHEV細胞に発現することを見出した。DARCは他のケモカイン受容体と類似の7回膜貫型蛋白質で種々の炎症性ケモカインとの結合能を示すが、細胞内領域にDRYモチーフを持たずGタンパクと共役しないという構造的な特徴をもつ。また、ヒトでは赤血球上のマラリア原虫*Plasmodium vivax*に対する受容体として機能することが知られている。また、DARCはケモカイン提示分子あるいは、ケモカインscavengerとして機能する可能性が示唆されているが、HEVに発現するDARCのリンパ球ホーミングにおける機能的な意義は明らかでない。そこで私は、まずDARC発現細胞を用いて、DARCと免疫系ケモカインを含むケモカインとの結合特異性およびDARCとケモカインの結合がケモカイン活性に及ぼす影響を解析した。さらに、新たに作製されたDARC欠損マウスを用いて、HEV細胞に発現するDARCのリンパ球のホーミングにおける機能的意義を解析した。

【方法ならびに成績】

マウスリンパ節HEVにおけるDARC mRNAの発現を*in situ* hybridizationで、DARC蛋白質の発現を抗DARC抗体を用いた免疫組織染色で解析した。その結果、DARCはmRNAおよび蛋白質レベルで$PNAd^+$ HEVおよび$MAdCAM\text{-}1^+$ HEVに選択的に発現することが確認された。次にDARCを強制発現させたマウス血管内皮細胞株F-2/DARCを樹立し、DARCのケモカインに対する結合特異性を^{125}I標識CXCL1と20種類の炎症性および免疫系ケモカインを用いた結合阻害実験にて解析した。その結果、DARCはCXCL1、CCL7、CXCL5、CCL5、CCL2を含む種々の炎症性ケモカインと結合したが、解析した免疫系ケモカイン（CCL21、CCL19、CXCL13、CXCL12、CX3CL1、

CCL20、CCL18）との明らかな結合は認められなかった。また、DARC とケモカインの結合がケモカイン活性に及ぼす影響を、DARC に結合させた CCL2 と CCR2B 発現マウス pre-B 細胞株 L1.2（L1.2/CCR2B）を用いて解析した。その結果、遊離 CCL2 が L1.2/CCR2B 細胞にカルシウム流入を惹起したのに対して、DARC に結合させた CCL2 は L1.2/CCR2B 細胞に有意なカルシウムシグナルを誘導しなかった。さらに、HEV に発現する DARC の機能的意義を明らかにするために、DARC 欠損マウスリンパ節の白血球サブセットおよび組織構築を解析した。しかし、野生型マウスと比較して T 細胞、B 細胞やマクロファージなどの白血球サブセット構成およびリンパ節の組織構築に明らかな変化は認められなかった。また DARC 欠損マウスに正常マウス脾細胞を経静脈的に投与し、その生体内動態を解析した。その結果、DARC 欠損マウスにおいても、T 細胞、B 細胞および Mac-1^{+} 細胞のリンパ節、パイエル板および脾臓への集積に明らかな変化は認められなかった。

【総　括】

本研究を通じて、DARC は未刺激マウスのリンパ節 HEV に、mRNA および蛋白質レベルで構成的に発現することが確認された。また、ケモカイン結合阻害実験より、DARC は様々な炎症性ケモカインと結合するが、免疫系ケモカインとは結合しないことが示された。さらに DARC と結合した CCL2 は標的細胞に有意なカルシウムシグナルを惹起しないことから、DARC に結合したケモカインは機能的に不活性化されていることが示唆された。しかし、DARC 欠損マウスにおいても、リンパ球ホーミングやリンパ節の白血球サブセット構成に明らかな異常は認められなかった。これらの結果から、HEV に発現する DARC は HEV 上で炎症性ケモカインを結合し、その活性を負に制御する scavenger として機能している可能性が示唆された。しかし、遺伝子欠損マウスを用いた解析から、生理的条件下での HEV 細胞を介するリンパ球ホーミングにおいて DARC の機能は代償可能であり、HEV には DARC 以外にも同様な機能を担う分子が発現する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、マウス高内皮細静脈内皮細胞（HEV 細胞）に構成的に発現する、ケモカイン共通レセプター DARC（Duffy antigen receptor for chemokines）の機能的意義を検討したものである。ケモカイン結合阻害実験より、DARC は様々な炎症性ケモカインと結合するが、免疫系ケモカインとは結合しないことが示された。また、遊離 CCL2 と異なり、DARC と結合した CCL2 は CCR2B 発現細胞に有意なカルシウム流入を惹起しないことから、DARC は炎症性ケモカインの活性を負に制御することが示唆された。一方、DARC 欠損マウスではリンパ節の白血球構成に明らかな変化は認められなかった。以上の結果は、DARC は炎症性ケモカインを結合しその活性を負に制御する機能を有するが、生理的条件下での HEV 細胞を介するリンパ球ホーミングにおいて、その機能は代償可能であることを示唆するもので、学位論文に値する。