



# Semaphorin 3G Provides a Repulsive Guidance Cue to Lymphatic Endothelial Cells via Neuropilin-2/PlexinD1

Liu, Xinyi

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6873号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006873>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



## 学位論文の内容要旨

### Semaphorin 3G Provides a Repulsive Guidance Cue to Lymphatic Endothelial Cells via Neuropilin-2/PlexinD1

セマフォリン 3G は Neuropilin-2/PlexinD1 を介して  
リンパ管内皮細胞に反発性ガイダンスシグナルを与える

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

血管生物学

(指導教員：平島 正則 准教授)

劉 歆儀

The vertebrate circulatory system comprises blood and lymphatic vascular systems. Lymphatic endothelial cells (LECs) are differentiated from venous endothelial cells and form a blind-end and unidirectional system of lymphatic capillaries and collecting lymphatic vessels. Lymphatic capillaries form a random network in peripheral tissues, such as the skin. Recent studies indicated that lymphatic network patterning is regulated by blood vessels which develop earlier than lymphatic vessels. Previous reports showed that Cxcr4<sup>+</sup> LECs migrate adjacent to Cxcl12<sup>+</sup> arteries. Following migration along arteries, LECs should eventually be repelled from blood vessels to form a random lymphatic vascular network in the peripheral tissues. However, little is known about which factors provide the repulsive guidance cues from arteries to LECs.

The class 3 semaphorins (Sema3s) represent a family of secreted factors characterized by a conserved semaphorin domain and have been implicated in a variety of functions, including axon guidance, cell migration, and vascular development. Most of these effects are mediated by plexins, one of the large transmembrane receptors with highly conserved cytoplasmic domains, and co-receptors such as neuropilins (Nrp). Among these Plexins, Sema3E/PlexinD1 axis is known to provide a repulsive guidance cue in endothelial cells. However, it remains to be elucidated whether PlexinD1 plays a role in lymphatic vascular patterning. Sema3G is the most recently discovered member of class 3 semaphorins. Previous studies showed that Sema3G strongly binds to Nrp2, but little is known about the *in vivo* role and its signaling mechanisms. In this study, we investigated the role of PlexinD1 or Sema3G in lymphatic vascular patterning.

To investigate the lymphatic vascular patterning as well as blood vessel development in mouse embryonic back skin, we performed confocal microscopy using antibodies to pan-endothelial marker PECAM-1,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA), and LEC marker Nrp2. An incomplete lymphatic network is formed near arteries by E13.5 and extended to subsequent branching after E14.5, suggesting that lymphatic vascular formation in mouse embryonic back skin is regulated by some guidance cues from arteries.

Since PlexinD1 signaling has been implicated in a repulsive guidance cue during blood vascular network formation, we studied the role of PlexinD1 in lymphatic vascular patterning of mouse embryonic back skin by using antibodies to PECAM-1, and LEC marker VEGFR3 at E15.5. In control littermates, lymphatic vessels form a random network, whereas lymphatic vessels are tightly associated with arteries in *PlexinD1*<sup>-/-</sup> embryos, leading to reduced lymphatic vascular branching. We found that Prox1<sup>+</sup> LECs number is not changed in *PlexinD1*<sup>-/-</sup> embryos compared to control littermates, suggesting that abnormal lymphatic vascular patterning is caused by abnormal distribution of LECs. We also noticed that the formation of large-caliber veins is disturbed in *PlexinD1*<sup>-/-</sup> embryos. When we analyzed LEC-specific PlexinD1 conditional knockout embryos, we found abnormal artery-lymph alignment without venous defect. These results indicate that abnormal artery-lymph alignment is caused primarily by the

loss of PlexinD1 in LECs.

We next tried to identify the PlexinD1 ligand regulating lymphatic vascular patterning in mouse embryonic back skin. Since it has been reported that *Sema3E* is implicated in a repulsive guidance cue in endothelial cells directly via PlexinD1, we investigated the network formation of blood and lymphatic vessels in *Sema3E*<sup>-/-</sup> embryos. *Sema3E*<sup>-/-</sup> embryos showed that lymphatic vessels form a random network with a pattern that is not related to blood vessels, indicating that *Sema3E* is not required for proper lymphatic vascular patterning in mouse embryonic back skin. Previous studies reported that *Sema3G* is preferentially expressed in arterial endothelial cells but *Sema3G*-deficient mice exhibit no overt vascular phenotype. We hypothesized that *Sema3G* is a good candidate for the ligand. By detecting a lac Z reporter knocked into the *Sema3G* locus, we confirmed that *Sema3G* is predominantly expressed by arterial endothelial cells in mouse embryonic back skin. We investigated vascular patterning in *Sema3G*<sup>-/-</sup> mouse embryonic back skin and found that *Sema3G*<sup>-/-</sup> embryos showed abnormal artery-lymph alignment and a disturbed formation of large-caliber veins, similar to those in *PlexinD1*<sup>-/-</sup> embryos.

We next investigated whether *Sema3G* provides signals via PlexinD1. Since previous reports showed that *Sema3G* binds Nrp2, COS-7 cells were transfected with expression vectors carrying PlexinD1, Nrp2 fused to FLAG tag (Nrp2-FLAG), or both. The transfected cells were incubated with *Sema3G* fused to alkaline phosphatase (*Sema3G*-AP) or *Sema3E*-AP as a control, and stained for AP activity to detect the ligand binding. We found that *Sema3E*-AP directly binds to PlexinD1-expressing cells, whereas *Sema3G*-AP binds to Nrp2-expressing cells but not PlexinD1-expressing cells, indicating that PlexinD1 is not a direct receptor for *Sema3G*. Co-immunoprecipitation experiments followed by western blot analysis detected binding of Nrp2 and PlexinD1 from HEK293T cells lysate when the cells were transfected with expression vectors carrying PlexinD1 and Nrp2-FLAG both. Next we confirmed the binding between Nrp2 and PlexinD1 endogenous proteins in human LECs. We also found that *Sema3G* induced COS-7 cell collapse when both PlexinD1 and Nrp2 were transfected. These results indicated that *Sema3G* provides signals via Nrp2/PlexinD1 receptor complex. In order to investigate whether *Sema3G* affects LEC migration induced by VEGF-C, we performed wound healing assay and transwell migration assay using human LECs. The results showed that *Sema3G* did not affect VEGF-C-induced migration, whereas *Sema3G* added to the lower chamber suppressed VEGF-C-induced transwell migration. These results indicated that *Sema3G* did not affect LEC motility but serves as a repulsive factor for LECs.

In this study, we found that proper patterning of LECs is regulated by the *Sema*/*Plexin* signaling pathway. Loss of *Sema3G* or PlexinD1 results in abnormal artery-lymph alignment and reduced lymphatic vascular branching in mouse embryonic back skin. Arterial *Sema3G*

binds to lymphatic receptor complex comprised of Nrp2 and PlexinD1 and provides a repulsive guidance cue to LECs. In conclusion, our findings shed light on a mechanism by which LECs can be distributed away from arteries and form a branching network during lymphatic vascular development.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2666 号	氏 名	劉 歆儀
論文題目 Title of Dissertation	Semaphorin 3G Provides a Repulsive Guidance Cue to Lymphatic Endothelial Cells via Neuropilin-2/PlexinD1  セマフォリン 3G は Neuropilin-2/PlexinD1 を介してリンパ管内皮細胞に反発性ガイダンスシグナルを与える		
審査委員 Examiner	主 査 勾坂 敏朗 Chief Examiner 副 査 橋本 啓樹 Vice-examiner 副 査 古屋敷 智之 Vice-examiner		

(要旨は 1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度)

【背景】

脊椎動物の脈管系は血管とリンパ管からなり、この二つは発生学的にも解剖的にも互いに密接した関係にある。近年の研究で、発生・分化したリンパ管内皮前駆細胞はケモカイン Cxcl12-Cxcr4 シグナル依存的に動脈に沿って遊走することが明らかにされた。一方、皮膚のような末梢組織においてリンパ管網はランダムに分布していることから、反発因子が作用することでリンパ管内皮細胞が動脈から離れる可能性があるが、これまでにそのような分子は報告されていない。クラス 3 セマフォリン (Sema3) は神経軸索伸長・細胞遊走・成長円錐の崩壊・血管新生などに作用する分泌性のガイダンス因子ファミリーで、受容体プレキシン (Plexin) と共受容体ニューロピリン (Nrp) というそれぞれのファミリーが協調してシグナルを伝えることが知られている。これまでに、Sema3E/PlexinD1 シグナルが血管内皮細胞に反発シグナルを与えることが報告されたが、リンパ管形成における PlexinD1 の役割は不明であった。また、Sema3G は Nrp2 に結合することが知られているが、生体内での役割およびシグナル受容体については不明であった。本研究では、マウス胎仔皮膚リンパ管パターンニングにおける PlexinD1 と Sema3G の役割およびこれらの分子と Nrp2 との相互作用について解析した。

【方法・結果】

マウス胎仔皮膚における血管リモデリングとリンパ管パターンニングの関連を解析した。血管内皮細胞マーカーPECAM-1、 $\alpha$ 平滑筋アクチン、リンパ管内皮細胞マーカーNrp2 で染色してフラットマウント標本を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で解析したところ、胎生 13.5 日 (E13.5) 以降において、血管由来のガイダンス因子がリンパ管形成と分布を制御している可能性が示唆された。リンパ管パターンニングにおける PlexinD1 の役割について明らかにするために、PlexinD1 欠損マウスを解析した。E15.5 の胎仔皮膚を採取して、PECAM-1 とリンパ管内皮細胞マーカーVEGFR3 で染色してフラットマウント標本を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。コントロール胎仔ではリンパ管網はランダムに分布していたが、PlexinD1 欠損胎仔ではリンパ管が動脈に近接していて分枝数が減少していた。Prox1 陽性リンパ管内皮細胞数には差異が認められなかったことから、リンパ管内皮細胞の異常分布によって異常なリンパ管パターンが生じていると考えられた。また、PlexinD1 欠損胎仔では静脈形成異常も認められた。リンパ管内皮細胞特異的 PlexinD1 欠損マウスを解析したところ、静脈形成に異常がなくてもリンパ管が動脈に近接していた。これらのことから、静脈形成とは無関係にリンパ管内皮細胞の PlexinD1 シグナルがリンパ管パターンニングに重要であることが明らかになった。

血管パターンニングにおいて、PlexinD1 はリガンド Sema3E に結合して反発作用を示すことが知られている。そこで、Sema3E 欠損マウスの胎仔皮膚リンパ管を解析したが、コントロール胎仔と同様にリンパ管網はランダムに分布していた。そこで、動脈特異的に発現することで知られるファミリー分子 Sema3G に注目した。Sema3G 欠損マウスの胎仔皮膚を解析したところ、PlexinD1 欠損マウスと同様にリンパ管が動脈に近接して分枝数が減少しており、静脈形成異常が認められた。

次に、Sema3G が PlexinD1 を介してシグナルを伝えるかどうか解析した。これまでに Sema3G が Nrp2 に結合することは知られているが、PlexinD1 との関連は明らかにされていない。COS-7 細胞に Nrp2、PlexinD1、あるいは両方を発現させてアルカリホスファターゼ (AP) 標識した Sema3G を作用させた。既報の通り Sema3G-AP は Nrp2 発現細胞に結合したが、PlexinD1 には直接結合しなかった。そこで、Nrp2 と PlexinD1 の相互作用を明らかにするために、293T 細胞にそれらを発現させて、免疫沈降法で解析した。この解析で Nrp2 と PlexinD1 が結合することが明らかになり、ヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞においても同様の結果を得た。さらに、Sema3G は Nrp2 と PlexinD1 の両方を発現した COS-7 細胞をコラプスさせることが分かった。これらのことから、Sema3G は Nrp2/PlexinD1 受容体複合体に結合してシグナルを惹起することが明らかになった。また、ヒトリンパ管内皮細胞に対して、Sema3G が反発因子として作用することが明らかになった。

#### 【結論】

本研究で、動脈内皮細胞特異的に発現する Sema3G がリンパ管内皮細胞の Nrp2/PlexinD1 受容体複合体を介して、リンパ管パターンニングを制御することが明らかになった。リンパ管内皮細胞の分布を制御する反発因子に関する初めての報告であり、今後の研究でリンパ管が関連する病態における標的分子となる可能性がある。

本研究は、Sema3G がリンパ管分布を制御することおよびその作用機序を示したものであり、リンパ管が関連する病態などにおいてその分布を抑制できる可能性を示した知見として価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。