



Title	Nepmucin/CLM-9, an Ig domain-containing sialomucin in vascular endothelial cells, promotes lymphocyte transendothelial migration in vitro
Author(s)	陳, 秀晶
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49872
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	陳秀晶
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第22465号
学位授与年月日	平成20年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Nepmucin/CLM-9, an Ig domain-containing sialomucin in vascular endothelial cells, promotes lymphocyte transendothelial migration in vitro (血管内皮細胞に発現するシアロムチン nepmucin/CLM-9 は Ig ドメインを介して in vitro でリンパ球の血管外遊走を促進する)
論文審査委員	(主査) 教授 宮坂 昌之 (副査) 教授 竹田 潔 教授 平野 俊夫

論文内容の要旨

[目的]

白血球の血管外遊走は、炎症および免疫監査に重要な役割を果たす。血中のリンパ球は免疫監査を行うために、恒常的にリンパ節やパイエル板などの二次リンパ器官に血管外遊走するが、この過程に関与する分子機構については不明な点が多い。

Nepmucin/CLM-9 は V type の Ig ドメインおよびムチン様ドメインを有するシアロムチンであり、リンパ節の高内皮静脈 (high endothelial venules; HEV) を含む血管内皮細胞に発現する。Nepmucin のムチン様ドメインは適切な糖鎖修飾を受け、L-セレクチン依存的なりんパ球のローリングを媒介すると共に、Ig ドメインを介して、リンパ球の接着を媒介する。本研究で、私は nepmucin が血管外遊走を促進する可能性について検討した。

[方法ならびに成績]

まず、末梢リンパ節の HEV における nepmucin の局在を内皮細胞マーカーである CD31 の局在と比較した。免疫組織染色の結果、nepmucin は HEV の管腔面および内皮細胞同士の接着面に発現し、後者においては CD31 との共局在が認められた。さらに、免疫電子顕微鏡的解析の結果、nepmucin は CD31 と同様に内皮細胞間の境界面に沿って存在する細胞内小胞に集積していた。CD31 を含む細胞内小胞は細胞質と内皮細胞の境界面を行き来し (リサイクリング)、白血球の血管外遊走を促進するとの報告がある。このことから、細胞内小胞に存在する nepmucin が同様にリサイクルするか検討した。その結果、nepmucin は時間依存的にリサイクルし、その速度は内皮細胞間の接着面に発現する JAM-A より早かった。これらの結果から、nepmucin は CD31 と同様の局在および細胞内動態を示すことが示唆された。

次に、nepmucin が CD31 と同様にホモフィリックに結合するかどうかを検討するため、細胞凝集アッセイを行なった。Nepmucin 発現 L 細胞株は同種細胞同士で細胞凝集を形成

したが、ベクターのみを導入した L 細胞株とは細胞凝集を形成しなかったことから、nepmucin はホモフィリックな細胞接着を媒介することが示唆された。この凝集塊の形成は nepmucin の Ig ドメインを認識する抗体により阻害され、この抗 nepmucin 抗体は、リンパ球と nepmucin のヘテロフィリックな結合を阻害しなかったことから、nepmucin はホモフィリックおよびヘテロフィリックに結合する際に、それぞれ Ig ドメイン中の異なる結合部位を使用することが示唆された。

次に、内皮細胞に発現する nepmucin のホモフィリックな結合がリンパ球の血管外遊走を媒介する可能性を検討した。まず、マウス血管内皮細胞株 MBEC4 に全長の nepmucin 、ムチン様ドメインまたは Ig ドメインを欠損した nepmucin を強制的に発現させ、それぞれの安定発現株を作製した。これらの内皮細胞をトランスウェル上で単層培養し、IL-1β 刺激後に、マウスの脾臓由来のプラスチック非付着性細胞を添加した。3 時間後、下層に遊走した脾細胞数を検討したところ、全長 nepmucin を発現する MBEC4 (FL-MBEC4) は、ベクターのみを導入した MBEC4 (Mock-MBEC4) に比べ、約 3 倍効率的に血管外遊走を媒介した。一方、ムチン様ドメイン欠損 nepmucin を発現する MBEC4 は一定程度リンパ球血管外遊走を媒介したが、Ig ドメイン欠損 nepmucin を発現する MBEC4 では血管外遊走は認められなかった。FL-MBEC4 におけるリンパ球血管外遊走はホモフィリックな結合およびヘテロフィリックな結合を抑制する抗体のいずれでも阻害された。一方、FL-MBEC4 に対するリンパ球の接着は後者の抗体のみにより阻害されたことから、nepmucin のヘテロフィリックな結合はリンパ球の接着および血管外遊走に関与し、ホモフィリックな結合はリンパ球の血管外遊走を制御することが示唆された。Nepmucin が媒介する血管外遊走の細胞集団による特異性を検討したところ、nepmucin は CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞および B 細胞の血管外遊走を促進した。

以上の結果から、nepmucin は二つの異なる結合様式を介してリンパ球の血管外遊走を促進することが示唆された。

[総括]

本研究を通じ、血管内皮細胞に発現する nepmucin は Ig ドメインを介してホモフィリックに結合し、ヘテロフィリックおよびホモフィリックな接着により、リンパ球の血管外遊走を媒介することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

白血球の血管外遊走は炎症および免疫監視に重要な役割を果たすが、定常状態でリンパ球の血管外遊走を制御する分子機構については不明な点が多く残されている。

申請者は、Ig ドメインを含むシアロムチン nepmucin が血管内皮細胞の細胞接着面に集積し、Ig ドメイン依存的にホモフィリックな細胞接着を媒介することを見出した。さらに、nepmucin はリンパ球の血管外遊走を促進し、これは nepmucin によるホモフィリックな細胞接着を阻害する特異抗体により抑制されることを明らかにした。これらのことから、nepmucin のホモフィリックな細胞接着が血管外遊走に関与することが示唆された。

これらの知見は新しく、リンパ球血管外遊走の分子機構解明に貢献するものであり、学位論文に値する。