

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670362

研究課題名(和文)腸管免疫におけるセマフォリンシグナルを標的とした生活習慣病発症機序の解明

研究課題名(英文)The role of Semaphorin signaling in pathogenesis of obesity and fatty liver
-possible implication of gastrointestinal biota.

研究代表者

横手 幸太郎 (Yokote, Koutaro)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20312944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮に発現するSemaphorin3G(以下Sema3G)を同定し、このKOマウスを用いて腸内細菌叢ならびに高脂肪食負荷による代謝の変化を検討した。Sema3G KOではBacteroides門がFirmicutes門に比して増加する傾向が見られた。メタゲノム解析ではSema3G KOにおいてはCyanobacteriaが増加、Verrucomicrobiaの減少がみられた。また、高脂肪食負荷では、KOマウスでは耐糖能が良好で、インスリン感受性がよく、脂肪肝が軽減される事が分かった。

研究成果の概要(英文)：We previously identified a novel secretory Semaphorin, Semaphorin3G (Sema3G), that is expressed in vascular endothelial cells. We then evaluated the roles of Sema3G in gut microbiota and its implication in pathogenesis of the life-style related diseases including obesity and fatty liver disease. Metagenome analysis showed that Sema3G KO gut microbiota included more Bacteroides and less Firmicutes. In addition, Sema3G KO showed more Cyanobacteria and less Verrucomicrobia. Metabolic analysis revealed that Sema3G KO mice showed better glucose tolerance, better insulin sensitivity, and the fatty liver was less severe compared to wild type mice after high fat diet.

研究分野：老年医学

キーワード：セマフォリン 腸内細菌 耐糖能 肥満 脂肪肝

1. 研究開始当初の背景

近年、腸内細菌叢や腸管免疫の変化と肥満との関連を示唆する報告が相次いでいる。肥満者と非肥満者では腸内細菌叢のFirmicutes 門の比率が増加しBacteroides 門の比率が低下することや、腸内細菌叢の変化に伴い脂肪分解に関わるAngptl4/Fiaf などの遺伝子が発現変化し肥満と関連すること、さらに腸内細菌叢の多様性が肥満症における合併症の罹患率にも相関することが報告されている。近年、我々は動脈硬化の新しい治療法の開発を目的として、血管特異的な遺伝子の網羅的な同定を行った。その結果、血管特異的遺伝子としてSemaphorin3G (Sema3G)を同定した。Semaphorin は神経成長円錐に対する反発分子として同定されたガイドンス分子であるが、多彩な生物学的作用を有することが報告されている。これまでの検討ではSema3G ノックアウトマウス (Sema3G KO)は野生型に比し肥満を来す事、ApoE KOマウスと交配すると動脈硬化病変が悪化すること、Sema3G KOでは糖尿病性腎症が悪くなることが示唆されている。

2. 研究の目的

これまでの研究の背景や研究成果のもと、本研究ではSema3G KO マウスに観察される肥満の原因に関して、腸内細菌叢や腸管免疫に焦点をあてて検討する。さらにSemaphorin シグナルの増強により肥満を中心とした、脂肪肝などの生活習慣病を予防できるかを検証する。

3. 研究の方法

1.Sema3G と腸内細菌叢との関連を明らかにする。

(1) Sema3G KO マウスならびに野生型マウスの腸内細菌叢の変化を16SrRNAの遺伝子配列解析、メタゲノム解析にて解析する。遺伝性肥満マウスであるob/ob マウスでは対照に比し通常餌においても腸内細菌叢が異なること

が報告されており(Turnbaugh PJ et al. Nature. 2006)、腸内細菌叢は環境要因のみならず遺伝的要因にも左右されることが示されている。本解析によりSema3G の直接的な腸内細菌叢への影響が明らかとなる。

(2)通常食、高脂肪食負荷時のSema3G遺伝子/蛋白発現に与える影響をreal-time PCR 法やウェスタンブロット法、免疫組織染色法にて観察する。

(3)Sema3G KOマウスを用いて、通常食、高脂肪食負荷時の耐糖能、インスリン感受性、脂肪肝の程度、肝臓における炎症反応や代謝異常について検討する。

4. 研究成果

(1) Sema3G KO マウスの腸内細菌叢メタゲノム解析

Sema3G KO マウスの便を用いて腸内細菌叢ならびに高脂肪食負荷による代謝の変化を検討した。代表的な腸内細菌であるFirmicutes 門およびBacteroides 門の細菌量をリアルタイム PCR にて測定したところ、野生型においてはBacteroides とFirmicutes は全菌種のそれぞれ 25%程度を占めておりほぼ同等であった。一方、Sema3G KO ではBacteroides がFirmicutes に対し相対的に増加する傾向が見られた。平均のBacteroides/Firmicutes 比は野生型 1.05、ノックアウト 1.30 であり、有意差には至らなかった。

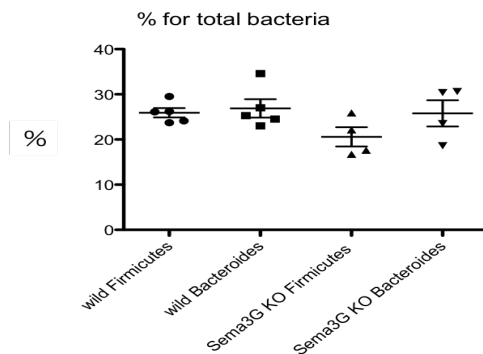


図 1

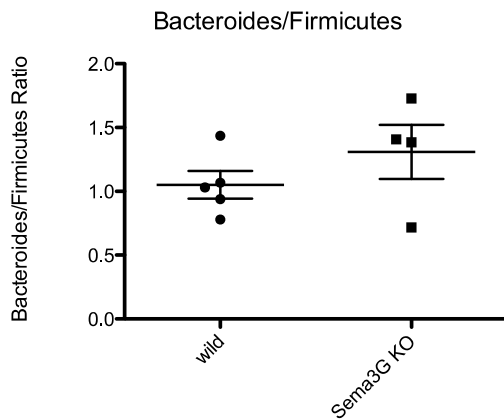


図2

更に、メタゲノム解では Sema3G KO においては先述の Bacteroides と Firmicutes の変化とともに、Cyanobacteria が増加、Verrucomicrobia の減少がみられ、また、Bacteroides 門の中では Bacteroidales が増加し、Firmicutes 門の中では Clostridiales の減少がみられた。

(2) Sema3G KO マウスの代謝異常

野生型ならびに Sema3G KO マウスにつき高脂肪食を負荷して検討した。すると、KO マウスでは野生型に比較して、インスリン感受性がよく、高脂肪食による耐糖能障害が軽減される事が判明した。

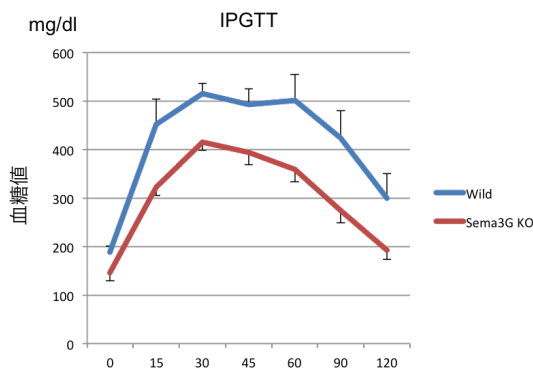


図3

さらに、高脂肪食の一種である高脂肪コリン欠乏メチオニン減量食の影響を検討した。このモデルでは比較的短期間に脂肪肝炎、肝線維化にいたるので、これらの病態を評価する事が出来る。肝臓における炎症性サイトカインの発現は、KO マウスで減少する傾向がみられた。さらに、高脂肪コリン欠乏メチオニ

ン減量食下で見られる肝の線維化について、マッソントリクローム染色を用いて検討したところ、線維化面積は Sema3G KO マウスにおいて減少している事が判明した。また、KO マウスは野生型よりも普通食では体重増加する傾向があったが、高脂肪食であると明らかな体重の差は見られなかった。以上より、Sema3G は腸内細菌に影響している事、また高脂肪食下で脂肪肝を促進し、インスリン抵抗性を促進していると想定されるが、未だそのメカニズムは不明のままであり、今後もこの解明に取り組んでいく。

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 44 件)全て査読あり

1. A novel podocyte gene, semaphorin 3G, protects glomerular podocyte from lipopolysaccharide-induced inflammation. Ishibashi R, Takemoto 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. *Sci Rep*. 2016 May 16;6:25955. doi: 10.1038/srep25955.
2. Improved Glycemic Control and Vascular Function and Reduction of Abdominal Fat Accumulation with Liraglutide in a Case of Werner Syndrome with Diabetes Mellitus. Ide S, Yamamoto M, Takemoto M, Fujimoto M, Ide K, Kobayashi K, Yokote K. *J Am Geriatr Soc*. 2016 Mar;64(3):687-8. doi: 10.1111/jgs.13970. No abstract available.
3. Matricellular protein CCN3 mitigates abdominal aortic aneurysm. Zhang C, van der Voort D, Shi H, Zhang R, Qing Y, Hiraoka S, Takemoto M, Yokote K, Moxon JV, Norman P, Rittié L, Kuivaniemi H, Atkins GB, Gerson SL, Shi GP, Golledge J, Dong N, Perbal B, Prosdocimo DA, Lin Z. *J Clin Invest*. 2016 Apr 1;126(4):1282-99. doi: 10.1172/JCI82337. Epub 2016 Mar 14.
4. Cushing Syndrome Due to ACTH-Secreting Pheochromocytoma, Aggravated by Glucocorticoid-Driven Positive-Feedback Loop. Sakuma I, Higuchi S, Fujimoto M, Takiguchi T, Nakayama A, Tamura A, Kohno T, Komai E, Shiga A, Nagano H, Hashimoto N, Suzuki S, Mayama T, Koide H, Ono K, Sasano H, Tatsuno I, Yokote K, Tanaka T. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Mar;101(3):841-6. doi: 10.1210/jc.2015-2855. Epub 2015 Dec 23.

5. Obesity Drives Th17 Cell Differentiation by Inducing the Lipid Metabolic Kinase, ACC1. Endo Y, Asou HK, Matsugae N, Hirahara K, Shinoda K, Tumes DJ, Tokuyama H, Yokote K, Nakayama T. Cell Rep. 2015 Aug 11;12(6):1042-55. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.014. Epub 2015 Jul 30.
6. Astaxanthin Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Werner Syndrome with Diabetes Mellitus. Takemoto M, Yamaga M, Furuichi Y, Yokote K. J Am Geriatr Soc. 2015 Jun;63(6):1271-3. doi: 10.1111/jgs.13505. No abstract available.
7. Pioglitazone improves fat tissue distribution and hyperglycemia in a case of cockayne syndrome with diabetes. Hayashi A, Takemoto M, Shoji M, Hattori A, Sugita K, Yokote K. Diabetes Care. 2015 May;38(5):e76. doi: 10.2337/dc14-2944. No abstract available.

〔学会発表〕(計 42 件)

1. Yokote, K., Ishibashi, S., Yamashita, S., Arai, H., Araki, E., Suganami, H., Kodama, T. (2015) (講演) Novel approach to residual risk, K-877, a potent and selective PPAR- α Modulator(SPPARM α), added-on to Pitavastatin in Japanese patients with dyslipidemia. American Heart Association Scientific Session 2015, Nov 9, Orlando, USA.
2. Yokote, K. (2015) Establishment of induced pluripotent stem cells derived from progeroid syndrome. The 10th International Association of Gerontology and Geriatrics- Asia/Oceania 2015, Oct 19, Chiang Mai, Thailand.
3. Yokote, K. (2015) Targeting obesity in management of diabetes: potential role of incretin-based therapies. The 8th Asia-Oceania Conference on Obesity (AOCO 2015) Morning Seminar 2, Oct 4, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
4. Yokote, K. (2015) Werner syndrome in Japan: from the medical, molecular and social aspects. Nathan shock center of excellence in the Basic Biology of Aging(ワシントン大学), Sep 28, Seattle, USA.
5. Yokote, K. (2015) Diabetes, Obesity and Atherosclerosis. The 15th Taipei International Vascular Biology Symposium Plenary Session, Sep 13, Taiwan.
6. Yokote, K. (2015) (シンポジスト) Pitavastatin and Incidence of DM. The Annual Scientific Meeting of Taiwan Society of Lipids & Atherosclerosis 2015 Dinner Symposium, Sep 12, Taipei(Taiwan).
7. Yokote, K. (2014) Lipid management in diabetes: potential role of pitavastatin in Asian patients. International Conference on Diabetes and Metabolism 2014 Luncheon symposium 6, Oct 18, Seoul (Korea).
8. Yokote, K. (2014) Progeroid syndrome as a

- model of aging-related metabolic disorders. International Conference on Diabetes and Metabolism 2014, Oct 17, Seoul (Korea).
9. Yokote, K. (2014) (シンポジスト) Statin in Lipid Management of Diabetes: Effect on Dyslipidemia and Beyond. MSDA2014, Sep 14, 国立京都国際会館(京都府京都市)
 10. Yokote, K. (2014) Therapeutic Strategy for prevention of atherosclerosis in Diabetes. The 18th International Vascular Biology Meeting Luncheon Seminar 15, Apr 17, みやこめっせ(京都府京都市).

〔図書〕(計 3 件)

1. 小林一貴、横手幸太郎、他(単行本) (2015) Q と A と事例でわかる訪問介護認知症訪問介護。中央法規、東京。290
2. 横手幸太郎(2015)(監修) コレステロールが下がる新ワザ 52。学研、東京。176
3. 横手幸太郎(2014)(監修) 薬がみえる Vol.2。メディックメディア、東京。379

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横手 幸太郎(YOKOTE, Koutaro)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：20312944

(2) 研究分担者

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