

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791147

研究課題名(和文)セマフォリン発現トランスジェニックマウスにおける皮膚免疫機能と肥満細胞の検証

研究課題名(英文)Immune regulation of mast cells in semaphorin 3a transgenic mouse

## 研究代表者

龍野 一樹 (Tatsuno, Kazuki)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50436937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Semaphorin 3a (Sema3a) を表皮基底細胞で過剰発現する遺伝子改変マウスを作成したところ、真皮内に肥満細胞の増殖が見られた。マウス骨髄より肥満細胞を培養し、これら細胞はSema3a受容体を発現することをFACS解析にて確認した。また、Sema3aはIL-3による肥満細胞の増殖を増強することが判明した。一方で、Sema3aはケラチノサイトからのSCF産生を低下させ、肥満細胞の過剰な増殖を抑制させるためのnegative feedback機構が皮膚環境において存在していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We developed a transgenic mice designed to over-express semaphoring 3a (Sema3a) in the basal layer of the epidermis. Increase in mast cell infiltration in the dermis of these mice was observed, and therefore, we investigated the interaction between sema3a and mast cells. We generated bone marrow derived mast cells from B6 mice, and analyzed the expression of sema3a receptor (receptor complex of NRP1 and Plexin A1). These cells showed expression of both molecules, and sema3a enhanced IL-3-induced mast cell proliferation. On the other hand, sema3a decreased the production of SCF from mouse keratinocytes, indicating the complex role of sema3a in the regulation of mast cell survival with in the skin.

研究分野：皮膚科学

キーワード：semaphorin mast cell SCF proliferation keratinocyte

## 1. 研究開始当初の背景

Semaphorin (Sema) は細胞外領域にセマドメインと呼ばれる500アミノ酸ほどの領域を有する分子であり、構造上の違いから現在は8つのサブクラスに分類される。Semaとして最初に同定されたSema3aは神経軸索反発因子として当初注目され、脊髄後根神経節の成長円錐を退縮させる作用により神経軸索の進行方向の転換、伸長停止などに働く。その後の解析で、Sema3aには血管新生、器官形成、癌の進展、免疫機能などの現象に関与することが判明した(Neufeld and Kessler. Nat Rev Cancer 2008)。Semaの発現はT細胞や樹状細胞などの免疫関連細胞でも確認されている。これまでの報告としては、関節リウマチ患者から分離した活性化T細胞でSema3aの発現が障害されていたことや(Catalano. J Immunol 2010)、アトピー性皮膚炎の患者における表皮内のSema3a発現が健康人に比べ低下していたことが判明している(Takamori et al. Br J Dermatol 2008)。このことから、Sema3aの発現低下は炎症性疾患に関連している可能性が推測される。

## 2. 研究の目的

申請者は、表皮基底層にSema3aが過剰発現する遺伝子改変マウス B6-Tg (pK-14-Sema3a)を作成した。このマウスにおいて脱毛症状や毛質が変化することを見だし、同部位において組織学的にmast cellが増加している現象を確認した。Sema3aとmast cellの関連性に着目して行われた研究の報告は過去に無く、観察した現象をもとに、Sema3aとmast cellの関係性を解明する。

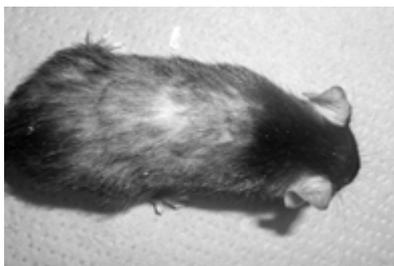


図1 Phenotypeとし、毛質の変化、脱毛を確認

このTG mouseの脱毛部皮膚を生検したところ、真皮内にmast cellの増加が確認された(下 図2)。



## 3. 研究の方法

### マウス骨髄由来肥満細胞の作製

Sema3aと肥満細胞の関連を検証するにあたり、まずはマウス骨髄より肥満細胞を作成した。手段としてはマウス大腿骨骨髄を回収し、IL-3およびSCFにて培養した。

### マウス肥満細胞におけるSemaphorin受容体の発現

Semaの受容体として現在同定されている分子はNeuropilin (NRP)とPlexin (Plex)の2種類である。NRPには現在1と2の種類が知られており、NRP1にはSema3a、3b、3c、3fが結合し、NRP2にはSema3b、3c、3fのみが結合する。Knock-out mouseの解析実験などから、NRP1は主にSema3aの、NRP2はSema3b、3c、3fの機能的受容体として作用していることが判明している。NRPの発現は血管内皮細胞、腫瘍細胞、樹状細胞、T細胞などのnon-neural cellにも発現していることが判明しているが、mast cellでの発現に関してはいまだに報告はない。そこで、マウス骨髄から培養したmast cellでのNP1およびPlexA1の発現をFACSにて検証した。

### Sema3aによる肥満細胞増殖能への作用

マウス肥満細胞がSema3aの受容体を有することが判明したため、Sema3aによる肥満細胞への直接作用を検証した。Sema3a過剰発現マウスにおいて肥満細胞の浸潤が多くみられたことより、Sema3aは肥満細胞の増殖を促す可能性が想定される。マウス骨髄より作成した肥満細胞にSema3aを作用させ、Alamarblue assayにて増殖能への影響を検証した。

### Sema3aによる肥満細胞へ遊走能への影響

マウス骨髄由来肥満細胞を用い、EZTaxiscan<sup>®</sup>にてSema3aによる遊走能への影響を検討した。

### Sema3aによるケラチノサイトへの影響

肥満細胞に発現しているc-kitのligandであるSCFの産生が、Sema3aにより誘導されている可能性を探った。マウス新生児皮膚より培養したケラチノサイトにSema3aを作用させ、それに伴うSCFの産生量の変化を検証した。

## 4. 研究成果

### マウス骨髄由来肥満細胞

マウス大腿骨より骨髄を回収し、溶血、洗浄後にrIL-3(5ng/ml)とrSCF(5ng/ml)にて2-3週ほど培養する。

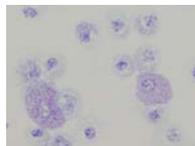


図3 培養2週目の肥満細胞

マウス肥満細胞は Sema3a 受容体を発現する Mast cell の標識としては FcεRI と CD117 (c-kit) を使用した。その結果、NRP(+)/FcεRI (+)およびNRP(+)/CD117(+)/FcεRI (+)の細胞群を確認し、mast cell は NRP1 を発現していることが確認された。また、NRP1 と複合体を形成する PlexinA1 の発現も確認したところ、肥満細胞において両分子の発現が確認された。

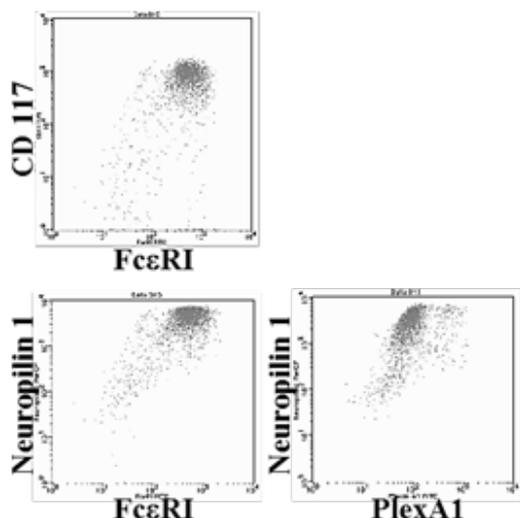
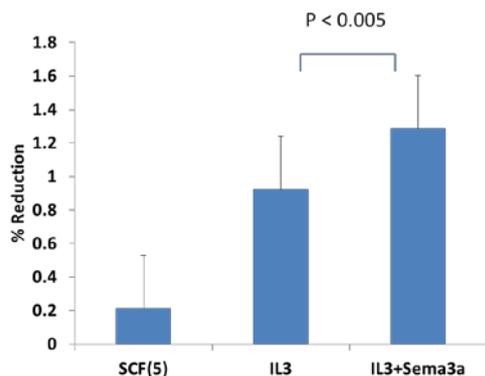


図4 マウス肥満細胞における Sema3a 受容体の発現  
肥満細胞は CD117/FcεRI+であり、Sema3a 受容体を形成する Neuropilin 1 と Plexin A1 の発現がみられた。

#### Sema3a は肥満細胞の増殖を促す

肥満細胞は SCF や IL-3 により増殖する。Sema3a がこの作用を増強するかを、Alamar blue assay にて検証した。Reduction rate が高いほど、cell viability が高いことを示す。培養肥満細胞に SCF、IL-3、IL-3+Sema3a を添加した群を作成し、比較した。結果、Sema3a は IL-3 による肥満細胞の増殖を増強する結果がみられた (下 図5)。



#### 肥満細胞の遊走能

EZTaxiscan<sup>®</sup>にて肥満細胞遊走能の評価を試みた。この assay では、培養液で満たしたチャンバー内での細胞の動きを高感度顕微鏡カメラにて観察することで、細胞の動きや速さを測定することができる。チャンバーの一方に細胞を配置させ、片方に細胞を動かす chemokine を流す。我々は SCF を chemokine とし、本 assay を試みたが、肥満細胞の遊走は確認できなかった。

#### Sema3a によるケラチノサイトへの影響

我々が作成した Sema3a 遺伝子改変マウスは、表皮基底層に Sema3a を過剰に発現するようにデザインされている。Sema3a が表皮に働き、その結果産生される分子が肥満細胞の遊走を誘導している可能性を考えた。前述の実験では SCF による肥満細胞の遊走能を直接評価することができなかったが、Sema3a が表皮細胞に働き、SCF の産生を促しているかにつき検討することで、肥満細胞の増加現象を間接的に証明することができないかと考えた。そこで、マウス新生児皮膚よりケラチノサイトを培養し、Sema3a を添加後の培養上清の SCF 濃度を測定した。結果、Sema3a はケラチノサイトからの SCF 産生を低下させる傾向がみられた。

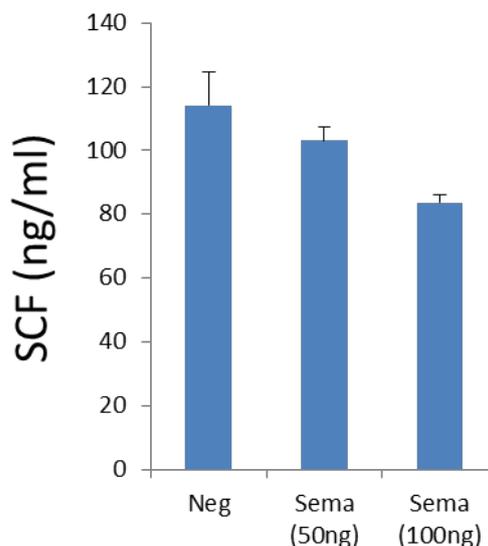


図5 Sema3a はケラチノサイトからの SCF 産生を低下させる

#### まとめ

これらの結果から、Sema3a は肥満細胞の増殖を促すことが判明し、Sema3a 遺伝子改変マウスにおいて肥満細胞が真皮内で増殖している現象の一因と考えられた。一方で、Sema3a はケラチノサイトからの SCF 産生を低下させる傾向がみられ、肥満細胞の過剰な増殖を抑制させるための negative feedback 機構が皮膚環境において存在していることが示唆された。

## 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5件)

Fujiyama, T., S. Ikeya, T. Ito, K. Tatsuno, M. Aoshima, A. Kasuya, J. Sakabe, T. Suzuki, and Y. Tokura. "Melanocyte-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Patients with Rhododendrol-Induced Leukoderma." *Journal of Dermatological Science* 77, no. 3 (Mar 2015): 190-2.

Hoshino, T., K. Tatsuno, T. Shimauchi, S. Okada, T. Ito, T. Ono, K. Ohshima, and Y. Tokura. "Epstein-Barr Virus-Associated T-Cell Lymphoproliferative Disorder Affecting Skin and Lung in an Elderly Patient." *Journal of Dermatology* 41, no. 9 (Sep 2014): 837-40.

Kasuya, A., T. Hoshino, M. Aoshima, K. Tatsuno, T. Fujiyama, and Y. Tokura. "Tgfbeta/Smad4 Signalling Is Inhibited in Tumour Cells and Infiltrating Lymphocytes of a Patient with Colon Cancer-Associated Dermatomyositis." *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* (May 23 2014).

Kuriyama, S., A. Kasuya, T. Fujiyama, K. Tatsuno, J. Sakabe, H. Yamaguchi, T. Ito, and Y. Tokura. "Leukoderma in Patients with Atopic Dermatitis." *Journal of Dermatology* 42, no. 2 (Feb 2015): 215-8. Sakabe, J., K. Kamiya, H. Yamaguchi, S. Ikeya, T. Suzuki, M. Aoshima, K. Tatsuno, et al. "Proteome Analysis of Stratum Corneum from Atopic Dermatitis Patients by Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134, no. 4 (Oct 2014): 957-60 e8.

Tokura, Y., T. Fujiyama, S. Ikeya, K. Tatsuno, M. Aoshima, A. Kasuya, and T. Ito. "Biochemical, Cytological, and Immunological Mechanisms of Rhododendrol-Induced Leukoderma." *Journal of Dermatological Science* 77, no. 3 (Mar 2015): 146-49.

[学会発表] (計4件)

Tatsuno K, Sakabe J, Funakoshi A, Yamada Y, Nishida K, Nakazawa S, Yamaguchi H, Ito T, Hirakawa S, Tokura Y. Anti-inflammatory effect of cholecystokinin in skin disorders. 2013 International

Investigative Dermatology Meeting. 2013. 5. 8-11. Edinburgh, United Kingdom.

Tatsuno K, Sakabe J, Nishida K, Yamaguchi H, Hirakawa S, Tokura Y. Anti-pruritic and anti-inflammatory effects of cholecystokinin in allergic skin disorders. 2013 European Academy of Allergy and Clinical Immunology & World Allergy Organization World Allergy and Asthma Congress. 2013. 6. 22-26. Milan, Italy

Tatsuno K, Fujiyama T, Yamaguchi Hayato, Tokura Y. High expression of TSLP receptors in circulating CD4+ T cells in atopic dermatitis. Society for Investigative Dermatology 73rd Annual Meeting 2014. 2014. 5. 7. New Mexico, U.S.A

Tatsuno K, Fujiyama T, Yamaguchi Hayato, Waki M, Tokura Y. TSLPR expressing CD4+ T cells produce enhanced IL-4 by directly responding to TSLP in AD. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014. 12. 12. Osaka, Japan

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 龍野 一樹  
(TATSUNO KAZUKI)

浜松医科大学 医学部附属病院 助教

研究者番号：50436937

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：