

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 27日現在

機関番号：17102  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590347  
 研究課題名（和文） 新規糖尿病微小血管障害発症機序とその治療標的としての有用性に関する病理学的研究  
 研究課題名（英文） Study of novel pathogenesis and its availability of therapeutic target for diabetes-associated microangiopathy  
 研究代表者  
 鬼丸 満穂（ONIMARU MITSUHO）  
 九州大学・医学研究院・助教  
 研究者番号：00380626

## 研究成果の概要（和文）：

微小血管の構造的安定性は正常な血管生理機能維持にとって重要である。糖尿病では、その微小血管構造が障害を受けるとされている。本研究では、血管構造維持に必須の受容体タンパク質（Tie）が糖尿病病態下では特定のタンパク分解酵素（MMP-14）により分解され、その結果微小血管の構築の異常とそれに伴う機能低下を引き起す可能性を示唆した。今後、糖尿病とMMP-14活性との相互関係の科学的詳細を検討する事は、糖尿病治療における治療標的としての有用性を具体化する観点から意義があると考えられる。

## 研究成果の概要（英文）：

Structural stability of microvessels is critical for exerting physiological function of microvessels. It has been indicated that the microvessel structure is affected under condition of diabetes Mellitus (DM). This study demonstrated a possibility that an indispensable receptor (Tie) for microvessel stabilization was degraded by a certain protease (MMP-14), resulting in causing physiological dysfunction of microvessels. Hence, further study of relationship between DM and MMP-14 activity is significant with the object of incarnating availability of therapeutic target for DM.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
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：基礎医学 実験病理学

キーワード：糖尿病、微小血管障害、受容体可溶性変換

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病合併症の多くは、その発症が高血糖状態に続発する微小血管障害に基づくものと考えられており、その障害の病態学的本質、障害の発生・進展機序の解明と、それらを科学的基盤とした治療法の開発が急務とされる。しかし、未だ微小血管障害の病態学的本質は科学的に十分解明されているとは言えない。

特に、糖尿病網膜症に着目した場合、局所における血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 発現亢進がその発症・進展に深く関与するとされており、現在、VEGF 活性抑制剤を硝子体内に投与する戦略は増殖性糖尿病網膜症 (PDR) に対して著効を示すことが臨床試験を通じ証明されている。しかし、VEGF 活性抑制戦略が抱える問題点は、糖尿病網膜症の初期病態である糖尿病黄斑浮腫 (DME) に対する有意な有効性が確認されないことである (D. N. Sang et al, *Diabetologia*, 2008)。つまり、VEGF は網膜症進展に重要な因子であるが、発症には深く関与していないということになる。一方、黄斑の浮腫状態を惹起する加齢黄斑変性に対する VEGF 活性抑制戦略の有効性は臨床試験的に証明されている (D. N. Sang et al, *Diabetologia*, 2008)。このような VEGF 抑制による治療反応の相違は、糖尿病の場合と加齢黄斑変性の場合とで、黄斑浮腫発症メカニズムが異なることを示唆する。従って、糖尿病病態に伴う微小血管障害の病態学的本質を明らかにし、それを標的とする治療法の開発は、広く糖尿病合併症に効果的な治療戦略確立に寄与すると考えられる。

血管成熟性を規定する代表的システムとして PDGF-BB/PDGFR- $\beta$  システムと Angiopoietin (Ang)/Tie-2 システムが知られる。我々はこれまでに前者システムが、1) 新生血管の成熟過程に重要であること (Onimaru M et al, *Am J Physiol*, 2009)、2) 糖尿病病態の細胞代謝異常である PKC 活性亢進に依存して PDGF-BB 発現低下が起こること、3) 糖尿病による虚血耐性低下の原因として PDGF-BB/PDGFR- $\beta$  システム機能低下が重要であること、を示唆した (Tanii M, Onimaru M et al, *Circ Res*, 2006)。一方、Ang/Tie-2 システムは血管成熟性制御に加え、血管透過性制御にも深く関与する。従って、糖尿病微小血管障害発症との関連性が推測されるものの、その関与を示唆する研究報告は乏しい。

申請者はこれまでに、Tie-2 の蛋白翻訳後の発現修飾機構として、全長 Tie-2 が、いわ

ゆる ectodomain shedding により可溶型に変換される現象を見いだした。

## 2. 研究の目的

糖尿病合併症の主たる基礎病態としての糖尿病微小血管障害発症機序に「血管成熟性制御を担う Angiopoietin/Tie-2 システムの破綻が関与する」という仮説をたてた。この仮説を軸にこれまでに申請者らが見いだした Tie-2 可溶型変換機構の詳細な分子機構、特に変換に関与する細胞内シグナル分子を明らかにする。また、ヒトや動物モデルの糖尿病病態における可溶型 Tie-2 産生状態や、可溶型変換関連分子機構の制御異常に関する時・空間的解析を行うことで、糖尿病病態発症・進展機序としての Tie-2 可溶型変換機構の重要性を明らかにするとともに、治療応用に向けた標的分子を同定する。

## 3. 研究の方法

本研究課題の研究計画遂行にあたり、研究代表者、研究分担者 (2名) からなる組織を形成した。研究代表者、研究分担者は、各々の専門分野に即した研究計画の責任者としての役割を果たすと同時に、常時密な連携をとり具体的実験計画の立案、実験結果の解釈を行った。研究代表者は自ら実験を遂行することに加え、必要に応じ実験を遂行・支援する大学院生、学術研究員や研究補助員への具体的指示等を行い、機能的かつ円滑な研究計画遂行を目指した。

## 4. 研究成果

(1) 本研究において着目し、血管の安定性に極めて重要な役割を果たす Tie-2 受容体に関し、これまで我々は、血管内皮細胞に発現する Tie-2 が可溶型に変換されること、PMA の刺激で Tie-2 可溶型変換が促進されることを明らかにしてきた。本研究課題は、この Tie-2 可溶型変換と糖尿病微小血管障害の病態発症・進展との関与を明らかにすることであるが、そのためには、細胞レベルでの Tie-2 可溶型変換分子メカニズムを明らかにすることが重要である。平成 22 年度は、このメカニズム解明に重点を置いた研究を遂行し、次の結果を得た。1. Tie-2 の可溶型には主に 75kDa のものと 115kDa の二つタイプが存在すること、2. PMA は 75kDa のタイプの可溶型変換促進に関与すること、3. PMA による 75kDa Tie-2 可溶型変換は PKC のシグナルにより促進されること、4. PKC を構成するアイソホームの中でも、特に PKC-epsilon の活性が

75kDaTie-2 可溶型変換に重要であること、5. 115kDaTie-2 の可溶型変換は、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ により促進されること、6. 75kDa の Tie-2 可溶型変換に主として関与する膜型プロテアーゼは MMP-14 であり、115kDaTie-2 可溶型変換に主として関与するプロテアーゼは ADAM9 であること、などを明らかにした。変換メカニズムが異なる二種類の Tie-2 可溶型の存在を明らかにしたことは、本年度における一番の成果である。しかし、このことは予期していなかったことであり、今後、なぜ二つの可溶型変換メカニズムが存在するのかという、その生物学的意義を明らかにしていくことが、最終的な目標である糖尿病病態との関連性を明らかにする上で重要であると考えた。

(2) 平成23年度は、平成22年度に明らかにした Tie-2 可溶型変換機構とそれにより産生される分子量の異なる二種類の可溶型 Tie-2 {115kDa の可溶型 (115-sTie-2), 115kDa の可溶型 (75-sTie-2)} に関し、その病態生物学的意義を中心に研究を行った。その結果、正常マウスの大腿筋肉を含む各主要臓器には主として 115-sTie-2 が存在し、その発現程度は臓器により異なり、腎臓、肺に高い事が明らかとなった。一方、血中には 115-sTie-2 と 75-sTie-2 の双方が同程度存在する事が明らかとなった。血中に存在する 75-sTie-2 がいかなる臓器で産生されるかは現在もまだ同定出来ておらず今後の課題である。また、STZ 誘発糖尿病マウスを用いた検討では、コントロールマウスと比較して大腿筋肉中の可溶型 Tie-2 の発現状況、つまり濃度や可溶型のタイプに特段の差を認めなかった。一方、ヒト硝子体液中の可溶型 Tie-2 は、糖尿病の初期病変である黄斑浮腫あるいは進行病変である糖尿病増殖性網膜症の罹患患者において非罹患患者と比較して有意にその濃度が高い事、発現亢進している可溶型は 115-sTie-2 と 75-sTie-2 の双方であることが明らかになった。しかしながら、このヒト硝子体液中の可溶型 Tie-2 発現亢進は、血管透過性亢進による血漿中の可溶型 Tie-2 が硝子体液中に漏れでた結果である可能性があり、血管内皮細胞が発現する全長 Tie-2 が可溶型に変換された結果生じるものかどうかは動物モデルでの検討が必要である。今後は STZ 誘発糖尿病マウスや ob/ob マウスにおける病的状態誘導時 (例えば虚血下肢や網膜症誘導時) における可溶型 Tie-2 の発現状況や全長 Tie-2 の発現状況の検討が必要と考えられた。また、近年血管内皮細胞が発現する Tie-1 の Ang-1/Tie-2 システム機能修飾の報告がなされている。この Tie-1 は PKC シグ

ナル依存性に可溶型に変換されることも知られている。よって、Tie-2 の可溶型変換に加え、Tie-1 の可溶型変換機構と Ang-1/Tie-2 システム機能への影響に関する検討も必要であると考えた。

(3) 平成24年度は、血管安定性制御に重要な役割を果たす Angiopoietin (Ang)/Tie システムにおいて、未だリガントが同定されていないチロシン型受容体 Tie-1 に関し、その病態生理学的役割を Tie-1 可溶型変換機構に着目して解析した。これまでに報告されている Tie-1 の生化学的機能として、Ang-1/Tie-2 システムを負に制御することが言われている。つまり、Tie-1 は Ang-1 により活性化された Tie-2 により transactivation を受け活性化し、この活性化 Tie-1 が、Tie-2 の活性化を抑制する機能を有するというものである。一方、この Tie-1 機能の病態生理学的意義は明らかでない。また、Tie-1 が可溶型に変換される現象も既に報告されているものの、その生物学的意義は明らかでない。本研究では、まず、Tie-1 可溶型変換機構の詳細を検討した。血管内皮細胞が発現する Tie-1 は western blot においてグリコシレーションの違いにより分子量の異なる二つのバンド (high molecular Tie-1/HM-Tie-1, low molecular Tie-1/LM-Tie-1) として認識される。VEGF-A や PMA により PKC が活性化されると、HM-Tie-1 のみ可溶型に変換される事が明らかになった。また、Tie-1 は Tie-2 と細胞外ドメインを介し複合体を形成する事が知られているが、この複合体形成に関与する Tie-1 は HM-Tie-1 のみであり、VEGF-A や PMA で活性化された血管内皮細胞では、HM-Tie-1 の可溶型変換に伴い、Tie-2 との複合体形成が阻害されることを見いだした。しかし一方で、Ang-1 による Tie-2 を介した Tie-1 transactivation は、VEGF-A や PMA で活性化された血管内皮細胞 (Tie-1, Tie-2 複合体形成が阻害された状態) においても誘導されることが確認され、この Tie-1 transactivation に細胞外ドメインを介した複合体形成は必要ない事が明らかとなった。一方、in vitro において血管内皮細胞が発現する Tie-1 をノックダウンすると、VEGF-A 依存性 ERK1/2 活性化が亢進されるという新たな知見を見いだした。このことは、Tie-1 は Ang/Tie システムのみならず、VEGF-A/VEGFR2 システムにも関与し、血管機能を制御していると考えられる。今後は Tie-1 に関する生化学的知見をさらに深めると共に、それら知見を統合する事により Tie-1 の病態生理学的役割を明らかにし、Tie-1 機能も含めた Ang/Tie システムの

糖尿病病態への関与を解明することで、治療に結びつく基礎的基盤を築く方向へと発展させていきたい。

#### 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 1 件)

Onimaru M, Yonemitsu Y, Suzuki H, Fujii T, Sueishi K. An Autocrine Linkage Between Matrix Metalloproteinase-14 and Tie-2 via Ectodomain Shedding Modulates Angiopoietin-1-Dependent Function in Endothelial cells Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (査読あり), 30, 818-826, 2010. 04.

[学会発表] (計 10 件)

#### 1. 鬼丸 満穂

血管内皮細胞における VEGF-A シグナルと Tie-1 との相互作用に関する分子病理学的検討 第 9 回病理学会カンファレンス、2012. 8. 03

#### 2. 鬼丸 満穂

血管内皮細胞における Tie-1 による VEGF-A シグナル制御、第 18 回 九州血液血管研究会、2011. 11. 05.

3. Mitsuho Onimaru, Yoshikazu Yonemitsu, Katsuo Sueishi, Vascular endothelial growth factor-dependent p42/44 MAPK (ERK1/2) activation are regulated by Tie-1 in endothelial cells、第 19 回日本血管生物医学学会学術集会、2011. 12. 09.

4. Mitsuho Onimaru, Yoshikazu Yonemitsu, Yusuke Murakami, Yasuhiro Ikeda, Katsuo Sueishi, PKC-MMP-14 Axis Regulates Endothelial Soluble Tie-2 (sTie-2) Production: Involvement of sTie-2 in Diabetes Mellitus-Associated Vascular Complications, American Heart Association Scientific Sessions, 2011, 2011. 11. 13.

5. 鬼丸 満穂、米満 吉和、居石 克夫  
血管内皮細胞における VEGF-A シグナルと Tie-1 との相互作用に関する分子病理学的検討、第 52 回日本脈管学会総会、2011. 10. 21.

6. Mitsuho Onimaru, Yoshikazu Yonemitsu, Hanako Suzuki, Katsuo Sueishi, Identification of soluble-form extracellular Tie-2 with full functional

domains: involvement of TIMP-insensitive ADAM9 in its production in endothelial cells、XXIII The International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2011. 07. 26.

#### 7. 鬼丸 満穂

血管内皮細胞における Tie-2 可溶性変換機構への ADAM9 の関与  
九州血液血管研究会、2010. 11. 27.

8. 鬼丸 満穂、米満 吉和、居石 克夫  
血管内皮細胞における Tie-2 可溶性変換機構への ADAM9 の関与、第十八回日本血管生物医学学会総会、2010. 12. 02.

9. 鬼丸 満穂、米満 吉和、居石 克夫  
血管内皮細胞における Tie-2 可溶性変換機構への ADAM9 の関与、第 51 回日本脈管学会総会、2010. 10. 15.

#### 10. 鬼丸 満穂、居石 克夫

血管内皮細胞の即時可溶性 Tie-2 (sTie-2) 産生機構に関する分子病理学的検討、第 9 回日本病理学会総会、2010. 04. 28.

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002951/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鬼丸 満穂 (ONIMARU MITSUHO)  
九州大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：00380626

##### (2) 研究分担者

米満 吉和 (YONEMITSU YOSHIKAZU)  
九州大学・大学院薬学研究院・客員教授  
研究者番号：40315065

##### (3) 研究分担者

池田 康博 (IKEDA YASUHIRO)  
九州大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：20380389