

セマフォリン3Aトランスジェニックマウスにおける毛組織や皮膚の免疫環境でのセマフォリン3Aの役割の解明と皮膚炎症に対する新規治療軸の開発

浜松医科大学皮膚科学講座

伊藤 泰介

Semaphorin 3A (Sema3A) is originally found the nerve guidance molecule. Sema3A can induce growth cone collapse and axon repulsion through interaction with a neuropilin-1/plexin-A receptor complex. In AD patients, Sema3A expression is decreased in epidermis that allows higher skin innervation. In addition to the role of nerve guidance, recent studies indicate sema3A as the immunomodulator in several immune reactions.

In this study, we found the novel role of sema3A in trichoimmunology via mast cell stimulation. We established B6-Tg(pK14-Sema3a)/UOEH mouse that express excess Sema3A in epidermis under K14 promotor. Interestingly, this mouse show hair loss lesion mainly on back skin. Histological analysis revealed a large number of mast cells in dermis and around hair follicles of hair loss lesions compared to healthy control and non hair loss lesion. Non hair loss lesion also shows significant infiltration of mast cells in dermis and around hair follicles compared to healthy control. On the other hand, MCP-1+ basophils are rarely found in dermis and around hair follicles. Next, we generate murine bone-marrow (BM) derived mast cells. The presence of Neuropilin-1/Plexin A1 expression was analyzed on FACScan. Furthermore, histamine releasing was studied in BM derived mast cells cultured with sema3A or PBS by ELISA. Sema3A was injected into the back skin after the induction of depilation induced murine hair cycle in order to know the affect of sema3A on murine hair cycle. In wild type C57BL/6 mice, sema3A is strongly expressed on Day8 in the depilation murine hair cycle that indicates the catagen induction by sema3A. In conclusion, sema3A may induce increasing and activation of mast cells with releasing of histamine that result in alopecic lesions in B6-Tg(pK14-Sema3a)/UOEH mouse. This study shows unique face of sema3A in trichoimmunology and skin immune systems, especially to mast cell.

1. 緒言

セマフォリンはもともと中枢神経の発達に関わる神経のアクソンのガイドをする因子として報告されてきた¹⁾。それだけでなく、細胞走化性、細胞増殖やアポトーシス、心臓や腎組織、眼組織の形態形成に関与することが報告されている。セマフォリン分子群は、膜型と分泌型があり、各群で共通の構造である細胞外領域のSemaドメインがあり、それに続くC末端領域の構造上の特徴によって8つのサブクラスに分類されている。I、II型セマフォリンは無脊椎動物に、VIII型はウイルスにコードされ、ほ乳類はIIIからVII型のセマフォリンが同定されている。分泌型はII型、III型、VIII型セマフォリンであり、それ以外は1回膜貫通型蛋白である。

セマフォリンの主な受容体は、plexinファミリーとNeuropilin (Nrp) ファミリーが知られている。plexinファミリーは、plexin-AからDまでの4つのサブクラスに分かれ、細胞外にセマドメインを有している。セマフォリンの多くはSemaドメインを介してplexinと結合するが、III型セマフォリンの多くはNrp/plexin受容体複合体を介し

てシグナルを伝達する。しかしセマフォリンと受容体の結合は複雑であり、様々な結合が考えられている。plexinが細胞や組織によって様々な結合し、受容体と受容体複合体を形成することで心臓の発生過程における心臓形成、弁形成に関与している²⁾。また骨代謝において破骨細胞の分化に関与する³⁾。

アトピー性皮膚炎では、Sema3Aの発現量が、健常人と比較して表皮内において低下しており、その結果、表皮内に末梢神経が延長しているため、神経密度が健常人と比較して有意に高いとされる⁴⁾。そのため、かゆみ過敏や搔爬によるサブスタンスPなどの神経伝達物質の分泌がされやすい。よってSema3Aはアトピー性皮膚炎の新たな治療薬の候補として考えられている。

しかしながら、Sema3Aの皮膚における詳細な働きは未だ不明な点が多い。よって我々は、Sema3Aを過剰発現しているB6-Tg (pK14-Sema3a) /UOEHを用いて皮膚の毛髪免疫に対するSema3Aの影響を検討することとした。

2. 実験

2.1 マウス：Sema3A過剰発現マウスB6-Tg (pK14-Sema3a) /UOEHの樹立

K14 promoterとmouse Sema3A cDNAを含むtrancegeneをC58BL/6マウスのFIの受精卵の前核に注射した。

2.2 皮膚組織

B6-Tg (pK14-Sema3a) /UOEHの背部皮膚病変より皮



Analysis of the role of Semaphorin 3A in the skin and hair follicle immune systems of Sema3A transgenic mouse and exploration of novel treatments with Semaphorin 3A

Taisuke Ito

Department of Dermatology, Hamamatsu University School of Medicine

皮膚組織を採取し、HE 染色、免疫染色に供出した。

2.3 IL-3、SCF 産生量

mRNA レベルでの産生量を Realtime PCR 法にて検討した。

2.4 フローサイトメトリー

肥満細胞における Neurotrophin 1 発現をフローサイトメトリーにて検討した。

2.5 マウス毛周期誘導

C57BL/6 週齢マウスを外科用アロンアルファにて強制抜毛することで毛周期を誘導した。

2.6 ギムザ染色

肥満細胞を検討するため、ギムザ染色、MCP-3 染色を行い、浸潤する肥満細胞数、好塩基球数を検討した。また好塩基球の浸潤を MCP-3 染色にて検討した。

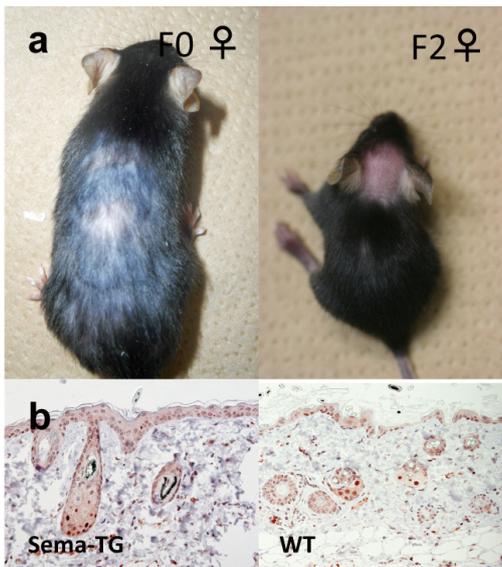


図1 a. TG マウスの背部に観察される脱毛症状、
b. Sema3A 発現

3. 結果

3.1 B6-Tg (pK14-Sema3a) /UOEH における皮膚症状

背部や後頸部に脱毛斑を観察した (図1a)。また同部位における Sema3A 発現は減弱していた (図1b)。

3.2 肥満細胞浸潤の検討

脱毛病変部の組織検討では毛組織は萎縮し、その周囲に肥満細胞浸潤を観察した。ギムザ染色にて脱顆粒や大型の肥満細胞を観察した (図2)。

3.3 IL-3、SCF 発現の検討

Wild type の C57BL/6 マウスと比較して B6-Tg (pK14-Sema3a) /UOEH では有意に発現が亢進していた (図3)。

3.4 表皮細胞における Nrp1 発現の検討

フローサイトメトリーによって肥満細胞は Nrp1 発現をみた。よって Sema3A のリガンドである Nrp1 は肥満細胞上に発現していることから、Sema3A が肥満細胞に何等かの影響を与えていることが示唆された (図4)。

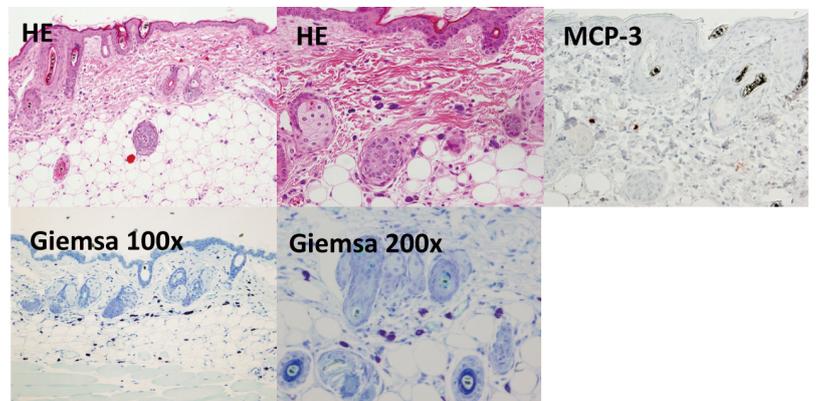


図2 脱毛病変部への肥満細胞の浸潤

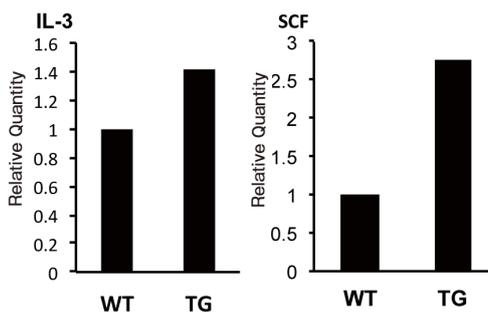


図3 Realtime PCR 法

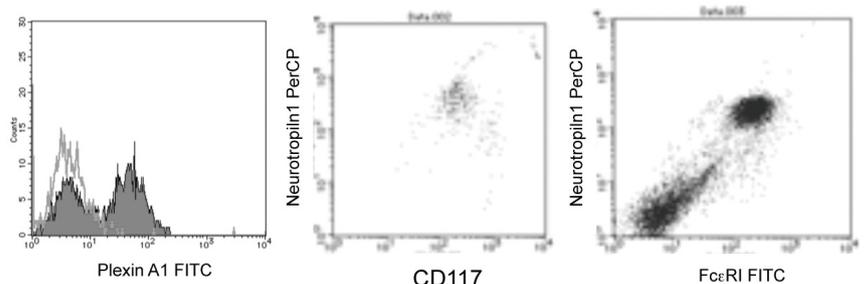


図4 Neurotrophin 1 expression on normal murine keratinocytes and mast cells

3.5 マウス毛周期におけるSema3A発現の検討

健常C57BL/6マウスにおけるSema3A発現の組織における検討では、成長期においてその発現が減弱していた。一方、休止期ではその発現が亢進していた(図5)。

3.6 毛周期における肥満細胞の変化とSema3Aの影響

強制抜毛による毛周期において、肥満細胞は成長期ではその浸潤数が減弱するが(図6a)、そこにSema3Aを投与するとその減弱が阻止された(図6b)。

3.7 肥満細胞のSema3Aによる増殖誘導

マウス骨髄由来の肥満細胞に対してSema3Aを投与すると、その増殖数は有意に上昇した(図7)。

4. 考察

我々の実験から、Sema3Aが過剰発現することによって毛周期が乱れることが示唆された。その原因として肥満細胞の増殖による影響が考えられた。

つまり、Sema3Aが過剰発現することによって、Nrp1発現をしている肥満細胞に影響を与え増殖することがわかった。その理由として、直接的な増殖誘導とともに、表皮細胞からのStem cell factorなど肥満細胞増殖因子が影響を与えていると考えられた。

実際、強制誘導した毛周期においても成長期にはSema3A発現が減弱していることから想定される。またSema3Aを投与することによっても肥満細胞の成長期

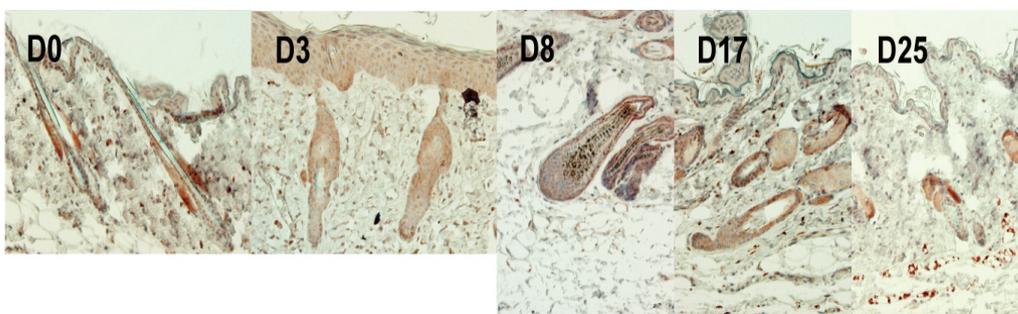


図5 Immunohistochemical staining revealed that sema3A immunoreactivity was reduced in hair matrix at D3 and D8

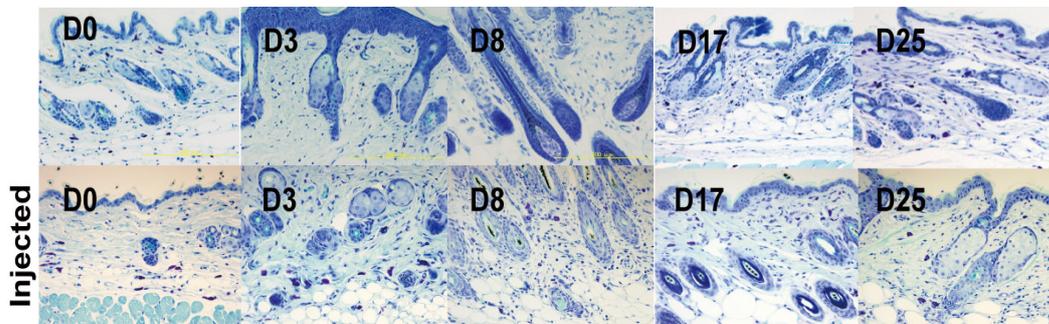


図6a

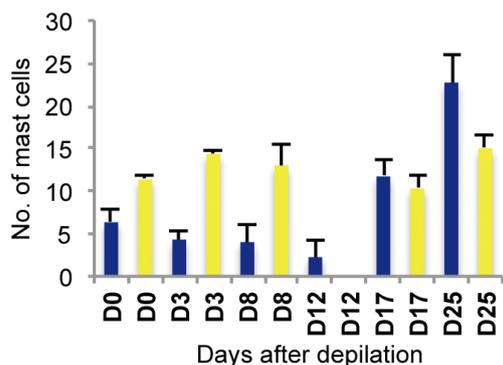


図6b 抜毛による毛周期と肥満細胞数の変化 (黄色バー: Sema3A投与群)

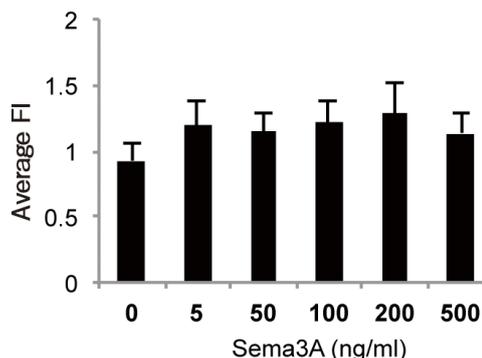


図7 Sema3Aによる肥満細胞の増殖効果

における減数が阻止されることも合わせてそれを示唆している。

以上から、皮膚疾患においてはアトピー性皮膚炎のみならず、脱毛症においても Sema3A が深く関与していることが大いに示唆された。

ヒトにおいては、アトピー性皮膚炎と円形脱毛症の合併が知られているが、Sema3A 発現が表皮において減弱しているアトピー性皮膚炎との整合性が問われる所であるが、表皮のみに限って減弱しているとすれば、真皮での Sema3A の動態は異なるものと理解される。

(文 献)

1) Luo Y, Raible D, Raper JA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of

neuronal growth cones. *Cell* 1993; 75: 217-227.

2) Toyofuku T, Zhang H, Kumanogoh A, et al. Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev.* 2004; 18: 435-447.

3) Takegahara N, Takamatsu H, Toyofuku T, et al. Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 615-622.

4) Tominaga M, Ogawa H, Takamori K. Decreased production of semaphorin 3A in the lesional skin of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2008; 158: 842-844.