

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860357

研究課題名(和文)セマフォリン分子による腸管炎症制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of semaphorin molecules in development of colitis

研究代表者

姜 秀辰(Kang, Sujin)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座助教

研究者番号：30644398

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)：セマフォリン分子による自然リンパ球活性制御を介した炎症性腸疾患の発症メカニズムを明らかにし、治療応用を目指すことを本研究の目的とする。本研究では、腸管組織に4型セマフォリン分子が発現し、特に、リンパ球に優位に高発現している、腸管炎症を制御するを見出した。in vitroでSema4Aを欠損すると自然リンパ球の炎症性サイトカイン産生が亢進され、DSS誘導性大腸炎の発症はSema4A欠損マウスの方が野生型より増悪した。さらに、CD8陽性T細胞に発現するSema4Aはエフェクター分子の発現を誘導し、リステリア感染崩御に重要な働きをすることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Type I Innate lymphoid cells (ILCs) play an important roles in maintenance of intestinal homeostasis. In this study, we identified Sema4A, which is highly expressed in innate lymphoid cells is required for type I ILC activation. Using dextran-sodium induced mouse model, we found that Sema4A deficient mice showed enhanced body weight loss and shortening of colon length from day 5 on. In addition, Sema4A was preferentially expressed in CD8+ T cells in large intestine. Deletion of Sema4A restrained expression of effector molecules such as granzyme B, perforin and FAS, resulting in susceptible for *Listeria* sp. infection. Our data demonstrated that Sema4A is essential to prevent excessive intestinal inflammation and for host defense for bacterial infection.

研究分野：基礎医学

キーワード：semaphorin colitis

1. 研究開始当初の背景

消化管は腸内細菌と共生関係にある特殊な臓器であり、他の組織とは異なり、過剰な免疫反応を抑制するため、常に抑制性の免疫が優位になっている。近年、腸管組織に自己免疫疾患への関与が強く示唆される T ヘルパー 17 細胞 (Th17 細胞) およびインターロイキン 17 (IL-17) が存在することが報告され、腸管組織における免疫応答制御メカニズムに注目が集まっている。さらに、最近、免疫抑制性サイトカイン、IL-22 が腸管免疫システムにおいて重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。腸管では上皮細胞がおもな IL-22 応答細胞であり、細胞内シグナル伝達に機能する転写因子 STAT3 を介して抗菌ペプチドの産生を誘導する。さらに、IL-22 は腸管上皮細胞の再生および修復を促進するなど、抗炎症性機能を有することが知られている。実際に、IL-22 ノックアウトマウスでは腸内細菌による腸炎の重症化することが明らかとなった。このように IL-22 及びこの下流で発現する抗菌ペプチドの分泌は免疫応答に対する制御作用に重要であり、その制御能の欠損は腸内細菌に対して過剰な免疫応答を惹起し、炎症性腸疾患のような腸管慢性炎症の引き金となる。しかし、現在まで、腸管における IL-22 の産生細胞及び IL-22 産生制御メカニズムについては全く報告されていない。

セマフォリン分子群は神経軸策の方向性を決定する神経ガイダンス因子として同定された分子群であるが、現在、その機能は神経系にとどまらず器官形成、血管新生、癌の進展への関与など、多岐にわたることが明らかとなっている。申請者が所属する研究グループはこれまでにいくつかのセマフォリン分子が免疫細胞にも発現し、免疫応答を制御する機能を有することを明らかにしてきた (図 1)。免疫細胞に発現するセマフォリン分子は免疫反応の様々な phase を制御する機能を有し、「自己免疫疾患治療の鍵分子」と呼ばれている。最

近、申請者はセマフォリン分子が腸管免疫恒常性維持に重要な機能を有すること (Kang et al, *J. Immunol.*, 2012) を見出した。本研究では、炎症性腸疾患マウスモデルを用い、セマフォリン分子の中 Sema4A をターゲットにする過敏性腸疾患や自己免疫疾患発症機構を解明するとともに、セマフォリン分子の機能障害抗体を用いた炎症性腸疾患に対する治療効果の検討を本研究の目的とする。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患は原因不明の自己免疫疾患であり、現在まで根本的な治療法がなく、その発症メカニズムの解明が急務である。申請者は最近腸管上皮細胞に発現するセマフォリン分子 Sema7A が腸管免疫の恒常性維持において重要な役割を果たしていることを明らかにするとともに (*J. Immunol.*, 188:1108, 2012)、腸管樹状細胞に発現するセマフォリン分子 Sema4A の遺伝子欠損マウスが炎症性腸疾患モデルに対し発症抵抗性を示すとの知見を得た。本研究では、炎症性腸疾患マウスモデルや無菌マウスを用い、セマフォリン分子をターゲットにする過敏性腸疾患および自己免疫疾患の発症制御機構の解明するとともに、セマフォリン分子の機能障害抗体を用いた炎症性腸疾患に対する治療効果を検討する。

3. 研究の方法

本研究は、免疫セマフォリンの中、Sema4A が腸管組織に高発現することに着目し、無菌マウス及び炎症性腸疾患マウスモデルを用いて Sema4A による腸管免疫応答制御機構の解明および Sema4A 機能障害抗体を用いた炎症性腸疾患に対する治療効果を検討する。

<平成25年度の計画>

自然リンパ球機能制御する Sema4A の生物学作用機構の解明

野生型マウスの小腸・大腸の粘膜固有層から自然リンパ球を単離し、リコンビナント

Sema4A で刺激を加え、DNA チップ解析などの網羅的な方法により炎症誘導性 (IL-6, IL-23, IL-1 β , TNF- α) 及び抑制性サイトカイン (IL-10, IL-22, TGF- β) やケモカイン、転写因子などの発現変化を検討する。さらに、DSS を投与した野生型及び Sema4A 欠損マウスの大腸をそのまま培養し、実際に炎症反応が行った病変部位においてのサイトカイン産生を検討する。

腸管組織において Sema4A 発現細胞の同定

免疫系においては、Sema4A が樹状細胞に発現し、抗原特異的に T 細胞の分化を制御することが知られている。腸管組織において、腸内細菌由来の抗原を提示する CD103 陽性樹状細胞には Sema4A 発現が検出できなかった。この結果から、腸管組織において Sema4A を発現する細胞を検討するため、野生型マウス由来の小腸や大腸の組織切片を作成し Sema4A の発現を組織染色法或は腸管粘膜固有層から細胞を分離し FACS にて検討する。

<平成26年以降の計画>

Sema4A 欠損マウスを用いた炎症性腸疾患マウスモデル及び感染性大腸炎を評価

In vitro の結果により Sema4A は抗炎症性機能をする事が考えられる。そこで野生型及び Sema4A 欠損マウスに DSS を投与し、マウスの体重や大腸の長さを測定及び腸組織染色法を用いて大腸炎の重症度を検討する。さらに、リステリア感染による感染性腸炎モデルに対しての Sema4A の機能解析を行なう。

4. 研究成果

最近、様々な炎症性疾患や自己免疫疾患の発症及び増悪に関与することが報告されている炎症性サイトカイン IL-17 と IL-22 を産生する非リンパ球が見出され、その細胞が Lymphoid tissue inducer-like cell (LTi 様細胞、自然リンパ球)であることが明らかにされた。これまでに LTi 様細胞は、リンパ節、腸管パイエ

ル板などの二次リンパ組織の形成に重要な役割を果たしていることが示されている。本研究では、Sema4A 欠損マウスは炎症性腸疾患マウスモデルにより発症される大腸炎が野生型マウスより抵抗性を示す知見を得た。炎症反応に重要な細胞である自然リンパ球機能制御に関与する Sema4A 機能の分子メカニズムを明らかにすることと、マウス大腸炎モデルと用い Sema4A の治療効果の検討を行う。そこで本研究では‘腸管組織において Sema4A による免疫応答の制御機構を明らかにして炎症性腸疾患の発症における病態意義の解明’を目的とした。

1. Sema4A は LTi 及び CD8 陽性 T 細胞細胞に高発現し、炎症性サイトカイン産生を抑制する。

腸管免疫システムにおける Sema4A 発現細胞を同定するため、ミエロイド系とリンパ球系細胞を分け、定量 PCR 法を用いて Sema4A の発現を検討した結果、腸管においてはミエロイド系細胞よりリンパ球系細胞に優位に高発現していることを確認した。リンパ球の中、更に Sema4A 発現細胞を同定した結果、Lin-NKp46-CD4⁺ の LTi 細胞及び CD3⁺CD8⁺T 細胞が Sema4A を高発現することが明らかになった。自然リンパ球及び CD8 陽性細胞における Sema4A の機能解析をするため、ex vivo で Sema4A 欠損マウス由来の自然リンパ球を単離し、PMA 及びイオノマイシンで刺激後、炎症性 (IL-17, IL-22, IFN) 及び抗炎症性 (IL-10, TGF) サイトカイン産生を検討した。その結果、野生型より Sema4A 欠損自然リンパ球は IL-17, IL-22 の産生が亢進した。一方、Sema4A 欠損 CD8 陽性 T 細胞は野生型よりエフェクター分子であるグランザイム B、ペフォリン、FAS の発現が減少する結果を定量 PCR 及び FACS にて明らかになった。

2. Sema4A は慢性腸炎及び感染性腸炎の発症を制御する。

炎症性腸疾患発症における Sema4A の機能解析を in vivo で検討した。野生型及び Sema4A 欠損マウスに 2% DSS を経口投与し、体重の変化及び投与後の組織学的レベルでの腸炎の重症度で評価した。その結果、Sema4A 欠損マウスは野生型より体重の減少及び大腸の短縮、炎症性細胞の浸潤などが亢進する結果が認められた。DSS 投与した際の Sema4A 欠損マウス由来の腸管細胞を単離し、24 時間培養し、そのサイトカインを測定した結果、in vitro 結果と同様に DSS 投与後の Sema4A 欠損マウス腸管組織には IL-17, IL-22 の産生が亢進する一方、IL-10, TSLP 産生は減少していた。これらの結果により、Sema4A は自然リンパ球の活性を抑制し、腸管炎症の発症を制御することが明らかになった。さらに、CD8 陽性 T 細胞における Sema4A の機能解析のため、リステリア感染実験を行った。その結果、リステリア感染した Sema4A 欠損マウス由来の CD8 陽性 T 細胞は野生型より IFN γ 、ペフォリンの産生が顕著に減少し、リステリア感染による致死率が高い知見が得られた。これらの結果により、CD8 陽性 T 細胞に発現する Sema4A はエフェクター分子発現を誘導し、獲得免疫によるリステリア感染に対する生体防御に関与することを示唆する。

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 2 件)

Kang S, Tanaka T, Kishimoto T.
Therapeutic uses of
anti-interleukin-6 receptor antibody.

Int Immunol.

2015, 27:21-29.

Ito D, Nojima S, Nishide M, Okuno T,
Takamatsu H, **Kang S**, Kimura T,
Yoshida Y, Morimoto K, Maeda Y,
Hosokawa T, Toyofuku T, Ohshima J,
Kamimura D, Yamamoto M,

Murakami M, Morii E, Rakugi H,
Isaka Y, Kumanogoh A.

mTOR Complex Signaling through
the SEMA4A-Plexin B2 Axis Is
Required for Optimal Activation and
Differentiation of CD8+ T Cells.
J.Immunol. 2015,195:934-43.

〔学会発表〕(計 1 件)

Sujin Kang, Yoshiyuki Kioi, Atsushi
Kumanogoh, Semaphorin 6D controls
macrophage polarization to prevent
inflammatory diseases., 日本免疫学会、
2015.11.18-20, 札幌、日本

〔図書〕(計 1 件)

T.Kishimoto, **S.Kang**, T.Tanaka. IL-6:
A new era for the treatment of
autoimmune inflammatory diseases.

In: Innovative Medicine: Basic
Research and Development. Edited
by K. Nakao, N. Minato, S. Uemoto.
Springer. 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姜 秀辰 (KANG SUJIN)

大阪大学 医学系研究科 抗体医薬臨床
応用学 寄附講座助教

研究者番号 : 30644398