

「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知られるセマフォリンファミリー分子は免疫細胞上にも発現している。本 CREST プロジェクトでは、免疫系におけるセマフォリン分子の役割を解明することを目的に、それらの免疫細胞に対する生物活性の解析、受容体の同定、遺伝子欠損マウスの作製と解析を行ない、これまでに Sema4D が CD72 を介して B 細胞や樹状細胞の活性化の制御を行うこと、Sema4A が T 細胞の活性化分化、特に Th1 分化において重要な働きを持つこと、Sema6D が樹状細胞や破骨細胞上の Plexin-A1 に結合し、これらの細胞を刺激して免疫反応や骨形成に寄与することなどを明らかにしてきた。本年度は、GPIアンカー型セマフォリン Sema7A の免疫系における役割を解析し、Sema7A が $\alpha 1\beta 1$ インテグリンを介してマクロファージに炎症性サイトカインの産生を誘導し、T 細胞依存性免疫反応のエフェクター相で機能していることを明らかにした。

2. 研究実施内容

Sema7A の免疫系における機能解析

研究目的

Sema7A はセマフォリンファミリーの中では唯一の GPIアンカー型の分子である。神経系の解析から、Sema7A は嗅索の形成に必須なセマフォリンであること、 $\beta 1$ インテグリン結合し神経細胞の成長を誘導すること等が知られているが、免疫系におけるその役割や機能はあまりよく知られていない。本年度は、免疫系における Sema7A の生物活性やその機能を明らかにすることを目的に、研究を進めた。

研究方法及び結果

Sema7A のマクロファージ刺激活性

マウス Sema7A の細胞外領域とヒト IgG1 の Fc 部分からなるリコンビナント融合蛋白 (Sema7A-Fc) を作製し、Sema7A-Fc 存在下で種々の免疫細胞を培養した。その結果、Sema7A-Fc はヒト末梢血由来の単球やマウスのマクロファージに IL-6、TNF- α 等の炎症性サイトカインの産生を誘導することが明らかになった。また、Sema7A-Fc をコートしたプレートにヒト単球や

マウスマクロファージが強く接着することも明らかになった。

Sema7A の受容体の同定

神経系においては、Sema7A は $\beta 1$ インテグリンに結合することが知られている。免疫系における受容体を同定するために、種々のインテグリン抗体や可溶性リコンビナントインテグリン存在下で、Sema7A のヒト単球に対する刺激活性や接着誘導活性を解析した。その結果、抗 $\alpha 1$ インテグリン抗体、抗 $\beta 1$ インテグリン抗体、可溶性 $\alpha 1\beta 1$ インテグリン分子が、Sema7A による単球のサイトカイン産生や細胞接着を特異的に抑制することが判った。また、 $\alpha 1$ インテグリン欠損マウス由来のマクロファージの Sema7A によるサイトカイン産生や Sema7A に対する結合能は、野生型マクロファージに比して著しく低下していた。これらの結果より、免疫系における Sema7A の受容体は $\alpha 1\beta 1$ インテグリンであることが明らかとなった。

免疫シナプスの構成要素としての Sema7A と $\alpha 1\beta 1$ インテグリン

リコンビナント Sema7A を免疫原として用いて、抗マウス Sema7A モノクローナル抗体を作製した。この抗体を用いて免疫細胞における Sema7A の発現を解析したところ、Sema7A は休止期の細胞には発現していないが、活性化された T 細胞に誘導されることが判った。次に、卵白アルブミン特異的 TCRトランスジェニックマウス由来の T 細胞とマクロファージ間で抗原特異的な結合を誘導し、Sema7A と $\alpha 1\beta 1$ インテグリンの分布を解析したところ、Sema7A と $\alpha 1\beta 1$ インテグリンは両細胞の接触面(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再分布することがわかった。すなわち、Sema7A は免疫シナプスにおいて $\alpha 1\beta 1$ インテグリンに結合してマクロファージを活性化すると考えられる。

T 細胞依存性免疫反応における Sema7A の役割

Sema7A の生体内における役割を明らかにするために、Sema7A 欠損マウスの免疫能を解析した。Sema7A 欠損マウスにおいては、抗体産生などの体液性免疫には異常は認められなかったが、DNFB の皮膚への塗布で誘導される接触性皮膚炎の症状は Sema7A 欠損マウスにおいて著しく減弱していた。また、MOG ペプチドの免疫で誘導される実験的自己免疫性脳脊髄炎の症状も、Sema7A 欠損マウスにおいて著しく軽微であった。しかし、これらのマウスにおいては、抗原特異的な Th1 細胞や Th17 細胞は正常に誘導されていた。次に、DNFB や MOG ペプチドで感作された Sema7A 欠損マウスの T 細胞の移入実験を行ったところ、Sema7A 欠損エフェクター T 細胞は炎症局所には移動できるが、炎症反応を誘導できないことが明らかとなった。

結論

Sema7A は活性化 T 細胞上に特異的に発現し、エフェクター T 細胞がマクロファージとの抗原特異的な相互作用する際に、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とその下流のシグナルを活性化し、マクロファージに炎症性サイトカインの分泌を誘導することを明らかにした。さらに

Sema7A 欠損マウスの解析から、Sema7A を介したマクロファージの活性化が、T 細胞依存性免疫反応のエフェクター相に必須であることも明らかとなった。これらの結果は、Sema7A とその受容体 $\alpha 1 \beta 1$ インテグリンが、自己免疫疾患など T 細胞依存性炎症反応を伴う免疫病の治療に向けた分子標的候補となる可能性を示唆している。

3. 研究実施体制

(1)「菊谷」グループ

①研究者名

菊谷 仁(大阪大学微生物病研究所 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全ての解析をおこなった。

(1)Sema7A のマクロファージ刺激活性、(2) Sema7A の受容体の同定、(3) 免疫シナプスの構成要素としての Sema7A と $\alpha 1 \beta 1$ インテグリン、(4) T 細胞依存性免疫反応における Sema7A の役割

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- 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. (E-pub, doi:10.1038/nature05652).
- 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 U S A.* 104(5):1621-6, 2007. (E-pub, Jan 23).
- 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+ 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.

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:2件(CREST 研究期間累積件数:2件)