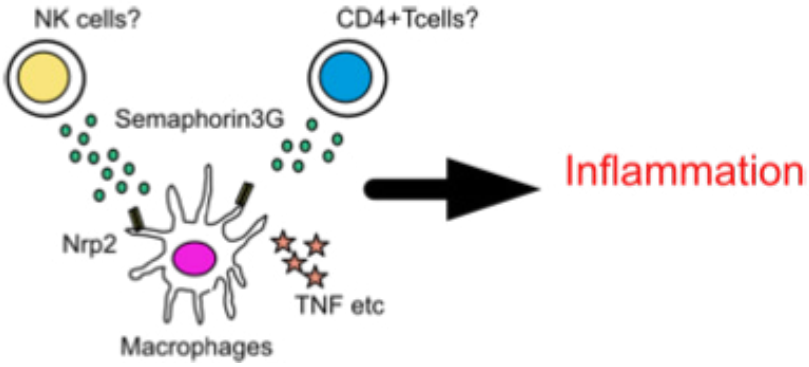
179　関節リウマチ病態におけるSemaphorin3Gの役割の解明	田中　繁

【目的】関節リウマチ（RA）は破壊性の慢性関節炎である。近年、生物学的製剤の登場によりその関節予後は改善したが、依然として寛解に至らない例がある。本研究は新規治療ターゲットを探索する目的で、メトトレキサート治療前後の RA 患者から CD4 陽性 T 細胞を採取し、その遺伝子発現の変化を検討したところ、Semaphorin3G の発現が有意に変動した。そこで RA 病態における Semaphorin3G の役割を解明することを目的とした。

【方法】1. 関節炎病態における Semaphorin3G 産生細胞と応答細胞を同定するため、コラーゲン誘導性関節炎モデルを用いて解析した。2. 関節炎病態における Sempahorin3G の役割を解明するため、Semaphorin3G 欠損マウスを用いてコラーゲン誘導性関節炎を解析した。3. マクロファージにおける Semaphorin3G－Nrp2 シグナルで誘導される遺伝子を解析した。

【結果】1. コラーゲン誘導性関節炎を惹起したマウスの関節において Semaphorin3G は CD2 陽性 CD11b 陽性の小型の細胞により産生されていた。また、Semaphorin3G の受容体である Nrp2 は主に F4/80 陽性のマクロファージに発現していた。2. *Semaphorin3G* 欠損マウスはコラーゲン誘導性関節炎に抵抗性であった。3. Bone marrow derived macrophage を IFNγで刺激すると Nrp2 の発現が強く誘導された。LPS で刺激した Bone marrow derived macrophage にリコンビナント Semaphorin3G を添加したところ、TNFαの産生が亢進した。

Semaphorin3G はマクロファージを活性化し、関節炎病態を悪化させる



179. 関節リウマチ病態における Semaphorin3G の役割の解明

田中　繁

千葉大学 医学部附属病院 アレルギー・膠原病内科

Key words：関節リウマチ，コラーゲン誘導性関節炎，Semaphorin3G，マクロファージ

緒　言

関節リウマチ（Rheumatoid Arthritis : RA）は破壊性の関節炎を特徴とする多因子疾患である。近年、RA に対する薬物治療は飛躍的な進歩を遂げた。特に生物学的製剤や JAK 阻害薬の登場によって RA 患者の関節機能予後は劇的に改善したが、依然として既存治療では寛解に至らない症例が一定数いる。

我々は RA の新規治療ターゲットを探索する目的で、無治療 RA 患者 28 名を対象として、RA 治療のアンカードラッグであるメトトレキサート（MTX）治療前および 3 ヶ月後の CD4 陽性 T 細胞から抽出した RNA を DNA マイクロアレイ実験に供して、MTX による遺伝子発現の変化を検討した。有意な発現変動を示した遺伝子のうち、Semaphorin3G に着目した。

Semaphorin3G は分泌型 Semaphorin であり、その受容体は Neuropilin-2（Nrp2）と Plexin の複合体である。これまで神経や血管系の発達に重要であると考えられていたが、近年の研究により Semaphorin は免疫系にも重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。しかしながら、Semaphorin3G の免疫系や RA 病態における役割は全く不明である。

そこで本研究では RA の病態における Semaphorin3G の関与を、マウス RA モデルであるコラーゲン誘導性関節（Collagen-induced arthritis : CIA）を用いて解析し、Semaphorin3G 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した。

方　法

1.　CIA における Semaphorin3G 産生細胞およびその標的細胞の同定

C57BL6 マウス（あるいは Sema3G レポーターマウス、$Sema3G^{+/LacZ}$; B6 background）に Chicken type Ⅱ collagen と Complete fraud's adjuvant のエマルジョンを Day0 と Day21 に免疫し、関節炎を惹起した。関節部を酵素的に分散し、関節浸潤細胞における Semaphorin3G 産生細胞およびその標的細胞である Nrp2 陽性細胞をフローサイトメトリー法で同定した。

2.　*Semaphorin3G* 欠損マウスにおける CIA の解析

Semaphorin3G 欠損マウス（$Sema3G^{LacZ/LacZ}$）あるいは *Semaphorin3G* ヘテロ欠損マウス（$Sema3G^{+/LacZ}$）に CIA を惹起し、経時的な臨床スコアとエンドポイントにおける関節浸潤細胞数を評価した。

3.　マクロファージにおける Semaphorin3G シグナルの解析

CIA モデルにおける Nrp2 陽性細胞の大多数はマクロファージであった。*In vitro* で Bone marrow-derived macrophage を Semaphorin3G で刺激した際の、サイトカイン産生に与える影響を評価した。

結　果

1. CIA マウス関節部では CD2 陽性 CD11b 陽性小型細胞が Semaphorin3G を産生し、マクロファージが Nrp2 を発現する

Sema3G$^{+/LacZ}$ に CIA を惹起し、関節部に浸潤する細胞を分取した。この細胞を *ex vivo* で刺激し、LacZ 陽性細胞（＝Semaphorin3G 産生細胞）をフローサイトメトリーで解析したところ、その大部分が CD2 陽性 CD11b 陽性の小型細胞であった。

次に C57BL6 マウスに CIA を惹起し、関節に浸潤している細胞の Nrp2 発現をフローサイトメトリーで解析した。興味深いことに Nrp2 陽性細胞の多くは CD11b 陽性 F4/80 陽性のマクロファージと思われる細胞集団であった（図 1）。

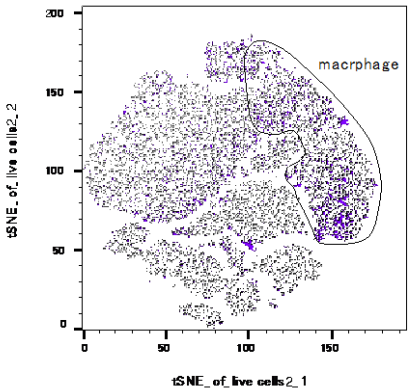


図 1.　関節炎局所における Nrp2 陽性細胞

関節浸潤細胞をフローサイトメトリーで解析し、Nrp2 陽性細胞の分布を tSNE プロットで示した。

灰色は生細胞、濃い紫は Nrp2 陽性細胞を示している。黒線で囲われた部分は Macrophage（CD11b 陽性 F4/80 陽性細胞）。

2. *Semaphorin3G* 欠損マウスは CIA に抵抗性である

Sema3G$^{+/LacZ}$ および Sema3G$^{LacZ/LacZ}$ に CIA を惹起し、臨床スコアを比較したところ、Sema3G$^{LacZ/LacZ}$ において有意に臨床スコアが改善した（2-way ANOVA、$p<0.05$）。同様に、関節部に浸潤する細胞数も Sema3G$^{LacZ/LacZ}$ において減少した（Mann-Whitney test、$p<0.05$）（図 2）。

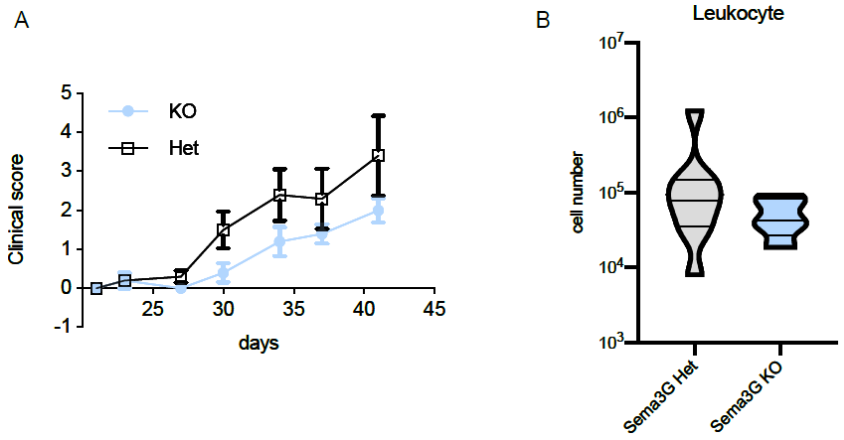


図 2.　Semaphorin3G 欠損マウスにおける CIA

A）　2 回目の免疫後から臨床スコアを 0～4 の 5 段階で記録し、経時的な変化を示した。

B）　Day42 にマウスを解剖し、後肢に浸潤する CD45 陽性細胞数を比較した。

KO：Sema3G$^{LacZ/LacZ}$、Het：Sema3G$^{+/LacZ}$。

3. Semaphorin3G は Bone marrow-derived macrophage からの炎症性サイトカイン産生を促進する

次に、マクロファージにおける Semaphorin3G—NRP2 シグナルについて解析するため、野生型マウスの骨髄細胞を用いて、Bone marrow-derived macrophage を作製した。Bone marrow-derived macrophage は Nrp2 をほとんど発現していなかったが、IFNγで刺激することで Nrp2 の発現が強く誘導された。次に、Bone marrow-derived macrophage を Recombinant Semaphorin3G の存在下／非存在下で 24 時間培養し、関節リウマチ病態に関連する炎症性サイトカインである TNFαの発現を定量的 PCR 法を用いて検討した。興味深いことに IFNγで刺激していない Bone marrow-derived macrophage では Recombinant Semaphorin3G 添加による TNFαの上昇は見られなかったが、IFNγで刺激した細胞では Recombinant Semaphorin3G 添加によって TNFαの発現が上昇した（図 3）。

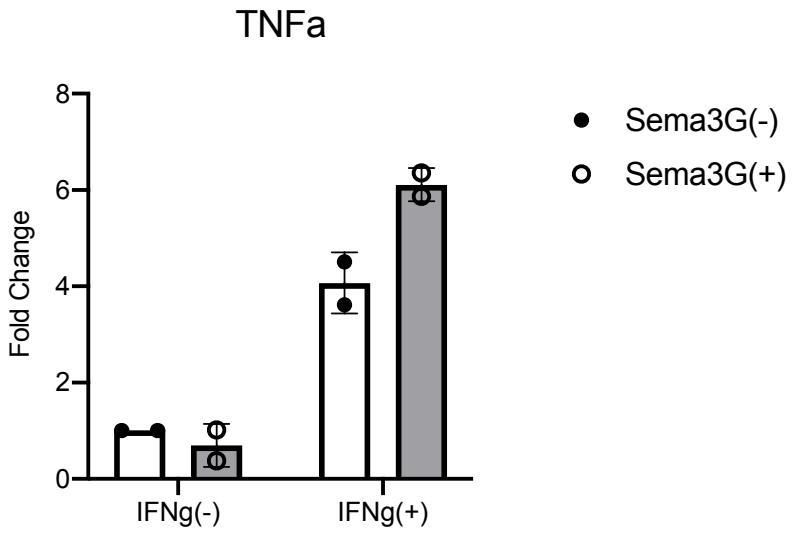


図 3. Semaphorin3G による炎症性サイトカイン誘導
Bone marrow-derived macrophage を作製し、TNFα産生における Semaphorin3G の効果を定量的 PCR 法で検討した。左側は IFNγ刺激なしの細胞、右側は IFNg 刺激ありの細胞における結果を示した。

考　察

Semaphorin は神経軸索の伸長過程におけるガイダンス因子として同定されたが、近年の研究によって免疫系や自己免疫性疾患の病態形成における重要性も明らかとなってきている［1]。本研究では RA 患者の MTX 治療前後で末梢血 CD4 陽性 T 細胞における遺伝子発現変化を網羅的に解析した結果、Semaphorin3G に着目した。マウス関節炎モデルである CIA の関節部においては Semaphorin3G の主な産生細胞は CD2 陽性 CD11b 陽性の小型細胞であった。リンパ球系の細胞マーカーである CD2 と骨髄系細胞のマーカーである CD11b をともに発現しており、かつ小型の細胞であることからこれらは成熟 NK 細胞の可能性がある［2]。また、Semaphorin3G の受容体である Nrp2 は主にマクロファージに発現していた。興味深いことに *in vitro* においては IFNγで刺激した際にマクロファージが Nrp2 を発現した。これらの結果から、活性化したマクロファージが Nrp2 を発現し、NK 細胞が産生する Semaphorin3G を受け取ることで TNFα等のサイトカインを介して関節炎病態を悪化させている可能性が示唆された。この仮説は、*Semaphorin3G* 欠損マウスはヘテロ欠損マウスと比べて CIA に抵抗性であることと一致する。

現在、Semaphorin3G 産生細胞の詳細に関する検討、*in vivo* における Nrp2 陽性マクロファージの表現型解析、Semaphorin3G がマクロファージに及ぼす影響の網羅的解析、そして RA 患者の滑膜における Semaphorin3G 及び Nrp2 陽性細胞の解析を進めている。これらの検討を加えることにより、Semaphorin3G—Nrp2 を標的とした RA 治療の基盤を構築することが可能であると考えている。

共同研究者・謝辞

本研究は千葉大学大学院医学研究院整形外科学の正田純平と千葉大学大学院医学研究院アレルギー・臨床免疫学の中島裕史の協力のもと行われた。

文　献

1） Nishide M, Kumanogoh A. The role of semaphorins in immune responses and autoimmune rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol. 2018;14(1):19-31. Epub 2017/12/08. doi: 10.1038/nrrheum.2017.201. PubMed PMID: 29213125.

2） Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, Roth C, Vivier E, Walzer T. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. Blood. 2009;113(22):5488-96. Epub 2009/02/24. doi: 10.1182/blood-2008-10-187179. PubMed PMID: 19234143.