

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16146

研究課題名(和文) 難治性血管炎におけるセマフォリン分子の病的意義と治療応用

研究課題名(英文) Pathological and therapeutic roles of semaphorin in refractory vasculitis

研究代表者

西出 真之(Nishide, Masayuki)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：80812255

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)：MPOノックアウトマウスにMPO蛋白を免疫する既存の方法に改良を加え、腎炎の安定発症に成功した。また、副鼻腔の血管周囲に局所的な好酸球性炎症を生ずるアスペルギルス死菌を用いた好酸球性副鼻腔炎モデルを用い、安定発症を確認した。SEMA4Dが血管内皮、鼻腔上皮に働きかけて透過性を亢進させると同時に、好酸球の移行を介してポリープの産生を促す事を見出し、SEMA4D抗体による治療実験を完遂し、難治性疾患の新たな治療標的として論文報告を行った。血管炎患者臨床サンプルの解析においては、血清SEMA7A濃度が腎機能障害の程度と強い相関を認め、ANCA関連血管炎の新規バイオマーカーとなり得る結果が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、難病である血管炎モデルマウスの作成に着手し、好中球・好酸球を活性化させる免疫たんぱく質「セマフォリン」について研究を行いました。その結果、難病の血管炎、鼻ポリープを形成するアレルギー性疾患に対して、セマフォリンを標的とする治療が有効であることを突き止めました。

研究成果の概要(英文)：We focused on two diseases, ANCA-associated vasculitis (AAV) and Eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS). We developed a passive transfer model of acute AAV, using purified monoclonal anti-MPO antibody taken from MPO-deficient mice immunized with recombinant mouse MPO. Mice exhibited glomeruli vasculitis and elevated proteinuria. Serum soluble SEMA4D levels were elevated in patients with ECRS and positively correlated with disease severity. Cell surface expression of SEMA4D on eosinophils from patients was reduced, which was due to MMP-mediated cleavage of membrane SEMA4D. Soluble SEMA4D enabled eosinophil trans-endothelial migration, and treatment with anti-SEMA4D antibody ameliorated eosinophilic infiltration in sinus tissues in the ECRS animal model. Semaphorins are thus potentially useful as clinical markers and therapeutic targets for autoimmune vascular diseases.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：ANCA関連血管炎 セマフォリン 好中球 好酸球

1. 研究開始当初の背景

好中球は、血液中を流れる白血球の中で圧倒的多数を占める細胞で、免疫反応の最前線を担うことが知られている。また、好中球に好酸球、好塩基球を含めた「顆粒球」と呼ばれる細胞群は、血管炎のような免疫難病や、世界中で多くの患者を悩ませるアレルギー疾患の病態の中心的存在である。しかし、顆粒球が、免疫疾患の成り立ちの過程でどのように活性化され、症状を引き起こすのかは、十分に理解されていない。例えば、「ANCA (アンカ) 関連血管炎」は好中球の活性化によって全身の小型血管に炎症を生じ、生命を脅かす免疫難病であるが、好中球の異常活性化のメカニズムについてはわかっていなかった。

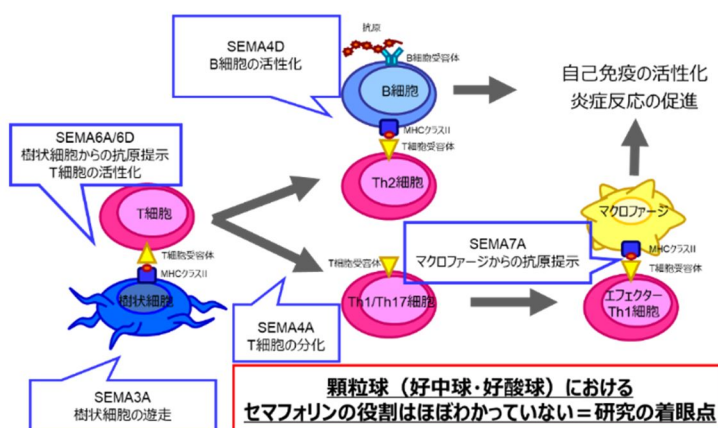
古くから「病は気から」という諺があるように、ヒトの感情や感覚を司る神経系と、生体を守る免疫系が互いに制御し合っていることは以前から指摘されてきた。申請者が所属する研究グループはこれまで、神経の成長の方向を決めるガイダンス分子である「セマフォリン」が、免疫機能の活性化や制御にも必須の役割を果たしていることを明らかにしてきた (Nature 2002, 2007, 2010, 2012, Nat Immunol. 2008, 2010, Nat Rev Immunol. 2013)。しかし、そのほとんどはリンパ球が主役の獲得免疫に関する報告であり、自然免疫の最前線を担う顆粒球における機能はほとんど不明であった (右図)。

申請者は、これまで詳細な病態が解明されていない免疫、アレルギー疾患の成り立ちの中で、顆粒球の活性化にセマフォリン分子が関与するのではないかという着眼点を持って、研究に着手した。

2. 研究の目的

臨床実地における問題点を明確にし、難治性血管炎の患者検体を解析し、顆粒球における免疫ガイダンス因子セマフォリンの作用を軸に病態解明と治療応用に繋げること。

獲得免疫におけるセマフォリン分子の役割



3. 研究の方法

(1) ANCA 関連血管炎モデルマウスの構築および治療実験

リコンビナント MPO タンパクをアジュバントと混合・乳化し、MPO 欠損マウスに免疫し、採血、脾臓採材、細胞調製を行う。採取した脾細胞を Rag2 KO マウスに移入する事により、糸球体腎炎を含む ANCA 関連血管炎を発症させる。血管炎の病勢評価は、Overall survival、体重変化、腎組織所見、BUN/Cr/MPO-ANCA、尿蛋白、尿潜血定量により行う。糸球体腎炎の発症率を詳細に検討したうえで、随時プロトコルを修正し、より効率的に、正確に病態を反映する疾患モデルマウスを構築してゆく。モデルマウスおよび病態評価基準を樹立後、マウスを用いた前臨床試験 (セマフォリン抗体投与実験) を行う。可溶性 SEMA4D の中和抗体は先行研究により既に準備済みである。同抗体が Agonistic な作用をもたらす可能性も考えられるのでそれを含めて評価する。また、臨床検体を解析する中で、特定のセマフォリン分子は好酸球にも発現する事が判明した。そのため、ANCA 関連血管炎の臨床的枠組みの中で、好酸球が関与する病型である EGPA にも対象を拡充し、好酸球性副鼻腔炎モデルを用いてその治療効果を判定する。

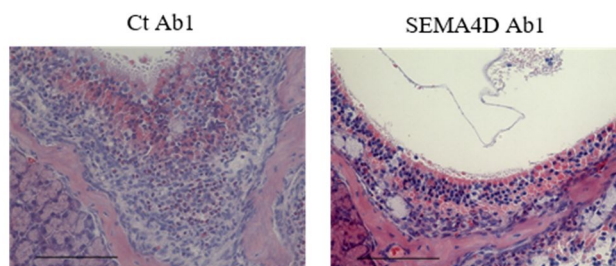
(2) 血管炎患者臨床サンプルを用いた解析

新規入院、増悪入院の ANCA 関連血管炎の原則として全例において、十分なインフォームドコンセントの上、全血を約 20 ml 採取する。血清は -80 に保管し、必要時に解凍し、ELISA 法により血清中のセマフォリンを測定する。ANCA 関連血管炎は稀な疾患であるが、先行研究後に本学で ANCA 関連血管炎患者症例として採取された血清検体を、厚生労働省の診断基準に則り MPA (n=27) GPA (n=19) に分類 (Probable までを含む) し、Age Match した健常人血清 (n=24) を対照群とした。各血清のセマフォリン 3A/3C/3E/5A/7A 濃度を測定し、スピアマンの順位相関により臨床パラメータとの相関を算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ANCA 関連血管炎モデルマウスの構築および治療実験

好中球性炎症モデルについては、MPO ノックアウトマウスに MPO 蛋白を免疫する既存の手法に、免疫経路やザイモサン処置を加えるという改良を加える事で、腎組織所見で血管炎が高いレベルで発症する条件を見出した。しかしながら、本手法にはリコンビナント MPO 準備のコスト(大量に必要) 作成にかかる時間(免疫7週間+細胞移入後4週間/回) 免疫した全てのマウスが使えるわけではない(ANCA 高力価のみ) その上でほぼドナー1匹 レシピエント1匹への脾細胞移入が限界、発症率にブレがある(軽症~重症) 全脾細胞移入のため、Anti-MPO 抗体が真に Pathogenic であるか明確でないといった問題点がある事がわかった。そこで、Anti-MPO 抗体を表面している B 細胞を 1 細胞レベルでソーティングし、MPO 高反応性のモノクローナル抗体を複数種類取得した。モノクローナル抗体を移入するモデルマウス作成に移行し、血管炎の発症に成功している。また、好酸球性血管炎の局所病変として高率に合併し、副鼻腔の血管周囲に局所的な好酸球性炎症を生ずるアスペルギルス死菌を用いた好酸球性副鼻腔炎モデルを用い、安定して複数回の発症を確認することが出来た。上述の好酸球性炎症モデルについては、SEMA4D 抗体による治療実験まで完遂し、難治性疾患の新たな病態、治療標的として 2020 年 2 月に論文報告を行った。5 週齢の野生型 BALB/c マウス(雌)に対して、75 µg の卵白アルブミンと 2U の Aspergillus protease を PBS 50 µl に混和したものを 5 週間連続で週に 3 回、経鼻的に投与した。投与開始後 7 日目、14 日目、21 日目、28 日目に経腹腔的に抗 SEMA4D 抗体(50mg/kg)抗体/コントロール抗体を投与した。5 週間の経鼻投与後、鼻腔洗浄液および副鼻腔組織の採取を行った。すると、抗 SEMA4D 抗体を投与したマウスにおいてコントロールマウスと比較して、組織学的に副鼻腔組織の炎症が軽微であった(右図)。また抗 SEMA4D 抗体を投与したマウスより採取した副鼻腔洗浄液では炎症細胞数の減少傾向が見られ、また IL-4、IL-6 濃度がコントロール抗体を投与したマウスと比較して低値であった。(成果論文発表済)



セマフォリンシグナルの基礎的解析においては、好中球、好酸球表面に SEMA4D が発現し、切断された SEMA4D が血管内皮、鼻腔上皮に働きかけて透過性を更新させると同時に、MMP-9 の発現上昇を介して好酸球性顆粒の代表である EDN の産生を上げる事や、好酸球の移行を介してポリープの産生を促す事を見出した。セマフォリンの発現が mTOR に代表される代謝シグナルによって制御され、特に逆行性シグナルがマクロファージの活性化に関与していることを発見、報告した。

##### 申請者が発見した事柄



	好中球	好酸球
セマフォリンの発現	あり (SEMA4D)	あり (SEMA4D)
セマフォリンの機能	免疫チェックポイント分子として活性化を制御	細胞から切断されることにより血管透過性を亢進
標的疾患	ANCA関連血管炎	好酸球性副鼻腔炎
臨床的意義	血中SEMA4D濃度が血管炎の病勢を反映する	血中SEMA4D濃度が鼻ポリープの重症度を反映する SEMA4Dを中和する抗体治療がマウスモデルに有効

##### (2) 血管炎患者臨床サンプルを用いた解析

臨床現場における網膜血管炎の指標として Optical Coherence Tomography Angiography (OCTA) の有用性を見出し、血管炎の臨床経過において血管が再生していく様子を画像的に捉えた症例を筆頭著者として報告した。また、ANCA 関連血管炎患者症例として採取された血清検体のセマフォリン 3A/3C/3E/5A/7A 濃度を測定し、スピアマンの順位相関により臨床パラメータとの相関を算出した。血清 SEMA7A 濃度は、Age Match した健康人に比して顕微鏡的多発血管炎 (MPA) 患者で有意に上昇しており、腎機能障害の程度と強い相関を認めていた。血清 SEMA4D 値は MPA 症例で血管炎の活動性スコアである BVAS と有意に正の相関を認め、先行研究の結果を Confirm するものとなった。本研究計画内で予定していた全てのセマフォリンの測定を完了し、SEMA4D 値は BVAS と相関する MPA の活動性マーカーとして、SEMA7A 濃度は MPA の腎機能障害の指標となりうる新しい知見を得た。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsuda Takeshi, Nishide Masayuki, et al.	4. 巻 145
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 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 843 ~ 854.e4
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 該当する
1. 著者名 Mizuno Yumiko, Nishide Masayuki, Wakabayashi Taku, Nishida Kohji, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 79
2. 論文標題 OCTA, a sensitive screening for asymptomatic retinopathy, raises alarm over systemic involvements in patients with SLE	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 e17 ~ e17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2018-214751	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 Tsuda Takeshi, Maeda Yohei, Nishide Masayuki, Koyama Shohei, Hayama Yoshitomo, Nojima Satoshi, Takamatsu Hyota, Okuzaki Daisuke, Kinehara Yuhei, Kato Yasuhiro, Nakatani Takeshi, Obata Sho, Akazawa Hitoshi, Shikina Takashi, Takeda Kazuya, Hayama Masaki, Inohara Hidenori, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 31
2. 論文標題 Eosinophil-derived neurotoxin enhances airway remodeling in eosinophilic chronic rhinosinusitis and correlates with disease severity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 33 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy061	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 Kang Sujin, Nakanishi Yoshimitsu, Kioi Yoshiyuki, Okuzaki Daisuke, Kimura Tetsuya, Takamatsu Hyota, Koyama Shohei, Nojima Satoshi, Nishide Masayuki, Hayama Yoshitomo, Kinehara Yuhei, Kato Yasuhiro, Nakatani Takeshi, Shimogori Tomomi, Takagi Junichi, Toyofuku Toshihiko, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 19
2. 論文標題 Semaphorin 6D reverse signaling controls macrophage lipid metabolism and anti-inflammatory polarization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 561 ~ 570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-018-0108-0	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masayuki Nishide
2. 発表標題 'Semaphorins and their involvement in the pathogenesis of autoimmune vasculitis'
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西出真之
2. 発表標題 好中球活性化制御分子を標的としたANCA 関連血管炎の病態解析と治療への挑戦
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Nishide
2. 発表標題 'Semaphorins and their involvement in the pathogenesis of autoimmune vasculitis'
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Nishide
2. 発表標題 'Semaphorins and their involvement in the pathogenesis of autoimmune vasculitis'
3. 学会等名 EMBO Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西出 真之
2. 発表標題 好中球活性化制御分子を標的とした ANCA関連血管炎の疾患特異的治療への挑戦
3. 学会等名 第 4 回日本骨免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西出 真之
2. 発表標題 好中球活性化制御分子を標的とした ANCA関連血管炎の疾患特異的治療への挑戦
3. 学会等名 第 4 回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西出 真之
2. 発表標題 自己免疫疾患の病態における セマフォリン分子の意義と作用
3. 学会等名 第 4 6 回日本臨床免疫学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西出 真之
2. 発表標題 Semaphorins and their involvement in the pathogenesis of autoimmune vasculitis
3. 学会等名 第 4 7 回日本免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masayuki Nishide
2. 発表標題 The role of semaphorins in the regulation of granulocytic inflammation
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会
4. 発表年 2020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