

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659264

研究課題名(和文)内因性抗線維化分子に着目した、腎線維化の制御手段開発

研究課題名(英文)Development of control means of renal fibrosis focused on endogenous anti-fibrotic molecule

研究代表者

永井 貴子(NAGAI, Takako)

金沢医科大学・大学病院・医員

研究者番号：90625443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：線維芽細胞は腎線維症に重要な役割を担い、内皮-間葉系細胞分化(EndMT)が活性化線維芽細胞の重要な供給源である。我々は内因性抗線維化ペプチドN-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline(AcSDKP)にEndMT抑制を介した線維化抑制効果を見出し、線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR1)を介した抗線維化microRNAの発現が重要である可能性を見出した。AcSDKPは糖尿病CD-1マウスで抑制され、内因性抗線維化ペプチドの低下が線維化惹起に有意である可能性が示唆され、AcSDKP補充による内因性AcSDKP正常化は抗線維化治療戦略になりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The fibroblasts play a role in kidney fibrosis. Recently, the endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) has emerged as an important source of myofibroblasts or activated fibroblasts. MicroRNA let-7 exhibits anti EndMT effects and fibroblast growth factor (FGF) receptor has been shown to be an important in microRNA let-7 expression. We found that the endogenous anti fibrotic peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (AcSDKP) inhibited the EndMT and exhibited anti fibrotic effects; Such anti fibrotic effects of AcSDKP were associated with FGF receptor mediated anti-fibrotic program. Regards with this, endogenous levels of AcSDKP were suppressed in the urine of streptozotocin-induced diabetic CD-1 mice. These results suggest that AcSDKP is an endogenous anti fibrotic molecule that has the potential to cure diabetic kidney fibrosis via an inhibition of the EndMT associated with the restoration of FGF receptor and microRNA let-7.

研究分野：糖尿病

キーワード：EndMT AcSDKP 糖尿病性腎症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は最終的に腎線維化を生じ、末期腎不全へと進行する。腎線維化において重要とされる線維芽細胞の活性化やその供給源として EndMT(内皮-間葉系細胞分化)の意義が注目されている。レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系阻害薬、特にアンギオテンシン受容体拮抗薬(ARB)とアンギオテンシン変換酵素阻害薬(ACE-I)は、糖尿病性腎症症例に対して広く臨床の現場で使用されている。これらは臓器保護薬剤として同一視されがちだが実際は性格の異なる薬物であり、ACEの基質にはアンギオテンシン以外にも重要な生理活性物質が存在している。それらのACE基質の中でACE-I投与により血中濃度が上昇し、抗線維化・抗増殖・抗炎症・抗アポトーシス・血管新生作用を有し単独で優れた臓器保護作用を持つ N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline(AcSDKP)が注目されている。AcSDKPは、様々な実験モデルにおいて抗線維化効果を示すことが報告されている。

2. 研究の目的

抗線維化ペプチド AcSDKP の線維芽細胞活性化、EndMT、腎線維化に対する抑制効果を確認するとともに、その分子機構を明らかにし、臨床応用を見据え、既存の糖尿病性腎症治療薬との併用で相加的効果があることを確認する。

3. 研究の方法

実験 糖尿病性腎症治療薬 ACE 阻害薬投与下の AcSDKP による相加的抗線維化効果を調べるために、生後 6 週 CD1 マウスに

streptozotocin(STZ)(200mg/kg)を腹腔内へ単回投与し、STZ 誘導 1 型糖尿病腎症モデルマウスを作成、その時点から 4 カ月後に ACE 阻害剤 (ACE-I) のイミダプリル単独あるいは ACE-I + AcSDKP の追加投与、または アンギオテンシン受容体拮抗薬の TA-606 単独を各々マウスに投与した。各マウス群の薄切腎組織を用い、PAS 染色にて系球体硬化を調べ、MTS 染色にて尿細管間質線維化を評価した。他方でマウス血漿および尿中の AcSDKP 濃度を測定した。EndMT 過程を調べるために薄切腎組織に対して内皮マーカー CD31 及び間葉系マーカー SMA および FSP1 染色を行い、二重染色陽性細胞を EndMT 過程の細胞と認識して蛍光顕微鏡で解析した。

実験 AcSDKP による抗 EndMT 効果の in vitro 解析を行うために、ヒト培養内皮細胞(HMVEC)を用い、サイトカイン(TGF- β 2, TNF- α , IL-1 β)で刺激、2 時間の AcSDKP 前孵置 (100nM) を行い、計 72 時間の培養後、AcSDKP の有無によって比較検討し、さらに蛍光抗体法により CD31 及び SM22 の発現を調べ、Western blot 法によって CD31, VE カドヘリンと FSP1 さらに Smad3 の蛋白発現を検討した。

実験 AcSDKP による抗 EndMT 効果における microRNA let-7 family 制御機構及び let-7 の標的 TGF- β 1 についての検討を行った。糖尿病モデルマウス凍結腎臓サンプルを用いて microRNA を含む total RNA を抽出後、microRNA array 解析、定量的 PCR を施行し、let-7 family を解析した。Western blot 法により FGFR リン酸化、FGFR 蛋白量を解析し、また薄切腎組織を用い、let-7 の標

的である TGF R1 と CD31 を二重染色し、蛍光顕微鏡で解析した。

実験 糖尿病性腎症において AcSDKP の生体内における意義を明らかにするために、金沢医科大学病院 糖尿病・内分泌内科へ通院している 2 型糖尿病症例を対象に、外来もしくは病棟にて尿サンプル、血液サンプルを検体として採取し、使用薬剤等の基本情報や各種パラメーターと血中・尿中 AcSDKP 濃度との相関を検討した。

4. 研究成果

実験 マウスの組織学的解析において、糸球体肥大および PAS 陽性のマトリックス蓄積、MTS 染色で強く尿細管間質線維化が認められた糖尿病マウスと比較し、イミダプリル治療群では糸球体硬化と尿細管間質の線維化が部分的に、イミダプリル + AcSDKP 治療群では腎線維化がほぼ完全に抑制された。TA-606 に抗線維化効果はなかった。糖尿病マウスの血中 AcSDKP 濃度はコントロールに比べ低下傾向にあったが、イミダプリル投与で上昇を認め、イミダプリル + AcSDKP 追加投与ではその約 5.5 倍へと増加した。メサンギウム領域拡大、尿細管間質の線維化は AcSDKP 血漿濃度と逆相関していた。糖尿病マウスでは EndMT を呈している細胞数が増加していたが、イミダプリル治療群では部分的に抑制、イミダプリル + AcSDKP 治療群では完全に抑制された。TA606 治療群には EndMT の抑制は認められなかった。

実験 HMVEC 細胞を用いた実験では、敷石状外観を呈する内皮細胞はサイトカイン刺激にて紡錘形へ形態変化したが、AcSDKP の共孵置で形態変化は抑制された。内皮細胞

の形態変化とともに確認された EndMT (内皮マーカー (CD31) の消失と間葉系マーカー (SM22) の発現増加) は、AcSDKP の共孵置で抑制された。サイトカイン刺激で CD31 および VE カドヘリン蛋白発現量減少かつ FSP1 増加が見られたが、AcSDKP 追加投与にて各々の変化は抑制され、また同様に、Smad3 のリン酸化も抑制された。

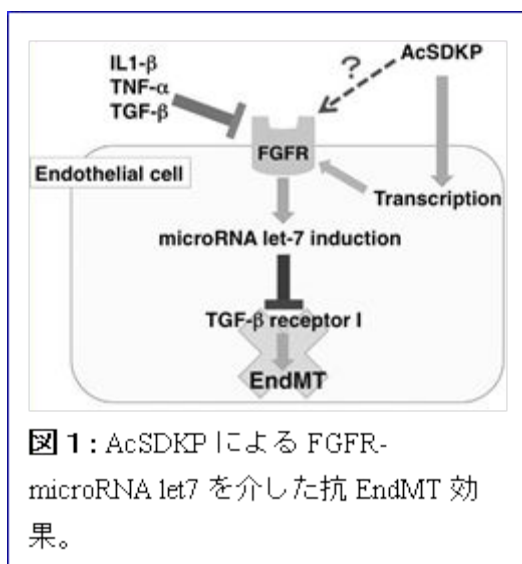
実験 microRNA array 解析の結果、let-7 family は糖尿病腎で抑制されていたが、イミダプリル + AcSDKP 処理にてほぼすべての let-7 量が正常化傾向を示していた。定量的 PCR 解析でも、イミダプリル + AcSDKP の処理によって let-7 量の回復を確認した。また Western blot 解析では、糖尿病で低下していた FGFR リン酸化および FGFR 蛋白量および遺伝子発現量が、イミダプリルにより部分的に、イミダプリル + AcSDKP で完全に回復した。培養細胞 HMVEC においても、サイトカイン刺激で抑制されていた FGFR 発現と FGFR リン酸化は共に AcSDKP 共孵置で正常化した。糖尿病マウス内皮細胞で TGF R1 は発現増加していたが、イミダプリル投与で部分的に、AcSDKP 追加で完全に抑制されていた。

実験 現時点では、血中 AcSDKP は 21 例、尿中 AcSDKP は 33 例まで解析中だが、ACE-I 使用 2 型糖尿病患者において、血中、尿中ともに AcSDKP 濃度が上昇傾向にあった。一方、ARB 使用 2 型糖尿病患者や ARB や ACE-I 未使用 2 型糖尿病患者では変化は見られなかった。今後も、検討をすすめていく予定である。

総括

ACEの基質でありACE-Iの投与により血中濃度が上昇する内因性抗線維化ペプチド

AcSDKPが糖尿病では低下しており、糖尿病ではAcSDKPにより惹起されるFGF受容体を介したmicroRNA let-7の発現も低下していた。ACE-IとAcSDKP併用療法によって内因性抗線維化プログラムを改善することが可能であった(図1)。本検討から、AcSDKP-FGF受容体-let7という抗線維化プログラムが糖尿病腎で低下し、その機構が治療標的である事、また糖尿病性腎症の治療戦略においてACE阻害の生物学的意義に注目する必要がある事が示唆された。



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 5件)

Sen Shi, Swayam Prakash Srivastava, Megumi Kanasaki, Jianhua He, Munehiro Kitada, Takako Nagai, Kyoko Nitta, Susumu Takagi, Keizo Kanasaki, Daisuke Koya, "Interactions of DPP-4 and integrin 1 influences endothelial-to-mesenchymal transition", *Kidney International*, 査読有、1 April 2015;DOI:10.1038/ki.2015.103

Keizo Kanasaki, Sen Shi, Megumi Kanasaki, Jianhua He, Takako Nagai, Yuka Nakamura, Yasuhito Ishigaki,

Munehiro Kitada, Swayam Prakash Srivastava, Daisuke Koya, "Linagliptin-Mediated DPP-4 Inhibition Ameliorates Kidney Fibrosis in Streptozotocin Induced Diabetic Mice by Inhibiting Endothelial-to-Mesenchymal Transition in a Therapeutic Regimen", *Diabetes*, 査読有、June 2014 volume 63:2120-2131, DOI:10.2337/db13-1029

Keizo Kanasaki, Takako Nagai, Kyoko Nitta, Munehiro Kitada, Daisuke Koya "N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline: a valuable endogenous anti-fibrotic peptide for combating kidney fibrosis in diabetes", *frontiers in PHARMACOLOGY*, 査読有、14 April 2014, DOI:10.3389/fphar.2014.00070

Takako Nagai, Megumi Kanasaki, Swayam Prakash Srivastava, Yuka Nakamura, Yasuhito Ishigaki, Munehiro Kitada, Sen Shi, Keizo Kanasaki, Daisuke Koya "N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline Inhibits Diabetes-Associated Kidney Fibrosis and Endothelial-Mesenchymal Transition", *BioMed Research International*, 査読有、Volume 2014, Article ID 696475 DOI:10.1155/2014/696475

Takako Nagai, Kyoko Nitta, Megumi Kanasaki, Keizo Kanasaki, Daisuke Koya "The biological significance of angiotensin-converting enzyme inhibition to combat kidney fibrosis." *Clinical and Experimental Nephrology*, 査読有、volume 19, 2014 65-74 DOI:10.1007/s10157-014.1000-3

[学会発表](計 8件)

永井貴子, Swayam Prakash Srivastava, 金崎啓造, 古家大祐, "糖尿病性腎線維化における内因性抗線維化ペプチド AcSDKP の意義とその作用機序における抗線維化 microRNA クロストーク" 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 2015年5月21日、シーモールパレス(山口県下関市)(口頭発表)

永井貴子, 金崎めぐみ, 金崎啓造, 古家大祐, "内因性抗線維化ペプチド AcSDKP は FGF 受容体発現と miRNA let-7 の正常化を介して糖尿病腎の線維化を抑制する" 第25回日本糖尿病性腎症研究会 2013年12月8日、東京ガーデンパレス(東京都文京区)(口頭発表)

永井貴子, 金崎めぐみ, 金崎啓造, 古家大祐, "内因性抗線維化分子 AcSDKP による糖尿病性腎症治療効果とその分子機構における miRNA の意義"

第4回分子腎臓フォーラム 2013年9月7日、メルパルク京都(京都府京都市下京区)(口頭発表)

永井貴子、金崎めぐみ、金崎啓造、古家大祐、“内因性抗線維化ペプチド AcSDKP による糖尿病性腎症治療効果とその分子機構における miRNA の意義”

FRONT-J 第4回学術集会 2013年8月24日、経団連会館2階「国際会議場」(東京都千代田区大手町)(口頭発表)

永井貴子、金崎めぐみ、金崎啓造、古家大祐 “内因性抗線維化分子 AcSDKP は EndMT を抑制し糖尿病性腎症・腎線維化に対して有効な治療戦略となる”

第56回日本腎臓学会学術総会 2013年5月11日、東京国際フォーラム(東京都千代田区丸の内)(口頭発表)

永井貴子、金崎めぐみ、金崎啓造、古家大祐、“内因性抗線維化分子 AcSDKP は EndMT を抑制し糖尿病性腎症・腎線維化に対して有効な治療戦略となる”

第24回日本糖尿病性腎症研究会 2012年12月1日、新霞が関ビル全社協・灘尾ホール(東京都千代田区霞が関)(口頭発表)

Takako Nagai, Keizo Kanasaki,

Daisuke Koya

” Endogenous anti-fibrotic peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline inhibits

endothelial-mesenchymal-transition and diabete-associated kidney fibrosis ”

American Society of Nephrology Kidney Week2012, 2012,11,1 San Diego,CA,USA

(ポスター発表)

Takako Nagai ,

“Endogenous anti-fibrotic peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline inhibits

endothelial-mesenchymal-transition and diabete-associated kidney fibrosis”

The 11th Japan-Korea Diabetic

Nephropathy Seminar 2012年10月20日、金沢エクセルホテル東急(石川県金沢市)

(口頭発表)

6. 研究組織

(1)研究代表者

永井 貴子 (NAGAI, Takako)

金沢医科大学・大学病院・医員

研究者番号：90625443

(2)研究分担者

金崎 啓造 (KANASAKI, Keizo)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：60589919