

## ガイダンス因子による免疫制御機構

Roles of guidance factors in immune regulation

菊谷 仁 (KIKUTANI HITOSHI)

大阪大学・微生物病研究所・教授



### 研究の概要

神経ガイダンス因子として知られるセマフォリンファミリーの中のいくつかのメンバーが免疫反応の様々な段階で機能していることが明らかとなり、これらの分子が免疫病治療の分子標的になりうる可能性が出てきた。本研究では、セマフォリン分子による免疫制御の分子機構解析を行うとともに、セマフォリンを標的とした免疫病治療の可能性の検証を行っている。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：リンパ球、免疫制御、セマフォリン

### 1. 研究開始当初の背景

セマフォリン分子は神経ネットワークの構築に必須な神経ガイダンス因子ファミリーを形成している。しかしそれまでの、私たちの研究から、多くのセマフォリン分子が免疫細胞上にも発現し、少なくとも4種類の膜結合型セマフォリン分 Sema4D、Sema4A、Sema6D、Sema7A の免疫制御に関与していることが判り、セマフォリンによる新たな免疫制御機構が存在する可能性が出てきた。

### 2. 研究の目的

セマフォリン分子による免疫制御の全容解明と免疫病の標的治療への応用を目指して、1) 免疫系で発現するセマフォリン分子とその受容体の遺伝子欠損マウスなどを用いた免疫セマフォリンの機能解析、2) 免疫細胞に対するセマフォリンの生物活性発揮の分子機構とシグナル伝達の解析、3) 阻害抗体やリコンビナント分子を用いた分子標的としてのセマフォリン分子の有用性の検証等を行う。

### 3. 研究の方法

クラス IV セマフォリン Sema4A による Th1/Th2 細胞制御の分子機構を遺伝子欠損マウスやリコンビナント分子を用いて解析するとともに、Sema4A のアレルギー疾患に対する効果を検証する。また、Plexin 分子や Tim 分子等のセマフォリン受容体を欠損するマウスを用いて、それらの免疫系における役割を解析する。

### 4. これまでの成果

#### Sema4A によるアレルギー性疾患の実験的治療及びその分子機構の解析：

ヒトのアレルギー疾患に近い疾患モデルとして知られている卵白アルブミン(OVA)で誘導される気道過敏性を用いてリコンビナント Sema4A の効果を検証した。まず Sema4A 欠損マウスは OVA で誘導される気道過敏性においても野生型マウスに比して有意に亢進していることがこのモデルでも確認できた。更に、OVA 感作マウスを経鼻的に OVA で再刺激する際にリコンビナント Sema4A を投与したところ、気道過敏性の低下や肺胞における好酸球数の減少が認められた。また、Sema4A 投与マウスにおいては、Th2 サイトカイン産生の低下が認められた。これらの結果から、リコンビナント Sema4A が Th2 反応を抑制し、アレルギー疾患の症状を軽減できることが明らかになり、Sema4A を用いたアレルギー疾患治療の可能性が出てきた。

#### Plexin-A1 の樹状細胞機能制御における役割の解析：

樹状細胞の体内移動に焦点を当てて樹状細胞における Plexin-A1 の役割を解析した。まず、Plexin-A1 欠損樹状細胞は末梢の輸入リンパ管の外壁付近までは移動できるが、そこからは進めず二次リンパ組織に到達できないこと、試験管内でも Plexin-A1 欠損樹状細胞はリンパ内皮細胞単層膜を貫通出来ないことが判った。Plexin-A1 のリガンドとしては膜型セマフォリン Sema6C や Sema6D に加えて可溶性セマフォリン Sema3A が知

られているが、Sema3A 欠損マウスが同様の形質を示すことから、Sema3A と Plexin-A1 の相互作用を介したシグナルが必要であると考えられた。また、Plexin-A1 の発現は、遊走中の樹状細胞においては細胞の後縁部分(trailing edge)に認められること、Sema3A が樹状細胞のアクチンを活性化し 3D ゲル中での遊走を亢進させることなども明らかとなった。

#### Tim4 による T 細胞免疫制御機構の解析：

Sema4A は免疫系の細胞においては Tim ファミリーに属する Tim2 に結合することを示してきたが、Tim ファミリーの他のメンバーも免疫系で様々な機能を発揮することが知られている。本研究においては、Tim ファミリーメンバーで樹状細胞に高発現する Tim4 の機能の解析を行った。その結果、T 細胞の初期活性化において Tim4 は抑制的に働くが、エフェクター相においては増強的に働くことが明らかになり、Tim4 は T 細胞の活性化段階に依存して二相性の機能を発揮すると考えられた。

#### Protein kinase N1 (PKN1)による胚中心 B 細胞の品質管理機構の解析：

多くのセマフォリン分子は RhoGTPase などの小分子 G タンパク質の活性制御を介して細胞骨格の再構成を誘導することが知られている。セマフォリンシグナルの解析過程で RhoGTPase に結合することが知られている PKN1 が新規の機構で液性免疫の制御にかかわっていることを明らかにした。免疫細胞内における PKN1 の蛋白間相互作用を検討したところ、PKN1 は B 細胞抗原受容体のシグナル依存的にプロトオンコジーン産物 Akt に選択的に結合した。また、PKN1 は Akt のキナーゼ活性のみならず形質転換活性をも抑制できることから、Akt の細胞内抑制因子として機能していることが明らかとなった。つぎに、PKN1 の生体内における機能を明らかにするために、PKN1 欠損マウスを作成しその形質の解析を行った。PKN1 欠損 B 細胞においては Akt の恒常的な活性化が認められ、BCR 刺激に対する反応性が亢進していた。更に特筆すべき形質は、免疫や感染のない状態でも胚中心の過形成が認められ、加齢とともに自己抗体の産生など自己免疫様の症状を呈することである。しかし、PKN1 欠損マウスを抗原で免疫した場合は、野生型マウスに比して大きな胚中心が形成されるにもかかわらず、抗体遺伝子への体細胞変異や高親和性抗体産生細胞数は著明に減少していた。これらの結果は、PKN1 による Akt 活性の制御が B 細胞の生存維持の調節だけでなく、胚中心における高親和性 B 細胞選択のための BCR シグナル閾値の設定においても機能していることを示している。

#### 5. 今後の計画

Sema4A による T 細胞制御の分子機構については、Sema4A 欠損 T 細胞においては T 細胞抗原受容体 (TCR) 刺激依存的な接着能が低下していることを見出しており、Sema4A の T 細胞の運動や形態変化にたいする影響を解析するとともに、それに伴う細胞内シグナルの解析を行う。また、PKN1 欠損マウスにおいては T 細胞の生体内移動にも障害があることから、T 細胞の遊走等における PKN1 の役割解析も行う。さらに、PKN1 と相同性の高い PKN2 欠損マウスを作成しその免疫能を解析する。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Takamatsu, H., N. Takegahara, Y. Nakagawa, M. Tomura, M. Taniguchi, R.H. Friedel, H. Rayburn, M. Tessier-Lavigne, Y. Yoshida, T. Okuno, M. Mizui, S. Kang, S. Nojima, T. Tsujimura, Y. Nakatsuji, I. Katayama, T. Toyofuku, H. Kikutani, and A. Kumanogoh. Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nat Immunol* 11:594-600, 2010.

Mizui, M., A. Kumanogoh, and H. Kikutani. Immune semaphorins: novel features of neural guidance molecules. *J. Clin. Immunol.*, 29:1-11, 2009.

Toyofuku, T., J. Yoshida, T. Sugimoto, M. Yamamoto, N. Makino, H. Takamatsu, N. Takegahara, F. Suto, M. Hori, H. Fujisawa, A. Kumanogoh, and H. Kikutani. Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the navigation of cardiac neural crest cells. *Dev. Biol.*, 321:251-262, 2008.

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.

平成 21 年 4 月 文部科学大臣表彰 (科学技術賞)

ホームページ等

[http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/mol-imm/Molecular\\_Immunology/Welcome.html](http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/mol-imm/Molecular_Immunology/Welcome.html)