

## 論文の内容の要旨

論文題目 表皮細胞におけるセマフォリンの発現と機能に関する検討

氏名 鎌田昌洋

セマフォリンは従来神経ガイダンス因子として知られてきた分子だが、近年、器官形成、血管新生、癌の進展など神経系以外への関与も明らかになってきている。更には、免疫応答にも関与すると報告されてきている。セマフォリンは様々な臓器に分布しているが、皮膚における機能に関する研究のほとんどは神経伸長や抗腫瘍効果における機能に関するものであり、皮膚における発現や免疫学的機能に関する報告は限定的である。そこで今回、ケラチノサイトに発現しているセマフォリンの皮膚免疫における役割について研究した。

まず、セマフォリン mRNA の正常ヒト表皮角化細胞 (Normal huma epidermal keratinocytes; NHK) における発現を reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いて調べたところ、NHK はセマフォリン 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, 4A, 4B, 4C, 4D, 5A, 6A, 6C, 6D, 7A を mRNA レベルで発現していた。NHK に発現しているセマフォリン mRNA のうち、皮膚に浸潤する細胞 (単球、 $\alpha 1\beta 1$  T 細胞) に発現する  $\beta 1$  integrin を受容体とすることが知られているセマフォリン 7A に今回は注目した。

次に、NHK のセマフォリン 7A 蛋白質のサイトカインによる発現調節を調べた。NHK を interferon (IFN)- $\gamma$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , transforming growth factor (TGF)- $\beta 1$ , interleukin (IL)-4, IL- $\beta$ , または IL-6 の存在下、または非存在下で 24 時間培養した。更に、フローサイトメトリー及び免疫ブロット法により、サイトカイン刺激下での NHK のセマフォリン 7A 蛋白質の発現を調べた。フローサイトメトリーでは、IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  刺激にて NHK 細胞表面のセマフォリン 7A 発現が促進される傾向を認めた。また、TGF- $\beta 1$  刺激にて NHK 細胞表面のセマフォリン 7A 発現は用量依存性に促進された。一方、IL-4 は NHK のセマフォリン 7A 発現を減少させる傾向を認めた。IL- $\beta$  及び IL-6 は NHK のセマフォリン 7A 発現に影響しなかった。免疫ブロット法でのサイトカインの NHK 細胞溶解物へのセマフォリン 7A (80 kDa) 発現に対する影響は、フローサイトメトリーの結果と同様であった。

免疫応答でのセマフォリン 7A の主要な受容体は  $\beta 1$ -integrin であることが知られている。そこで、NHK 細胞表面に発現したセマフォリン 7A が単球などの  $\beta 1$ -integrin を発現している免疫細胞を刺激しうるかどうかを調べた。まず、セマフォリン 7A 発現を促進するため NHK を 24 時間

10 ng/ml の TGF- $\beta$ 1 で刺激した群と刺激していない群を作った。NHK 自体からのサイトカイン産生をなくし、かつ細胞表面分子の発現を保存するため、これらの細胞をパラホルムアルデヒドで固定した。次に、固定した NHK をヒト単球細胞株である THP-1 細胞と 24 時間共培養し、上清中に分泌された IL-8 を ELISA により測定した。固定した NHK が IL-8 を産生しないことは確認した。THP-1 細胞は、無刺激の NHK あるいは TGF- $\beta$ 1 で刺激した NHK と共培養したときの方が THP-1 細胞単独で培養したときよりも IL-8 をより産生した。更に、THP-1 細胞は、TGF- $\beta$ 1 刺激した NHK と共培養したときの方が、無刺激の NHK と共培養したときに比べ、IL-8 産生が促進される傾向にあった。これらの結果から、NHK は THP-1 細胞からの IL-8 産生を誘導し、更に NHK が TGF- $\beta$ 1 で刺激され、細胞表面のセマフォリン 7A の発現が亢進されている時の方が、THP-1 細胞からの IL-8 産生が促進される傾向にあることがわかった。

次に、セマフォリン 7A と  $\beta$ 1-integrin の相互作用自体が NHK による THP-1 細胞の活性化に関与しているかどうかを調べた。 $\beta$ 1-integrin 中和抗体または isotype 抗体で前処理した THP-1 細胞を、TGF- $\beta$ 1 で刺激し固定した NHK と共培養し、THP-1 細胞からの IL-8 産生を比較した。THP-1 細胞が  $\beta$ 1-integrin 中和抗体で前処理された場合は、isotype 抗体で処理された場合に比べ、THP-1 細胞からの IL-8 産生は有意に抑制された。よって、THP-1 細胞は、NHK との共培養の際に THP-1 細胞上の  $\beta$ 1-integrin を介した刺激により IL-8 産生が促進されることがわかった。

次に、NHK に発現しているセマフォリン 7A の THP-1 細胞刺激における役割について調べた。NHK におけるセマフォリン 7A 発現を抑制するため、NHK にセマフォリン 7A siRNA をリポフェクション法によりトランスフェクトしてからパラホルムアルデヒドで固定した。そして、固定した NHK を THP-1 細胞と共培養した。THP-1 細胞からの IL-8 産生を ELISA で測定した。セマフォリン 7A siRNA でトランスフェクトされた NHK で、セマフォリン 7A 発現が mRNA レベル、蛋白質レベルで抑制されていることを RT-PCR とフローサイトメトリーで確認した。結果、NHK を THP-1 細胞と共培養する前にセマフォリン 7A siRNA で処理すると、negative control siRNA で処理した場合よりも、THP-1 細胞からの IL-8 産生は有意に抑制された。以上から、NHK 細胞表面に発現したセマフォリン 7A が、NHK による THP-1 細胞からの IL-8 産生促進に、重要な役割を果たしていることがわかった。

今回の検討では、まず、フローサイトメトリーと免疫ブロット法によりセマフォリン 7A 蛋白が NHK の細胞表面上に膜型として発現していることを示した。また、NHK に発現しているセマフォリン 7A は、TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ により発現が増加し、IL-4 により発現が減少することがわかった。これらのサイトカインのうち、TGF- $\beta$ 1 は著明に NHK のセマフォリン 7A 発現を促進した。THP-1 細胞をパラホルムアルデヒドで固定された NHK と共培養すると、THP-1 細胞からの IL-8 産生が誘導された。更に、この IL-8 産生誘導は、THP-1 細胞を  $\beta$ 1-integrin 中和抗体で前処理する、または、NHK をセマフォリン 7A siRNA で前処理すると、抑制された。このことは、ケラチノサイトのセマフォリン 7A が、単球上の  $\beta$ 1-integrin を介して単球を活性化することを示唆している。しかしながら、セマフォリン 7A siRNA による IL-8 産生抑制が不完全であった一方、 $\beta$ 1-integrin 中和抗体による抑制はほぼ完全であったことから、ケラチノサイトの細胞表面

上にセマフォリン 7A 以外に THP-1 細胞からの IL-8 産生を誘導する分子が存在するか、あるいはセマフォリン 7A siRNA によるノックダウンが不完全であった可能性が考えられる。

最近、Scott らは、セマフォリン 7A が表皮ケラチノサイトの基底層、基底層の直上、及び真皮内の線維芽細胞の細胞膜に発現していることを報告している。基底層のケラチノサイトに発現しているセマフォリン 7A は、直接的にも間接的にも、表皮のみならず真皮上層に浸潤する免疫細胞と接触し相互作用を与える機会がある。そこでセマフォリン 7A 発現はこれらの浸潤細胞によって分泌されたサイトカインによって影響を受けうる。ケラチノサイトのセマフォリン 7A 発現を亢進させる TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  の発現は、乾癬などの炎症性疾患や創傷治癒過程において亢進する。更に、乾癬では、血清 TGF- $\beta$ 1 値は、組織の TGF- $\beta$ 1 レベルを反映するが、乾癬皮疹の重症度スコアである PASI スコア (Psoriasis Area and Severity Index score) と相関する。乾癬において活性化したケラチノサイトは TGF- $\beta$ 1 を分泌すると報告されており、TGF- $\beta$ 1 はケラチノサイトにオートクラインに働き、セマフォリン 7A の発現を亢進させられる。創傷治癒の過程で、不活性型 TGF- $\beta$ 1 は 脱顆粒した血小板により大量に放出され、蛋白質分解作用及び蛋白質分解を介さない作用両方により活性化される。よって、ケラチノサイトと血小板はこれらの疾患において、TGF- $\beta$ 1 産生のソースとなりうる。加えて、創傷治癒の過程では、再上皮化する前に、血小板やその他の細胞から放出された成長因子に引き寄せられた単球は、真皮だけでなく表皮にも浸潤する。これらの単球は直接表皮のケラチノサイトと接触し相互に作用しあう機会がある。この相互作用により、 $\beta$ 1-integrin を発現している単球が IL-8 を産生し、その結果、好中球の皮膚への浸潤が亢進していると考えられる。実際、乾癬の皮膚組織では好中球の浸潤が多くみられ、IL-8 が好中球遊走に重要とされており、単球の活性化と好中球の稠密な浸潤は創傷治癒でも認められている。

今回の実験結果により、NHK に発現しているセマフォリン 7A と単球上の  $\beta$ 1-integrin は、ケラチノサイトによる単球の活性化に関与していることが示された。皮膚に浸潤する単球によって引き起こされる皮膚の炎症において、ケラチノサイトのセマフォリン 7A が臨床的に重要であることを、示唆していると考えられる。