



Title	Deletion of Tetraspanin CD9 Diminishes Lymphangiogenesis in Vivo and in Vitro
Author(s)	岩崎, 剛雄
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59771">https://hdl.handle.net/11094/59771</a>
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、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

新生に関与するのではないかと仮説をたてて、リンパ管新生におけるCD9の機能解析を行った。

【73】

氏 名	岩崎 剛 雄
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学 位 記 番 号	第 25899 号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科学系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Deletion of Tetraspanin CD9 Diminishes Lymphangiogenesis in Vivo and in Vitro (テトラスパン CD9 の欠損により vivo と vitro においてリンパ管新生が減少する)
論文審査委員	(主査) 教授 熊ノ郷 淳 (副査) 教授 高倉 伸幸 教授 目加田 英輔

論文内容の要旨

〔目的〕

リンパ管は、リンパ球などの免疫担当細胞、小腸で吸収された脂肪、末梢組織で血管から漏出した組織液・タンパク質を血管へ送るなどの働きをしている。さらに癌細胞は様々なリンパ管新生促進物質を分泌して新生リンパ管を誘導し、癌のリンパ節転移を促進する。リンパ節転移はstage分類に含まれ、腫瘍の進展におけるリンパ管新生の重要性は十分に認識されている。血管新生については多くのことが研究され、血管新生をターゲットとした治療薬の開発が進んでいるが、リンパ管新生や癌のリンパ行性転移については詳しい機序がほとんど解明されていない。最近になりリンパ管内皮特異的なマーカーやリンパ管内皮の増殖因子やその受容体が同定され、リンパ管発生とリンパ管新生の研究分野は飛躍的に進みつつある。リンパ管新生は腫瘍の進展や転移だけでなく、リンパ浮腫、動脈硬化など種々の病態と密接に関連する。よって今後リンパ管新生のメカニズムの解明と治療法の開発が期待される。テトラスパン (TM4) は CD9, CD81, CD151などを含む細胞膜4回貫通蛋白でインテグリンやその他の膜蛋白と細胞膜にて複合体を形成することにより接着、遊走、増殖、分化、アポトーシス、細胞融合、癌転移やシグナル伝達など様々な機能に影響を与えることが報告されている。癌細胞や転移における TM4 の重要性については多くの報告があるが、TM4 のリンパ管新生の役割は解明されていない。

ヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (HEC) では HUVEC と比べインテグリンや TM4 の発現が増強していることを確認した。中でも CD9 は他の TM4 よりも発現が強く、さらに様々な腫瘍組織で腫瘍の血管内皮とリンパ管内皮における CD9 の発現増加が確認された。以上のことより CD9 はリンパ管

〔方法ならびに成績〕

まずマウスの胸壁を切開し、肺実質内に直接肺癌細胞 (LLC) を投与するリンパ節転移モデルを作成し CD9KO マウスに誘導し野生型のマウスと比較したところ、リンパ節の減少と腫瘍内におけるリンパ管密度の低下を認めた。また腹腔内に不完全フロイントアジュバント (IFN) を投与し炎症を惹起しリンパ管腫を形成させたところ、KO マウスにおいてリンパ管腫の形成低下とリンパ管密度の低下を認めた。IFN により誘導されたリンパ管腫から単離したリンパ管内皮細胞でも機能(遊走、形態形成、増殖)の低下を認めた。以上のことから、in vivo, in vitro において CD9 が欠損するとリンパ管新生は減少すると考えられた。次に CD9 がどのようなメカニズムでリンパ管新生に関与するかを明らかにするために、免疫沈降を行ったところ CD9 はインテグリン ( $\alpha 9, \alpha 5$ ) だけでなく VEGFR-3 などリンパ管新生に必須の蛋白と会合することを見出した。そこで siRNA により CD9 Knockdown (KD) した HEC を用いて、VEGF-C 刺激による VEGFR-3 下流シグナルを検討すると、コントロールに比べて CD9KD において VEGFR-3 だけでなく、Akt, Erk, p38 の活性低下を認めた。以上より、CD9 によるリンパ管新生には VEGFR-3 によるシグナル経路が関与していると示唆された。最後に、CD9 と相同性の高い CD81 を同時に欠損したダブルノックアウトマウス (DKO) の気管支と横隔膜の蛍光染色によりリンパ管形態異常を見出した。CD9KO マウス単独、CD81KO マウス単独では形態異常を認めないことから、CD9 と CD81 はリンパ管新生において相補的に作用していると考えられた。

〔総括〕

我々は、リンパ管内皮細胞において CD9 の発現が強く、リンパ管新生の遊走、形態形成、増殖などの機能に関与することを明らかにした。また、CD9 がインテグリン  $\alpha 5, \alpha 9$  や VEGFR-3 と会合し修飾することで VEGFR-3 のシグナル経路に働きかけてリンパ管新生を誘導していることを示唆した。CD9 は腫瘍や炎症などの病的状態、生理的状態でリンパ管新生に必須タンパクであり、リンパ節転移や炎症の新たな治療標的になりうると考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者は、CD9ノックアウトマウスを用い、CD9が欠損すると腫瘍モデルや炎症モデルにおいて、リンパ管新生が減少することを示した。また、これらが起こるメカニズムとして、CD9がVEGFR-3とインテグリン $\alpha 5, \alpha 9$ と機能的複合体を形成し、VEGFR-3のリン酸化を引き起こしリンパ管新生に関与することを示した。さらに申請者は、CD9とCD81がお互いに相補的に作用し、両者が欠損するとリンパ管の形成不全を起こすことを明らかにした。リンパ節転移は癌の進展・予後において重要であり、治療法の開発が急がれている。近年の研究から、リンパ管内皮に特異的なマーカーが同定され、リンパ管新生の研究分野は飛躍的に進みつつあり、リンパ管新生に関与する成長因子・レセプターの中でも VEGF-C と VEGFR-3との関係が重要である。今回の研究では、CD9がこの VEGFR-3と会合し機能的複合体を形成することでリンパ管新生に関与することを示しており、リンパ節転移あるいはリンパ管新生における新たな治療法の開発につながると期待される。以上を総合的に判断し、上記の研究成果は、博士(医学)の学位授与に値するものと考える。