

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 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

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名

研究代表者： 菊谷 仁（大阪大学微生物病研究所 教授）

3. 研究内容及び成果：

セマフォリンファミリーは神経軸索のガイダンス因子として同定され、神経ネットワークの形成に必須の分子群であるが、近年神経系以外の臓器の形成においても重要な役割を果たしていることが知られている。また私達の解析から、免疫系においても多くのセマフォリン分子が発現し、免疫反応の制御において必須の役割を果たしていることが明らかになりつつある。本研究は、これらセマフォリン分子群による免疫制御機構の全容を明らかにし、免疫病治療の新たな分子標的候補を探索することを目的に行い、その結果、Sema4D、Sema4A、Sema6D、Sema7A、Plexin-A1、Plexin-A4 等、セマフォリン分子およびそれらの受容体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した。

Sema4D(CD100): クラスIVサブファミリーに属する膜型セマフォリンSema4DはT細胞上に発現する分化抗原CD100としても知られている。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Plexin-B1を介して神経軸索に対する化学反発活性を発揮するが、免疫系においてはCD72に結合しその抑制的シグナルを解除するという非常にユニークな機構でB細胞上の様々な受容体のシグナルを増強する。Sema4D欠損マウスのB細胞においては、CD72の抑制性シグナルが恒常的に入るため、B細胞抗原受容体(BCR)の活性化閾値が有意に上昇している。興味あることに、Sema4D欠損マウスは免疫不全状態にあるにもかかわらず、加齢とともにmarginal zone (MZ) B細胞亜集団が選択的に増大し、自己抗体価の上昇等のB細胞依存性自己免疫が発症する。これらの結果は、Sema4DがBCRシグナルのfine tuningを介してB細胞亜集団のホメオスターシス維持にも重要な役割を果たしていることを示している。

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。

Sema4A: Sema4Aは樹状細胞よりクローニングされたクラスIV膜型セマフォリンであり、活性化T細胞上のTim-2 分子に結合し、T細胞に対して典型的な補助刺激活性を示す。その発現は、種々の樹状細胞上に恒常的に認められる。興味深いことに、Sema4AはTh1 へ分化中の細胞にも特異的に誘導され、試験管内で誘導したTh1 細胞や株化Th1 細胞上には非常に強く発現している。遺伝子欠損マウスの作製とその解析から、樹状細胞上のSema4AはT細胞の初期活性化、すなわちT細胞プライミングに、T細胞上のSema4AはTh1 細胞分化に必要であることが明らかになっている。特に後者の役割は重要であり、Sema4A欠損マウスにおけるTh1 反応は著しく低下している。事実、抗Sema4A抗体はTh1 型の自己免疫疾患として知られる多発性硬化症のマウスモデル、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を効率よく抑制することが出来る。一方、Sema4A欠損マウスは*Nippostrongylus brasiliensis* 感染でむしろ強いTh2 反応を示す。また、Sema4A欠損マウスは野生型マウス

に比して、ハプテン誘導性のアレルギー皮膚炎や卵白アルブミンで誘導される気道過敏性や鼻炎に対して非常に強い感受性を示す。これらの結果は、Sema4Aとその受容体がTh1/Th2 分解上に起因する自己免疫疾患やアレルギー性疾患の分子標的候補になりうることを示している。

Sema6D/Plexin-A1: Sema6D はマウスの心臓からクローニングされたクラス VI 膜型セマフォリンである。ニワトリ胎児を用いた解析からは、Sema6D は Plexin-A1 に直接結合し、心臓の細胞に対して部位特異的に化学反応活性あるいは化学誘引活性を発揮して、心臓の形態形成に関与していることが明らかになっている。一方、Sema6D および Plexin-A1 は免疫細胞でも発現しており、特に樹状細胞において比較的高い Plexin-A1 の発現が認められる。また、リ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 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。さらに、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ている。

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。

Sema7A: 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- α 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。

Plexin-A4: 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。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

セマフォリン分子群による免疫制御という新しいパラダイムを開いた本研究は、国際的にも優れた成果をあげ、高く評価できる。Sema4D、Sema4A、Sema6D、Sema7A、Plexin-A1、Plexin-A4等、セマフォリン分子およびそれらの受容体が免疫反応の様々な局面で機能していることを、それら分子の免疫学的生物活性の解析、遺伝子欠損マウスの作成とその免疫学的形質の解析などを通して明らかにした。これらの研究を通して、セマフォリンファミリーによる新たな免疫制御機構の存在を示すなど、非常に独創的な成果を上げることが出来た。

これらの研究成果は、論文(21編)、招待口演や口頭発表等(70回)として発表されている。これらの多くは、Nature、Nature Immunology、Nature Cell Biology、Nature Neuroscience、Immunityなどの学術誌に発表され、国際的に高い評価を得ている。

下記はその中の特筆すべきものである。

- (1) Sema4Aが活性T細胞上のTim2分子に結合し、T細胞の初期活性化を促進するだけでなく、Th1細胞分化において必須の役割を果たすことを示した。
- (2) Sema6Dがその受容体Plexin-A1を介して、胎児期の心臓において場所及び時期特異的に細胞遊走に対して化学反発及び化学誘引活性を発揮することによって複雑な心臓の形態形成に寄与していることを示した。更に、免疫系においてもPlexin-A1のシグナルは樹状細胞の活性化や遊走の制御を介してT細胞免疫反応に寄与していることを示した。
- (3) 活性化T細胞上に発現するSema7Aがマクロファージ上の $\alpha 1 \beta 1$ インテグリンに結合し、マクロファージに炎症性サイトカインの産生を誘導することが、T細胞依存性炎症反応の成立に必須であることを示した。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

セマフォリンの免疫システムにおける機能の解明が進み、最終的に免疫制御のターゲットとして創薬への道を拓いた。基礎研究からtranslational researchに向けた試みも評価できる。少なくとも一部の分子は免疫病治療標的となる可能性も高く、今後の発展に期待したい。

- (1) 免疫セマフォリンというこれまで知られていなかった新たな免疫制御分子ファミリーを示すことが出来たことは免疫学の進展に大きく貢献すると考えられる。従来、サイトカインファミリー分子、接着分子、B7ファミリー分子などの生物活性や機能を基盤にして、免疫反応の成立や制御の調節機構が理解されてきた。本研究によって明らかにされたセマフォリン分子群の機能や役割を考慮に入れることによって免疫調節機構の理解が更に進むと思われる。
- (2) 本研究で同定されたセマフォリン分子群はそれぞれ、T細胞、B細胞の初期活性化から免疫反応のエフェクター相までの異なるステップで機能していることが明らかになった。更に、それら分子のノックアウトマウスや阻害抗体を投与したマウスにおいては実験的自己免疫疾患の発症が抑制されることも明らかになった。これらの事実は、セマフォリン分子及びその受容体が免疫病治療を目指した新たな分子標的候補であることを示している。
- (3) セマフォリン分子は神経軸索のガイダンス因子として同定されたことから、主に神経科学の領域でのみ

精力的に研究がなされてきた。しかし、本研究によって免疫系においてもファミリーとして機能していることが明らかになり、その機能の多様性が改めて証明された。これを弾みとして、神経系や免疫系以外の臓器、組織でのセマフォリン分子の機能や役割の研究が進むことが期待される。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

本CRESTプロジェクトでは、上記の研究成果だけでなく多くの若手研究者が育った。分担研究者の熊ノ郷淳は本プロジェクトにおける成果が評価され大阪大学微生物病研究所感染病態分野教授に就任した。同豊福利彦も准教授に昇任した。

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

以上