

# 慢性腎臓病における Semaphorin3A を介した腎臓線維化の制御

辻 憲二

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学

key words : Semaphorin3A, 腎臓線維化, 線維芽細胞, c-Jun NH2-terminal kinase

## 要 旨

腎臓線維化は慢性腎臓病進展における共通経路として知られるが、治療法は限られており、新規機序の薬物創出が求められている。Semaphorin3A (SEMA3A) は細胞間の情報伝達物質として機能する分泌型蛋白であり、細胞増殖、血管新生、免疫細胞の制御など多彩な生理活性作用を持つ。SEMA3A は腎臓では糸球体上皮細胞および尿細管上皮細胞に発現し、腎臓病進展との関連性が報告されるがその機序は不詳である。本研究では一側尿管結紮 (unilateral ureteral obstruction; UUO) マウスモデルを用いて、SEMA3A と腎臓線維化の関連および SEMA3A 阻害剤の効果を検討した。UUO マウスの腎臓には SEMA3A およびその受容体の Neuropilin-1 (NRP1) 発現が亢進しており、SEMA3A 阻害剤により UUO による腎臓線維化は有意に軽減した。TGF- $\beta$ 1 により誘導される培養ヒト尿細管上皮細胞の上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) は SEMA3A 阻害剤により抑制された。JNK:c-Jun N-terminal kinase 阻害剤 (SP600125) は SEMA3A により誘導される EMT を抑制したことから、JNK シグナルが SEMA3A 経路による腎臓線維化に関与すると考えられた。さらに培養線維芽細胞に SEMA3A を添付すると線維化マーカーの発現亢進が認められた。以上より腎臓線維化に対する SEMA3A を制御する新たな治療戦略となりうることを示された。

## 1 研究目的

我が国の慢性腎臓病 (CKD) 患者は 1,300 万人にも及び、透析患者数は 30 万人を超え、依然として増加傾向であり、透析医療のみで 1.4 兆円以上に及ぶ。腎臓病対策として、平成 30 年に厚生労働省の腎疾患対策検討会報告書における全体目標として、慢性腎臓病の早期発見・重症化予防および QOL の維持向上があげられている。慢性腎臓病の進展において腎臓線維化は共通経路として知られ、腎臓線維化の抑制は CKD 進行を抑制する手段と考えられる一方で、腎臓線維化の進展機序は未だに不明な点も多く、新規機序の薬物創出が期待される。

Semaphorin は細胞間のシグナル伝達に関わる蛋白質群であり、7 種のクラスに分けられる<sup>1)</sup>。そのなかで SEMA3A は細胞増殖、遊走、血管新生、免疫細胞の制御など多彩な生理活性作用を有する分泌型蛋白であり、神経系や眼科領域などの複数の臓器の種々の疾患に関与することが報告されている<sup>1)</sup>。SEMA3A は腎臓では糸球体上皮細胞および尿細管上皮細胞に発現し、発現量の増加と腎障害の進展に相関することが報告されている<sup>2)</sup>。腎臓尿細管障害および腎臓線維化における SEMA3A の病態への関与およびその機序は不詳である。本研究は SEMA3A の尿細管上皮細胞障害および腎臓線維化への影響を解析し、SEMA3A 阻害剤を用いて慢性腎臓病における重症化防止効果を解析することにより SEMA3A の治療標的分子としての有用性を検討することを目的とした。UUO マウスを用いて

慢性腎臓病における SEMA3A とその受容体である NRP1 の発現量の評価を行い、SEMA3A 阻害剤を用いて腎臓病の進行抑制への効果を検討した。また、尿細管上皮細胞および線維芽細胞を用いて SEMA3A 経路の腎臓線維化における役割および機序を解析した。

## 2 研究方法

### 2-1 腎臓線維化モデルマウスを用いた腎臓線維化における SEMA3A 経路の解析

腎臓線維化モデルとして、野生型 C57BL/6 マウスに UUO 手術 (n=7) を行い、コントロールマウス (n=7) と合わせて術後 2 週間後に屠殺し、腎臓を採取した。腎臓組織から蛋白質を抽出し、イムノブロットを行い SEMA3A および NRP1 の発現量を比較した。ホルマリン固定を行った腎臓組織からパラフィンブロックを作成し、ヘマトキシリン・エオジン (H & E) 染色およびマッソン・トリクローム (M-T) 染色を行い、腎尿細管間質の萎縮および線維化の程度を評価した。また、腎臓組織凍結切片を用いて免疫蛍光染色を行い、SEMA3A、NRP1 の腎尿細管間質における発現および局在について評価した。

### 2-2 腎臓線維化モデルマウスに対する SEMA3A 阻害剤の効果の解析

野生型 C57BL/6 マウスに UUO 手術を行い、連日腹腔内に Vehicle として生食を投与する群 (UUO 群: n=7)、UUO 手術に加えて SEMA3A 阻害剤 (SM-345431<sup>3)</sup>) を連日腹腔内投与 (20  $\mu$ g/日) する群 (UUO + SEMA-I 群: n=7) および Sham 群 (n=7) に分け、UUO 手術から 2 週間後にすべてのマウスを屠殺して、腎臓組織を採取した。腎臓組織から蛋白質の抽出、パラフィンブロックの作製、凍結切片をそれぞれ作成し、イムノブロット、H & E 染色、M-T 染色および免疫蛍光染色法を行い、腎尿細管間質の萎縮および線維化の程度、炎症細胞浸潤、EMT 等を評価した。また SEMA3A 阻害剤によってその影響がどのように制御するかについて解析を行った。さらに SEMA3A シグナルの下流にあることが報告されている JNK シグナルの評価を行った。

### 2-3 培養近位尿細管細胞および線維芽細胞に対する SEMA3A 経路の影響の解析

in vitro において培養近位尿細管細胞 (HK-2 細胞) および線維芽細胞 (NIH/3T3 細胞) の各細胞を用いて SEMA3A 経路の解析を行った。TGF- $\beta$ 1 を用いて HK-2 細胞の EMT を誘導し、SEMA3A 阻害剤の EMT および JNK シグナルへの影響を評価した。EMT の評価としてウェスタンブロットによる Vimentin/E-cadherin 比を用いた。さらに JNK 阻害剤を用いて SEMA3A による HK-2 細胞 EMT への影響を評価した。

3T3 細胞に対する SEMA3A の影響を評価するために、recombinant SEMA3A を細胞に添加し、線維化マーカーである  $\alpha$ SMA、Fibronectin および Collagen type I の発現量をイムノブロットおよび蛍光免疫染色を用いて評価した。

## 3 研究結果

UUO モデルマウスの腎臓において、コントロールマウスと比較して近位尿細管上皮細胞における SEMA3A の発現は有意に高値であった。また SEMA3A の受容体: NRP1 の発現量は、腎臓間質の線維芽細胞において著明に上昇を認めた。SEMA3A-NRP1 経路の下流であることが報告されている JNK シグナルの亢進が近位尿細管上皮細胞および線維芽細胞に認められ、両者の細胞における SEMA3-NRP1 経路の亢進が示唆された。UUO マウスにより惹起した腎臓線維化に対して SEMA3A 阻害剤を用いたマウスでは M-T 染色により評価される腎臓線維化が未治療群と比較して有意に減少しており、線維化のマーカーとして知られる  $\alpha$ SMA および Fibronectin の蛋白発現量は有意に減少しており、SEMA3A 阻害剤による腎臓線維化抑制効果が示唆された。SEMA3A 阻害剤治療群において、免疫染色およびイムノブロット法の Vimentin/E-cadherin 比で評価される EMT は軽減しており、SEMA3A 阻害剤の EMT の制御による線維化抑制効果が示唆された。In vitro による解析では、HK-2 細胞において TGF- $\beta$ 1 刺激による EMT は SEMA3A 阻害剤により有意に抑制された。さらに、recombinant SEMA3A により惹起される HK-2 細胞の EMT は、JNK 阻害剤 (SP600125) により有意に抑制されたことより SEMA3A 経路は JNK シグナルを介することが示された。また 3T3 細胞に recombinant SEMA3A を添付すると、線維化マーカー

である  $\alpha$ SMA, Fibronectin および Collagen type I の発現量は免疫ブロット法および免疫染色法いずれの評価でも増加を認め、線維芽細胞の SEMA3A 刺激による線維化誘導が *in vitro* においても示された。

#### 4 考察

SEMA3A は腎臓内では糸球体上皮細胞および尿細管上皮細胞に発現しており<sup>4)</sup>、過剰な SEMA3A の発現が、急性腎障害および糖尿病性腎症の進行を誘導することが報告されている<sup>5,6)</sup>。SEMA3A 発現量の増加と腎障害との関連性について我々はこれまでに糸球体上皮細胞障害と SEMA3A 経路に着目した研究を行い、尿中 SEMA3A レベルがネフローゼ症候群患者の疾患活動性と強く関連することを明らかにした<sup>5)</sup>。また、ドキシソルビシンによる糸球体上皮細胞障害のモデルマウスを用いた動物実験により、過剰な SEMA3A が JNK 経路を活性化させることにより糸球体上皮細胞障害およびそれに伴う尿蛋白を惹起し腎障害を加速すること、

SEMA3A 阻害剤によって糸球体上皮細胞障害が軽減されることを明らかにした<sup>6)</sup>。SEMA3A は糸球体上皮細胞のみならず尿細管上皮細胞にも発現していることから、本研究では腎尿細管間質における SEMA3A 経路と腎臓線維化の関連性に着目して研究を行い、SEMA3A 経路を介した腎臓線維化および SEMA3A 阻害剤による腎臓線維化の抑制効果を明らかにした。我々は、UUO による慢性腎障害の腎臓において、近位尿細管上皮細胞で SEMA3A 発現が亢進し、線維芽細胞において NRP1 の発現が亢進することを明らかにし、さらに JNK シグナルを介していることを解明した<sup>7)</sup>。さらに SEMA3A 阻害剤を使用することにより UUO による惹起される腎臓線維化が有意に抑制されることを明らかにし、腎臓病進展において SEMA3A 経路が関与すること、および SEMA3A 経路を制御することにより腎臓線維化が抑制しうる可能性を明らかにした。

SEMA3A-NRP1 経路はどのようにして JNK シグナ

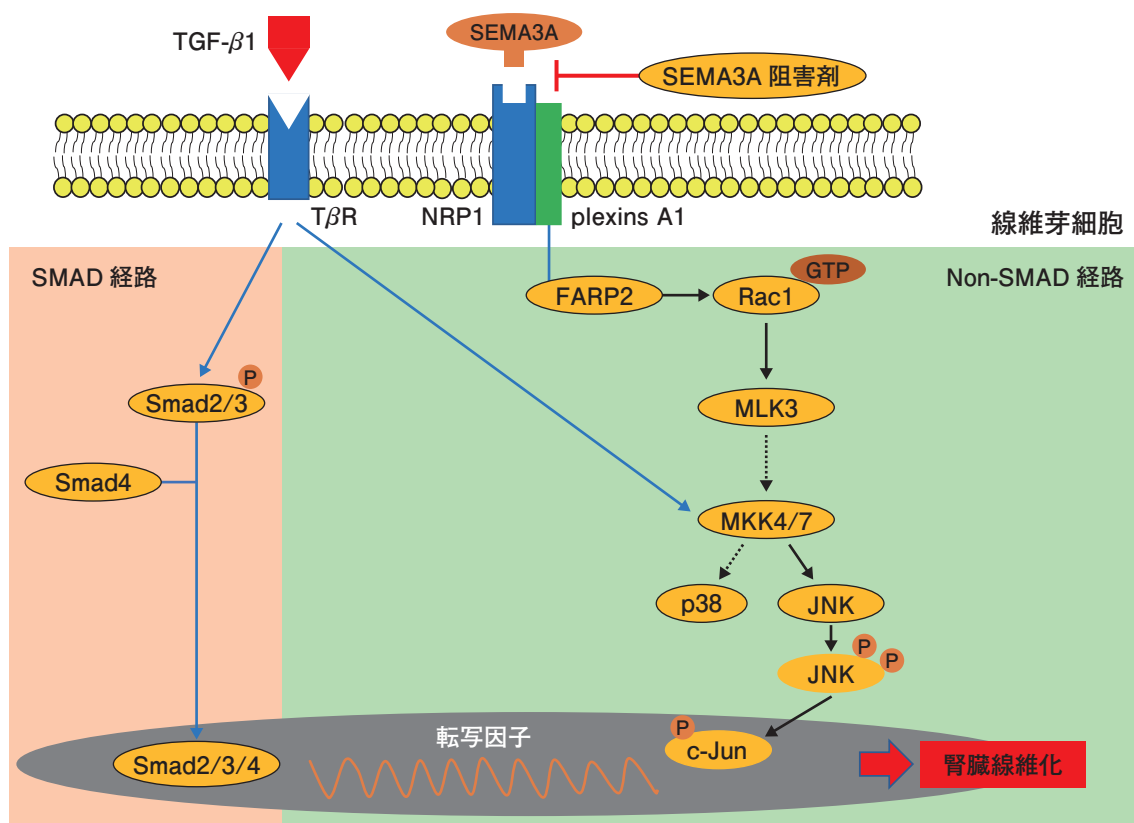


図1 SEMA3A 経路による JNK シグナルを介した腎臓線維化機序 (推論)

SEMA3A は受容体の NRP1 に結合すると、JNK シグナルの活性化を介して、腎臓線維化を誘導する。SEMA3A 阻害剤は SEMA3A と NRP1 の結合を阻害することで SEMA3A 経路を制御しうる。

Ⓟ : phosphorylation.

(著者作成)

ルを活性化するかについては、依然として不明である。JNK シグナルの上流にある MAPK ファミリーの MKK4 は、SEMA3A により刺激された神経で増加することが報告されている<sup>10)</sup>。また、SEMA3A 経路により FERM, ARH/Rho guanine nucleotide exchange factor, and pleckstrin domain-containing protein 2 (FARP2) を介して Rasrelated C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) が活性化されること<sup>11)</sup>、Rac1 が MKK4/7 を介して JNK 経路を制御することが報告されている<sup>12)</sup>。以上より SEMA3A-NRP1-plexin-A1 complex/FARP2/Rac1/MLK1-MLK3/ MKK4/7/JNK カスケードが存在する可能性が考えられる (図 1)。これらのシグナル伝達については今後の詳細な検討が求められる。

本研究によって、SEMA3A 経路と腎臓線維化の関連性、および SEMA3A 阻害剤の腎臓線維化に対する治療効果が明らかになった。今後の検討課題としては、腎臓病の進展における Semaphorin3A 経路の関与について、Loxp-Cre システムを用いた近位尿細管特異的 SEMA3A ノックアウトを作成し、表現型解析および慢性腎障害に対する耐性の評価などの未だ解明されていない基礎的な問題を解決すること、さらに Semaphorin3A 抗体を治療薬として臨床応用へと展開するための研究基盤の確立が重要と考えられる。

## 結 論

SEMA3A-NRP1 経路は JNK シグナルを介して UUO による腎臓線維化を進めることを明らかにした。SEMA3A 阻害剤により SEMA3A 経路を制御することで、腎臓線維化を抑制する革新的な治療の選択肢となり得ると考えられる。

令和元年度日本透析医会公募研究助成により得られた成果は、原著論文として「American Journal of Physiology-Renal Physiology」に投稿したため、二重投稿となることを避け、本報告書ではその概要を総説的な報告書として記載した。なお、原著論文は 2021 年 12 月に下記論文として公表されている。

Sang Y, Tsuji K, Fukushima K, et al. : Semaphorin3A-inhibitor ameliorates renal fibrosis through the regula-

tion of JNK signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 2021; 321(6) : F740-F756.

利益相反自己申告：申告すべきものなし

## 文 献

- 1) Winberg ML, Noordermeer JN, Tamagnone L, et al. : Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* 1998; 95(7) : 903-916.
- 2) Aggarwal PK, Veron D, Thomas DB, et al. : Semaphorin3a promotes advanced diabetic nephropathy. *Diabetes* 2015; 64(5) : 1743-1759.
- 3) Kumagai K, Hosotani N, Kikuchi K, et al. : Xanthofulvin, a novel semaphorin inhibitor produced by a strain of penicillium. *J Antibiot (Tokyo)* 2003; 56 : 610-616.
- 4) Guan F, Villegas G, Teichman J, et al. : Autocrine class 3 semaphorin system regulates slit diaphragm proteins and podocyte survival. *Kidney Int* 2006; 69 : 1564-1569.
- 5) Tian X, Gan H, Zeng Y, et al. : Inhibition of semaphorin-3a suppresses lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. *J Mol Med (Berl)* 2018; 96 : 713-724.
- 6) Aggarwal PK, Veron D, Thomas DB, et al. : Semaphorin3a promotes advanced diabetic nephropathy. *Diabetes* 2015; 64 : 1743-1759.
- 7) Inoue-Torii A, Kitamura S, Wada J, et al. : The level of urinary semaphorin3A is associated with minimal change nephrotic syndrome. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2017; 10 : 167-174.
- 8) Sang Y, Tsuji K, Inoue-Torii A, et al. : Semaphorin3A-inhibitor ameliorates doxorubicin-induced podocyte injury. *Intl J Mol Sci* 2020; 21(11) : 4099.
- 9) Sang Y, Tsuji K, Fukushima K, et al. : Semaphorin3A-inhibitor ameliorates renal fibrosis through the regulation of JNK signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 2021; 321(6) : F740-F756.
- 10) Ben-Zvi A, Yagil Z, Hagalili Y, et al. : Semaphorin 3A and neurotrophins : a balance between apoptosis and survival signaling in embryonic DRG neurons. *J Neurochem* 2006; 96 : 585-597.
- 11) Danelon V, Goldner R, Martinez E, et al. : Modular and distinct plexin-A4/FARP2/Rac1 signaling controls dendrite morphogenesis. *J Neurosci* 2020; 40 : 5413-5430.
- 12) Zhang QG, Wang R, Han D, et al. : Role of Rac1 GTPase in JNK signaling and delayed neuronal cell death following global cerebral ischemia. *Brain Res* 2009; 1265 : 138-147.