

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「免疫難病・感染症等の先進医療」

研究課題  
「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」

研究終了報告書

研究期間 平成15年10月～平成21年3月

研究代表者: 菊谷 仁  
(大阪大学微生物病研究所 教授)

## § 1 研究実施の概要

### 研究の背景

免疫反応はその成立から終息まで免疫担当細胞間の相互作用によって巧妙に制御されている。この細胞間相互作用を担う分子としては、サイトカイン、ケモカインなどの可溶性因子、インテグリンファミリー等の接着分子、B7 や CD40 リガンドを始めとする B7、TNF ファミリーなどの副刺激分子が知られている。しかし、これらの分子だけで免疫反応調節機構がすべて説明できるわけではない。本プロジェクト開始前の本研究室の研究によって、神経回路形成におけるガイドランス因子として知られているセマフォリンファミリーのメンバーが、免疫反応の調節において重要な働きをしていることが示され、セマフォリン分子群による免疫反応調節機構が存在する可能性が出てきた(図1)。例えば、CD100/Sema4D は CD40 刺激によって誘導される遺伝子産物のなかに見出されたセマフォリン分子である。可溶性リコンビナント分子

や遺伝子欠損マウスを用いた解析や、受容体の同定から、CD100/Sema4D 刺激が CD72 の抑制性シグナルを解除するという非常にユニークなメカニズムで B 細胞や樹状細胞の活性化を増強し免疫反応の制御に寄与していることが明らかになっていた(図2)。また、樹状細胞や B 細胞に発現する新たなセマフォリン Sema4A をクローニングし、Sema4A が T 細胞の活性化を増強すること、Sema4A の受容体が活性化 T 細胞に発現する Tim-2 であること、抗 Sema4A モノクローナル抗体の in vivo 投与により抗原特異的 T 細胞の出現や実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症が阻止出来ることなどから Sema4A-Tim-2 相互作用が T 細胞の分化、特に細胞性免疫において重要な役割を果たしていることも明らかになっていた。このように、免疫系におけるセマフォリンの生理的意義は本研究室の研究によって初めて明らかになるとともに、「免疫セマフォリン」という新たな免疫制御分子ファミリーの存在が明らかになりつつある。また、本研究の今後の展開によっては、今まで知られていなかった新たな免疫制御機構の解明とその臨床応用が十分期待される。したがって、これら免疫セマフォリン及びその関連領域は、免疫学、特に免疫制御の分野に残された数少ないフロンティアのひとつといえよう。

### 研究の進め方

本研究計画では、「セマフォリンによる免疫制御機構」という新たなパラダイムの確立と、それを基盤にした免疫病治療の開発を目的に、(1) CD100/Sema4D による自己反応性 B 細胞の制御機構、(2) CD100/Sema4D 刺激による CD72 信号伝達調節の解析、(3) Sema4A による T 細胞刺激の分子機構、(4) Tim-2 以外の Sema4A 受容体の探索、(5) Sema4A 欠損マウスの免疫反応の解析、(6) Sema6D の免疫系における機能解析、(7) その他の免疫セマフォリンの解析、(8) 免疫における化学反応因子としてのセマフォリンの機能解析、(9) 免疫セマフォリンを標的にした免疫制御の試み、(10) ヒト免疫セマフォリンの免疫機能、(11) ニワトリ胎児を用いた免疫系以外でのセマフォリンの機能解析を行った。

### 研究の成果

#### Sema4D(CD100)シグナルと B 細胞のホメオスターシスの維持

Sema4D による B 細胞抗原受容体(BCR)シグナルの調節機構及び B 細胞恒常性維持における Sema4D の役割について解析した。野生型及び Sema4D 欠損マウスの B 細胞の BCR シグナルの生化学的解析、抗 IgM 抗体刺激に対する増殖反応の解析などから、Sema4D はその抑制型受容

### セマフォリンファミリー

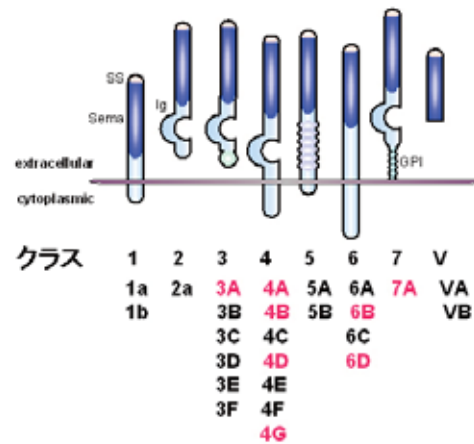


図1 セマフォリンはウイルス由来のものを含めてその構造から8つのサブファミリーに分類される。赤字は本研究室で免疫系において発現を認めているセマフォリン分子。

体 CD72 の BCR 複合体への会合を阻害し、BCR シグナルの増強を誘導していることを明らかにした。また、Sema4D 欠損 B 細胞は野生型 B 細胞に比べ、生体内におけるターンオーバーが著しく低下していた。更に、Sema4D 欠損マウスにおいては、加齢に伴い CD21<sup>high</sup>CD23<sup>low</sup> の marginal zone(MZ) B 細胞の割合が徐々に増加し、自己抗体の産生や種々の組織への B 細胞の浸潤など B 細胞依存性の自己免疫病の発症が認められた。これらの結果から、Sema4D による BCR シグナルの fine tuning が B 細胞の恒常性の維持において必須の役割を果たしていることが明らかになった。

#### **Sema4A による T ヘルパー細胞の分化制御**

Sema4A の免疫細胞における発現を詳細に解析したところ、Sema4A は樹状細胞上に恒常的に発現するだけでなく、Th1 細胞へ分化途上の細胞や Th1 細胞上に強発現することがわかった。そこで、Sema4A の T 細胞分化における役割を明らかにするために、Sema4A 欠損マウスの免疫反応及び Sema4A 欠損 T 細胞の試験管内における T ヘルパー細胞分化を解析したところ、Sema4A 欠損 T 細胞の Th1 細胞への分化は著しく損なわれていた。また、Th1 反応を強力に誘導することで知られている *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) を接種しても Sema4A 欠損マウスにおいては IFN- $\gamma$  産生 Th1 細胞が出現しなかった。これらの結果から、Sema4A は Th1 細胞分化において必須の役割を果たしていることが明らかとなった。更に、Sema4A 欠損及び野生型樹状細胞を用いた移入実験から、生体内においては樹状細胞上の Sema4A が T 細胞の初期活性化、T 細胞上の Sema4A が Th1 細胞分化に必要であることが判った。

#### **Sema7A の T 細胞依存性炎症反応における役割**

Sema7A はセマフォリンファミリーの中では唯一の GPI アンカー型の膜タンパクである。免疫系においては、Sema7A の発現は活性化 T 細胞に特異的に誘導される。また、リコンビナント Sema7A はヒト及びマウスのマクロファージや単球上の  $\alpha 1\beta 1$  インテグリン/VLA1 に結合し、IL-6 や TNF- $\alpha$  などのサイトカインの分泌を誘導する。Sema7A および  $\alpha 1\beta 1$  インテグリンはそれぞれ活性化 T 細胞とマクロファージ上で一様に分布しているが、これらの細胞が抗原特異的に結合するといずれの分子もその接触面に再分布する。すなわち、Sema7A とその受容体  $\alpha 1\beta 1$  インテグリンは、活性化 T 細胞とマクロファージ間に形成される免疫シナプスの構成成分であることが判った。興味あることに、Sema7A 欠損マウスは、抗原特異的なエフェクター T 細胞が正常に誘導されるにもかかわらず、EAE や接触性皮膚炎の誘導に対して抵抗性である。Sema7A 欠損および野生型 T 細胞を用いた移入実験から、Sema7A 欠損 T 細胞は炎症局所へ正常に移動できるが、局所で炎症を誘導できないことが明らかになっている。これらの結果は、T 細胞依存性の炎症の惹起には、T 細胞-マクロファージ間の免疫シナプスにおける Sema7A- $\alpha 1\beta 1$  インテグリン相互作用が必須であることを示している。

#### **Sema6Dによる心臓形成制御機構**

Sema6D はマウスの心臓から単離された新規セマフォリン分子である。ニワトリ胎児における Sema6D のノックダウン或いは異所性発現実験、受容体の探索などから、Sema6D はその受容体 Plexin-A1 介して心臓の初期形成、特に心室の形成において必須の役割を果たすことがわかった。また、その作用機序の解析から Plexin-A1 は心臓の部位特異的に 2 型 VEGF 受容体(VEGFR2) 或いは Off-track と会合し、心内膜細胞に対して化学反発活性或いは化学誘引活性という全く異なる活性を発揮し、複雑な心臓の形態形成に寄与していることを明らかにした。更に、Sema6D は心室の肉柱形成にも寄与しており、その際は受容体として機能して Plexin-A1 からの逆行性シグナルを心筋細胞に伝達していることも明らかになった。

#### **Plexin-A1 の T 細胞活性化における役割**

Sema6D および Plexin-A1 は免疫細胞でも発現しており、コンビナント可溶性 Sema6D は樹状細胞に対して種々の炎症性サイトカインの産生や補助刺激分子の発現を誘導する。Plexin-A1 の免疫系における役割を明らかにするために、Plexin-A1 欠損マウスを作成しその免疫能を解析した。そ

の結果、Plexin-A1 欠損マウスにおいては T 細胞免疫反応が著しく低下しており、また破骨細胞の分化異常から大理石病を発症することがわかった。このような Plexin-A1 欠損マウスの形質は、Plexin-A1 からのシグナルが樹状細胞の活性化を介した T 細胞免疫反応の制御のみならず、破骨細胞の分化や骨形成の制御においても必須の役割を果たすことを示している。樹状細胞や破骨細胞における Plexin-A1 シグナルの解析から、これらの細胞において Plexin-A1 は Trem-2 および DAP-12 分子と複合体を形成していることも明らかになった。さらに、Plexin-A1 欠損マウスにおける樹状細胞の動態の解析から、末梢組織からリンパ管への移行に Plexin-A1 が必須の役割を果たしていることも明らかになっている。従って、Plexin-A1 欠損マウスにおける T 細胞活性化不全には、樹状細胞の活性化の異常に加え、樹状細胞の末梢から所属リンパ節への移行の異常も寄与していると思われる。

### **Plexin-A4 による T 細胞反応の抑制的制御**

Plexin ファミリーに属する Plexin-A4 は Neuropilin-1 と複合体を形成し可溶性セマフォリン Sema3A の受容体として機能するだけでなく、膜結合型セマフォリン Sema6A に直接結合しそのシグナルを伝達することが知られている。免疫系においては Plexin-A4 は主に T 細胞やマクロファージ、樹状細胞に強く発現している。Plexin-A4 欠損マウスをタンパク抗原で免疫したところ、野生型マウスに比して強い T 細胞反応が認められた。また、MOG ペプチドで免疫した場合も、Plexin-A4 欠損マウスは野生型マウスに比べてより症状の強い実験的自己免疫性脳脊髄炎を発症した。このような T 細胞反応の亢進は、Plexin-A4 のリガンドの一つ Sema6A を欠損したマウスでは認められなかった。一方、Sema3A 欠損マウスや Neuropilin-1 の Sema3A 結合部位に変異を導入したノックインマウスでは、Plexin-A4 欠損マウスに類似の T 細胞反応の亢進が認められた。これらの結果から、Sema3A と Neuropilin-1-Plexin-A1 複合体との相互作用が T 細胞活性化の負の制御に関わっている可能性が考えられた。

## **§ 2 研究構想及び実施体制**

### **(1) 研究構想**

これまでの申請者らの研究によって CD100/Sema4D と Sema4A の2つのセマフォリン分子は免疫反応の調節において重要な働きをしていること、それ以外のセマフォリン分子も免疫細胞に対して生物活性を有することなどが示され、セマフォリン分子群による新たな免疫制御機構の存在の可能性が出てきた。本研究計画では、「セマフォリンによる免疫制御機構」という新たなパラダイムの確立と、それを基盤にした免疫病治療の開発を目的に、以下の①～④の項目の研究を行う。一方、セマフォリンは元来、神経系の発生で役割を持つ分子として同定されてきたものである、本研究の成果を生物学のより広い領域に浸透させるには、本研究の対象としているセマフォリンの個体発生における役割をも同時に示していく必要がある。そのために、②の項目では、対象セマフォリンの神経系、心血管系発生における役割を解析する。

① CD100/Sema4D による自己反応性 B 細胞の制御機構: 最近、CD100/Sema4D 欠損マウスにおいて、30 週令以降に自己抗体の産生や B 細胞の異常拡大等、自己免疫様の症状を呈することが見出され、CD100/Sema4D が自己反応性 B 細胞の制御にも関わっている可能性が出てきた。本研究では、組織学的解析や細胞移入実験などを行い、免疫不全状態から自己免疫への移行の分子機構を解明する。また、類似の疾患がヒトでも認められるのか、もしあれば CD100-CD72 シグナル系に異常があるのかなどを解析する。

② CD100/Sema4D 刺激による CD72 信号伝達調節の解析: これまでに CD100/Sema4D 刺激により CD72 が脱リン酸化され、SHP-1 が CD72 より解離することによって CD72 の抑制性シグナルが解除されることを明らかにしてきた。また、CD100/Sema4D 欠損 B 細胞では BCR、CD40、TLR4 のシグナルが減弱するだけでなく、FcγRIIB の抑制性シグナルも減弱していることも明らかにしている。本研究では、CD72 に結合した SHP-1 がこれらのレセプターからのシグナルをいかなる機構で調節するのかを明らかにする。

③ Sema4A による T 細胞刺激の分子機構: これまでに、Sema4A がその受容体 Tim-2 分子を介して T 細胞の活性化を促進すること、Sema4A が Tim-2 のチロシンリン酸化を誘導することを明らかにしてきた。本研究では、Tim-2 と会合する分子の解析、Tim-2 リン酸化酵素の同定などを行い、Tim-2 シグナル経路を明らかにする。また、TCR、Tim-2 刺激を同時に行い、TCR シグナルと Tim-2 シグナルのクロストークの有無を解析する。

④ Tim-2 以外の Sema4A 受容体の探索: Sema4A が Tim-2 に結合し Tim-3 には結合しないことを報告しているが、Tim ファミリーには8個のメンバーが存在する。Sema4A の Tim-2 や Tim-3 以外のメンバーへの結合を解析する。また、Tim-1 には遺伝多型が存在するので、種々のアレルの可溶性リコンビナント分子を作成し、BIAcore を用いて Sema4A との結合を解析する。もし、Sema4A が Tim-1 に結合し、しかも各アレル間で結合親和性が異なれば、Sema4A の Tim-1 への結合がマウスの気道過敏性を決定している可能性が出てくる。一方、セマフォリンの神経系で報告されている受容体は plexin ファミリーであるので、Sema4A がどの plexin 分子に結合するかも明らかにする。

⑤ Sema4A 欠損マウスの免疫反応の解析: Sema4A 欠損マウスはすでに作成済みで、Sema4A 欠損下におけるリンパ球分化、体液性免疫反応、細胞性免疫反応を解析する。また、Tim-2 欠損マウスも 16 年度中に作成できる予定なので、使用可能になればその免疫能を解析する。

⑥ Sema6D の免疫系における機能解析: 新規に単離したクラス VI セマフォリン分子 Sema6D は、Plexin-A1 に結合し、樹状細胞、マクロファージ、NK 細胞にサイトカイン産生を強く誘導することを明らかにしている。また、Sema6D が樹状細胞に対して強い遊走阻止活性を有していることも見出している。マウスにリコンビナント蛋白を投与し、Sema6D の免疫反応への影響を *in vivo* で解析する。既に、Sema6D 欠損マウス、Sema6D 過剰発現トランスジェニックマウスの作成を行っており、それらが使用可能になれば、それらを用いた *in vivo* 解析も行う。

⑦ その他の免疫セマフォリンの解析: 上記のセマフォリンに加え、Sema4B、Sema4G、Sema6B が免疫系で発現している。これらのセマフォリンについても、CD100/Sema4D や Sema4A で行ったのと同じ手法で解析する。Sema4G、Sema6B は NK 細胞に強く発現していることから、NK 細胞の機能を中心に解析する。また、Sema4G はマラリア感染で肝臓に発現誘導される転写産物としても報告されており、マラリア感染実験も取り入れて解析する。

⑧ 免疫における化学発因子としてのセマフォリンの機能解析: 免疫細胞のホーミングや 2 次免疫組織における住み分けはケモカインを代表とする化学誘引因子によって制御されている。しかし、これらの現象はケモカインだけで全て説明がつくわけではなく、化学発因子が関与している可能性も考えられる。事実、Sema6D は樹状細胞の遊走に対して強い阻止活性を有している。従って本研究で取り上げるセマフォリンに関しても、免疫細胞のホーミングや住み分けにおいて化学発因子として機能しているかについて検討する。

⑨ 免疫セマフォリンを標的にした免疫制御の試み: 既に、抗 Sema4A 抗体を用いて EAE や GVH の発症を阻止できることを確認している。他のセマフォリンに対するモノクローナル抗体を用いて同様の解析を行い、セマフォリンが免疫病治療の分子標的になりうることを示す。

⑩ ヒト免疫セマフォリンの免疫機能: 上記のセマフォリンのヒトのホモログのリコンビナント分子やモノクローナル抗体を作成し、それらの免疫学的活性を解析する。

⑪ ニワトリ胎児を用いた免疫系以外でのセマフォリンの機能解析: これまでに、ニワトリ胎児の *in vitro* 培養系において過剰発現や RNAi を用い、Sema4A が血管新生に、Sema6D が心臓の発生に関与していることを見出している。特に、Sema6D は Plexin-A1 を受容体として用いて、心室領域の ballooning と endocardial cushion の形成に必須の役割を果たしている。本研究では、Sema4A や Sema6D の内皮細胞や心筋細胞への生物活性を解析し、心血管系の形成への関与の分子機構を明らかにする。その他のセマフォリンの個体発生への関与も同様の実験系で解析する。

## (2)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。

### § 3 研究実施内容及び成果

#### 3.1 Sema4D(CD100)シグナルと B 細胞のホメオスターシスの維持:

免疫系においてはじめて同定されたセマフォリンは、クラス IV サブファミリーに属する膜型セマフォリン Sema4D であり、T 細胞上に発現する分化抗原 CD100 としても知られている。Sema4D は B 細胞や樹状細胞上にもその発現が認められ、CD40 刺激などによってその発現はさらに増強する。神経系では Sema4D は Plexin-B1 に結合し神経軸索に対する化学反発活性を発揮することが知られている。一方、これまでの私たちの研究からは、免疫系における主要な受容体は CD72 分子であることが明らかになっている。CD72 は B 細胞やマクロファージ、樹状細胞に発現する膜タンパクであるが、細胞質内領域に ITIM モチーフを介して SHP-1 という蛋白質脱リン酸化酵素に会合し B 細胞の活性化を抑制するいわゆる抑制性受容体として知られていた。興味あることに、リコンビナント可溶性 Sema4D 分子 (Sema4D-Fc) の添加によって、抗 IgM 抗体や抗 CD40 抗体による B 細胞の活性化が著明に亢進する。

更に生化学的な解析から、Sema4D の結合が CD72 の細胞質内 ITIM の脱リン酸化と SHP-1 の解離を誘導することが明らかになっている。事実、Sema4D 欠損マウスの B 細胞は種々の刺激に対して低応答を示し、B 細胞上の

CD72 のリン酸化と SHP-1 との会合は恒常的に認められる。一方、Sema4D は樹状細胞に対しても働き、CD40 を介して刺激された樹状細胞の炎症性サイトカインの産生や MHC 分子、補助刺激分子の発現を増強する。樹状細胞は B 細胞と同様に CD72 を発現しており、T 細胞上の Sema4D が CD72 を介して樹状細胞の活性化を更に増強していると思われる。Sema4D を介した樹状細胞の活性化は T 細胞の活性化にとっても重要であり、Sema4D 欠損マウスを蛋白抗原で免疫しても抗原特異的な T 細胞の出現が著しく低下している。これら一連の解析から、Sema4D は CD72 の抑制性シグナルを解除するという非常にユニークな機構で、B 細胞や抗原提示細胞の活性化閾値を制御していると考えられた。以上の背景の下で本研究は、

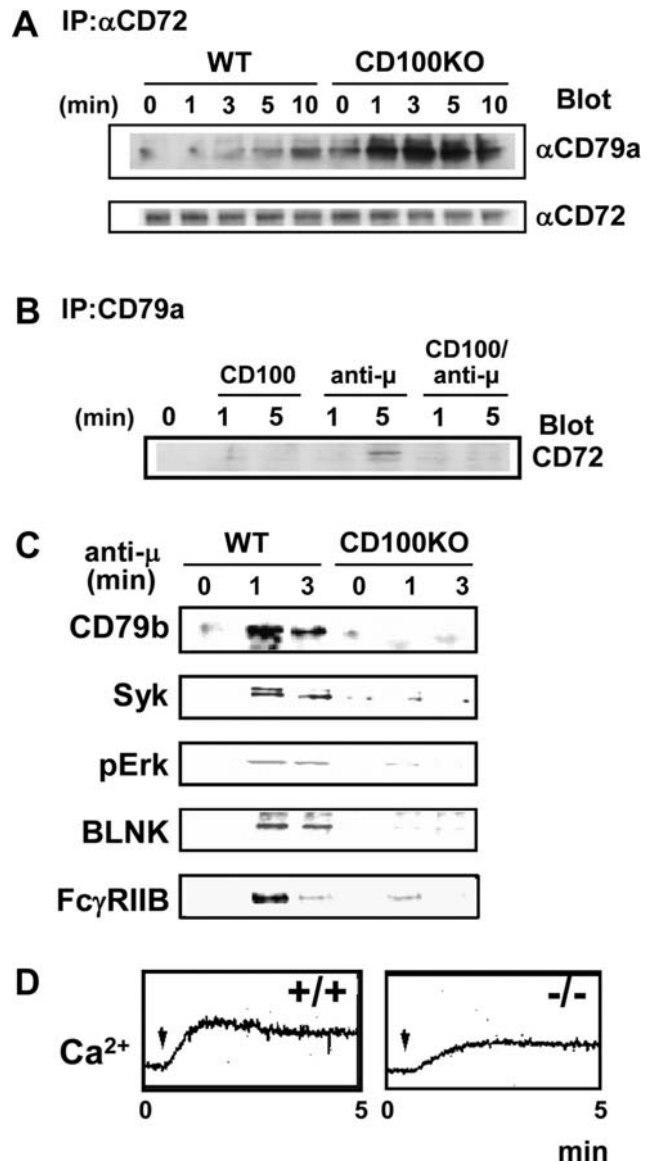


図2 Sema4D と CD72 による BCR シグナルの制御  
A. 抗 IgM 刺激後の BCR(CD79b)と CD72 の会合、B. Sema4D-Fc の添加は抗 IgM 刺激で誘導される BCR(CD79b)と CD72 の会合を阻害する、C. Sema4D 欠損 B 細胞における BCR シグナル分子のチロシンリン酸化の低下、D. Sema4D 欠損 B 細胞における抗 IgM 刺激で誘導される Ca<sup>2+</sup>反応の低下

Sema4D による B 細胞抗原受容体(BCR)シグナルの調節機構及び B 細胞恒常性維持における Sema4A の役割の解明を目指して行われた。

### (1) Sema4D による BCR シグナル制御機構

Sema4D による BCR シグナルの制御機構を解析するために、野生型及び Sema4D 欠損 B 細胞を抗 IgM 抗体で刺激し、CD72 と BCR 複合体との会合を解析した。野生型 B 細胞においては、抗 IgM 刺激前では CD72 と BCR 複合体の会合は認められなかった、刺激後数分で CD72 が BCR 複合体に会合することがわかった。一方、Sema4D 欠損マウスにおいては、刺激前において既に CD72 と BCR の会合が認められ、抗 IgM 刺激によってその会合は更に増強された。また、B 細胞の培養液中に可溶性 Sema4D を添加することにより、抗 IgM 刺激で誘導される CD72 と BCR の会合はほぼ完全に阻害された。CD72 は SHP-1 を介して BCR 複合体及びその下流のシグナル分子を脱リン酸化することにより、BCR シグナルを抑制的に制御していると考えられている。事実、抗 IgM 抗体で野生型及び Sema4D 欠損 B 細胞を刺激し BCR 下流のシグナル分子のリン酸化を解析したところ、Sema4D 欠損 B 細胞においては Ig $\beta$ 、Syk、Erk、BLNK などの分子のリン酸化が著しく低下していた。Sema4D 欠損 B 細胞においては、BCR 下流シグナル分子のリン酸化低下に一致して、抗 IgM 抗体により誘導される細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇も有意に阻害されていた(図 2)。

次に、野生型及び Sema4D 欠損 B 細胞を抗 IgM 抗体で刺激し、その増殖反応を比較した。その結果、抗 IgM 抗体で誘導される Sema4D 欠損 B 細胞の増殖は、野生型 B 細胞に比して低下していることがわかった。また、固層化した抗 IgM 抗体により BCR を強く架橋することで、B 細胞に細胞死を誘導することが出来るが、Sema4D 欠損 B 細胞においては抗 IgM 抗体による細胞死の誘導も著しく損なわれていた。以上の結果より、Sema4D はその抑制型受容体 CD72 の BCR 複合体への会合を阻害し、BCR シグナルの増強を誘導していることが明らかになった。(図 2)

### (2) B 細胞のホメオスタシス維持における Sema4D の役割

BCR シグナル閾値のきめ細かい制御が B 細胞の恒常性維持において重要であることが知られている。事実、BCR シグナル強度に異常を有する多くの変異マウスにおいては、B 細胞の恒常性に異常が認められる。Sema4D による BCR シグナル閾値の制御が B 細胞の恒常性に寄与しているのか否かを明らかにするために、野生型及び Sema4D 欠損マウスに飲料水に混入し

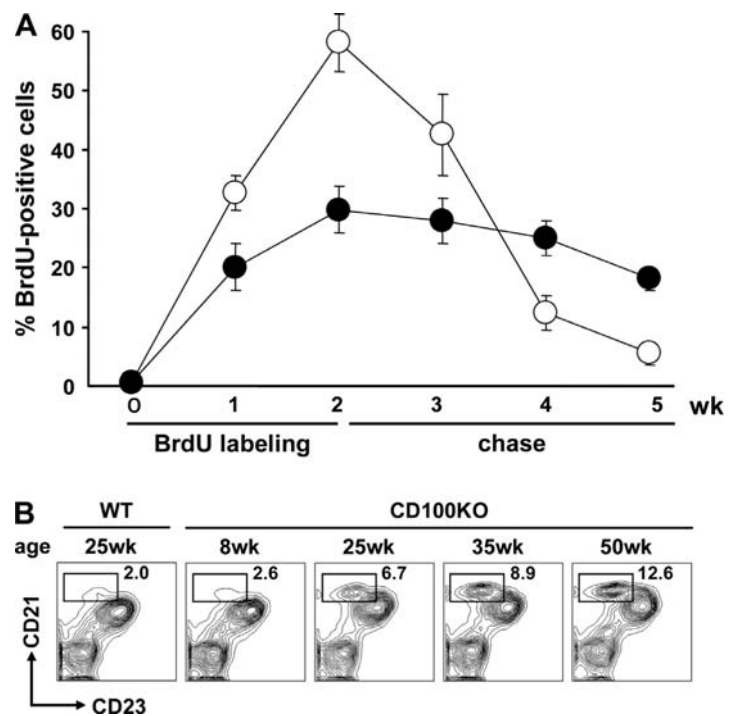


図3 Sema4D 欠損マウスにおける B 細胞集団の恒常性維持の異常 A. BrdU 摂取による B 細胞のターンオーバーの解析；Sema4D 欠損マウスにおいては、B 細胞の BrdU の取り込み率が低下し、その後の BrdU 陽性細胞の消失が遅延する。B. Sema4D 欠損マウスにおける B 細胞亜集団の解析；Sema4D 欠損マウスにおいては加齢とともに CD21<sup>high</sup>CD23<sup>low</sup> の MZ B 細胞の割合が増加する。(Int. Immunol. 17:1277-1282, 2005 より転載)

たBrdUを摂取させ、B細胞の生体内におけるターンオーバーを解析した。野生型マウスに比して、Sema4D欠損マウスのB細胞へのBrdUの取り込みが遅く、BrdU陽性細胞の消失

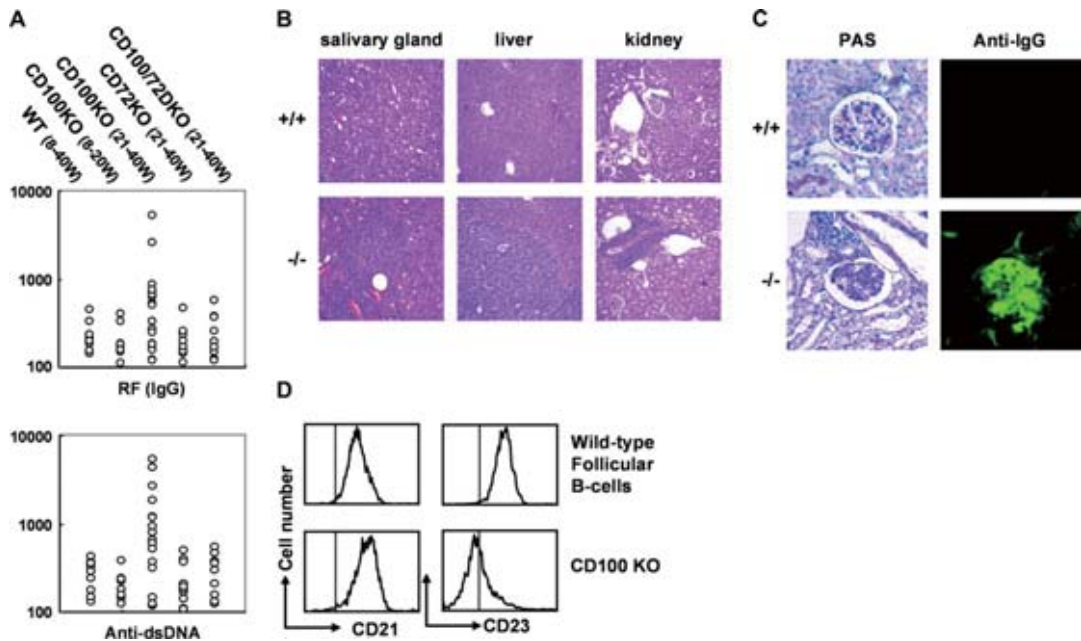


図4 Sema4D欠損マウスにおける自己免疫病の発症

A. 野生型、Sema4D欠損、CD72欠損、Sema4D/CD72二重欠損マウスにおける血中自己抗体価。B. Sema4D欠損マウスの唾液腺、肝臓、腎臓組織への単核球浸潤。C. Sema4D欠損マウスにおける糸球体腎炎の発症 D. Sema4D欠損マウスの組織に浸潤している細胞はMZ B細胞様の形質を持つ。(Int. Immunol. 17:1277-1282, 2005より転載)

にもより長い時間を要することから、Sema4D欠損B細胞のターンオーバーは著しく低下していることが明らかになった。(図3)

Sema4D欠損がB細胞の恒常性に病的な影響を及ぼすのか否かを明らかにするために、50週令までB細胞の細胞表面形質を観察した。その結果、十数週令までの若いマウスでは野生型マウスとSema4D欠損マウスの間にほとんど差は認められなかったが、25週令を境にしてSema4D欠損マウスの脾臓においてCD21<sup>high</sup>CD23<sup>low</sup>のmarginal zone(MZ) B細胞の割合が徐々に増加し、50週令では脾臓細胞の約12%にも達した(図3)。一方、脾臓における主要なB細胞亜集団である濾胞B細胞の増加は認められなかった。興味あることに、MZ B細胞の増加に一致して、Sema4D欠損マウスでは抗DNA抗体、リウマチ因子、抗SSA、抗RNPなどの血中自己抗体価の著明な上昇が認められた。更に、Sema4D欠損マウスの75%の唾液腺、30%の肝臓、25%の腎臓に特徴的な白血球浸潤が認められた。白血球浸潤が認められた腎臓では基底膜の肥厚や免疫複合体の沈着が認められ典型的な自己免疫性糸球体腎炎の像を呈していた。唾液腺に浸潤している細胞を分離して、種々の抗体で染色したところ、T細胞や樹状細胞も認められたが浸潤細胞の大部分がB細胞であり、しかもCD21<sup>high</sup>CD23<sup>low</sup>のMZ B細胞様の細胞であった。また、Sema4D欠損マウスの脾臓から濾胞B細胞とMZ B細胞を分離しそれぞれを培養したところ、自己抗体はMZ B細胞から分泌されていることが明らかになった。(図4)

次に、Sema4D欠損マウスにおける自己免疫の発症が、CD72のシグナルの恒常的な活性化の結果なのか否かを明らかにするために、Sema4D/CD72二重欠損マウスを作成した。まず、CD72欠損マウスにおいては、CD72の抑制性シグナルが全く欠失しているにもかかわらず、50週令までに自己免疫を発症する個体は認められなかった。一方、Sema4D/CD72二重欠損マウスにおいても自己免疫の発症は全く認められず、Sema4D欠損マウスにおける自己免疫発症は、CD72の過剰なシグナルがB細胞で恒常的に伝達さ



れた結果と考えられた。(図 4)

### 3.2 Sema4A による T ヘルパー細胞の分化制御

Sema4A は申請者らのグループによって、マウス樹状細胞よりクローニングされたセマフォリン分子である。構造は Sema4D と同様のドメイン構造をもち、クラス4サブファミリーに属する膜型のセマフォリンである。その発現は、樹状細胞に恒常的に認められる。また、発現クローニングにより、その結合分子として Tim ファミリーのメンバー、Tim-2 がクローニングされている。Tim-2 は活性化 T 細胞上に一過性に発現が誘導される分子であり、Sema4A は Tim-2 を介して T 細胞と樹状細胞間の相互作用において機能している可能性が考えられた。事実、リコンビナント可溶性 Sema4A 分子(Sema4A-Fc)は、抗 CD3 抗体によって誘導される T 細胞の増殖を更に増強する活性、いわゆる補助刺激分子活性を有する。一方、抗 Sema4A 阻害抗体は異種樹状細胞を刺激細胞として用いたリンパ球混合培養における T 細胞の増殖を有意に阻害できる。*In vivo* においても、マウスをタンパク抗原で免疫する際に同時に Sema4A-Fc を投与すると、抗原特異的な T 細胞の出現が更に増加する。また、マウスにオリゴデンドロサイト糖

由来ペプチドをマウスに免疫することにより、多発性硬化症の実験モデル、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を誘導できるが、MOG ペプチドを免疫する際に抗 Sema4A 阻害抗体を投与すると EAE の発症を抑制することが出来る。これら、申請者らのグループによる先行研究から、樹状細胞上の Sema4A は T 細胞に対して補助刺激分子様活性を発揮することにより、T 細胞の初期活性化に寄与している可能性が示唆されていた。

本研究プロジェクトでは、Sema4A 欠損マウスの作成、解析を通して Sema4A の生体内における役割をさらに解明することを目指した。

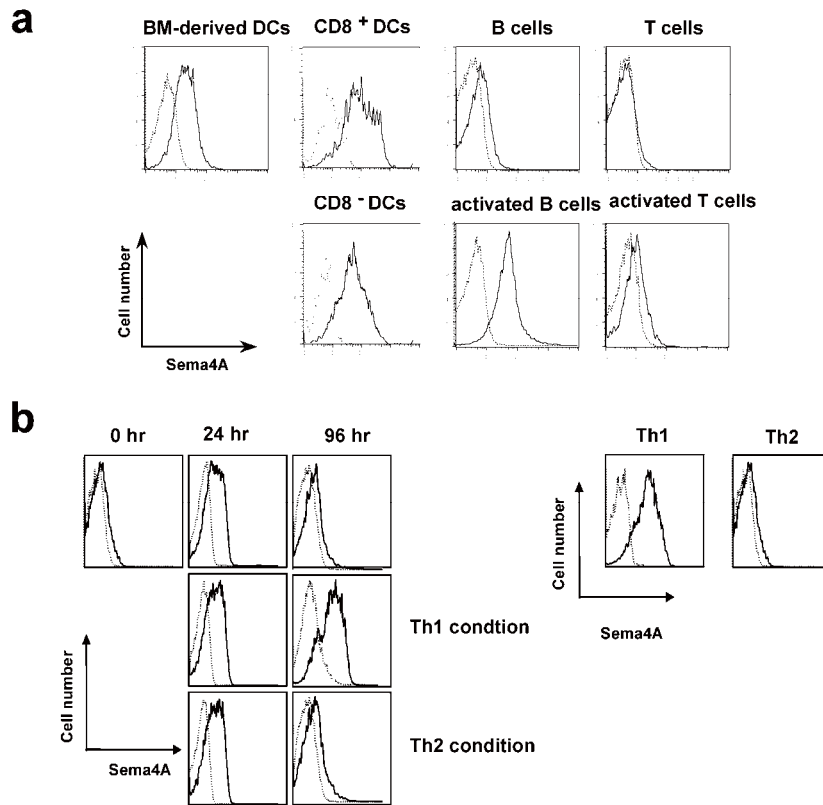


図 5 免疫細胞上における Sema4A の発現

a. Sema4A は骨髄から誘導した樹状細胞、脾臓から調製した樹状細胞上に恒常的に発現する。一方、B 細胞や T 細胞上には活性化により一過性に発現誘導される。b. T 細胞を抗 CD3 および抗 CD28 で刺激した場合或いは、Th2 誘導条件下(IL-4, 抗 IL-12, 抗 IFN- $\gamma$ 存在下)で刺激した場合は Sema4A の発現は一過性であった。しかし、Th1 誘導条件下(IL-12, 抗 IL-4 存在下)で培養した場合は、Sema4A は 24 時間後に発現の上昇が認められ、その後更にその発現が上昇した。また、Th1 に分化した株化細胞にも特異的に発現した。(Immunity 22: 305, 2005 より転載)

### (1) 免疫細胞上の Sema4A の発現

Sema4A の発現は、樹状細胞上に恒常的に認められるが、活性化 T 細胞上にも一過性に誘導される。T 細胞における Sema4A の発現を更に詳細に検討するために、T 細胞を種々の条件下で培養し、経時的に Sema4A の発現を解析した。T 細胞を抗 CD3 および抗 CD28 で刺激した場合は、刺激後 24 時間で一過性の Sema4A 発現が認められ、その発現はその後速やかに減弱した。また、Th2 誘導条件下 (IL-4、抗 IL-12、抗 IFN- $\gamma$  存在下) で、T 細胞を刺激した場合も、同様の一過性の発現のみが認められた。しかし、Th1 誘導条件下 (IL-12、抗 IL-4 存在下) で培養した場合は、Sema4A は 24 時間後に発現の上昇が認められ、その後更にその発現が上昇した。更に、同様の T ヘルパー細胞誘導条件で培養を続け、Th1 及び Th2 細胞株を樹立した後に、Sema4A の発現を比較した場合も、Sema4A は Th1 細胞株に選択的に発現することが明らかになった。すなわち、Sema4A は樹状細胞に恒常的に発現するのに加え、Th1 への分化途上の細胞あるいは Th1 に分化した細胞上にも強く発現することが明らかになった。(図 5)

### (2) Th1 細胞分化における Sema4A の役割

樹状細胞及び Th1 分化細胞上に発現する Sema4A の機能を明らかにするために、Sema4A 欠損マウスを作成した。欠損マウスはメンデルの法則にしたがって生まれ、生後も発育・成長遅延は認められなかった。神経系の解析からは、網膜の形成に異常をきたしていること以外は大きな欠損は認められなかった。また免疫系の発生学的な異常も同様に認められなかった。しかし、マウス骨髄より樹状細胞を誘導し、リンパ球混合培養でアロ T 細胞を刺激する活性を解析したところ、Sema4A 欠損樹状細胞は野生型樹状細胞に比べアロ T 細胞

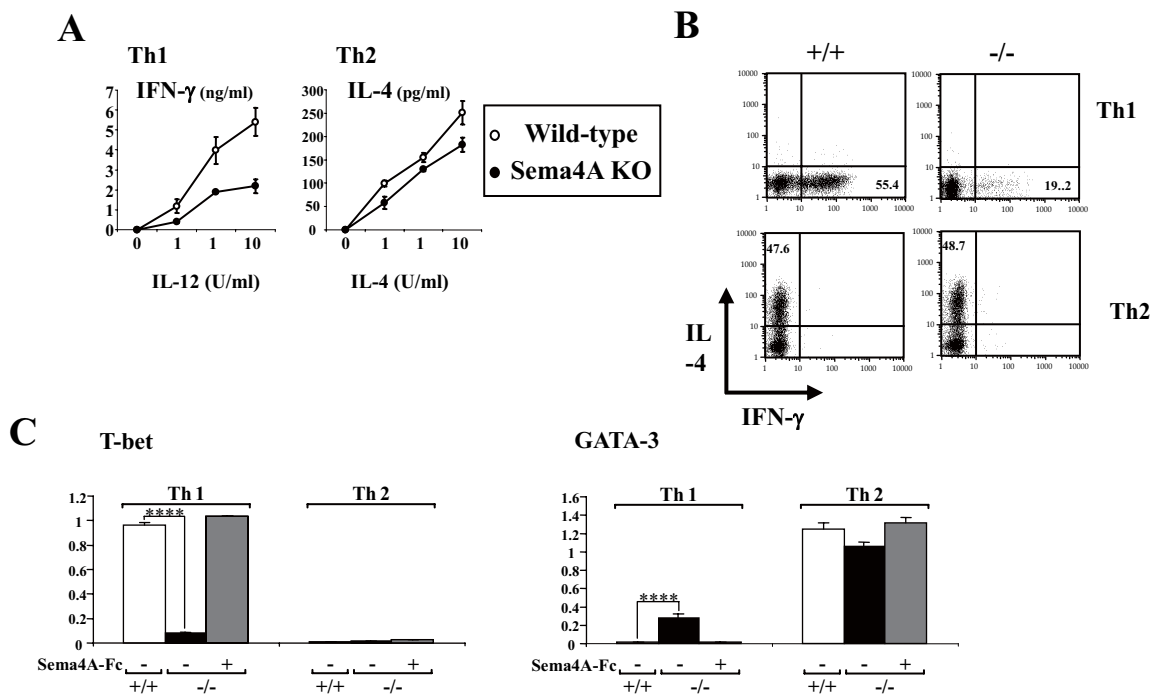


図 6 Sema4A 欠損 T 細胞の Th1 細胞への分化異常

野生型及び Sema4A 欠損マウスから休止期の T 細胞を調製し、Th1 及び Th2 誘導条件下で 5 日間培養した後、抗 CD3 で刺激し、サイトカインの産生を解析した。A. Th1 誘導細胞における IFN- $\gamma$  分泌と Th2 誘導細胞における IL-4 分泌。B. Th1 誘導および Th2 誘導細胞における細胞質内 IFN- $\gamma$  と IL-4 染色。C. Th1 誘導および Th2 誘導細胞における T-bet と GATA3 の RNA 発現。

刺激能が劣っており、先行研究で認めていた T 細胞の初期活性化における樹状細胞上の Sema4A の機能が確認できた。次に、Sema4A 欠損及び野生型マウスより調整した休止期 T 細胞を Th1 及び Th2 誘導条件下で培養し、ヘルパー T 細胞への分化能を解析した。Th2 誘導条件下では、Sema4A 欠損 T 細胞は野生型 T 細胞と同程度に IL4 産生 T 細胞に分化できた。しかし、Th1 誘導条件下での培養では、Sema4A 欠損マウスの IFN- $\gamma$  産生 T 細胞への分化が著しく損なわれていた。Th1 細胞への分化に必須の転写因子として T-bet が知られているが、Sema4A 欠損マウスにおいて T-bet の発現も低下していた。更に、Sema4A 欠損 T 細胞の Th1 細胞への分化は、培養液への Sema4A-Fc の添加や野生型 T 細胞との混合培養により回復した。これらの結果は、T 細胞上に発現する Sema4A が Th1 分化において非常に重要な役割を果たしていることを示している。(図 6)

Sema4A が実際に生体内で Th1 分化の制御に関わっていることを明らかにするために、Sema4A 欠損マウス及び野生型マウスに Th1 反応を強力に誘導することで知られている

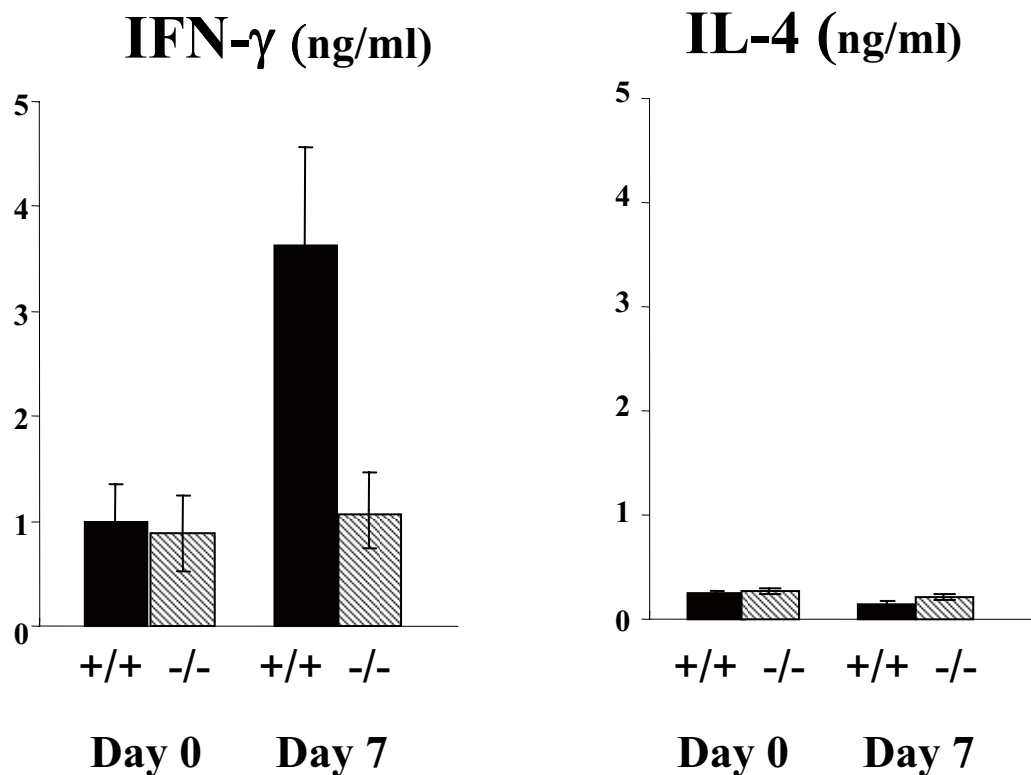


図 7 野生型及び Sema4A 欠損マウスの *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) に対する反応性  
野生型及び Sema4A 欠損マウスに *P. acnes* を接種した後、IFN- $\gamma$  と IL-4 の産生を解析した。

*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) を接種し T 細胞の IFN- $\gamma$  の産生能を解析した。その結果、*P. acnes* の接種によって誘導される IFN- $\gamma$  産生が Sema4A 欠損マウスにおいて著しく低下していることが明らかになった(図7)。一方、Th2 反応を誘導することで知られている *Nippostrongylus brasiliensis* を接種した場合は、Sema4A 欠損マウスは野生型マウスに比してより高い IgE 値や IL-4 産生を示した。

### (3) 樹状細胞由来及び T 細胞由来の Sema4A の機能的使い分け

試験管内の実験からは、樹状細胞と T 細胞上の Sema4A はそれぞれ T 細胞の分化の異なるステップで機能している可能性が考えられた。そこで、生体内でも同じような使い分けがあるのかどうか検討するために、蛋白抗原である keyhole limpet hemocyanin(KLH)あるいは *P.acnes* で刺激した樹状細胞を移入して免疫反応を誘導する実験系を用いて検討した。

Sema4A 欠損及び野生型マウスから調製した樹状細胞を試験管内で抗原でパルスしたのち、Sema4A 欠損及び野生型のレシピエントマウスに移入しその免疫反応を解析した。この移入実験では、Sema4A 欠損樹状細胞/Sema4A 欠損 T 細胞、野生型欠損樹状細胞/Sema4A 欠損 T 細胞、Sema4A 欠損樹状細胞/野生型 T 細胞、野生型樹状細胞/野生型 T 細胞の4種類の組み合わせにおけるT細胞反応を比較できる。まず、樹状細胞、T細胞のいずれもがSema4Aを発現していない場合は、T細胞反応はほとんど誘導されなかった。T細胞上にSema4Aが発現していても樹状細胞がSema4A欠損の場合は、抗原によって誘導されるT細胞の増殖、IL-2産生が有意に低かった。一方、T細胞がSema4A欠損マウス由来の場合は、樹状細胞にSema4Aが発現していてもIFN- $\gamma$ 産生T細胞の出現がなく、逆にIL-4産生細胞の出現が増加していた。すなわち、生体内においても樹状細胞由来のSema4AはT細胞の初期活性化の、T細胞由来のSema4AはTh1細胞分化の制御において機能していることが明らかになった。(図8)

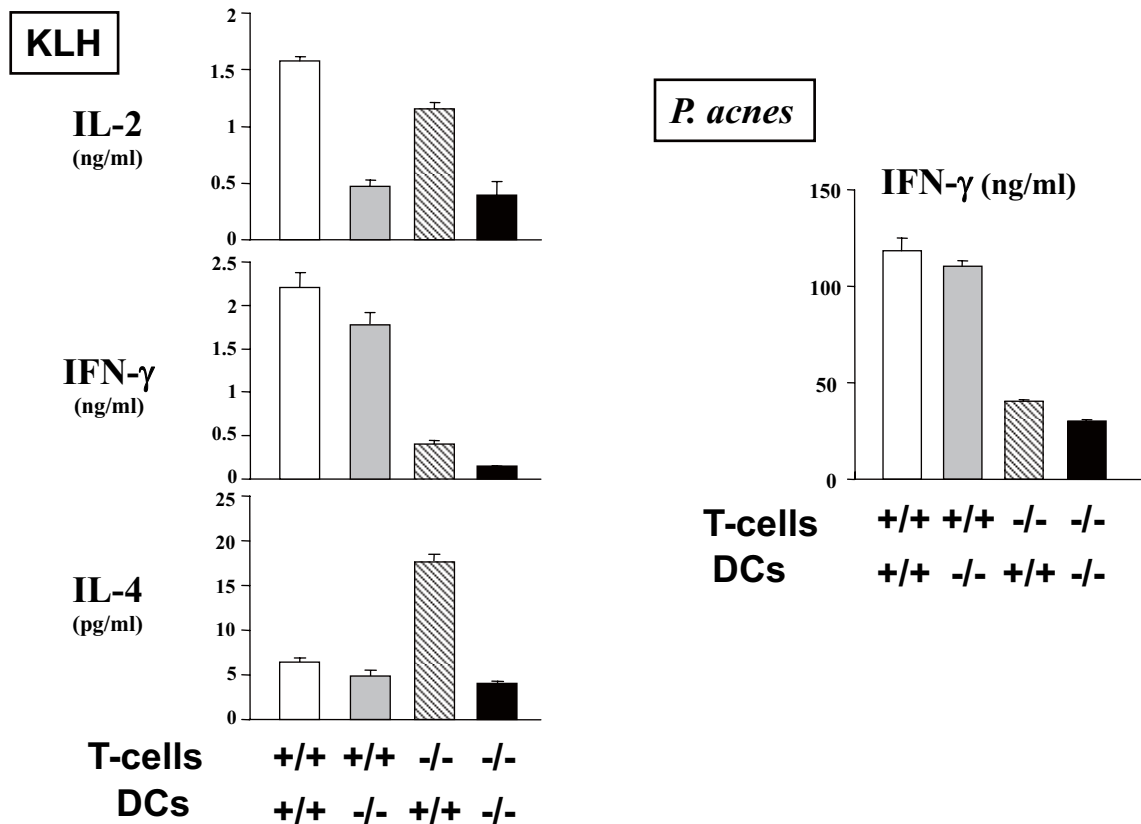


図8 樹状細胞上のSema4AはT細胞の初期活性化に、T細胞上のSema4AはTh1分化に必要である野生型及びSema4A欠損マウスの樹状細胞をKLH或いは*P. acnes*でパルスした後に野生型及びSema4A欠損マウスに移入した。移入マウスよりT細胞を調製し試験管内で同じ抗原で刺激し、サイトカインの産生を解析した。

#### (4) 免疫病治療の分子標的候補としてのSema4A

抗Sema4A阻害抗体の投与は、T細胞の活性化を有意に抑制できるとともに、EAEの発症をも抑制できることから、Sema4Aとその受容体は、多発性硬化症などの異常なTh1型免疫反応によって発症すると思われる自己免疫疾患治療のための分子標的候補と考えられる。一方、Sema4A欠損マウスは野生型マウスに比べ、タンパク抗原の免疫や*N. brasiliensis*の感染に対してより強いTh2反応を示す。Sema4AのTh2反応及びTh2型の免疫病における役割を解析するため、Sema4A欠損マウスをBALB/cマウスに戻し交配しSema4A欠損BALB/cマウスを作成した。興味あることに、雄のSema4A欠損BALB/cマウスの一部が皮膚炎を発症した。皮膚炎を発症した皮下にはマスト細胞の浸潤が見られること、血中IgEが

有意に亢進していること、T 細胞の IL-4 産生が亢進していることなどから、Sema4A 欠損 BALB/c マウスの皮膚症状はアトピー性皮膚炎と考えられる。

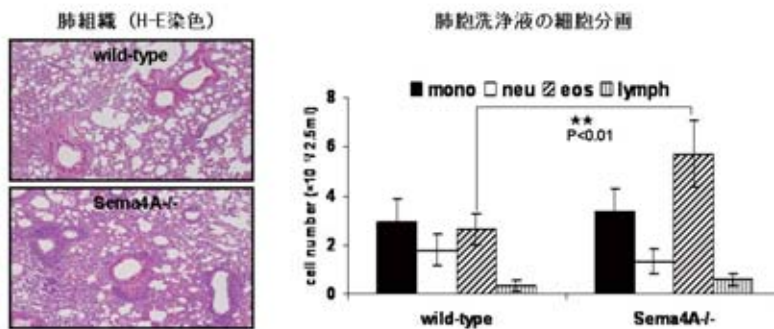


図 9 Sema4A 欠損 BALB/c マウスにおける抗原特異的気道過敏性の亢進

BALB/c マウスは野生型マウスに比して、気道のコンプライアンスは更に低下しており、気道抵抗もより亢進していた(図9)。また、Sema4A 欠損 BALB/c マウスの肺胞において多くの好酸球の浸潤が認められ、肺胞洗浄液中の Th2 サイトカインレベルも上昇していることが明らかになった。これからの結果は、Sema4A 欠損 BALB/c マウスが OVA による気道過敏性誘導により感受性が高いことを示しており、Th2 型の免疫病などにおいても Sema4A やその受容体が、有用な分子標的候補になりうると考えられた。

更に、Th2 型免疫病における Sema4A の役割を解析するために、Sema4A 欠損 BALB/c マウスおよび野生型マウスに卵白アルブミン (OVA) を免疫し、その後経鼻的に OVA でチャレンジすることにより気道過敏性 (実験的喘息モデル) を誘導した。

Sema4A 欠損

### 3. 3 Sema7A の T 細胞依存性炎症反応における役割

Sema7A はセマフォリンファミリーの中で唯一の GPI アンカー型の膜結合タンパク質である。また、Sema7A はワクチニアウイルス由来セマフォリン A39R の哺乳類ホモログとして知られ、A39R と同様に Plexin-C1 に結合することが報告されていた。しかし、Sema7A 欠損マウスを用いた解析からは、Sema7A が外側嗅索の形成に必要なこと、また Plexin-C1 ではなく  $\beta 1$  インテグリンを介して神経細胞の成長を誘導することが明らかになっている。Sema7A は CD108 としても知られ、血液系でその発現が認められている。本研究では、Sema7A 欠損マウスを用いて免疫系における Sema7A の役割の解析及び、Sema7A の機能的な受容体の同定を行った。

#### (1) Sema7A は $\alpha 1 \beta 1$ インテグリンを介してマクロファージを活性化する

まず、Sema7A がヒト及びマウスマクロファージに結合し、炎症性サイトカインの産生を誘導できるか否かを解析した。ヒト末梢血及びマウス骨髄より調製したマクロファージを Sema7A-Fc 吸着プレート上で培養し、Sema7A のマクロファージへの結合と炎症性サイトカインの産生誘導能を検討した。その結果、Sema7A はヒト及びマウスのマクロファージに特異的に結合し、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 の産生を誘導できることが確認された。神経系では Sema7A の  $\beta 1$  インテグリンへの結合が報告されている。そこで、各種抗インテグリン抗体を上記の培養液に加えその影響を解析したところ、 $\alpha 1$  インテグリン抗体と  $\beta 1$  インテグリン抗体が Sema7A のマクロファージへの結合能とサイトカイン産生誘導能を阻害することが明らかになった。さらに、 $\alpha 1$  インテグリン欠損マウスのマクロファージの Sema7A に対する反応は大きく減弱していた。また、Sema7A の細胞外領域にはインテグリン結合モチーフとして知られる RGD 配列が存在するが、これを KGE に置き換えた変異 Sema7A はマクロファージにサイトカイン産生を誘導できなかった。以上の結果から、Sema7A はマクロファージ上に発現する  $\alpha 1 \beta 1$  インテグリンに直接結合し、炎症性サイトカインの産生を誘導すると考えられた。(図 10)

## (2) $\alpha 1 \beta 1$ インテグリンの下流のシグナルを活性化する

いかなる機構で Sema7A が  $\alpha 1 \beta 1$  インテグリンを介してマクロファージを活性化させるのか

を明らかにするために、Sema7A 刺激後の  $\alpha 1 \beta 1$  インテグリンの分布、 $\alpha 1 \beta 1$  インテグリンの下流のシグナル分子の活性化の状態を解析した。マクロファージ細胞株を Sema7A-Fc 吸着プレート上で培養すると、細胞上に一様に分布していた  $\alpha 1 \beta 1$  インテグリンはプレートとの接触面にリング状に再分布した。また、 $\alpha 1 \beta 1$  インテグリンの直下のキナーゼ分子 FAK も Sema7A 刺激後、 $\alpha 1 \beta 1$  インテグリンと共局在を示すことがわかった。更に、Sema7A は FAK や ERK1/2 のチロシン酸化を誘導することがわかった。これらの結果は、Sema7A はマクロファージ上の  $\alpha 1 \beta 1$  インテグリンのクラスター化を誘導することにより、その下流の MAP キナーゼを活性化していることが考えられた。事実、MAP キナーゼ阻害剤存在下では、Sema7A はマクロファージのサイトカイン産生を誘導できなかった。(図 11)

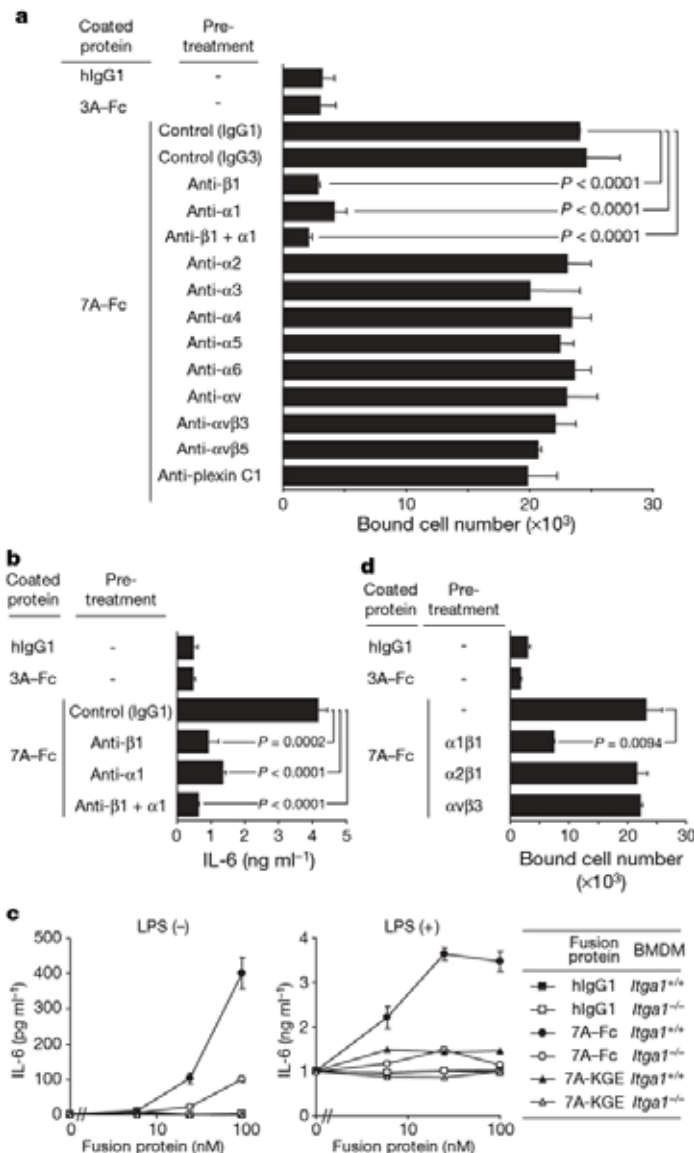


図 10 Sema7A は  $\alpha 1 \beta 1$  インテグリンを介してマクロファージに結合し炎症性サイトカインの産生を誘導する

a 抗  $\alpha 1$  インテグリンと抗  $\beta 1$  インテグリン抗体はマクロファージの Sema7A 吸着プレートへの接着を阻害する。b 抗  $\alpha 1$  インテグリンと抗  $\beta 1$  インテグリン抗体は Sema7A-Fc で誘導される IL-6 産生を抑制する。c  $\alpha 1$  インテグリン欠損マウスのマクロファージは Sema7A-Fc 刺激に対して IL-6 を産生出来ない。d 可溶性  $\alpha 1 \beta 1$  インテグリンはマクロファージの Sema7A への結合を阻害する。

を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、Sema7A と  $\alpha 1 \beta 1$  インテグリンは免疫シナプスのそれぞれ T 細胞側とマクロファージ側に分布していることが明らかになった。次に、Sema7A 欠損 OTII T 細胞と野生型マクロファージ間或いは野生型 OTII T 細胞と  $\alpha 1$  インテグリン欠損マクロファージ間で免疫シナプスを形成させたところ、T 細胞上の Sema7A の免疫シナプスへの集積はマクロファージ上に  $\alpha 1 \beta 1$  インテグリンが発現していなくても認められたが、マク

## (3) Sema7A と $\alpha 1 \beta 1$ インテグリンは免疫シナプスの構成要素として機能する

種々の免疫細胞における Sema7A の発現を、フローサイトメーターで解析したところ、Sema7A は休止期の T 細胞には発現されていないが、T 細胞の活性化によって発現が誘導されることが明らかになり、活性化 T 細胞とマクロファージ間の相互作用の過程で、Sema7A が機能している可能性が考えられた。そこで、OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス (OTII) の T 細胞と OVA でパルスしたマクロファージの間で免疫シナプスを形成させた上で、Sema7A と  $\alpha 1 \beta 1$  インテグリン

ロファージ上の $\alpha 1\beta 1$  インテグリンの免疫シナプスへの集積は、T 細胞上に Sema7A が発現していないと起こらなかった。Sema7A が GPI アンカー型膜タンパク、すなわち脂質ラフトタンパクということ考えると、この結果は、T 細胞-マクロファージ相互作用において Sema7A が脂質ラフトとともに免疫シナプスに高密度に再集積し、その結果マクロファージ上の $\alpha 1\beta 1$  インテグリンを強力にクラスター化する可能性を強く示唆している。(図 11)

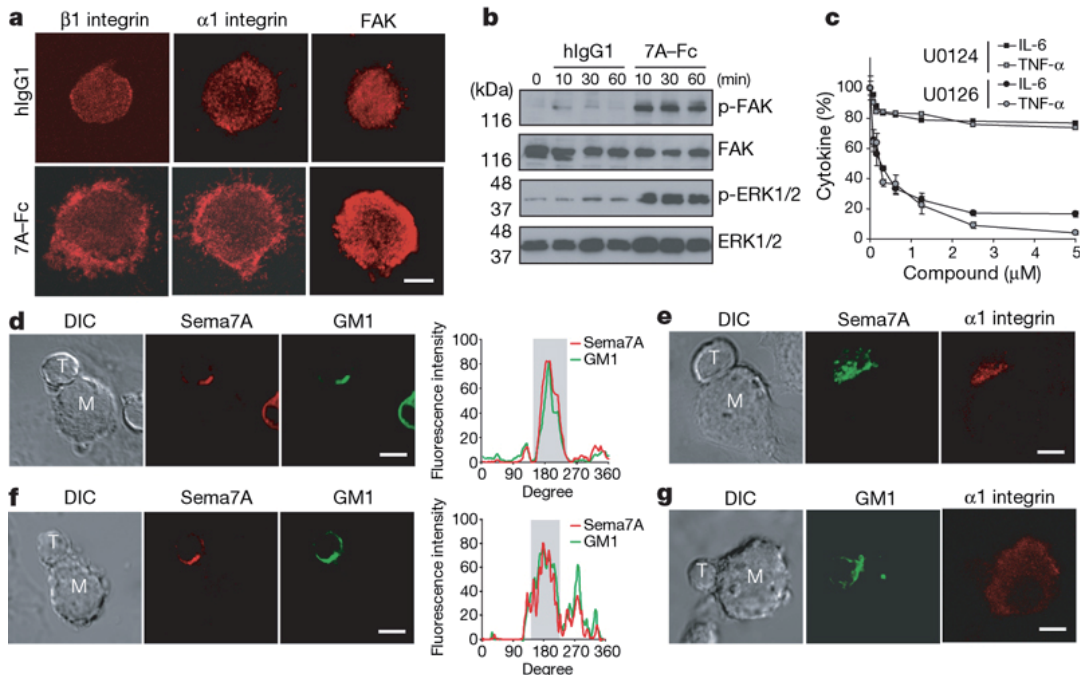


図 11 Sema7A は免疫シナプスにおいてマクロファージ上の $\alpha 1\beta 1$  インテグリンのクラスター化を誘導し MAP キナーゼ経路を活性化させる

a マクロファージが Sema7A 吸着プレートに接着すると $\alpha 1\beta 1$  インテグリンと FAK は再分布クラスターを構成する。b Sema7A 刺激はマクロファージに MAP キナーゼ経路の活性化を誘導する。c MAP キナーゼ阻害剤は Sema7A によるマクロファージの炎症性サイトカイン産生誘導を阻害する。d, e Sema7A と $\alpha 1$  インテグリンは免疫シナプスの構成成分である。f 野生型 T 細胞と $\alpha 1$  インテグリン欠損マクロファージ間の免疫シナプス。Sema7A は免疫シナプスに集積する。g Sema7A 欠損 T 細胞と野生型マクロファージ間の免疫シナプス。 $\alpha 1$  インテグリンは免疫シナプスに集積できない。

#### (4) Sema7A は T 細胞依存性炎症反応のエフェクター相で機能する

T 細胞依存性免疫反応における Sema7A の役割を明らかにするために、Sema7A 欠損マウスの二種の T 細胞依存性炎症疾患の実験モデル、EAE とハプテン誘導性接触性皮膚炎に対する感受性を検討した。Sema7A 欠損マウスはいずれの実験モデルにおいても、野生型マウスとは異なり非常に軽度の症状しか認められなかった。また、MOG ペプチドで免疫あるいはハプテンを塗布された Sema7A 欠損マウスにおいては、抗原特異的なサイトカイン産生 T 細胞は野生型マウスと同程度に出現したが、これら T 細胞をレシピエントマウスに静脈注射しても EAE や接触性皮膚炎を移入することは出来なかった(図 12)。この結果は、EAE や接触性皮膚炎の発症には、T 細胞上に発現する Sema7A が必須であることを示している。次に、ハプテン誘導性接触性皮膚炎の実験系を用いて、蛍光色素で標識した Sema7A 欠損及び野生型ハプテン反応性 T 細胞をレシピエントマウスに移入したところ、いずれのマウス由来の細胞も皮膚の炎症局所に移動することが出来た。しかし、Sema7A 欠損マウスの T 細胞を直接皮膚に移入しても皮膚炎を誘導することは出来なかった。従って、Sema7A 欠損 T 細胞は炎症局所までは移動できるが、局所で炎症を誘導できないことを示している。以上の結果から、Sema7A は T 細胞依存性炎症反応のエフェクター相において T 細胞がマクロファージを直接活性化する際に機能していると思われる。

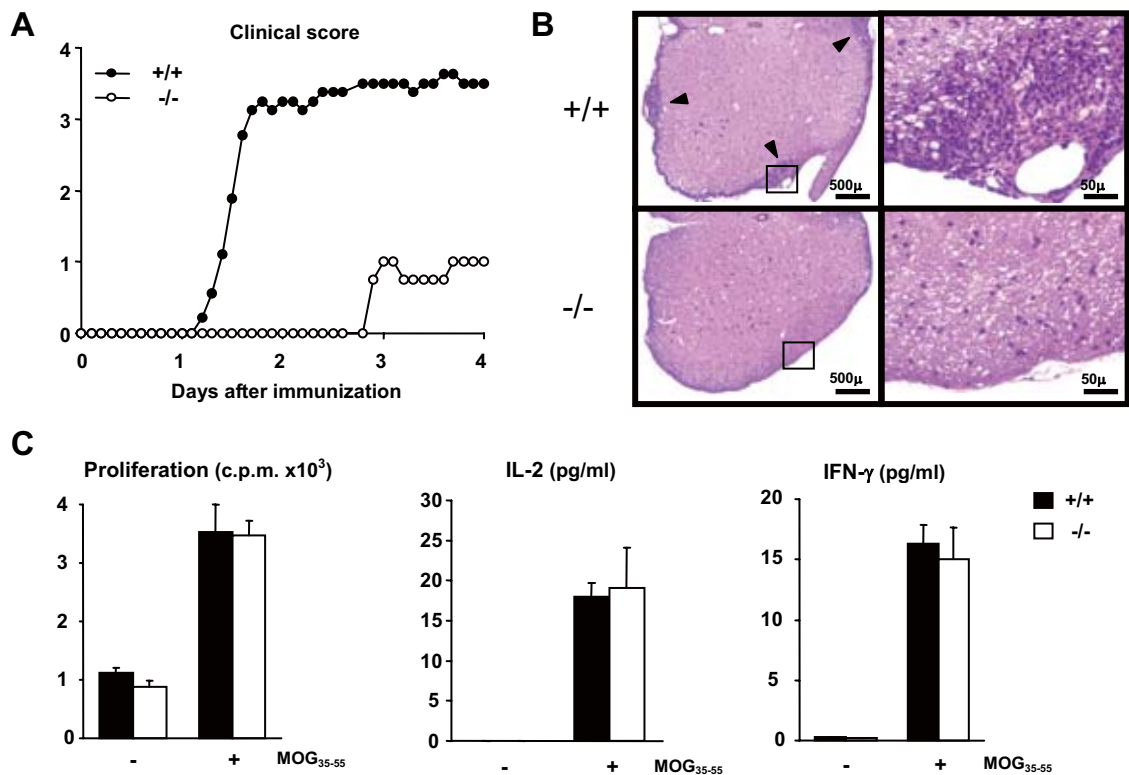


図 12 Sema7A 欠損マウスは自己抗原特異的エフェクターT 細胞は出現するが EAE 誘導に対して抵抗性である

A Sema7A 欠損マウスの EAE の臨床経過。B Sema7A 欠損マウスの脊髄へのリンパ球浸潤は野生型マウスに比べ非常に軽度である。C Sema7A 欠損マウスにおいても野生型マウスと同程度に MOG 特異的エフェクター細胞が出現する。

### 3.4 Sema6Dによる心臓形成制御機構

多細胞生物に必須の体液循環システムにおいて、心臓は駆動系であり血管は輸送系を司る。心臓の発生はいくつかの転写因子により制御されていることがここ数年明らかとなってきた (*Cell* 110:153, 2002, *Nature Rev Genet* 3:544, 2002)。さらに心臓の形態形成には心筋細胞のダイナミックな移動に基づく制御機構が存在することを示唆する研究が報告されている。シウジョウバエの心発生において、ガイダンス因子 Slit が心筋芽細胞の移動と融合による心臓管形成に関与する (*Curr. Biol.* 15: 2271, 2005)。一方、血管系の発生については神経ガイダンス因子の一つである Ephrin と Eph 受容体の動・静脈決定への関与が報告されるなど (*Genes Dev.*13: 295-306, 1999, *Cell* 93: 741, 1998)、これまで神経ガイダンス因子とされてきた因子の血管形成における役割が現在注目されている。当初神経ガイダンス因子とされてきたセマフォリン分子群が、近年血管内皮細胞による血管形成抑制作用や (*Nature* 424:391, 2003, *Science* 307:265, 2005)、心臓発生への関与を示唆する報告もなされている (*Development* 2001, 128: 3061-3070)。

セマフォリン分子群が心臓形成に関わる機序をあきらかにするために、心臓 cDNA ライブラリーより、心臓に高発現するセマフォリンを同定した。ニワトリ胎児を使用した実験モデルを使用し、ターゲット遺伝子を導入したウイルスをニワトリ初期胚の心臓予定領域(左右外側中胚葉)にエレクトロポレーションにより導入する。あるいはターゲット蛋白質を発現する細胞株を樹立し胎児に移植する。機能欠損実験ではターゲット遺伝子に対する siRNA または shRNA をコードしたウイルスを心臓予定領域(左右外側中胚葉)にエレクトロポレーションにより導入する。その後の胎児の形態形成は経時的に観察可能である。



### 3.4.1 新規クラスVIセマフォリン Sema6D の同定とその発現

セマフォリン分子はその構造的特徴として sema domain を N 末端側に有する。この領域の両端に位置する共通するアミノ酸配列を利用して degenerative PCR 法により心臓 cDNA ライブラリーより Sema domain に相同性を示すいくつかの cDNA 断片を得た。核酸配列の解析より、新規クラスVI群に属するセマフォリン Sema6D を同定し、初期胚において、心臓と神経管背側部分に Sema6D の mRNA の発現を確認した。

### 3.4.2 初期心臓形成における Sema6D の役割

初期心臓形成において、左右外側中胚葉の心臓予定領域が移動し正中線上で融合してできた心臓管が、右方向へのループを形成し、次いで体軸に対して反時計方向に回転して頭側に心臓の流入路と流出路が並び、尾側にループ部分が位置し心室が形成される。この回転した心臓管内部に形成される隔壁により左右心房、左右心室が完成し、同時期に形成される弁により心房一心室間に弁が完成する。RNAi により心臓予定領域の Sema6D を欠損させた胎児は、心臓のループ形成が阻害される。Sema6D 過剰発現細胞の移植された胎児では、ループ部分の拡張を示した。さらにアルカリフォスファターゼ融合 Sema6D に結合する分子として同定した plexin-A1 の欠損胎児においても心臓のループ形成が阻害を観察したことより、Sema6D-plexin-A1 シグナルが初期心臓のループ形成を制御することが示された。

### 3.4.3 異なる受容体複合による Sema6D の部位特異的作用

ループ形成した心臓はループ形成部分の拡張を起こし、同時に心室流出路に心内膜細胞の増殖による隆起が出現する。両部位での Sema6D の機能を解析する目的にて、両部位を切除し explant としてコラーゲン・ゲル内でコントロール細胞塊ないし Sema6D 発現細胞塊と並べて培養した。ループ部の explant から遊走してくる心筋細胞は Sema6D 発現細胞によりその遊走が阻害された。一方、心室流出路の explant から遊走する心内膜細胞は Sema6D 発現細胞によりその遊走が促進された。

Sema6D の心臓の部位特異的な作用の制御機構を説明するため、異なる受容体複合による制御を仮定し、Plexin-A1 に結合する補助受容体の検索を行った。Plexin-A1 は細胞外領域にイムングロブリン・ドメインを有し、同じドメイン

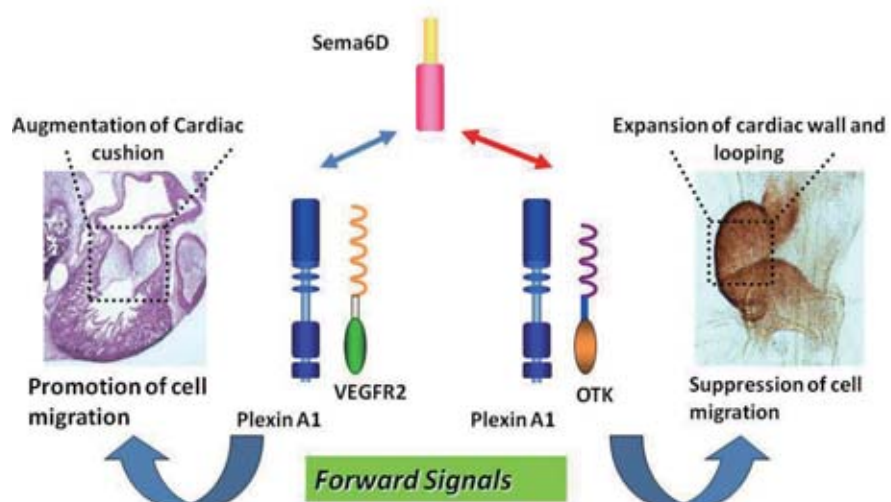


図 13 Sema6D は Plexin-A1-VEGFR2 複合体と Plexin-A1-Off-track 複合体を介して、二種の異なる生理活性を発揮して心臓の形態形成に寄与する

ン構造を有する受容体を検索した結果、ショウジョウ・バエにおいて plexin-A1 に相同の plexin-A と受容体複合を形成する off-track が同定された。さらに血管形成増殖因子である VEGF の 2 型受容体である VEGF type2 が同定された。Off-track は心室領域の心筋細胞で発現し、VEGF type2 は心室流出路の心内膜細胞で発現した。Explant の実験系では off-track

を欠損した心筋細胞は Sema6D による心筋細胞の遊走の阻害効果が抑制され、VEGF type2 を欠損した心内膜細胞は Sema6D による遊走の促進効果が抑制された。以上のことより、Sema6D による部位特異的な作用が直接結合する Plexin-A1 とその異なる補助受容体との組み合わせにより決定されることが明らかとなった(図 13)。

### 3.4.4 後期心臓形成における Sema6D の細胞内領域を介するシグナルの役割

ループ形成後の心臓管では心筋細胞の内腔への多くのヒダ状の突出(肉柱)が形成され、血液中からの酸素供給を効率的に行うことができる。心室壁内で Sema6D は心室の外周部分と肉柱の心筋細胞に発現し、Plexin-A1 は心室の外周部分に主に発現していた。この時期に Sema6D の欠損を導入すると、このヒダ状の突出の形成が抑制される。さらに Plexin-A1 欠損においても同様の効果を認めることから、肉柱形成は Sema6D-plexin-A1 シグナルによる制御を受けていることが判明した。この欠損胎児に対して Sema6D, Plexin-A1 の細胞外領域を含むリコンビナント蛋白質を作成し投与した実験において、Plexin-A1 欠損胎児の肉柱形成抑制は Sema6D 蛋白質の投与により回復するが、Plexin-A1 蛋白質の投与では回復しなかった。一方、Sema6D 欠損胎児の肉柱形成抑制は Sema6D 蛋白質でも Plexin-A1 蛋白質の投与でも回復しなかった。以上より、肉柱形成には Sema6D の細胞内領域を介するシグナルすなわち Sema6D が Plexin-A1 の受容体として作用する機構の存在が示唆された(逆行性シグナル)。

### 3.4.5 Sema6D の細胞内領域を介するシグナル・カスケードと心筋細胞遊走における役割

Sema6D の細胞内領域に結合する因子を酵母 two-hybrid 法により検索した結果、細胞移動を制御する Abl kinase が Sema6D のプロリン配列を示す部分に結合することが判明した。さらに Sema6D の C 末端領域にはアクチンと結合することが知られている Ena が結合することが確認できた。Sema6D 発現細胞に Plexin-A1 蛋白質を投与すると Abl kinase の活性化と Ena のリン酸化、リン酸化 Ena の Sema6D からの離脱が惹起された。

Abl kinase-Ena シグナル・カスケードの心室における肉柱形成への関与を胎児の心室の心筋細胞において解析するため、それぞれの mutant cDNA を挿入したベクターを心筋細胞に導入し、導入された心筋細胞の位置を同時に導入した GFP ベクターによって観察した。細胞内領域を欠損した

Sema6D を導入された心筋細胞は肉柱への移動が抑制された。活性型 Abl kinase を導入した多くの心筋細胞は肉柱に位置した。一方、リン酸化部位を欠損した Ena を導入した心筋細胞は肉柱への移動が抑制された。以上の結果より、Plexin-A1 と結合した Sema6D の細胞内領域には Abl

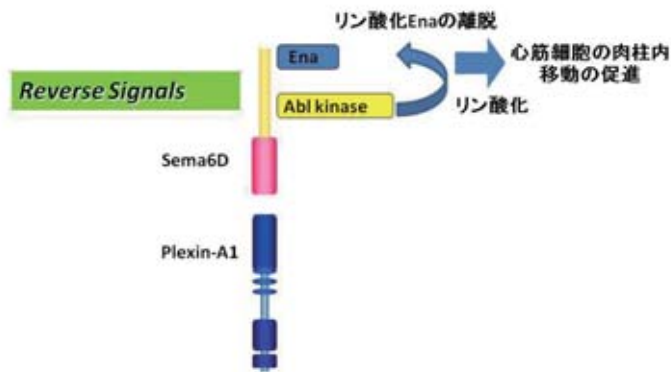


図 14 Sema6D は受容体として逆行性のシグナルを伝達し心室の肉柱形成に寄与する

kinase-Ena シグナル・カスケードが活性化され、心筋細胞における遊走能の亢進、すなわち肉柱形成促進効果を示すことがあきらかとなった(図 14)。

## 3.5 Plexin-A1 の T 細胞活性化における役割

上記のように、ニワトリ胎児を用いた解析から、時空間的に巧妙に制御された Sema6D と

Plexin-A1 の相互作用が心臓の形態形成過程において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方、神経系では可溶性セマフォリン Sema3A が Neuropilin-1(NP-1)と Plexin-A1 の複合体に結合し神経軸索に対する化学発活性を發揮する。本研究では、Sema6D の免疫細胞に対する生物活性の解析及び Plexin-A1 欠損マウスの作成と解析を通して、免疫系における Sema6D-Plexin-A1 相互作用の役割の解明を目指した。

### (1) Sema6D は樹状細胞を活性化する

免疫細胞における Sema6D の発現を検討したところ、Sema6D は T 細胞において最も強い発現を示した。一方、その受容体の PlexinA1 は主に樹状細胞やマクロファージにおいて発現していた。この発現パターンは、Sema6D が T 細胞と樹状細胞やマクロファージとの相互作用において機能している可能性を示している。そこで、Sema6D の樹状細胞に対する活性を調べるため、可溶性 Sema6D 分子 (Sema6D-Fc) 存在下で種々の免疫樹上細胞を培養しその影響を解析した。その結果、Sema6D-Fc は、それ単独で樹状細胞に IL-6、IL-12 などのサイトカインの産生を誘導できることが明らかになった。

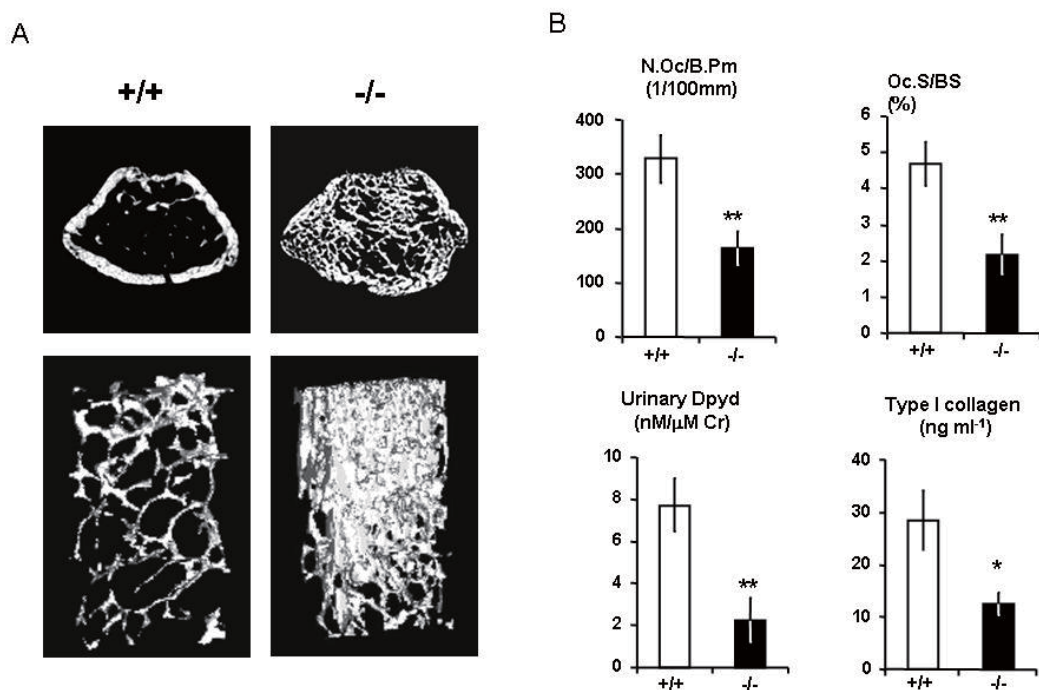


図 15 Plexin-A1 欠損マウスは破骨細胞分化不全から大理石病を発症する  
A 野生型及び Plexin-A1 欠損マウスの大腿骨のマイクロ CT 像、B 破骨細胞マーカー

### (2) Plexin-A1 欠損マウスは大理石病を呈する

Plexin-A1 及びそのリガンドの免疫系における役割を明らかにするために、Plexin-A1 欠損マウスを作成し、発生学的、免疫学的な解析を行った。Plexin-A1 欠損マウスはメンデルの法則にしたがって生まれた。また、神経系や心血管系には予想されるような異常は認められず、Plexin-A1 欠損マウスの神経系や循環器系においては、Plexin-A1 の機能は他の Plexin ファミリーのメンバーによって代償されている可能性が考えられた。しかし、Plexin-A1 欠損マウスにおいては骨量と骨密度が有意に増大しており、いわゆる大理石病の発症が認められた。大理石病は骨芽細胞と破骨細胞のバランスの異常が原因で発症することが知られている。Plexin-A1 欠損マウスの骨芽細胞数は野生型マウスのそれとほぼ同じであっ

たが、破骨細胞数は有意に減少していた。尿中 deoxypyridinoline や血清 I 型コラーゲン断片等の破骨細胞マーカーも Plexin-A1 欠損マウスにおいて減少していた。更に、Plexin-A1 欠損マウス及び野生型マウスの骨髄細胞を M-CSF と RANKL 存在下で培養し試験管内で破骨細胞分化を誘導した場合も、Plexin-A1 欠損マウス由来骨髄細胞からの破骨細胞誘導は有意に低下していた。以上の結果は、Plexin-A1 が破骨細胞分化において必須の役割を果たしていることを示している。(図 15)

### (3) Plexin-A1 欠損マウスにおける T 細胞免疫反応

Plexin-A1 欠損マウスの免疫細胞の細胞表面形質などの解析からは、野生型マウスとの差は認められなかった。しかし、タンパク抗原で免疫した Plexin-A1 欠損マウスと野生型マウスより T 細胞を調

製し、抗原に対する増殖、サイトカイン産生を解析したところ、Plexin-A1 欠損マウスの T 細胞反応が著しく低下していることがわかった。T 細胞反応の低下の原因として、T 細胞の異常と抗原提示細胞の異常の二つの可能性が考えられる。抗 CD3 抗体で誘導される T 細胞増殖などの解析からは、Plexin-A1 欠損マウス由来の T 細胞に大きな欠損は認められなかった。

一方、Plexin-A1 欠損マウス由来の樹状細胞は補助刺激分子や MHC クラス II 分子の発現には異常は認められなかったが、T 細胞への抗原提示能は野生型マウスに比べて有意に低下していた。Plexin-A1 欠損樹状細胞のアロ T 細胞刺激能は野生型に比べ有意に低かった。更に、Sema6D-Fc の Plexin-A1 欠損樹状細胞と野生型樹状細胞への作用を解析したところ、Sema6D-Fc は Plexin-A1 欠損樹状細胞に IL-12 などのサイトカインの産生を誘導できないことがわかった。これらの結果は、T 細胞上の Sema6D による Plexin-A1 を介した樹状細胞の活性化が、T 細胞-樹状細胞相互作用において重要な役割を果たしている可能性を示唆している。(図 16)

胎児発生期の心臓においては Plexin-A1 は Sema6D の受容体として心筋細胞や心内膜細胞の遊走を制御するシグナルを伝達している。Plexin-A1 の樹状細胞の移動における役割を解析するために、Plexin-A1 欠損マウスと野生型マウスの皮膚に FITC を塗布し、FITC を取り込んだ樹状細胞の所属リンパ節への移動を比較した。所属リンパ節における FITC 陽性の樹状細胞数は Plexin-A1 欠損マウスにおいて有意に減少していた。また、CFSE で標識した Plexin-A1 欠損樹状細胞及び野生型樹状細胞を皮下に移入して、所属リンパ節への移動を比較した場合も、同様に Plexin-A1 欠損マウスにおいて同様の異常を認めた。次に、末梢から所属リンパ節までの経路のどのステップで Plexin-A1 欠損樹状細胞の移動が滞っているのかを調べたところ、Plexin-A1 欠損樹状細胞はリンパ管内に内皮を超えて

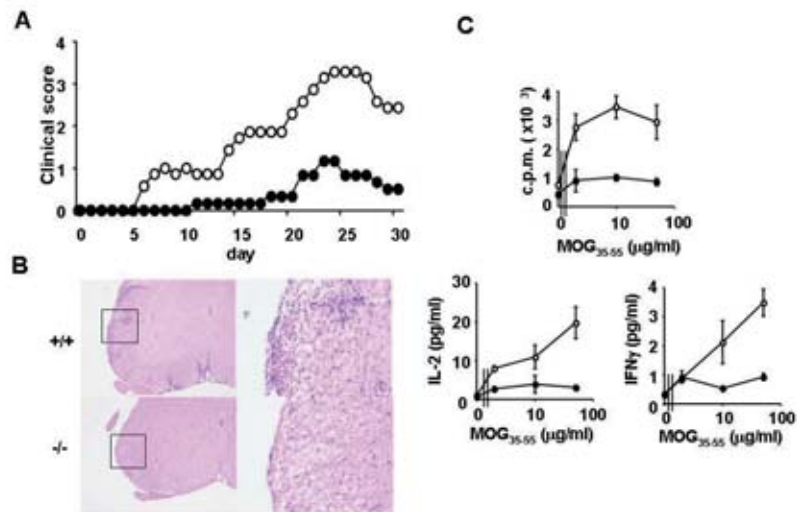


図 16 Plexin-A1 欠損マウスにおける T 細胞反応の異常

A Plexin-A1 欠損マウスは MOG で誘導される EAE に抵抗性である。B Plexin-A1 欠損マウスの脊髄へのリンパ球浸潤は野生型マウスに比較し非常に軽度である。C Plexin-A1 欠損マウスにおいては MOG 特異的 T 細胞が出現しない。

移行できないことが明らかになった。これらの結果から、Plexin-A1 は樹状細胞の T 細胞による活性化だけでなく、末梢組織からリンパ管内への移行においても重要な働きをしていることが明らかとなり、これらの機能の不全が Plexin-A1 欠損マウスの T 細胞反応の低下につながっていると考えられた。

#### (4) 免疫系においては Trem2 と DAP12 が Plexin-A1 のシグナルを伝達する

ニワトリ胎児の心臓においては、Plexin-A1 は 2 型 VEGF 受容体(VEGFR2)或いは Off-track と受容体複合体を形成し、Sema6D のシグナルを伝達することが明らかになっている。しかし、樹状細胞には VEGFR2 や Off-track は発現しておらず、他の分子が Plexin-A1 と複合体を形成している可能性が考えられた。そこで樹状細胞において Plexin-A1 と会合している分子を探索したところ、Trem2-DAP12 複合体が Plexin-A1 と会合することが免疫沈降実験から明らかになった。また、樹状細胞を Sema6D で刺激することにより DAP12 のリン酸化も誘導された。更に、DAP12 欠損マウス由来の樹状細胞の Sema6D に対する反応性は野生型樹状細胞に比べ有意に低下していた。また、RNAi で Trem2 発現を抑制した樹状細胞においては、Sema6D に対する反応性も低下していた。これらの結果から、樹状細胞においては Sema6D は Trem2、DAP12 と機能的な受容体複合体を形成していることが明らかになった。(図 17)

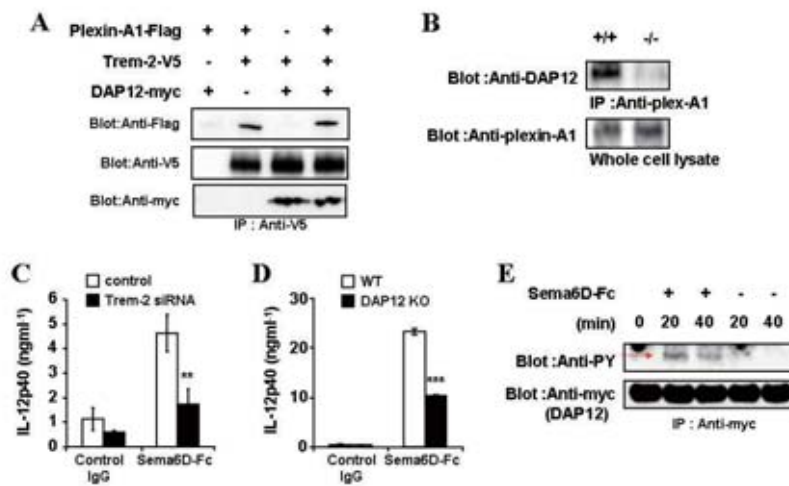


図 17 樹状細胞では Plexin-A1 は Trem2 と DAP12 と受容体複合体を構成する

A Plexin-A1 と Trem2、DAP12 の会合。 B 樹状細胞における Plexin-A1 と DAP12 の会合。 C Trem2 の RNAi は樹状細胞の Sema6D に対する反応性を低下させる。 D DAP12 欠損マウスは Sema6D に対して低反応性である。 E Sema6D 刺激は樹状細胞において DAP12 のチロシンリン酸化を誘導する。

### 3. 6 Plexin-A4 による T 細胞反応の抑制的制御

Plexin-A4 は、NP-1 と受容体複合体を形成し、分泌型の III 型セマフォリン、Sema3A のシグナルを伝達することで、神経軸索の化学反発を誘導することが報告されている。加えて、膜型の VI 型セマフォリン、Sema6A は NP-1 を介さずに直接 Plexin-A4 に結合し、同様に神経軸索の反兆に関与することも明らかになっている。RT-PCR により発現解析を行うと、Plexin-A4 はマウスの成体においては脳、肺、腎臓、心臓、肝臓、脾臓や精巣など種々の臓器に広く発現が認められた。一方、免疫細胞においては、樹状細胞やマクロファージといった抗原提示細胞や T 細胞に高く発現していたが、B 細胞や NK 細胞における発現は低かった。本研究では、免疫系における Plexin-A4 の役割を明らかにするために、Plexin-A4 欠損マウスの免疫能を解析した。

#### (1) T 細胞免疫応答における Plexin-A4 の機能

まず、*in vivo* における T 細胞の活性化を評価する目的で、plexin-A4 欠損マウスに KLH を免疫し、5 日後所属リンパ節から単離した T 細胞を、*in vitro* にて KLH で再刺激した。その

結果、plexin-A4 欠損マウスでは野生型マウスに比べ、抗原特異的な T 細胞増殖応答とサイトカイン産生の亢進が認められたことから、plexin-A4 が T 細胞応答の負の制御に関与していることが明らかとなった。次に、plexin-A4 欠損マウスに MOG ペプチドで EAE を誘導すると、野生型マウスに比べより重篤な臨床症状を呈した。組織学的解析の結果、plexin-A4 欠損マウスでは野生型マウスに比べ、脊髄への炎症細胞の浸潤が増加していた。また、MOG ペプチドで免疫した plexin-A4 欠損マウスの所属リンパ節から T 細胞を採取し、*in vitro*にて MOG で再刺激すると、増殖応答およびサイトカイン産生の亢進が見られた。この結果より、plexin-A4 は正常の免疫応答だけでなく自己免疫反応にも関与していることが明らかとなった。しかし、plexin-A4 は神経ガイダンス因子としての機能を有していることから、EAE の重症化については、神経系に発現する plexin-A4 の欠損が原因である可能性も考えられた。この可能性を除外するため、MOG 特異的 T 細胞を移入することによって EAE を誘導する passive EAE の系を用いて検討を行った。Plexin-A4 欠損マウスに MOG を免疫し、10 日後所属リンパ節細胞を採取し *in vitro*にて MOG で再刺激した。また、リンパ節から T 細胞を単離し、放射線照射した野生型のレシピエントマウスに移入した。その結果、野生型 T 細胞を移入されたマウスでは、軽度で一過性の EAE を発症したのに対し、plexin-A4 欠損 T 細胞を移入されたマウスでは、より重篤な麻痺を生じ寛解には至らなかった。この結果より、plexin-A4 欠損マウスにおける EAE の重症化は、免疫系に発現する plexin-A4 が欠損したことによって起こる、MOG 特異的 T 細胞の異常な活性化が原因であることが明らかとなった。(図 18)

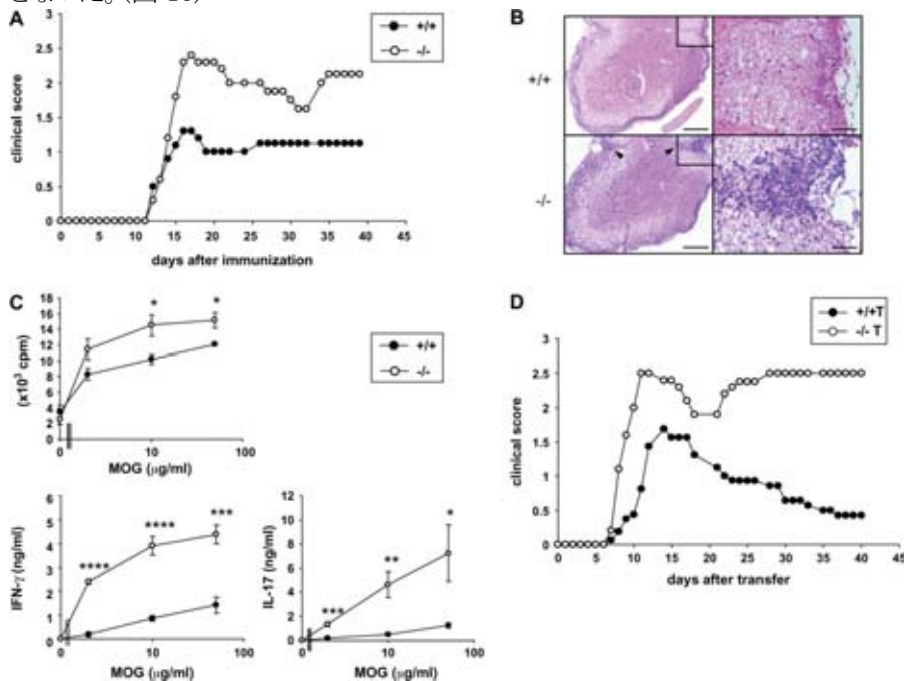


図 18 Plexin-A4 欠損マウスの T 細胞免疫応答の亢進

A 野生型及び Plexin-A1 欠損マウスにおける MOG ペプチド誘導 EAE の臨床症状。 B EAE を誘導した野生型及び Plexin-A1 欠損マウスの脊髄組織像。 C 野生型及び Plexin-A1 欠損マウスの MOG ペプチドに対する免疫応答。 D MOG を免疫した Plexin-A1 欠損マウスの T 細胞は、野生型マウスの T 細胞に比してより症状の激しい EAE をレシピエントマウスに移入できる。

## (2) T 細胞の活性化における plexin-A4 の役割

plexin-A4 欠損マウスにおける T 細胞応答の亢進の原因を明らかにするために、*in vitro*で T 細胞と樹状細胞の機能解析を行った。Plexin-A4 欠損 T 細胞を低濃度の抗 CD3 抗体で刺激すると、野生型 T 細胞に比べ増殖応答が亢進していた。また、plexin-A4 欠損 T 細胞を異型マウス由来の野生型樹状細胞と混合培養すると、T 細胞の増殖応答は著明に亢進

した。一方、plexin-A4 欠損樹状細胞を異型マウス由来の野生型 T 細胞と混合培養すると、T 細胞の増殖応答には若干の亢進が認められた。しかし、樹状細胞を抗 CD40 抗体で刺激することによって惹起される副刺激分子の発現上昇や IL-12 産生は正常であった。このことから、plexin-A4 欠損樹状細胞における T 細胞に対する活性化能の亢進は、単に副刺激分子の発現やサイトカイン産生の亢進によるものではないことがわかった。これらの結果より、T 細胞と樹状細胞どちらに発現する plexin-A4 欠損が欠損しても T 細胞の活性化亢進に寄与するが、T 細胞において欠損した場合の方が、より大きな影響があることがわかった。(図 19)

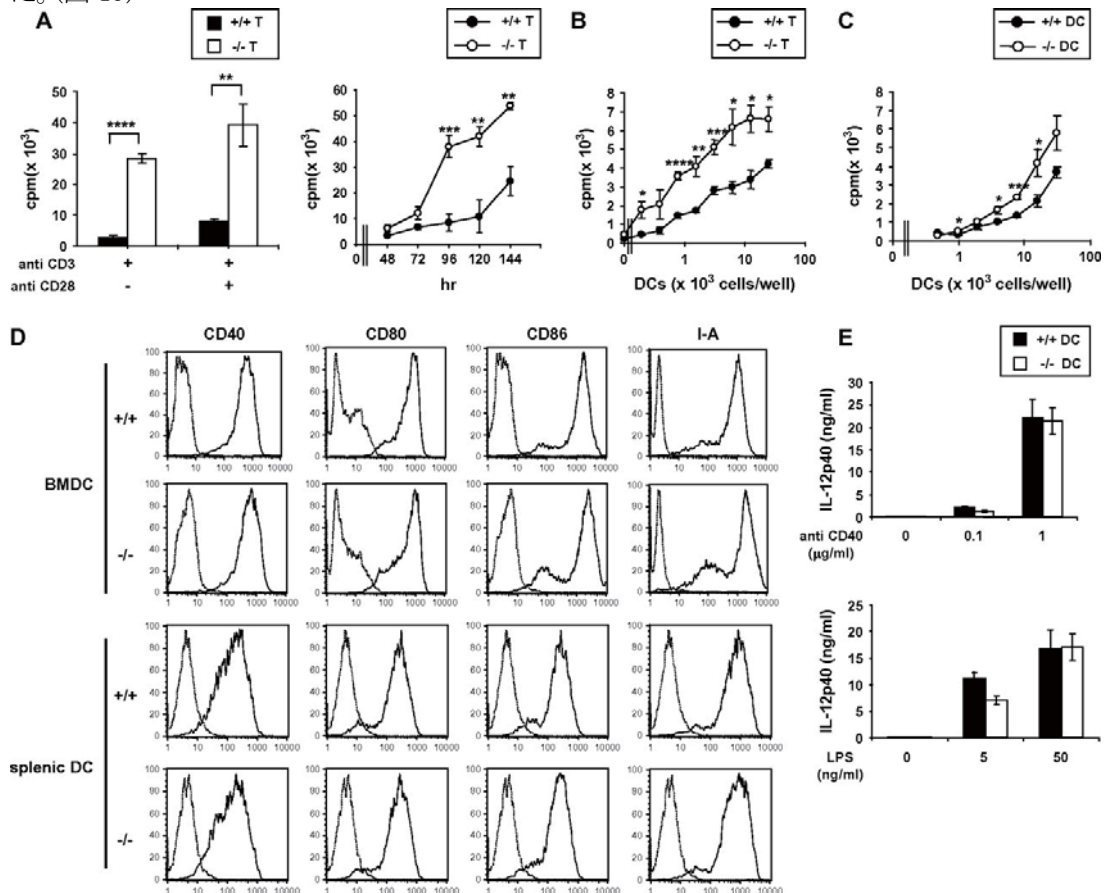


図 19 Plexin-A1 欠損 T 細胞活性化の亢進

A 野生型及び Plexin-A1 欠損 T 細胞の抗 CD3、抗 CD3+抗 CD28 に対する増殖反応。B MLR における野生型及び Plexin-A1 欠損 T 細胞の反応性、C MLR における野生型及び Plexin-A1 欠損樹状細胞の T 細胞刺激能。D 野生型及び Plexin-A1 欠損樹状細胞における MHC クラス II 分子、補助刺激分子の発現。E 野生型及び Plexin-A1 欠損樹状細胞のサイトカイン産生能。

次に、plexin-A4 の TCR 受容体 (TCR) シグナルへの関与についての検討を行った。抗 CD3 抗体刺激によって誘導される TCR シグナル分子の活性化は、plexin-A4 欠損 T 細胞では Zap-70 と LAT のリン酸化に増強が認められた。しかし、Erk、や Jnk、p38、PLC- $\gamma$ 1 といったシグナル分子のリン酸化は野生型 T 細胞と同程度であった。このように、plexin-A4 は初期の TCR シグナル分子の活性化に関与することが明らかになった。

### (3) T 細胞制御を担う plexin-A4 のリガンド

これまでの結果より、plexin-A4がT細胞の活性化を負に制御していることが明らかとなったが、それではこの活性を担うplexin-A4のリガンドは何であろうか。前述のように、神経系においてはplexin-A4は2つのセマフォリン分子の受容体として機能している。一つは、NP-1と受容体複合体を形成しSema3Aのシグナルを伝達する経路、もう一つはNP非依存性に直接Sema6Aと結合しシグナルを伝達する経路であり、いずれも神経軸索の化学発芽を誘導する。そこで、免疫系においてもこれらのセマフォリン分子がplexin-A4のリガンドであるか明らかにするため、これらのセマフォリンシグナルが欠損したマウスのT細胞を用いて検

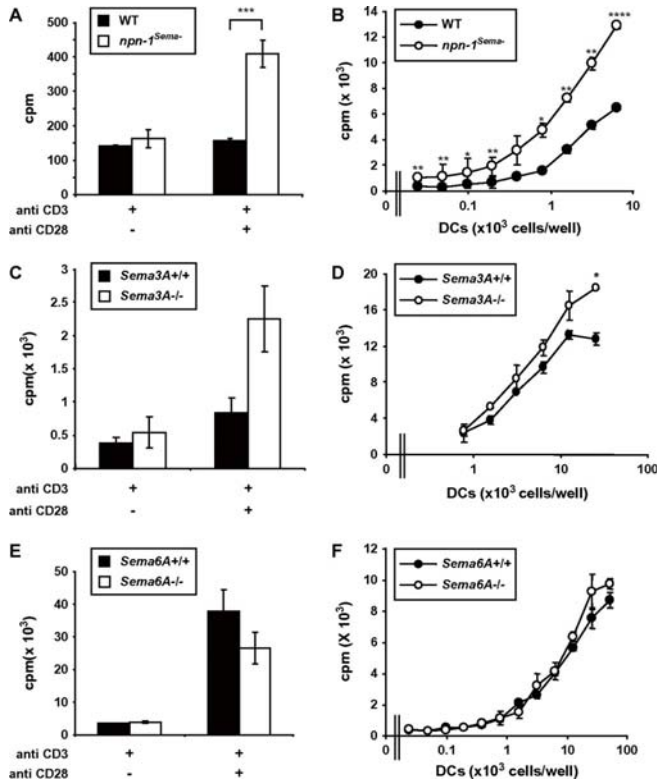


図 20 *Npn-1<sup>Sema-/-</sup>*、*Sema3A* 欠損、*Sema6A* 欠損マウス由来 T 細胞の増殖能  
 A *Npn-1<sup>Sema-/-</sup>* マウス由来 T 細胞の抗 CD3、抗 CD28 に対する反応。B *Npn-1<sup>Sema-/-</sup>* マウス由来 T 細胞の MLR における反応。C *Sema3A* 欠損マウス由来 T 細胞の抗 CD3、抗 CD28 に対する反応。D *Sema3A* 欠損マウス由来 T 細胞の MLR における反応。E *Sema6A* 欠損マウス由来 T 細胞の抗 CD3、抗 CD28 に対する反応。F *Sema6A* 欠損マウス由来 T 細胞の MLR における反応。

討を行った。III 型セマフォリンの結合部位を欠損した変異型 NP-1 を発現するマウス<sup>23)</sup>由来の T 細胞の活性化について検討を行った。この T 細胞では、抗 CD3 抗体や樹状細胞の刺激に対し、plexin-A4 欠損マウスと同様に増殖応答の亢進を示した。次に、*Sema3A* 欠損マウス由来の T 細胞の活性化について同様の検討を行った。その結果、plexin-A4 欠損 T 細胞に比べると若干程度は弱くなるものの、この T 細胞においても、抗 CD3 抗体や樹状細胞の刺激に対し増殖応答の亢進が見られた。Plexin-A4 は *Sema6A* に直接結合することが知られているが、*Sema6A* 欠損マウス由来の T 細胞を用いて同様の検討を行ったが、この *Sema6A* 欠損 T 細胞では、抗 CD3 抗体や樹状細胞の刺激に対し増殖応答の亢進は見られなかった。Plexin-A4 は NP-1 依存性に、*Sema3A* を含む III 型セマフォリンのシグナルを伝達することで、T 細胞応答を負に制御している可能性が示唆されたが、一方この制御において *Sema6A* は重要ではないことが明らかとなった。(図 20)

### 3.7 まとめと展望

以上、本研究によって *Sema4D*、*Sema4A*、*Sema6D*、*Sema7A*、*Plexin-A1*、*Plexin-A4* などの分子がそれぞれ免疫反応の初期相からエフェクター相、更にはホメオスターシスの維持までの異なるステップにおいて機能していることが明らかになり、これまで我々が提唱してきた免疫セマフォリン分子による免疫制御機構の存在が改めて確認することが出来た(図 21)。これら分子以外にも免疫系でいくつかのセマフォリンおよびそれらの受容体が発現している。今後、これらの分子の機能を解析することにより、セマフォリンによる免疫制御機構がより明確になってくるだろう。しかし、神経系で神経軸索のガイダンス能を有する分子群が、免疫系ではどのような分子機構で免疫細胞の活性化に寄与しているのか等まだ不明な点が多く残っており、細胞内におけるシグナル伝達機構の解析などを精力的に行う



必要があるだろう。また、Sema4A のような一部セマフォリンが、免疫病治療の分子標的候補になりうるものが、一連の実験によって明らかになりつつある。さらに、Sema4A 以外のセマフォリンおよびそれらの受容体に対する阻害抗体を作成し、新たな分子標的候補を探索していく必要があるだろう。

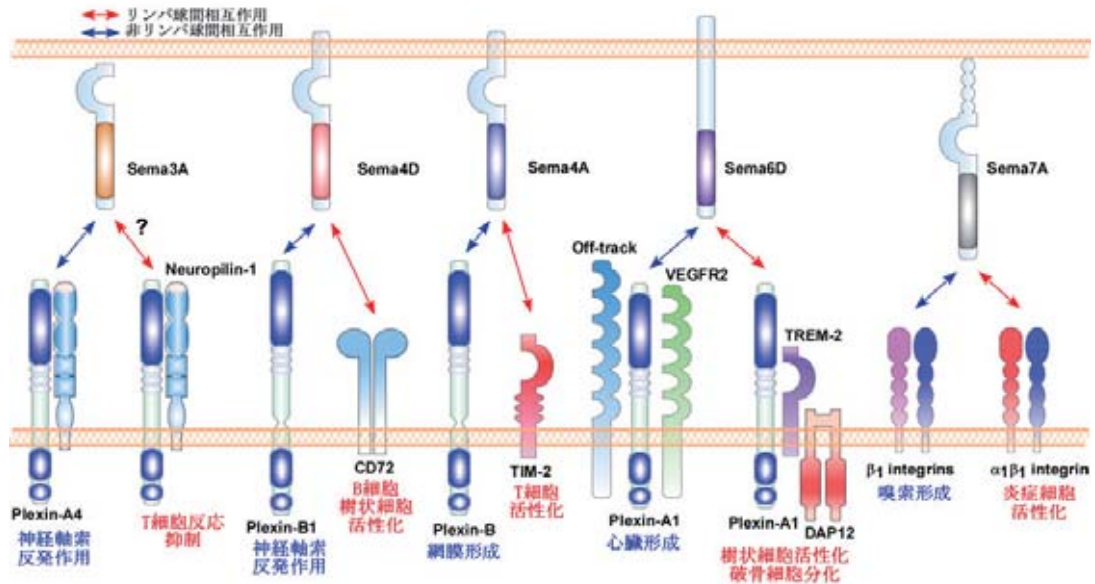


図 21 代表的な免疫セマフォリン

本研究では Sema4D、Sema4A、Sema6D、Sema7A、Plexin-A1、Plexin-A4 などのセマフォリンおよびその受容体分子が免疫反応の様々な局面で機能していることを明らかにすることが出来た。

## § 4 研究参加者

### ① 菊谷グループ (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)

	氏名	所属	役職		参加時期
○	菊谷 仁	大阪大学	教授	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	H15.1~H21.3
	熊ノ郷 淳	大阪大学	教授	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	H15.1~H21.3
	豊福 利彦	大阪大学	准教授	個体発生におけるセマフォリンの機能解析	H15.1~H21.3
	安居 輝人	大阪大学	助教	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	H15.1~H21.3
	竹ヶ原 宜子	大阪大学	助教	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	H15.1~H21.3
	水井 理之	大阪大学	助教	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	H17.4~H21.3

	Durbaka, Prasad V.J.	大阪大学	特任研究員	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	H18.5～H20.8
	高松 漂太	大阪大学	学振特別研究員	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	H15.1～H21.3
	山本 みどり	大阪大学	大学院	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	H15.1～H20.3
	鈴木 一博	大阪大学	大学院	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	H16.～H19.10
	尾形 威明	大阪大学	大学院 D4	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	H17.4～H21.3
	森鼻 哲生	大阪大学	大学院 D4	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	H17.4～H21.3
	矢田 佳織	大阪大学	大学院 D4	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	H18.4～H21.3
	牧野 信彦	大阪大学	大学院 D4	個体発生におけるセマフォリンの機能解析	H18.4～H21.3
	多田 智	大阪大学	大学院 D3	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	H19.4～H21.3
	LIM Xue Min	大阪大学	大学院 M2	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	H19.7～H21.3
	久保田恭子	大阪大学	事務補佐員		H15.1～H21.3
*	吉田 淳子	大阪大学	CREST 技術員	個体発生におけるセマフォリンの機能解析	H16.4～H20.3
*	蓮井千恵子	大阪大学	CREST 技術員	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	H17.4～H21.3
*	八澤 智子	大阪大学	CREST 技術員	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	H17.9～H20.3
	杉本たみ子	大阪大学	技術補佐員	個体発生におけるセマフォリンの機能解析	H18.4～H21.3
	塩崎 和子	大阪大学	技術補佐員	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	H18.4～H21.3
	亀井 順子	大阪大学	大学院	個体発生におけるセマフォリンの機能解析	H15.1～H16.3
	張 弘	大阪大学	大学院	個体発生におけるセマフォリンの機能解析	H15.1～H16.3
	矢吹 正典	大阪大学	研究生	個体発生におけるセマフォリンの機能解析	H15.1～H16.8

	石田 勲	大阪大学	研究生	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	H15.10 ~ H16.10
	原田光一郎	大阪大学	研究生	個体発生におけるセマフォリンの機能解析	H15.10 ~ H17.1
	丸川 聡子	大阪大学	大学院	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	H15.10 ~ H17.3
	識名 崇	大阪大学	大学院	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	H15.10 ~ H17.3
*	釜本 晃子	大阪大学	CREST 技術員	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	H16.4~H17.3
	渡邊 さやか	大阪大学	大学院 M1	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	H18.7~H19.3

## § 5 招聘した研究者等

なし

## § 6 成果発表等

Mizui, M., T. Shikina, H. Arase, K. Suzuki, T. Yasui, P.D. Rennert, A. Kumanogoh, and H. Kikutani. Bimodal regulation of T cell-mediated immune responses by TIM-4. *Int. Immunol.*, in press 2008, (E-pub:)

Yamamoto, M., K. Suzuki, T. Okuno, T. Ogata, N. Takegahara, H. Takamatsu, M. Mizui, M. Taniguchi, A. Chédotal, F. Suto, H. Fujisawa, A. Kumanogoh, and H. Kikutani. Plexin-A4 negatively regulates T lymphocyte responses. *Int. Immunol.*, 20:413-20, 2008.

Watanabe, N., M. Tanaka, K. Suzuki, A. Kumanogoh, H. Kikutani, and A. Miyajima. Tim2 is expressed in mouse fetal hepatocytes and regulates their differentiation. *Hepatology*. 45:1240-1249, 2007.

Suzuki, K., T. Okuno, M. Yamamoto, R.J. Pasterkamp, N. Takegahara, H. Takamatsu, T. Kitao, J. Takagi, P.D. Rennert, A.L. Kolodkin, A. Kumanogoh, and H. Kikutani. Semaphorin 7A initiates T cell-mediated inflammatory responses through  $\alpha 1\beta 1$  integrin. *Nature*, 446:680-684, 2007.

Mizui, M., T. Shikina, H. Arase, K. Suzuki, T. Yasui, P.D. Rennert, A. Kumanogoh, and H. Kikutani. Bimodal regulation of T cell-mediated immune responses by TIM-4. *Int. Immunol.*, 20:695-708, 2008

Yamamoto, M., K. Suzuki, T. Okuno, T. Ogata, N. Takegahara, H. Takamatsu, M. Mizui, M. Taniguchi, A. Chédotal, F. Suto, H. Fujisawa, A. Kumanogoh, and H. Kikutani. Plexin-A4 negatively regulates T lymphocyte responses. *Int. Immunol.*, 20:413-20, 2008.

Watanabe, N., M. Tanaka, K. Suzuki, A. Kumanogoh, H. Kikutani, and A. Miyajima. Tim2 is expressed in mouse fetal hepatocytes and regulates their differentiation. *Hepatology*. 45:1240–1249, 2007.

Suzuki, K., T. Okuno, M. Yamamoto, R.J. Pasterkamp, N. Takegahara, H. Takamatsu, T. Kitao, J. Takagi, P.D. Rennert, A.L. Kolodkin, A. Kumanogoh, and H. Kikutani. Semaphorin 7A initiates T cell-mediated inflammatory responses through  $\alpha 1\beta 1$  integrin. *Nature*, 446:680–684, 2007.

Zhu, L., W. Bergmeier, J.Wu, H. Jiang, T.J. Stalker, M. Cieslak, R. Fan, L. Boumsell, A. Kumanogoh, H. Kikutani, L. Tamagnone, D.D. Wagner, M.E. Milla, and L.F. Brass. Regulated surface expression and shedding support a dual role for semaphorin 4D in platelet responses to vascular injury. *Proc. Natl., Acad., Sci., USA*, 104:1621–1626, 2007..

Li, M., K.M. O'Sullivan, L.K. Jones, T. Semple, A. Kumanogoh, H. Kikutani, S.R. Holdsworth, and A.R. Kitching. CD100 enhances dendritic cell and CD4<sup>+</sup> cell activation leading to pathogenetic humoral responses and immune complex glomerulonephritis. *J. Immunol.*, 177:3406–3412, 2006.

Takegahara, N., H. Takamatsu, T. Toyofuku, T. Tsujimura, T. Okuno, K. Yukawa, M. Mizui, M. Yamamoto, D.V.R. Prasad, K. Suzuki, M. Ishii, K. Terai, M. Moriya, Y. Nakatsuji, S. Sakoda, S. Sato, S. Akira, K. Takeda, M. Inui, T. Takai, M. Ikawa, M. Okabe, A. Kumanogoh, and H. Kikutani. Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nature Cell Biol.*, 8:615–622, 2006.

Toyofuku, T., J. Yoshida, T. Sugimoto, H. Zhang, A. Kumanogoh, M. Hori, and H. Kikutani. The FERM domain containing GEF protein FARP2 triggers signals for Sema3A-mediated axonal repulsion. *Nature Neurosci.*, 8:1712–1719, 2005.

Okuno, T., Y. Nakatsuji, A. Kumanogoh, M. Moriya, H. Ichinose, H. Sumi, H. Fujimura, H. Kikutani, and S. Sakoda. Loss of Dopaminergic Neurons by the induction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via CD40: Relevance to Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.* 81:874–882, 2005.

Takegahara, N., A. Kumanogoh, and H. Kikutani. Semaphorins: a new class of immunoregulatory molecules. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B. Biol. Sci.*, 360:1673–1680, 2005.

Kumanogoh, A., T. Shikina, C. Watanabe, N. Takegahara, K. Suzuki, M. Yamamoto, H. Takamatsu, D.V. Prasad, M. Mizui, T. Toyofuku, M. Tamura, D. Watatane, J.R. Parnes, and H. Kikutani. Requirement for CD100–CD72 interactions in fine-tuning of B-cell antigen receptor signaling and homeostatic maintenance of the B-cell compartment. *Int. Immunol.* 17:1277–1282, 2005.

Yukawa, K., T. Tanaka, T. Bai, T. Ueyama, K. Owada-Makabe, Y. Tsubota, M. Maeda, K. Suzuki, H. Kikutani, and A. Kumanogoh. Semaphorin 4A induces growth cone collapse of hippocampal neurons in a Rho/Rho-kinase-dependent manner. *Int. J. Mol. Med.*, 16:115–118, 2005.

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.

Kumanogoh, A., and H. Kikutani. Biological functions and signaling of a transmembrane semaphorin, CD100/Sema4A. *Cell Mol. Life Sci.*, 61:292-300, 2004.

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議5件、国際会議10件)

Kikutani, H. (Symposium) Semaphorins and inflammatory responses. EMBO Workshop "Semaphorin Function & Mechanisms of Action", Cernay, France, May 8-11, 2008.

Kikutani, H. (Symposium) Semaphorins and their receptors in the immune system. 第30回日本分子生物学会、横浜、2007年12月11日～15日。

Kikutani, H. (Special Lecture, Doctoral Course of Molecular Medicine, Torino University) Semaphorins and their receptors in the immune system. Torino, Italy, September 21, 2007.

Kikutani, H. (Symposium) Semaphorins and the cardiovascular system formation. The Annual Meeting of Korean Society of Lipidology and Atherosclerosis. Seoul, Korea, September 14-15, 2007.

Kikutani, H. (Symposium) Semaphorins and their receptors in the immune system: Novel mechanisms of immune regulation. 4<sup>th</sup> International Leukocyte Signal transduction Workshop: Clinical implications of signaling pathways. Rhodes, Greece, June 3-8, 2007.

Kikutani, H. (Workshop) Roles of the semaphorin receptor, Plexin-A1 in bone homeostasis and immune regulation. "Advanced Bone and Joint Science" -International Symposium/Workshop "Stem Cells and Bone" (supported by Japanese Society for Promotion of Science), Nov. 6-9, 2006, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

Kikutani, H. (Workshop) Plexin and immune system. "Advanced Bone and Joint Science" -International Symposium/Workshop "Stem Cells and Bone" (supported by Japanese Society for Promotion of Science), Nov. 6-9, 2006, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

Kikutani, H., (Symposium) A role of the class IV semaphorin, Sema4A in Th1/Th2 regulation. The 8th International Congress of Neuroimmunology. October 15-19, 2006, Nagoya, Japan.

Kikutani, H. The transmembrane semaphorin Sema6D and its receptor Plexin-A1 in dendritic cell functions. RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2006 “Regulation of Immune Responses in Allergy and Inflammation”. June 16–18, 2006, Yokohama, Japan.

Kikutani, H., A. Kumanogoh, T. Toyofuku. Molecular mechanisms for signaling through plexin-A1 (plexin-A1 シグナルの分子機構)。第 29 回日本神経学会、京都市、2006 年 7 月 20 日。(シンポジスト)

菊谷仁:免疫反応と骨代謝の制御におけるセマフォリン分子の役割。第 24 回日本骨代謝学会、東京都台場、2006 年 7 月 6 日～7 月 8 日。(シンポジスト)

Kumanogoh, A., T. Shikina, K. Suzuki, M. Yamamoto, H. Takamatsu, N. Takegahara, S. Marukuawa, I. Ishida, P. Drubaka, T. Toyofuku, and H. Kikutani. Semaphorins in the immune system. The Uehara Memorial Foundation Symposium-2005 “The Innate Immune System: Strategies for Disease Control”, July 11–13, 2005, Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan.

Kikutani, H. Semaphorins and their receptors in immune regulation. “International Symposium: Autoimmunity in Intractable Diseases: From Bench to Clinic”, Oct. 25–27, 2005, Hakone, Japan.

熊ノ郷淳: 免疫セマフォリン分子による免疫応答制御機構の解析、“阿蘇シンポジウム”、2005 年 7 月 30 日、阿蘇。

熊ノ郷淳: “免疫セマフォリン分子による免疫応答制御機構の解析”、2005 年 12 月 14 日、第 35 回日本免疫学会、横浜市。

② 口頭発表 (国内会議30件、国際会議8件)

矢田佳織、安居輝人、多田智、丸尾聖爾、菊谷仁:EBVBAC を用いた感染可視化による EBV-宿主間相互作用の包括的解析。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月 26 日～28 日。

安居輝人、矢田佳織、多田智、丸尾聖爾、菊谷仁:EBV 感染成立におけるウイルス-宿主間相互作用の網羅的解析法の確立。第 5 回 EB ウイルス研究会、米子、2008 年 7 月 18 日。(口頭)

多田智、矢田佳織、丸尾聖爾、安居輝人、菊谷仁:EBV 感染の可視化とそれに関わる宿主因子同定法の確立。第 23 回ヘルペスウイルス研究会、大山(鳥取県西伯郡)、2008 年 6 月 5 日～7 日。

矢田佳織、多田智、安居輝人、菊谷仁:EB ウイルス LMP 分子間相互作用における形質転換シグナルの解析。第 23 回ヘルペスウイルス研究会、大山(鳥取県西伯郡)、2008 年 6 月 5 日～7 日。

Toyofuku, T., A. Kumanogoh, H. Kikutani. (Workshop) Coordination of repulsive and attractive semaphorins defines migration of cardiac neural crest cells. 第 30 回日本分子生物学会、横浜、2007 年 12 月 11 日～15 日。

Yasui, T., K. Yada, E. Kieff, and H. Kikutani. TNF-receptor associated factor 3 controls B cell survival by accelerating the ubiquitination of Protein kinase C delta. 第37回日本免疫学会、東京都、2007年11月20日～22日。

Yamamoto, M., K. Suzuki, T. Ogata, N. Takegahara, A. Kumanogoh, and H. Kikutani. A role of plexin-A4 in negative regulation of T cell responses. 第37回日本免疫学会、東京都、2007年11月20日～22日。

Nakahashi-Oda, C., S. Tahara-Hanaoka, K. Hitomi, T. Nakano, I. Can, N. Totsuka, T. Yasui, H. Kikutani, S. Honda, K. Shibuya, and A. Shibuya. イムノグロブリン様レセプター、MAIR-I (CD300a)による敗血症モデルマウスにおける炎症応答の修飾 /ITIM-bearing immunoglobulin-like receptor, MAIR-I (CD300a) modulates the inflammatory responses in murine sepsis. 第37回日本免疫学会、東京都、2007年11月20日～22日。

Mizui, M., H. Arase, K. Suzuki, T. Yasui, A. Kumanotoh, and H. Kikutani. T細胞反応におけるTim-4の二相性作用/Biophasic action of Tim-4 on T cell-mediated immune responses. 第37回日本免疫学会、東京都、2007年11月20日～22日。

矢田佳織、安居輝人、多田智、菊谷仁:EB ウイルス LMP 分子間相互作用による形質転換シグナルの増大。第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌市、2007年10月21日～23日。

安居輝人、矢田佳織、多田智、丸尾聖爾、菊谷仁:P3HR-1 strain 由来 EB ウイルス Bacterial artificial chromosome (P3EBVBAC)を用いた Reverse genetics による EB ウイルス感染成立機構の解明。第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌市、2007年10月21日～23日。

安居輝人、矢田佳織、多田智、丸尾聖爾、Kieff, E., 菊谷仁:P3HR-1 strain 由来 EBV Bacterial artificial chromosome (P3EBVBAC)。第4回EBウイルス研究会、東京都、2007年6月29日。

矢田佳織、安居輝人、菊谷仁:Bimolecular Fluorescence complementation (BiFC)によるEBVLMP分子間会合様式の解析。第4回EBウイルス研究会、東京都、2007年6月29日。

Suzuki, K., A. Kumanogoh, R.J. Pasterkamp, A.L. Kolodkin, and H. Kikutani. Sema7A is a novel cellular ligand for  $\alpha 1 \beta 1$  integrin/VLA-1: its crucial role in the effector phase of T cell-mediated immune responses. 第36回日本免疫学会、大阪市、2006年12月11日～13日。

Durbaka, P., T. Morihana, H. Takamatsu, M. Yamamoto, N. Takegahara, M. Mizui, A. Kumanogoh, and H. Kikutani. Involvement of Sema4A in activation and effector functions of CD8<sup>+</sup> T-cells and NK-cells. 第36回日本免疫学会、大阪市、2006年12月11日～13日。

Mizui, M., H. Arasa, T. Morihana, T. Yasui, A. Kumanogoh, and H. Kikutani. An inhibitory role of Tim-4 in naïve T-cell activation. 第36回日本免疫学会、大阪市、2006年12月11日～13日。

Yada, K., T. Yasui, M. George, E. Kieff, and H. Kikutani. PKN1, a member of the protein kinase C family controls B cell activation and tolerance.. 第36回日本免疫学会、大阪市、2006年12月11日～13日。

Yasui, T., K. Yada, E. Kieff, and H. Kikutani. Non-redundant role of TNF-receptor associated

factor 3 in signals of TNF receptor family members and B cell development. 第36回日本免疫学会、大阪市、2006年12月11日～13日。

Takamatsu, H., N. Takegahara, K. Suzuki, T. Ogata, M. Yamamoto, M. Mizui, A. Kumanogoh, and H. Kikutani: Involvement of plexin-A1 in trafficking of dendritic cells. 第36回日本免疫学会、大阪市、2006年12月11日～13日。

Konomi, A., N. Ozaki, H. Takamatsu, K. Sugiyama, A. Kumanogoh, and H. Kikutani: Antibody-mediated blocking of Sema4A protects mice from chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. 第36回日本免疫学会、大阪市、2006年12月11日～13日。

Yasui, T. EB virus LMP1 signaling controls B cell life and death—role of PKC regulated by TNF receptor/LMP1-associated proteins. 2006 International CVRDC-RIMD Joint Symposium “Infection, Immunity & Vaccine”. Nov. 9–10, 2006, Gwangju, Korea. (Chonnam National University Medical School)

Yasui, T., E. Kieff, H. Kikutani. Role of TRAF3 in EBV LMP1 Signaling and B Lymphocyte Development. The 12th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases. July 8–12, 2006, Boston, USA.

安居輝人、菊谷仁:EBVKNP1 シグナル関連分子の同定とB細胞分化・生存における生理的意義。第3回EBウイルス研究会、EBウイルスシンポジウム、名古屋市、2006年6月30日。

安居輝人、菊谷仁:EBウイルスLatent membrane protein1(LMP1)会合分子を介した細胞形質転換機構シグナルの解析。第21回ヘルペスウイルス研究会、岐阜県大野郡白川村、2006年6月8日～10日。

Kikutani, H., Semaphorins in the Immune System. “International symposium: Immune Tolerance and Regulation”, April 7, 2005, Kyoto, Japan.

Kikutani, H. Semaphorins in the Immune System. The US-Japan Symposium for Integrated Medical Sciences “Frontiers in Immunobiology”, July 26–27, 2005, University of Washington, Seattle, USA.

Takegahara, N., A. Kumanogoh, H. Takamatsu, M. Inui, T. Takai, and H. Kikutani. Plexin-A1 associates with Trem-2/DAP12 receptor complex and mediates the activities of Sema6D on DCs. “The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity”, Sept 5–8, 2005, Awaji Island, Japan.

Takegahara, N., A. Kumanogoh, H. Takamatsu, M. Inui, T. Takai, and H. Kikutani.: Plexin-A1 utilizes the Trem-2/DAP12 receptor complex as a co-receptor in the immune system. 第35回日本免疫学会、横浜市、2005年12月13日～15日。

Mizui, M., T. Shikina, H. Arase, A. Kumanogoh, and H. Kikutani.: Identification of Tim4 as a ligand of Tim1, and its possible role for negative regulation in the T cell-dendritic cell interactions. 第35回日本免疫学会、横浜市、2005年12月13日～15日。

Suzuki, K., A. Kumanogoh, N. Takegahara, T. Shikina, M. Mizui, P. Drubaka., H. Takamatsu, M. Yamamoto, R.J. Pasterkamp, and H. Kikutani: GPI-anchored semphorin Sema7A promotes



maturation of dendritic cells. 第35回日本免疫学会、横浜市、2005年12月13日～15日。

Takamatsu, H., A. Kumanogoh, N. Takegahara, T. Ogata, K. Takeda, S. Akira, and H. Kikutani: Involvement of plexin-A1 in immune responses and bone homeostasis. 第35回日本免疫学会、横浜市、2005年12月13日～15日。

Durbaka, P., A. Kumanogoh, T. Shikina, H. Takamatsu, M. Mizui, K. Suzuki, N. Takegahara, M. Yamamoto, and H. Kikutani. Development of atopic dermatitis in *Sema4A*-deficient mice. 第35回日本免疫学会、横浜市、2005年12月13日～15日。

Kumanogoh, A., T. Shikina, K. Suzuki, M. Yamamoto, N. Takegahara, H. Takamatsu, S. Marukawa, S. Uematsu, S. Akira, K. Takeda, M. Okabe, and H. Kikutani. Non-redundant roles of *Sema4A* in the immune system: Defective humoral and cellular immune responses in *Sema4A*-deficient mice. 12th International Congress of Immunology (July 18–23, 2004), July 21, 2004, Montreal Canada.

Takegahara, N., A. Kumanogoh, T. Toyofuku, and H. Kikutani. A novel immune semaphorin *Sema6D* functioning in cardiac development and immune responses. 12th International Congress of Immunology (July 18–23, 2004), July 21, 2004, Montreal Canada.

Kumanogoh, A., T. Shikina, K. Suzuki, and H. Kikutani. A class IV semaphorin *Sema4A* plays non-redundant roles in T-cell priming and Th1/Th2 regulation. Keystone Symposia “Dendritic Cells at the Center of Innate and Adaptive Immunity: Eradication of Pathogens and Cancer and Control of Immunopathology” (February 1–7, 2005), February 3, 2005, Vancouver, Canada.

竹ヶ原宜子、熊ノ郷淳、山本みどり、高松漂太、識名崇、丸川聡子、石田勲、高井俊行、菊谷仁：*Sema6D* は *plexin-A1* を介して免疫細胞を活性化する。第34回日本免疫学会、札幌市、2004年12月1日～3日。

識名崇、熊ノ郷淳、鈴木一博、植松智、筒井ひろ子、審良静男、竹田潔、菊谷仁：免疫セマフォリン分子 *Sema4A* の Th1/Th2 制御における役割。第34回日本免疫学会、札幌市、2004年12月1日～3日。

安居輝人、KIEFF Elliott、LUTIG Micah、菊谷仁：改変誘導型遺伝子発現システムを用いたEBVのB細胞分化修飾機構の解析。第34回日本免疫学会、札幌市、2004年12月1日～3日。

③ ポスター発表 (国内会議1件、国際会議3件)

Morihana, T., S. Goya, T. Yasui, A. Kumanooh, H. Kikutani. Enhanced antigen specific allergic asthma and rhinitis in *Sema4A*-deficient mice. The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Hyogo, Japan, September 7–11, 2008.

Yada, K., T. Yasui, G. Mosialos, E. Kieff and H. Kikutani. The member of PKC family, PKN1 regulates BCR signaling by modulating Akt signaling pathway. 第37回日本免疫学会、東京都、2007年11月20日～22日。

Yada, K., T. Yasui, G. Mosialos, E. Kieff and H. Kikutani. The member of PKC family, PKN1

regulates B cell activation and the tolerance by regulating BCR signaling pathway. The 7<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Hyogo, Japan, September 1-5, 2007.

Yasui, T., K Yada, G Mosialos, E Kieff, and H. Kikutani. PKN1, a member of the protein kinase C family regulates the activation and the tolerance of B lymphocytes. 4<sup>th</sup> International Leukocyte Signal transduction Workshop: Clinical implications of signaling pathways. Rhodes, Greece, June 3-8, 2007.

### (3)特許出願

#### ①国内出願 (3件)

1. 発明の名称:Methods for Treating Inflammatory, Autoimmune or Bone Resorption Diseases.  
発明者:菊谷仁、熊ノ郷淳、杉山憲司  
出願人:Boehringer Ingelheim、国立大学法人 大阪大学  
出願日:2006年5月15日  
出願番号:2006-161546
2. 発明の名称:Methods for Treating Cytokine Mediated Disease.  
発明者:菊谷仁、熊ノ郷淳、杉山憲司  
出願人:Boehringer Ingelheim、国立大学法人 大阪大学  
出願日:2006年5月15日  
出願番号:2006-161547
3. 発明の名称:抗EBウイルス薬候補化合物のスクリーニング法  
発明者:安居輝人、菊谷仁  
出願人:国立大学法人 大阪大学  
出願日:2007年8月20日  
出願番号:2007-213266

#### ②海外出願 (9件)

1. 発明の名称:Methods for Treating Inflammatory, Autoimmune or Bone Resorption Diseases.  
発明者:菊谷仁、熊ノ郷淳、杉山憲司  
出願人:Boehringer Ingelheim、国立大学法人 大阪大学
  - ① ドイツ、出願日:2006年5月11日、出願番号:202006007499.6
  - ② カナダ、出願日:2006年7月17日、出願番号:2551163
  - ③ USA、出願日:2006年10月17日、出願番号:11/550166
  - ④ メキシコ、出願日:2006年11月14日、出願番号:2006-013220
2. 発明の名称:Methods for Treating Cytokine Mediated Disease.  
発明者:菊谷仁、熊ノ郷淳、杉山憲司  
出願人:Boehringer Ingelheim、国立大学法人 大阪大学
  - ⑤ ドイツ、出願日:2006年5月12日、出願番号:202006007590.9
  - ⑥ カナダ、出願日:2006年7月25日、出願番号:2553402
  - ⑦ USA、出願日:2006年10月17日、出願番号:11/550184
  - ⑧ メキシコ、出願日:2006年11月14日、出願番号:2006-013219

3. 発明の名称:Composions and Methods of Treating Oncological, Inflammatory and Autoimmune Diseases Mediated by Sema4a.

発明者:菊谷仁、熊ノ郷淳、杉山憲司

出願人:Boehringer Ingelheim、国立大学法人 大阪大学

出願日:2006年11月10日

出願番号:06・865.227

#### (4)受賞等

##### ①受賞

日本免疫学会賞(第8回):熊ノ郷淳 平成17年12月

日本学術振興会賞(第1回):熊ノ郷 淳 平成17年3月

持田記念学術賞:菊谷 仁 平成16年10月

##### ②新聞報道

平成19年3月22日付毎日新聞朝刊に「免疫疾患治療に光」、2007年3月23日付日本経済新聞夕刊に「多発性硬化症仕組み解明 阪大、原因たんぱく質特定」の見出しでNature電子版に発表の論文について新聞報道された。

##### ③その他

#### (5)その他特記事項

Mizui, M., and H. Kikutani. Neuropilin-1: the glue between regulatory T cells and dendritic cells? *Immunity*, 28:302-303, 2008.

Suzuki, K., A. Kumanogoh, and H. Kikutani. Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. *Nat. Immunol.*, 9:17-23, 2008.

Toyofuku, T., and H. Kikutani. Semaphorin signaling during cardiac development. *Adv Exp Med Biol.*, 600:109-117, 2007.

Kikutani, H., K. Suzuki, and A. Kumanogoh. Immune semaphorins: Increasing members and their diverse roles. *Adv. Immunol.*, 93:121-143, 2007.

## §7 研究期間中の主な活動

ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2008年2月8日	The International Symposium on Infection and Immunity	大阪大学銀杏会館	200名	大阪大学 21世紀 COE「感染症学・免疫融合プログラム」主催の国際シンポジウム

## §8 結び

私たちは本 CREST プロジェクトにおいて、これまで神経系においてのみ研究がなされてきたセマフォリンという分子の免疫学側面を研究するという免疫学領域ではむしろ異端とも言うべき研究を行ってきた。本プロジェクトが始まる前までに、私たちは Sema4A と Sema4D の二種のセマフォリン分子が免疫系で発現し、しかも重要な調節機能を有していることを報告していたが、現在さらに 3 種類のセマフォリンと 2 種類のセマフォリン受容体が免疫反応制御に関与することが明らかになっている。また、本研究からこれらセマフォリンはそれぞれ免疫反応の異なった局面、段階で機能していることも明らかとなっている。更に、欠損マウスの解析や、リコンビナント分子、阻害抗体を用いた解析から、セマフォリン分子とその受容体が、免疫病治療の新たな分子標的候補となる可能性も出てきた。従って、本プロジェクトの成果は、セマフォリンファミリーによる免疫制御機構という新たな免疫制御システムの存在を提示できたことであると考えている。事実ここ数年、私たちの研究をフォローするかのようになり欧米のグループからも免疫系におけるセマフォリン分子に関する論文が一流紙に数多く発表されるようになってきた。しかし、神経系の発生など臓器発生におけるセマフォリンの機能と免疫制御における機能の間に共通のメカニズムがあるのか否かといった、当初掲げた疑問に関しては残念ながらまだ明確な回答を得るに至っておらず、我々に残された大きな課題のひとつではないかと考えている。

いずれにしても、以上のような成果は、私とともに歩んできた微生物病研究所分子免疫制御分野のスタッフ、ポスドク、大学院生、テクニシャンの方々の努力なくしてはなかったものと思う。また、本プロジェクトも半ばに、共同研究者の熊ノ郷淳先生が独立して新たな研究室を立ち上げることが出来たことも、うれしい出来事であった。最後に、本研究を常に温かく見守っていただいた領域総括の岸本先生、山西先生、アドバイザーの先生方、いつも無理を聞いていただいた領域事務所のスタッフの方々に深く感謝致します。