

「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

国立大学法人 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、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などを報告してきた。19年度は、これら分子のなかでも特に、Sema4A と Plexin-A1 の機能について詳細な解析を行い、Sema4A がアレルギー性皮膚炎において抑制的な役割を果たすこと、Plexin-A1 が樹状細胞の末梢からリンパ節への移動に必須の役割を果たすことを明らかにした。

## 2. 研究実施内容

研究目的

Sema4A は樹状細胞と Th1 分化過程の T 細胞に発現するセマフォリンであるが、Sema4A 欠損マウスにおいては Th1 反応が著しく低下しており、T 細胞の Th1 分化において重要な働きを果たしていることが示唆されている。しかし、Sema4A がどのような分子機構で Th1 分化に関与しているのか、Sema4A が Th2 分化にはどのような影響を与えるのかは不明であった。また、Plexin-A1 欠損マウスにおいては、抗原特異的な T 細胞の活性化が著しく損なわれていること、破骨細胞の分化不全から大理石病を発症することなどが明らかになっている。しかし、Plexin-A1 の欠損がどのよう

な機構で T 細胞のプライミング不全につながるのかは不明であった。このような背景の下で、本年度は Sema4A の Th2 分化における役割の解明、T 細胞活性化における Plexin-A1 の役割の解明を目的として以下の研究を実施した。

## 研究方法及び結果

### Sema4A 欠損マウスにおけるアレルギー性皮膚炎の自然発症

Sema4A の Th2 反応における役割を解析するために、Sema4A 欠損マウスを Th2 反応が優位なマウスとして知られている BALB/c マウスに戻し交配した。その結果得られた Sema4A 欠損 BALB/c マウスの雄の半数以上に皮膚炎の自然発症が認められた。これら皮膚炎を発症したマウスにおいては、血中の IgE レベルや T 細胞からの IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカイン産生の上昇が認められた。更に、皮膚炎組織においては肥満細胞の集積が認められ、これら Sema4A 欠損マウスが自然発症する皮膚炎は、Th2 反応によって引き起こされたアレルギー性皮膚炎と考えられた。

### ハプテン誘導型アレルギー性皮膚炎に対する Sema4A 欠損マウスの感受性

2,4,6-trinitrochlorobenzene(TNCB)をマウスの皮膚に塗布することによって、アレルギー性皮膚炎様の皮膚症状を誘導することが出来るが、Sema4A 欠損マウスはこの処置に対して感受性が高く、野生型マウスに比較してより重篤な皮膚炎を発症した。このハプテン誘導型皮膚炎も、高血清 IgE 値の上昇や IL-4 と IL-13 の高産生を伴うこと、Sema4A/STAT6 二重欠損マウスにおいては発症が認められないことから、典型的な Th2型の炎症性皮膚炎と考えられた。

### リコンビナント Sema4A によるハプテン誘導型アレルギー性皮膚炎の抑制効果

Sema4A 欠損マウス及びアトピー性皮膚炎モデル NC/nga マウスを用いて、TNCB の初回塗布の一日前から数日おきに Sema4A-Fc タンパクを投与し、ハプテン誘導型アレルギー性皮膚炎の発症に対する影響を検討した。その結果、Sema4A 欠損マウス及び NC/nga マウスのいずれの場合も、Sema4A-Fc 投与群において皮膚炎の発症が有意に抑制された。Sema4A 投与群では、血中の IgE 値の低下に加えて血清 IFN- $\gamma$  値の著明な上昇が認められた。また、Sema4A-Fc 非投与群のマウスの CD4 T 細胞は IL-4 を高産生し IFN- $\gamma$  を全く産生せず、典型的な Th2 反応を示した。一方、Sema4A-Fc 投与マウスの CD4 T 細胞では大量の IFN- $\gamma$  の産生が認められたが、IL-4 や IL-13 の産生は逆に低下していた。更に、Sema4A-Fc 投与マウスにおいては、CD4 T 細胞だけでなく CD8 T 細胞や NK 細胞からも大量の IFN- $\gamma$  が産生されていることが明らかになった。

### リコンビナント Sema4A の IFN- $\gamma$ 欠損及び T-bet 欠損マウスの皮膚炎発症に対する効果

Sema4A-Fc がどのような機構でハプテン誘導型アレルギー性皮膚炎の発症を抑制するのかを検討するため、IFN- $\gamma$  欠損マウス及び Th1 分化に必要な転写因子 T-bet を欠損したマウスに

TNCB を塗布して、Sema4A-Fc の抑制効果を解析した。IFN- $\gamma$ 欠損及び T-bet 欠損マウスのいずれのマウスも NC/nga マウスと同程度の皮膚炎を発症した。しかし、Sema4A-Fc の投与はこれらのマウスにおける皮膚炎の発症を全く抑制することが出来なかった。次に、これらマウスから調整した各リンパ球サブセットのサイトカイン産生を解析したところ、IFN- $\gamma$ 欠損マウスにおいては当然 Sema4A-Fc 投与を行っても IFN- $\gamma$ の産生はまったく認められなかった。一方、Sema4A-Fc 投与 T-bet 欠損マウスにおいては、CD4 T 細胞は大量の IL-4 を産生し、IFN- $\gamma$ の産生は認められなかったが、CD8 T 細胞や NK 細胞においては依然IFN- $\gamma$ の高産生が認められた。これらの結果は、Sema4A-Fc のアレルギー皮膚炎発症抑制効果は、Th1 細胞が産生するIFN- $\gamma$ に依存していることを示唆している。

#### Plexin-A1 の樹状細胞移動における役割の解析

Plexin-A1 欠損マウスにおいては、抗原特異的 T 細胞の活性化(T 細胞プライミング)が著しく阻害されている。T 細胞プライミングにおける Plexin-A1 の役割を明らかにするため、まず Plexin-A1 欠損樹状細胞の抗原取り込み能、ケモカインに対する反応、末梢からリンパ節への移動能を解析した。その結果、Plexin-A1 欠損樹状細胞の抗原取り込み能やケモカインに対する走化性には異常はないが、FTIC 塗布により標識された皮膚樹状細胞や皮下に接種された骨髄由来の樹状細胞の所属リンパ節への移動が著しく障害されていることが明らかになった。次に、皮膚から所属リンパ節への移動のどの段階で障害されているのかを解析したところ、Plexin-A1 欠損樹状細胞は皮膚からリンパ管までは移動できるが、リンパ管内に移行できないことが明らかになった。すなわち、Plexin-A1 は樹状細胞がリンパ管内皮細胞間を移動する際に機能していることが示唆された。

#### 結論

以上の解析から、Sema4A が Th1 細胞だけでなく CD8 T 細胞や NK 細胞に対しても IFN- $\gamma$  産生を誘導し、アレルギー性皮膚炎などの Th2 型の免疫病の発症に対して抑制的な役割を果たしていることを明らかにすることが出来た。この結果は、Sema4A が Th1 型の自己免疫病だけでなく Th2 型のアレルギー疾患の治療標的になりうる可能性を示唆している。また、本研究から、Plexin-A1 が樹状細胞の末梢から所属リンパ節への移動、特にリンパ管内皮細胞間を移動する際に有用な働きをしていることが明らかになった。免疫系以外では、セマフォリンやその受容体は、神経軸索の伸展や神経細胞はじめとする種々の細胞の遊走を制御することが知られていたが、今回の結果から、免疫系においてもセマフォリンシグナルが細胞移動の調節作用を有していると考えられる。

### 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) Sema4A 欠損マウスにおけるアレルギー性皮膚炎の自然発症、(2) ハプテン誘導型アレルギー性皮膚炎に対する Sema4A 欠損マウスの感受性、(3) リコンビナント Sema4A によるハプテン誘導型アレルギー性皮膚炎の抑制効果、(4) リコンビナント Sema4A の IFN- $\gamma$ 欠損及び T-bet 欠損マウスの皮膚炎発症に対する効果、(5) Plexin-A1 の樹状細胞移動における役割の解析

### 4. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表(原著論文)

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.

#### (2) 特許出願

平成 19 年度国内特許出願件数: 1 件 (CREST 研究期間累積件数: 3 件)