The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Immunological activities of a class VI semaphorin, Sema6D
Author(s)	竹ケ原, 宜子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46379
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【54】

氏　　名	竹ケ原　宣　子（たけがはら　のりこ）
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, Sema6D （６型セマフォリン Sema6D 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、プロトタイプの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 領域からなる可溶型リコンビナント Sema6D タンパク（sSema6D）を作成した。脾臓由来 small resting B 細胞を sSema6D 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 sSema6D 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Fcγ 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Fcγ receptorを介したも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細胞の抗原特異的反応を*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-γ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-γ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、また可溶型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plexinA1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型リコンビナント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。