セマフォリンによるリンパ管分布制御機構

平島正則

神戸大学大学院医学研究科 生理学 和胞生物学講座 血管生物学分野

【研究の背景】

Semaphorin (Sema) 3G はガイダンス因子ファミリーに属し、動脈内皮細胞特異的に発現することが示されている。内皮細胞 に発現する PlexinD1 は Sema 受容体として細胞間反発シグナルに関わるが、これまでに Sema3G との機能関連は全く示され ていなかった。われわれは、Sema3G あるいは PlexinD1 を欠損するマウス胎仔において、リンパ管が動脈に異常に近接する 表現型を見出した(Liu et al, Cell Rep, 2016)。リンパ管内皮前駆細胞が動脈の上を遊走することが知られているため、動脈 から離れてリンパ管網を形成する際に、Sema3GとPlexinD1が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。COS-7細胞 に共受容体 Neuropilin 2(Nrp2)あるいは PlexinD1 を発現させると、アルカリフォスファターゼを融合した Sema3G (Sema3G-AP)タンパクは Nrp2 に結合するものの PlexinD1 には直接結合しなかった。293T 細胞に Nrp2 および PlexinD1 を 発現させると Nrp2 と PlexinD1 が結合し、Nrp2 と PlexinD1 の両方を発現する COS-7 細胞では Sema3G-AP に反応してコラ プスした。しかしながら、Sema3G がリンパ管内皮細胞に対して直接作用するかどうかは明らかでなかった。

【目 的】

本研究では、リンパ管内皮細胞においてSema3Gが共受容体Nrp2への結合を介してPlexinD1依存的反発シグナルを惹 起し、リンパ管分布を制御するかどうか明らかにすることを目的とした。

【方 法】

Nrp2とPlexinD1の相互作用の解析

共免疫沈降法:内在性の Nrp2 と PlexinD1 タンパクが相互作用するか明らかにするために、ヒト新生児皮膚リンパ管内皮 (HMVEC-dLyNeo)細胞のライセートを調整して、抗 Nrp2 抗体で免疫沈降後に抗 PlexinD1 抗体でウェスタンブロット解析し た。

Sema3G がリンパ管内皮細胞に及ぼす作用と分子機構の解析

創傷閉鎖遊走アッセイ:Sema3G がリンパ管内皮細胞の遊走に作用するか明らかにするために、HMVEC-dLyNeo 細胞を コンフルエントまで培養した後にチップで引っ掻いて創傷を作製し、走化性因子 VEGF-C と同時に Sema3G-AP を加えて創 傷閉鎖を解析した。

トランスウェル遊走アッセイ: Sema3G がリンパ管内皮細胞に対して反発作用を及ぼすか明らかにするために、 HMVEC-dLyNeo 細胞を上のチャンバーの有孔膜上に入れて、下のチャンバーには走化性因子 VEGF-C と同時に Sema3G-APを加えて培養した後に、孔を通って細胞が遊走してくるか解析した。

コラプスアッセイ: Sema3G-AP が細胞コラプスを誘導するか解析した。また、HMVEC-dLyNeo 細胞に発現する Nrp2, PlexinA1, A2, D1 各受容体をノックダウン後に同様に解析した。

Sema3G-/-成体マウスにおけるリンパ管機能の解析

成体マウスの足底に高分子デキストランを注入するリンパ管造影を行って、リンパ管機能を解析した。

【結 果】

共免疫沈降法によって、リンパ管内皮細胞に内在する Nrp2 と PlexinD1 タンパクが結合して受容体複合体を形成していることが明らかになった。 創傷閉鎖遊走アッセイでは Sema3G による遊走抑制は見られなかったが、トランスウェル遊走アッセイではリンパ管内皮細胞の遊走抑制が認められた。このことは Sema3G がリンパ管内皮細胞の分布を負に制御することを示している。 Sema3G がリンパ管内皮細胞のコラプスを誘導したが、Nrp2 ノックダウンあるいは PlexinA1, A2, D1 のトリプルノックダウンを行うと、 Sema3G による細胞コラプスは見られなかった。 Sema3G-/-成体マウスのリンパ管造影ではリンパ管機能異常は認められなかった。

【考 察】

血管とリンパ管の相対的な組織内分布を決定する分子機構について、これまで明らかにされたことは限られている。ゼブラフィッシュ胚でリンパ管内皮前駆細胞はケモカインシグナル依存的に、動脈を足場にして遊走すると報告されている(Cha et al, *Dev Cell*, 2012)。一方、リンパ管内皮細胞が動脈から反発する分子機構については全く報告が無く、われわれの研究成果が初めての知見である。本研究によって、Sema3Gがリンパ管内皮細胞の共受容体 Nrp2 に結合して Plexin シグナル依存的にリンパ管の分布を負に制御することが明らかになった。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

リンパ管新生はがんや炎症といった様々な病態に付随して見られる。近年、中枢神経系のリンパ管が再発見され、マクロ分子の運搬路となっていることが示された(Louveau et al, *Nature*, 2015)。このリンパ管はアルツハイマー病で沈着するアミロイド β タンパク質の排出路となっている可能性が高く、非常に注目を集めている。Sema3G がリンパ管の分布を負に制御する因子であることとその作用機序が分かってきたことで、これらの病態を制御する方法の開発に貢献すると考えられる。

【参考・引用文献】

Cha YR, Fujita M, Butler M, Isogai S, Kochhan E, Siekmann AF, Weinstein BM. Chemokine signaling directs trunk lymphatic network formation along the preexisting blood vasculature. *Dev Cell* 22 (4):824–36, 2012

Liu X, Uemura A, Fukushima Y, Yoshida Y, Hirashima M. Semaphorin 3G provides a repulsive guidance cue to lymphatic endothelial cells via Neuropilin-2/PlexinD1. *Cell Rep* 17 (9):2299-2311, 2016

Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523 (7560):337–41, 2015