

Title	Involvement of CD100, a lymphocyte semaphorin, in the activation of the human immune system via CD72 : implications for the regulation of immune and inflammatory responses
Author(s)	石田, 勲
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45345
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	石 田 勲 いしだ いさお
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 18492 号
学位授与年月日	平成 16 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	Involvement of CD100, a lymphocyte semaphorin, in the activation of the human immune system via CD72 : implications for the regulation of immune and inflammatory responses (リンパ球セマフォリン分子 CD100 はヒトの系においても CD72 を介して免疫及び炎症反応に関わっている。)
論文審査委員	(主査) 教授 菊谷 仁 (副査) 教授 平野 俊夫 教授 宮坂 昌之

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

CD100は分子量 150 kDa の膜型糖蛋白質でセマフォリンファミリーのクラスIVセマフォリンに分類される。従来、セマフォリン分子は神経の方向性を決定するガイダンス因子として知られてきた。CD100 は免疫系において生理的に機能するセマフォリンとして最初に同定された分子である。マウスの系では、CD100 刺激が CD40 刺激との共刺激により B 細胞の増殖および抗体産生を著しく増強すること、リコンビナント CD100 蛋白をマウスに投与すると T 細胞依存性抗原で免疫したマウスの抗原特異的な抗体産生が著しく促進されること、T 細胞に発現する CD100 からの刺激が樹状細胞の活性化、成熟化に関与していることが明らかとなっている。一方ヒトでは詳細な機能が未だ十分に解明されていない。CD100 の受容体としては、神経系では plexin B-1 が、免疫系ではマウスの系で CD72 が受容体として機能していることが示されている。CD72 を介した CD100 の作用機序については CD100 刺激が ITIM モチーフを有する CD72 のネガティブレギュレーターとしての機能を解除することによってリンパ球の活性化を促進することが明らかになっている。しかしながらヒトでは CD100 がそのレセプターとして CD72 を利用しているかどうかは未だ不明である。本研究ではヒト CD100 が CD72 を介して B 細胞、樹状細胞及び単球等の免疫細胞の活性化に関与しているかどうか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]

1) ヒト CD100 の細胞外領域とヒト IgG の Fc 領域からなるリコンビナント可溶性タンパク (hCD100-Fc) を作成した。2) ヒト CD72 cDNA を lipofection 法により CHO 細胞に transfection し、CD72-CHO stable transfectant を樹立した。次にビオチン化したヒト CD100-Fc の CD72-CHO への結合を FACS で検討した結果、ヒト CD72 とヒト CD100 の特異的結合が確認された。3) ヒト CD72 を一過性に発現させた COS7 細胞におけるヒト CD100-Fc 刺激後の CD72 のチロシンリン酸化の有無を検討したところ、CD100 刺激によりヒト CD72 のチロシン脱リン酸化と SHP-1 の CD72 からの解離が誘導された。4) ヒト扁桃から Ficoll-Hypaque 法及び Percoll gradient 法により休止期

B細胞を調整し、抗ヒト CD40 抗体及びヒト CD100-Fc 刺激後の B 細胞の増殖を $[H^+]$ thymidine の取り込みにより測定したところ、CD100-Fc が CD40 刺激による B 細胞の増殖反応を相乗的に増強した。5) 健常なヒトの末梢血から Ficoll-Hypaque 法及び抗ヒト CD3⁺ 抗体、抗ヒト CD19⁺ 抗体 dynabeads を用いた negative selection により単球を、また GM-CSF 及び IL-4 との共培養により樹状細胞を得て、CD40、CD72 の発現を FACS で検討したところ、単球、樹状細胞どちらにおいても強い発現を認めた。次にこれらの細胞を CD100-Fc で刺激し、48 時間後の培養上清中の種々の炎症性サイトカインを ELISA 法で測定した結果、樹状細胞では CD100-Fc の添加により抗 CD40 抗体刺激による IL-12 産生能が増強され、また単球では CD100-Fc 刺激あるいはアゴニスティックな抗 CD72 抗体の刺激のみで TNF- α 、IL-6、IL-8 の産生が誘導された。6) 末梢血各サブセットにおける plexin-B1 の発現を RT-PCR により検討したところ、活性化 T 細胞での弱い発現が認められた。

[総括]

本研究から、ヒト CD100 刺激はマウスで得られた知見と同じようにヒト CD72 のチロシン脱リン酸化及び SHP-1 の CD72 からの解離を誘導し、CD40 刺激された B 細胞及び樹状細胞を相乗的に活性化することが明らかとなった。さらに単球においてはヒト CD100 刺激あるいは抗 CD72 抗体の刺激のみで、炎症性サイトカインの産生が誘導されることが明らかとなった。このようにヒトの免疫系において CD100 は CD72 を受容体として B 細胞、樹状細胞及び単球の活性化に関与していることが示された。

論文審査の結果の要旨

CD100 はクラス IV セマフォリンに属する分子量 150 kDa の膜型糖蛋白質で、主に T 細胞上に恒常的に強く発現しており、活性化すると細胞表面上で切断されて分泌されることが明らかとなっている。CD100 の受容体については CD72 がマウスの免疫系においてすでに同定されている。本研究では、ヒト CD100 とヒト CD72 の特異的結合を確認し、リコンビナントヒト CD100 蛋白を用いて、ヒト CD100 が B 細胞、単球由来樹状細胞及び単球等の免疫細胞の活性化に関与するか否かを検討した。その結果、ヒト CD100 刺激はマウスの系で見られたように CD72 のチロシン脱リン酸化と SHP-1 の CD72 からの解離を誘導すること、CD40 刺激された B 細胞の増殖能及び単球由来樹状細胞の IL-12 産生を高めることが確認された。またヒト CD100 刺激は CD40 刺激の有無に関係なく単球の炎症性サイトカイン産生を誘導することが新たに明らかとなった。

以上のように本研究はヒト CD100 がマウスの系と同じような機能を有していることを確認することに加えて CD100 が炎症反応に関与している可能性を示した。これらの知見はヒト CD100-CD72 相互作用がヒトの免疫疾患治療の新たな分子標的となりうることを示唆しており、学位に値するものと認める。