

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09263

研究課題名(和文) バゾヒビンによるミトコンドリア障害の制御を介した急性腎障害治療効果の検討

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy with Vasohibin against acute kidney injury

研究代表者

田邊 克幸 (Tanabe, Katsuyuki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40534805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、血管新生抑制因子Vasohibin-1 (VASH1)と血管新生促進因子Vasohibin-2 (VASH2)が急性腎障害(AKI)で担う役割の解明を目的として行った。VASH1ヘテロ欠損マウスではシスプラチン誘発AKIの増悪が認められ、ミトコンドリア抗酸化酵素SOD2の発現低下が示された。培養尿細管細胞へのVASH1の投与はSOD2の発現増加につながった。VASH2ホモ欠損マウスでは虚血再灌流AKIの増悪が認められた。培養尿細管細胞でのVASH2過剰発現はアポトーシスの抑制につながった。以上より、VASH1とVASH2の発現増加はAKIに対する新たな治療戦略となり得る。

研究成果の概要(英文)：In this study, antiangiogenic factor Vasohibin-1 (VASH1) heterozygous deficiency exacerbated cisplatin-induced acute kidney injury (AKI) with markedly decreased expression of mitochondrial antioxidative enzyme SOD2. Recombinant VASH1 increased SOD2 expression in cultured renal tubular cells. On the other hand, proangiogenic factor Vasohibin-2 (VASH2) homozygous deficiency again exacerbated ischemic-reperfusion AKI. Overexpression of VASH2 in cultured renal tubular cells resulted in the inhibition of H2O2-induced apoptosis. Taken together, increased expression of VASH1 and VASH2 in renal tubular cells may be a novel therapeutic strategy against AKI.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：急性腎障害 血管新生 ミトコンドリア 酸化ストレス アポトーシス Vasohibin

### 1. 研究開始当初の背景

急性腎障害 (Acute Kidney Injury ; AKI) は、入院患者における軽度の急性腎機能低下ですら院内死亡率の上昇と関連することを示した報告以来注目されているが、近年では AKI の有意な割合が腎機能を回復することなく慢性腎臓病 (chronic kidney disease ; CKD) へと移行することが証明されていることから、ますます臨床的な意義が高まっている。AKI の主要な原因は敗血症とともに薬剤や手術などの医療行為自体であるため、入院患者における AKI の予防または早期治療が望ましいが、未だ有効性を明確に証明された予防・治療薬は存在しない。

AKI の発生は腎尿細管上皮細胞障害に始まるが、持続的な尿細管虚血が尿細管上皮の障害からの回復を遅延させ、慢性化への進展を促進する病態となる。尿細管上皮は高いエネルギー需要のために豊富なミトコンドリアを有しており、尿細管虚血に起因する尿細管上皮細胞におけるミトコンドリア障害と、それに続いて起こる酸化ストレスの増加及びアポトーシスが病態の基礎として重要であると考えられる。

Vasohibin-1 (VASH1) は、血管新生刺激によって血管内皮細胞より分泌される血管新生の negative feedback 制御因子である。VASH-1 は血管内皮細胞の増殖・遊走に対して抑制効果を持つが、他の血管新生抑制因子とは異なり、内皮細胞のアポトーシスを誘導しない特徴を持つ。VASH1 のホモログとして同定された Vasohibin-2 (VASH2) は、主として腫瘍細胞や骨髄由来単核球より分泌され、血管新生を促進する因子であることが報告されている。我々は、これまでに、糖尿病性腎症モデルマウスにおける VASH1 過剰発現により糸球体構成細胞への作用を介した腎症進展の抑制効果を報告してきた。また、VASH1 欠損マウスにおける糖尿病性腎症の増悪についても報告し、糖尿病性腎症における VASH1 の新規治療薬としての可能性を示した。また、VASH2 欠損は、VASH1 とは逆に糖尿病性腎症の進行を抑制することも報告し、VASH2 は新規の治療標的となる可能性がある。

VASH1 及び VASH2 は、傍尿細管毛細血管の維持や修復により AKI からの回復や CKD への進行抑制に関与する可能性が考えられる一方、VASH1 は mitochondrial biogenesis の促進因子である Sirt1 やミトコンドリアの酸化酵素である SOD2 の発現調節を介して内皮細胞の抗老化・細胞生存作用を発揮し、その恒常性維持に重要な役割を担うことが示されている。我々は、*in vitro* 実験にて VASH1 のメサングウム細胞、ポドサイト、線維芽細胞への直接的な作用も報告しており、VASH1 が内皮細胞とともに尿細管上皮細胞にも作用して細胞障害からの回復と進行抑制につながる可能性が考慮される。VASH2 に関しては、糖尿病性腎症以外の腎疾患における役割に関して報告が未だないが、VASH1 の作用に

拮抗する可能性が示唆されている。このため、VASH1 及び VASH2 の AKI における尿細管障害及びミトコンドリア障害、酸化ストレスへの関与を解明することは、AKI に対する新規治療法の開発につながる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では VASH1 及び VASH2 の発現変化が、AKI の進行の制御に関与するとの仮説の下に以下の検討を行うことにより VASH1 及び VASH2 が AKI に対する新規の治療標的となり得ることを証明する。

(1) VASH1 ノックアウトマウスに AKI モデルを作成し、VASH1 欠損が AKI の進行過程に及ぼす影響を検討する。

(2) 培養尿細管上皮細胞に対して組み換え VASH1 蛋白質を投与し、VASH1 の尿細管上皮細胞への直接的な作用を検討する。

(3) VASH2 ノックアウトマウスに AKI モデルを作成し、VASH2 欠損が AKI の進行過程に及ぼす影響を検討する。

(4) 培養尿細管上皮細胞にアデノウイルスベクターを用いて VASH2 の過剰発現を行い、尿細管上皮細胞での VASH2 発現増加の意義を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) VASH1 ヘテロ欠損マウスにおける AKI 進行の変化の検討

VASH1 ヘテロ欠損 (VASH1<sup>+/-</sup>) マウスは、東北大学加齢医学研究所より提供され、岡山大学動物資源部門において繁殖させたものを使用した。9 週齢の C57BL/6J 系統野生型または VASH1<sup>+/-</sup> マウスにシスプラチン 20mg/kg を腹腔内投与し、薬剤性 AKI モデルを作成した。シスプラチンの投与から 72 時間後に採血を行って安楽死させ、腎臓を摘出した。血液検査での腎機能の評価とともに、腎臓の組織学的傷害を PAS 染色標本上で傷害尿細管 (上皮の脱落、内腔の拡大、円柱形成) の割合として評価した。また、TUNEL 染色 (Trevigen 社の Apoptosis Detection Kit) によりアポトーシス細胞数を評価し、蛋白質発現の変化は Western blot、mRNA 発現の変化は real-time PCR により評価した。

(2) 尿細管上皮細胞に対する VASH1 の作用の検討

培養尿細管上皮細胞 HK-2 は、10% ウシ胎児血清 (FBS) を含むダルベッコ改良イーグル培地 (DMEM) により通常条件で培養した。組み換え VASH1 蛋白質の投与前に 0.5% FBS を含む DMEM により serum starvation を行った。組み換え VASH1 蛋白質は 5 または 10nM の濃度で投与し、24 時間反応させた。シスプラチン刺激を行う場合は、VASH1 を 24 時間反応させた後に 100 $\mu$ M の濃度で刺激を行った。蛋白質発現の変化は Western blot により評価し、酸化ストレスは Abcam 社の Cellular ROS/Superoxide Detection Assay Kit を使用して顕微鏡下に評価した。

### (3) VASH2 ホモ欠損マウスにおける AKI 進行の変化の検討

VASH2 ホモ欠損(VASH2<sup>-/-</sup>)マウスは、東北大学加齢医学研究所より提供され、岡山大学動物資源部門において繁殖させたものを使用した。8~9 週齢の C57BL/6J 系統野生型または VASH2<sup>-/-</sup>マウスを麻酔下に開腹し、両側の腎動静脈をクリップにより 25 分間クランプした。クランプ解除後に閉腹し、虚血・再灌流(I/R)障害 AKI モデルを作成した。24 時間後に採血を行って安楽死させ、腎臓を摘出した。(1)と同様に、血液検査で腎機能の評価を行い、組織学的傷害は PAS 染色標本上で傷害尿細管の範囲により 0~5 でスコア化した。また、TUNEL 染色とともに、蛋白質発現の変化は Western blot、mRNA 発現の変化は real-time PCR により評価した。

### (4) 尿管上皮細胞における VASH2 過剰発現の効果の検討

培養尿管上皮細胞 HK-2 は(2)と同様に培養を行い、VASH2 発現アデノウイルスベクターを感染させ、VASH2 の過剰発現を行った。対照には LacZ 発現アデノウイルスベクターを使用した。その後 500 $\mu$ M の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により刺激することでアポトーシスの誘導を行ってから蛋白質を回収し、Western blot により評価した。

## 4. 研究成果

### (1) VASH1 ヘテロ欠損マウスにおける AKI 進行の変化の検討

VASH1<sup>+/-</sup>マウスは、これまでの報告と同様に、野生型マウスと同等な腎機能及び腎形態を示した。また、VASH1 mRNA レベルは、VASH1<sup>+/-</sup>マウスの腎臓において野生型マウスの腎臓の約 10~20%程度に低下していた。

野生型マウスと VASH1<sup>+/-</sup>マウスにシスプラチン誘発 AKI を発症させたところ、野生型マウスと比較して VASH1<sup>+/-</sup>マウスで血中尿素窒素及び血清クレアチニンの上昇に有意な増悪が認められた(図1)。

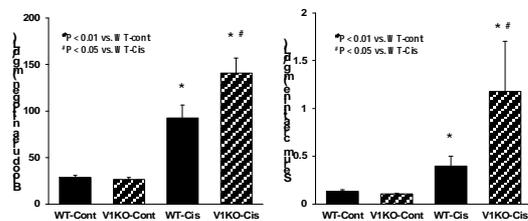


図1 シスプラチン投与後の腎機能

また、腎臓の組織学的解析では、野生型マウスへのシスプラチン投与後に認められた尿管上皮細胞の傷害(傷害尿管の割合)は、VASH1<sup>+/-</sup>マウスでは有意な増悪が認められた(図2)。更に、シスプラチン投与後に尿管に観察されたアポトーシス細胞数についても野生型マウスと比較して VASH1<sup>+/-</sup>マウスにおいて有意に増加することが認められた。

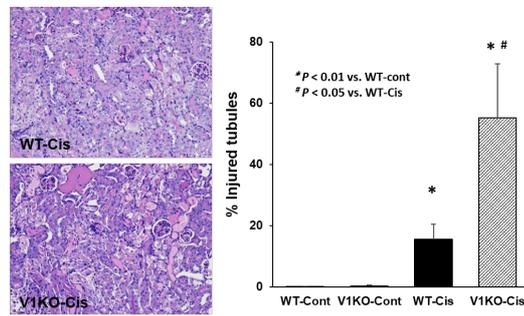


図2 シスプラチン投与後の尿管傷害

また、シスプラチン投与後の腎臓内の酸化ストレスを過酸化脂質であるマロンジアルデヒド(MDA)の免疫組織化学と 4-ヒドロキシノネナル(4-HNE)の Western blot にて解析したが、いずれについても野生型マウスと比較して VASH1<sup>+/-</sup>マウスで腎臓へのより大きな蓄積が認められた。

VASH1 は内皮細胞に高発現し、ストレスに対する保護作用を持つことが報告されており、シスプラチン投与後の傍尿管毛細血管(PTC)数について CD34 の免疫組織化学により検討した。CD34 陽性の PTC 数は野生型マウスにおいてシスプラチン投与後に有意に減少したが、VASH1<sup>+/-</sup>マウスでは野生型マウスよりも更に大きな減少が認められた(図3)。

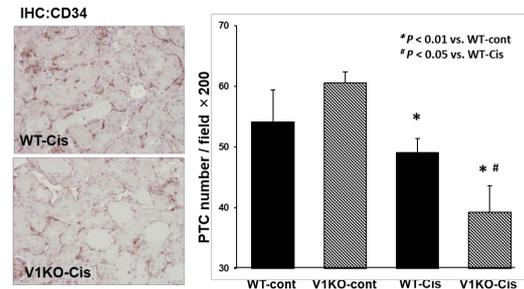


図3 シスプラチン投与後の傍尿管毛細血管数

VASH1<sup>+/-</sup>マウスにおけるシスプラチン投与後の酸化ストレス亢進の機序として、内皮細胞で VASH1 がミトコンドリア抗酸化酵素である SOD2 の発現に關する報告から、シスプラチン腎障害モデルでその発現を検討したが、VASH1<sup>+/-</sup>マウスでは野生型マウスと比較してシスプラチン投与後の SOD2 の発現レベルが有意に低下していた(図4)。

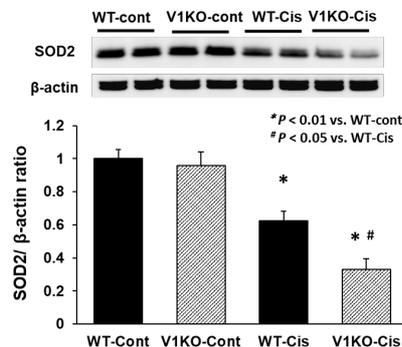


図4 シスプラチン投与後のSOD2発現レベル

## (2) 尿管上皮細胞に対する VASH1 の作用の検討

培養尿管上皮細胞に組み換え VASH1 蛋白質を 5 または 10nM の濃度で投与したところ、用量依存的に SOD2 の発現が増加することが認められた(図5)。また、シスプラチン投与後の培養尿管細胞での活性酸素種(ROS)の増加は、10nM の組み換え VASH1 蛋白質の投与により抑制された。

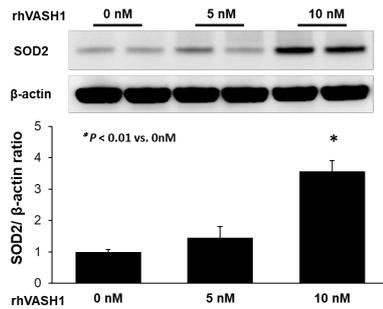


図5 HK-2へのVASH1投与後のSOD2発現レベル

以上の結果より、VASH1 はミトコンドリア抗酸化酵素である SOD2 の発現調節を介して、シスプラチン腎症における尿管上皮細胞のアポトーシスに対して保護的に作用する可能性が示唆された。

## (3) VASH2 ホモ欠損マウスにおける AKI 進行の変化の検討

VASH2<sup>-/-</sup>マウスは、VASH1<sup>+/-</sup>マウスと同様に、腎機能及び腎形態について野生型マウスと著明な差は認められなかった。しかし、VASH1 とは異なり、腎臓における VASH2 mRNA 発現レベルは極めて低く、VASH1 mRNA の 100 分の 1 未満であった。

VASH2 は VASH1 とは反対に血管新生促進因子であることが示されているが、野生型マウスと VASH2<sup>-/-</sup>マウスに虚血再灌流(I/R)障害 AKI モデルを作成したところ、やはり野生型マウスと比較して VASH2<sup>-/-</sup>マウスで血中尿素窒素及び血清クレアチニンの上昇に有意な増悪が認められた(図6)。

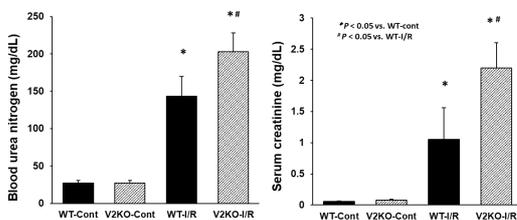


図6 I/Rに伴う腎機能の変化

腎臓の組織学的解析では、野生型マウスの I/R モデルで認められた尿管上皮細胞の傷害(ATN スコア)は、VASH2<sup>-/-</sup>マウスにおいて有意に増悪していた(図7)。また、皮髄境界部を中心とした尿管上皮細胞のアポトーシスについても野生型マウスと比較して VASH2<sup>-/-</sup>マウスにおいて有意に亢進することが認められた。

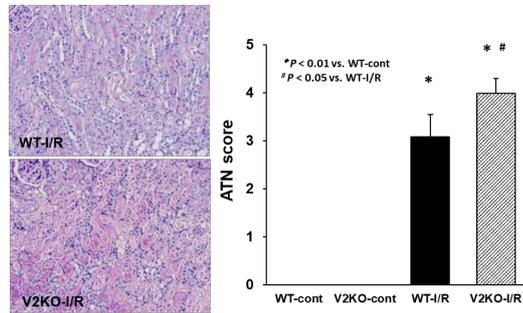


図7 I/Rに伴う尿管傷害

また、I/R に伴う腎組織内の酸化ストレスも VASH1 と同様に MDA に対する免疫組織化学と 4-HNE の Western blot により解析したところ、いずれについても野生型マウスと比較して VASH2<sup>-/-</sup>マウスにおいて大きな蓄積が認められた(図8)。更に、皮髄境界部を中心とした好中球浸潤についても免疫組織化学により検討したが、VASH2<sup>-/-</sup>マウスにおいて野生型マウスと比較して有意な増加が認められた。

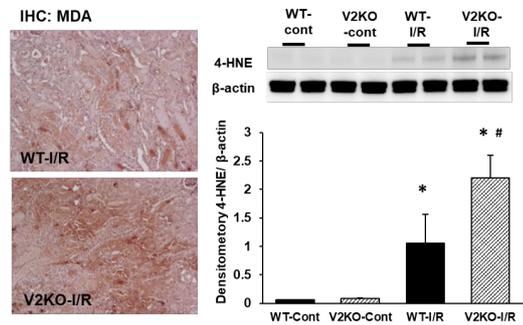


図8 I/Rに伴う酸化ストレス

I/R による尿管上皮細胞数の減少については、CD34 に対する免疫組織化学により間質の CD34 陽性血管数として評価したが、野生型マウスと比較して VASH2<sup>-/-</sup>マウスにおいて有意に大きかった。

野生型マウスにおける腎臓内の VASH2 mRNA 発現レベルは VASH1 mRNA と比較すると対照群では低かったが、I/R 後には著明な発現の増加が認められたことから、VASH2 の発現は急性の尿管上皮細胞障害に伴って誘導される可能性が示唆された。

## (4) 尿管上皮細胞における VASH2 過剰発現の効果の検討

尿管上皮細胞における VASH2 発現増加の意義を検討するために、培養尿管上皮細胞 HK-2 に VASH2 発現アデノウイルスベクターを感染させて VASH2 を過剰発現させた。対照として LacZ 発現アデノウイルスベクターを使用した。VASH2 の過剰発現に伴い、HK-2 において著明な Akt のリン酸化亢進が観察された(図9)。このリン酸化亢進は部分的に PI<sub>3</sub> キナーゼ阻害薬である PX-866 によって抑制された。

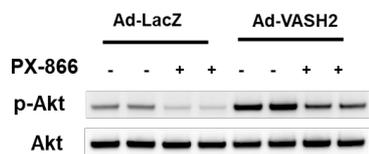


図9 VASH2過剰発現によるAktリン酸化

更に、HK-2 に対して H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による刺激を行うことでアポトーシスを誘発したところ、アポトーシス誘導蛋白質である Bax の発現増加が確認されたが、VASH2 の過剰発現に伴って、この Bax の発現増加が抑制されることが認められた。従って、急性の尿細管上皮細胞障害における VASH2 の発現増加は、細胞生存につながる可能性が示唆された。

以上の結果より、虚血・再灌流による AKI の過程において VASH2 の発現が誘導され、これは尿細管上皮細胞の抗アポトーシス効果につながり、VASH2 欠損マウスでは、VASH2 の抗アポトーシス効果の喪失により、野生型マウスと比較して虚血・再灌流による AKI が増悪した可能性が考えられた。

これらの研究結果から、VASH1 と VASH2 はいずれも AKI の過程において保護的に働くと考えられ、主として内皮細胞に発現している VASH1 の発現低下と、尿細管上皮細胞において発現が誘導される VASH2 の発現低下は、酸化ストレスの増加やアポトーシスの促進から AKI の増悪につながると考えられた。そのため、VASH1 及び VASH2 の発現の増加は、AKI に対する新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

三宅広将、Deficiency of proangiogenic factor vasohibin-2 exacerbates acute kidney injury via impaired renal tubular cell survival、国際腎臓学会 Frontiers meetings、2018 年 2 月 23 日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

谷村智史、Lack of vasohibin-1, a negative feedback regulator of angiogenesis, exacerbates renal injury in murine cisplatin nephropathy model、米国腎臓学会 Kidney Week 2017、2017 年 11 月 2 日、ニューオーリンズ(アメリカ合衆国)

三宅広将、急性腎障害における血管新生促進因子 Vasohibin-2 の発現意義についての検討、第 60 回日本腎臓学会学術総会、2017 年 5 月 28 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

谷村智史、血管新生抑制因子 Vasohibin-1

の急性腎障害の発生への関与についての検討、第 60 回日本腎臓学会学術総会、2017 年 5 月 26 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)  
田邊克幸、急性腎障害における Vasohibin-1 及び-2 の発現意義についての検討、第 12 回 Vasohibin 研究会、2017 年 2 月 5 日、ラフォーレ蔵王(宮城県蔵王町)

田邊克幸、Genetic deletion of endogenous proangiogenic factor Vasohibin-2 exacerbates renal ischemic reperfusion injury、米国腎臓学会 Kidney Week 2016、2016 年 11 月 17 日、シカゴ(アメリカ合衆国)

田邊克幸、急性腎障害における内因性血管新生促進因子 Vasohibin-2 の役割に関する検討、第 59 回日本腎臓学会学術総会、2016 年 6 月 18 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田邊 克幸 (TANABE, Katsuyuki)

岡山大学病院・助教

研究者番号：40534805

##### (2) 連携研究者

佐藤 靖史 (SATO, Yasufumi)

東北大学加齢医学研究所・教授

研究者番号：50178779