

称号及び氏名	博士（獣医学）	佐伯 法学
学位授与の日付	平成28年3月31日	
論文名	単球/マクロファージと血管内皮細胞に発現する EphA2 と ephrin-A1 が血管内皮細胞層通過に及ぼす影響	
論文審査委員	主査	小川 和重
	副査	岡田 利也
	副査	小森 雅之

論文要旨

緒言

単球は成熟過程のマクロファージ (M ϕ)で、接着分子など多くの分子を共通して発現している。好中球, リンパ球, 単球など血中の白血球は、ほぼ同一の機序で血管壁を通過する。白血球が炎症組織の血管に流入すると、白血球と血管内壁を構成する血管内皮細胞との間に(a)~(d)へと続く一連の現象が起こり、血管壁を通過して組織に浸潤する：(a)血管内壁のローリング, (b)強固な接着, (c)通過経路の探索, (d)血管内皮細胞層の通過。これらの現象は、白血球に発現しているインテグリンが血管内皮細胞のインテグリンリガンドに対する結合性を変遷させて接着性を変えることに起因すると考えられているが、不明な点が多い。

Eph 受容体と ephrin リガンドは膜タンパクである。ともに A, B サブクラスに大別され、同じサブクラスであれば結合する。Eph 発現細胞と ephrin 発現細胞の接触で Eph と ephrin はヘテロ 4 量体を形成し、Eph にはキナーゼの活性化による自己リン酸化, ephrin には主に Src ファミリー分子を介したシグナルが発生する。両シグナルは、Rho GTPases を介して細胞の接着や遊走を制御する。また、Eph シグナルはインテグリンと相互作用することが明らかにされているが、インテグリンの活性化と不活化が報告されており、統一的な見解は得られていない。

白血球系細胞の中で単球と M ϕ に発現する Eph とインテグリンに関する報告

は数少ない。これまでに、炎症により血管内皮細胞の ephrin-A1 発現レベルが上昇すること、血管内皮細胞の EphA2/ephrin-A1 シグナルが血管新生に働くこと、単球/MØ は EphA2, ephrin-A1 を含む複数の EphA と ephrin-A を発現することが明らかになっている。これらの知見を踏まえ、「EphA2 と ephrin-A1 は単球/MØ の血管内皮細胞への接着と内皮細胞層通過を制御する」と仮説を立て、仮説の検証を本研究の目的とした。

第 1 章 血管内皮細胞と単球/MØ における EphA, ephrin-A とインテグリンの発現

臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC), 皮膚微小血管内皮細胞 (HDMVEC), 腹腔 MØ (在住と炎症性), 単球/MØ 様細胞 J774.1 と単球様細胞 U937 を材料に RT-PCR で EphA と ephrin-A サブクラスの発現状態を検討した。その結果, 在住腹腔 MØ 以外の細胞はいずれも EphA2 と ephrin-A1 を比較的高いレベルで発現していた。在住腹腔 MØ は ephrin-A1 を発現していたが EphA2 の発現は認められなかった。また, 炎症性サイトカイン TNF α が両分子の mRNA 発現に及ぼす影響を検討した結果, HUVEC と HDMVEC では EphA2 と ephrin-A1 発現はともに有意に上昇し, 炎症性腹腔 MØ の EphA2 発現も上昇した。以上の結果から, 炎症部位で単球/MØ が血管内皮細胞に接触すると強い EphA2/ephrin-A1 シグナルが発生することが示唆された。

単球/MØ における EphA2 の働きを解析する目的で, J774.1 と U937 を材料に細胞内ドメインを EGFP に置換した EphA2 (EphA2 Δ C-EGFP) の安定発現株 EphA2 Δ C-EGFP-J774.1 と EphA2 Δ C-EGFP-U937 を作製した。対照として EGFP 発現垂株 EGFP-J774.1 も作製した。親株と垂株について, EphA2 の発現レベルを RT-PCR とフローサイトメトリーで比較・検討した。EGFP-J774.1, EphA2 Δ C-EGFP-J774.1 と EphA2 Δ C-EGFP-U937 はともに親株とほぼ類似したレベルで内因性 EphA2 を発現し, 内因性と比較して EphA2 Δ C-EGFP の発現レベルは EphA2 Δ C-EGFP-J774.1 では低く, EphA2 Δ C-EGFP-U937 では顕著に高かった。また, 親株と垂株について, インテグリン鎖 (α L, α M, α X, α D, α 4, β 1, β 2) の mRNA 発現レベルを RT-PCR で比較・検討した。全体として親株と垂株で発現レベルに著しい差は認められず, J774.1 ではインテグリン α L β 2, α M β 2, α 4 β 1 を, U937 ではインテグリン α M β 2, α X β 2 を発現していることが示唆された。以上の結果から, 垂株は EphA2 とインテグリンを介する細胞接着の解析に有用であると判断された。

第 2 章 EphA と ephrin-A シグナルが血管内皮細胞の形状に及ぼす影響

Ephrin-A1-Fc (efnA1-Fc), EphA2-Fc, 対照として Fc を結合させた Beads (efnA1-Fc-beads, EphA2-Fc-beads, Fc-beads) を培養液に添加し, 血管内皮細胞に対する Beads の吸着性と吸着により発生する EphA, ephrin-A シグナルが細胞形状とアクチン線維形成に及ぼす影響を検討した。この方法では, シグナルの発生部位を特定し影響を解析できる。Beads の吸着性において, efnA1-Fc-beads は

EphA2-Fc-beads と比べ、より多数の Beads が血管内皮細胞に吸着したが、Fc-beads はほとんど吸着しなかった。また、efnA1-Fc-beads の吸着細胞には膜退縮が起こり、吸着部には Beads の形状に対応したアクチン線維形成が認められた。以上の結果から、血管内皮細胞に発生する EphA シグナルは白血球の通過経路の形成に関与することが示唆された。

第 3 章 EphA2 と ephrin-A シグナルが単球/MØ の接着に及ぼす影響

インテグリンリガンドと efnA1-Fc または EphA2-Fc の 2 重吸着領域 (2 重領域) とインテグリンリガンド単独の吸着領域 (単独領域) が交互に現れるストライプ状の基質を作製し、この基質に対する単球/MØ の接着性と接着により発生する EphA, ephrin-A シグナルが細胞形状に及ぼす影響を検討した (Stripe assay)。

1) 腹腔 MØ と単球/MØ 様細胞の接着と EphA, ephrin-A シグナル

単球/MØ として腹腔 MØ と J774.1 を、インテグリンリガンドとして Matrigel (Laminin と Collagen Type IV を主要分子として含む細胞外基質) を使用し Stripe assay を行った。両細胞ともに、単独領域上に比べ efnA1-Fc, EphA2-Fc との 2 重領域上の細胞密度は有意に高く、2 重領域上の細胞は突起を形成し細胞質を広げて接着していた。以上の結果から、単球/MØ に発生する EphA, ephrin-A シグナルはインテグリンを介する細胞接着を増強させることが示唆された。

2) 単球/MØ 様細胞と単球様細胞の ICAM1, VCAM1 への接着性と EphA2 シグナル

単球/MØ として第 1 章で作製した亜株とその親株を使用し、efnA1-Fc とインテグリンリガンド ICAM1 または VCAM1 とのストライプ基質を用いて Stripe assay を行い、EphA2 シグナルとインテグリンの関連性を検討した。ICAM1 では、J774.1 の親株と亜株ともに、単独領域に対する 2 重領域上の相対的な細胞密度は有意に高く、VCAM1 では亜株のみ 2 重領域上の相対的な細胞密度が有意に高かったが、顕著な細胞密度の差は認められなかった。一方 U937 では、ICAM1 と VCAM1 とともに単独領域に対する 2 重領域上の相対的な細胞密度は有意に高く、細胞密度の差は顕著で、亜株は親株よりもさらに顕著であった。また 2 重領域上で、親株の細胞は細胞質を広げ、亜株ではさらに細胞質を広げて接着していた。以上の結果から、ephrin-A1 との結合により単球/MØ に発生する EphA2 シグナルは血管内皮細胞膜のインテグリンリガンド ICAM1 と VCAM1 に対する接着性を増強させること、この増強は EphA2 の細胞外ドメインでも誘導されることが示唆された。そこで、EphA2 とインテグリン-インテグリンリガンドの結合性について、efnA1-Fc を培養液に添加した U937 の親株と亜株のタンパクライゼートを材料に ICAM1 または VCAM1 をバイトタンパクとして Pull-down し、Western blot により EphA2 (細胞外ドメインを認識する抗体を使用) とインテグリン β 2 の検出を試みた。その結果、内因性 EphA2 のバンドは efnA1-Fc 添加の有無に関わらず親株と亜株それぞれ同レベルの強度でインテグリン β 2 とともに検出された。また、亜株において efnA1-Fc の添加時にのみ EphA2 Δ C-EGFP のバンドが検出された。この結果から、EphA2 の細胞外ドメインは ephrin-A1 と結合してインテグリン

ン-インテグリンリガンドと複合体を形成することが示唆された。

第4章 単球/MØのEphA2が血管内皮細胞層通過に及ぼす影響

EphA2が単球/MØの血管内皮細胞層の通過を制御するか、CFSEで蛍光標識したEphA2 Δ C-EGFP-J774.1, EGFP-J774.1を血管内皮細胞層上に播種し、1時間後に血管内皮細胞層を通過したCFSE陽性細胞の割合を比較し検討した。その結果、EGFP-J774.1と比べEphA2 Δ C-EGFP-J774.1は基底側に局在するCFSE陽性細胞の割合が有意に減少した。この結果から、EphA2は単球/MØの血管内皮細胞層通過を制御すること、この制御にEphA2の細胞外ドメインが関与すること示唆された。

総括

本研究から次の点が示唆された。

1. 単球/MØが炎症組織の血管内皮細胞に接触すると強いEphA2/ephrin-A1シグナルが発生する。
2. 血管内皮細胞のEphAシグナルは白血球の通過経路の形成に関与する。
3. 単球/MØにおいてEphA2の細胞外ドメインを介するシグナルはインテグリン-インテグリンリガンドと複合体を形成し、血管内皮細胞への接着を制御する。
4. 単球/MØにおいてEphA2の細胞外ドメインを介するシグナルは血管内皮細胞層通過を制御する。

以上より、単球/MØのEphA2はインテグリンシグナルを制御する新規分子として位置付けできることが明らかになった。従って、主にインテグリン-インテグリンリガンドにより説明されてきた白血球の血管内皮細胞層通過機構の大幅な見直しが必要で、これら分子間の相互作用について詳細な検討が期待される。

審査結果の要旨

単球は成熟中のマクロファージ(MØ)であり、接着分子など多くの分子は共通して発現している。好中球、リンパ球、単球など血液中の白血球は炎症組織の血管に入ると、血管内壁を構成する血管内皮細胞上をローリングした後に強く接着して止まり、通過経路を探索後に血管内皮細胞層を通過し炎症組織に浸潤する。この現象は、白血球のインテグリンが血管内皮細胞のインテグリンリガンドに対し結合性を変遷させて接着性を変えることに起因するが、不明な点も多い。一方、本研究の対象分子Eph受容体キナーゼとephrinリガンドは膜タンパクで、A, Bサブクラスに大別され、同じサブクラスであれば結合する。Eph発現

細胞と ephrin 発現細胞が接触すると、Eph は主に自己リン酸化を介して、ephrin は主に Src ファミリー分子を介してシグナルが発生し、細胞の接着や遊走を制御する。Eph はインテグリンの活性化および不活化を誘導して接着を制御すると報告されているが、統一的な見解は得られていない。

単球と MØ に発現する Eph とインテグリンに関する報告は数少ない。これまでに、炎症により血管内皮細胞の ephrin-A1 発現レベルが上昇すること、血管内皮細胞の EphA2/ephrin-A1 シグナルが血管新生に働くこと、単球/MØ は EphA2, ephrin-A1 を含む複数の EphA と ephrin-A を発現することが明らかになっている。これらの知見を踏まえ、仮説「EphA2 と ephrin-A1 は単球/MØ の血管内皮細胞への接着と内皮細胞層通過を制御する」を立てた。本研究は培養系で仮説の検証を試みた。

第 1 章では、血管内皮細胞、腹腔 MØ, 単球/MØ 様細胞 J774.1 と単球様細胞 U937 について EphA2, ephrin-A1 発現を検討した。その結果、(1)炎症性サイトカイン TNF α は血管内皮細胞の EphA2, ephrin-A1 発現を有意に上昇させること、(2)単球/MØ 系細胞はいずれも EphA2, ephrin-A1 の発現レベルが高いことが判明し、炎症部位で単球/MØ が血管内皮細胞に接触すると強い EphA2/ephrin-A1 シグナルが発生することが示唆された。

また、EphA2 シグナル解析を目的に、細胞内ドメインを EGFP に置換した EphA2 (EphA2 Δ C-EGFP)を発現する J774.1 と U937 の亜株、EGFP を発現する亜株を作製し、内因性 EphA2 とインテグリンの発現レベルを親株と亜株で比較した。その結果、発現レベルに著しい差は認められず、亜株は EphA2 とインテグリンを介する細胞接着の解析に有用であることが明示された。

第 2 章では、ephrin-A1 発現細胞の代替として ephrin-A1 を結合させた Beads を使用して、血管内皮細胞の EphA シグナルが細胞の形状に及ぼす影響を検討した。その結果、多数の Beads が血管内皮細胞に吸着し、吸着細胞には膜退縮が、吸着部には Beads の形状に対応したアクチン線維形成が誘導されることが明らかになり、血管内皮細胞に発生する EphA シグナルは白血球の通過経路の形成に関与することが示唆された。

第 3 章では、ephrin-A1 とインテグリンリガンド(ICAM1 または VCAM1: 血管内皮細胞の細胞膜に局在)の 2 重吸着領域とインテグリンリガンド単独の吸着領域が交互に現れるストライプ基質を作製し、第 1 章で作製した EphA2 Δ C-EGFP 発現亜株と親株(J774.1, U937)の EphA2 シグナルが単球/MØ の接着性に及ぼす影響を検討した。その結果、親株においては、インテグリンリガンド単独吸着領域と比べ 2 重吸着領域で細胞の接着性が有意に高くなり、また、EphA2 Δ C-EGFP 発現亜株は親株よりもさらに顕著に接着性が上昇していた。以上の結果から、(1)単球/MØ に発生する EphA2 シグナルはインテグリンリガンド ICAM1 と VCAM1 に対する接着性を増強させること、(2)この増強は EphA2 の細胞外ドメインのみでも誘導されることが示唆された。また、ephrin-A1 を培養液に添加した U937 の親株と亜株のタンパクライセートを材料に ICAM1 または VCAM1 をバイトタンパクとして Pull-down assay を行い EphA2 とインテグリン-

インテグリンリガンドの結合性を検討した。その結果、EphA2の細胞外ドメインは ephrin-A1 と結合するとインテグリン-インテグリンリガンドと複合体を形成することが明らかになった。

第4章では、EphA2 Δ C-EGFP 発現 J774.1 と対照亜株(EGFP 発現 J774.1)を使用して EphA2 が血管内皮細胞層通過に及ぼす影響を共培養系で検討した。その結果、EphA2 Δ C-EGFP 発現 J774.1 では基底側に局在する細胞の割合が有意に減少し、EphA2 の細胞外ドメインは単球/M ϕ の血管内皮細胞層通過を制御することが示唆された。

本研究により、(1)単球/M ϕ が炎症組織の血管内皮細胞に接触すると強い EphA2/ephrin-A1 シグナルが発生すること、(2)血管内皮細胞の EphA シグナルは白血球の通過経路の形成に関与すること、(3)単球/M ϕ において EphA2 の細胞外ドメインを介するシグナルはインテグリン-インテグリンリガンドとの複合体形成を誘導し、血管内皮細胞への接着を制御すること、(4)単球/M ϕ において EphA2 の細胞外ドメインを介するシグナルは血管内皮細胞層通過を制御することが明らかになった。これらの成果から、EphA2/ephrin-A1 は白血球の血管内皮細胞層通過を制御する新規分子であることが示唆された。従って、本研究は白血球の血管内皮細胞層通過機構の解明に寄与し、医学・獣医学の発展に貢献すると判断され、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。