

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460495

研究課題名(和文) 関節疾患における免疫セマファリンの骨ホメオスタシス調整作用の解明

研究課題名(英文) The role of Semaphorin 4D in Rheumatoid Arthritis

研究代表者

緒方 篤(Ogata, Atsushi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・招へい教授

研究者番号：90309451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：セマフォリン4D(Sema4D)は骨形成抑制作用が報告されており、骨びらんや破壊が発生する関節リウマチにおいて病態形成に関与している可能性がある。今回の研究の結果、関節リウマチでは血中・関節液中に蛋白酵素ADAMTS-4の濃度が高く、これがCD3+、CD14+の単核球細胞表面からSema4Dを切離させているとみられた。動物実験ではSema4Dを阻害すると関節炎が抑制されたことから、遊離した可溶性Sema4Dが血中や関節液中で増えることで関節びらんや滑膜増殖を引き起こしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that semaphorine 4D (Sema4D) is a suppressor of osteogenesis. It may be involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis which presents bone erosion and destruction. According our study, the sera and joint fluids contained higher level of protease ADAMTS-4, and this made shedding of Sema4D from the membrane of CD3+ and CD14+ mononuclear cells resulting in augmentation of Sema4D level in sera and joint fluid. Because arthritis model mice which were injected anti-Sema4D antibody have presented suppression of arthritis, augmented Sema4D may induce bone erosion and destruction in the patients with rheumatoid arthritis.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：関節リウマチ セマフォリン

1. 研究開始当初の背景

セマフォリンは神経軸索の伸長に関わる因子として同定されたが、免疫活性化や骨代謝にも強く関与していることが明らかになりつつある。関節リウマチは免疫活性化により惹起された炎症に伴い関節で骨破壊が進展する疾患であり、この病態へのセマフォリンの関与を想定しその検証を行うこととした。

2. 研究の目的

関節リウマチにおいてセマフォリン 4 D (Sema4D)の関与を検討する。

3. 研究の方法

(1) 関節リウマチ、変形性関節症、強直性脊椎炎、全身性エリテマトーデス、健常者の血清中可溶性 Sema4D 濃度を ELISAs で測定し、疾患活動性との相関を検討した。

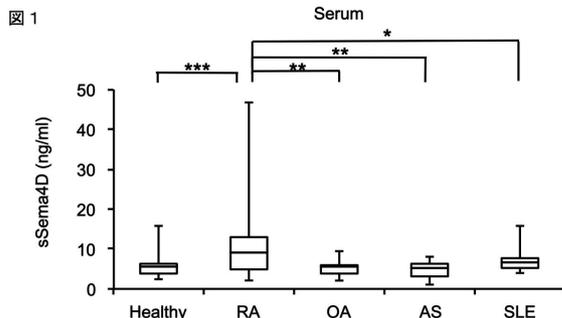
(2) 関節リウマチ患者の末梢血、関節液、関節滑膜の細胞における Sema4D の発現を、FACS および、RT-PCR にて蛋白および mRNA レベルで検討した。

(3) 蛋白分解酵素による Sema4D 発現細胞の処理により可溶性 Sema4D が発現できるか検討した。また炎症性サイトカインによる蛋白分解酵素の誘導、Sema4D による炎症性サイトカインの産生の検討を行った。

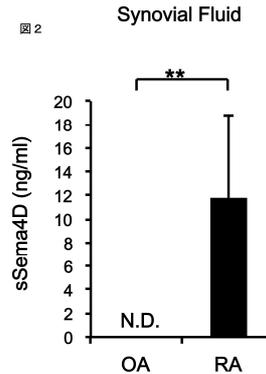
(4) コラーゲン誘発関節炎(CIA)モデルマウスを用いて、Sema4D を阻害した場合の治療実験を行った。

4. 研究成果

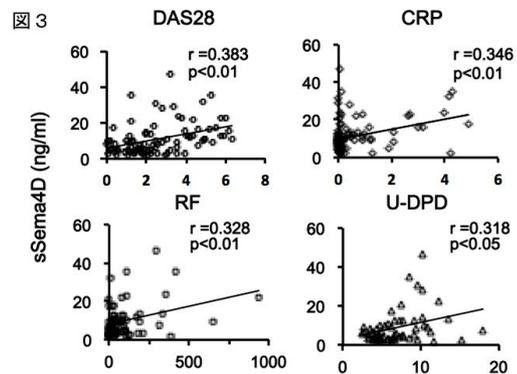
(1) 関節リウマチ、変形性関節症、強直性脊椎炎、全身性エリテマトーデス、健常者の血清中可溶性 Sema4D 濃度を Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)法で測定した結果、関節リウマチ患者で可溶性 Sema4D 濃度の上昇が確認された(図 1)。



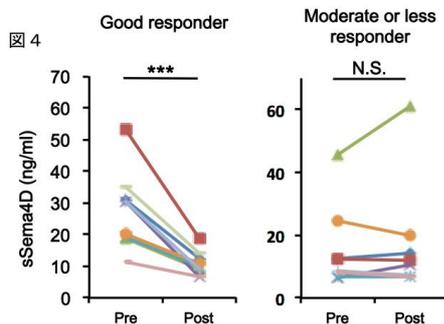
また、滑液が貯留する疾患として関節リウマチと変形性関節症患者の滑液中可溶性 Sema4D を比較したところ、変形性関節症患者滑液中には可溶性 Sema4D が検出されなかったが、関節リウマチ患者では可溶性 Sema4D が検出された(図 2)。



関節リウマチ患者における可用性 Sema4D 濃度は疾患活動性の指標となる CRP、RF、Disease Activity Score (DAS) 28 のそれぞれの値と相関が観察された(図 3)。



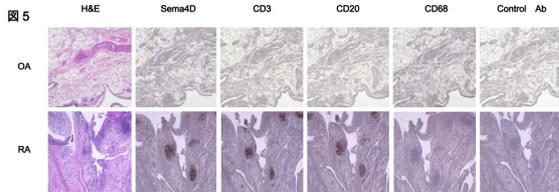
また、骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン濃度とも相関が観察された。関節リウマチ患者における血清中 Sema4D 濃度は関節リウマチに対して治療介入を行った際、その反応の良不良にしたがって低下した(図 4)。



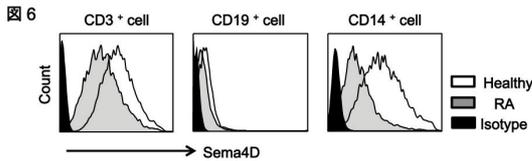
このことより、可溶性セマフォリンが関節リウマチの疾患活動性と相関して増加することを示しており、病勢と相関することより病態に関与する可能性が示唆された。

(2)そこで、次にセマフォリンの産生がどこで行われているかの検討を行った。

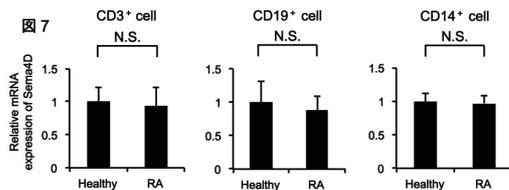
関節リウマチおよび変形性関節症患者滑膜組織を用いて Sema4D の免疫組織染色を行うと、変形性関節症患者滑膜組織には Sema4D 陽性細胞が検出されなかったが、関節リウマチ患者滑膜組織では Sema4D 陽性細胞がクラスターを形成して観察された(図5)。



一方、末梢血単核球を Ficoll-Paque Plus 液を用いて単離し、その細胞表面上 Sema4D の発現を flowcytometry を用いて検討したところ、関節リウマチ患者の CD3 陽性細胞、CD14 陽性細胞ではその発現程度が健常者末梢血単核球に比べて低下していた(図6)。

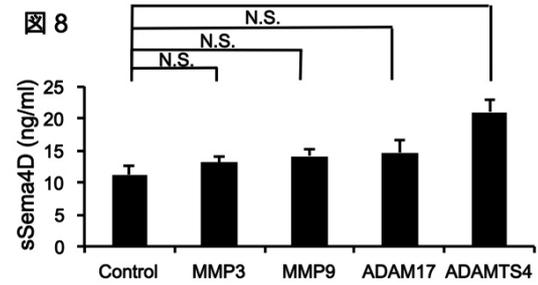


しかしながら mRNA レベルの Sema4D の産生は関節リウマチと健常人で差はなかった(図7)。

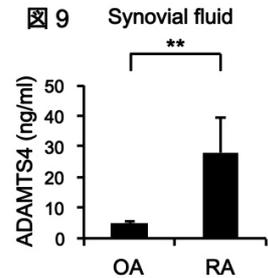


(3)このことより Sema4D の細胞表面からの減少は Sema4D 産生低下ではなく、細胞表面からの shedding out である可能性が示唆された。実際、関節軟骨の構成成分であるアグリカンコアタンパクを分解する酵素の一つである ADAMTS-4 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4)は培養上清中の Sema4D の量を増加

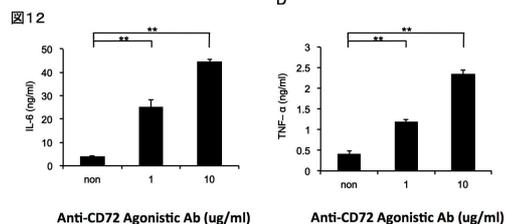
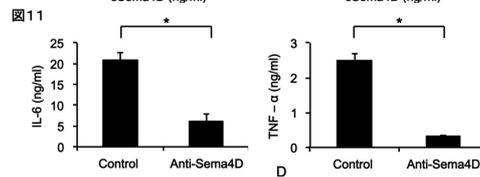
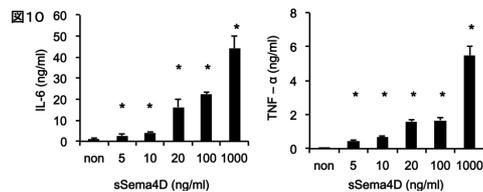
させた(図8)。



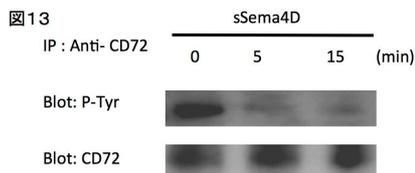
さらに ADAMTS-4 は関節リウマチ患者の関節液中で増加しており(図9)関節リウマチ患者では細胞膜上 Sema4D が豊富な ADAMTS-4 によって shedding され結果として滑液、血清で増加していることが示唆された。



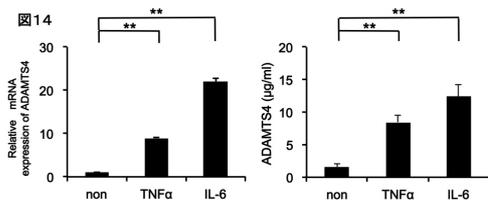
次に、Sema4D がどのような役割を果たしているかを検討した。可溶性 Sema4D はリンパ球からの炎症性サイトカインである、IL-6 や TNF- α の産生を惹起し(図10)その産生は抗 Sema4D 抗体で中和された(図11)。サイトカインの産生は Sema4D の受容体である CD72 に対する抗体によっても抑制され(図12) CD72 抗体によって、Sema4D による CD72 のリン酸化を抑制することから信号伝達も抑制していることが確認された(図13)。



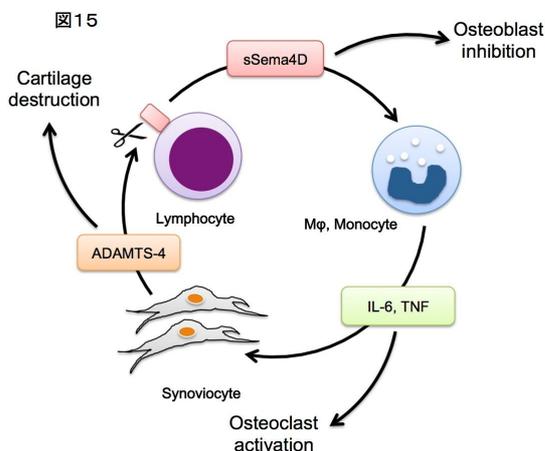
これらのことは Sema4D は特異的にリンパ球からの炎症性サイトカインの産生を誘導することができ、それにより関節リウマチの悪化に寄与する可能性を示唆した。



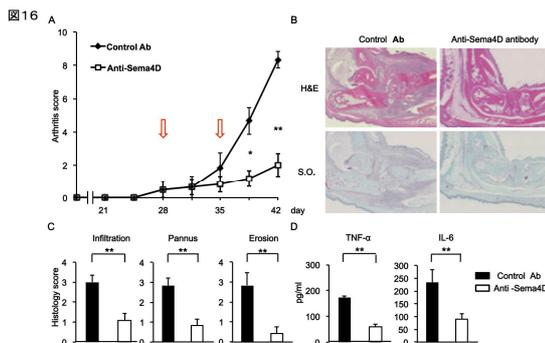
一方で IL-6 や TNF-a などの炎症性サイトカインは ADAMTS4 の産生を誘導していた (図 14)



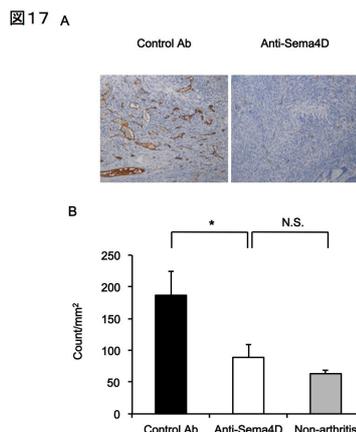
このように、関節リウマチで産生が増加している ADAMTS4 が細胞表面の Sema4D を shedding out させることにより可溶性の Sema4D を産生させ、増加した可溶性 Sema4D がその受容体である CD72 を活性化し炎症性サイトカインである IL-6 や TNF-a を産生させ、これらの炎症性サイトカインが ADAMTS4 を産生させさらに可溶性 Sema4D を産生させるといった。自律的な炎症サイクルが関節リウマチで形成されている可能性が考えられた。Sema4D はこのような自律的なサイクルを担うことにより関節リウマチ炎症の慢性化に重要な役割を果たしている可能性を考えられた (図 15)



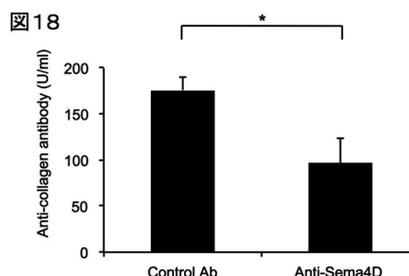
(4) Sema4D 信号を阻害することによりこのような関節リウマチ炎症の慢性化サイクルを抑制することが、関節リウマチの治療選択肢になりうるかを検討するために、コラーゲン誘発関節炎(CIA)モデルマウスを用いて、Sema4D を阻害した場合の治療実験を行った。



CIA マウスに抗 Sema4D 抗体を腹腔内投与反復したところ、関節炎スコアの抑制 (図 16-A)、組織学的に滑膜増生の抑制 (図 16-B)、細胞浸潤や骨びらんの低減 (図 16-C)、および血清中 TNF-a および IL-6 の抑制 (図 16-D) が観察された。



また CD31 染色によって評価された血管新生の抑制 (図 17)、シトルリン化抗体産生抑制 (図 18) など Sema4D 阻害抗体治療で観察された。



(5) まとめ

Sema4D は直接的に骨芽細胞を抑制することが知られており、Sema4D を介した炎症慢性化のサイクルの中で、炎症性サイトカインにより破骨細胞の活性、タンパク分解酵素により、関節軟骨の破壊などを介して間接的に、また直接的に関節リウマチの骨病変に関わっていることが示された。Sema4D を標的とした治療が関節リウマチの新しい治療となる可能性が示された。

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)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Yoshida Y, Ogata A, Kang S, Ebina K, Shi K, Nojima S, Kimura T, Ito D, Morimoto K, Nishide M, Hosokawa T, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Tsuboi H, Saeki Y, Tomita T, Tanaka T and Kumanogoh A. Semaphorin 4D contributes to rheumatoid arthritis by inducing inflammatory cytokine production: pathogenic and therapeutic implications. *Arthritis and Rheumatology*. (査読あり) 2015;67(6):1481-90.

〔学会発表〕(計 3件)

1、吉田佑志、緒方篤、冨田哲也、平野亨、嶋良仁、榎崎雅司、田中敏郎、熊ノ郷淳。可溶性 Sema4D は関節リウマチ患者の血清、関節液で上昇し、疾患活動性と相関する。第58回日本リウマチ学会総会・学術集会。東京 2014.4.24-26.

2、Yoshida Y, Ogata A, Tomita T, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Tanaka T, Kumanogoh A. Soluble Semaphorin 4D in rheumatoid arthritis. The 58th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology, International Rheumatology Symposium. Tokyo Japan, April 24-26, 2014.

3、Yoshida Y, Ogata A, Ebina K, Shi K, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Tanaka T, Tsuboi H, Saeki Y, Tomita T, Kumanogoh A. Contribution of semaphorin 4D (Sema4D) in rheumatoid arthritis (RA): increased soluble Sema4D enhanced RA inflammation and Sema4D antibody inhibited mouse collagen arthritis. The 59th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology,

International Concurrent Workshop . Nagoya Japan, April 23-25, 2015.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

緒方 篤(OGATA Atsushi)

大阪大学・医学系研究科・招へい教授

研究者番号: 90309451

(2)研究分担者

田中 敏郎(TANAKA Toshio)

大阪大学・医学系研究科・寄付講座教授

研究者番号: 40273651

(3)連携研究者

熊ノ郷淳(KUMANOGOU Atsushi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 10294125

(4)研究協力者

吉田佑志 (YOSHIDA Yuji)