

令和 元年 6 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09341

研究課題名(和文) Sema3Gの機能解析を通じた非アルコール性脂肪性肝炎の機序解明

研究課題名(英文) The role of Semaphorin 3G in pathogenesis of NASH and NAFLD

研究代表者

徳山 宏丈 (Tokuyama, hirotake)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：90385039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000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マウスを用いて高脂肪コリン欠乏メチオニン減量食負荷による代謝の変化を検討した。このマウスは急速に肝の線維化をきたすが、この変化はSema3G KOで減弱していた。また、炎症性サイトカインの発現も変異マウスで低下していた。以上より、Sema3Gは肝臓の血管内皮に発現し、分泌され、局所の炎症などに関わるものと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規分泌蛋白であるSemaphorin3GがNASH/NAFLDにおいては促進的に働いている可能性が示唆された。高齢化ならびに生活習慣病が蔓延する現代社会において、この疾患は増え続けているが、食事運動療法以外の有効な治療法がない。今回、Semaphorin3Gを抑制するような治療が、NASHの治療に有用である可能性が示唆され、今後の治療法開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：We identified Semaphorin3G (hereinafter referred to as Sema3G) expressed in the vascular endothelium, and examined its role in the liver due to high fat choline deficient methionine reduction diet load using this KO mouse. This mouse rapidly induced liver fibrosis, but this change was attenuated by Sema3G KO. In addition, the expression of inflammatory cytokines was also reduced in mutant mice. From the above, it was speculated that Sema3G is expressed on the vascular endothelium of the liver, secreted and involved in local inflammation and the like.

研究分野：腎臓内科

キーワード：セマフォリン 耐糖能 肥満 脂肪肝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食生活の西洋化に伴う食事内容の変化や慢性的な運動不足により、我が国のあらゆる年代において肥満者が急増し、これに伴って非アルコール性脂肪肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)、非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) も急増している。脂肪肝はこれまでは良性の疾患と捉えられてきたが、一部の症例では炎症や線維化が惹起され、最終的に肝硬変や肝がんにまで進行する。我が国の肝臓癌の多くが NASH など脂肪性肝炎に起因しているといわれ、その病態の解明と有効な治療法の開発は重要な課題である。

我々はこれまで血管特異的な遺伝子の網羅的な同定と機能解析を行ってきた。この過程で、Semaphorin ファミリーに属する分泌型蛋白 Semaphorin3G (Sema3G) を同定した (Takemoto et al. Am J Pathol 2004、Takemoto et al. EMBO J 2006)。Sema3G は血管内皮細胞や腎糸球体に発現しており、多彩な細胞調節作用を有する。予備的な検討では、Sema3G KO マウスにおいては、高脂肪食の投与による脂肪肝や耐糖能障害が軽減される傾向にあった。また、近年腸内細菌叢や腸管免疫の変化と NASH との関連を示唆する報告が相次いでいる (Cell 2013) が、興味深い事に、メタゲノム解析を用いた我々の検討では、Sema3G KO マウスでは野生型と比較して腸内細菌叢が大きく変化していた。

2. 研究の目的

すなわち Sema3G を抑制するような治療が NASH に有用である可能性が高いと推測され、本研究では Sema3G の NAFLD/NASH における役割を解明する事を通じて、その病態と機序を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) NASH モデルにおける Sema3G の発現様式を検討した。モデルとしては超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量食 (CDAHFD) モデルを用いた。肥満になることはないモデルであるためヒトの肥満、脂肪肝モデルと比べると人為的と指摘されているが、肝臓に強い脂肪肝、炎症をきたし、早期に線維化をきたすモデルで短期間で実験できるという利点がある。

(2) Sema3G KO マウスに CDAHFD を付加することにより、Sema3G が NASH の病態に与える影響を検討した。

4. 研究成果

Sema3G については免疫組織染色で有用な抗体が存在しないため、RNA In situ Hybridization にて、マウス肝臓組織における Sema3G の発現について検討した。すると、血管壁の内皮細胞に発現が見られ、周囲の構造から interlobular artery と推測された (図1)。続いて、CDAHFD モデルを野生型マウスに負荷したところ、8 週程度すると肝臓において Sema3G の発現が、定常状態と比較して3 倍程度、増強されることが判明した (Data not

Sema3G In Situ Hybridization

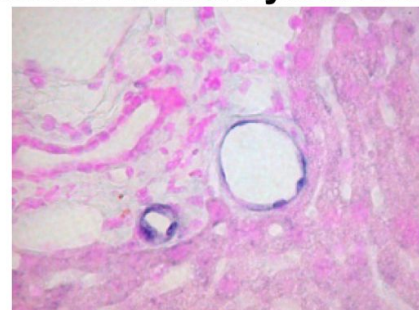


図1

shown)。体重に関しては、CDAHFD 食負荷の有無にて有意な群間差を認めなかった。

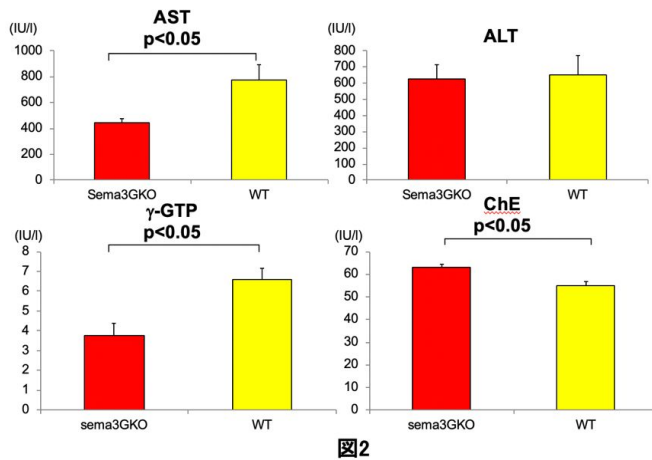
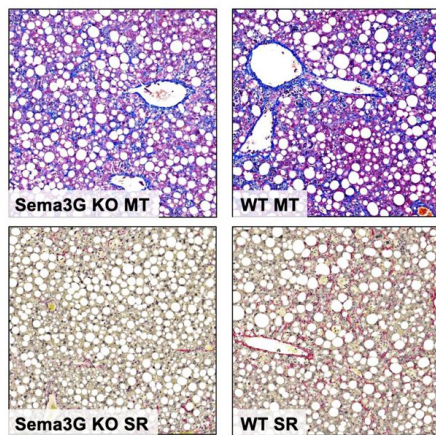


図2



MT: Masson's-Trichrome staining, SR: Sirius Red staining

図3

化の程度は Sema3G KO において抑制されている傾向が認められた (図 3)。加えて、このような Sema3G KO における線維化抑制の原因として、炎症性サイトカインの変化があると仮想し、肝臓におけるその遺伝子発現を評価した。すると、MCP-1 の発現には変化を認めなかったが、TNFα や IL6 の mRNA 発現が、KO 群においてそれぞれ 36% と 59%、有意に低下していることがわかった (図 4)。

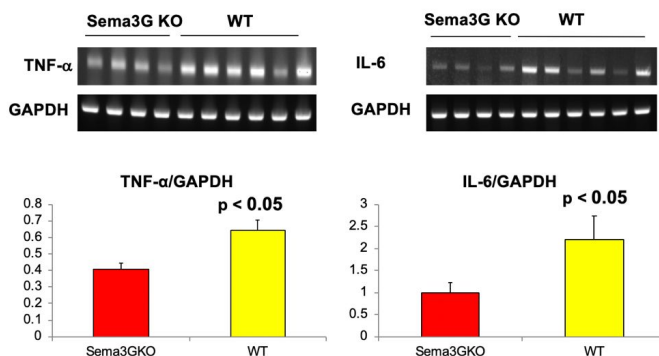


図4

次に、8 週齢の野生型ならびに Sema3G KO マウスに CDAHFD 食負荷を行い、4 週目、8 週目に体重、肝酵素、肝重量、血液の生化学的データを検討した。体重、接餌量に差は認めず、体重あたりの肝重量も野生型 7.5%、Sema3G KO 7.3% と両群間で有意な差は認めなかった。一方で、血液生化学のデータでは、Sema3GKO 群で、肝酵素 AST と γGTP の発現が抑制されており、また、ChE の発現は増加が認められ、これらの変化は統計学的に有意であった。すなわち、Sema3G を抑えた方が NASH が軽減される可能性が示唆された (図 2)。

HE 染色においては、肝臓における脂肪滴のサイズの明らかな変化は認められなかったが、一方でマッソントリクローム染色、並びにシリウスレッド染色を行ったところ、線維

また、CDAHFD 食負荷後、8 週後のマウスを用いて、血清脂質濃度について検討を行った。すると、総コレステロールは野生型で 35mg/dl であったのに対して、Sema3G KO マウスにおいては 71mg/dl と有意に高値であった。中性脂肪に関しても、野生型で 22mg/dl、ノックアウト群では 29mg/dl と、こちらは有意では

なかったものの、同様にノックアウトで高値である傾向が認められた。リポ蛋白に関して評価したところ、Sema3G KO マウスにおいてはカイロミクロン中のコレステロール (CM-C) と、VLDL-C が低下しており、一方で LDL-C と HDL-C 量が野生型と比較して増加していた。ことに HDL-C に関しては Sema3G KO において 2.7 倍と顕著な増加を示していた (図 5)。このような所見から、脂質代謝系のうちで TG に富むリポ蛋白を代謝

する経路が活性化されていることが推察された。

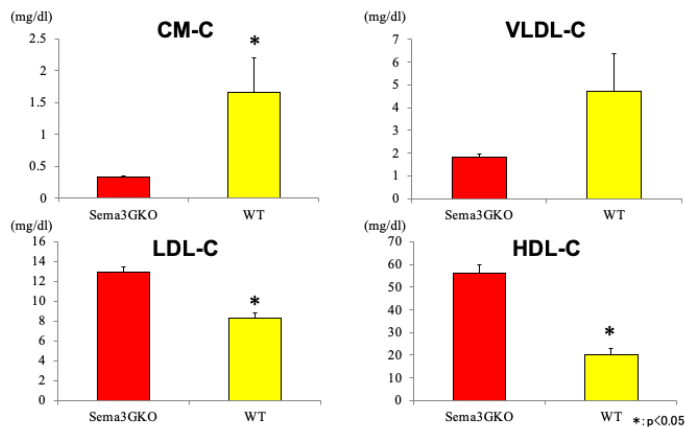


図5

以上より、Sema3G は肝組織の血管内皮細胞から分泌され、肝細胞に作用するものと考えられた。また、NASH などの肝傷害時には Sema3G 発現が増加することが判明したが、Sema3G KO マウスにおいては炎症性サイトカイン発現が抑制されていたことから、Sema3G は IL-6 や TNF α の発現を促進することにより、肝において炎症と線維化を促進しているもの

のと思われた。本研究室においては以前に、リポポリサッカライドによる急性腎障害モデルにおいては、Sema3G は抗炎症作用を有することを報告しており (Ishibashi et al. Scientific reports 2016) 本研究はこの以前の報告と逆の結果となった。肝臓においては Sema3G は内皮細胞に認められ、肝細胞に採用するものと推察されるが、腎臓においては主にポドサイトに発現し、内皮細胞や尿細管に作用すると考えられているため、このような細胞種による差異が、この作用の差をもたらしていると考えられる。さらに興味深いことに、脂質代謝の観点からは、Sema3G KO マウスにおいては総コレステロールの増加、中性脂肪の減少、LDL-C と HDL-C の増加が認められ、さらに CM-C、VLDL-C の減少が認められた。以上の結果からは、カイロミクロンや VLDL など、TG-rich リポ蛋白の代謝を促進するような経路の活性化が推察される。インスリン作用が十分にある状態ではこのような脂質プロファイルになりやすく、今後本モデルにおけるインスリン感受性の評価を行なっていきたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Ide S, Finer G, Maezawa Y, Onay T, Souma T, Scott R, Ide K, Akimoto Y, Li C, Ye M, Zhao X, Baba Y, Minamizuka T, Jin J, Takemoto M, Yokote K, Quaggin SE.

Transcription Factor 21 Is Required for Branching Morphogenesis and Regulates the Gdnf-Axis in Kidney Development. J Am Soc Nephrol. 査読有. 2018 Dec;29(12):2795-2808 ASN.2017121278. doi: 10.1681/ASN.2017121278. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30377232.

Maezawa Y, Yokote K. Human glomerular transcriptome of diabetic kidneys: Can the podocyte cytoskeleton be a therapeutic target? J Diabetes Investig. 査読有. 2018 Oct 5. doi: 10.1111/jdi.12951. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30290070.

Maezawa Y, Kato H, Takemoto M, Watanabe A, Koshizaka M, Ishikawa T, Sargolzaeiaval F, Kuzuya M, Wakabayashi H, Kusaka T, Yokote K, Oshima J. Biallelic WRN Mutations in Newly Identified Japanese Werner Syndrome Patients. Mol Syndromol. 査読有. 2018 Jul;9(4):214-218. doi: 10.1159/000489055. Epub 2018 May 15. PubMed PMID: 30140198; PubMed Central PMCID:

PMC6103371.

Ishibashi R, Takemoto M, Tsurutani Y, Kuroda M, Ogawa M, Wakabayashi H, Uesugi N, Nagata M, Imai N, Hattori A, Sakamoto K, Kitamoto T, Maezawa Y, Narita I, Hiroi S, Furuta A, Miida T, Yokote K. Immune-mediated acquired lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency: A case report and literature review. *J Clin Lipidol*. 査読有. 2018 Jul - Aug;12(4):888-897.e2. doi:10.1016/j.jacl.2018.05.002. Epub 2018 May 15. PubMed PMID: 29937398.

Oshima J, Kato H, Maezawa Y, Yokote K. RECQ helicase disease and related progeroid syndromes: RECQ2018 meeting. *Mech Ageing Dev*. 査読有. 2018 Jul;173:80-83. doi:10.1016/j.mad.2018.05.002. Epub 2018 May 9. Review. PubMed PMID: 29752965; PubMed Central PMCID: PMC6217841.

Ide K, Koshizaka M, Tokuyama H, Tokuyama T, Ishikawa T, Maezawa Y, Takemoto M, Yokote K. N-3 polyunsaturated fatty acids improve lipoprotein particle size and concentration in Japanese patients with type 2 diabetes and hypertriglyceridemia: a pilot study. *Lipids Health Dis*. 査読有. 2018 Mar 15;17(1):51. doi:10.1186/s12944-018-0706-8. PubMed PMID: 29544483; PubMed Central PMCID:PMC5855932.

Shoji M, Takemoto M, Kobayashi K, Shoji T, Mori S, Sagara JI, Kurosawa H, Hirayama Y, Sakamoto K, Ishikawa T, Koshizaka M, Maezawa Y, Yokote K. Serum podocalyxin levels correlate with carotid intima media thickness, implicating its role as a novel biomarker for atherosclerosis. *Sci Rep*. 査読有. 2018 Jan 10;8(1):245. doi: 10.1038/s41598-017-18647-6. PubMed PMID: 29321582; PubMed Central PMCID:PMC5762903.

Yamaga M, Takemoto M, Shoji M, Sakamoto K, Yamamoto M, Ishikawa T, Koshizaka M, Maezawa Y, Kobayashi K, Yokote K. Werner syndrome: a model for sarcopenia due to accelerated aging. *Aging (Albany NY)*. 査読有. 2017 Jul 19;9(7):1738-1744. doi:10.18632/aging.101265. PubMed PMID: 28738022; PubMed Central PMCID: PMC5559172.

Ishikawa T, Koshizaka M, Maezawa Y, Takemoto M, Tokuyama Y, Saito T, Yokote K. Continuous glucose monitoring reveals hypoglycemia risk in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig*. 査読有. 2018 Jan;9(1):69-74. doi:10.1111/jdi.12676. Epub 2017 May 24. PubMed PMID: 28397367; PubMed Central PMCID: MC5754529.

Yamaga M, Takemoto M, Takada-Watanabe A, Koizumi N, Kitamoto T, Sakamoto K, Ishikawa T, Koshizaka M, Maezawa Y, Yokote K. Recent Trends in WRN Gene Mutation Patterns in Individuals with Werner Syndrome. *J Am Geriatr Soc*. 査読有. 2017 Aug;65(8):1853-1856. doi:10.1111/jgs.14906. Epub 2017 Apr 10. PubMed PMID:28394436.

〔学会発表〕(計 4 件)

日中動脈硬化国際研究会, Yoshiro Maezawa, Roles of the bHLH Transcription Factor Tcf21 in Cardiorenal Syndrome. Jianguo Hotel Xi'an, Xi'an, China Aug 30th, 2018

第 50 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, Yoshiro Maezawa, English Symposium 1 Topics in Atherosclerosis & Dyslipidemia (Basic) : Roles of The bHLH Transcription Factor Tcf21 in Cardiorenal Syndrome 大阪国際会議場 July 12-13, 2018

第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会, Yoshiro Maezawa, Symposium 3: Seeking for a common culprit of vascular complications in diabetes. Roles of the bHLH Transcription Factor Tcf21 in Kidney, Heart and Blood Vessels in Health and Diabetes 東京国際フオ

ーラム May 24th, 2018

前澤善朗 シンポジウム『糖尿病性腎症の病態研究における新たな展開』ポドサイトの機能異常-転写因子 Tcf 2 1 の役割を中心に- 第 28 回糖尿病性腎症研究会 2016 年 12 月 3 日 都市センターホテル 3 階 コスモスホール I、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： 前澤 善朗

ローマ字氏名：Maezawa Yoshiro

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：講師

研究者番号(8桁): 80436443

研究分担者氏名： 竹本 稔

ローマ字氏名：Takemoto Minoru

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：特任教授

研究者番号(8桁): 60447307

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。