

Title	Immunological activities of a class VI semaphorin, Sema6D
Author(s)	竹ヶ原, 宜子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46379">https://hdl.handle.net/11094/46379</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</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	たけがはらのりこ 竹ヶ原 宣子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 20111 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 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	Immunological activities of a class VI semaphorin, <i>Sema6D</i> (6型セマフォリン <i>Sema6D</i> の免疫学的活性)
論文審査委員	(主査) 教授 菊谷 仁  (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 木下タロウ

#### 論文内容の要旨

##### [ 目的 ]

セマフォリン分子群は従来、胚の発生段階における神経軸索成長円錐の進行方向を決定するガイダンス因子として同定されてきた分子群であるが、近年、器官形成、血管新生、脈管形成、癌の進行および免疫応答制御への関与が指摘され、生体内において多彩な機能を有することが明らかにされつつある。VI型セマフォリン *Sema6D* は脊椎動物に存在するセマフォリン分子であるが、そのアミノ酸配列は無脊椎動物に存在するセマフォリン分子と類似しており、プロトタイプ of セマフォリン分子と考えられている。これまでに *Sema6D* が受容体 *plexin-A1* を介してニワトリ胚の発生段階における心臓の形態形成に重要な役割を担うことが報告されている。本研究では *Sema6D* が脾臓で強く発現していることから *Sema6D* の免疫系への関与を考え、免疫細胞における *Sema6D* の発現様式ならびに免疫細胞に対する *Sema6D* の活性を検討した。

##### [ 方法ならびに成績 ]

マウス組織における *Sema6D* の発現を Mouse Multiple Tissue cDNA Panel を用いて RT-PCR 法にて検討したところ、心臓、脳、肺、精巣及び脾臓に強い発現を認め、*Sema6D* が生体内において広範囲に発現することが示された。次に、種々の免疫細胞における *Sema6D* の発現を検討した。B 細胞および T 細胞は脾臓より MACS にて、また NK 細胞は SCID BALB/c マウスの脾臓より単離した。マクロファージはチオグリコレート投与後の腹腔より単離した。樹状細胞は骨髄細胞から GM-CSF により分化誘導した。これら免疫細胞から cDNA を調整し、定量 PCR 法にて *Sema6D* の発現を検討したところ、B 細胞、T 細胞及び NK 細胞に *Sema6D* の強い発現が認められる一方、骨髄由来樹状細胞や腹腔マクロファージに弱い発現が認められた。

*Sema6D* の免疫細胞への作用を検討するため、マウス *Sema6D* の細胞外領域とヒト IgG1 Fc 領域からなる可溶性リコンビナント *Sema6D* タンパク (s*Sema6D*) を作成した。脾臓由来 small resting B 細胞を s*Sema6D* 存在下、非存在下において IL-4、抗 CD40 抗体或は LPS 刺激したが、B 細胞の細胞増殖および抗体産生に差は認められなかった。また、脾臓由来 T 細胞を s*Sema6D* 存在下、非存在下において抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体にて刺激したが、細胞増殖に差は認められなかった。

次に、樹状細胞に対する Sema6D の作用を検討した。骨髄由来樹状細胞を sSema6D 存在下、非存在下で培養したところ、sSema6D が樹状細胞からの IL-12 の産生および CD80、CD86、MHC class II の発現上昇が誘導することが明らかになった。MyD88 欠損マウスおよび Fc $\gamma$  receptor 欠損マウス由来樹状細胞においても sSema6D による IL-12 の産生が認められ、観察された sSema6D の樹状細胞活性化作用がエンドトキシン或いは Fc $\gamma$  receptor を介したのではないことが示された。次に、ケモカインに対する樹状細胞の遊走能における Sema6D の作用を Boyden chamber を用いた遊走能解析により検討すると、樹状細胞の SLC に対する遊走が sSema6D の濃度依存的に抑制され、Sema6D が免疫細胞の遊走制御にも関与することが示唆された。さらに *in vitro* において sSema6D 存在下、非存在下で抗原パルスした樹状細胞をそれぞれマウスの腹腔内に投与し、7日後に脾臓由来 T 細胞の抗原特異的応答を *in vitro* にて検討した。sSema6D 処理した群では sSema6D 処理していない群に比して抗原特異的な細胞増殖および IFN- $\gamma$  の産生の増強が認められ、Sema6D が樹状細胞による抗原特異的 T 細胞応答を増強することが示された。

最後にマクロファージおよび NK 細胞に対する Sema6D の作用を検討した。腹腔由来マクロファージを sSema6D 存在下で培養すると、Sema6D の濃度依存的に炎症性サイトカインの産生が誘導された。また、脾臓由来 NK 細胞を IL-2 存在下で sSema6D 添加すると、IFN- $\gamma$  の産生が増強された。これらの結果より Sema6D が樹状細胞のみならずマクロファージや NK 細胞の活性化にも関与することが示された。

#### [ 総 括 ]

定量 PCR 法による Sema6D の発現様式検討により、Sema6D が T 細胞や B 細胞に高発現することが、また可溶性リコンビナントタンパクを用いた解析により Sema6D が樹状細胞やマクロファージ、NK 細胞の活性化に関与することが明らかになった。これまで IV 型セマフォリン Sema4A や Sema4D/CD100 が B 細胞や T 細胞といった獲得免疫担当細胞の活性化に関与することが報告されているが、本研究により Sema6D が B 細胞や T 細胞ではなく樹状細胞やマクロファージ、NK 細胞の活性化に関与することが明らかになった。心臓発生における Sema6D の受容体 plexin-A1 はこれまでに樹状細胞に高発現する一方、B 細胞や T 細胞には殆んど発現しないことが報告されており、本研究の結果から Sema6D が plexin-A1 を介して樹状細胞を活性化していることが強く示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

申請者はニワトリ初期胚の心臓発生において重要な機能を有する膜型セマフォリン分子・Sema6D の免疫細胞における発現を検討し、Sema6D が B 細胞や T 細胞といった免疫細胞に発現することを見出した。さらに Sema6D の免疫細胞に対する生物学的活性を可溶性リコンビナント Sema6D 蛋白を用いた実験系で検討し、Sema6D が樹状細胞を活性化して副刺激分子の発現や炎症性サイトカインの産生を誘導すると共に、樹状細胞の活性化を介して T 細胞 priming を増強することを明らかにした。樹状細胞上には Sema6D の受容体として知られる plexin-A1 が発現しており、Sema6D-plexin-A1 相互作用が T 細胞・樹状細胞間相互作用において重要な役割を有する可能性が示された。以上のように申請者の研究は免疫応答において機能する新たなセマフォリン分子・Sema6D を同定したものであり、学位に値するものと考えられる。