

Title	Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100 and enhanced immune responses in transgenic mice expressing a truncated form of CD100
Author(s)	渡辺, 知恵
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43744
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	わた なべ ち え 渡 辺 知 恵
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16863 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100 and enhanced immune responses in transgenic mice expressing a truncated form of CD100. (クラスIVセマフォリン CD100のリンパ球受容体 CD72の同定および変異型 CD100トランスジェニックマウスにおける免疫応答の増強)
論文審査委員	(主査) 教授 菊谷 仁 (副査) 教授 審良 静男 教授 平野 俊夫

論文内容の要旨

【目的】

セマフォリンファミリーは、発生過程での神経回路網の形成において、神経成長円錐の方向性を決定する反発因子として特に神経学分野で研究されてきた分子群であるが、現在では胎生期の神経回路の形成のみならず、器官形成、脈管形成、血管新生や癌の悪性化などに対する関与も示唆されている。CD100はこのセマフォリンファミリーの中で、免疫系において生理的に発現機能するセマフォリンとして最初に同定された分子として知られている。本研究では、CD100の受容体の同定および変異型 CD100-トランスジェニック (CD100-Tg) マウスの作成を通じて CD100の免疫応答における役割を明らかにすることを目的としている。

【方法ならびに成績】

CD40シグナルの標的遺伝子産物の一つとして、クラスIVセマフォリンサブファミリーに属する CD100分子を単離した。抗マウス CD100モノクローナル抗体を用いた FACS 解析により、CD100はT細胞上に強く、B細胞上に比較的弱く発現しており、CD40刺激を含む様々な刺激によるリンパ球の活性化に伴ってその発現が著しく増強することが明らかとなった。さらに可溶性 CD100-Fc キメラ分子及び膜結合型 CD100発現 transfectant を用いて CD100のB細胞への作用を検討したところ、CD100は単独刺激ではB細胞に影響を及ぼさないが、CD40によって誘導されるB細胞の増殖及び抗体産生を著しく増強させた。また可溶性 CD100-Fc を NP-CGG で免疫したマウスに投与すると抗原特異的な抗体産生は著しく促進され、CD100が液性免疫応答に深く関与していることが示された。次に CD100-Fc を用いた結合実験及び発現クローニング法にて CD100受容体を検索したところ、リンパ組織においては CD72が受容体として機能することが明らかとなった。CD72はその細胞内領域の ITIM モチーフを介して、チロシンフォスターゼ SHP-1と会合し、抑制性の受容体分子として機能すると考えられてきた。そこで、CD100刺激による CD72の抑制性シグナルに対する影響を検討した。マウス B細胞株 WEHI231を抗 IgM 抗体刺激すると、CD72のチロシン残基のリン酸化および SHP-1の CD72への会合が観察されるが、CD100-Fc で WEHI231細胞を前処理しておく、抗 IgM 抗体刺激による CD72のチロシンリン酸化及び SHP-1の会合は阻害された。さらに、CD72を強制発現させた C OS-7細胞では、CD72の恒常的リン酸化と SHP-1との会合が認められるが、CD100-Fc 添加は CD72の脱リン酸化と SHP-1の解離を誘導した。以上の結果より、CD100刺激は CD72を脱リン酸化し SHP-1を解離させることにより CD7

2の抑制性制御因子としての機能を解除することによりB細胞の反応性を促進するものと考えられた。

次に、CD100のリガンドとしての生理的機能を *in vivo* で検討するため、細胞内領域を欠失した変異 CD100を E μ エンハンサーおよび IgH プロモーターの支配下で過剰発現する CD100-Tg マウスを作製した。定量 PCR および FACS 解析により、変異型 CD100は合成されるがB細胞上から可溶性 CD100として速やかに遊離されること、さらには ELISA 法により CD100-Tg マウスの血清中の可溶性 CD100が著明に上昇していることが明らかになった。細胞表面マーカーを用いた FACS 解析からは、CD100-Tg マウスにおける脾臓T細胞およびB細胞の分化の異常は認められなかった。しかしながら、腹腔内に存在する CD5陽性 B-1細胞は顕著に増加していた。*in vitro* における CD100-Tg B細胞の CD40抗体および IL-4または LPS に対する増殖および抗体産生は顕著に増加しており、*in vivo* における T細胞依存性抗原 NP-CGG に対する CD100-Tg マウスの抗体産生も有意に増強していた。また KLH をアジュバントと共に CD100-Tg マウスに免疫し、9日後にその所属リンパ節から採取したT細胞を *in vitro* で KLH を用いて再刺激を行ったところ、CD100-Tg マウスでは抗原特異的なT細胞の増殖が著しく増強されていた。さらに、申請者が既に作成している CD100ノックアウト (CD100-KO) マウスでは CD100-Tg マウスとは逆に *in vitro* におけるB細胞の増殖の低下および *in vivo* における NP-CGG に対する抗体産生の低下が観察されるが、CD100-Tg マウスを CD100-KO マウスに交配して CD100分子を再構成したところ、*in vitro* におけるB細胞の増殖の減少および *in vivo* における NP-CGG に対する抗体産生の減少が通常マウスレベルまで回復させることができた。以上の結果より、CD100は液性免疫応答のみならず、細胞性免疫応答にも重要な役割を果たしていること、またそれらの役割の多くは可溶性 CD100によって代用できることが示唆された。

【総括】

本研究から、セマフォリン分子の一つである CD100がその受容体 CD72の抑制性シグナルを解除するという非常にユニークな機構でB細胞の活性化を制御していることが明らかとなった。すでに、CD100は非リンパ系においては Plexin B-1をレセプターとして使っていることが知られており、本研究から CD100は非免疫系では Plexin B-1、免疫系では CD72というように二つのレセプターを使い分けていることが明らかとなった。さらに CD100-Tg マウスを用いた解析から、CD100は液性および細胞性免疫応答において重要な役割を果たしていることのみならず、細胞膜表面から遊離した可溶性 CD100が生体内でリガンドとして機能している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

CD100分子は神経回路形成過程における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に属するが、免疫系ではT細胞等のリンパ球上にも発現している。本研究において、CD100が CD40によって誘導されるB細胞の増殖及び抗体産生を著しく増強することを示した。さらに免疫系では CD72が CD100の受容体として機能すること、さらに CD100が CD72の負のシグナルを解除するという非常にユニークな機構でB細胞の反応性を促進することが明らかになった。すでに、CD100は非リンパ系においては Plexin B-1をレセプターとして使っていることが知られており、本研究から CD100は非免疫系では Plexin B-1、免疫系では CD72というように二つのレセプターを使い分けていることが示された。また CD100欠損マウスおよび可溶性 CD100を過剰に産生するトランスジェニックマウスを用いた解析から、CD100が液性免疫応答のみならず細胞性免疫応答にも必須の役割を果たしていることが明らかになった。

以上のように、本研究はセマフォリン分子 CD100による免疫調節機構を、その受容体の同定および遺伝子改変マウスの解析を通して解明したものであり、学位の授与に値するものと考えられる。