

平成21年4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590947

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症とベイシジン-VEGF/NOシグナルネットワーク

研究課題名(英文) Role of Basigin-VEGF/NO signal in the diabetic nephropathy

研究代表者

湯澤 由紀夫(YUZAWA YUKIO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00191479

研究成果の概要：

糖尿病性腎症の発症機序における Basigin-VEGF/NO シグナルの関与について検討した結果、初期段階から VEGF/NO uncoupling により、血管新生が引き起こされる。また、Basigin は、VEGF の inducer としては作用せず、Basigin 上の糖鎖が E-selectin の新たなリガンドとして働き、糸球体内への microinflammation を誘導し、糖尿病性腎症の発症・進展に関与する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：糖尿病性腎症、ベイシジン、VEGF/NO uncoupling

1. 研究開始当初の背景

我々は、高度の糸球体硬化と結節性病変を呈する2つの糖尿病性腎症動物モデル(MKノックアウトマウス+STZ,カルモジュリントランスジェニックマウス(CaMTg))を開発し、糖尿病性腎症の発症におけるMKを介するmicroinflammationの重要性及びVEGF/NOシグナルの重要性を確認した。一方Basigin(Bsg)/CD147は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜一回貫通型糖蛋白であり、血球、上皮、内皮細胞などに幅広く発現している。細胞外領域に長大なN型糖鎖を有し、その分子量の半分以上を占めている。生体内での作用として

はmatrix metalloproteinaseの産生を促し、癌の浸潤を促進する事や、乳酸トランスポーターのシャペロンとして働いている事が明らかとなっている。近年、Basiginは、これらの機能に加え、VEGF-Aのinducerとしての機能も報告され、糖尿病性腎症の発症・進展に重要なVEGF/NOuncoupling現象に関与する可能性も考えられる。

2. 研究の目的

これらの2つの糖尿病性腎症動物モデルを解析して、糖尿病性腎症での内皮細胞障害における、VEGF-A、NOの関与及びVEGF-Aの誘導因子としてのBasiginの関与の詳細とこれらの分子を標的とした新たな治療法の可能性を詳細に検

討する。さらに、**microinflammation** に関与するかどうかに関して、**Bsg** 欠損型マウスを用いて、腎急性炎症モデル（腎虚血再還流障害モデル）における **Bsg** の分子レベルでの役割を明らかにし、糖尿病性腎症及び炎症性疾患に対する新たな治療戦略の開発を目的として以下の実験を行った。

3. 研究の方法

A.: 培養内皮細胞及び **CaM-Tg** マウスを用い **VEGF/NO uncoupling** 現象による内皮細胞障害の検討

B.: **Basigin/CD147** の **VEGF-A** の inducer、**chemotaxis** 作用の検討

CaM-Tg マウス腎での **Basigin** の有意な発現上昇は認めなかった。

ipGTT（腹腔内へのブドウ糖負荷：OGTTのip版）の結果、**Bsg** 欠損型マウスには、ブドウ糖負荷早期のインシュリン分泌能、耐糖能異常がある可能性が示唆された。**Bsg**^{+/+}、**Bsg**^{-/-}マウスに対して、空腹時血糖、空腹時インシュリン濃度を測定しインシュリン抵抗性（**HOMA-R**）、インシュリン分泌能（**HOMA-b**）をそれぞれ測定したが、両群間に差はなく、個体としてインシュリン抵抗性、分泌能に差はなかった。

- (1) 腎虚血再還流モデル作成：**Bsg** 野生型（**Bsg**^{+/+}）および、欠損型（**Bsg**^{-/-}）マウスに対し、右腎摘出術を施行。7日後に、左腎動静脈を45分間腎血流を遮断。その後開放し血流を再開。術後1, 2, 4, 7日後に **sacrifice** を行った。
- (2) 腎組織障害の比較検討：虚血再還流を施行した腎臓の、組織障害をスコアー化し定量化。また免疫染色を施行し、腎局所における炎症細胞浸潤を評価。
- (3) 腎局所の接着分子、好中球遊走因子の評価：障害後の腎における、接着分子、好中球遊走因子の発現を **Western blotting** 法、**ELISA** 法にて測定。
- (4) フローサイトメトリー（**FCM**）：可溶性 **E-selectin** を用いて、**Bsg**^{+/+}、**Bsg**^{-/-} 両マウスの腹腔内から回収した好中球上の、**E-selectin** リガンドの発現量を比較。また磁気ビーズ（**Dynabeads**）を

用いて、ヒト前骨髄球性白血病細胞株（**HL-60**）由来の、**Bsg** 蛋白を固相化したビーズを作成し、可溶性 **E-selectin** との結合性を解析した。次にツニカマイシンを用い、**N** 型糖鎖の生合成を抑制した **Bsg** 蛋白を準備し、同様に **E-selectin** との結合を評価。

- (5) 細胞接着実験：**Bsg**^{+/+}、**Bsg**^{-/-} 両マウスの腹腔内から回収した好中球を蛍光標識し、**TNF- α** で刺激したヒト臍帯静脈内皮細胞（**HUVEC**）と共培養のうえ、**HUVEC** との接着細胞数を評価。
- (6) 好中球移入実験：**Bsg**^{+/+}、**Bsg**^{-/-} 両マウスに腎虚血再還流手術を施行し、直後に尾静脈から **Bsg**^{+/+}、**Bsg**^{-/-} 両マウス由来の蛍光標識好中球を静脈投与。1日後、障害腎への標識好中球浸潤を評価。

4. 研究成果

CaM-Tg マウスにおいて、結節性病変・滲出性病変に先行して、**VEGF/NO uncoupling** 現象が起こり、血管新生を引き起こす。一方、**Basigin** の生理活性として **VEGF** の inducer の報告があるが、糖尿病性腎症においては、**VEGF** の inducer としては作用しない。腎急性炎症モデルに関しては、以下の結果が得られた。

- (1) 腎虚血再還流後の腎障害：**Bsg**^{+/+} に比して **Bsg**^{-/-} では、腎の組織障害が軽度で、腎機能の指標の **BUN** 値も低かった。
- (2) 障害後の腎への好中球浸潤：腎局所への好中球浸潤は、好中球走化因子（**MIP-2**、**KC**）や接着分子（**E-selectin**、**ICAM-1**）の発現に差がないにもかかわらず、**Bsg**^{+/+} に比して **Bsg**^{-/-} では少なかった。
- (3) 好中球上の **Bsg** の局在：電子顕微鏡にて **Bsg** は好中球の微絨毛上の存在を確認
- (4) 好中球上のセレクチンリガンドの発現：マウス腹腔由来好中球と、可溶性 **E-selectin** との結合性を **FCM** にて評価した結果、**Bsg**^{+/+} 由来好中球が、**Bsg**^{-/-} よりも **E-selectin** との結合性が高かった。

- (5) E-selectin と Bsg の結合性：磁気ビーズにて、免疫学的に抽出した HL-60 由来の Bsg 蛋白は、よく E-selectin と結合した。一方、ツニカマイシンにて Bsg の糖鎖合成を抑制した Bsg 蛋白は、E-selectin との結合を認めなかった。
- (6) マウス好中球と HUVEC との接着性の比較：*Bsg*^{+/+} 由来の好中球は、*Bsg*^{-/-} に比して、活性化した HUVEC とよく接着した。更に HUVEC を予め、E-selectin の阻害抗体で処理しておく、両群間の差は消失し、*Bsg*^{+/+} における接着性の高さは、E-selectin 依存性であった。
- (7) 虚血再還流後の標識好中球の腎への浸潤：腎虚血再還流術後に標識好中球を経静脈投与したところ、*Bsg*^{+/+} 由来好中球の方が、*Bsg*^{-/-} に比してよく腎に浸潤していた。

以上から、Basigin は VEGF-A の inducer としてではなく、Basigin 上の糖鎖が E-selectin の新たなリガンドとして働き、糸球体内への microinflammation を誘導し、糖尿病性腎症の発症・進展に関与すると考えられた。

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 34 件) (全て査読有)

1. N Watanabe, M Kato, N Suzuki, C Inoue, S Fedorova, Hi Hashimoto, S Maruyama, S Matsuo, Y Wakamatsu.
Kidney regeneration through nephron neogenesis in medaka. *Development Growth and Differentiation* 51, 2009: 135-143
2. Kato S, Chmielewski M, Honda H, Pecoits-Hilho R, Matsuo S, Yuzawa Y, Tranaeus A, Stenvinkel O and Lindholm.
Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology* 3(5), 2008: 1526-33
Anas CM, Hattori R, Morita Y, Matsukawa Y, Komatsu, T, Yoshino Y, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsuo S and

- Gotoh M.
Efficiency of laparoscopic-assisted renal biopsy. *Clinical Nephrology* 70(3), 2008: 203-9
3. Asano Y, Akisawa T, Fukuhara S, Shimojo F, Matsuo S, Yorioka T, Morita T, Wakita T, Onishi Y, Kurokawa K.
Downregulation of monocyte chemoattractant protein-1 involving short interfering RNA attenuates hapten-induced contact hypersensitivity. *Molecular Therapy* 16(2), 2008: 387-95
 4. Iwashima S, Ozaki T, Maruyama S, Saka Y, Kobori M, Omae K, Yamaguchi H, Niimi T, Toriyama K, Kamei Y, Torii S, Murohara T, Yuzawa Y, Kitagawa Y, Matsuo S.
Novel culture system of mesenchymal stromal cells from human subcutaneous adipose tissue. *Stem Cells and Development*, 2008 *in press*
 5. Ishii H, Kumada Y, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Amano T, Yasuda Y, Yuzawa Y, Maruyama S, Matsuo S, Matsubara T, Murohara T.
Aortic valvular calcification predicts restenosis after implantation of drug-eluting stents in patients on chronic haemodialysis. *Nephrology dialysis transplantation*, 2008 *in press*
 6. Ishikawa T, Takeda K, Itoh M, Imaizumi T, Oguri K, Takahashi H, Kasuga H, Toriyama T, Matsuo S, Hirooka Y, Itoh A, Kawashima H, Kasugai T, Ohno E, Miyahara R, Ishigami M, Katano Y, Ohmiya N, Niwa Y, Goto H.
Prevalence of Pancreatic Cystic Lesions Including Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms in Patients With End-Stage Renal Disease on Hemodialysis. *Pancreas*, 2008 *in press*
 7. Hauser AB, Stinghen AE, Kato S, Buchares S, Aita C, Yuzawa Y and Pecoits-Filho R.
Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. *Peritoneal Dialysis International Suppl* 3, 2008: S183-7
Fumiaki Sugiura, Toshihisa Kojima, Takeshi Oguchi, Shirou Urata, Yukio Yuzawa, Akihiro Sakakibara, Hiroki Hayashi, Norihiro Nishimoto, Naoki Ishiguro.
A case of peripheral neuropathy and skin ulcer in a patient with rheumatoid arthritis after a single infusion of tocilizumab. *Mod Rheumatol in press*, 2008
 8. Urahama Y, Ohsaki Y, Fujita Y, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsuo S, Fujimoto T.
Lipid droplet-associated proteins protect

- renal tubular cells from fatty acid-induced apoptosis. American journal of Pathology 173(5), 2008: 1286-1294
9. Shoichi Maruyama, Akihiko Taguchi, Shigejiro Iwashima, Takenori Ozaki, Kaoru Yasuda, Akie Kikuchi-Taura, Toshihiro Soma, Hideki Ishii, Toyoaki Murohara, Hiroshi Takahashi, Hirotake Kasuga, Yoshitaka Kumada, Takanobu Toriyama, Yasuhiko Ito, Hirohisa Kawahara, Yukio Yuzawa and Seiichi Matsuo
Low circulating CD34+ cell count is associated with poor prognosis in chronic hemodialysis patients. Kidney international 74(12), 2008: 1603-9
 10. Imai E, Matsuo S, Makino H, Watanabe T, Akizawa T, Nitta K, Iimuro S, Ohashi Y, Hishida A; CKD-JAC Study Group.
Chronic Kidney Disease Japan Cohort (CKD-JAC) study: design and methods. Hypertension research 31(6), 2008: 1101-1107
 11. Kumada Y, Aoyama T, Ishii H, Tanaka M, Kawamura Y, Takahashi H, Toriyama T, Aoyama T, Yuzawa Y, Maruyama S, Matsuo S, Murohara T.
Long-term outcome of percutaneous transluminal angioplasty in chronic haemodialysis patients with peripheral arterial disease. Nephrology dialysis transplantation 23(12), 2008: 3996-4001
 12. Imai E, Matsuo S.
Chronic kidney disease in Asia. LANCET 371(9631), 2008: 2147-2148
 13. Yuzawa Y, Niki I, Kosugi T, Maruyama S, Yoshida F, Takeda M, Tagawa Y, Kaneko Y, Kimura T, Kato N, Yamamoto J, Sato W, Nakagawa T, Matsuo S.
Overexpression of Calmodulin in Pancreatic {beta} Cells Induces Diabetic Nephropathy. Journal of the American Society of Nephrology 19(9). 2008: 1701-1711
 14. Kato S, Chmielewski M, Honda H, Pecoits-Filho R, Matsuo S, Yuzawa Y, Tranaeus A, Stenvinkel P, Lindholm B.
Aspects of Immune Dysfunction in End-stage Renal Disease. Clinical journal of the American Society of Nephrology 3(5), 2008: 1526-1533 査読有
 15. Ishii H, Kumada Y, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Yamada S, Yasuda Y, Yuzawa Y, Maruyama S, Matsuo S, Matsubara T, Murohara T.
Cilostazol Improves Long-Term Patency after Percutaneous Transluminal Angioplasty in Hemodialysis Patients with Peripheral Artery Disease. Clinical journal of the American Society of Nephrology 3(4), 2008: 1034-1040 査読有
 16. Nishimura H, Ito Y, Mizuno M, Tanaka A, Morita Y, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsuo S.
Mineralocorticoid receptor blockade ameliorates peritoneal fibrosis in new rat peritonitis model. American journal of physiology. Renal physiology 294, 2008: F1084-1093 査読有
 17. Takaaki Yaomura, Naotake Tsuboi, Yoshinori Urahama, Akinori Hobo, Kenji Sugimoto, Jun Miyoshi, Tetsuya Matsuguchi, Kannagi Reiji, and Seiichi Matsuo, Yukio Yuzawa
A Serine/Threonine Kinase, Cot/Tpl2, Regulates Renal Cell Apoptosis in Ischemia/Reperfusion Injury. Nephrology 13(5), 2008: 397-404 査読有
 18. Aoyama T, Ishii H, Toriyama T, Takahashi H, Kasuga H, Murakami R, Amano T, Uetani T, Yasuda Y, Yuzawa Y, Maruyama S, Matsuo S, Matsubara T, Murohara T.
Sirolimus-eluting stents vs bare metal stents for coronary intervention in Japanese patients with renal failure on hemodialysis. Circulation journal 72(1), 2008: 56-60 査読有
 19. Sato W, Kosugi T, Zhang L, Roncal CA, Heinig M, Campbell-Thompson M, Yuzawa Y, Atkinson MA, Grant MB, Croker BP, Nakagawa T.
The pivotal role of VEGF on glomerular macrophage infiltration in advanced diabetic nephropathy. Laboratory investigation 88(9), 2008: 949-961 査読有
 20. Yamagata K, Iseki K, Nitta K, Imai H, Iino Y, Matsuo S, Makino H, Hishida A
Chronic kidney disease perspectives in Japan and the importance of urinalysis screening. Clinical and experimental nephrology 12(1), 2008: 1-8 査読有
 21. Takei Y, Nemoto T, Mu P, Fujishima T, Ishimoto T, Hayakawa Y, Yuzawa Y, Matsuo S, Muramatsu T, Kadomatsu K
In vivo silencing of a molecular target by short interfering RNA electroporation: tumor vascularization correlates to delivery efficiency. Molecular cancer therapeutics 7(1), 2008: 211-221
 22. Ozaki T, Anas C, Maruyama S, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ito Y, Gotoh M, Yuzawa Y, Matsuo S.

- Intrarenal administration of recombinant human soluble thrombomodulin ameliorates ischaemic acute renal failure. *Nephrology dialysis transplantation* 23(1), 2008: 110-119
23. Takuji Ishimoto, Yoshifumi Takei, Yukio Yuzawa, Koji Hanai, Shunji Nagahama, Yuzo Tarumi, Seiichi Matsuo, Kenji Kadomatsu
Downregulation of monocyte chemoattractant protein-1 involving short interfering RNA attenuates hepten-induced contact hypersensitivity. *Molecular Therapy* 16(2), 2008: 387-395
24. Fumihiko Sato, Shoichi Maruyama, Hiroki Hayashi, Izumi Sakamoto, Shingo Yamada, Tomonori Uchimura, Yoshiaki Morita, Yasuhiko Ito, Yukio Yuzawa, Ikuro Maruyama, Seiichi Matsuo
High mobility group box chromosomal protein 1 in patients with renal diseases. *Nephron Clinical Practice* 108(3), 2008: c194-c201
25. Anas C, Ozaki T, Maruyama S, Yamamoto T, Gotoh M, Ono Y, Matsuo S
Effects of olprinone, a phosphodiesterase III inhibitor, on ischemic acute renal failure. *International journal of Urology* 14(3), 2007: 219-225
26. Mizuno M, Blanchin S, Gasque P, Nishikawa K, Matsuo S
High levels of complement C3a receptor in the glomeruli in lupus nephritis. *American journal of kidney diseases* 49(5), 2007: 598-606
27. Inaguma D, Tatematsu M, Shinjo H, Suzuki S, Mishima T, Inaba S, Kurata K, Yuzawa Y, Matsuo S
Relationship between renal function at the time of percutaneous coronary intervention and prognosis in ischemic heart disease patients. *Clinical and experimental nephrology* 11(1), 2007: 56-60
28. Ishii H, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Yamada S, Kasuga H, Ichimiya S, Kanashiro M, Mitsuhashi H, Maruyama S, Matsuo S, Naruse K, Matsubara T, Murohara T
Efficacy of oral nicorandil in patients with end-stage renal disease: A retrospective chart review after coronary angioplasty in Japanese patients receiving hemodialysis. *Clinical therapeutics* 29(1), 2007: 110-122 Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, Heinig M, Clarke T, Campbell-Thompson M, Yuzawa Y, Atkinson MA, Johnson RJ, Croker B
Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 18(2), 2007: 539-550
29. Mizuno M., Nozaki M., Morine N., Suzuki N., Nishikawa K., Morgan BP., Matsuo S
A Protein Toxin from the Sea Anemone *Phyllodiscus semoni* Targets the Kidney and Causes a Severe Renal Injury with Predominant Glomerular Endothelial Damage. *American journal of Pathology* 171(2), 2007: 402-414
30. Dambara A, Morinaga T, Fukuda N, Yamakawa Y, Kato T, Enomoto A, Asai N, Murakumo Y, Matsuo S, Takahashi M.
Nucleolin modulates the subcellular localization of GDNF-inducible zinc finger protein 1 and its roles in transcription and cell proliferation. *Experimental cell research* 13(17), 2007: 3755-3766
31. Kosugi T, Yuzawa Y, Sato W, Arata-Kawai H, Suzuki N, Kato N, Matsuo S, Kadomatsu K.
Midkine is involved in tubulointerstitial inflammation associated with diabetic nephropathy. *Laboratory investigation* 87(9), 2007: 903-913

[学会発表] (計9件)

1. Yukio Yuzawa Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. 3rd CKD Forum in Nagoya Feb. 15, 2009, Nagoya
2. Isao Ito, Shoichi Maruyama, Kiyonari Kato, Hiroshi Takahashi, Takanobu Toriyama, Hirohisa Kawahara, Seiichi Matsuo, Yukio Yuzawa Elevated Serum Resistin Level Is Associated with Left Ventricular Hypertrophy in Chronic Kidney Disease Patients on Hemodialysis. 41rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology Nov.4-8, 2008, Philadelphia
3. H Hayashi, Y Yuzawa, S Maruyama, W Sato, A Hobo, S Ikematsu, D Sugiyama, K Kadomatsu, S Matsuo Urinary Midkine Is a Sensitive Biomarker of Ischemic Acute Kidney Injury and an Early Detection of Acute Kidney Injury in Human. 41rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology Nov.4-8, 2008, Philadelphia
4. A Hobo, T Kosugi, W Sato, T Ishimoto, Y Ito, A Nishiyama, K Kadomatsu, S Matsuo, Y Yuzawa The Growth Factor Midkine Is a Critical Regulator of Blood Pressure through the Renin Angiotensin Aldosterone System. 41rd Annual Meeting of The

American Society of Nephrology Nov.4-8, 2008, Philadelphia

5. Hiroki Hayashi, Yukio Yuzawa, Shoichi Maruyama, Akinori Hobo, Shinya Ikematsu, Daisuke Sugiyama, Kenji Kadomastu, Seichi Matsuo URINARY MIDKINE IS A SENSITIVE BIOMARKER OF ACUTE TUBULAR NECROSIS IN HUMAN. 45th ERA-EDTA Congress May.10-13, 2008, Stockholm

6. Sachiyo Suzuki, Hiroki Hayashi, Kei Kurata, Daijyo Inaguma, Kensuke Kataoka, Yasuhiro Kondo, Hiroyuki Taniguchi, Daisuke Sugiyama, Seichi Matsuo Yukio Yuzawa ACUTE KIDNEY INJURY (AKI) IS ONE OF THE MAJOR PROGNOSTIC FACTORS FOR THE PATIENTS WITH ACUTE LUNG INJURY/ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME. 45th ERA-EDTA Congress May.10-13, 2008, Stockholm

7. Yukio Yuzawa

Characteristics and Causes of Immune Dysfunction in Uremia 3rd Asian Chapter Meeting of International Society for Peritoneal Dialysis Nov. 24, 2007, Hiroshima

8. T Kosugi, N Kato, Y Yuzawa, K Kadomastu, S Matsuo Transmembrane Glycoprotein, Basigin (CD147), Is Involved in the Pathogenesis of Renal Fibrosis. 40rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology Oct.31-Nov.5, 2007, San Francisco

9. W Sato, M Heinig, C Roncal, Y Yuzawa, Mu Wei, S Reungjui, Michael S. Gersch, Byron Croker, Seichi Matsuo, Richard J. Johnson, Takahiko Nakagawa

eNOS Deficiency as a Mechanism for Development of Mesangiolytic, Glomerular Microaneurysms and Nodular Glomerulosclerosis in the Mouse Kidney. 40rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology Oct.31-Nov.5, 2007, San Francisco

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯澤 由紀夫 (YUZAWA YUKIO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00191479

(2) 研究分担者

仁木 一郎 (NIKI ICHIRO)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：10262908

(3) 連携研究者

松尾 清一 (MATSUO SEIICHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70190410

門松 健治 (KADOMATSU KENJI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80204519