

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06958

研究課題名(和文)SEMA4Aを介した神経・免疫クロストークによる好酸球性副鼻腔炎病態解明

研究課題名(英文)Evaluate the function of SEMA4A in ECRS pathogenesis via cross-talk among neural network and immunoreaction

研究代表者

津田 武 (Tsuda, Takeshi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00778631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性副鼻腔炎患者では他副鼻腔疾患患者と比較して血清SEMA4A濃度が有高い結果であったが、臨床病勢との相関は認められなかった。先行実験からSEMA4Aが欠損すると好酸球の寿命が短縮することがわかっており、同系統マウス(SEMA4A欠損マウスおよびWTマウス)より採取した骨髄由来好酸球に対して脱顆粒能および遊走能について評価を行ったが差は認められなかった。また骨髄由来好酸球に対して網羅的解析を行った結果、SEMA4A欠損マウス由来の好酸球においてCXCL12の遺伝子発現レベル亢進を認めた。鼻腔上皮細胞に対するSEMA4A刺激実験によってMMP-1蛋白の産生亢進が認められた。

研究成果の概要(英文)：Serum SEMA4A levels were significantly higher in patients with ECRS than in those with other diseases. Serum SEMA4A levels were not correlated with clinical disease activity of ECRS. There were no significant differences in in vivo peritoneal migration, in vitro degranulation between eosinophils derived from Wild type (WT) and SEMA4A deficient mice. BMDEo from SEMA4A deficient mice may produce larger amount of CXCL12 than those from WT mice. Recombinant SEMA4A enhanced the production of MMP-1 from Human nasal epithelial cells (HNEpC).

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：SEMA4A 好酸球性副鼻腔炎

## 1. 研究開始当初の背景

好酸球性副鼻腔炎は好酸球浸潤の強い鼻茸と嗅覚障害を特徴とする疾患であり厚生労働省の難病指定を受けている。現在治療法は手術あるいはステロイド内服が一般的であるが、長期内服による副作用の問題点や術後早期に高率で再発することが問題となっており病態の解明および新たな治療法の開発が必要とされている。

本研究でターゲットとするセマフォリンは当初、神経軸索の進展方向を決定する神経ガイダンス分子として発見されたが近年各種免疫・アレルギー反応や腫瘍浸潤などその機能が多岐にわたることが解明されてきた。

## 2. 研究の目的

これまでの予備実験から我々は好酸球性副鼻腔炎患者において血清 SEMA4A 濃度が上昇していることを発見した。

今回我々は神経系症状である高度嗅覚障害と免疫系が強く関与する鼻茸の形成に着目し「SEMA4A を介した神経・免疫クロストークによる好酸球性副鼻腔炎病態解明」という切り口で診断および治療につながる成果を示す。

## 3. 研究の方法

(1) 大阪大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科を受診した鼻副鼻腔患者より採取した血清サンプルについて、現在未測定サンプルについて SEMA4A 濃度を測定するとともに、好酸球性副鼻腔炎患者由来のサンプルについては SEMA4A 濃度と血中好酸球数、好酸球%、血中 IgE 値、Polyp score、JESREC score、臨床的重症度との相関関係を評価することによって血清 SEMA4A 濃度が疾患の病勢評価におけるバイオマーカーとなりうるかを検討する

(2) 本学にてすでに飼育中の SEMA4A<sup>-/-</sup> マウスおよび Wild type マウス(WT マウス)より骨

髄由来好酸球を作成し脱顆粒、遊走能などについて評価することによって SEMA4A の好酸球における機能を評価する。(SEMA4A のバックシグナルの可能性について評価する)

また定常状態における両 BMDEo における遺伝子発現レベルの差異について RNA-sequence を用いて網羅的に評価を行う。

(3) 鼻茸を構成する細胞のうち最も大きなポピュレーションを持つ上皮細胞において SEMA4A の受容体の発現についてフローサイトメトリー法を用いて評価を行う。

(4) 鼻腔上皮細胞に対して recombinant SEMA4A を用いた刺激実験を行い、変動遺伝子について RNA-sequence の手法を用いて評価を行う。

## 4. 研究成果

(1) 副鼻腔疾患患者血清 SEMA4A 濃度測定

Human SEMA4A ELISA kit (MBL) を用いて 2014 年～2017 年に大阪大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科を受診した鼻副鼻腔患者の血清について Human SEMA4A ELISA kit (MBL) を用いて SEMA4A 濃度を測定した。その結果、サンプル数を増加させた場合でも好酸球性副鼻腔炎患者では他副鼻腔疾患患者と比較して、有意に血清 SEMA4A 濃度が高い結果であった。

しかし好酸球性副鼻腔炎患者の血清 SEMA4A 濃度と臨床的な病勢評価としての血中好酸球数、好酸球%、血中 IgE 値、Polyp score、JESREC score、臨床的重症度の間に有意な正の相関は認められなかった。

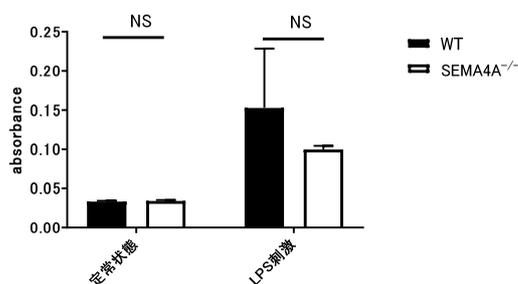
(2) 骨髄由来好酸球の作成(SEMA4A<sup>-/-</sup> マウスおよび WT マウス骨髄由来好酸球)

Dyer KDら(J Immunol 2008;181(6):4004-4009.) の報告にある方法にそって SEMA4A<sup>-/-</sup> マウスおよび WT マウスより Bone-marrow derived eosinophil(BMDEo)

を作成した。また両系統に関して day4、day8 day12 の時点で SiglecF および SEMA4A の発現レベルについてフローサイトメトリー法を用いて評価したが、両系統間に発現レベルの差は認められなかった。

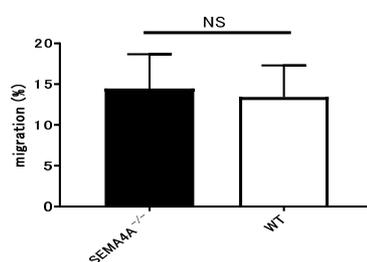
#### 骨髄由来好酸球を用いた脱顆粒能評価

上記の方法を用いて作成した BMDEo に対して D.J.Adamko ら (Journal of Immunological Methods 2004;291;101-108) の報告にそって脱顆粒能の評価を行った。具体的には day12 で回収した BMDEo に対して無刺激あるいは LPS 刺激下に 4 時間経過観察し、回収した上清に 0-フェニレンジアミン刺激を加え 2 分後に 4M の硫酸で反応を停止させ吸光度を測定した。その結果両系統とも LPS 刺激によって有意に脱顆粒は促進されたが、系統間に脱顆粒能の差は認められなかった。



#### SEMA4A<sup>-/-</sup> マウスおよびWT マウスにおける好酸球遊走能評価

T.Satoh ら (nature immunology 2010;11;936-944) の報告にそって 800ng のキチンを SEMA4A<sup>-/-</sup> マウスおよびWT マウス腹腔内に注射し 48 時間後に腹水細胞を回収、フローサイトメトリー法によって SiglecF<sup>+</sup>、CCR3<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup> の細胞群を好酸球と設定し遊走好酸球%を評価した。その結果好酸球の遊走能に関しても両系統間に有意な差を認めなかった。



#### BMDEo に対する RNA-sequence 評価

p-value, 0.05、Fold change >2 もしくは <-2 の条件において両群間で発現に差を認めた遺伝子数は 114 個であった。

これらの遺伝子リストを用いて Upstream analysis を行った結果、上流遺伝子として CXCL12 の変動が示唆された。また同遺伝子変動について mRNA を用いた qPCR 法で評価したところ、SEMA4A<sup>-/-</sup> マウス由来 BMDEo において約 2 倍の発現亢進を認めた。

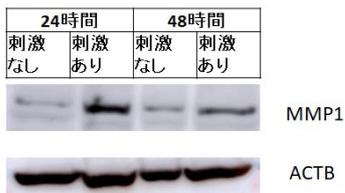
#### (3) 鼻腔上皮細胞における SEMA4A 受容体の発現評価

予備実験において鼻腔上皮細胞では PlexinB2、PlexinD1、NRP1 の mRNA 発現を認めていたが同受容体についてフローサイトメトリー法では発現を確認できなかった。しかし臨床検体を用いた免疫染色法によって PlexinD1、NRP1 の発現が確認されたため抗体種等の変更を行い、再検討を要する。

#### (4) 鼻腔上皮細胞に対する recombinant SEMA4A 刺激実験

鼻腔上皮細胞を培養後 recombinant SEMA4A (10 μg/ml) にて 24hr 刺激を加え、刺激による遺伝子変動を RNA-sequence を用いて評価した。結果 FPKM>1、p-value<0.05、Fold change >2 もしくは <-2 条件下で 2086 個の遺伝子変動を認めた。最も大きな変動を認めた遺伝子は metalloproteinase (MMP) 10 であり、次に変動が大きかった遺伝子は MMP1 であった。2 遺伝子がそれぞれコードする蛋白について変動をウェスタンブロット法で評価したところ、MMP-10 蛋白については刺激による蛋白

レベルの発現亢進は認められなかったが MMP-1 蛋白に関して産生が亢進するという結果が認められた。実際の臨床検体における MMP-1 の発現について免疫染色法によって評価したところ非好酸球性副鼻腔炎および好酸球性副鼻腔炎鼻腔いずれの症例でも上皮において MMP-1 蛋白の発現を認めたが、発現レベルは好酸球性副鼻腔炎の方が高い結果となった。



以上の結果から SEMA4A は鼻腔上皮細胞に作用し MMP の産生亢進を介した上皮リモデリング促進に寄与している可能性が考えられる。今後トランズウェルや経上皮電気抵抗 (Transepithelial electric resistance:TER) 測定法を用いた透過性実験についての評価を行う必要があると考えられた。

また上述のとおり鼻腔上皮における SEMA4A の受容体は現時点で完全には同定しきれておらず、受容体を同定した上で shRNA を用いたノックダウンの手法による SEMA4A-receptor interaction によりリモデリングの促進が引き起こされているかの評価も併せて必要と考えられた。

## 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)

[学会発表](計1件)

好酸球性副鼻腔炎における SEMA4A の機能解析 津田武 日本鼻科学会 2017

## 6．研究組織

(1)研究代表者

津田 武 (Tsuda Takeshi)

大阪大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉