

血管新生 negative feedback 制御因子 Vasohibin-1 によるマウス糖尿病性腎症進展制御効果の検討

那須 達世^{a*}, 前島 洋平^a, 木野村 賢^a, 川原 (広越) 久美子^a, 田邊 克幸^a,
杉山 齊^{a,b}, 園田 光^c, 佐藤 靖史^d, 横野 博史^a

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 ^a腎・免疫・内分泌代謝内科学, ^b慢性腎臓病対策 腎不全治療学, ^c塩野義製薬,
^d東北大学加齢医学研究所 腫瘍循環研究分野

キーワード：糖尿病性腎症, 血管新生, vasohibin-1

Vasohibin-1, a negative feedback regulator of angiogenesis, ameliorates renal alterations in a mouse model of diabetic nephropathy

Tatsuyo Nasu^{a*}, Yohei Maeshima^a, Masaru Kinomura^a, Kumiko Hirokoshi-Kawahara^a, Katsuyuki Tanabe^a,
Hitoshi Sugiyama^{a,b}, Hikaru Sonoda^c, Yasufumi Sato^d, Hirofumi Makino^a

Departments of ^aMedicine and Clinical Science, ^bCenter for Chronic Kidney Disease and Peritoneal Dialysis, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and
Pharmaceutical Sciences, ^cDiscovery Research Laboratories, Shionogi, ^dDepartment of Vascular Biology, Institute of Development, Aging, and Cancer, Tohoku University

緒 言

わが国にて、末期腎不全より維持透析療法を施行されている患者数は年々増加し、28万人超となっている。原疾患の中でも、糖尿病性腎症は最多で、その進展機序の解明・新たな治療法の開発が重要な課題である。糖尿病性腎症では、早期に糸球体過剰濾過・糸球体肥大、続いてメサングウム基質の増加や尿中アルブミン排泄増加が認められ最終的に糸球体硬化から末期腎不全に到る¹⁾。腎症早期の段階で、糸球体係蹄数の増加・既存の血管の伸長等の「血管新生」様の現象が認められ、血管新生促進因子である vascular endothelial

growth factor (VEGF) の関与が報告された²⁻⁵⁾。また、我々は、近年血管新生抑制因子 tumstatin peptide, endostatin peptide, NM-3 による糖尿病性腎症治療効果について報告してきた⁶⁻¹⁰⁾。

Vasohibin-1 (VASH-1) は VEGF 等の刺激下で内皮細胞より発現誘導され血管新生の negative feedback 制御を司る¹¹⁾。これまでに VASH-1 による動脈硬化・腫瘍増殖・増殖性網膜症の治療効果が報告されている¹¹⁻¹³⁾。今回、アデノウイルスベクターを用いた human (h) VASH-1 過剰発現による早期糖尿病性腎症進展抑制効果、及びその作用機序について検討した。

材料と方法

1. 動物実験

雄性 ICR マウス (5 週齢) に streptozotocin (STZ, 120mg/kg 体重) を 48 時間毎に 3 回腹腔内注射し、1 型糖尿病モデルを作成した。高血糖を確認後、human

平成23年1月受理

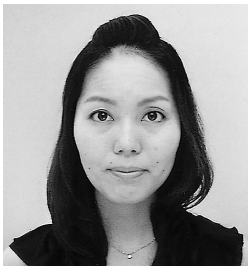
*〒790-0024 愛媛県松山市春日町83

愛媛県立中央病院

電話：089-947-1111 FAX：089-943-4136

E-mail：tatsuyon@snow.odn.ne.jp

プロフィール



那須 達世

昭和53年10月28日生

平成15年3月 愛媛大学医学部卒業

平成21年12月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科修了

平成17年8月 岡山大学病院腎臓・糖尿病・内分泌内科 医員

現在に至る

VASH-1 発現アデノウイルスベクター (AdhVASH-1) もしくは対照として Ad-LacZ を 5×10^9 vp/mouse にて 2 週毎に尾静脈内投与した。アデノウイルスベクター投与開始後 4 週で尿中アルブミン・クレアチニン比 (UACR), 24 時間クレアチニンクリアランス (Ccr), 体重, 腎重量, 血糖を測定した。PAS 染色光顕切片にて糸球体容積およびメサンギウム matrix index を測定した。酵素抗体法を用いて, F4/80 陽性単球/M ϕ 数を算定し, 間接蛍光抗体法を用いて CD31 陽性糸球体内皮細胞領域, IV 型コラーゲン蓄積を評価し, CD31/ α SMA と VASH-1 の蛍光二重染色を行った。また腎皮質より RIPA buffer を用いて蛋白抽出し, Western blot により TGF- β 1, MCP-1, RAGE, VEGF, VEGFR2 (VEGF 受容体), pVEGFR2 (リン酸化 VEGFR2), actin の発現 (活性化) 変化を検討し, 血清中及び肝組織での hVASH-1 発現を観察した。さらに腎皮質より total RNA を抽出し real-time PCR 法にて TGF- β , MCP-1 の mRNA 発現変化を評価した。

2. ヒト糸球体内皮細胞 (hGECs)

hGECs を, recombinant hVASH-1 (rhVASH-1) 存在下にて, VEGF (1 nM) または高糖濃度 (25mM) 刺激し, 蛋白を抽出し VEGFR2, pVEGFR2, actin の発現 (活性化) 変化を Western blot にて検討した。高糖濃度条件の対照として mannitol 添加群を設けた。

3. マウスメサンギウム細胞 (MES13)

MES13 を recombinant hVASH-1 (rhVASH-1) 存在下にて高糖濃度 (25mM) にて刺激し, TGF- β , MCP-1, RAGE 蛋白の発現変化を Western blot にて検討した。

結 果

アデノウイルスベクター投与開始 4 週で, AdhVASH-1 投与糖尿病群では, AdLacZ 投与糖尿病群に比し有意に血清中・肝組織における hVASH-1 発現の増加が観察された (図 1 A)。AdLacZ 投与糖尿病群では非糖尿病群に比し有意な高血糖, 体重減少を認め, AdhVASH-1 投与糖尿病群でも同様で, 血糖改善効果等は観察されなかった。腎重量/体重比は AdLacZ 投与糖尿病群にて非糖尿病群に比し有意に増加したが, AdhVASH-1 投与糖尿病群にて有意な抑制効果を認めた (図 1 B)。UACR 及び Ccr は AdLacZ 投与糖尿病群にて非糖尿病群に比して有意に高値を呈したが, AdhVASH-1 投与糖尿病群では有意に抑制された (糸球体過剰濾過の是正) (図 1 C, D)。糸球体容積は, AdLacZ 投与糖尿

病群にて非糖尿病群に比して有意に増加し, AdhVASH-1 投与糖尿病群にて有意に抑制された (糸球体肥大の抑制) (図 1 E-I)。糖尿病対照群での糸球体内メサンギウム基質 (図 1 J) 及び IV 型コラーゲン陽性領域の増加・単球/M ϕ 浸潤が AdhVASH-1 投与糖尿病群にて有意に抑制された (図 2)。糸球体 CD31 陽性内皮細胞領域は糖尿病対照群にて増加したが, AdhVASH-1 投与糖尿病群にて抑制された (図 3 A-E)。腎皮質での VEGF 蛋白発現は糖尿病対照群にて非糖尿病群に比し有意に増加し, AdhVASH-1 投与による抑制作用は観察されなかった。一方, VEGFR2 および pVEGFR2 は糖尿病対照群にて非糖尿病群に比し有意に増加し, AdhVASH-1 投与糖尿病群にて有意な抑制効果を認めた (図 3 F-I)。糖尿病対照群にて腎での TGF- β , MCP-1, RAGE mRNA/蛋白発現が有意に増加したが, AdhVASH-1 投与糖尿病群では有意に抑制された (図 4)。内因性 mouse VASH-1 は, 糖尿病群の腎組織にて発現増加傾向を示し, CD31 陽性内皮細胞領域・ α -SMA 陽性メサンギウム領域に局在していた。

hGECs にて, VEGF 刺激後 5 分で有意な VEGFR2 リン酸化が観察されたが (図 5 A), リコンビナント VASH-1 (rhVASH-1) 蛋白添加により濃度依存性に抑制された (図 5 B)。また, hGECs を高糖濃度下で培養すると 24 時間後の時点で VEGFR2 リン酸化が有意に増加したが, rhVASH-1 添加により濃度依存性に抑制された (図 5 C)。

また, MES13 において, 高糖濃度下で培養すると 24 時間後の時点で TGF- β , MCP-1, RAGE 発現が増加していたが, rhVASH-1 添加により濃度依存性に抑制された (図 6)。

考 察

本研究では, 1 型糖尿病モデルマウスに, 外因性に VASH-1 を過剰発現させる目的で, アデノウイルスベクターを静脈内投与した。AdhVASH-1 の静脈内投与により肝臓にて発現した hVASH-1 が血流を介して腎に作用したと考えられたが, アデノウイルスベクター投与による炎症性変化等の副作用は観察されなかった。AdhVASH-1 投与群では, 早期糖尿病性腎症における微量アルブミン尿, 糸球体過剰濾過の指標であるクレアチニンクリアランスの増加が改善された。

また, 早期糖尿病性腎症において観察される糸球体肥大, メサンギウム基質増加・糸球体内皮細胞領域増

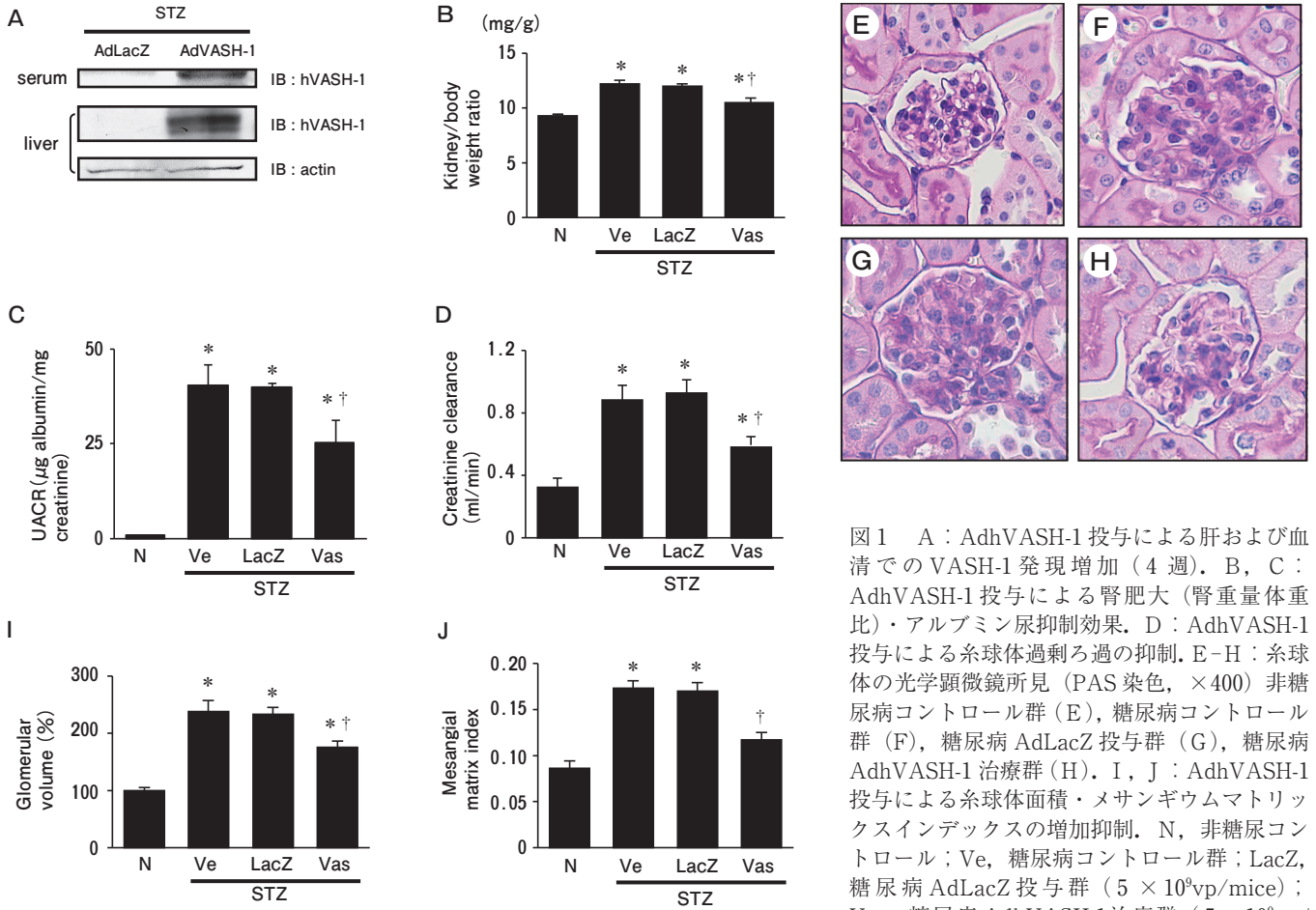


図1 A：AdhVASH-1投与による肝および血清でのVASH-1発現増加（4週）。B，C：AdhVASH-1投与による腎肥大（腎重量体重比）・アルブミン尿抑制効果。D：AdhVASH-1投与による糸球体過剰増殖の抑制。E-H：糸球体の光学顕微鏡所見（PAS染色， $\times 400$ ）非糖尿病コントロール群（E），糖尿病コントロール群（F），糖尿病 AdLacZ 投与群（G），糖尿病 AdhVASH-1 治療群（H）。I，J：AdhVASH-1投与による糸球体面積・メサンギウムマトリックスインデックスの増加抑制。N，非糖尿コントロール；Ve，糖尿病コントロール群；LacZ，糖尿病 AdLacZ 投与群（ 5×10^9 vp/mice）；Vas，糖尿病 AdhVASH-1治療群（ 5×10^9 vp/mice）。

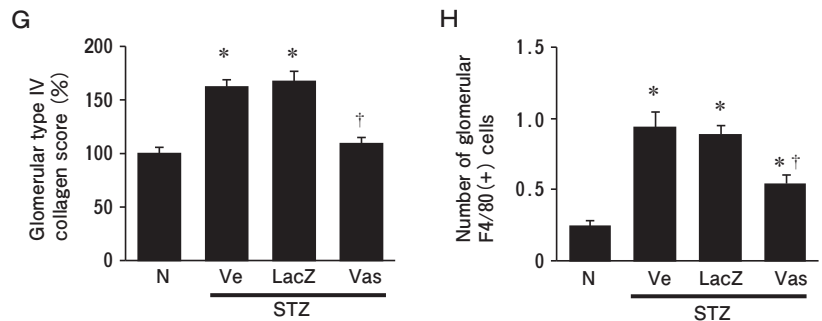
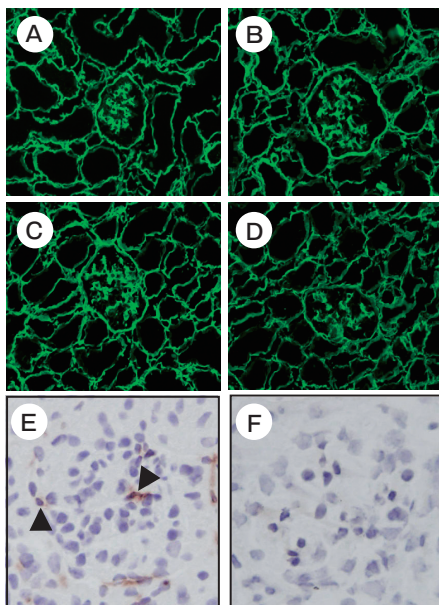


図2 A-D，G：AdhVASH-1による糸球体内 type IV collagen 陽性領域増加の抑制，非糖尿病コントロール群（A），糖尿病コントロール群（B），糖尿病 AdLacZ 投与群（C），糖尿病 AdhVASH-1 治療群（D）。A-D： $\times 200$ 。E，F，H：AdhVASH-1投与による糸球体内 F4/80陽性マクロファージ数増加の抑制，F4/80陽性糸球体（E矢頭）陰性コントロール（F）（ $\times 400$ ）。各群 $n = 5$ 。N，非糖尿コントロール；Ve，糖尿病コントロール群；LacZ，糖尿病 AdLacZ 投与群（ 5×10^9 vp/mice）；Vas，糖尿病 AdhVASH-1治療群。

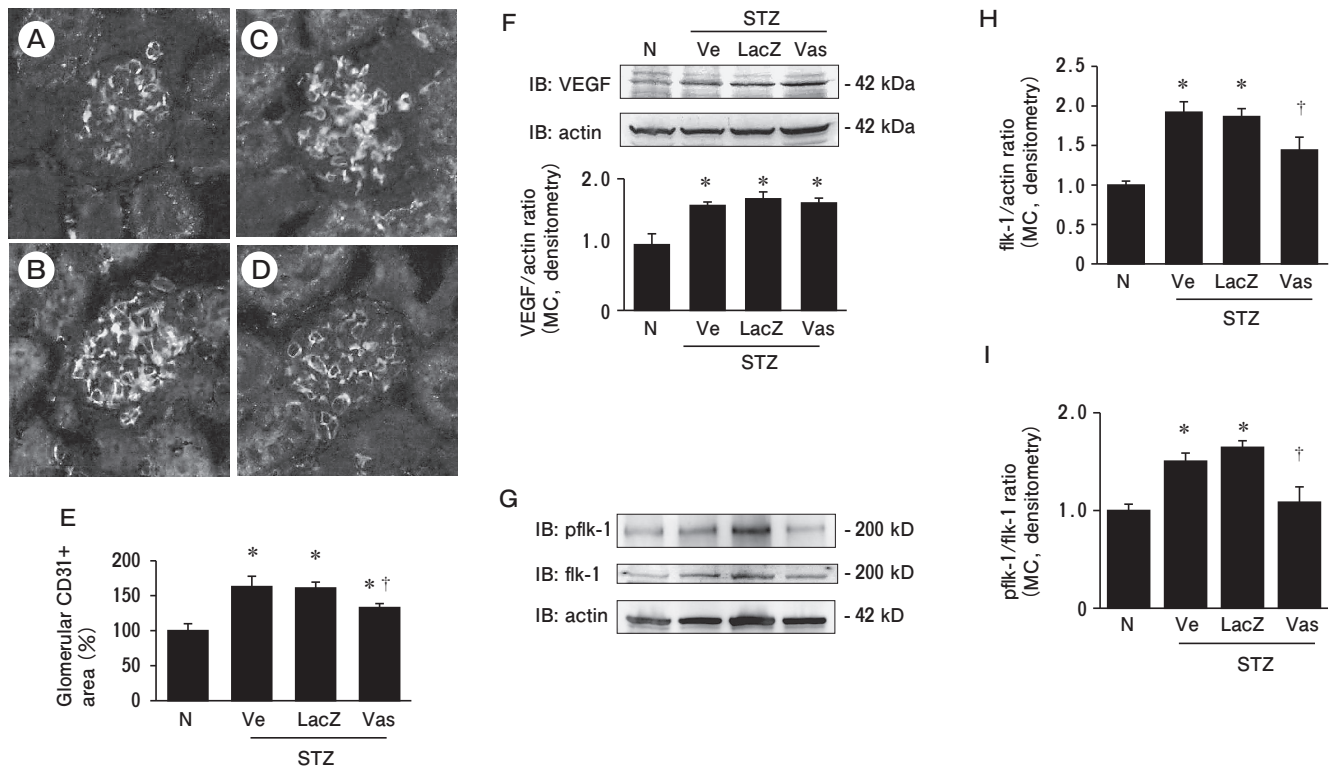


図3 AdVasohibin-1 投与による血管新生関連因子の変化

A-E: AdhVASH-1 投与による糸球体内 CD31 陽性領域の変化 (A-E), 非糖尿病コントロール群 (A), 糖尿病コントロール群 (B), 糖尿病 AdLacZ 投与群 (C), 糖尿病 AdhVASH-1 治療群 (D). F, G: 腎皮質での VEGF-A, phosphorylated flk-1 (pflk-1), total flk-1 蛋白発現の変化. N, 非糖尿病コントロール; Ve, 糖尿病コントロール群; LacZ, 糖尿病 AdLacZ 投与群 (5×10^9 vp/mice); Vas, 糖尿病 AdhVASH-1 治療群.

加が AdhVASH-1 投与群にて抑制された。従って、VASH-1 により糸球体係蹄濾過表面積の増加が抑制され、糸球体過剰濾過の制御効果が観察されたものと推察された。

次に血管新生促進因子 VEGF 及び VEGF 受容体について検討した。AdhVASH-1 投与群では、対照糖尿病群にて観察される腎皮質での VEGF-A 増加は抑制せず、VEGFR2 発現増加および VEGFR2 リン酸化(活性化)が抑制された。培養ヒト糸球体内皮細胞にて、VEGF 刺激・高糖濃度刺激による VEGFR2 リン酸化が VASH-1 蛋白添加により抑制され、糸球体内皮細胞の VEGFR2 過剰活性化制御による血管新生抑制効果から糸球体過剰濾過が制御されたものと考えられた。なお、VASH-1 受容体およびその細胞内シグナル伝達経路は未だ解明されておらず、今後のさらなる検討が必要である。

次に、糖尿病対照群の腎皮質における TGF- β , MCP-1, RAGE 発現増加が、AdhVASH-1 投与群にて

有意に抑制され、メサンギウム基質増加・炎症細胞浸潤・AGE による腎障害の制御効果が示唆された。さらに、高糖濃度培養条件下におけるマウスメサンギウム細胞での TGF- β , MCP-1, RAGE 発現増加が、VASH-1 添加により抑制され、糸球体内皮細胞のみでなくメサンギウム細胞への直接作用を介する腎症制御効果が考えられた。なお、内因性 VASH-1 発現は、糖尿病群の糸球体内皮細胞のみでなく、メサンギウム領域でも観察され、内皮細胞より分泌された VASH-1 がメサンギウム領域に沈着しメサンギウム細胞に直接作用を及ぼす可能性が示唆された。

糖尿病性腎症のみならず慢性腎臓病全般にて、傍尿細管毛細血管 (PTC) 数の減少、尿細管間質虚血/低酸素に伴う尿細管間質病変の進行が観察され、腎機能予後の規定因子となる。AdhVASH-1 投与による有意な PTC 数減少は観察されなかったが、本研究は比較的早期の腎症における検討であり、今後より慢性的な腎症モデルを用いた安全性の検討が望ましい。さらに、

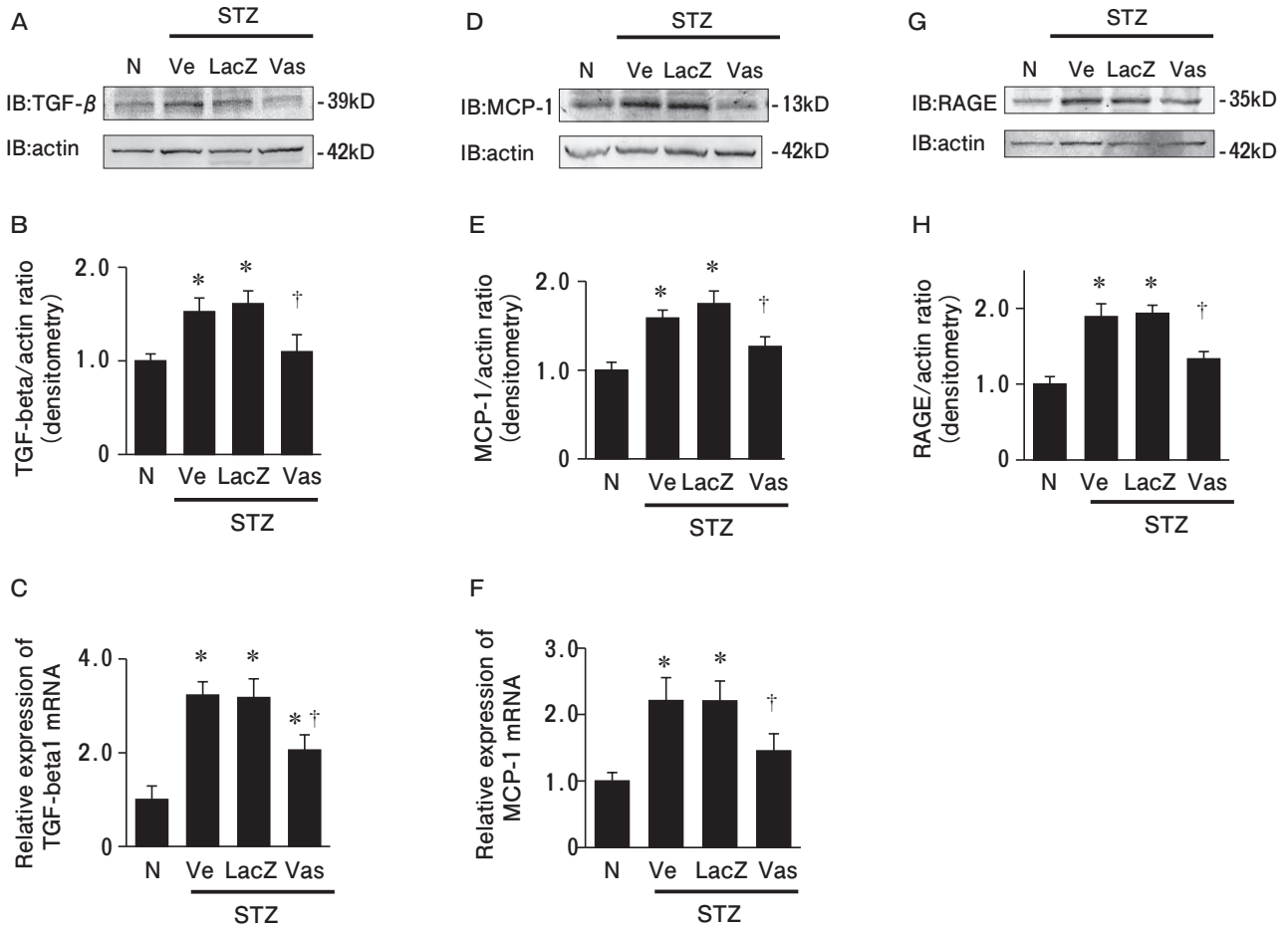


図4 AdVasohibin-1投与による TGF- β ・MCP-1・RAGE 蛋白発現増加の抑制作用
 A, D, G : TGF- β , MCP-1, RAGE, actin の蛋白発現. B : TGF- β /actin 比. E : MCP-1/actin 比. H : RAGE/actin 比. C, F :
 The TGF- β 1・MCP-1の mRNA (real-time PCR). N, 非糖尿コントロール; Ve, 糖尿病コントロール群; LacZ, 糖尿病 AdLacZ 投
 与群 (5×10^6 vp/mice); Vas, 糖尿病 AdhVASH-1治療群. 各群 n = 5.

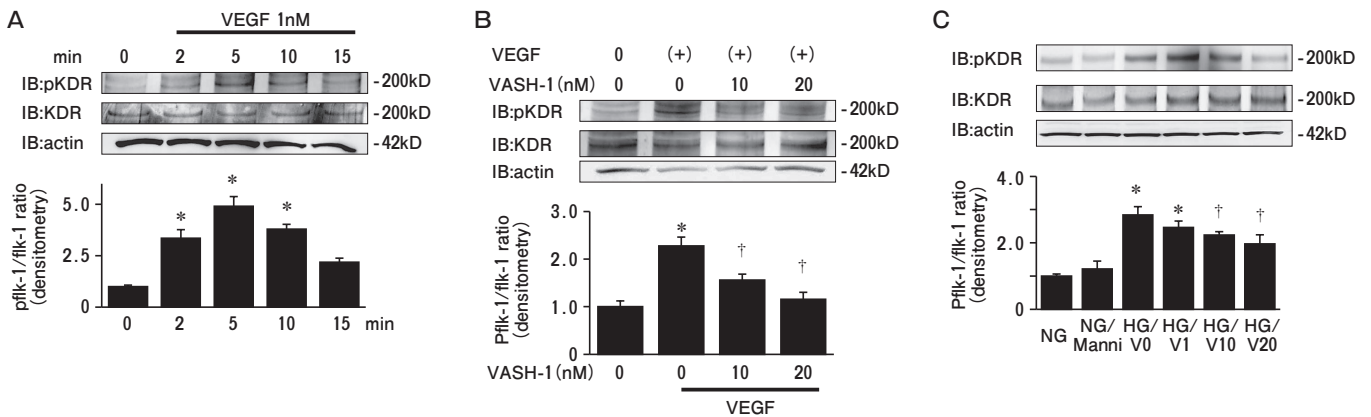


図5 ヒト糸球体内皮細胞 (hGECs) での血管新生関連因子発現変化
 A : VEGF 刺激による 2~15分後の pflk-1/flk-1 発現変化. B : VEGF 濃度 (0~20nM) による VASH-1 発現変化. C : recombinant
 VASH-1 (0~20nM) 存在下での正常糖濃度 (NG, 5.5mM) 高糖濃度での (HG, 25mM) での pflk-1/flk-1 発現変化 (24h).

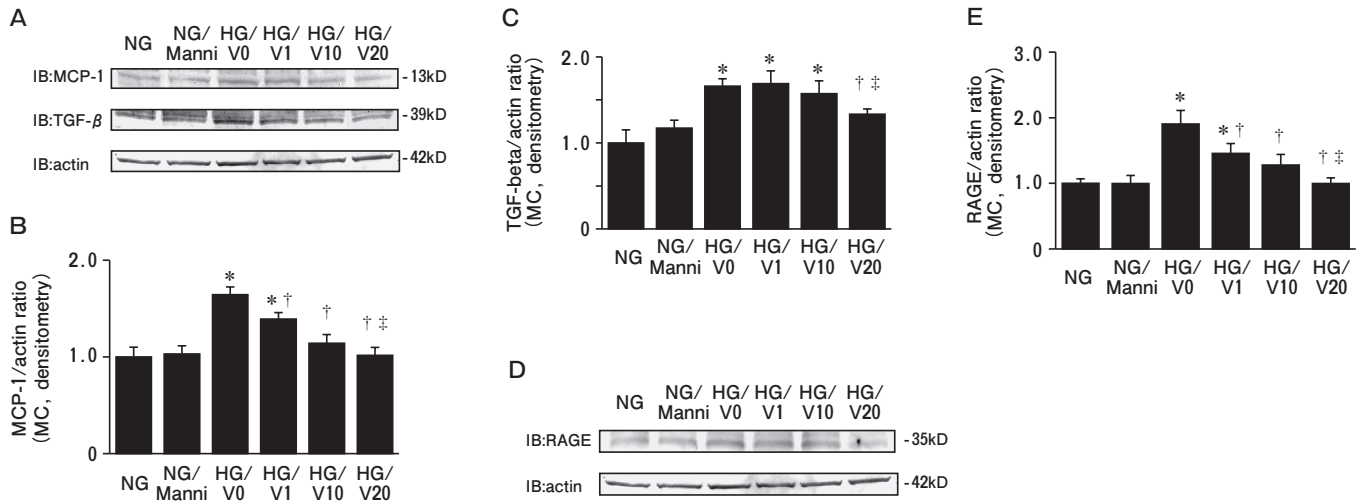


図6 マウスメサンギウム細胞での TGF-β/MCP-1, RAGE 発現変化
 A-C : recombinant VASH-1 による高糖濃度下 (HG, 25mM) での TGF-β, MCP-1 蛋白発現増加抑制. D-E : recombinant VASH-1 による高糖濃度下 (HG, 25mM) での RAGE1 蛋白発現増加抑制.

臨床応用に際しては、アデノウイルスベクターによる炎症惹起及び免疫原性等が懸念されることから、蛋白製剤大量生産系の開発もしくは VASH-1 誘導作用を有する低分子化合物の検索が今後の課題である。

結 論

血管新生 negative feedback 制御因子 vasohibin-1 による、内皮細胞ならびにメサンギウム細胞への直接作用を介する早期糖尿病性腎症の進展制御効果が示唆された。

文 献

- Makino H, Kashihara N, Sugiyama H, Kanao K, Sekikawa T, Okamoto K, Maeshima Y, Ota Z, Nagai R : Phenotypic modulation of the mesangium reflected by contractile proteins in diabetes. *Diabetes* (1996) 45, 488-495.
- Ferrara N : Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* (2000) 55, 15-35.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM : Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* (1995) 146, 1029-1039.
- Cooper ME, Vranes D, Youssef S, Stacker SA, Cox AJ, Rizkalla B, Casley DJ, Bach LA, Kelly DJ, Gilbert RE : Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in experimental diabetes. *Diabetes* (1999) 48, 2229-2239.
- Tsuchida K, Makita Z, Yamagishi S, Atsumi T, Miyoshi H, Obara S, Ishida M, Ishikawa S, Yasumura K, Koike T : Suppression of transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy in rats by a novel advanced glycation end product inhibitor, OPB-9195. *Diabetologia* (1999) 42, 579-588.
- Yamamoto Y, Maeshima Y, Kitayama H, Kitamura S, Takazawa Y, Sugiyama H, Yamasaki Y, Makino H : Tumstatin Peptide, an inhibitor of angiogenesis, prevents glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy. *Diabetes* (2004) 53, 1831-1840.
- Ichinose K, Maeshima Y, Yamamoto Y, Kitayama H, Takazawa Y, Hirokoshi K, Sugiyama H, Yamasaki Y, Eguchi K, Makino H : Anti-angiogenic endostatin peptide ameliorates renal alterations in the early stage of type 1 diabetic nephropathy model. *Diabetes* (2005) 54, 2891-2903.
- Zhang SX, Wang JJ, Lu K, Mott R, Longeras R, Ma JX : Therapeutic potential of angiostatin in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* (2006) 17, 475-486.
- Wang JJ, Zhang SX, Mott R, Chen Y, Knapp RR, Cao W, Ma JX : Anti-inflammatory effects of pigment epithelium-derived factor in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* (2008) 294, F1166-1173.
- Ichinose K, Maeshima Y, Yamamoto Y, Kinomura M, Hirokoshi K, Kitayama H, Takazawa Y, Sugiyama H, Yamasaki Y, Agata N, Makino H : 2-(8-hydroxy-6-methoxy-1-oxo-1h-2-benzopyran-3-yl) propionic acid, an inhibitor of angiogenesis, ameliorates renal alterations in obese type 2 diabetic mice. *Diabetes* (2006) 55, 1232-1242.

- 11) Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, Shimizu K, Ding Y, Abe M, Ohta H, Imagawa K, Hojo K, Maki H, Sonoda H, Sato Y : Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J Clin Invest* (2004) 114, 898-907.
- 12) Yamashita H, Abe M, Watanabe K, Shimizu K, Moriya T, Sato A, Satomi S, Ohta H, Sonoda H, Sato Y : Vasohibin prevents arterial neointimal formation through angiogenesis inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* (2006) 345, 919-925.
- 13) Shen J, Yang X, Xiao WH, Hackett SF, Sato Y, Campochiaro PA : Vasohibin is up-regulated by VEGF in the retina and suppresses VEGF receptor 2 and retinal neovascularization. *Faseb J* (2006) 20, 723-725.