

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591297

研究課題名(和文)セマフォリン3g 遺伝子解析による生活習慣病の機序解明と新しいバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of lifestyle-related diseases through the functional analysis of Semaphorin 3G, with the goal of developing a novel biomarker.

研究代表者

竹本 稔 (Takemoto, Minoru)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60447307

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)：本研究の目的は我々が同定したセマフォリン3g (Sema3G)の機能解析を通じて、糖代謝、動脈硬化、腎臓病などの生活習慣病のメカニズムを解析することである。これまでの研究結果では、1. Sema3Gは膵ラ氏島内における交感神経終末の配置に役割を担っている可能性を明らかにし、2. 動脈硬化病変形成抑制的に働くことや、3. Sema3Gは炎症性糸球体障害に対し抑制的に作用することを明らかにした。Sema3Gは様々な生活習慣病の「鍵因子」である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the mechanism of lifestyle-related diseases, such as glucose dysregulation, atherosclerosis, and kidney diseases, through the functional analysis of Sema3G, with the goal of developing a novel biomarker. First, we found that Sema3G had a role in sympathetic nerve navigation and correct positioning to the islets of Langerhans. We also found that Sema3G not only had a role in development of atherosclerosis, but also inhibited inflammation within kidney glomeruli. Through our data, we surmise that Sema3G could be an important factor for lifestyle-related diseases through the modulation of glucose dysregulation, atherosclerosis, and kidney diseases.

研究分野：内科

キーワード：Semaphorin3g 心腎関連 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化、車社会の発達による運動不足、社会不況に伴う精神的ストレスの増加によって、肥満、高血圧、脂質異常症、糖尿病といった生活習慣病患者数の増加は現代日本が抱える大きな医療のみならず社会経済学的な問題である。特に糖代謝に関しては日本国民の6人に1人は何らかの異常を有する可能性が報告されており、早急に様々な角度から対策を講じないことには、糖尿病合併症によって生活の質、そして生命を脅かされる人々の数は後を絶たないであろう。

これまでの我々の糖尿病合併症機序解明へむけた試み

ヒトゲノム計画を通して、我々の身体はおよそ2万個の遺伝子によって構築され、そして機能していることが明らかとなった。遺伝子はゲノムから転写され蛋白へと翻訳され、そして機能するためには非常に精巧で精密な制御が行われている。では糖尿病合併症の機序を探るためにはこの2万個の遺伝子のうちどの遺伝子に着目し解析すべきなのであろうか？我々はこの命題に答えるべく、合併症の一つである糖尿病腎症の発症機序の解明を目的として腎系球体特異的遺伝子をゲノムワイドに同定し、その機能解析を行ってきた。何故なら糖尿病腎症の初期変化は蛋白尿/アルブミン尿の発現であり、アルブミン尿の多くは系球体障害によって生じるからである。我々のこれまでの歩みを簡単に述べると新しいマウス系球体採取方法の開発、マウス系球体特異的遺伝子ライブラリーとcDNAマイクロアレーの作成、マイクロアレーを用いた特異的遺伝子の同定、同定した遺伝子がコードする蛋白質に対する特異抗体作成、

同定した遺伝子のゼブラフィッシュ、マウスを用いた機能解析である (Am J Pathol. 2002 ;161:799-805.、EMBO J. 2006;25:1160-74.、J Am Soc Nephrol.2007;18:689-97.、Kidney int: 2007;71: 889-900.、J Am Soc Nephrol. 2008 ;19(2):260-8.)。実際には約300種類の系球体特異的遺伝子を同定し、その機能解析が現在も進行中である。この研究を通してFoxc2という転写因子が系球体の発達に重要

な役割を果たすことやDendrinといったタンパクがスリット膜の付着部に発現し系球体腎炎によって発現様式が変化すること、Crb2bという遺伝子がゼブラフィッシュの系球体機能に重要な役割を果たしていることを明らかにして報告してきた (Dev Biol. Dev Biol. 2009;334:1-9.)そして、この系球体特異的遺伝子の一つとして、本研究の主題であるSema3G遺伝子を同定した。

Sema3G 遺伝子の発現様式と機能解析

最初にマウスにおける Sema3G 遺伝子の発現様式をノックインした LacZ 遺伝子を用いて観察した。その結果、大動脈から分枝する血管の内皮細胞や膵臓ラ氏島の細胞に発現することを明らかにした。血管内皮細胞や系球体ポドサイトにおける発現は既に確認していたが、膵細胞における発現は予想外であった。

続いて、K/O マウスの解析を開始したが、K/O マウスはメンデルの法則に従って生まれ、妊孕性には問題なく、体重増加に関しても少なくとも普通食を食べさせた場合には著明な変化を認めなかった。しかしながら、細胞に発現していたことより、一晩絶食にして、空腹時血糖を測定した所、K/O マウスは有意に空腹時血糖値が上昇していることが判明した。さらに空腹時血糖値が上昇していたことより、肝臓において糖新生に關与する遺伝子である Glucose 6 phosphatase や phosphoenolpyruvate carboxykinase の発現を観察した所、K/O マウスでは有意にその発現が増加していた。肝臓からの糖放出増加によって空腹時血糖値が増加している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が新規に同定した血管内皮細胞、系球体ポドサイトに特異的に発現している遺伝子、Sema3G の機能解析である。Sema3G の機能解析のためノックアウトマウス(KOマウス)を作成し、ノックインしたLacZ遺伝子を指標に発現解析を行った所、予想外にSema3g遺伝子は膵細胞にも高発現しており、さらにKOマウスでは空腹時血糖の上昇や肝臓において糖新生が亢進することを明ら

かにした。この Sema3G 遺伝子の解析を通して、糖代謝、血管機能、腎機能の理解を深め、糖尿病、肥満、高血圧、動脈硬化、慢性腎臓病といった生活習慣病の新しい診断方法、治療法開発を目指したい。

3. 研究の方法

(1) Sema3g の膵細胞やインスリン感受性臓器における役割を検討する。特にインスリン分泌、インスリン細胞内シグナル、インスリン分泌拮抗ホルモン分泌に対する作用を検討する。

(2) Sema3g の血管内皮における役割、特に血圧や動脈硬化への影響を検討する。

(3) Sema3g の腎機能、特に糸球体ろ過機能への影響を検討する。

4. 研究成果

(1) Sema3GKO マウスでは交感神経終末に配列異常をきたし、膵細胞から分泌される Sema3G が膵ラ氏島内における交感神経終末の正確な配置に役割を担っている可能性を明らかにした。しかしながら、Sema3G KO はインスリン分泌能や感受性は野生型に比し差を認めなかった。空腹時血糖の変化に関してはグルカゴン分泌異常の関与が示唆されており、さらに解析を進めている。

(2) ApoE ノックアウトと Sema3G KO との交配し、高コレステロール負荷を行った所、ApoE/Sema3G ダブルノックアウトマウスは ApoE ノックアウトマウスに比し、動脈硬化薬のサイズが有意に拡大することを明らかにした。動脈硬化病変形成悪化メカニズムを探るべく Sema3G リコンビナント蛋白の作成を行い、*in vitro* を行った。

Sema3G は単球・マクロファージの細胞株である THP-1 細胞や RAW264 細胞で検討した結果、Sema3G はそれぞれの細胞の増殖や内皮細胞への接着を抑制したが、遊走や LDL の取り込み能には明らかな作用を及ぼさなかった。今後、骨髄移植などの実験をすすめ Sema3G の動脈硬化病変形成における役割を明らかにする。

(3) Sema3GKO マウスに糖尿病や炎症刺激などを加えると腎障害が野生型に比し増悪することを

明らかにした。さらに Sema3GKO から樹立したポドサイトは野生型から樹立したポドサイトに比し、炎症性サイトカインの分泌が亢進することなどを明らかにした。以上の結果よりポドサイトから分泌される Sema3G は糸球体の恒常性維持に重要であることを明らかとした。

このように本研究によって Sema3G が糖代謝、動脈硬化、腎臓病といった生活習慣病の発症・進展に関わる可能性が示唆された。今後さらに Sema3G をバイオマーカーとして使用できるか、Sema3G を介した治療介入が可能になるかなどの命題に対して答えを見出していきたい。

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 21 件)

- (1) Toda N, Ihara K, Takemoto M, Yokote K, Hara T. Endocrine and metabolic abnormalities in a girl with childhood werner syndrome: case report. *J Am Geriatr Soc.* 2014 Jul;62(7):1404-5. (査読有)
doi: 10.1111/jgs.12897
- (2) Oshitari T, Kitahashi M, Mizuno S, Baba T, Kubota-Taniai M, Takemoto M, Yokote K, Yamamoto S, Roy S. Werner syndrome with refractory cystoid macular edema and immunohistochemical analysis of WRN proteins in human retinas. *BMC Ophthalmol.* 2014;14:31. (査読有)
<http://www.biomedcentral.com/1471-2415/14/31>
- (3) Kobayashi K, Yokoh H, Sato Y, Takemoto M, Uchida D, Kanatsuka A, Kuribayashi N, Terano T, Hashimoto N, Sakurai K, Hanaoka H, Ishikawa K, Onishi S, Yokote K. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin compared with alpha-glucosidase inhibitor in Japanese patients with T2DM inadequately controlled on sulfonylurea alone (SUCCESS-2): a multicenter, randomized, open-label, non-inferiority trial. *Diabetes Obes Metab.* 2014;16:761-5(査読有)
DOI: 10.1111/dom.12264
- (4) Ina K, Hayashi T, Araki A, Kawashima S,

- Sone H, Watanabe H, Ohru T, Yokote K, Takemoto M, Kubota K, Noda M, Noto H, Ding QF, Zhang J, Yu ZY, Yoon BK, Nomura H, Kuzuya M; Japan CDM Group. Importance of high-density lipoprotein cholesterol levels in elderly diabetic individuals with type IIb dyslipidemia: A 2-year survey of cardiovascular events. *Geriatr Gerontol Int*. 2014;14:806-10(査読有)
doi: 10.1111/ggi.12168
- (5) Hayashi T, Araki A, Kawashima S, Sone H, Watanabe H, Ohru T, Yokote K, Takemoto M, Kubota K, Noda M, Noto H, Ina K, Nomura H; Japan CDM group. Metabolic predictors of ischemic heart disease and cerebrovascular attack in elderly diabetic individuals: difference in risk by age. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;9;12:10(査読有)
doi:10.1186/1475-2840-12-10
- (6) Watanabe K, Kobayashi K, Takemoto M, Ishibashi R, Yamaga M, Kawamura H, Fujimoto M, Ishikawa T, Onishi S, Okabe E, He P, Yokote K. (2013) Sitagliptin improves postprandial hyperglycemia by inhibiting glucagon secretion in Werner syndrome with diabetes. *Diabetes Care* 36:e119. (査読有)
doi: 10.2337/dc13-0709
- (7) Takemoto M, Ishikawa T, Onishi S, Okabe E, Ishibashi R, He P, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K. (2013) Atorvastatin ameliorates podocyte injury in patients with type 2 diabetes complicated with dyslipidemia. *Diabetes Res Clin Pract*. 100:e26-9(査読有)
doi:10.1016/j.diabres.2012.12.018
- (8) Hayashi T, Araki A, Kawashima S, Sone H, Watanabe H, Ohru T, Yokote K, Takemoto M, Kubota K, Noda M, Noto H, Ina K, Nomura H; Japan CDM group. (2013) Metabolic predictors of ischemic heart disease and cerebrovascular attack in elderly diabetic individuals: difference in risk by age. *Cardiovasc Diabetol*. 9;12:10(査読有)
doi:10.1186/1475-2840-12-10
- (9) Tokuyama H, Kawamura H, Fujimoto M, Kobayashi K, Nieda M, Okazawa T, Takemoto M, Shimada F. (2013) A low-grade increase of serum pancreatic exocrine enzyme levels by dipeptidyl peptidase-4 inhibitor in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 100:e66-9(査読有)
doi: 10.1016/j.diabres
- (10) Sonesaki K, Maezawa Y, Takemoto M, Kobayashi K, Tokuyama T, Watanabe-Takada A, Simoyama T, Sato S, Saito Y and Yokote K (2013) Alteration of VEGF and Angiopoietins expressions in diabetic glomeruli implicated in the development of diabetic nephropathy *Advanced studies in medical science* 1, 11-28(査読有)
<http://m-hikari.com/asms/asms2013/asms1-4-2013/takemotoASMS1-4-2013.pdf>
- (11) Takemoto M, Mori S, Kuzuya M, Yoshimoto S, Shimamoto A, Igarashi M, Tanaka Y, Miki T, Yokote K (2013) Diagnostic criteria for Werner syndrome based on Japanese nationwide epidemiological survey. : Japanese Werner Syndrome Working Committee. *Geriatr Gerontol Int*. 13:475-481(査読有)
DOI: 10.1111/j.1447-0594
- (12) Kitamoto T, Takemoto M, Fujimoto M, Ishikawa T, Onishi S, Okabe E, Ishibashi R, Kobayashi K, Kawamura H, Yokote K (2012) Sitagliptin successfully ameliorates glycemic control in a Werner's syndrome with diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 35:e83. (査読有)
doi: 10.2337/dc12-1179
- (13) Mezawa M, Takemoto M, Onishi S, Ishibashi R, Ishikawa T, Yamaga M, Fujimoto M, Okabe E, He P, Kobayashi K, Yokote K (2012) The reduced form of coenzyme Q10 improves glycemic control in patients with type 2 diabetes. *BioFactor* 38:416-21(査読有)
doi: 10.1002/biof.1038
- (14) Onishi S, Takemoto M, Ishikawa T, Okabe E, Ishibashi R, He P, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K (2012) Japanese diabetic patients with Werner syndrome exhibit high incidence of cancer *Acta*

- Diabetologica 49 Suppl 1:S259-60(査読有)
DOI 10.1007/s00592-012-0424-z
- (15) Okabe E, Takemoto M, Onishi S, Ishikawa T, Ishibashi R, He P, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K (2012) Incidence and characteristics of metabolic disorders and vascular complications in individuals with Werner syndrome in Japan. *J Am Geriatr Soc.* 60,997-8. (査読有)
DOI: 10.1111/j.1532-5415
- (16) Koshizaka M, Takemoto M, Sato S, Tokuyama H, Fujimoto M, Okabe E, Ishibashi R, Ishikawa T, Tsurutani Y, Onish S, Mezawa M, He P, Honjo S, Ueda S, Saito Y, Yokote K (2012) An angiotensin II type 1 receptor blocker, prevents renal injury via inhibition of the Notch pathway in Ins2 Akita diabetic mice. *Exp Diabetes Res.* 2012,159874. (査読有)
doi:10.1155/2012/159874
- (17) Takada-Watanabe A, Yokote K, Takemoto M, Fujimoto M, Irisuna H, Honjo S, Futami K, Furuichi Y, Saito Y. (2012) A case of Werner syndrome without metabolic abnormality: Implications for the early pathophysiology. *Geriatr Gerontol Int.* 12,140-6. (査読有)
doi: 10.1111/j
- (18) Okano H, Isono Y, Tanaka H, Ishihara Y, Matsusaki S, Aoki M, Sase T, Saitou T, Mukai K, Nishimura A, Takemoto M, Yokote K. (2011) Primary liver tumor associated with Werner syndrome (adult progeria). *Hepatology Res.* 41,1260-5. (査読有)
doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00877.x.
- (19) Oshima Y, Kinouchi K, Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, Bokuda K, Narita T, Kurosawa H, Sun-Wada GH, Wada Y, Yamada T, Takemoto M, Saleem MA, Quaggin SE, Itoh H. (2011) Prorenin Receptor Is Essential for Normal Podocyte Structure and Function. *J Am Soc Nephrol.* 22, 2203-12. (査読有)
doi: 10.1681/ASN.2011020202
- (20) Tsurutani Y, Fujimoto M, Takemoto M, Irisuna H, Koshizaka M, Onishi S, Ishikawa T, Mezawa M, He P, Honjo S, Maezawa Y, Saito Y, Yokote K. (2011) The roles of transforming growth factor- β and Smad3 signaling in adipocyte differentiation and obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 407, 68-73. (査読有)
doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.106
- (21) Kutschera S, Weber H, Weick A, Desmet F, Genove G, Takemoto M, Prahst C, Riedel M, Mikelis C, Baulande S, Champseix C, Kummerer P, Conseiller E, Multon MC, Heroult M, Bicknell R, Carmeliet P, Betsholtz C, Augustin HG. (2011) Differential endothelial transcriptomics identifies Semaphorin3G as a vascular class 3 semaphorin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31, 151-9. (査読有)
DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.215871
- 〔学会発表〕(計 40 件)
- (1) 前澤善朗、竹本稔、井出真太郎、井出佳奈、Tuncer Onay, Rizaldy Scott, Susan E. Quaggin、横手幸太郎 (2014) 転写因子 Tcf21 のポドサイトにおける欠損は糖尿病性腎症の増悪をもたらす。第 26 回糖尿病性腎症研究会、12 月 6 日、ベルサール神田(東京都千代田区)
- (2) 石橋亮一、竹本稔、黒田正幸、小川真、若林華恵、鶴谷悠也、服部暁子、茂手木宏美、渡邊亜紀、横手幸太郎 (2014) 抗 LCAT 抗体により低脂血症とネフローゼ症候群をきたした 1 例。(ポスター発表) 第 24 回臨床内分泌代謝 Update、11 月 29 日、大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)
- (3) 北原綾、徳山宏丈、松本淳子、野本尚子、服部暁子、竹本稔、横手幸太郎 (2014) 肥満症患者における心理的特徴の検討。(ポスター発表 第 35 回日本肥満学会、10 月 24 日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県宮崎市)
- (4) 大原恵美、徳山宏丈、北本匠、服部暁子、出口ハンナ、北原綾、竹本稔、林秀樹、横手幸太郎 (2014) 高度肥満の成長ホルモン分泌に対する影響。(ポスター発表) 第 35 回日本肥満学会、10 月 24 日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県宮崎市)

- (5) 林愛子、徳山宏丈、北原綾、服部暁子、大原恵美、熊谷仁、小林一貴、林秀樹、竹本稔、横手幸太郎 (2014) 肥満外科治療に伴う骨密度・体組成変化の検討。第35回日本肥満学会、10月24日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県宮崎市)
- (6) 山賀政弥、河村治清、竹本稔、小林一貴、徳山宏丈、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) 粥状動脈硬化形成におけるSemaphorin 3Gの機能解析。第29回日本糖尿病合併症学会、10月4日、都市センターホテル(東京都千代田区)
- (7) 正司真弓、小林一貴、竹本稔、佐藤泰憲、河村治清、徳山宏丈、石川崇広、石橋亮一、平山吉朗、花岡英紀、原正則、横手幸太郎 (2014) 糖尿病腎症における尿中ポドカリキシンと各種病態指標との前向き検討。第29回糖尿病合併症学会、10月3日、都市センターホテル(東京都千代田区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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