



Title	新規の関節軟骨・骨破壊機構：非古典的 Semaphorin 4D シグナル経路
Author(s)	村上, 智彦
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2024, 68(2), p. 1-5
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/101989
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

新規の関節軟骨・骨破壊機構

—非古典的 Semaphorin 4D シグナル経路—

村上 智彦*

(令和6年4月4日受付)

はじめに

近年、日本は超高齢社会を迎え、関節リウマチや変形性関節症などの関節軟骨破壊を伴う疾患が増加している。それらの患者数は、日本だけでも関節リウマチ80万人、変形性関節症1000万人と推定されており、患者のQOLの低下に加え、その社会的経済的損失も甚大である。また、歯科領域においては、関節軟骨破壊を伴う疾患として、変形性顎関節症が知られている。したがって、関節軟骨破壊の理解とその制御法を確立することは、歯学および医学における重要な課題の一つであると言える。

関節軟骨の表層は非常に滑らかであり、関節の円滑な運動に必須である。組織的な特徴として、関節軟骨には、血管、神経およびリンパ管がない。したがって、関節軟骨は関節腔に満たされている滑液から栄養されることで組織の恒常性を保っている。一方、関節軟骨は再生能や修復能に乏しいことから、その破壊は、膝関節であれば歩行障害、顎関節であれば不正咬合などの病態に直結する。

関節軟骨の破壊には、自己免疫、機械的刺激、老化に伴う炎症が関与する。炎症反応により、活性化したリンパ球、マクロファージ、滑膜細胞などは炎症性サイトカインを産生する。この炎症サイトカインは、関節軟骨を破壊する細胞外マトリックス分解酵素の発現を誘導し、関節疾患の発症と進行に深く関与する。実際、関節リウマチの治療では、炎症性サイトカインであるIL-6やTNFのシグナル経路を遮断する分子標的薬が開発され、大きな治療成果をあげている。一方、こ

れらの治療法では治療効果の弱い患者群が2-3割程度存在することもわかつてき。このことは、IL-6やTNF以外の未同定の炎症性サイトカインが存在し、関節軟骨の破壊に関与していることを示唆している。本稿では、最近、筆者らが見出した関節軟骨の破壊と炎症に関与する新規炎症性サイトカインSemaphorin 4D(Sema4D)とその作用機序について紹介する。

Semaphorinとは

Semaphorinは神経細胞の軸索伸長を制御する因子として発見され、手旗信号(semaphore)から命名された¹⁾。このSemaphorinはSemaドメインを細胞外に有するタンパク質であり、現在20種類以上が同定されている²⁾。またSemaphorinの主な受容体であるPlexinもSemaドメインを細胞外に有し、細胞内ドメインでは主にRhoファミリー低分子量Gタンパク質と相互作用することで情報伝達を行う³⁾。Rhoファミリーは、細胞骨格の調整を司っており、神経軸索の伸長や方向の制御に関わる。

Semaphorinは膜結合型タンパク質として産生されるが、それに加え、タンパク質分解酵素により細胞外ドメインが切断されて分泌(shedding)される。すなわち、Semaphorinには膜結合型とsheddingによる分泌型が存在し、いずれも細胞間シグナル伝達物質として働く。Semaphorinの作用としては、神経軸索の制御に加え、免疫、骨代謝、血管新生などの制御にも関わることがわかっている⁴⁻⁷⁾。本稿で扱うSema4Dは関節リウマチ患者の滑液や血液中で上昇していることが報告

* 大阪大学大学院歯学研究科 生化学講座

されており⁸⁾、関節リウマチとの関連が提唱されているが、関節軟骨への作用は不明であった。最近、筆者らはSema4Dが関節軟骨を直接破壊する炎症性サイトカインとして機能することを見出し、関節リウマチの新たな発症機構を明らかにした⁹⁾。

関節軟骨破壊を誘導する因子 Sema4D の同定

関節軟骨の破壊には炎症が関わることから、炎症時に活躍するマクロファージなどの炎症細胞から関節軟骨の破壊シグナル因子が産生されている可能性が高い。実際、リボ多糖により炎症を惹起したマクロファージの細胞培養上清を関節軟骨細胞に作用させたところ、関節軟骨破壊マーカーである細胞外マトリックス分解酵素 Matrix metalloproteinase 13 (Mmp13) の発現を強力に誘導した。この培養上清を分子量にて分画化し、Mmp13誘導能が最も強い分画を質量分析したところ、分泌型Sema4Dを見出した⁹⁾。

Sema4Dの働きを確認するために、関節軟骨細胞にSema4Dを作用させると、濃度および時間依存的にMmp13の発現を誘導した。RNA-Seqによる網羅的遺伝子発現解析から、Sema4DはMmp13に加え、関節軟骨破壊に関わる細胞外マトリックス分解酵素 Adamts4, Adamts5, Mmp3, 破骨細胞分化誘導因子で骨破壊に関わるRANKL, 炎症性サイトカイン IL-6 の発現を促進させていた⁹⁾。この結果は、Sema4Dが炎症性サイトカインとしての機能を有しており、軟骨破壊、骨破壊、炎症の誘導に関わることを示していた。このSema4Dの炎症性サイトカインとしての機能は、成長軟骨細胞や骨芽細胞に対しても確認された。

関節リウマチモデルでの Sema4D の挙動と働き

関節リウマチモデルマウスを用いた解析から、Sema4Dは関節リウマチモデルの関節組織および滑液中で劇的に上昇していた。一方、血液中に含まれるSema4D濃度は緩やかな上昇に留まった。Sema4Dの免疫染色から、関節リウマチ関節組織のマクロファージ、リンパ球、破骨細胞がSema4Dを産生していた⁹⁾。以上の結果から、Sema4Dは、血液を介してではなく、関節リウマチの関節組織で産生され、集積することで関節破壊に関わっていることが示唆された。

関節リウマチの病態に対するSema4Dの関与を確認するために、Sema4D欠損マウスを用いた実験を行っ

た。その結果、Sema4D欠損マウスは関節リウマチ抵抗性を示した。逆に、Sema4Dを関節リウマチモデル関節腔に投与すると、関節破壊が進行した。一方、生体内では多様な因子によって関節破壊が生じると考えられる。Sema4Dが直接関節軟骨破壊を誘導するかを確認するために、マウス大腿骨頭を用いた器官培養にSema4Dを作用させたところ、関節軟骨破壊が誘導された⁹⁾。以上の結果から、Sema4Dはin vitro, ex vivo, in vivoにおいて関節軟骨破壊を誘導することが明らかになった。

既知の Sema4D シグナルとは異なる伝達経路

Sema4Dは関節軟骨細胞に作用し、Mmp13などの遺伝子発現を誘導することがわかったが、その遺伝子発現制御機構は不明であった。これを解決するために、まず関節軟骨細胞におけるSema4Dの受容体の同定を行った。Sema4Dは、主な受容体としてPlexinB1、その他として、PlexinB2、PlexinB3、CD72が知られている。関節軟骨細胞におけるSema4D受容体の発現を調べたところ、PlexinB1およびPlexinB2の発現が強かつた。PlexinB1およびPlexinB2ノックダウンの実験から、PlexinB2がSema4DによるMmp13誘導に重要なことが判明した。この結果は、PlexinB2欠損マウスを用いた関節軟骨細胞や関節組織の解析によってもサポートされた⁹⁾。多くの細胞では、PlexinB1が主要な受容体であると示されてきたが、関節軟骨細胞では、PlexinB2が主要な受容体であった。

これまでのSema4Dシグナルの多くはSema4D—PlexinB1—Rho（古典的Sema4Dシグナル経路）（図1）であり、細胞内シグナル伝達ではRhoシグナルが

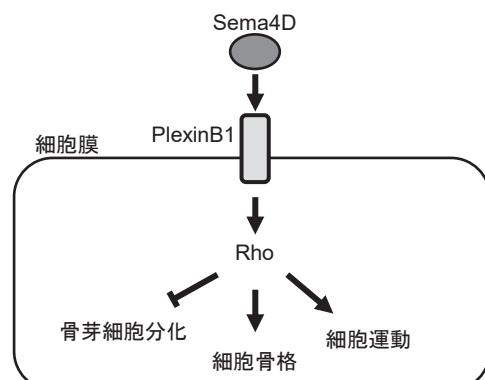


図1 古典的 Sema4D シグナル経路
PlexinB1 受容体から Rho シグナル経路を介して細胞内シグナルを伝達する。

中心的役割を果たしている。そこで、Sema4Dによる関節軟骨破壊作用にRhoシグナルの関与を検証するために、複数のRhoシグナルの阻害薬を用いた実験を行ったが、Rhoシグナルを遮断してもSema4DによるMmp13発現誘導作用は全く抑制されなかった⁹⁾。このことから、関節軟骨破壊作用においてRhoシグナルは核内に情報を伝え、遺伝子発現を制御する経路ではないことがわかった。

非古典的Sema4Dシグナル経路の発見

Sema4Dの受容体であるPlexinBは、c-MetやErbBといった受容体と相互作用することが報告されており、c-MetやErbBがSema4DによるMmp13の発現誘導に関わっている可能性が考えられた。解析の結果、ErbBを阻害しても、Sema4Dの作用は影響を受けなかつたが、c-Metを阻害すると、Sema4Dの作用が抑制された。さらに、関節軟骨細胞にSema4Dを作用させると、c-Metの下流であるRas—MEK—Erk1/2経路の活性化が見出された。Ras—MEK—Erk1/2経路を阻害すると、Sema4DによるMmp13の発現誘導が抑制された。一方、c-MetのリガンドであるHGFだけではMmp13を誘導できなかったことから、PlexinB2の

下流シグナルがメイン経路であることが示唆された⁹⁾。

PlexinB2の下流シグナルを探索するために、関節軟骨細胞を用いてSema4D依存的にPlexinB2に結合するタンパク質を網羅的に検索した結果、TRAF2が同定された。実際、TRAF2 KOマウス由来関節軟骨細胞において、Sema4Dの遺伝子発現誘導効果が阻害されていた。さらに、関節軟骨細胞にSema4Dを添加すると、TRAF2の下流として知られるNF-κBが活性化していた⁹⁾。したがって、関節軟骨細胞において、Sema4Dは、PlexinB2—TRAF2—NF-κB経路とc-Met—Ras—MEK—Erk1/2経路がクロストークし、非古典的シグナル伝達経路を構成し、核内に情報伝達していると考えられる（図2）。

非古典的Sema4Dシグナルによって誘導される転写因子

Sema4DはMmp13、Mmp3、Adamts4、Adamts5、RANKLおよびIL-6の発現を誘導するが、この誘導にはNF-κBだけではなく、新規合成される転写因子が必要であった。そこで、関節軟骨細胞にSema4Dを作用させ、発現上昇する転写因子をRNA-Seqにて網羅的に探索した。その結果、IκBζとC/EBPδが強力に発現

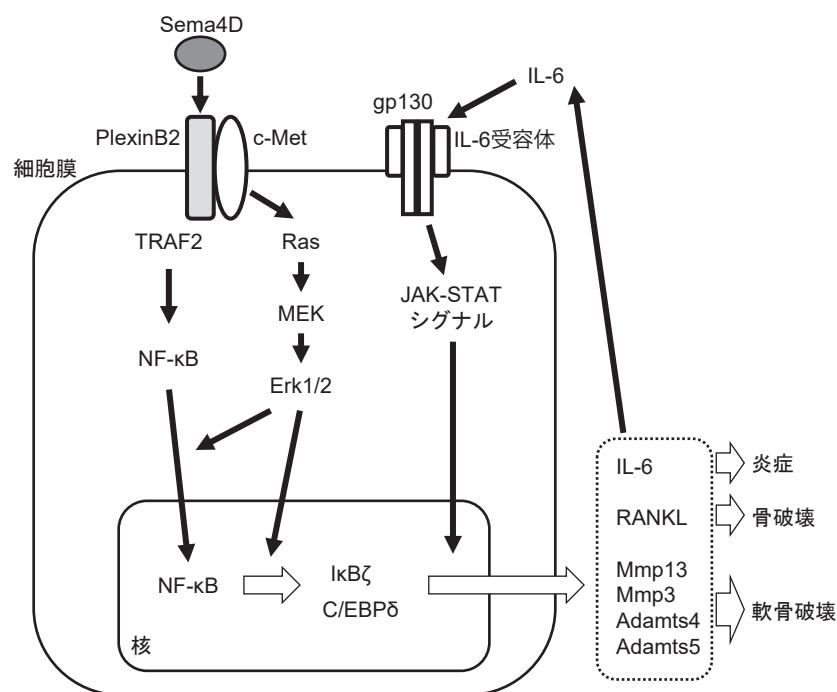


図2 非古典的Sema4Dシグナル経路

PlexinB2—TRAF2—NF-κB経路とc-Met—Ras—MEK—Erk1/2経路がクロストークし、軟骨破壊・骨破壊・炎症を誘導する。また、これら非古典的Sema4Dシグナル経路はIL-6経路と協調して、関節破壊の進行に関わる。

誘導していることがわかった。I κ B ζ を過剰発現すると、Mmp13, Mmp3 および C/EBP δ の発現が誘導され、C/EBP δ を過剰発現すると、Mmp13 の発現が誘導された。また、I κ B ζ KO マウス由来の関節軟骨細胞では、Sema4D の作用が抑制された⁹⁾。したがって、非古典的 Sema4D シグナルは I κ B ζ と C/EBP δ を介して、遺伝子発現を誘導していた（図 2）。

非古典的 Sema4D シグナルと IL-6 シグナルの相乗効果

Sema4D は、関節軟骨細胞において IL-6 の遺伝子発現およびタンパク質産生を誘導する。このため、Sema4D 存在下の関節軟骨細胞は、IL-6 にも曝されることから、非古典的 Sema4D シグナルと IL-6 シグナルが共に活性化することが推察された。実際、Sema4D の作用が抗 IL-6 中和抗体により部分的に阻害されること、Sema4D と IL-6 が相乗的に Mmp13 および Mmp3 の発現を増加させることを確認している⁹⁾。したがって、Sema4D は、直接的には、非古典的シグナルとして PlexinB2—TRAF2—NF- κ B 経路と c-Met—Ras—MEK—Erk1/2 経路を活性化し、I κ B ζ と C/EBP δ を介して関節破壊を誘導し、それに加え、IL-6—JAK—STAT シグナルと協調して、関節破壊をさらに促進させていると考えられる（図 2）。

おわりに

関節破壊は、骨破壊と軟骨破壊に大きく分けられる。骨破壊に関しては、破骨細胞分化誘導因子 RANKL が重要な役割をしており、抗 RANKL 抗体の開発により、関節リウマチの骨破壊を直接抑制することに成功している。一方、抗 RANKL 抗体では軟骨破壊は抑制できない。また、関節軟骨破壊が主な病態である変形性関節症の治療としては、軽度であれば鎮痛薬やヒアルロン酸注入などの対症療法、重度であれば人工関節置換術が行われている。このように、関節軟骨破壊を直接抑止する治療法や再生法は確立されておらず、関節軟骨の破壊を抑制する薬や再生を促す薬が望まれている。今回見出した Sema4D による関節リウマチの発症機構は、関節軟骨破壊の新たな治療戦略に利用できると考えられる。

現在、Sema4D は、関節リウマチだけではなく、進行固形腫瘍や多発性硬化症との関連も報告されており、

進行固形腫瘍や多発性硬化症の治療を対象とした抗 Sema4D 抗体の開発が進んでいる¹⁰⁾。抗 Sema4D 抗体の開発が順調に進めば、関節リウマチの治療への適用が期待される。一方、抗 Sema4D 抗体が実用化されるかは不明であることからも他の治療戦略を進めておく必要がある。そこで、筆者らは、非古典的 Sema4D シグナルを阻害することを目的に、低分子化合物および核酸医薬による関節リウマチの新しい治療法確立を目指している。特に、低分子化合物の探索には適切なハイスループットスクリーニングシステム（HTS）の構築が重要であるが、筆者らは HTS に応用できる遺伝子発現モニタリングシステムの開発に成功している¹¹⁾。このシステムは標的遺伝子の発現を高感度かつ迅速に測定できるため、これを応用して、非古典的 Sema4D シグナルを特異的に抑制する阻害薬の開発を進めている。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、大阪大学大学院歯学研究科 生化学講座 西村理行教授および教室員、大阪大学大学院医学系研究科 蟻名耕介准教授、大阪大学大学院歯学研究科 口腔病理学講座 廣瀬勝俊助教 豊澤悟教授、東京医科歯科大学医歯学総合研究科 浅原弘嗣教授はじめとする共同研究者の方々に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Kolodkin, A. L., Matthes, D. J. and Goodman, C. S. (1993): The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* **75**: 1389–1399.
- 2) Tran, T. S., Kolodkin, A. L. and Bharadwaj, R. (2007): Semaphorin regulation of cellular morphology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 263–292.
- 3) Liu, B. P., and Strittmatter, S. M. (2001): Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 619–626.
- 4) Kumanogoh, A. and Kikutani, H. (2013): Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins. *Nat Rev Immunol* **13**: 802–814.
- 5) Negishi-Koga, T., Shinohara, M., Komatsu, N., Bito, H., Kodama, T., Friedel, T. R. H. and Takayanagi, H. (2011): Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat Med* **17**: 1473–1480.
- 6) Hayashi, M., Nakashima, T., Taniguchi, M., Kodama, T., Kumanogoh, A. and Takayanagi, H. (2012): Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature* **485**: 69–

- 74.
- 7) Kang, S. and Kumanogoh, A. (2013): Semaphorins in bone development, homeostasis, and disease. *Semin Cell Dev Biol* **24**: 163–171.
 - 8) 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. (2015): Semaphorin 4D Contributes to Rheumatoid Arthritis by Inducing Inflammatory Cytokine Production: Pathogenic and Therapeutic Implications. *Arthritis Rheumatol* **67**: 1481–1490.
 - 9) Murakami, T., Takahata, Y., Hata, K., Ebina, K., Hirose, K., Ruengsinpinya, L., Nakaminami, Y., Etani, Y., Kobayashi, S., Maruyama, T., Nakano, H., Kaneko, T., Toyosawa, S., Asahara, H. and Nishimura, R. (2022): Semaphorin 4D induces articular cartilage destruction and inflammation in joints by transcriptionally reprogramming chondrocytes. *Sci Signal* **15**: eabl5304.
 - 10) Nishide, M. and Kumanogoh, A. (2018): The role of semaphorins in immune responses and autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* **14**: 19–31.
 - 11) Murakami, T., Ruengsinpinya, L., Takahata, Y., Nakaminami, Y., Hata, K. and Nishimura, R. (2023): HOXA10 promotes Gdf5 expression in articular chondrocytes. *Sci Rep* **13**: 22778.