

審査の結果の要旨

氏名 鎌田 昌洋

本研究は、従来神経ガイダンス因子として知られてきたが最近免疫応答において重要な役割を演じていると考えられるセマフォリン分子の皮膚における機能と役割を明らかにするため、正常ヒト表皮角化細胞 (Normal huma epidermal keratinocytes; NHK) とヒト単球細胞株 (THP-1細胞) を用いて、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機能と役割について解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 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。
2. 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)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , transforming growth factor (TGF)- β 1, interleukin (IL)-4, IL-1 β , 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- γ , TNF- α 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- β 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-1 β 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。
3. 免疫応答でのセマフォリン 7A の主要な受容体は β 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 β 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- β 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- β 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- β 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- β 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。

4. セマフォリン 7A と β 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。 β 1-integrin 中和抗体または isotype 抗体で前処理した THP-1 細胞を、TGF- β 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 β 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 β 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。
5. 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。

以上、本論文により、NHK に発現しているセマフォリン 7A と単球上の β 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。本研究はこれまで知られていなかった、ケラチノサイトにおけるセマフォリン 7A の免疫学的機能と役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。