

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591312

研究課題名(和文)セマフォリン3gの解析を通じた心腎連関の機序解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of cardiorenal syndrome through the functional analysis of Semaphorin 3G

研究代表者

小林 一貴 (Kobayashi, Kazuki)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座教員

研究者番号：30400998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000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、腎と心血管の病態が互いに連関する機序を解明することである。Sema3G KOマウスでは糖尿病や炎症による腎障害の増悪や、動脈硬化モデルにおける病変の促進が起こり、in vitroではSema3Gがポドサイトの形態維持や抗炎症機序、および単球系細胞の血管内皮接着や増殖の抑制に関与することを見出した。これらの結果から、Sema3Gは腎障害および動脈硬化の両病態に抑制的に関与してい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 cardiorenal syndrome, the association between atherosclerosis and kidney diseases, through the functional analysis of Sema3G. We found that Sema3G deficient mice showed worsening renal injury under diabetic or inflammatory condition or more progressive atheroma in atherosclerosis model. In vitro, we also revealed that Sema3G had a role in maintenance of cell shape or anti-inflammatory function in podocytes, and in suppressive mechanism for proliferation or adhesion in monocytes. Through our data, we surmise that Sema3G could be the common suppressive factor for both pathogenesis of atherosclerosis and kidney diseases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：セマフォリン3G 心腎連関 ポドサイト 動脈硬化 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

我が国では心血管病 (Cardio Vascular Disease: CVD) などの動脈硬化性疾患が増加しているが、近年やはり増加が続く慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) 患者において、有意に心血管病罹患率が高いことが疫学的に明らかになっており、「心腎連関」と称されている。

CKD とは尿検査異常もしくは腎機能低下が 3 カ月続く病態であり、2002 年に米国で提唱された概念である。CKD が末期腎不全と CVD のリスクとなることは我が国の福岡県 久山町研究でも明らかとなっている。CKD の主な原因疾患は糖尿病腎症であり、糖尿病患者数の増加に伴い、CKD の患者数の増加と、心腎連関に伴う CVD の発症率も増加の一途を辿ることが予想されている。CKD の病期の主座は微小血管の塊である糸球体である。心腎連関とは糸球体と冠動脈という二つの異なった場所にある血管が特異的障害される現象である。血管障害は内皮細胞障害がトリガーとなるも、全身の血管内皮細胞のうち何故、糸球体、冠動脈の内皮細胞障害が関連するのかはまだ十分に明らかになっていない。我々はこれまで、血管障害の解析を Transforming growth factor- (TGF-) という増殖因子に着目し、動脈硬化の発症機序 (Kobayashi et al. Circ Res 2005) や糖尿病腎症の発症進展機序 (Fujimoto, Kobayashi et. al Biochem Biophys Res Commun. 2003) に関して研究を行い報告してきた。

通常の血管は内皮細胞と平滑筋細胞 (微小血管では周細胞) によって構築されているが、糸球体は他の部位の微小血管と異なり、上皮系の細胞であるポドサイトによって血管網が覆われている。ポドサイトは先に述べた TGF- や Vascular endothelial growth (VEGF), Angiopoietin 等の増殖因子を分泌し血管網の恒常性の維持に役割を果たしている。我々はこれまで CKD の発症機序を探るべくポドサイト特異的遺伝子を同定し、その機能解析を行ってきた (Takemoto et al. EMBO J, 2006, He, Takemoto et. Al Kidney Int 2007, He, Takemoto et. J Am Soc Nephrol. 2008)。この解析を通して Sema3G を同定するに至った。Semaphorin は元来、神経の成長円錐を虚脱させる因子として同定され Collapsin とも呼ばれている。哺乳類ではおよそ 20 種類存在することが報告されており、膜貫通型や分泌型等に分類される。Sema3G は膜貫通ドメインがなく分泌型に分類され、これまでの Sema3A から Sema3F に加えて、7 番目の分泌型として Sema3G と命名された。Semaphorin はニューロピリン (Nrp) やプレキシンといった受容体と結合することにより細胞内にシグナルを伝え、主に細胞内骨格の変化や細胞のバイアビリイに関与することが報告されている。我々はポドサイト特異的な遺伝子として Sema3G

を同定し、さらに機能解析の目的に通常のコモロガスリコンビネーション法を用いて Sema3G ノックアウト (Sema3G KO) マウスを作成した。この際にノックアウトコンストラクに LacZ 遺伝子を導入し、Sema3G ヘテロマウスを用いて Sema3G 遺伝子の詳細な遺伝子発現様式をガラクトシダーゼ染色を用いて検討した結果、糸球体のみならず心臓の冠動脈内皮細胞に発現を確認した。つまり心腎連関発症の病気の主座に Sema3G が特異的に発現することが明らかになった。ポドサイトにおける Sema3G の機能に関してはまだ明らかになっていないが、内皮細胞においては Nrp1、2 と結合することや血管新生に関与することを報告している (Kutschera、Takemoto et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011)。

Sema3G はリガンドとして働き、その受容体は Nrp やプレキシンである。Nrp には VEGF や TGF- も結合することが報告されている。VEGF や TGF- は心、腎に限らず比較的広い組織に発現が観察される。その為、広範に発現している増殖因子が臓器特異的 (心、腎) でかつ同じ受容体を共有する Sema3G により制御されることによって臓器時的な作用を発現する可能性がある。プレリミナリーな検討では Sema3G KO マウスの糸球体では TGF- の発現上昇や内皮細胞の有化の減弱など内皮細胞障害が示唆されている。

これらの知見より申請者らは、Sema3G の発現変化によって Sema3G 単独もしくは心、腎局所における他の増殖因子のアンバランスが生じ、そのことが心腎連関のトリガーになっている、という仮説をたて、検討に着手した。

2. 研究の目的

申請者らが同定した、腎、心血管特異的な遺伝子 Sema3G の機能解析を通して、心腎連関といった二つの異なる臓器の障害が如何に関連し発症するかを解明し、心腎連関の新しい診断マーカーや治療法開発など臨床応用へと展開する為の研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

- (1) Sema3G KO マウスの腎、心血管の機能解析
- (2) Sema3G KO マウスの腎、心血管における他の増殖因子の発現や細胞内シグナルの解析
- (3) Sema3G KO マウスの腎、心血管の遺伝子発現解析
- (4) 病的状態における腎、心血管での Sema3G および他の増殖因子の発現様式を解析

4. 研究成果

腎臓関連で明らかになったこと：

- (1) Sema3G KO マウスの糸球体ではポドサイトの細胞形態が変化しアルブミン尿が微増する。
- (2) Sema3G KO マウスに糖尿病や炎症刺激などを負荷すると、腎障害が野生型に比べて増悪する。
- (3) Sema3G KO マウスから樹立したポドサイトでは野生型ポドサイトに比べ、炎症性サイトカインの分泌が亢進する。

- (4) Sema3G 蛋白を野生型ポドサイト添加到すると、炎症刺激によるシグナル活性化を抑制する。

心血管関連で明らかになったこと：

- (5) 動脈硬化モデルである ApoE KO マウスと交配した ApoE/Sema3G ダブル KO マウスに高コレステロール負荷を行うと、ApoE KO マウスに比べ動脈硬化巣が増大し、in vitro では単球/マクロファージの増殖や内皮細胞への接着を抑制する。

これらの結果から、Sema3G は腎障害および動脈硬化の両病態に抑制的に関与している可能性が示唆された。今後さらに研究を進め、Sema3G が慢性腎臓病および心血管病の各種病態に関与する機序、ならびに心腎連関に対して果たしうる役割を解明し、さらには将来的にリコンビナント蛋白や発現遺伝子導入などによる Sema3G を介した治療の可能性についても検討を行いたいと考えている。

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 20 件)

- 1) 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/jdi.12282
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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.2013.03.034.
- 5) 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)
www.m-hikari.com
- 6) Tokuyama H, Kawamura H, Fujimoto M, Kobayashi K, Nieda M, Okazawa T, Takemoto M, Shimada F. A Low-grade Increase of Serum Pancreatic Exocrine Enzyme Level by Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor in Patient with Type 2 Diabetes Diabetes. (2013) *Res Clin Pract.*e66-e69. (査読有)
doi:10.1016/j.diabres.2013.03.034
- 7) Takemoto M, Ishikawa T, Onishi S, Okabe E, Ishibashi R, He Peng, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K. Atrovastatin ameliorates the urinary excretion of podocytes in patients with type2 diabetes complicated with dyslipidemia .(2013)*Diabetes Res ClinPract.*100:e26-e29. (査読有)
doi:10.1016/j.diabres.2012.12.018
- 8) 竹本 稔、小林 一貴、河村 治清、横手 幸太郎 (2013) 糖尿病患者におけるしびれ症状の発現頻度について - 外来患者122例を対象としたアンケート調査に基づく解析 -*Therapeutic Reseach* 34(4):531-537
- 9) 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.
- 10) 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

- 11) 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
- 12) 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

〔学会発表〕(計 40 件)

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 坂本憲一、竹本稔、久野響子、石川崇広、石橋亮一、賀鵬、河村治清、小林一貴、徳山宏丈、前澤善朗、横手幸太郎 (2014) DPP-4 基質である脳下垂体
- アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) のポドサイトでの抗炎症作用に関する検討。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)
- 5) 坂本憲一、竹本稔、久野響子、石川崇広、大西俊一郎、石橋亮一、賀鵬、正司真弓、河村治清、小林一貴、徳山宏丈、前澤善朗、横手幸太郎 (2014) 脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) のポドサイトにおける抗炎症作用に関する検討。(ポスター発表) 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、7 月 11 日、京王プラザホテル (東京都新宿区)
- 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。(ポスター発表) 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、7 月 10 日、京王プラザホテル (東京都新宿区)
- 7) 北本匠、小林一貴、横尾英孝、佐藤泰憲、竹本稔、内田大学、金塚東、栗林伸一、櫻井健一、寺野隆、橋本尚武、花岡英紀、石川耕、大西俊一郎、横手幸太郎、SUCCESS 研究グループ (2014) インスリン抵抗性改善薬投与中の高齢 2 型糖尿病患者へのシタグリプチン追加による血糖改善効果の検討。第 56 回日本老年医学会学術集会 シンポジウム 5、6 月 13 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- 8) 小林一貴 (2014) 高齢者の心血管病予防。第 56 回日本老年医学会学術集会 シンポジウム 5、6 月 13 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- 9) 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、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) 粥状動脈硬化形成における Semaphorin 3G の機能解析。第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、5 月 24 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
- 10) 石橋亮一、竹本稔、秋元義弘、河村治清、小林一貴、大西俊一郎、石川崇広、賀鵬、Betsholtz Christer (2014) ポドサイト分泌タンパク Semaphorin3g の糸球体における機能解析。第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、5 月 24 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
- 11) 坂本憲一、竹本稔、久野響子、石川崇広、

大西俊一郎、石橋亮一、賀鵬、北本匠、服部暁子、正司真弓、山賀政弥、河村治清、小林一貴、徳山宏丈、前澤善朗、横手幸太郎(2014)神経伝達因子 脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)のポドサイトにおける抗炎症作用に関する検討。第57回日本糖尿病学会年次学術集会、5月24日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

12) 服部暁子、徳山宏丈、山賀正弥、正司真弓、坂本憲一、北本匠、石橋亮一、石川崇広、大西俊一郎、前澤善朗、河村治清、小林一貴、島田典生、竹本稔、横手幸太郎(2014)DPP-4阻害剤はマクロファージ/単球活性化マーカー可溶性CD163を抑制する。第57回日本糖尿病学会年次学術集会、5月24日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

13) 横尾英孝、小林一貴、佐藤泰憲、竹本稔、内田大学、金塚東、栗林伸一、櫻井健一、寺野隆、橋本尚武、花岡英紀、石川耕、大西俊一郎、横手幸太郎、SUCCESS研究グループ(2014)インスリン抵抗性改善薬投与中の2型糖尿病患者における追加投薬の肥満の有無による効果の検討(SUCCESS-1研究サブグループ解析)。第57回日本糖尿病学会年次学術集会、5月23日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

14) 賀鵬、河村治清、小林一貴、徳山宏丈、石川崇広、大西俊一郎、石橋亮一、岡部恵見子、坂本憲一、山賀政弥、北本匠、服部暁子、正司真弓、竹本稔、横手幸太郎(2014)腎糸球体ポドサイトにおけるシロスタゾール/プロブコールの相加的抗炎症メカニズム。第57回日本糖尿病学会年次学術集会、5月23日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 一貴 (KOBAYASHI, Kazuki)

千葉大学・大学院医学研究院・寄附講座教員
研究者番号：30400998

(2)研究分担者

1) 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) 藤本 昌紀 (FUJIMOTO, Masaki)

千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20451742

3) 河村 治清 (KAWAMURA, Harukiyo)

千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：70527902