

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591193

研究課題名(和文)慢性腎臓病における内因性バゾヒピンファミリーの腎保護効果と臨床的意義に関する検討

研究課題名(英文) Analysis on the renoprotective effects and clinical significance of endogenous Vasohibin family in chronic kidney disease

研究代表者

前島 洋平 (MAESHIMA, YOHEI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10343287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)は末期腎不全・心血管疾患の危険因子である。本研究では、内在性血管新生制御因子Vasohibin-1のCKDの病態における機能的解析を行った。Vasohibin-1欠損マウスにおいて野生型マウスに比して、糖尿病性腎症、尿細管間質病変、急性腎障害が増悪した。CKD患者にて、腎組織でのVasohibin-1発現は半月体形成、間質炎症細胞浸潤と相関し、血・尿中Vasohibin-1濃度高値群では、将来的な腎機能低下進展のリスクが増加した。内因性Vasohibin-1のCKD病態における腎保護の効果並びに新規バイオマーカーとしての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The population of CKD patients in Japan is estimated as 13.3 million people. CKD is a risk factor of end-stage renal disease and cardiovascular disorders. Here, we examined the functional role of Vasohibin-1, a negative feedback regulator of angiogenesis, in CKD. Diabetic nephropathy, tubulointerstitial injuries induced by unilateral ureteral obstruction and acute kidney injury were exacerbated in the Vasohibin-1^{+/-} mice compared with the wild-type mice. Renal Vasohibin-1 expression was associated with crescentic lesions and interstitial inflammation in CKD patients. Elevated plasma/urinary levels of Vasohibin-1 predicted progressive renal functional deterioration in CKD patients. These results suggest the potential renoprotective effects of Vasohibin-1 and its potential as a novel biomarker in CKD.

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：慢性腎臓病 血管新生 糖尿病性腎症 Vasohibin-1 尿細管間質障害

1. 研究開始当初の背景

2002年にCKD(慢性腎臓病)の概念が米国より提唱されたが、CKD人口は本邦にて1,330万人と推計される。CKDから末期腎不全に至り透析療法を施行される患者数は本邦にて年々増加し約30万人に至る(2011年末)。またCKDは心血管疾患の危険因子であり進展制御法の開発が国家的課題である。CKDの主要な原疾患は、糖尿病性腎症、腎硬化症、慢性腎炎であるが、末期腎不全に至る際に糸球体硬化・尿細管間質病変(間質線維化)が共通して観察される。

血管新生は促進因子と抑制因子のバランスにより調節されるが、腫瘍、糖尿病性網膜症、等の病態進展に関与する主要な血管新生促進因子VEGF-Aは、糸球体内皮修復作用や傍尿細管毛細血管数増加/尿細管間質病変改善作用を有する一方、血管透過性・炎症を促進する。糖尿病性腎症早期における糸球体でのVEGF-A発現増加、中和型抗VEGF-A抗体や各種血管新生抑制因子投与による腎症進展抑制効果が報告された。

Vasohibin-1(VASH-1)は生体内での血管新生のnegative-feedback調節を司り、血管新生の終息/血管の成熟に関与すると考えられる。さらに、VASH-1はストレス下での内皮細胞生存に寄与する。これまでにVASH-1による抗腫瘍効果、網膜血管新生抑制作用、動脈内膜肥厚の抑制効果が報告されている。VASH-1のホモログVASH-2は、主として単核球等に由来するが、sprouting等の血管新生を促進する作用を持つ。我々は、VASH-1過剰発現による糖尿病性腎症治療効果についてこれまで報告してきた。しかしながら、内因性VASH-1/2の腎保護的役割、CKD患者にお

ける腎組織・血/尿中VASH-1の病態意義については、いまだに解明されていない。

2. 研究の目的

内因性VASH-1の腎保護効果と分子作用機序について遺伝子欠損マウス等を用いて解析し、CKDの新規治療法開発に向けての基礎的検討を行う。ホモログであるVASH-2のCKD病態における意義についても検討する。さらに、CKD患者検体を用いてVASH-1の腎臓病バイオマーカーとしての有用性を検討する。

- (1) VASH-1ヘテロ欠損マウス、VASH-2欠損マウスに1型糖尿病を惹起して腎症変化について野生型マウスと比較検討する。
- (2) VASH-1ヘテロ欠損マウスに片側尿管結紮、葉酸腎症モデルを惹起し、尿細管間質障害について野生型マウスと比較検討する。
- (3) CKD患者血漿・尿中VASH-1濃度測定、腎生検組織におけるVASH-1発現と臨床指標との関連性を検討する。

3. 研究の方法

- (1) VASH-1 KOマウスにおける1型糖尿病モデル惹起による腎症進展変化の検討
Streptozotocin(STZ)をVASH-1ヘテロ欠損マウス、VASH-2ヘテロ欠損マウス(連携研究者より供与)、野生型マウス(C57/BL6J)に腹腔内投与し1型糖尿病モデルを作成する。4週毎に蓄尿を行い、16週後に屠殺し尿、血液、腎組織等を採取し腎機能・アルブミン尿測定、免疫染色、Western blot, real-time PCR等を行い解析する。
- (2) VASH-1 KOマウスにおける尿細管間質障害モデル惹起による腎障害変化の検討
常法により、VASH-1ヘテロ欠損マウス、野生型マウスに片側尿管結紮(UUO)モデル、

葉酸腎症モデルを作成する。UUOではDay 3, 7に、葉酸腎症ではDay 1, 2, 14に腎臓を摘出/血清採取し、腎機能・腎尿管間質病変の定量的評価を行い、免疫染色、Western blot, real-time PCR等を行い解析する。培養腎間質線維芽細胞にVasohibin-1 siRNAを導入しTGF- β 1刺激下での細胞増殖・matrix産生能について比較検討する。

(3)CKD患者血/尿中VASH-1濃度、腎組織VASH-1発現の臨床的意義の検討

当科外来、入院CKD患者よりICを得た後に血漿、尿検体を採取し、ELISA法にてVASH-1濃度を測定する。腎生検組織を用いて、VASH-1, VEGF-A, VEGFR-2免疫染色を行う。各種臨床指標・腎機能予後との関連性を検討する。

4. 研究成果

本研究にて、VASH-1ヘテロ欠損マウスにstreptozotocin(STZ)誘発1型糖尿病、片側尿管結紮(UUO:尿尿管間質病変)モデルを各々作成した。VASH-1ヘテロ欠損マウスでは、野生型対照マウスに比して、糖尿病性腎症(アルブミン尿、糸球体肥大、足細胞障害、単球浸潤、NF- κ B活性化、VEGF-A増加、Ang-1/Ang-2比低下: *manuscript in preparation*) UUO(間質線維化、単球浸潤、ケモカイン発現増加: *manuscript in submission*)等の増悪を認めた。培養糸球体足細胞(podocyte)を用いた検討で、VASH-1 siRNA導入による濾過障壁維持に関するnephrin, ZO-1発現低下と、VEGF-A発現増加、Ang-1発現低下が観察された(高糖濃度培養下)。また、培養腎間質線維芽細胞では、VASH-1 siRNA導入による間質型コラーゲン、TGF- β 1の発現増加、pSmad3増加が観察された。

第2に、1型糖尿病を惹起したVASH-2欠損マウスでは、野生型糖尿病群に比して

アルブミン尿が有意に減少し、電顕にて糸球体足細胞障害が減少し、腎でのTGF- β 1発現の増加が抑制されていた。

本検討により、内因性血管新生negative feedback制御因子VASH-1のCKD病態における腎保護的役割が示唆された。

一方、CKD患者では、血中VASH-1濃度が血圧/年齢と負の相関を示し、さらに、血漿VASH-1濃度高値と、血漿VASH-1/SVBP濃度高値は、腎機能低下予後悪化を予知しうる事が明らかとなった(*manuscript in revision*)。さらに、ヒト腎組織でのVASH-1発現について免疫染色にて検討したが、正常腎組織では主として糸球体/傍尿管毛細血管内皮に観察され、CKD患者群では内皮細胞、メサンギウム細胞、一部の浸潤炎症細胞、半月体部位にも陽性で、腎VASH-1陽性細胞数と間質炎症細胞浸潤、半月体形成、糸球体VEGFR-2陽性領域との間に正の相関を認めた(*Acta Medica Okayama, in press*)。以上より、CKD患者におけるVasohibin-1の新規バイオマーカーとしての可能性が示唆された。

Vasohibin-1のCKD進展における保護的役割が示唆され、今後のCKD治療における応用並びにバイオマーカーとしての可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計17件)

Hinamoto N, Maeshima Y, Saito D, Yamasaki H, Tanabe K, Nasu T, Watatani H, Ujike H, Kinomura M, Sugiyama H, Sonoda H, Kanomata N, Sato Y, Makino H. Renal distribution of Vasohibin-1 in patients with chronic kidney disease. *Acta Medica Okayama*. 査読有, (*In press*)

Matsuda M, Tamura K, Wakui H, Maeda A, Ohsawa M, Kanaoka T, Azushima K, Uneda K, Haku S, Tsurumi-Ikeya Y, Toya Y, Maeshima Y, Yamashita A, Umemura S. Upstream stimulatory factors 1 and 2 mediate the

transcription of angiotensin II binding and inhibitory protein. J. Biol. Chem. 査読有, 288巻, 2013, 19238-19249 DOI: 10.1074/jbc.M113.451054.

Tanabe K, Tamura Y, Lanasp MA, Miyazaki M, Suzuki N, Sato W, Maeshima Y, Schreiner GF, Villarreal FJ, Johnson RJ, Nakagawa T. Epicatechin limits renal injury by mitochondrial protection in cisplatin nephropathy. Am J Physiol-Renal Physiol. 査読有, 303巻, 2012, F1264-1274 DOI:10.1152/ajprenal.00227.2012.

Nasu T, Kinomura M, Tanabe K, Yamasaki H, Htay SL, Saito D, Hinamoto N, Watatani H, Ujike H, Suzuki Y, Sugaya T, Sugiyama H, Sakai Y, Matsumoto K, Maeshima Y, Makino H. A sustained-release prostacyclin analog ONO-1301 ameliorates tubulointerstitial alterations in a mouse obstructive nephropathy model. Am J Physiol-Renal Physiol. 査読有, 302巻, 2012, F1616-1629 DOI: 10.1152/ajprenal.00538.2011.

Saito D, Maeshima Y, Nasu T, Yamasaki H, Tanabe K, Sugiyama H, Sonoda H, Sato Y, Makino H. Amelioration of renal alterations in obese type 2 diabetic mice by Vasohibin-1, a negative feedback regulator of angiogenesis, Am J Physiol-Renal Physiol, 査読有, 300巻, 2011, F873-886 DOI: 10.1152/ajprenal.00503.2010.

〔学会発表〕(計 50 件)

Hinamoto N (Maeshima Y), Protective Effects of Endogenous Vasohibin-1 on Podocyte in Diabetic Nephropathy, 2013 年度米国腎臓学会議、2013 年 11 月 7 日、アトランタ、米国

Watatani H (Maeshima Y), Lack of Vasohibin-1 exacerbates tubulointerstitial injuries partly via activating Smad3 and excessive matrix production in renal fibroblasts, 2012 年度米国腎臓学会議、2012 年 11 月 1 日、サンディエゴ、米国

〔図書〕(計 1 件)

榎野博史、前島洋平、シスメックス株式会社、CKDフォトブック、2013、51

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 2 件)

名称：バゾヒピン含有治療剤
発明者：前島洋平、那須達世、田邊克幸、佐藤靖史、榎野博史
権利者：国立大学法人 岡山大学
種類：特許
番号：第 5256192 号
取得年月日：H25 年 4 月 26 日
国内外の別：国内

名称：糖尿病性腎症の治療用医薬組成物
発明者：前島洋平、一瀬邦弘、榎野博史
権利者：国立大学法人 岡山大学
種類：特許
番号：第 5044775 号
取得年月日：H24 年 7 月 27 日
国内外の別：国内

〔その他〕
特記事項無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前島 洋平 (MAESHIMA YOHEI)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：10343287

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

佐藤 靖史 (SATO YASUFUMI)
東北大学・加齢医学研究所腫瘍循環分野・
教授
研究者番号：50178779