

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007 -2008
 課題番号：19591763
 研究課題名（和文） 骨軟骨組織における神経反発因子セマフォリン 3A による血管侵入の制御
 研究課題名（英文） The regulation of vascularity by Semaphorin 3A in the osteo-cartilaginous tissues
 研究代表者
 藤田 貴也（FUJITA YOSHINARI）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：10296642

研究成果の概要：ヒト関節症軟骨において神経反発因子であるセマフォリン 3A が発現していることをはじめて証明した。さらに血管新生因子（VEGF）と受容体ニューロピリン 1 を競合することにより軟骨細胞の遊走能がセマフォリン 3A により抑制され、その効果がセマフォリン 3A 阻害剤および RNAi により回復することを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：変形性関節症, 神経反発因子, 血管新生因子

1. 研究開始当初の背景

(1)変形性関節症(OA)では、本来無血管であるはずの関節軟骨に血管新生因子(VEGF)およびその受容体が発現していることが、榎本ら(Enomoto H, Inoki I, Komiya K, Shiomi T, Ikeda E, Obata K, Matsumoto H, Toyama Y, Okada Y. Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage. Am J Pathol 2003; 162:171-181.) によって報告されていることに注目した。VEGF165 とその Co-receptor であるニューロピリン-1 が OA 関節軟骨に発現してい

たが、その VEGF の機能については MMP 産生を亢進させる以外には不明なままであった。(2)ニューロピリン-1 はもともとセマフォリン 3A の受容体として同定され、のちにニューロピリン-1 が VEGF の受容体としても機能することが判明し、セマフォリン 3A と VEGF165 を同時にニューロピリン-1 と反応させるとニューロピリン-1 への結合が競合することよりニューロピリン-1 の同じ領域に結合することが報告されていた(Bagnard D et. al. Semaphorin 3A-Vascular Endothelial Growth Factor 165 Balance Mediates Migration and Apoptosis of Neural Progenitor Cells by the Recruitment of

Shared Receptor. J.Neurosci 2001; 21:3332-3341.)ので、関節軟骨にもセマフォリン 3A が存在するのではないかと考えた。(3)VEGF は CTGF と複合体を形成し、OA 進行により産生された MMP で CTGF のみが分解されることにより VEGF が作用するようになることが知られている (Hashimoto G et al. Matrix Metalloproteinases Cleave Connective Tissue Growth Factor and Reactivate Angiogenic Activity of Vascular Endothelial Growth Factor 165. JBC 2002; 277 (39):36288-36295)。OA といった病的な状態では、VEGF の作用がセマフォリン 3A の作用と競合的に働いているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

正常および変形性関節症軟骨に神経反発因子セマフォリン 3A が発現していることを証明すること。発現している場合、セマフォリン 3A の軟骨細胞に対する作用および VEGF との競合作用が存在するかを調べることで変形性関節症の軟骨変性あるいは組織修復の病態にいかに関与しているかを検討すること。

3. 研究の方法

(1)免疫組織学的検討

ヒト正常関節軟骨および変形性関節症軟骨におけるセマフォリン 3A, VEGF, ニューロピリン 1, co-receptor である VEGF-R1, VEGF-R2, プレキシシン A1 の蛋白質レベルの発現を特異的抗体による免疫染色にて証明した。

(2)軟骨組織に対する RT-PCR

ヒト正常軟骨および変形性関節軟骨から我々の考案した方法にて高純度の RNA を抽出し、相補的 DNA (cDNA)を作成し特異的プライマーを用いてセマフォリン 3A, VEGF, ニューロピリン 1, VEGF-R1, VEGF-R2, プレキシシン A1 の mRNA レベルの発現を証明した。

(3)培養軟骨細胞に対する RT-PCR

軟骨組織から軟骨細胞を酵素処理によって単離し、単層培養し cell lysate から RNA を抽出し、相補的 DNA (cDNA)を作成し特異的プライマーを用いてセマフォリン 3A, VEGF, ニューロピリン 1, VEGF-R1, VEGF-R2, プレキシシン A1 の mRNA レベルの発現を証明した。

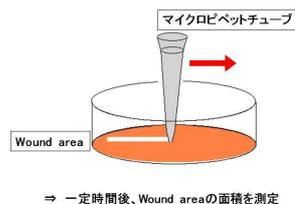
(4) セマフォリン 3A の培養軟骨細胞に対する作用

下記の作用について調べた。

アポトーシス
形態学的変化
細胞増殖
細胞遊走能

遊走能に関しては wound healing test, Boyden Chamber, 金コロイド assay を行い、軟骨細胞の移動量を移動面積としてコンピュータソフト(Sicon image)により計測し数値化した。

Wound healing test



(5)VEGF との競合実験

VEGF 刺激による軟骨細胞の遊走能
VEGF 0, 1, 5, 10, 25, 50 ($\mu\text{g/ml}$) で刺激した軟骨細胞の移動量を計測
VEGF 10 $\mu\text{g/ml}$ で刺激した軟骨細胞にセマフォリン 3A を 0, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ ずつ加えて軟骨細胞の遊走能に与える影響を調べた。

(6)セマフォリン 3A 阻害剤による抑制実験

セマフォリン 3A の特異的阻害剤である Xanthofulvin (SM-21628)を加え軟骨細胞の wound healing test を行い、軟骨細胞の遊走能を評価した。

(7)セマフォリン 3A 特異的 RNAi による抑制実験

培養軟骨細胞に RNAi を導入し 2 日後に RT-PCR および Western blot によってセマフォリン 3A の発現が抑制されていることを確認した。RNAi 導入された軟骨細胞に対して wound healing test を行い、導入により軟骨細胞の遊走能を評価した。

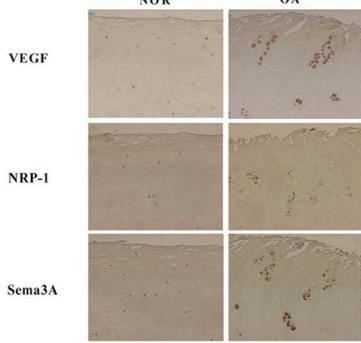
(8)セマフォリン 3A のプロセッシングに対するマトリックスメタロプロテナーゼ (MMPs) の関与

I¹²⁵ で標識したセマフォリン 3A に対して活性型 MMP-1, 2, 3, 7, 9, 13 を作用させ、セマフォリン 3A の分解を調べた。

4. 研究成果

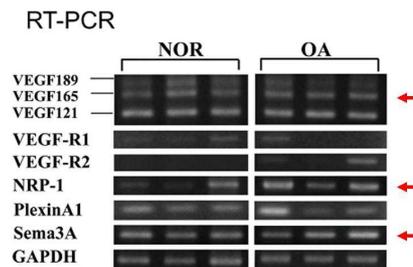
(1)免疫染色では、OA 関節軟骨では VEGFR1 以外の VEGF, VEGF-R2, ニューロピリン 1, プレキシシン A1, セマフォリン 3A は陽性で、正常関節軟骨はすべて陰性であった。

OAおよびNOR関節軟骨における
Sema3A, VEGF, NRP-1の発現



(2) VEGF,プレキシシン A1,セマフォリ 3A の mRNA 発現は正常・OA 軟骨に constitutive に認められ、VEGF-R2,ニューロピリン1の mRNA 発現は OA 軟骨で陽性になる傾向が認められた。

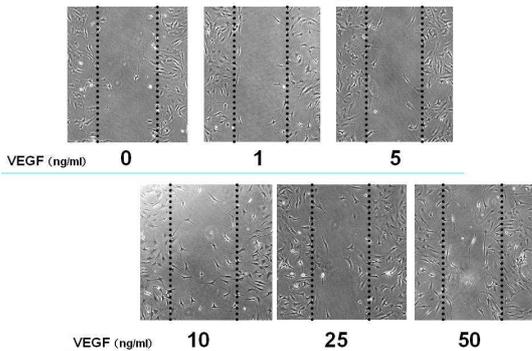
関節軟骨(NOR, OA)における
セマフォリン3AのmRNA発現



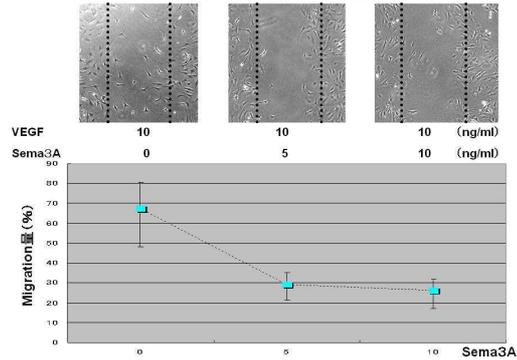
(3) 培養軟骨細胞でのニューロピリン 1, プレキシシン A1 mRNA 発現は認められたが VEGF-R1, VEGF-R2 は、ほとんど認められなかった。

(4) 培養軟骨細胞に対するセマフォリン 3A の作用として、アポトーシス誘導・形態学的変化は認められなかった。migration に関しては VEGF165 により migration が促進され、その作用を Sema3A が抑制する傾向が見られた。

VEGFによる軟骨細胞のmigration促進



Sema3Aによる軟骨細胞のmigration抑制

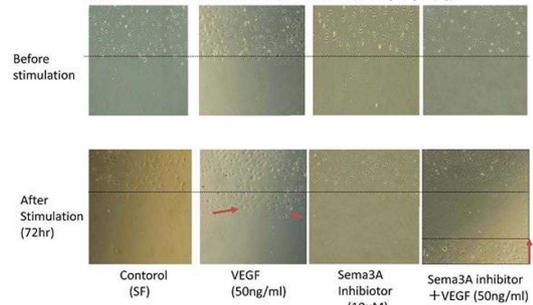


(5) VEGF 刺激により軟骨細胞の遊走能は容量依存性に亢進していた。

VEGF10 μ g/ml で刺激された軟骨細胞の遊走能はセマフォリン 3A 投与により容量依存性に抑制されていた。

(6) セマフォリン 3A 特異的阻害剤を加えるとセマフォリン 3A により抑制された軟骨細胞の遊走能が再び亢進することが明らかになった。

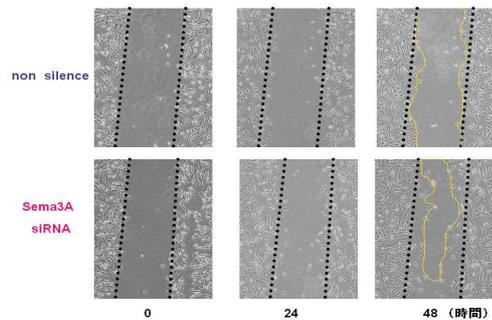
Sema3A inhibitorによる阻害実験



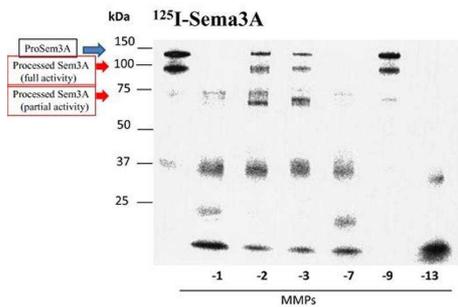
■ VEGFによる軟骨細胞Migrationがセマフォリン3A阻害により増強

(7) セマフォリン 3A の RNAi 導入によりセマフォリン 3A により抑制された軟骨細胞の遊走能が再び亢進することが明らかになった。

siRNAによるセマフォリン3Aの阻害



MMPsによるセマフォリン3A processing



(8) ¹²⁵I 標識したセマフォリン 3A は MMP -1, 2, 3, 7, 13 により分解された。特に、MMP -1, 7, 13 により活性のない大きさまで分解されていた。MMP -9 はセマフォリン 3A を分解しなかった。

(9) 今後の展望

変形性関節症軟骨においてセマフォリン 3A が発現し軟骨細胞の遊走能において VEGF と競合的に働いていることが明らかになった。軟骨組織は軟骨細胞のクラスター形成という形態で組織修復を行っているが、このクラスターを形成した軟骨細胞の増殖能が亢進していることが知られている。軟骨細胞が増殖しても移動することが出来なければ、正常な軟骨組織が再生されない。正常な軟骨再生が生じさせるためにセマフォリン 3A を阻害することが有用である可能性がある。変形性関節軟骨の組織再生については、今後もさらなる研究が必要と考える。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 貴也 (FUJITA YOSHINARI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 10296642

(2) 研究分担者

高石 官成 (TAKAISHI HIRONARI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 60236180
木村 徳宏 (KIMURA TOKUHIRO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 40445200
大久保 匡 (OKUBO MASASHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 30445225

(3) 連携研究者