

令和 3 年 4 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17902

研究課題名（和文）関節リウマチの病態形成におけるSemaphorin3Gの役割の解明

研究課題名（英文）:The roles of Semaphorin3G in the pathogenesis of rheumatoid arthritis

研究代表者

田中 繁 (Tanaka, Shigeru)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30822051

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は関節リウマチ病態に関連する新規分子を解析し、新たな治療ターゲットを創出することを目的とした。申請者の予備実験から関節リウマチの病態悪化にセマフォリン3Gが関与している可能性が示唆されたため、同分子に着目し研究を行った。セマフォリン3Gは関節リウマチ患者および関節炎を発症したマウスの滑膜に強く発現していた。セマフォリン3Gが作用する細胞は主にマクロファージと思われた。セマフォリン3Gを遺伝的に欠損するマウスは実験的関節炎モデルに抵抗性であった。以上からセマフォリン3Gが関節リウマチの新規治療ターゲットとなりうると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチは慢性破壊性の関節炎であり、日本では約70万人の患者が存在する。疾患のコントロールが不良の場合、関節が破壊されることでその機能が制限され、生活の質や労働生産性が著しく低下する重大な疾患である。

現在の関節リウマチ治療は炎症を抑え、「寛解（＝症状がほとんどない状態）」を目標とするが「根治（＝薬を必要としない状態）」には至らない。今までの治療法とは異なる戦略を構築するを目標とする本研究により、次世代の「根治」を目指す次世代のリウマチ治療を提案する基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This project aimed to find novel therapeutic targets for rheumatoid arthritis patients. We previously performed unbiased gene-expression analyses of helper T cells from rheumatoid arthritis patients and found Semaphorin3G is a molecule which might be related to the pathogenesis of rheumatoid arthritis.

Semaphorin3G was expressed in the synovium of rheumatoid arthritis patients and arthritic mouse joint. The receptor for Semaphorin3G was expressed on macrophages. Mice lacking Semaphorin3G were resistant to murine arthritis model. Together, it is plausible that Semaphorin3G is a novel therapeutic target of rheumatoid arthritis patients.

研究分野：リウマチ学

キーワード：関節リウマチ セマフォリン マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (以下 RA) は破壊性の炎症性関節炎である。RA の罹患率は 0.5%程度とされ、日本には約 70 万人の患者がいると推計されている。RA は関節炎症が持続すると骨や軟骨が破壊されることによって関節の機能が低下し、患者の生活の質や労働生産性が著しく障害される。現在、メトトレキサートをアンカードラッグとし、生物学的製剤や JAK 阻害薬を併用することで、従来に比べると寛解に至る患者が増えてきている。一方で、依然として症状の改善が得られない患者が相当数存在すること、薬剤の中止により容易に症状が再燃することなどから、既存の治療とは異なる分子標的が求められている。

我々は未治療 RA 患者 28 例から末梢血 CD4 陽性 T 細胞を分取し、メトトレキサート治療前後で発現が有意に変動する遺伝子を複数同定した。今回、その中の一つである Semaphorin3G(以下 Sema3G)に注目した。Sema3G は分泌型の Semaphorin であり、主に神経発達やリンパ脈管の形成に重要な役割を果たしているとされる。近年、Semaphorin 分子が免疫系に重要な役割を果たしていることが報告されているが¹⁾、Sema3G の免疫系における機能や RA 病態における役割に関する知見は乏しい。

2. 研究の目的

本研究は RA の病態形成における Sema3G の関与をマウス関節炎モデルと RA 患者滑膜組織を用いて解析し、Sema3G の免疫系における働きを明らかにすることを通して、Sema3G を標的とした RA に対する新規治療戦略の基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 関節炎組織における Sema3G の発現の解析

- ①RA および変形性関節症(OA)患者の滑膜における Sema3G の発現を解析する。
- ②コラーゲン誘導性関節炎(以下 CIA)を惹起したマウスの関節における Sema3G の発現を解析する。

(2) 関節炎組織における Sema3G 受容体である Neuropilin-2(以下 Nrp2)の発現の解析

- ①CIA を惹起したマウスの関節における Nrp2 発現細胞を解析する。
- ②ヒト滑膜組織における Nrp2 発現細胞を解析する。

(3) マウス関節炎モデルにおける Sema3G の役割の解析

- ①Sema3G 欠損マウスおよび同腹コントロールマウスに CIA を惹起し、関節炎の重症度を評価する。
- ②Sema3G 欠損マウスおよび同腹コントロールマウスに抗コラーゲン誘導性関節炎(以下 CAIA)を惹起し、関節炎の重症度を評価する。

(4) Sema3G 刺激による免疫応答細胞の機能変化の解析

- ①関節において Nrp2 を発現する免疫担当細胞を Sema3G の存在下で培養し、遺伝子発現の変化を解析する。

4. 研究成果

(1) Sema3G は関節炎局所に強く発現する

関節炎の局所における Sema3G の発現を検討するため、関節置換術を施行された RA および OA 患者から滑膜組織の提供を受け、滑膜における Sema3G の発現を免疫化学染色法(以下 IHC)を用いて評価した。OA 患者の滑膜組織においては単層の滑膜細胞に Sema3G が比較的弱く発現していた。一方、RA 患者の滑膜組織では重層化した滑膜細胞および、滑膜に浸潤する小型の免疫細胞にも Sema3G が強く発現していた(図 1 Sema3G 陽性の範囲を計測し、グラフで示す)。

CIA を惹起したマウスの関節についても同様に Sema3G の発現を IHC を用いて解析した。関節炎を惹起していないマウスの関節にはほとんど滑膜組織は観察されず、Sema3G を発現する細胞も存在しなかった。CIA を惹起したマウスの関節では滑膜が高度に増生し、滑膜細胞と思われる細胞に Sema3G が強く発現していた。以上より、ヒトおよびマウスでは関節炎の局所で Sema3G が強く発現することが示された。

(2) 関節炎局所ではマクロファージが Nrp2 を発現する

次に、関節炎の局所で Sema3G の受容体である Nrp2 を発現する細胞を解析した。CIA を惹起したマウスの足部を酵素的に分散し、得られた細胞を抗 Nrp2 抗体で染色の後、フローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、Nrp2 を発現する細胞の多くは CD11b 陽性 F4/80 陽性のマクロファージであることが示唆された(図2 各免疫細胞分画における Nrp2 陽性細胞の割合をグラフに示す)。特に活性化マーカーを強く発現するマクロファージに Nrp2 の発現が観察された。また、すでに報告されている RA の滑膜組織を用いたシングルセル RNA-seq のデータ²⁾を再解析したところ、ヒトにおいても関節組織では CD14 陽性の単球/マクロファージ分画に相当する細胞が Nrp2 を発現していた(図3 紫色が Nrp2 陽性細胞を示す)。CD14 陽性細胞以外では線維芽細胞が比較的高い Nrp2 発現を有していた。以上より関節炎病態において Sema3G は主にマクロファージに作用していることが示唆された。

図 1

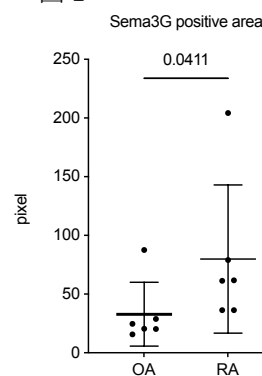


図 2

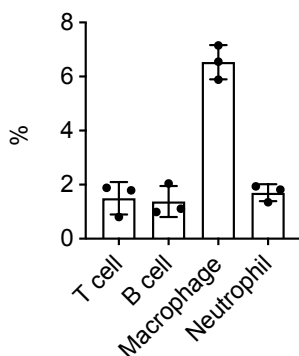
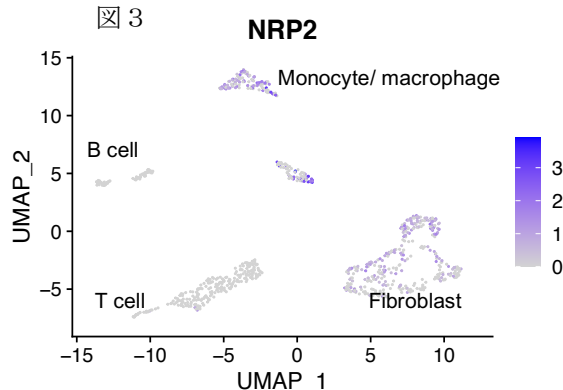


図 3



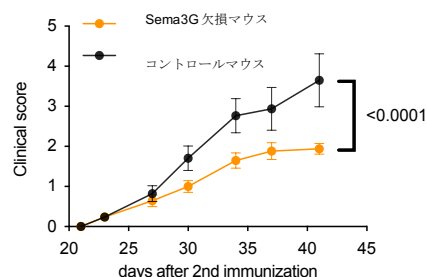
(3) Sema3G 欠損マウスは実験的関節炎に抵抗性である

関節炎病態における Sema3G の役割を検討するため、Sema3G 欠損マウスおよび同腹のコントロールマウスに CIA を惹起し、関節炎の重症度をスコア化した。興味深いことに Sema3G 欠損マウスはコントロールマウスに比べて、有意に関節炎スコアが軽症化した(図4 2回目の免疫後の重症度スコアをグラフに示す)。病理学的にも、Sema3G 欠損マウスにおいては滑膜の炎症や骨破壊が強く見られた。

次に、獲得免疫系の関与が少ない CAIA を用いて、同様の解析を行ったところ、やはり Sema3G 欠損マウスでは関節炎が軽症化する傾向を見出した。

以上の結果から、Sema3G は関節炎を重症化させる機能があり、獲得免疫系はこれに関与していない可能性が示唆された。

図 4



(4) Sema3G はマクロファージを活性化する

最後に Sema3G の存在下でマクロファージを培養し、遺伝子発現の変化を検討した。

まず、野生型マウスの骨髄細胞を採取し、定法に従って Bone marrow derived macrophage (以下 BMM) を作成した。BMM は定常状態では Nrp2 をほとんど発現しなかったが、IFN γ や LPS の刺激により Nrp2 の発現レベルが有意に上昇した。

次に、LPS で刺激し、Nrp2 が発現した BMM をリコンビナント Sema3G の存在・非存在下で培養し、細胞を RNA シーケンス解析に供した。いくつかの遺伝子の発現が有意に変化しており、特に細胞の増殖に関連する遺伝子群の変化が顕著であった。

(5) 結語

以上より、Sema3G は関節炎時に主に滑膜細胞から産生され、活性化マクロファージに作用し、細胞増殖などを通じて関節炎病態を悪化させている可能性が示唆された。今後は Sema3G の

中和による関節炎治療の可能性を検討する。

<引用文献>

1) Takamatsu and Kumanogoh. Diverse roles for semaphoring-plexin signaling in the immune system. *Trens Immunol.* 2012;33(3):127-35

2) Zhang et al. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol.* 2019; 20(7):928-942

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 0件）

1. 著者名 Suehiro Ken-Ichi, Suto Akira, Suga Kensuke, Furuya Hiroki, Iwata Arifumi, Iwamoto Taro, Tanaka Shigeru, Kageyama Takahiro, Suzuki Kotaro, Hirose Koichi, Lefebvre V?ronique, Nakajima Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Sox12 enhances Fbw7-mediated ubiquitination and degradation of GATA3 in Th2 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular & Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41423-020-0384-0	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 -

1. 著者名 Eldredge Laurie C., Creasy Rane S., Tanaka Shigeru, Lai Jen-Feng, Ziegler Steven F.	4. 巻 202
2. 論文標題 Imbalance of Ly-6Chi and Ly-6C1o Monocytes/Macrophages Worsens Hyperoxia-Induced Lung Injury and Is Rescued by IFN-	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2772 ~ 2781
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1801374	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 服部古都、石川絢一、矢部遥子、田中繁、岩本太郎、古田俊介、池田 啓、鈴木浩太郎、中島裕史
2. 発表標題 全身性エリテマトーデスの維持加療中に心窩部の激痛で発症した内臓播種性水痘帯状疱疹ウイルス感染症の一例
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tadamichi Kasuya, Shigeru Tanaka, Shunsuke Furuta, Kei Ikeda, Kotaro Suzuki, Hiroshi Nakajima
2. 発表標題 Clinical Features and Cytokine Profile of Anti-melanoma Differentiation-associated Gene 5 Antibody-Positive Dermatomyositis
3. 学会等名 Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Congress（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤愛美、池田啓、杉山隆広、田中繁、古田俊介、鈴木浩太郎、中島裕史
2. 発表標題 炎症性関節炎における炎症の局在と末梢血自然リンパ球分画の関連
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤愛美、古田俊介、田中繁、池田啓、鈴木浩太郎、中島裕史
2. 発表標題 ANCA関連血管炎患者の血清BAFF, APRIL濃度の推移による疾患再発予測
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 末廣健一、須藤明、田中繁、玉地智宏、鈴木浩太郎、中島裕史
2. 発表標題 Th2細胞分化におけるSox12の役割の解明
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中繁、池田 啓、山形 美絵子、眞山 快枝、加々美 新一郎、海 辺 剛志、松村 竜太郎、杉山 隆夫、縄田 泰史、中島 裕史
2. 発表標題 関節リウマチに対するアパタセプトの薬効予測
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------