総説

特集：自己免疫性疾患の病態形成に関わる細胞・分子と臨床応用

セマフォリンと自己免疫

高松 漂太, 熊ノ郷 淳

Involvement of semaphorins in autoimmunity

Hyota TAKAMATSU and Atsushi KUMANOGOH

Department of Molecular Immunology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

(Received August 29, 2005)

summary

Semaphorins were identified originally as guidance cues for developing axons. However, it is becoming clear that several semaphorins are crucially involved in the immune system. For instance, *Sema4D* (CD100) enhances activation of B cells and dendritic cells, and *Sema4A* is involved in T cell priming and Th1/Th2 regulation. In addition, recent cumulative evidence reveals their importance in immunological homeostasis. We here focus on our current understanding of the roles of semaphorins in autoimmunity.

Key words——Semaphorin; CD100/*Sema4D*; CD72; *Sema4A*; autoimmunity

抄録

セマフォリン分子群は神経ガイダンス因子として、1990年代の初めに同定された分子群であるが、近年神経系以外にも器官形成や血管新生、癌の悪性化等への関与が示唆されている。免疫系においても *Sema4D*/CD100 (以下 CD100) が B 細胞や樹状細胞の活性化を促進することや、*Sema4A* が T 細胞の活性化および Th1/Th2 分化制御に関与することが明らかとなっている。更に、これらのセマフォリン分子の免疫ホメオスターシスへの関与も示唆され、免疫制御におけるセマフォリン分子の重要性が認識されつつある。本稿では、これまで明らかになっているセマフォリン分子の自己免疫への関わりに焦点を当てて紹介する。

はじめに

神経系および免疫系には多くの類似性があることが知られている。例えば、両者がホメオスターシスの維持に、ケミカルメディエーターやサイトカインなどの共通の分子を用いている点や、免疫担当細胞である T 細胞と抗原提示細胞 (APC) の細胞間接合部で、神経シナプスに類似した「免疫シナプス」と呼ばれる高度な細胞間ネットワークを形成している点などが挙げられる。

セマフォリン (semaphorin; semaphore=手旗信号が語源) は従来発生の過程における神経成長円錐の伸張方向を決定する神経ガイダンス因子として同定されてきた分子群である^{1,2)}。これまでに、ハエや線虫などの原始的な生物からヒトに至るまで約 30 種類のセマフォリン分子が同定されている。セ

マフォリンファミリーには分泌型と膜結合型があり、ウイルスにコードされるセマフォリン分子も含めてその構造的特徴から 8 つのサブクラスに分類されている³⁾ (図 1)。セマフォリン分子は、細胞外領域に約 500 アミノ酸残基からなるセマドメインと呼ばれる領域を有する。セマドメインは各サブクラス間においてアミノ酸レベルで 30~40% の相同性を示し、ドメイン内のシステイン残基及び N 型糖鎖付加部位はほぼ完全に保存されている。ここ数年の筆者らを含む一連の研究により、いくつかのセマフォリン分子やその受容体分子が、免疫反応の調節に重要な機能を担っていることが示されつつある⁴⁾。

I. CD100 と自己免疫疾患

1. CD100 の発現と活性

CD100 は免疫系において初めて生理的に発現することが報告されたセマフォリンとして知られ、1992 年フランスの Bousmell らのグループにより、

図1 セマフォリンファミリーの構造

活性化 T 細胞上に発現が増強し、T 細胞の活性化に関与する分子として同定された⁵⁾。CD100 は細胞外領域にセマドメインを有する膜貫通型の糖タンパク質で、シグナルペプチド、セマドメインに続きイムノグロブリンドメイン、膜貫通領域及び細胞内領域を持ち、S-S 結合によって二量体を形成している。さらにリンパ球の活性化に伴って細胞表面で proteolytic に shedding を受けて分泌型 CD100 となる⁶⁾。CD100 は T 細胞上に強く発現し、休止期の B 細胞及び樹状細胞 (dendritic cell ; DC) 上での発現は弱い⁷⁾。CD40 刺激などによる細胞の活性化に伴ってこれらの細胞でも発現が著しく増強する⁷⁾。

可溶性リコンビナント CD100 タンパク (以下 CD100-Fc) 存在下で B 細胞を刺激すると、CD100 単独刺激では B 細胞に殆ど影響を及ぼさないが、CD40 抗体との共刺激により B 細胞の増殖及び抗体産生が著しく亢進し、T 細胞依存性抗原である NP-CGG で免疫したマウスに CD100-Fc を投与すると、抗原特異的抗体の産生亢進を認めることより、CD100 の B 細胞活性化作用が示されている。実際、CD100 欠損マウスでは *in vitro* における B 細胞の増殖及び *in vivo* における抗原特異的抗体産生の低下が認められている⁸⁾。逆に細胞内領域を欠失した CD100 を過剰発現する CD100 トランスジェニックマウスでは、B 細胞の増殖及び抗原特異的抗体産生能が亢進しており⁹⁾、これらのことから CD100 が T-B 細胞間相互作用において重要な役割を担っていることが証明されている。

2. CD100 の受容体

1999 年イタリアの Tamagnone らにより、CD100 の受容体として Plexin-B1 が報告された¹⁰⁾。Plexin-B1 は約 2100 のアミノ酸からなる膜タンパク質であり、細胞外領域にセマドメインを持ち、他の plexin 分子とアミノ酸レベルで非常に高い相同性を有している。神経系においては CD100 の受容体は Plexin-B1 であるが、primary のリンパ球においてはその発現が殆ど認められないため、plexin-B1 とは異なる受容体の存在が示唆された。発現クローニングを用いた筆者らの検討により、免疫系において、CD100 は CD72 を受容体として用いていることが明らかとなった⁷⁾。CD72 は C-type lectin ファミリーに属する 45kDa の II 型膜貫通型タンパク質で、細胞内領域に 2 つの ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) モチーフを有し、B 細胞受容体 (以下 BCR) 刺激によりそのチロシン残基がリン酸化される。リン酸化された ITIM モチーフには、Src Homology2 (SH2) ドメインを持つチロシンホスファターゼである SHP-1 が会合し、BCR シグナルを抑制的に制御していると考えられている¹¹⁾。Parnes らによる CD72 欠損マウスを用いた解析では、CD72 欠損マウス由来 B 細胞が種々の刺激に対し反応性の亢進を示した¹²⁾ことから、この仮説は裏付けられている。ただし、CD72 が免疫系において CD100 の唯一の受容体であるか否かについては未だ不明である。最近、ヒト T 細胞で活性化に伴って Plexin-B1 の発現が誘導される、さらに Plexin-B1 発現細胞株が Sema4D を発現した chronic lymphocytic leukemia (CLL) 細胞や CD5 陽性 B 細胞の生存に関与するとの報告がなされ、Plexin-B1 のリガンドとしての作用も報告されている¹³⁾。

3. CD100 欠損 B 細胞における CD72 と SHP-1 の恒常的会合

マウス B 細胞株である WEHI231 細胞において抗 IgM 抗体を用いて BCR を刺激すると、CD72 のチロシンのリン酸化に続いて SHP-1 の CD72 への会合が観察される。ところがこの時、CD100-Fc で WEHI231 細胞を前処理しておくと、抗 IgM 刺激による CD72 のチロシンのリン酸化および、CD72 と SHP-1 との会合は阻害される⁷⁾。また、興味深いことに、CD100 欠損マウスの B 細胞では、抗 IgM 刺激前から恒常的な CD72 と SHP-1 の会合が観察さ

れるが、CD100-Fc の前処理によって CD72 と SHP-1 の会合はほぼ完全に阻害された⁸⁾。これらの結果から CD100 刺激は CD72 を脱リン酸化することにより、CD72 の“負の制御因子”としての機能を解除し、その結果 B 細胞の反応性を促進するものと考えられた。

4. CD100 欠損下における CD72 と BCR の恒常的会合

それでは CD100 による CD72 の抑制性機能の解除はどのような機構で起こるのであろうか？野生型 B 細胞では BCR 刺激により CD72 と BCR 複合体コンポーネントである CD79a (Ig α) との会合が認められるが、CD100 欠損マウス由来 B 細胞では恒常的に両者の会合が認められ、その会合は BCR 刺激によりさらに増強した。また、野生型 B 細胞を BCR 刺激と共に CD100-Fc で刺激すると両者の会合は阻害された¹⁴⁾。このことより、CD100 刺激によりシグナル分子が集積するいわゆる BCR signalosome から CD72 が sequestration され、それにより CD72 が脱リン酸化され、CD72 から SHP-1 が解離するというモデルが示唆された (図 2)。実際、CD100 欠損 B 細胞では CD72 と BCR との会合により、BCR 刺激による CD79b, Syk, BLNK, Fc γ RIIB, Erk-2 のチロシンリン酸化が减弱しており、BCR 刺激による Ca²⁺ mobilization も野生型に比べ著しく减弱していた。

5. CD100 欠損マウス由来 B 細胞のアポトーシス抵抗性

CD100 による BCR シグナル強度の調節は生理的にどのような意義を有するのであろうか？固相化した抗 IgM 抗体で BCR を強く架橋すると、B 細胞のアポトーシスが誘導される。しかし CD100 欠損 B 細胞は、前述したように BCR シグナル強度が减弱しているため、BCR 過剰刺激によるアポトーシス誘導に対し抵抗性であった。一方、抗 IgM 抗体の F(ab')₂ フラグメントで BCR を中等度架橋すると、CD100 欠損 B 細胞の増殖は野生型 B 細胞に比し低下していたが、BCR と Fc γ RIIB とを同時に架橋できる intact な抗 IgM 抗体で刺激すると、野生型 B 細胞は Fc γ RIIB による negative feedback 機構によりその増殖が抑制されたのに対し、CD100 欠損 B 細胞では増殖抑制効果が認められなかった。このことより CD100 欠損は B 細胞の細胞死に影響を与え

図2 T細胞/B細胞間のCD100-CD72のシグナル

図3 CD100 欠損 B 細胞のターンオーバー障害

るのみならず、Fc γ RIIB による negative feedback 機構にも影響していることが示唆された。CD100 欠損 B 細胞がアポトーシスに抵抗性であったことから、生体内での B 細胞のターンオーバーについて検討した。野生型および CD100 欠損マウスに BrdU を含んだ水を 2 週間与え (pulse), その後 BrdU を含まない水を与えて (chase), BrdU を取込んだ脾臓 B 細胞の割合を経時的にフローサイトメトリーで評価した。CD100 欠損マウスは pulse 相における BrdU の取込み陽性細胞の割合が野生型に比し少なく、chase 相において、BrdU 取込み細胞の消失の遅延が認められた (図 3)。このことから CD100 欠損マウスでは BCR 刺激の减弱のため、*in vivo* における B 細胞のターンオーバーが障害されていると考えられた。

6. CD100 欠損マウスの加齢に伴う自己免疫疾患発症

CD100 欠損 B 細胞での BCR シグナル减弱の影響により、B 細胞の亜集団に変化が生ずるか否か脾臓 B 細胞で検討した。CD100 欠損マウスでは加齢に伴って徐々に CD21^{high}CD23^{low} の辺縁帯 B 細胞

図4 CD100 欠損マウスの加齢による MZB 細胞の蓄積

図5 CD100 欠損マウスの自己免疫性糸球体腎炎

(marginal zone B cell ; MZB) 数の増加が認められた (図 4)。更に CD100 欠損マウスでは MZB 細胞の増加に伴い、25 週齢を過ぎると抗 ssDNA 抗体、抗 dsDNA 抗体、リウマチ因子、抗 SSA 抗体、抗 RNP 抗体などの自己抗体価の上昇を認めた。組織学的な検討を加えると、CD100 欠損マウスでは、唾液腺、肝臓や、腎臓の傍血管周囲に著しい炎症細胞の浸潤を認めた。特に糸球体は PAS 染色陽性の基底膜の肥厚像と免疫染色にて IgG の沈着を認めた (図 5)。さらに、セルソーターを用いて CD100 欠損マウスの脾臓から CD21^{high}CD23^{low} の MZB 細胞と CD21^{low}CD23^{high} の濾胞 B 細胞 (follicular B cells ; FB) を採取し、自己抗体産生細胞の同定を試みると、MZB 細胞が主な自己抗体産生細胞であることが分かった。一方、CD100 と CD72 二重欠損マウスでは MZB 細胞の増加および自己免疫疾患の発症は認めず、CD100-CD72 相互作用の免疫ホメオスターシス維持への関与が強く示唆された。次に、T 細胞の自己反応性亢進が自己免疫疾患発症の原因である可能性を検討したが、CD25 陽性の調節性 T 細胞 (regulatory T cell ; Treg) の数およびその機能に異常は認めず、CD69 などの T 細胞の活性化マーカーの発現にも有意な差は認めなかった。さらに、ヌードマウスに野生型および CD100 欠損 T 細胞を

移入して自己抗体価が上昇するか否かについて検討したが、両者ともに自己抗体価の上昇は認めず T 細胞の自己反応性の亢進の関与は否定的であった。以上のことより、CD100 欠損マウスにおける自己免疫疾患発症の原因は、CD100-CD72 相互作用の欠如により生じる BCR シグナルの異常に起因すると考えられた¹⁴⁾。

7. 分泌型 CD100 の MRL/lpr マウスの血清中の上昇

前述したように CD100 は膜型のセマフォリン分子であるが、リンパ球が活性化されると shedding を受けて可溶性分子となる。筆者らは可溶性 CD100 を検出する ELISA のシステムを確立し、種々の免疫反応時の血清中の CD100 を測定した。T 細胞依存性の抗原で免疫した際、抗原特異的な抗体価の上昇に比例して分泌型 CD100 の上昇を認めた。さらに、ヒトの自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus ; SLE) のモデルマウスとして知られる MRL/lpr マウスにおいて、自己抗体価の上昇が起こる 16 週頃から自己抗体価の上昇と一致して血清中に分泌型 CD100 の著しい上昇を認めた⁶⁾。このことより、分泌型 CD100 の過剰産生により、自己抗体の産生が促進される可能性が示唆された。

8. CD100 と実験的自己免疫性脳脊髄炎

CD100 欠損マウスを KLH (keyhole limpet hemocyanin) などのタンパク抗原をフルインドの完全アジュバントとともに免疫すると、抗原特異的 T 細胞の出現が障害される。このことは、T 細胞に強発現している CD100、あるいは樹状細胞自身が産生分泌する分泌型 CD100 が樹状細胞を活性化し、それにより T 細胞が活性化されるというメカニズムが示唆される。同様の機序で、CD100 欠損マウスでは MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) ペプチドで誘導される、ヒトの多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis ; EAE) に対して抵抗性を示す¹⁵⁾。今後 CD100 を標的とした自己免疫疾患治療への可能性が示されている。

II. Sema4A と自己免疫疾患

1. Sema4A の発現と機能

Sema4A は免疫系で生理的に機能していることが

明らかになった2番目のセマフォリン分子である¹⁶⁾。Sema4AはCD100と同様にセマフォリンファミリーの中でクラスIVに属する膜型の糖蛋白である。Sema4Aは当初、マウスの胎生期に発現するセマフォリン分子として同定されたが、成体においても脳、肺、腎臓、脾臓や精巣など種々の臓器に広く発現が認められる。免疫細胞におけるSema4Aの発現は、樹状細胞上に強発現しているほかT細胞上にも後述のように、Th1細胞に選択的に発現誘導されることが明らかとなっている。

2. Sema4Aの活性

リコンビナントSema4Aタンパク(以下Sema4A-Fc)の存在下でCD4陽性T細胞を抗CD3抗体で刺激すると、細胞増殖およびIL-2産生が抗CD3抗体単独刺激に比し増強された。さらにallogeneicなCD4陽性T細胞と抗原提示細胞間の混合リンパ球培養反応(mixed lymphocyte reaction; MLR)により誘導されるT細胞の増殖も、Sema4A-Fcを添加すると増強した¹⁶⁾。また、Sema4A欠損マウス由来樹状細胞を用いてallogeneicなCD4陽性T細胞とMLRを行うと、Sema4A欠損樹状細胞では野生型樹状細胞に比べてT細胞の増殖が著しく減弱した¹⁷⁾。以上より、Sema4Aが副刺激分子としてT細胞の活性化を増強することが示唆された。

次にマウスT細胞リンパ腫株であるEL-4細胞から作成したcDNAライブラリーを用いた発現クローニングによる検討で、TIM(T cell immunoglobulin and mucin domain)ファミリーに属するTim2がSema4Aの受容体であることが明らかとなった¹⁶⁾。TIMファミリーは、細胞外領域にイムノグロブリン様ドメインおよびムチンドメインを有し、マウスにおいてはTim1からTim8までが同定されている。ヒトではマウスTim1、Tim3およびTim4に相同性を有する3つの遺伝子が同定されているが、Tim2に相当する遺伝子は同定されていない。Tim遺伝子は当初、マウスの気道過敏性を決定するTapr(T-cell and airway phenotype regulator)遺伝子座に存在する遺伝子として同定された。Tim-1には遺伝子多型が認められ、ヒトおよびマウスにおける気管支喘息、アトピー性皮膚炎といったTh2反応に依存する疾患の発症に寄与していることが示されている¹⁸⁾。またTim3はTh1細胞上に発現し、Th1反応およびマクロファージの活性化に関与することが報告されており¹⁹⁾、TIMファミリーがTh1/

Th2反応の制御に関与することが示唆されている²⁰⁾。

3. Sema4AとEAE

Sema4Aは休止期のT細胞には殆ど発現が認められないが、naïve CD4陽性T細胞をIL-12と抗IL-4抗体で誘導したTh1細胞上にSema4Aが特異的に誘導される。Sema4A欠損マウス由来のT細胞では、*in vitro* および *in vivo* ともにTh1細胞への分化が顕著に障害されており¹⁷⁾、Sema4AはTh1/Th2分化の制御に重要な役割を担っていることが示されている。

Sema4A-Fc投与下、タンパク抗原とフルイントの完全アジュバントとともに免疫すると、非投与マウスに比べ抗原特異的なT細胞の増加を認める。逆に、Sema4A欠損マウスでは、抗原特異的T細胞の出現が障害される。このことより、Sema4AのT細胞-樹状細胞間相互作用への関与が示されている。また、ヒトの多発性硬化症のモデルであるEAEモデルマウスに抗Sema4A抗体を投与するとEAEの発症が抑制されたことより¹⁶⁾、Sema4Aを標的とした自己免疫疾患治療への可能性も示されている。

III. クラスIIIセマフォリンと自己免疫疾患

Mangasserのグループは、関節リウマチの病因関連遺伝子を探索する過程でサブトラクション法を行い、関節リウマチの滑膜培養細胞で健康人に比し優位に発現が上昇している遺伝子として、クラスIIIセマフォリンであるSema3Cを報告している²¹⁾。一方、Millerらは、関節リウマチ患者の滑膜に浸潤しているマクロファージや線維芽細胞上にSema3Cの発現が認められ、滑膜におけるSema3C発現細胞数と副交感神経の分布に負の相関があると報告している²²⁾。

おわりに

以上述べてきたように、免疫系におけるセマフォリンの機能は、B細胞のホメオスタシス維持、副刺激分子としての機能、T細胞のTh1/Th2分化制御と、その機能は非常にバラエティー富んでいる。最近、筆者らは上述したセマフォリン分子のほかにも免疫細胞に発現する新たなセマフォリン分子を見出すとともに、これらの免疫制御への関与を示唆する知見を得つつある。今後の解析により、セマフォリン分子による免疫制御機構が明らかにされるだけ

でなく、セマフォリン分子群を標的とした自己免疫疾患やアレルギー疾患および感染症治療に向けた、新たなアプローチが期待される。

文 献

- 1) Luo, Y. et al. : A protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell*, **75** : 217–227, 1993.
- 2) Kolodkin, A. L. et al. : The semaphoring genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell*, **75** : 1389–1399, 1993.
- 3) Semaphorin Nomenclature Committee : Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. *Cell*, **97** : 551–552, 1999.
- 4) Kikutani, H. and Kumanogoh, A. : Semaphorins in interactions between T cells and antigen presenting cells. *Nat Rev Immunol*, **3** : 159–167, 2003.
- 5) Bougeret, C. et al. : Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation. *J Immunol*, **148** : 318–323, 1992.
- 6) Wang, X. et al. : Functional soluble CD100/Sema4D released from activated lymphocytes : possible role in normal and pathologic immune responses. *Blood*, **97** : 3498–3504, 2001.
- 7) Kumanogoh, A. et al. : Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100 : a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity*, **13** : 621–631, 2000.
- 8) Shi, W. et al. : The class IV semaphorin CD100 plays nonredundant roles in the immune system : defective B and T cell activation in CD100-deficient mice. *Immunity*, **13** : 633–642, 2000.
- 9) Watanabe, C. et al. : Enhanced immune responses in transgenic mice expressing a truncated form of the lymphocyte semaphorin CD100. *J. Immunol.*, **167** : 4321–4328, 2001.
- 10) Tamagunone, L. et al. : lexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell*, **99** : 71–80, 1999.
- 11) Adachi, T. et al. : The B cell surface protein CD72 recruits the tyrosine phosphatase SHP-1 upon tyrosine phosphorylation. *J. Immunol.*, **160** : 4662–4665, 1998.
- 12) Pan, C. et al. : CD72-deficient mice reveal nonredundant roles of CD72 in B-cell development and activation. *Immunity*, **11** : 495, 1999.
- 13) Granziero, L. et al. : CD100/PlexinB1 interactions sustain proliferation and survival of normal and leukemic CD5⁺ B lymphocytes. *Blood*, **101** : 1962–1969, 2003.
- 14) Kumanogoh, A. et al. : Requirement for CD100–CD72 interactions in fine-tuning of B-cell antigen receptor signaling and homeostatic maintenance of the B-cell compartment. *Int. Immunol.*, 2005, in press.
- 15) Kumanogoh, A. et al. : Requirement for the lymphocyte semaphoring, CD100, in the induction of antigen-specific T cells and the maturation of dendritic cells. *J. Immunol.*, **169** : 1175–1181, 2002.
- 16) Kumanogoh, A. et al. : Class IV semaphoring Sema4a enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature*, **419** : 629–633, 2002.
- 17) Kumanogoh, A. et al. : Nonredundant roles of Sema4A in the immune system : defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice. *Immunity*, **22** : 1–12, 2005.
- 18) McIntire, J. J. et al. : Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nature Immunol*, **2** : 1109–1116, 2001.
- 19) Monney, L. et al. : TH1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*, **415** : 536–541, 2002.
- 20) Kuchroo, V. K. et al. : The TIM gene family : emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*, **3** : 454–462, 2003.
- 21) Mangasser, S. K. et al. : Identification of human semaphorin E gene expression in rheumatoid synovial cells by mRNA differential display. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234** : 153–156, 1997.
- 22) Miller, L. E. et al. : Increased Prevalence of Semaphorin 3C, a Repellent of sympathetic Nerve Fibers, in the Synovial Tissue of Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.*, **50** : 1156–1163, 2004.