

## 125. セマフォリン分子のマクロファージ活性化制御の解明

姜 秀辰

Key words : マクロファージ, 敗血症, セマフォリン

大阪大学 免疫フロンティア研究センター 感染病態

### 緒 言

本研究では、マクロファージ活性化において細胞骨格再構築する RhoGTPase 或いは活性化酸素種の産生を包括的に制御する Sema6D とその受容体である Plexin-A1 との相互作用によるシグナル経路の解明により新たな知見を与え、その全貌解明を目指すことである (図 1)。敗血症のような過剰なマクロファージ活性化の病態形成において活性化の制御は環境的な要因が関与していることが動物モデルでの検討や臨床的知見から以前より強く疑われている。マクロファージは細菌等の外来抗原に対する自然免疫の主な担当細胞であり感染制御において重要な役割を担っている。しかしながら、感染或いは環境的な要因によりマクロファージが過剰に活性化される時、多量の炎症性サイトカイン産生に関する分子メカニズムの詳細は、未だに明らかにされてない。本研究では、Sema6D 及び Plexin-A1 が他の免疫細胞よりマクロファージに高発現し、TLR の刺激によるサイトカイン産生のバランスにこれらの分子が関与することを明らかにした。特に、Sema6D 欠損マウスを用いた敗血症モデルの結果により、Sema6D-Plexin-A1 の逆行性シグナル分子はマクロファージの活性化に非常に重要な機能を示し、敗血症の治療薬のターゲットになりうる可能性を示唆する。

### 方 法

#### 1. マクロファージにおける Sema6D-Plexin-A1 の機能解析

Sema6D は Plexin-A1 を介しシグナルを伝達する際、DAP12 及び TREM-2 との複合体を形成する必要がある。マクロファージ株化細胞を用い、これらの受容体分子を shRNA によりノックダウンし、Sema6D 刺激の存在下、TLR (Toll-like receptor) およびインフラマソーム活性が抑制されるのかをサイトカイン産生 (ELISA) にて検討した。

#### 2. Sema6D-Plexin-A1 シグナル伝達経路の検討

マウス骨髄由来のマクロファージに r Sema6D-Fc で刺激し、NF- $\kappa$ B 経路、MAPKinase 経路の活性化をウェスタンブロット法を用いて明らかにする。rSema6D-Fc 刺激により活性化された細胞内シグナルが炎症性サイトカイン産生に関与するのかを検討するため、ChIP (chromatin immunoprecipitation) 法を用いた。

#### 3. Sema6D-Plexin-A1 シグナルと ROS 産生の機構解明

マクロファージにおける TLR 及びインフラマソーム活性には ROS 産生が重要である。Sema6D 刺激存在下、ROS 産生を担う媒介する分子を pull-down 法を用いて同定する。Sema6D 刺激により産生される ROS を蛍光標識し、共焦点顕微鏡を用いた time lapse イメージングによって検討した。

#### 4. マクロファージ活性化マウスモデルを用いた Sema6D-Plexin-A1 分子の治療効果検討

野生型マウスにマクロファージ活性化症候群を誘導し、抗 Sema6D 及び Plexin-A1 抗体の投与或いは Sema6D-Plexin-A1 シグナル伝達分子である Arf-GEF 阻害剤を投与することにより、マクロファージ関連疾患治療効果を検討した。

## 結 果

### 1. マクロファージにおける Sema6D-Plexin-A1 の機能解析

Sema6D は Plexin-A1 を介しシグナルを伝達する際、DAPI2 及び TREM-2 との複合体を形成する必要があるかを明らかにするため、DAPI2 欠損マウスの骨髄由来マクロファージに Sema6D-Fc を加え、炎症性サイトカイン産生を ELISA により測定した結果、Sema6D によるマクロファージ活性化においては DAPI2 は関与しないことが明らかになった。

マクロファージ株化細胞を用い、これらの受容体分子を shRNA によりノックダウンし、Sema6D 刺激の存在下、TLR およびインフラマソーム活性が抑制されるのかを検討した結果、サイトカイン産生には差がなかった。しかし、DAPI2 は Sema6D によるマクロファージの活性酸素の産生には必須であることが FACS 解析により明らかになった。

### 2. Sema6D-Plexin-A1 シグナル伝達経路の検討

マウス骨髄由来のマクロファージを rSema6D-Fc で刺激し、NF- $\kappa$ B 経路、MAPKinase 経路の活性化をウェスタンブロット法を用いて検討した。rSema6D-Fc 刺激により活性化されたマクロファージにおいて NF- $\kappa$ B 経路分子である Erk や p65 のリン酸化が誘導された。さらに、rSema6D-Fc の存在下では、p65 の核移行は促進することが共焦点顕微鏡解析により明らかになった。一方、Plexin-A1 欠損マクロファージを rSema6D-Fc で刺激するとマクロファージ活性化が部分的に抑制することが分かった。この結果、Sema6D は従来の受容体である Plexin-A1 以外の分子を介してマクロファージ活性化を制御することを明らかにした。

### 3. Sema6D-Plexin-A1 の逆行性シグナルによるマクロファージ活性化制御の検討

Sema6D 及び Plexin-A1 欠損マクロファージ及び野生型マクロファージを TLR リガンドで刺激し、サイトカイン産生を検討した。その結果、Sema6D 欠損マクロファージは LPS や LPS, IFN 刺激に対し野生型と比べ、炎症性サイトカイン IL-6, IL-12p40 などの産生が亢進し、抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生が著しく減少することが分かった。一方、Plexin-A1 欠損マクロファージは野生型と同様なサイトカイン産生が見られた。この結果より、マクロファージ活性化の際には Sema6D-Plexin-A1 正行性シグナルよりむしろ逆行性シグナルが優位に機能することが示唆された。

### 4. Sema6D 欠損マウスの敗血症モデルの検討

マクロファージ活性化における Sema6D の機能を *in vivo* で確認するため、Sema6D 欠損マウス及び野生型マウスに LPS を投与し、生存率を観察した結果、Sema6D 欠損マウスの死亡率が野生型より高かった。LPS 投与後マウスの血清のサイトカインレベルを検討した結果、*in vitro* のマクロファージの実験結果と一致して、Sema6D 欠損マウスの血清サイトカインは野生型より炎症性サイトカインである IL-6, TNF, IL-12p40 の産生が亢進し、抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生が非常に減少していることが分かった。これらの結果は、Sema6D がマクロファージ活性化を制御することにより敗血症発症を制御することが考えられる。

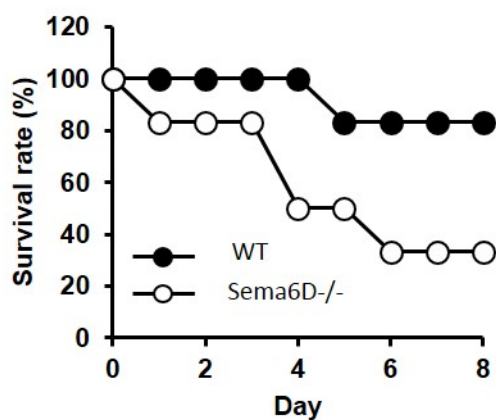


Fig. 1. LPS-induced endotoxin shock model.

0.5 mg LPS の腹腔内投与による生存率の評価. 8 週齢の C57BL/6j マウスを使用.

## 文 献

- 1) Kumanogoh, A. & Kikutani, H. : Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins. *Nat. Rev. Immunol.*, **13** : 802-814, 2013.
- 2) Kang, S. & Kumanogoh, A. : Semaphorins in bone development, homeostasis, and disease. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **24** : 163-171, 2013