

Sema6D の免疫代謝制御による炎症疾患の病態解析

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター・免疫機能統御学
姜 秀辰

概要

慢性炎症の病態形成におけるマクロファージなどの免疫細胞の機能に注目が集まっている。近年、mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路を介した細胞内代謝のダイナミックシフトがマクロファージをはじめとする免疫細胞分化に重要な役割を担うことが明らかとなり、免疫代謝 “immunometabolism” として注目されている。この「慢性炎症と免疫代謝のクロストーク」の解明には両者をつなぐ分子機構を明らかにする必要がある。セマフォリンは神経軸索伸長のガイダンス因子として見出された分子群であるが、セマフォリンは多発性硬化症、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、がん、網膜色素変性症を含む様々な疾患の病態形成に関わることが分かってきており、セマフォリンは「疾患の鍵分子」としても近年大きな注目を集めている。近年 mTOR pathway とセマフォリンの関連が報告され、免疫代謝においてもセマフォリンが重要な役割を担う可能性が予想される。本研究ではセマフォリンによるマクロファージ代謝制御機構の探索および慢性炎症病態形成への関与性を検討することを主目的とした。

研究成果

1. mTOR 活性依存的に発現する Sema6D は抑制性マクロファージ分化に必須である

mTOR の活性化による抑制性マクロファージへの分化制御機構を明らかにするため、mTOR 阻害剤である Torin1 存在下に抑制性マクロファージの分化を誘導し、DNA マイクロアレイ法を用いて遺伝子発現解析を行った。その結果、mTOR 活性阻害により Sema6D の発現が低下することが明らかとなり、Sema6D の発現は mTOR シグナルによって制御されることが示された。次に、マクロファージ分化制御における Sema6D の機能を明らかにするため、Sema6D 欠損マウスを用いてマクロファージの分化能を評価した。野生型マクロファージに比べて Sema6D 欠損マクロファージでは IL-4 刺激に対する M2 型マクロファージマーカーの発現が顕著に減弱していた。一方で、LPS や IFN- γ に対して Sema6D 欠損マクロファージでは IL-6, TNF など炎症性サイトカインの産生が亢進しており、過剰な M1 型応答を示した。これらの結果から、*in vitro* において Sema6D は抑制性マクロファージへの分化に必要であることが明らかとなった。さらに、Sema6D による抑制性マクロファージ分化制御を *in vivo* においても検討するため、キチン腹腔内投与による抑制性マクロファージ誘導を行った。キチン腹腔内投与は IL-4 産生細胞を腹腔内へ誘導し、抑制性マクロファージの分化を促進するが、野生型マウスと比較して Sema6D 欠損マウスでは M2 型マクロファージマーカーの発現が顕著に低下していた。また、LPS 腹腔内投与によるエンドトキシンショックモデルで Sema6D 欠損マウスでは野生型よりも血清中の炎症性サイトカイン濃度が高値であり、致死率も高いことが確認された。以上の結果から、*in vitro* のみならず *in vivo* においても、mTOR 活性依存的に発現される Sema6D が抑制性マクロファージの機能獲得に重要であると明らかになった。

2. Sema6D シグナルは PPAR γ を介しマクロファージの脂質代謝を制御する

抑制性マクロファージ分化における Sema6D シグナルの分子機構を明らかにするため、野生型および

Sema6D欠損マクロファージの遺伝子発現の差異をRNA-Sequencing法により解析した。その結果, Sema6D欠損マクロファージでは *Pparg* 遺伝子及び PPAR γ シグナルに関連する遺伝子の発現減少を認めた。実際に抑制性マクロファージ分化条件下において, Sema6D欠損マクロファージでは PPAR γ の発現が顕著に低下していた。さらに, Sema6D欠損マクロファージに *Pparg* 遺伝子を導入すると抑制性マクロファージ関連遺伝子の発現が上昇した。一方で, PPAR γ 活性阻害剤存在下において Sema6D欠損マクロファージに *Sema6d* 遺伝子を導入しても抑制性マクロファージマーカー遺伝子の発現は回復できなかった。以上より, PPAR γ は免疫抑制機能の獲得における Sema6D の主要な下流分子であることが明らかになった。

PPAR γ は主に脂肪細胞分化に関与し, 脂質代謝の鍵分子として知られている。免疫系においては特に単球やマクロファージに発現し, 抗炎症作用を発揮することが報告されている。上述の通り Sema6Dシグナルが PPAR γ の発現を制御することから, 抑制性マクロファージ分化において Sema6D が脂質代謝を制御する可能性を検討した。まず, 脂質代謝関連遺伝子である CD36 及び FABP4 の発現を調べたところ, Sema6D欠損マクロファージではこれらの遺伝子の発現が顕著に減少していた。次に, 細胞内への脂質取り込み能を評価したところ, Sema6D欠損抑制性マクロファージでは LDL の取り込み能が低下していた。さらに, 細胞外フラックスアナライザーを用い脂肪酸 β 酸化を評価した結果, Sema6D欠損抑制性マクロファージにおいて β 酸化の低下を認めた。以上の結果より, Sema6Dシグナルは PPAR γ を介して細胞内への脂質取り込み及び脂質代謝を制御し, 抑制性マクロファージ分化に寄与することが明らかになった。

3. Sema6D 逆行性シグナルは c-Abl を介して抑制性マクロファージ分化を制御する

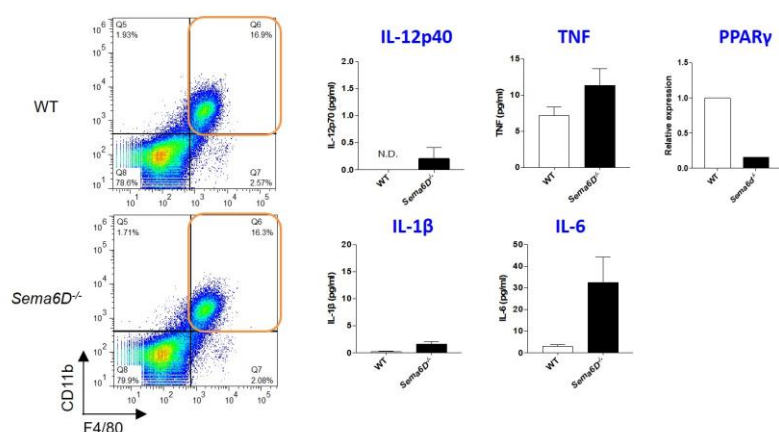
セマフォリン分子群は通常リガンドとして機能しその受容体であるプレキシンやニューロピリンとの結合を介して様々な機能を発揮する。クラス IV セマフォリン分子群はセマフォリン分子の中で最も長い細胞内領域を持つユニークな分子である。ニワトリ胎児を用いた心臓の形態形成において Plexin-A1 をリガンドとした Sema6D 逆行性シグナルの重要性が報告されている。一方で, 免疫系における Sema6D 逆行性シグナルの機能については未だ不明である。そこで, Sema6D 逆行性シグナルの抑制性マクロファージ分化への関与を検討するため, Sema6D 細胞内シグナル伝達に必須であるチロシンキナーゼとの結合を阻害する Sema6D 変異体を Sema6D 欠損マクロファージに発現させたが, この変異体は抑制性マクロファージ分化マーカーの発現を回復できなかった。つまり, 抑制性マクロファージ分化には Sema6D 逆行性シグナルの活性が必須であることが明らかとなった。次に, Sema6D のリガンド探索を行った。Plexin-A4 存在下において野生型抑制性マクロファージでは *Pparg* の発現が上昇するのに対し, Sema6D 欠損マクロファージでは変化を認めなかった。さらに, c-Abl 阻害剤及び siRNA を用いた *Abl1* ノックダウンにより抑制性マクロファージへの分化が抑制されたことから, 抑制性マクロファージ分化には c-Abl 活性が重要な役割を果たすことが明らかになった。これらの結果から, Plexin-A4 をリガンドとする Sema6D 逆行性シグナルは c-Abl を介して免疫抑制活性を持つことがわかった。

4. 高脂肪食負荷 Sema6D 欠損マウスは骨髓造血異常により全身性炎症を誘導する

全身性炎症応答における Sema6D の機能を明らかにするため, 高脂肪食負荷による肥満モデルを行った。その結果, Sema6D 欠損マウスは野生型マウスより体重の増加及び内臓脂肪の蓄積が著しく減少した。

骨髓由来の単球マクロファ

図. Sema6D欠損脂肪組織マクロファージの炎症応答



ージは、血管形成性造血幹/前駆細胞と協力して損傷組織の治癒を促進する。しかし、肥満は造血を調節不全にし、骨髄由来の組織修復反応を弱める。肥満などの慢性炎症進行には骨髄における骨髄造血反応が促進される。本研究では、脂肪組織における炎症性マクロファージの蓄積が、炎症性骨髄造血により増加することを実証した。興味深いことに、Sema6D欠損マウスの骨髄造血異常には好中球の前駆細胞の増加がみられた。さらに、高脂肪食負荷したSema6D欠損マウスの脂肪組織常在マクロファージを単離し、LPSなどにより炎症応答を検討した。その結果、Sema6D欠損脂肪組織マクロファージは野生型より炎症性サイトカインの産生が増加し、抗炎症性因子の発現が有意に減少した（図）。これらのデータの潜在的な予防的および治療的意味は、神経シグナルによる慢性炎症の病態、マクロファージ分極、および造血幹細胞の動員/保持の観点である。