

「免疫難病・感染症等の先進医療」

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

これまでに、神経ガイダンス因子と知られるセマフォリン分子が免疫反応の調節に深く関わっていることを明らかにしてきた。Sema3A は Neuropilin-1 と Plexin-A1 からなる受容体複合体を介して、神経軸索に対する化学反発活性を発揮するが、その細胞内シグナルは知られていない。本年度は、Sema3A 受容体の下流シグナル分子を探索し、Neuropilin-1 存在下で FARP2 という Rac-GEF が Plexin-A1 の細胞質内に結合し、Sema3A の細胞内シグナルの引き金を引くことを明らかにした。また、Plexin-A1 は樹状細胞等の免疫細胞でも発現するが、plexin-A1 の免疫系における機能を解析するために plexin-A1 欠損マウスを作成した。その結果、Sema6D と plexin-A1 の相互作用が樹状細胞の活性化を介して T 細胞依存性免疫反応の成立に寄与すること、また破骨細胞の分化に必要であることを明らかにした。また、樹状細胞と破骨細胞における plexin-A1 のシグナルを解析し、これらの細胞では、plexin-A1 は TREM-2 と DAP-12 とともに Sema6D に対する受容体複合体を構成していることを見いだした。

2. 研究実施内容

(1) Sema3A のシグナル伝達機構の解析

研究目的

クラス III 型セマフォリン Sema3A は Neuropilin-1-Plexin-A1 複合体を介して神経軸索の成長円錐にたいして化学反発活性を発揮する。しかし、Sema4D などのクラス IV 型セマフォリンに比べ、その細胞内シグナルはあまり知られていない。例えば、Sema3A 刺激により小分子量 G 蛋白 Rac が活性化されるが、Rac 活性化の機構や活性化 Rac がどのように化学反発につながるのかは判っていない。本研究では、Plexin-A1 の直下で Sema3A のシグナルの引き金になる分子を探索した。

方法及び結果

Plexin-A1 結合分子としての FARP2 の同定

Plexin-A1 を始めとする type A plexin ファミリー分子の膜直下の細胞質内領域には FERM ドメイン蛋白に対する結合配列が保存されている。Neuropilin-1 存在下或いは非存在下で、種々の FERM

ドメイン蛋白を Plexin-A1 と共に一過性に発現させたところ、FARP2 という Rac-GEF 分子が Neuropilin-1 存在下でのみ Plexin-A1 に結合することが明らかになった。

Sema3A による FARP2 の Rac-GEF 活性化

Neuropilin-1、Plexin-A1 に加え FARP2 或いは GEF 活性を失った変異 FARP2 を発現する細胞を、Sema3A で刺激したところ、いずれの FARP2 分子も刺激依存的に Plexin-A1 から解離した。一方、Sema3A 依存的な Rac の活性化は FARP2 発現細胞では認められたが、変異 FARP2 発現細胞では認められなかった。さらに、FARP2 による Rac 活性化は、小分子量 G 蛋白 Rnd1 の plexin-A1 への結合、plexin-A1 の Ras-GAP 活性の活性化を介して R-Ras の不活性化することを明らかにした。

FARP2 の Sema3A の化学反発活性への関与

FARP2 が Sema3A による神経軸索の化学反発に必要か否かを明らかにするために、ニワトリ胎児の後根神経節細胞に FARP2 に対する shRNA をアデノウイルスベクターで発現させた後に、Sema3A で刺激し、その化学反発活性や成長円錐の退縮を誘導する活性を解析した。その結果、FARP2 をノックダウンすることで化学反発や成長円錐の退縮がほぼ消失することがわかった。

結論

Plexin-A1 の細胞質内部分に結合する分子として FARP2 という Rac-GEF 分子を同定した。FARP2 は、Sema3A による神経軸索の化学反発に必須のシグナル分子であることが明らかになった。

(2) Plexin-A1 欠損マウスの作成とその解析

研究目的

Plexin-A1 は Sema3A の受容体複合体のシグナル伝達分子として神経系で、また Sema6D に対する直接の受容体として心臓の形態形成において機能していることが知られている。一方、Plexin-A1 は、免疫系でも樹状細胞に発現し、樹状細胞による T 細胞の活性化において機能している可能性が報告されている。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、その表現形を解析した。

方法及び結果

Plexin-A1 欠損マウスの作成

Plexin-A1 欠損マウスは ES 細胞を用いた gene targeting により、定法に基づいて作成した。欠損マウスはメンデルの法則に従って生まれ、神経系や循環器系においては明らかな異常はなく、これらの組織における Plexin-A1 の欠損は他の plexin ファミリー分子によって代償されていると考えられた。

Plexin-A1 欠損マウスの免疫機能

Plexin-A1 欠損マウスに蛋白抗原を免疫し、数日後に所属リンパ節より調整した T 細胞を試験管内で抗原刺激したところ、その増殖及びサイトカイン分泌が著しく低下していた。また、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク(MOG)由来ペプチドで免疫した場合も、野生型マウスに比べ自己免疫性脳脊髄炎の発症率が著しく低かった。これらの結果は、Plexin-A1 欠損マウスにおいては、T 細胞依存性免疫反応が低下していることを示唆している。

Plexin-A1 欠損樹状細胞の機能

Plexin-A1 欠損樹状細胞は、MHC クラス II 分子や CD80 などの副刺激分子は正常に発現していたが、異系 T 細胞や抗原特異的トランスジェニック T 細胞を刺激する能力は著しく低下していた。また、Sema6D は野生型樹状細胞に結合し、且つ IL-12 の分泌や副刺激分子発現の増強を誘導したが、これらの現象は Plexin-A1 欠損樹状細胞では認められなかった。

Plexin-A1 欠損マウスにおける大理石病の発症

Plexin-A1 欠損マウスの大腿骨をマイクロ CT で解析したところ、野生型マウスに比べ有意に骨量が増大していることが明らかになった。また、Plexin-A1 欠損マウスの骨芽細胞の機能には異常は認められなかったが、破骨細胞の分化が著しく低下していた。

Plexin-A1 と TREM-2、DAP-12 の結合

樹状細胞や破骨細胞における Plexin-A1 のシグナル伝達機構を明らかにするため、Plexin-A1 と種々のシグナル分子との会合を解析した。その結果、これらの細胞上では、Plexin-A1 は TREM-2 を介して DAP-12 と会合していることが明らかになった。また、RNAi で TREM-2 をノックダウンした樹状細胞や DAP-12 欠損樹状細胞の Sema6D に対する反応性は、野生型樹状細胞に比べ著しく低下していた。

結論

Plexin-A1 欠損マウスの作製及び解析から、Sema6D と plexin-A1 の相互作用が樹状細胞の活性化を介して T 細胞依存性免疫反応の成立に寄与すること、また破骨細胞の分化に必要であることを明らかにした。また、樹状細胞と破骨細胞では、plexin-A1 は TREM-2 と DAP-12 ともに Sema6D に対する受容体複合体を構成していることを見いだした。

3. 研究実施体制

菊谷グループ

①研究分担グループ長：菊谷 仁（微生物病研究所、教授）

②研究項目：大阪大学微生物病研究所・分子免疫制御分野において菊谷をグループリーダーとして下記の研究項目の全てをおこなった。

(1) Sema3A のシグナル伝達機構の解析:

- ① Plexin-A1 結合分子としての FARP2 の同定、②Sema3A による FARP2 の Rac-GEF 活性化、③FARP2 の Sema3A の化学反発活性への関与

(2) Plexin-A1 欠損マウスの作成とその解析:

- ① Plexin-A1 欠損マウスの作成、②Plexin-A1 欠損マウスの免疫機能、③Plexin-A1 欠損樹状細胞の機能、④Plexin-A1 欠損マウスにおける大理石病の発症、⑤ Plexin-A1 と TREM-2、DAP-12 の結合

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文 (原著論文) 発表

- 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.