

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」
平成15年度採択研究代表者

菊谷 仁

(大阪大学微生物病研究所 教授)

「セマフォリンによる免疫調節機構の解明と免疫制御への応用」

1. 研究実施の概要

神経軸索のガイダンス因子として知られるセマフォリン分子が免疫系をはじめとする種々の臓器で機能していることが明らかになりつつある。本研究では、これら分子の免疫学的活性、その受容体、シグナル伝達経路の解析をおこない、免疫制御におけるセマフォリン分子の役割の解明と、その成果の免疫病の診断治療への応用を目指している。平成16年度は主に、Sema4AのT細胞活性化分化における機能解析とSema6Dの免疫制御及び心臓の形態形成における役割の解析を行った。その結果Sema4AがTh1細胞分化に必須の役割を果たすこと、またSema6Dが心筋細胞の遊走を制御して心室壁の拡張と肉柱形成に寄与していることを明らかにした。今後、Sema4AがTh1依存性自己免疫を抑制するための分子標的や、Th1反応の指標として用いることが出来るか否かを検証しなければならない。また、Sema6Dが免疫系においても心臓の形態形成時に認められた生理活性をもつかについても更に解析する必要がある。

2. 研究実施内容

(1) Sema4AのT細胞活性化分化における役割：

研究目的：

Sema4Aはマウス樹状細胞に高発現するセマフォリンとして同定された。これまでの研究から、Sema4Aが活性化T細胞に発現するTim-2という分子に結合し、試験管内でT細胞に対して補助刺激活性を発揮すること、抗Sema4A抗体は多発性硬化症のマウスモデル、自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を抑制できることが明らかになっていた。本研究は、Sema4Aの免疫細胞での発現の詳細な解析やSema4A欠損マウスの解析を通して、Sema4Aの生体内における機能を明らかにする事を目的に行われた。

方法と結果：

Sema4A欠損マウスの作成

ES細胞を用いてSema4A遺伝子ターゲティングを行い、Sema4A欠損マウスを作成した。Sema4A欠損マウスはメンデルの法則に従って生まれた。また、網膜形成異常が認められた以外は、他の臓器の発生分化に異常は認められなかった。これらのマウスは、更にC57BL/6

及びBALB/Cマウスに戻し交配して遺伝的背景を整えた。

抗Sema4A抗体の作成とSema4A発現の解析

Sema4A欠損マウスにSema4A-Igを免疫し、抗Sema4Aモノクローナル抗体を作成した。これまでに、樹状細胞と活性化B細胞にSema4Aが高発現することを報告していたが、T細胞サブセットにおける発現は不明であった。そこで、これらの抗体を用いてTh1及びTh2細胞に分化している細胞上のSema4A発現を解析した。T細胞を抗CD3と抗CD28で刺激した場合、或いはTh2条件（IL-4と抗IL-12存在下）で抗CD3と抗CD28で刺激した場合は、Sema4A発現は24時間後に一過性に上昇し、その後速やかに低下した。一方、Th1条件（IL-12と抗IL-4存在下）で抗CD3と抗CD28で刺激するとSema4Aの高発現が培養期間中を通して維持された。また、Th1培養を数回繰り返した後のTh1分化細胞上にもSema4Aの高発現が認められた。

Sema4A欠損樹状細胞の機能

Sema4A欠損樹状細胞あるいは野生型樹状細胞と異系のT細胞との混合リンパ球培養を行った。その結果、Sema4A欠損樹状細胞のT細胞刺激能は野生型のそれに比べ有意に低かった。

Sema4A欠損T細胞のTh1/Th2分化能

Sema4A欠損マウスと野生型マウスからCD4T細胞を調整し、Th1条件及びTh2条件で高CD3と抗CD28で刺激した。その結果、Sema4A欠損T細胞はTh1分化が著しく低下していることがわかった。また、Sema4A欠損T細胞をTh1条件で培養した場合は、T-betやIL-12受容体β鎖の発現も著しく低下していた。

Sema4A欠損マウスにおける免疫反応

In vivoのTh1及びTh2反応におけるSema4Aの役割を解析するために、Sema4A欠損マウスにPropionibacterium acnesやNippostrongylus brasiliensisを接種した。その結果、Sema4A欠損マウスにおいては、P. acnesで誘導されるTh1反応が著しく低下していたが、一方、N. brasiliensisで誘導されるTh2反応が亢進していた。

結論：

Sema4A欠損マウスの解析から、これまでに報告しているように樹状細胞上のSema4AがT細胞のプライミングにおいて機能していることを確認するとともに、T細胞上のSema4AがTh1細胞分化に必須であることを明らかにした。

(2) 心臓の形態形成におけるSema6Dの役割

研究目的：

これまでにSema6Dが神経系以外に免疫細胞や心臓において発現していること、その受容体がPlexin-A1であること、Sema6Dが免疫細胞、特に樹状細胞に強い刺激活性を持つとともに心臓の形態形成に必須であることを明らかにしてきた。本年度は、Sema6Dの心室の形成における役割を詳細に解析した。

方法と結果：

ニワトリ胎児を用いたSema6DやPlexin-A1の機能解析

ニワトリ胎児の心臓でRNAiによるSema6DとPlexin-A1のノックダウン、或いは可溶性Sema6Dや可溶性Plexin-A1の強制発現を行い、心室形成に対する影響を解析した。その結果、

心室壁の拡張においてはPlexin-A1からのシグナルが重要であるが、肉柱形成にはSema6Dからの逆行性のシグナルが必要であることが明らかになった。

Sema6Dの逆行性シグナルに関わる分子の同定

Sema6Dの細胞質内領域に結合する分子をtwo hybrid screeningなどを用いて解析した。その結果、Sema6Dの膜近位部にAbl kinaseが、膜遠位部にはEnaが結合することを明らかにした。また、EnaはSema6Dに恒常的に結合しており、Plexin-A1がSema6Dに結合するとAbl kinaseがEnaのリン酸化とSema6Dからの解離を誘導することを示した。この一連のシグナルが、心室の肉柱を形成するための心筋細胞の遊走を誘導に必須であることを明らかにした。

3. 研究実施体制

研究のすべては研究代表者菊谷仁の総括の下、大阪大学微生物病研究所・分子免疫制御分野で行われた。

研究実施項目：（１）CD100/Sema4D欠損マウスにおける自己免疫の発症機構の解析；（２）CD100によるCD72と種々のB細胞レセプターとの会合の調節機構；（３）Timファミリー分子のシグナル伝達機構の解析；（４）Tim-1リガンドの検索；（５）Sema4AK0マウスの免疫能；（６）Sema6DK0マウスの解析；（７）心臓の形態形成におけるPlexin-A1前方シグナル伝達とSema6D逆シグナル伝達の役割（８）Sema4Aの血管新生に及ぼす効果とその受容体であるPlexin-D1を介するシグナル伝達系の解析；（９）Sema6Dの属するClass VI semaphorinのSema6A, Sema6B, Sema6Cの受容体の同定と機能解析。

概要：上記の項目の解析を行い、免疫系で発現するセマフォリンのin vitroにおける免疫学的生物活性やin vivoにおける免疫制御機能の解明、各セマフォリンの免疫系における受容体の同定とそのシグナル経路の解明を目指した。一方、これらセマフォリン分子は神経系をはじめとする種々の組織の形態形成においても機能していると考えられ、ニワトリ胎児等を用いて個体発生における役割も同時に解析した。これらすべての研究は、大阪大学微生物病研究所の分子免疫制御分野にて行った。また、役割分担については、研究代表者の菊谷がすべての研究を総括し、熊ノ郷と安居が免疫系におけるセマフォリンの役割、受容体、シグナル経路に関する研究を行った。個体発生におけるセマフォリンの機能解析は、豊福が中心になって行った。

4. 主な研究成果の発表

（１）論文（原著論文）発表

- Kumanogoh, A., T. Shikina, K. Suzuki, S. Uematsu, K. Yukawa, S. Kashiwamura, H. Tsutsui, M. Yamamoto, H. Takamatsu, E.P. Ko-Mitamura, N. Takegahara, S. Marukawa, I. Ishida, H. Morishita, D.V.R. Prasad, M. Tamura, M. Mizui, T. Toyofuku, S. Akira, K. Takeda, M. Okabe, and H. Kikutani. Non-redundant roles of Sema4A in the immune system: Defective T-cell priming and Th1/Th2 regulation in sema4A-deficient mice.

Immunity, 22:305-316, 2005.

- Toyofuku, T., H. Zhang, A. Kumanogoh, N. Takegaraha, M. Yabuki, K. Harada, M. Hori, and H. Kikutani. Guidance of myocardial patterning in cardiac development by Sema6D reverse signaling. *Nature Cell Biol.*, 6:1204-1211, 2004.
- Toyofuku, T., H. Zhang, A. Kumanogoh, N. Takegahara, F. Suto, J. Kamei, K. Aoki, M. Yabuki, M. Hori, H. Fujisawa, and H. Kikutani. Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes & Dev.*, 18:435-447, 2004.