

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461326

研究課題名(和文)セマフォリン3Gによる膵細胞の恒常性維持機構解明と糖尿病治療への応用

研究課題名(英文) Investigation of the role of Semaphorin 3G in the homeostasis of pancreatic alpha cells and the application to the therapy against diabetes.

研究代表者

河村 治清 (Kawamura, Harukiyo)

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号：70527902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、セマフォリン3G(Sema3G)がグルカゴン分泌を調節し、糖代謝の恒常性維持に寄与しているという仮説のもと行われた。

sema3gノックアウトマウスを用いた解析で、膵細胞の増加および、pancreas duodenum homeobox 1(Pdx1)、Neurogenin3(Ngn3)といった膵内分泌細胞の分化、機能維持に必須の転写因子の発現亢進を認めた。一方で、グルカゴンは低値であり、膵島周囲の神経細胞の増加、膵島内への交感神経終末の貫入を認めた。以上より、Sema3Gは膵細胞の増殖・分化および、神経網の構築に関与し、グルカゴン分泌に重要な役割を果たしているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study was performed on the basis of the hypothesis that Semaphorin 3G (Sema3G) regulated glucagon secretion and contribute to the homeostasis of glucose metabolism. Analysis of Sema3G deficient mice shows increase of pancreatic cells and elevated expression of pancreas duodenum homeobox 1 (Pdx1) and Neurogenin3 (Ngn3), transcription factors essential for the differentiation and function maintenance of pancreatic endocrine cells. On the other hand, serum glucagon level was low and it was found that nerve cells were increased on the periphery of pancreatic islets and sympathetic nerve ending intruded into islets. These results indicates that Sema3G plays an important role in glucagon secretion by regulating proliferation and differentiation of pancreatic cells and the organization of nerve network.

研究分野：代謝学

キーワード：セマフォリン3G グルカゴン 膵細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 【糖尿病におけるグルカゴン分泌異常の重要性】

糖尿病はインスリン作用の不足により生じる慢性高血糖を主徴とする代謝疾患群と定義され、インスリン作用不足は、膵細胞からのインスリン分泌の低下、および肝臓、筋肉、脂肪などの標的器官におけるインスリンに対する反応性の低下を原因とする。そのため、これまでは、インスリンの補充や膵β細胞からのインスリン分泌の促進、そしてインスリン抵抗性の改善を目指した治療が行われてきた。しかし一方で、糖尿病ではインスリン拮抗ホルモンの増加により、インスリン作用が低下していることも知られており、その中でも中心的な役割を持つグルカゴンの作用が、グルカゴン分泌抑制作用を持つとされるインクレチン関連薬の登場とともに、注目を集めている。

通常、グルカゴンは飢餓状態のときに膵α細胞から分泌され、主に肝臓に作用し、グリコーゲンの分解、糖新生を促進することで、血糖値を維持している。しかし、**糖尿病患者では、グルカゴン分泌調節異常が存在する。**つまり、食前のグルカゴン分泌が増加しているうえ、食後もグルカゴン分泌の抑制がみられず、逆に奇異性上昇を呈する例もある。このことから、糖尿病における食後高血糖にはインスリン分泌不全のみでなく、グルカゴンの過剰分泌が寄与しており、グルカゴンは糖尿病の病態形成に不可欠の役割を果たしていると考えられている。

グルカゴンの分泌調節機構としては、膵細胞自身がグルコースの変化を感知し、KATPチャネルの活性化を介してグルカゴンの分泌が抑制されるという機構に加え、周辺細胞や栄養素によるパラクライン調節を受けていると考えられている。膵細胞から分泌されるインスリン、亜鉛、GABA、アミリンはグルカゴン分泌を抑制し、また、膵細胞から分泌されるソマトスタチンもグルカゴン分泌を抑制し、GLP1によるグルカゴン分泌抑制作用の一端を担うものと考えられている。アミノ酸は促進的に、遊離脂肪酸、ケトン体は抑制的にグルカゴン分泌に作用すると考えられている。しかし、膵細胞のグルカゴン分泌調節の分子機構は不明な点が多く、明確には証明されていない。糖尿病において、なぜグルカゴン分泌調節異常が認められるのかは未だ明らかではなく、膵細胞機能の詳細を解明することは糖尿病の病態を知る上で極めて有用であると考えられる。

### (2) 【Sema3Gの膵島機能における役割】

申請者らは、これまで、腎系球体上皮細胞に特異的に発現している遺伝子として、セマフォリン 3G (Sema3G) を同定し、機能解析を行ってきたが、この分子が膵細胞の恒常性維持に関与している可能性を見出した。

まず、Sema3G 遺伝子の発現様式を、Sema3G 欠損マウス作製時にノックアウト

コンストラクトに LacZ 遺伝子を導入し、βガラクトシダーゼ染色を行うことで、詳細に検討した結果、**Sema3g は糸球体のみならず、膵臓でも発現していることを発見した。**

Sema3G は分泌型のセマフォリン分子である。セマフォリンはもともと、神経軸索の反発因子として同定されたが、その後、血管新生や免疫の制御など多彩な機能を有していることが明らかになっており、Sema3G も血管新生への関与が推察されている (Kutschera et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31(1):151, 2011)。Sema3G を含むセマフォリンは、細胞膜受容体であるニューロピリン (NRP) と結合することが示されており、膵α細胞は NRP を発現していることが報告されているものの、これまでセマフォリンが膵島機能及ぼす影響は全く知られていない。

## 2. 研究の目的

新規のセマフォリン分子であるセマフォリン 3G (Sema3G) がグルカゴン分泌を調節し、糖代謝の恒常性維持に寄与しているという仮説のもと、Sema3G ノックアウトマウスおよび培養膵α細胞を用いて、グルカゴン分泌調節のメカニズムを解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) Sema3G 欠損マウスにおける膵内分泌細胞の形態学的解析

糖尿病におけるグルカゴン分泌異常には膵細胞容積の変化が関与している可能性が報告されており、申請者らの行った予備実験の結果からは、Sema3G が膵α細胞容量を調節していることが示唆される。そこで、Sema3G 欠損マウスにおいて、高脂肪餌負荷、また、ストレプトゾトシン (STZ) 投与による糖尿病惹起を行い、膵α、β、δ細胞の局在、構成比、増殖、アポトーシスなどを解析する。増殖は BrdU 染色、アポトーシスは TUNEL 染色、カスパーゼ3の活性変化などで評価する。

### (2) Sema3G 欠損マウスにおける膵島の血管網、神経網の形態学的解析

膵細胞におけるグルカゴン分泌は周辺細胞からの分泌物質や栄養素、自律神経などによっても調節を受けており、微小循環や神経系の関与も重要である。セマフォリンは元来、神経軸索に対する反発因子として同定された分子であり、さらに、血管新生へも関与することから、Sema3G 欠損マウスでは膵島周囲の神経、膵島内部の血管網の異常を生じている可能性が考えられ、これらの構造を免疫染色法および電子顕微鏡を用いて詳細に解析する。

### (3) Sema3G 欠損マウスにおける糖代謝制御機構の解析

Sema3G 欠損マウスにブドウ糖負荷試験を行い、グルコース誘導性インスリン分泌能、グルカゴン分泌抑制能を評価する。また、インスリン負荷試験にて、インスリン抵抗性お

よび低血糖に対するグルカゴンの分泌反応を評価する。さらに、絶食、再摂食時における、肝臓のグリコーゲン含量、ホスホエノールピルビン酸カルボキシナーゼ、グルコース-6-ホスファターゼ遺伝子の発現を測定し、肝グリコーゲン代謝、肝糖新生調節能を評価する。

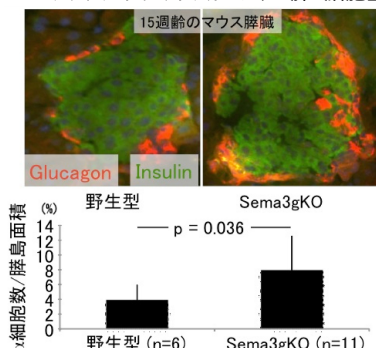
#### 4. 研究成果

ノックアウトコンストラクトに LacZ 遺伝子を導入した *sema3g* LacZ/+マウスを用いた基礎検討で、膵臓においても *Sema3G* が発現していることが確認されていたが、膵臓における発現細胞を明らかにするため、ガラクトシダーゼと膵島構成細胞の特異的マーカーに対する二重染色を行った。その結果、ガラクトシダーゼとインスリンとの共染色を認め、*Sema3G* は膵細胞に発現していることが示唆された。また、膵島外では PECAM との共染色がみられ、血管内皮細胞にも発現しているものと考えられた。一方で、*Sema3G* の受容体として報告されているニューロピリン2はグルカゴンと共発現しており、膵細胞で発現していることが免疫染色で明らかになった。このことより、膵細胞で分泌された *Sema3G* が膵細胞にパラクラインに作用しうることが示唆された。

さらに、*Sema3G* の糖代謝における影響を明らかにするため、*Sema3G* ノックアウトマウスの解析をすすめた。空腹時の血中グルコースおよび、インスリン濃度は野生型マウスと同程度であり、腹腔内ブドウ糖負荷試験でも血中グルコース濃度の反応性に有意な差はみられなかった。一方で、**空腹時の血中グルカゴン濃度は *sema3g* ノックアウトマウスにおいて有意に低値**であり、*Sema3G* が膵細胞に作用し、グルカゴン分泌に影響を及ぼしていることが示唆された。

次いで、*sema3g* ノックアウトマウスにおける、膵島の形態変化を検討したところ、膵島の数および大きさ、膵細胞、膵細胞の割合は野生型に違いがみられなかったものの、**膵細胞が約2倍に増加している**ことが免疫染色にて明らかになった(図1)。膵細胞増加の機序を明らかにするため、膵細胞の増殖およびアポトーシスをそれぞれ、PCNA 染色、TUNEL 染色で解析したが、*sema3g* ノックアウ

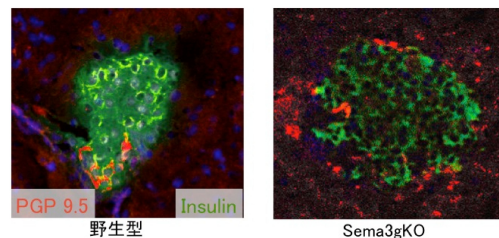
図1 *Sema3G* ノックアウトマウスにおける膵α細胞量の変化



トマウスと野生型マウスでは違いはみられなかった。一方、*Sema3g* ノックアウトマウスの膵島では**膵内分泌細胞の分化、機能維持に必須の *pancreas duodenum homeobox 1 (Pdx1)*、*Neurogenin3 (Ngn3)* といった転写因子の発現が亢進している**ことが RT-PCR にて明らかとなった。このことより、***Sema3G* は分化を抑制することにより膵細胞数を減少させる**ことが考えられた。

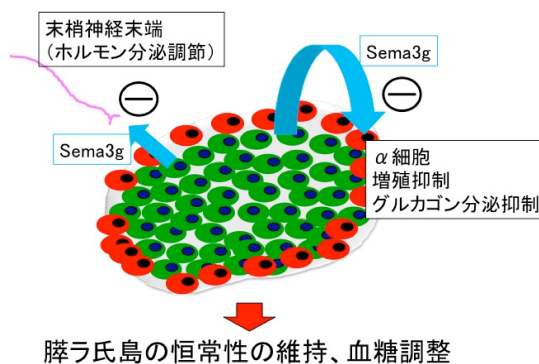
膵島機能には自律神経や血管網も重要な役割を果たしているが、セマフォリンは、神経軸索の反発因子であり、血管新生への関与も知られているため、膵島における神経や血管網の走行をそれぞれ、PECAM、PGP9.5 に対する免疫染色で検討した。その結果、*sema3g* ノックアウトマウスでは、血管網は野生型マウスと同様であったものの、**膵島周囲の神経細胞の数が多く、また、野生型ではほとんどみられない、膵島内への貫入を多く認めた**(図2)。この膵島内への神経の貫入は電子顕微鏡による観察でも確認された。さらに、膵島内へ貫入している神経は tyrosine hydroxylase 陽性であり、交感神経終末であることが示された。一方で抗 vesicular acetylcholine transporter 抗体の免疫染色では副交感神経の走行には違いはみられなかった。

図2 *Sema3G* ノックアウトマウスにおける膵島神経網の変化



以上のことから、***Sema3G* は膵細胞の増殖・分化のみならず、神経網の構築に関与している可能性が考えられ、神経の走行異常のため空腹時のグルカゴン分泌が低下している**可能性が考えられた(図3)。

図3 膵島機能維持における *Sema3G* の役割



#### 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)

Ishibashi R, Takenoto M, Akimoto Y, Ishikawa T, He P, Maezawa Y, Sakamoto K, Tsurutani Y, Ide S, Ide K, Kawamura H, Kobayashi K, Tokuyama H, Tryggvason K, Betsholtz C, Yokote K. (2016) A novel podocyte gene, semaphorin 3G, protects glomerular podocyte from lipopolysaccharide-induced inflammation. *Sci Rep*, 16; 6:25955 (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

第 79 回日本循環器学会学術集会  
Functional analysis of Semaphorin 3G in atherosclerosis development  
Masaya Yamaga, Harukiyo Kawamura, Kazuki Kobayashi, Hirotake Tokuyama, Yoshiro Maezawa, Takahiro Ishikawa, Ryouichi Ishibashi, Kenichi Sakamoto, Akiko Hattori, Mayumi Shoji, Peng He, Minoru Takenoto, Koutaro Yokote 2015 年 4 月 24 日～26 日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

第 52 回日本臨床分子医学会学術集会  
Semaphorin 3G の粥状動脈硬化形成における機能解析

山賀 政弥、河村 治清、小林 一貴、徳山 宏文、前澤 善朗、石川 崇広、石橋 亮一、坂本 憲一、井出佳奈、竹本 稔、横手 幸太郎 2015 年 4 月 10 日～11 日、みやこめっせ(京都府京都市)

第 29 回 日本糖尿病合併症学会  
粥状動脈硬化形成における Semaphorin 3G の機能解析

山賀 政弥、河村 治清、竹本 稔、小林 一貴、徳山 宏文、前澤 善朗、石川 崇広、大西 俊一郎、石橋 亮一、賀 鵬、北本 匠、坂本 憲一、服部 暁子、正司 真弓、横手 幸太郎 2014 年 10 月 3 日～4 日、都市センターホテル(東京都千代田区)

9<sup>th</sup> Metabolic Syndrome, Type2 Diabetes and Atherosclerosis Congress  
Protective effect of Semaphorin 3G on atherosclerosis development

Masaya Yamaga, Harukiyo Kawamura, Kazuki Kobayashi, Hirotake Tokuyama, Takahiro Ishikawa, Ryouichi Ishibashi, Kenichi Sakamoto, Akiko Hattori, Peng He, Minoru Takenoto, Koutaro Yokote 2014 年 9 月 12 日～14 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

第 46 回 日本動脈硬化学会総会 学術集会  
粥状動脈硬化形成における Semaphorin 3G の機能解析

山賀 政弥、河村 治清、竹本 稔、小林 一貴、徳山 宏文、前澤 善朗、石川 崇広、石橋 亮一、賀 鵬、坂本 憲一、服部 暁

子、正司 真弓、横手 幸太郎 2014 年 7 月 10 日～11 日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

第 57 回 日本糖尿病学会年次学術集会  
粥状動脈硬化形成における Semaphorin 3G の機能解析

山賀 政弥、河村 治清、竹本 稔、小林 一貴、徳山 宏文、前澤 善朗、石川 崇広、大西 俊一郎、石橋 亮一、賀 鵬、北本 匠、坂本 憲一、服部 暁子、正司 真弓、横手 幸太郎 2014 年 5 月 22 日～24 日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting

Protective effect of Semaphorin 3G on atherosclerosis development

Yamaga M, Kawamura H, Kobayashi K, Tokuyama H, Ishikawa T, Onishi S, Ishibashi R, Okabe E, Sakamoto K, Hattori A, Shoji M, He P, Takenoto M and Yokote K 2014 年 4 月 14 日～17 日、みやこめっせ(京都府京都市)

〔図書〕(計 0 件)

該当せず

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称: 該当せず

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: 該当せず

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 治清(KAWAMURA Harukiyo)

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授  
研究者番号: 70527902

(2) 研究分担者

小林 一貴(KOBAYASHI Kazuki)

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号： 30400998

竹本 稔 (TAKEMOTO Minoru)  
千葉大学・大学院医学研究院・特任教授  
研究者番号： 60447307

徳山 宏丈 (TOKUYAMA Hirotake)  
千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授  
研究者番号： 90385039

(3)連携研究者  
該当なし

(4)研究協力者  
該当なし