

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08423

研究課題名(和文) 樹状細胞におけるSema4Aの細胞内小胞輸送機構の解明

研究課題名(英文) Intracellular function of Sema4A in dendritic cells.

研究代表者

野島 聡 (Nojima, Satoshi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40528791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究の過程にて、SEMA4DとANCA関連血管炎(AAV)の間に興味深い相関が見つけられたため、これに着目した。AAV患者血清においてSEMA4D濃度の上昇が見られ、この値は病勢スコアと相関した。AAV患者の好中球において、膜型SEMA4Dが減少し、遊離型SEMA4Dが上昇していることが分かった。好中球の膜型SEMA4Dに血管内皮細胞のPlexin B2が結合することで、好中球の好中球細胞外トラップ(NET)の形成が抑制されることが見出された。Plexin B2タンパク質をANCAや病原体による刺激で活性化させた好中球に作用させてやることにより、活性酸素の放出やNET形成を有意に抑制できた。

研究成果の概要(英文)：Since an interesting association between SEMA4D and antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis (AAV) was found, we studied the significance of SEMA4D in the pathogenesis of AAV. Serum levels of soluble SEMA4D were elevated in patients with AAV and correlated with disease activity scores. Cell-surface expression of SEMA4D was downregulated in neutrophils from patients with AAV, a consequence of proteolytic cleavage of membrane SEMA4D. Membranous SEMA4D on neutrophils bound to plexin B2 on endothelial cells, and this interaction decreased NET formation. Recombinant plexin B2 successfully inhibited pathogen-induced or ANCA-induced oxidative burst and NET formation. Thus, neutrophil surface SEMA4D functions as a negative regulator of neutrophil activation. Proteolytic cleavage of SEMA4D as observed in patients with AAV may amplify neutrophil-mediated inflammatory responses. SEMA4D is a promising biomarker and potential therapeutic target for AAV.

研究分野：病理学、免疫学

キーワード：自己免疫性疾患 ANCA関連血管炎 免疫セマフォリン

### 1. 研究開始当初の背景

セマフォリンは元来、神経領域において軸索の伸長因子として同定された分子であるが、現在では、神経系に留まらず免疫、腫瘍の浸潤・転移、血管新生、骨代謝等、生体内の様々な局面において重要な活性を發揮することが明らかになっている。また、セマフォリンの機能異常は自己免疫疾患、骨粗鬆症、網膜色素変性症等多様な疾患に関与し、セマフォリンは「病気の鍵分子」として注目を集めている病理学的意義の大きな分子群である。

申請者は過去に、クラスIV型セマフォリンに属する Semaphorin 4A (SEMA4A)が網膜色素変性症の病態に関わることを報告しており、これらの報告の中で、網膜色素上皮に発現する SEMA4A が小胞輸送を介して光受容体細胞へと生存に必要な分子を供給するという「細胞内」における新しいセマフォリンの機能を見出している (Toyofuku T, Nojima S et al. *Genes&Dev.* 2012 ; Nojima S et al. *Nat commun.* 2013)。これまで分泌型ないし膜型の蛋白として「細胞外」で機能すると考えられてきたセマフォリンが「細胞内」で小胞輸送に関わるという知見はきわめて新規性の高いものであったが、セマフォリンの細胞内機能と自己免疫性疾患の病態との関係については未だ検証がなされておらず、Sema4A が網膜色素上皮において具体的にどのような分子学的機序にて小胞輸送を制御しているのかについてもその詳細については分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は、免疫系におけるセマフォリンの機能を細胞内機能という見地から解析するとともに、その分子学的メカニズムの詳細を明らかにし、セマフォリン関連疾患の診断・治療に繋げることを目的とした。セマフォリンが多発性硬化症や関節リウマチといった自己免疫性疾患に関与することは申請者の所属する研究グループからの研究成果を含め過去に多くの報告がなされており、その分子学的メカニズムを解明することは、これらの疾患に対する新規の診断法、治療法の開発に繋がる可能性があるものと考えられた。

### 3. 研究の方法

研究グループで既に作製されていたセマフォリン (SEMA3A, SEMA4A, SEMA4D, SEMA6D) のノックアウトマウスを用い、各種自己免疫性疾患の *in vivo* 実験モデルを施行した。機能解析について、これらのマウスおよび陰性対照としての野生型マウス由来の免疫細胞を用いて行った。また、自己免疫性疾患患者由来の血清においてセマフォリンの濃度の測定を行った。また、自己免疫性疾患患者の末梢血より免疫細胞を回収し、セマフォリンの発現量やシグナル分子の活性

化の程度を評価した。ヒト検体を用いた実験については、大阪大学大学院医学系研究科/医学部付属病院の医療倫理審査委員会における審査を経て承認がなされており (番号 10237)、実験は全て、これを遵守し行われた。

### 4. 研究成果

自己免疫性疾患患者の血清における ELISA による評価から、ANCA 関連血管炎 (AAV) 患者の血清において、遊離型 SEMA4D 濃度が有意に上昇していることが見出された。SEMA4D 濃度は、血管炎の臨床スコアと有意に相関していた。また、血管炎患者の白血球では、好中球で特異的に膜型 SEMA4D が減少しており、好中球上では ADAM17 という酵素による切断を受けて、膜型 SEMA4D の発現が低下していることが示された。すなわち、好中球において膜型 SEMA4D が切断され遊離型 SEMA4D になることが、AAV の病態機序に関与する可能性が示唆された。

次に、SEMA4D ノックアウトマウス由来の好中球を用いて実験を行った。好中球と血管内皮細胞とを一緒に培養すると、野生型マウスの好中球では血管炎の病態に重要な好中球細胞外トラップ (NET) の形成が抑制されるが、SEMA4D ノックアウトマウスの好中球では NET 形成の抑制が見られないことが分かった。また、血管内皮細胞上の Plexin B2 が SEMA4D と結合した際、NET 形成が有意に抑制されることも明らかになった。Plexin B2 の作用下では、NET 形成に必須とされる好中球の活性酸素 (ROS) が、細胞内タンパク質である Rac1 の非活性化によりほぼ完全に産生されなくなることも示された。

以上、AAV 発症のメカニズムとして、健康な状態では、血管内皮に発現する Plexin B2 と、好中球に発現する SEMA4D が結合し、好中球の異常な活性化を負に制御しているが、AAV 患者では、ADAM17 の働きによって好中球の膜型 SEMA4D が切断され、そのために好中球のブレーキがはずれ、不適切に活性化してしまうという機序が考えられた (図 1)。これらは、膜型 SEMA4D を介した NET 形成、ROS 産生という細胞内機能が AAV の病態機序に関与することを示した、新規性の高い知見である。

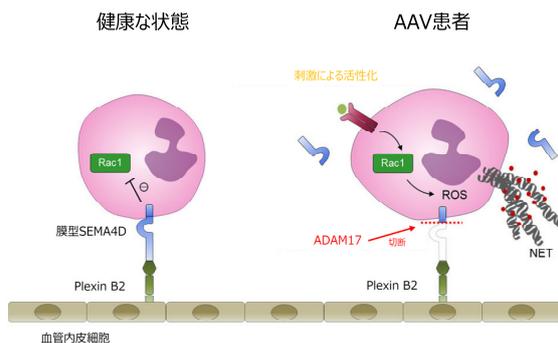


図 1 : AAV発症のメカニズム

更に、ヒト好中球を活性化させた後、Plexin B2 組み換えタンパク質を作用させてやることで ROS の産生、NET 形成を有意に抑制することができた (図 2)。このことは、好中球表面に発現する膜型 SEMA4D が、好中球の活性化を制御する新たな治療ターゲットとなりうる可能性を示唆する、意義深い結果と考えられる。

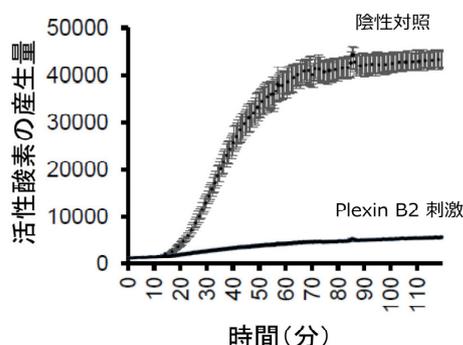


図 2 : Plexin B2タンパク質を作用させることによるヒト好中球での活性酸素産生の抑制

#### 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 8 件)

#### **CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis.**

Nojima S, Susaki EA, Yoshida K, Takemoto H, Tsujimura N, Iijima S, Takachi K, Nakahara Y, Tahara S, Ohshima K, Kurashige M, Hori Y, Wada N, Ikeda JI, Kumanogoh A, Morii E, Ueda HR. *Sci Rep*. 2017 Aug 24;7(1):9269.

#### **Lamtor1 Is Critically Required for CD4+ T Cell Proliferation and Regulatory T Cell Suppressive Function.**

Hosokawa T, Kimura T, Nada S, Okuno T, Ito D, Kang S, Nojima S, Yamashita K, Nakatani T, Hayama Y, Kato Y, Kinehara Y, Nishide M, Mikami N, Koyama S, Takamatsu H, Okuzaki D, Ohkura N, Sakaguchi S, Okada M, Kumanogoh A. *J Immunol*. 2017 Sep 15;199(6):2008-2019.

#### **Semaphorin 4D inhibits neutrophil activation and is involved in the pathogenesis of neutrophil-mediated autoimmune vasculitis.**

Nishide M, Nojima S\*, Ito D, Takamatsu H, Koyama S, Kang S, Kimura T, Morimoto K, Hosokawa T, Hayama Y, Kinehara Y, Kato Y, Nakatani T, Nakanishi Y, Tsuda T, Park JH, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Morii E,

Kumanogoh A\*. (\*corresponding author) *Ann Rheum Dis*. 2017 Aug;76(8):1440-1448.

**Characterizing Semaphorin-Mediated Immune Responses Using an Antigen-Presentation Assay.** Nojima S, Kumanogoh A. *Methods Mol Biol*. 2017; 1493: 379-391.

**Polarization of M2 macrophages requires Lamtor1 that integrates cytokine and amino-acid signals.** Kimura T, Nada S, Takegahara N, Okuno T, Nojima S, Kang S, Ito D, Morimoto K, Hosokawa T, Hayama Y, Mitsui Y, Sakurai N, Sarashina-Kida H, Nishide M, Maeda Y, Takamatsu H, Okuzaki D, Yamada M, Okada M, Kumanogoh A.

*Nat Commun*. 2016 Oct 12;7:13130.

#### **LRRK1 is critical in the regulation of B-cell responses and CARMA1-dependent NF- $\kappa$ B activation.**

Morimoto K, Baba Y, Shinohara H, Kang S, Nojima S, Kimura T, Ito D, Yoshida Y, Maeda Y, Sarashina-Kida H, Nishide M, Hosokawa T, Kato Y, Hayama Y, Kinehara Y, Okuno T, Takamatsu H, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Kurosaki T, Toyofuku T, Kumanogoh A. *Sci Rep*. 2016 May 11;6:25738.

#### **mTOR Complex Signaling through the SEMA4A-Plexin B2 Axis Is Required for Optimal Activation and Differentiation of CD8+ T Cells.**

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\*. (\* corresponding author) *J Immunol*. 2015 Aug 1;195(3): 934-43.

#### **Semaphorin 4D contributes to rheumatoid arthritis by inducing inflammatory cytokine production: Pathogenic and therapeutic implications.**

Yoshida Y, Ogata A, Kang S, Ebina K, Shi K, Nojima S, Kimura T, Ito D, Morimoto K, Nishide M, Hosokawa T, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Tsuboi H, Saeki Y, Tomita T, Tanaka T, Kumanogoh A. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Jun;67(6):1481-90.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

**Semaphorins - A Diversity of Emerging  
Physiological and Pathological Activities**  
Nojima S, Kumanogoh A, et al. Springer  
Science+Business Media LLC, I S B N,  
978-4-431-54384-8, 2015 年 05 月

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 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 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
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

野島 聡 (NOJIMA, Satoshi)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：40528791

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

熊ノ郷 淳 (KUMANOGOHO, Atsushi)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：10294125

### (4)研究協力者

( )