

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11359

研究課題名(和文)SEMA4D-TSLP相互作用に着目した好酸球性副鼻腔炎病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis Pathophysiology Focusing on SEMA4D-TSLP Interaction

研究代表者

前田 陽平 (Maeda, Yohei)

大阪大学・医学系研究科・招聘教員

研究者番号：00636483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球上に発現しているSEMA4Dが、好酸球の活性化に伴って細胞から遊離し、血管の内皮細胞や鼻腔の上皮細胞に働きかけ、血管や上皮の結合を緩めて好酸球を通り抜けやすくすることが、アレルギー反応を悪化させ、鼻ポリープの形成に関与していることを解明した。更に、SEMA4Dは、サイトカインを上皮から分泌させることも分かった。

実際の患者においても、SEMA4Dの血中濃度は好酸球性副鼻腔炎の重症度と相関しており、SEMA4D濃度が高い患者はこの病気が重症かつ難治性であることが分かった。SEMA4Dを中和する抗体を用いると、動物モデルにおいて好酸球性副鼻腔炎が著明に軽快することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好酸球上に発現しているSEMA4Dが、好酸球の活性化に伴って細胞から遊離し、血管の内皮細胞や鼻腔の上皮細胞に働きかけ、血管や上皮の結合を緩めて好酸球を通り抜けやすくすることが、アレルギー反応を悪化させ、鼻ポリープの形成に関与していることを解明したSEMA4Dを中和する抗体を用いると、動物モデルにおいて好酸球性副鼻腔炎が著明に軽快することを見出したことから、今後の診断や治療に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that SEMA4D, which is expressed on eosinophils, is released from cells upon eosinophil activation and acts on endothelial cells of blood vessels and epithelial cells of the nasal cavity, loosening the bonds of blood vessels and epithelium to facilitate passage of eosinophils, which exacerbates allergic reactions and is involved in nasal polyp formation. Furthermore, SEMA4D was found to cause cytokines to be secreted from the epithelium. In patients, blood levels of SEMA4D correlated with the severity of eosinophilic sinusitis, and patients with higher levels of SEMA4D had more severe and refractory forms of the disease. Eosinophilic sinusitis was significantly relieved in animal models.

研究分野：アレルギー

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 セマフォリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)好酸球性副鼻腔炎

好酸球性副鼻腔炎(以下 ECRS)は従来型の感染遷延型の副鼻腔炎と異なり、成人発症で嗅覚障害、鼻茸(polyp)のための鼻閉と粘稠な鼻汁を示す難治性副鼻腔炎である。厚生労働省による難病指定を受けている。鼻粘膜・鼻茸に多数の好酸球を認める特徴を有し、特に成人発症型喘息との関連が示唆されている。経過中にやはり難治性の好酸球性中耳炎を続発し聾に至る場合もあり、QOL を著しく損なう疾患である。抗菌薬は無効であり、ステロイドの内服にのみ反応するが、全身性ステロイド投与が長期にわたる場合も多く、病態の解明・治療法の開発が喫緊の課題として求められている。好酸球性副鼻腔炎の免疫学的メカニズムとしては、IgE の関与や Th1/Th2 のバランスにおける Th2 優位などが指摘されているが、炎症局所での著明な好酸球浸潤が認められることなどから、「好酸球性副鼻腔炎」の名称が示すように、病態の形成上好酸球の増多及び活性化も重要な役割を果たしていると考えられるようになってきた。(Fulkerson PC et al, Nat Rev Drug Discov. 2013 Feb) また、サイトカインの関与のトピックスとしては外的刺激(Alermin)により上皮から分泌される TSLP,IL-33 などの上皮由来サイトカインが注目を集めている。(Moore WC et al, J Allergy Clin Immunol. 2007)

(2)免疫セマフォリン・セマフォリン 4 D (SEMA4D)

セマフォリン(semaphorin)ファミリーは1990年代に発生過程における神経軸索の方向を決定する神経ガイダンス因子として同定された。現在は30種類以上の分子が同定され、class I~の7つのサブクラスに分類される分子群である。近年、免疫学領域においても重要な作用を有することが示されてきた。

免疫の分野におけるセマフォリンは「免疫セマフォリン」と呼ばれ、T細胞やB細胞の活性化といった獲得免疫からマクロファージや樹状細胞の機能調節といった自然免疫に至るまで様々な免疫学的機能を有することが明らかにされてきた。(Kumanogoh & Kikutani, Nat Rev Immunol. 2013) 今回の研究対象である Class セマフォリンの SEMA4D は CD100 としても知られ、セマフォリンファミリーの中で免疫系において発現することが初めて報告されたセマフォリンである。膜型セマフォリンである SEMA4D は免疫系では T 細胞に高発現しており、リンパ球の活性化に伴い膜表面で切断(shedding)を受けて可溶性としても存在する。一方、SEMA4D と好酸球の関連については過去に報告されていなかった。

2. 研究の目的

SEMA4D が TSLP により shedding を受けており、これにより血清中で高値となることを示す。SEMA4D の上皮における受容体を明らかにする。好酸球上の SEMA4D の役割を、in vitro/in vivo、human の 3 側面で明らかにする。

3. 研究の方法

(1)TSLP による SEMA4D shedding を証明

先に記した通り、in vitro で好酸球を濃度別の TSLP で刺激すると、好酸球上の SEMA4D の発現が濃度依存的に低下した。その上清で SEMA4D を同定することで SEMA4D が TSLP で shedding されることを証明する。同定の方法としては第一に ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent assay) 法を考えているが、これで同定可能な濃度に至らない場合は WB (Western Blot) 法で同定する。

(2)気道上皮における SEMA4D レセプターの同定

気道上皮の細胞株、具体的にはヒト鼻腔上皮細胞: Human Nasal Epithelial Cells (HNEpC) およびヒト気管上皮細胞 BEAS-2B の 2 系統の細胞株において、SEMA4D の受容体について検討する。SEMA4D の受容体としては CD72、Plexin-B1、Plexin-B2 が知られている。まずはこれらについて RT-PCR および WB、FCS において発現を確認する。発現があったものについて siRNA を用いて遺伝子ノックダウンを行い、リコンビナント SEMA4D (rSEMA4D) を作用させたときの発現を FCS で評価することで SEMA4D の機能的受容体となっているか評価する。なお、これらがいずれも機能的受容体ではなかった場合は、他のセマフォリンの受容体、すなわち Neuropilin-1 や他の Plexin ファミリー分子などについて同様の検討を行う。

(3)SEMA4D 欠損マウスにおける ECRS モデルの評価

SEMA4D 欠損マウス及び対照となる野生型マウスを用いて、好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) モデルを作成する。このモデルマウスは、アスペルギルスエキスを感作を行った後、同エキスを経鼻的に投与することによって作成する (Lindsay et al. Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2006)。このモデルマウスでは、副鼻腔粘膜に杯細胞の過形成・好酸球・マスト細胞の浸潤が認められ、ヒトの ECRS と類似した病理変化を来す。これを野生型および SEMA4D 欠損マウスで作成し、鼻腔病理・血中サイトカイン・鼻腔洗浄液サイトカインについて ELISA もしくは Bio-Plex

にて比較することで ECRS に関する SEMA4D の役割を明らかにする。次に、(2)で同定した受容体の欠損マウスにおいて ECRS モデルを作成し、野生型と比較する。さらに rSEMA4D および受容体の agonist/antagonist の投与による治療実験も行う。

4 . 研究成果

好酸球上に発現しているセマフォリン 4D (SEMA4D) が、好酸球の活性化に伴って細胞から遊離し、血管の内皮細胞や鼻腔の上皮細胞に働きかけ、血管や上皮の結合を緩めて好酸球を通り抜けやすくすることが、アレルギー反応を悪化させ、鼻ポリープの形成に関与していることを解明した。更に、SEMA4D は、炎症を引き起こすさまざまな分子 (サイトカイン) を上皮から分泌させることも分かった。

実際の患者においても、SEMA4D の血中濃度は好酸球性副鼻腔炎の重症度と相関しており、SEMA4D 濃度が高い患者はこの病気が重症かつ難治性であることが分かった。更に、SEMA4D を中和する抗体を用いると、動物モデルにおいて好酸球性副鼻腔炎が著明に軽快することを見出したことから、今後の診断や治療に役立つことが大いに期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 T Tsuda, M Nishide, Y Maeda, et al.	4. 巻 145(3)
2. 論文標題 Pathological and Therapeutic Implications of Eosinophil-Derived Semaphorin 4D in Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol .	6. 最初と最後の頁 843-854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2019.12.893.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 T Tsuda, M Nishide, Y Maeda, et al.	4. 巻 145(3)
2. 論文標題 Pathological and Therapeutic Implications of Eosinophil-Derived Semaphorin 4D in Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol .	6. 最初と最後の頁 843-854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2019.12.893	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 津田武、前田陽平、武田和也、赤澤仁司、小幡翔、中谷彩香、猪原秀典
2. 発表標題 好酸球性副鼻腔炎におけるSEMA4Dの機能解析(第2報)
3. 学会等名 第58回日本鼻科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田陽平、津田武、端山昌樹、赤澤仁司、武田和也、猪原秀典
2. 発表標題 SEMA4Aと気管支喘息・好酸球性副鼻腔炎
3. 学会等名 耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 前田陽平、津田武、端山昌樹、武田和也、識名崇、猪原秀典
2. 発表標題 SEMA4Aの上皮に対する作用および受容体の検討
3. 学会等名 第36回耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	端山 昌樹 (Hayama Masaki) (70756048)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------