

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08486

研究課題名(和文)心腎症候群発症における腎尿細管由来セマフォリン3Cの機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of renal tubule-derived semaphorin 3C in the development of cardiorenal syndrome

研究代表者

渡辺 昌文(Watanabe, Masafumi)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：60360096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：心腎症候群(CRS)の予後は不良である。CRS発症機序は未だ十分に解明されていない。セマフォリン3C(SEMA3C)は、心臓と腎臓の発生において重要な役割を果たす。そこで、CRS発症におけるSEMA3Cの役割を検討した。近位尿細管特異的SEMA3Cノックアウトマウスを作製した。SEMA3C KOマウスは、CRSを誘導すると、心肥大や生存率が悪化した。RNAシーケンス解析によりSEMA3C KOマウスはWnt/ β -catenin経路が活性化することが明らかになった。心不全患者において、SEMA3C低値群は、心イベント率が高率であった。SEMA3CはCRSの新規治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全は本邦における重要な死因である。特に予後が悪いのが心腎症候群であるが、機序が解明されておらず、確立した治療法がないのが現状である。今回、我々は腎尿細管から分泌されるSemaphorin3Cが低下すると、心腎症候群において病的な心肥大や生存率が悪化することをin vivoの実験系で示した。In vitroの実験系では、Semaphorin 3Cのリコンビナント蛋白質を投与することで心筋細胞肥大を抑制する知見を得た。今後、Semaphorin 3Cによる薬物介入や遺伝子導入により心肥大や予後が改善するか追加検証を行い、新たな治療薬の開発を目指していきたい。

研究成果の概要(英文)：Cardiorenal syndrome (CRS) is associated with a high mortality rate. The mechanism underlying CRS has not yet been fully elucidated. Semaphorin 3C (SEMA3C) plays an important role in the development of the heart and kidney. The aim of this study was to examine the role of SEMA3C in CRS development. We generated tamoxifen-inducible proximal tubule-specific SEMA3C knockout mice (PT-SEMA3C KO). PT-SEMA3C KO mice showed exacerbated cardiac hypertrophy induced by TAC and had a lower survival rate than their wild-type littermates. RNA sequencing of heart tissue revealed enhanced Wnt/ β -catenin signaling in PT-SEMA3C KO mice compared to wild-type littermates. Plasma SEMA3C levels were measured in 155 consecutive patients with heart failure (HF) and 17 patients without HF. The cardiac event rate was highest in the lowest SEMA3C tertile group in patients with HF. SEMA3C protects cardiomyocytes from cardiac hypertrophy, indicating that it could be a novel therapeutic target for CRS.

研究分野：Cardiology

キーワード：Semaphorin 3C Cardio-renal syndrome Wnt/ β -catenin signaling

1. 研究開始当初の背景

心不全 (HF) は、増加傾向にある公衆衛生上の問題で、本邦における死因の第 2 位になっている (*Eur J Heart Fail* 17, 884-892 (2015).)。心機能障害と腎機能障害は、互いに増悪し悪性サイクルを形成するため、心腎症候群の予後は極めて不良である (*Circulation* 139, e840-e878 (2019).)。腎尿細管細胞は、酸塩基平衡の維持、エリスロポエチン合成、アミノ酸の再吸収など多様な機能をもつ。我々は、心不全患者において、尿細管障害は、糸球体障害と独立した予後不良因子であることを報告した (*Circ Heart Fail* 6, 662-668 (2013).)。しかし、尿細管障害が心機能に与える影響は不明であった。本研究では、心腎症候群発症における尿細管細胞の役割を検討するために、腎臓から分泌されるクラス 3 セマフォリンに注目した。

セマフォリンファミリーは進化の過程でよく保存されており、構造に基づいて 7 つのクラスに分類される。20 を超える遺伝子が存在するが、SEMA ドメインを特徴とする。脊椎動物には、クラス 3 ~ 7 に属する 20 のセマフォリンが発現している。その中で、クラス 3 セマフォリンのみが分泌蛋白質として働くことが報告された (*Cell Metab* 21, 163-173 (2015).)。発生において SEMA3C は、神経堤細胞や流出路心筋細胞で発現している。SEMA3C の遺伝子異常は大動脈弓離断、総動脈幹症および心室中隔欠損症に関連すると報告された (*J Clin Invest* 125, 2661-2676 (2015).; *Development* 128, 3061-3070 (2001).)。また、SEMA3C は尿管芽の発達や糸球体濾過ユニット形成に関与する (*Pediatr Nephrol* 26, 1407-1412 (2011).)。以上より、SEMA3C は、心臓と腎臓の発生において、重要な役割を担っている。近年、癌、免疫学および発生においてセマフォリンは注目を集めている (*Cell Adh Migr* 10, 652-674 (2016).; *Cell Mol Life Sci* 66, 649-666 (2009).)。しかし、成人心疾患の発症における SEMA3C の機能は検討されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心腎症候群モデルマウスを用いて、心腎症候群発症における SEMA3C の役割を検証することとした。また、心不全患者において、血漿 SEMA3C 値が心不全や腎機能障害重症度と関連するか、更には心イベント発症と関連するか検討した。

3. 研究の方法

野生型マウスの組織から mRNA レベルで SEMA3C を高発現する組織をスクリーニングした。次に大動脈縮窄術を施行し心腎症候群を誘導し、SEMA3C の血中濃度を測定した。尿細管特異的 SEMA3C ノックアウトマウスを作成し、心腎症候群を誘導した。心筋細胞を培養し、SEMA3C リコンビナント蛋白質が心筋細胞肥大に対する影響を検討した。心不全患者の血漿 SEMA3C 値を ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

SEMA3C は、腎尿細管上皮細胞に発現し、心腎症候群では発現が低下した

SEMA3C mRNA は、野生型マウスの脳、肺、腎臓で高発現していた。腎組織の免疫染色を行ったところ SEMA3C は主に尿細管上皮細胞に高発現していた。心腎症候群を誘導するために、野生型マウスに大動脈縮窄術 (TAC) を施行した。TAC56 日後、Masson's trichrome 染色を行ったところ、腎線維化を認めた。また、心重量は増加し腎臓重量は減少した。腎組織における SEMA3C のタンパク質および mRNA 発現レベルは、TAC56 日後に減少した。他方、心組織では変化を認めなかった。蛍光免疫染色では、近位尿細管の SEMA3C 発現が減少していた。次に血漿 SEMA3C 値を ELISA 法で測定したところ、TAC を行うと有意に減少することがわかった。

近位尿細管細胞における SEMA3C 発現が、酸化ストレスの影響を受けるかどうか検討するために、正常なヒト腎臓由来の近位尿細管細胞株である HK2 細胞を H₂O₂ で刺激した。HK2 細胞の

SEMA3C のタンパク質および mRNA レベルは、H₂O₂ 刺激後に減少した。HEK293T 細胞でも、同様に SEMA3C のタンパク質および mRNA レベルは、H₂O₂ 刺激後に減少した。これらの知見から、腎臓から分泌される SEMA3C は、心腎症候群において酸化ストレスを介してダウンレギュレーションされることが示された。

近位尿細管特異的 SEMA3C ノックアウトマウス

SEMA3C 遺伝子の Exon2 は、シグナルペプチドを含むため、Exon2 を欠失すれば SEMA3C 分泌が阻害される可能性がある。SEMA3C^{flox/flox} マウスを作成する過程で、偶然 SEMA3C 遺伝子の Exon2 を欠失したマウスを得た。SEMA3C^{+/-} マウスから生まれたマウスの一部は、生後 1 日以内に死亡した。ヘテロ接合体の親から生まれた 42 匹の子孫のうち、5 匹の SEMA3C^{-/-} マウスが成人期まで生存した。出生直後に死亡したホモ接合マウスは、大動脈弓離断や総動脈幹症を示した。これらの結果から、SEMA3C の Exon2 を欠失することで、SEMA3C を機能的にノックアウトすることができることが示された。

5 週齢の PT-SEMA3C KO および flox-SEMA3C マウスにタモキシフェンを 5 日間連続で腹腔内投与した。タモキシフェン投与後、PT-SEMA3C KO マウスの SEMA3C mRNA は腎臓で特異的に切断され、flox-SEMA3C マウスと比較して 60% 減少した。蛍光免疫染色では、PT-SEMA3C KO マウスの近位尿細管における SEMA3C 発現は減少した。また、血漿 SEMA3C 値は、flox-SEMA3C マウスよりも PT-SEMA3C KO マウスの方が有意に低値であった。PT-SEMA3C KO マウスと flox-SEMA3C マウスの間で、KIM-1 の mRNA レベル、血漿クレアチニンや BUN に有意差は認めなかった。SEMA3C を近位尿細管細胞特異的にノックダウンするだけでは尿細管障害は惹起されないことが示唆された。更に、PT-SEMA3C KO マウスと flox-SEMA3C マウスでは、心エコー所見も有意差はなかった。

尿細管で SEMA3C を knockdown することで、他のクラス 3 セマフォリン発現に影響するか mRNA 発現を調べた。PT-SEMA3C KO マウスは、flox-SEMA3C マウスと比較して、腎組織で SEMA3A のみ発現が亢進していた。更に、PT-SEMA3C KO マウスの心臓における SEMA3C の受容体の発現を調べたが、PlexinB1、PlexinB2、および PlexinD1 の発現に有意な変化はなかった。

SEMA3C KO マウスにおける TAC 後の生存率

心腎症候群における近位尿細管由来 SEMA3C の役割を検討するために、PT-SEMA3C KO および flox-SEMA3C マウスに対して 27G 針を用いた TAC と SHAM 手術を施行した。Sham 手術群のすべての PT-SEMA3C KO および flox-SEMA3C マウスは、56 日間の追跡期間を生き延びた。TAC 後の生存率は、flox-SEMA3C マウスよりも PT-SEMA3C KO マウスで有意に低かった。顕微鏡分析により、心筋細胞の断面積と心組織線維化が、TAC56 日後に flox-SEMA3C マウスと比較して PT-SEMA3C KO マウスで大幅に増加した。*Myh7* と *Collagen1* の mRNA 発現は、Sham 手術群と比較して TAC 群で有意に増加したが、これらは PT-SEMA3C KO マウスでより増加した。TAC に使用する針を 27G から 25G に変更した。PT-SEMA3C KO マウスで心筋重量が大幅に増加し、心エコー検査で壁厚が厚くなり、左心室内腔が拡大し、左室短縮率が有意に減少した。これら結果から、近位尿細管に由来する SEMA3C の欠乏が、病的な心臓肥大を誘導し、TAC 後の生存率を悪化させる事が示された。

TAC 後の心組織において RNA sequence 解析を行うと脂質代謝や異化に関連する遺伝子群の発現が増加していた。Gene-set enrichment analysis は、Wnt / β -catenin 経路が PT-SEMA3C KO マウスで活性化することを示した。

SEMA3C は心筋細胞の Wnt / β -catenin 経路を抑制した

H9C2 細胞で、SEMA3C の過剰発現が Wnt / β -catenin 経路を調節するか検討した。Disheveled

1 (Dvl1)、Dvl2、Dvl3、p-GSK3 および活性化 β -catenin のタンパク質発現は、SEMA3C を過剰発現した H9C2 細胞で有意に減少した。新生仔ラット培養心筋細胞において、Wnt3a 刺激は Dvl1、Dvl2、Dvl3、p-GSK3 および活性化 β -catenin のタンパク質発現を増加したが、SEMA3C リコンビナント蛋白の同時投与によって一連の活性化が抑制された。

SEMA3C は心筋細胞の Akt および ERK1 / 2 のリン酸化を抑制しました

SEMA3C の過剰発現は、H9C2 細胞における Akt および ERK1/2 のリン酸化を抑制した。腎臓の細胞から分泌された SEMA3C が、心筋細胞に作用して心肥大シグナルを調節するか検討するために、H9C2 細胞を SEMA3C または空ベクターをトランスフェクションした HEK293T 細胞と共培養した。H9C2 細胞における Akt および ERK1/2 のリン酸化は、SEMA3C 過剰発現 HEK293T 細胞と共培養すると抑制された。分泌された SEMA3C が、H9C2 細胞における Akt および ERK1/2 のリン酸化を阻害したことが示唆された。

SEMA3C は、Ang II によって誘導される心筋細胞肥大を軽減した

Ang II による心筋細胞肥大に対する SEMA3C の影響を調べた。SEMA3C リコンビナント蛋白は、Ang II により誘導される Akt および ERK1/2 のリン酸化を抑制した。*Myh7* の mRNA 発現は、Ang II 刺激後に増加したが、SEMA3C リコンビナントの前投与により大幅に抑制された。免疫染色では、心筋細胞の大きさが Ang II 刺激 48 時間後に増加したことを示した。しかし、この心筋細胞肥大は SEMA3C リコンビナント前処置により有意に抑制された。

心不全患者における血漿 SEMA3C 値と心不全重症度の関係

対照被験者と心不全患者の血漿 SEMA3C の中央値は、それぞれ 1.73 ng/mL と 0.75 ng/mL であった。SEMA3C は正規分布しないため、すべての患者は SEMA3C 値の三分位により 3 群に分類した。第 1 三分位群は、NYHA が重症で、他の 2 群に比べて log BNP、シスタチン C および左房径が高値で、eGFR は低値であった。逆に、第 3 三分位群は、第 2 三分位群より高脂血症の有病率と BMI が高かった。血漿 SEMA3C 値は、NYHA が重症化するほど減少した。また、血漿 SEMA3C 値は、腎機能障害の進行とともに減少した。

心不全患者における血漿 SEMA3C 値と心イベントの関連。

追跡期間中（中央値 788 日）に、31 件の心不全再入院と 18 件の心臓死を含む 49 件の心イベントが発生した。Kaplan-Meier 分析では、第 1 三分位群の心イベント率が最も高率であった。心イベントの危険因子を調べるために、心不全患者で単変量および多変量 Cox 比例ハザード分析を行った。単変量 Cox 比例ハザード分析は、SEMA3C が心不全患者の心イベントと関連することを示した。多変量 Cox 比例ハザード分析では、心不全患者の年齢、性別、NYHA および BNP を調整しても第 1 三分位は心イベントと有意に関連した。

以上より、近位尿細管細胞から分泌される SEMA3C が欠乏すると、病的心肥大と心腎症候群の予後が悪化した。SEMA3C は、Akt と ERK1/2 のリン酸化や Wnt/ β -catenin 経路を抑制することにより、心筋細胞の肥大を抑制した。血漿 SEMA3C 低値は、心不全および腎機能障害の重症度と関連し、心不全患者の心イベントを予測する有用なマーカーとなる可能性がある。また、SEMA3C は、心腎症候群の新たな治療標的となりうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomonori Aono
2. 発表標題 Deficiency of Semaphorin 3C in the Proximal Renal Tubule Cells Exacerbates Cardiac Hypertrophy and Survival in Cardio Renal Syndrome
3. 学会等名 第6回日本循環器学会基礎研究フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大瀧 陽一郎 (Otaki Yoichiro) (80732693)	山形大学・医学部・助教 (11501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------