

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2008～2012

課題番号：20229007

研究課題名（和文） ガイダンス因子による免疫制御機構

研究課題名（英文） Roles of guidance factors in immune regulation

研究代表者

菊谷 仁（KIKUTANI HITOSHI）

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：80161412

研究成果の概要（和文）：セマフォリン分子群とその受容体の免疫制御における役割を解析し、Sema4A がマウスのアレルギー疾患の発症や病態に抑制的に働くことを示すとともに、Sema3A とその受容体 Plexin-A1 が樹状細胞の末梢からリンパ組織への移動を制御していることを明らかにした。また、Tim-4 が T 細胞の初期活性相とエフェクター相における役割を明らかにした。更に、生理的機能不明であったキナーゼ分子 PKN1 が B 細胞抗原受容体のシグナル制御と高親和性 B 細胞の分化制御において重要な働きを有することを示した。

研究成果の概要（英文）：This study has been carried out to determine roles of semaphorins and their receptors in immune regulation. We showed that Sema4A and Sema3A play roles in negative regulation in allergic immune responses and in trafficking of dendritic cells from the periphery to lymph nodes, respectively. Tim-4 was also shown to play a regulatory role in T-cell mediated immunity. Furthermore, PKN1, a serine-threonine kinase, whose functions had been unknown, turned out to be necessary not only for regulation of B cell antigen receptor signals and but also for selection of high affinity antibody producing B cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	47,300,000	14,190,000	61,490,000
2009年度	28,000,000	8,400,000	36,400,000
2010年度	28,000,000	8,400,000	36,400,000
2011年度	28,000,000	8,400,000	36,400,000
2012年度	28,000,000	8,400,000	36,400,000
総計	159,300,000	47,790,000	207,090,000

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：セマフォリン、プレキシン、アレルギー疾患、T細胞、B細胞、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

セマフォリンは神経軸索の伸展に対して化学反発活性或いは化学誘引活性を発揮する分子群であり、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、これらセマフォリン分子の多くは、神経系以外の組織、臓器でも広範に発現しており、神経系以外の発生にも関与

している可能性が考えられていた。事実、申請者らの研究から、一部のセマフォリン分子は心血管系の形成や免疫反応の制御にも関わっていることが明らかになり、単なる神経ガイダンス因子としてではなく、より広範な組織・臓器形成から個体発生完了後のホメオスターシス維持において多機能な制御因子としての役割を果たしている可能性が出てきた。特に免疫系では数種類のセマフォリン分子が免疫反応の初期相からエフェクター相までさまざまな局面で機能していることが明らかになりつつあった。

2. 研究の目的

これまでに研究代表者たちによって同定されたセマフォリン以外にも多くのセマフォリン分子が免疫細胞上に発現していることがわかっており、これらの分子の機能を明らかにして始めてセマフォリンによる免疫制御機構の全容が明らかになると思われる。さらに、セマフォリンによる免疫制御の分子メカニズムについても一部の分子については明らかになりつつあるが、セマフォリンによる免疫制御と神経軸索のガイダンスの間には共通の分子基盤があるのかなど、まだまだ解決すべき問題点が残っている。また、各々のセマフォリンがそれぞれ免疫反応の異なった局面で機能していることが明らかになり、セマフォリンとその受容体が自己免疫疾患などの免疫治療法開発の分子標的となる可能性が出てきた。従って、本研究計画においてはセマフォリン分子とその受容体群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と疾患モデルを用いた分子治療標的としてのセマフォリン分子の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) Th2 反応制御及びアレルギー疾患における Sema4A の役割 :

卵白アルブミン誘発型のアレルギー喘息（気道過敏性）に対する感受性を Sema4A 欠損マウスと野生型マウスを用いて比較解析すると共に、リコンビナント Sema4A のマウスアレルギー喘息に対する治療効果を検討する。また、Sema4A 欠損下或はリコンビナント Sema4A 投与下における Th2 細胞の分化を解析する。

(2) 細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞の機能と Sema7A

活性化 CD4T 細胞上の Sema7A はマクロファージを活性化し炎症性サイトカインの産生を誘導する。活性化された CD8T 細胞や NK 細胞にも発現することから、これら細胞の細胞障害能における Sema7A の役割を、Sema7A 欠損マウスを用いて解析する。

(3) 欠損マウス等を用いたセマフォリン受容体の機能解析

セマフォリン受容体として知られる Plexin 分子及び Tim2 やその関連分子の免疫系における機能を、それらの欠損マウスや阻害抗体を用いて解析する。具体的には、Plexin-A1 欠損マウスにおける樹状細胞の生体内移動、Plexin-A4 における T 細胞機能の解析を行う。また、Sema4A の受容体 Tim2 の関連分子 Tim4 の機能を Tim4-Fc 分子や抗 Tim4 抗体を用いて解析する。

(4) セマフォリンシグナルの解析 :

免疫細胞の増殖、運動性、極性等に関わるセマフォリンのシグナルを解析する。特に、セマフォリン受容体の下流に存在すると考えられている小分子 G タンパクの活性化や抗原受容体シグナルとのクロストークを解析する。

4. 研究成果

(1) 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 :

Sema4A 欠損マウスは Th1 反応の低下にともない Th2 反応が亢進し、ピクリルクロリドで誘導されるアトピー様皮膚炎に対する感受性も亢進している。また、予備実験からピクリルクロリド処理と同時にリコンビナント Sema4A を Sema4A 欠損マウスや NC/Nga マウスに投与すると、アトピー様皮膚炎症状が改善されることなどが明らかになっていた。しか

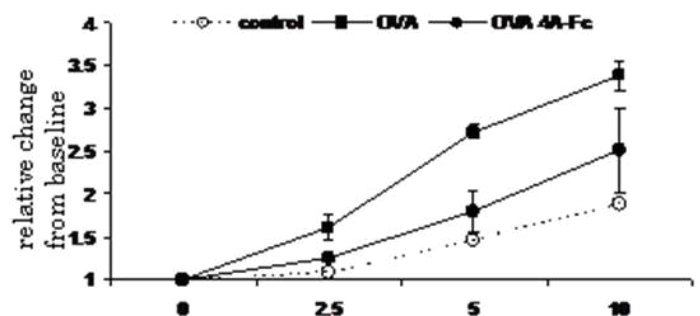


図 1. OVA のチャレンジと同時に Sema4A-Fc を投与すると、気道抵抗の亢進が軽減される。

し、この疾患モデルにおいては Sema4A の感作時投与による予防効果はみられたものの、感作後投与による治療効果は認められな

った。そこで、より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、肺胞中の IL4 等の Th2 サイトカイン値の低下や所属リンパ節細胞からの 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。

Sema4A の免疫系における受容体として Tim2 が同定されているが、Tim2 欠損マウスに OVA で気道過敏性を誘導して Sema4A の効果を解析したところ、リコンビナント Sema4A は Tim2 欠損マウスの気道過敏性に対しても抑制効果を発揮した。従って、Sema4A は Tim2 以外の受容体を介して Th2 細胞の機能を抑制していると考えられる。

(2) Plexin-A1 の樹状細胞機能制御における役割の解析：

これまでに Plexin-A1 欠損マウスの解析から、Plexin-A1 非存在下では破骨細胞の分化や T 細胞免疫反応の不全が認められること、Sema6D が Plexin-A1 を介して破骨細胞の分化や樹状細胞の活性化を誘導することを明らかにしていた。しかし、Sema6D による樹状細胞の活性化だけでは Plexin-A1 欠損マウスの T 細胞免疫不全を説明できず、本研究では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、皮膚への FITC 塗布後あるいは蛍光色素標識樹状細胞の皮下移入後の樹状細胞の移動を解析したところ、Plexin-A1 欠損マウスにおいて樹状細胞は末梢の輸入リンパ管の外壁付近まで移動できるが、そこからは進めず二次リンパ組織に到達できないことが判った。In vitro の実験系においても、Plexin-A1 欠損樹状細胞がリンパ内皮細胞単層膜を貫通出来ないことが確認できた。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、樹状細胞のリンパ管への移動不全は Sema6C や Sema6D を欠損するマウスでは認められなかったが、Sema3A を欠損するマウスにおいては認められた。したがって、樹状細胞がリンパ管の内皮細胞壁を通り抜けるためには 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 が樹状細胞のアクトミオシンを活性化し 3D ゲル中での遊走を亢進させることも明らかとなった。樹状細胞のリンパ管への移行の分子機構についてはこれまでほとんど知られていなかったが、これらの結果は樹状細胞のリンパ管への移行においては、Sema3A シグナルによって樹状細胞後縁部分に生じるアクトミオシンの駆動力が重要であることを示している。

(3) 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 ファミリー分子のひとつ Tim4 の機能の解析を行った。まず、Tim4 に対するモノクローナル抗体を作成し免疫細胞における発現を解析したところ、T 細胞上に発現が認められる他の Tim 分子とは異なり、樹状細胞やマクロファージ上に強い発現が認められた。マウス T 細胞を抗 CD3 + 抗 CD28 で刺激する際に、可溶性 Tim4(Tim4-Fc) あるいは Tim4 発現トランスフェクタントを共存させると、その活性化が著明に抑制された。また、マウスの免疫と同時に抗 Tim4 抗体を in vivo 投与したところ、抗原特異的な T 細胞の出現がさらに増強され、Tim4 は T 細胞の初期活性化に対しては抑制的な働きを有していることが明らかになった。一方、抗 Tim4 抗体を実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)等の T 細胞依存的炎症反応のエフ

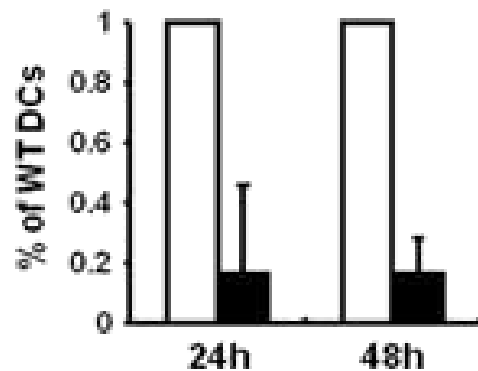


図 2. 野生型(open bar) 及び Plexin-A1^{-/-} (solid bar) 樹状細胞をマウスの皮下に投与した後、所属リンパ節に移動した樹状細胞数を解析した。

クター相で投与した場合は、逆に炎症反応が抑制された。Tim4 の T 細胞に対する機能については、幾つかの研究者から相反する報告がなされてきたが、本研究の結果から、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ことが明らかになった。

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

Sema4D や Sema6D 等のセマフォリンは樹状細胞や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。神経細胞において、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。一方、炎症性サイトカインの産生誘導にかかわる主要なシグナルは NFκB 経路である。本研究では、免疫細胞ではこの二つのシグナル経路を共役する機構が存在する可能性を検討した。残念ながらこれまでのところ小分子 G タンパク質経路と NFκB 経路を共役する機構が存在するとの証拠は得られていないが、この過程で RhoGTPase と NFκB の上流に位置する TRAF 分子のいずれとも結合することが知られている PKN1 が、これまで全く知られていない分子機構で液性免疫の制御にかかわっていることが明らかとなった。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 はプロトオンコジーン産物であり PI3 キナーゼ経路の下流で細胞の生存維持を担う分子として知られている Akt と選択的に結合すること、特に B 細胞においては抗原受容体 (BCR) の刺激によってこの結合はさらに増強されることが判った。さらに、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。まず予想されるように、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った。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必須であることを示している。

(5) EB ウイルス LMP2a の胚中心 B 細胞分化に対する影響：

PKN1 欠損マウスの解析から、BCR シグナル強度の調節が高親和性胚中心 B 細胞の選択に必須であることが明らかになった。一方、胚中心 B 細胞やメモリー B 細胞に潜伏感染する EB ウイルス (EBV) の遺伝子産物、LMP2a が BCR

シグナルを模倣することが知られており、LMP2a が EBV 感染 B 細胞の抗原非依存的な分化を誘導することにより EBV の潜伏感染成立に寄与している可能性が考えられている。LMP2a の胚中心 B 細胞分化への影響を解析するために、LMP2a を胚中心 B 細胞特異的に発現するマウス (LMP2a^{gc} マウス) を作成した。

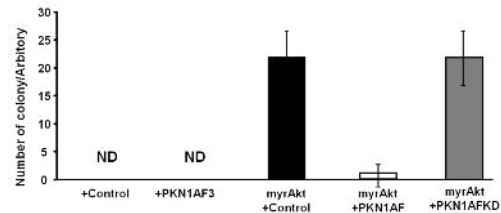


図 3. 恒常的活性型 PKN1 (PKNAF) は、ミリスチル化活性型 Akt による繊維芽細胞の形質転換をほぼ完全に抑制できるが、キナーゼ活性のない変異 PKN1 (PKNAFKD) は抑制活性をもたない。

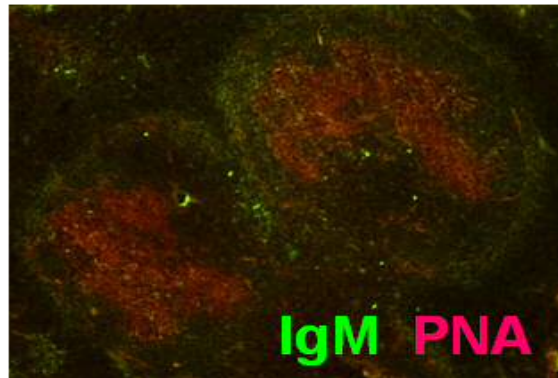


図 4. PKN1-/-マウスにおいては典型的な胚中心の自然形成が認められる。

LMP2a^{gc} マウスを抗原で免疫したところ、野生型マウスと同様に胚中心が形成されたが、抗原特異的抗体価の低下や高親和性 B 細胞数の減少が認められた。この結果は、LMP2a が胚中心 B 細胞の抗原非依存的な分化、選択を誘導し EBV の潜伏感染に寄与していることを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 28 件) すべて査読有

1. Protein kinase N1, a cell inhibitor of Akt kinase, has a central role in quality control of germinal center formation. Yasui T, Sakakibara-Yada K, Nishimura T, Morita K, Tada S, Mosialos G, Kieff E, Kikutani H. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Dec

- 18;109(51):21022-7. doi:
10.1073/pnas.1218925110. Epub 2012
Dec 5.
2. An inhibitory role for Sema4A in antigen-specific allergic asthma. Morihana T, Goya S, Mizui M, Yasui T, Prasad DV, Kumanogoh A, Tamura M, Shikina T, Maeda Y, Iwamoto Y, Inohara H, Kikutani H. *J Clin Immunol*. 2013 Jan;33(1):200-9. doi: 10.1007/s10875-012-9798-5. Epub 2012 Sep 25.
 3. The CD100 receptor interacts with its plexin B2 ligand to regulate epidermal $\gamma\delta$ T cell function. Witherden DA, Watanabe M, Garijo O, Rieder SE, Sarkisyan G, Cronin SJ, Verdino P, Wilson IA, Kumanogoh A, Kikutani H, Teyton L, Fischer WH, Havran WL. *Immunity*. 2012 Aug 24;37(2):314-25. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.026. Epub 2012 Aug 16.
 4. Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. Takamatsu H, Takegahara N, Nakagawa Y, Tomura M, Taniguchi M, Friedel RH, Rayburn H, Tessier-Lavigne M, Yoshida Y, Okuno T, Mizui M, Kang S, Nojima S, Tsujimura T, Nakatsuji Y, Katayama I, Toyofuku T, Kikutani H, Kumanogoh A. *Nat Immunol*. 2010 Jul;11(7):594-600. doi: 10.1038/ni.1885. Epub 2010 May 30.
 5. Roles of Sema4D-plexin-B1 interactions in the central nervous system for pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. Okuno T, Nakatsuji Y, Moriya M, Takamatsu H, Nojima S, Takegahara N, Toyofuku T, Nakagawa Y, Kang S, Friedel RH, Sakoda S, Kikutani H, Kumanogoh A. *J Immunol*. 2010 Feb 1;184(3):1499-506. doi: 10.4049/jimmunol.0903302. Epub 2009 Dec 28.
 6. Immune semaphorins: novel features of neural guidance molecules. Mizui M, Kumanogoh A, Kikutani H. *J Clin Immunol*. 2009 Jan;29(1):1-11. doi: 10.1007/s10875-008-9263-7. Epub 2008 Dec 6. Review.
 7. Involvement of Sema4A in the progression of experimental autoimmune myocarditis. Makino N, Toyofuku T, Takegahara N, Takamatsu H, Okuno T, Nakagawa Y, Kang S, Nojima S, Hori M, Kikutani H, Kumanogoh A. *FEBS Lett*. 2008 Nov 26;582(28):3935-40. doi: 10.1016/j.febslet.2008.10.040. Epub 2008 Oct 31.
 8. Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the navigation of cardiac neural crest cells. Toyofuku T, Yoshida J, Sugimoto T, Yamamoto M, Makino N, Takamatsu H, Takegahara N, Suto F, Hori M, Fujisawa H, Kumanogoh A, Kikutani H. *Dev Biol*. 2008 Sep 1;321(1):251-62. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.06.028. Epub 2008 Jun 30.
 9. Bimodal regulation of T cell-mediated immune responses by TIM-4. Mizui M, Shikina T, Arase H, Suzuki K, Yasui T, Rennert PD, Kumanogoh A, Kikutani H. *Int Immunol*. 2008 May;20(5):695-708. doi: 10.1093/intimm/dxn029. Epub 2008 Mar 26.
- [学会発表] (計 47 件)
1. Yasui, T (Symposist, Sept. 13) Pathogenic activation and evasion of humoral immune responses by γ -herpesvirus infection. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 11-14, 2012, Awaji, Hyogo, Japan.
 2. Minamitani, T., T. Yasui, and H. Kikutani. Expression of EB virus LMP2a modifies the selection of B cells in germinal center. International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases. August 1-4, 2012, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
 3. Kikutani, H. (Symposist, March 2): Novel endogenous regulator of Th2 inflammation: Semaphorins. 2012 Annual Meeting of American Academy of Allergy Asthma & Immunology. March 2-6, 2012, Orlando, Florida, USA.
 4. Kikutani, H. (Plenary, March 12, 2010): A role of protein kinase N1 in quality control of germinal center B cells. 9th International Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigen. March 11-13, 2010, Barcelona, Spain.
 5. Kikutani, H. (Symposist, August 27): Semaphorins in immune cell

communication. 14th International Congress of Immunology, August 22-27, 2010, Kobe, Japan.

6. Kikutani, H. (Symposist) Semaphorins and inflammatory responses. EMBO Workshop “Semaphorin Function & Mechanisms of Action”, May 8-11, 2008, Cernay, France

[その他]

ホームページ等

http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/mol-imm/Molecular_Immunology/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊谷 仁 (KIKUTANI HITOSHI)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号：80161412

(2) 研究分担者

安居 輝人 (YASUI TERUHITO)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：60283074

水井 理之 (MIZUI MASAYUKI)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：30423106
(H20～H22)

榊原 修平 (SAKAKIBARA SHUHEI)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：10618838
(H23～H24)