

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670414

研究課題名(和文)オートファジー制御による糖尿病腎症に対する新たな治療薬の開発

研究課題名(英文)New therapeutic strategy for diabetic nephropathy via autophagy regulation

研究代表者

古家 大祐 (KOYA, Daisuke)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70242980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病モデルマウスの腎線維化は、内因性抗線維化ペプチドであるN-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (AcSDKP)投与による抗線維化microRNA29 およびlet-7誘導による内皮・間葉転化の抑制を介して抑制されることを見出した。加えて、糖尿病状態におけるmicroRNA29発現低下によるDPP-4発現の増強によって腎線維化が生じていたが、DPP-4阻害薬であるリナグリプチン投与によるmicroRNA29発現亢進によって改善された。

研究成果の概要(英文)：Renal fibrosis in diabetic mouse model was ameliorated by inhibition of endothelial-mesenchymal conversion via the anti-fibrotic microRNA29 and let-7 induction with an endogenous anti-fibrotic peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (AcSDKP) administration. In addition, although renal fibrosis has been caused by the enhancement of the DPP-4 expression by reduced microRNA29 expression in diabetic state, it has improved by microRNA29 expression with a DPP-4 inhibitor, linagliptin administration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：オートファジー 糖尿病 内皮・間葉転化 microRNA

### 1. 研究開始当初の背景

我々はカロリー制限下に NAD+依存性に活性化されるサーチュイン Sirt1 (酵母では Sir2、哺乳類では Sirt1) が、抗老化を含め細胞保護的な意義を果たしていることに注目した。既に、肥満 2 型糖尿病腎症モデルラットの腎病変と腎機能や加齢腎障害が、カロリー制限による Sirt1 活性依存性のオートファジー機構維持によって改善されることを見いだした。さらに、糖尿病腎症における尿蛋白が腎障害をさらに増悪させる悪性サイクルには、Sirt3 活性化が同様に腎保護的に作用することも見いだした。上記の成果から、Sirt1 および Sirt3 活性化を介するオートファジーの制御が、腎保護作用を発揮するとの仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

慢性腎臓病から慢性透析療法を受けている患者数は 30 万人を超え、医学的のみならず社会的にも解決すべき課題である。特に、糖尿病腎症から新規に透析導入に至る患者数は、他の腎疾患と比べて突出して第 1 位であり、慢性腎臓病の最重要課題といえる。そこで、新たな糖尿病腎症の治療法の開発を目指し、糖尿病腎症モデル動物に対して、抗線維化効果を発揮する

N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (AcSDKP) 投与における腎 microRNA 解析を行い、抗線維化効果を発揮する microRNA を同定する。さらに、糖尿病モデル動物に対する DPP-4 発現と、DPP-4 阻害薬の腎保護効果と、関連する microRNA も同定する。

### 3. 研究の方法

(1) 糖尿病腎線維化治療薬として AcSDKP を用いる事を目標に、抗線維化ペプチド AcSDKP の生物学的意義と詳細な分子機構の解明を行う。8 週齢雄性 CD-1 マウスに STZ (200  $\mu$ g/kg BW) を腹腔内単回投与し、非治療群、ACE 阻害薬 (imidapril) 治療群、ACE 阻害薬

+AcSDKP 治療群、ARB (TA606) 治療群に分け、STZ 投与後 6 ヶ月で屠殺する。腎組織検査とともに、下記の如く FGF および FGFR、microRNA の評価を行った。

FGF1~10, FGFR1~4, FGFR specific substrate の蛋白-遺伝子発現レベル、及び microRNA array を行うとともに、microRNAlet-7s および microRNA29s は別途評価する。control siRNA 及び FGFR1~4 の siRNA を培養内皮細胞に導入し、TGF- $\beta$ 2 単独または TGF- $\beta$ 2/IL1 $\beta$ /TNF $\alpha$  刺激を AcSDKP の有無の条件にて行い、TGF- $\beta$  の特異的転写因子 smad3 のリン酸化および内皮・間葉転化 (EndMT) 抑制 (48 時間刺激) の検討を行う。

(2) 8 週齢雄性 CD-1 マウスに STZ (200  $\mu$ g/kg BW) を腹腔内単回投与し、1 型糖尿病発症後 5 か月目から 4 週間 linagliptin [5 mg/kg body weight (BW)/day in drinking water] 投与、非投与群に分け、6 か月目に EndMT、DPP-4 発現および活性、さらに、linagliptin 群と非投与群において、microRNA29 発現の差異を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 糖尿病誘導 6 ヶ月後、正常マウスに比し、糖尿病マウスでは顕著な線維化と糸球体硬化と肥大を認めた (図 1)。ACE 阻害薬 (imidapril) 投与にてこれら線維化病変の改善を軽度認め、ACE 阻害薬+AcSDKP 追加投与群ではほぼ線維化は消失した (図 1)。ARB (TA606) 投与群においては線維化、糸球体硬化とともに抑制できなかった (図 1)。糸球体肥大、および尿アルブミンはすべての介入治療で改善していた。また、糖尿病マウスでは尿中 AcSDKP 濃度は有意に抑制しており、線維化定量指数と血中 AcSDKP 濃度は逆相関することも明らかとなった。AcSDKP は培養内皮細胞で EndMT を抑制し、糖尿病腎においても増加した EndMT は ACE 阻害薬単独にて部分的に、ACE 阻害薬+AcSDKP にてほぼ正常化ま

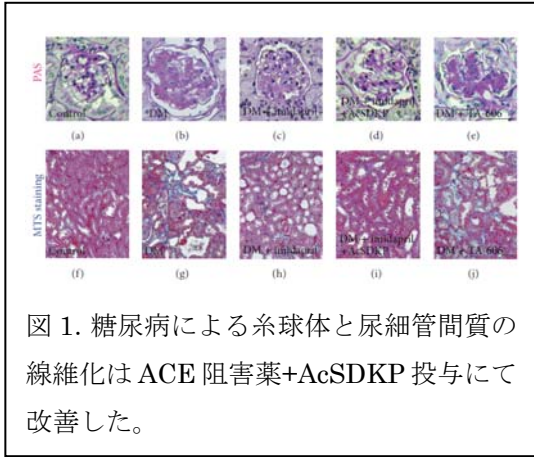


図 1. 糖尿病による糸球体と尿細管間質の線維化は ACE 阻害薬+AcSDKP 投与にて改善した。

で抑制されたが、ARB では全く抑制できなかった (図 2)。TGF-beta 受容体 I 型 (TbetaR-I)

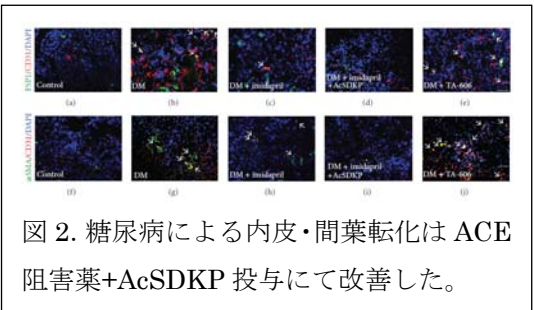


図 2. 糖尿病による内皮・間葉転化は ACE 阻害薬+AcSDKP 投与にて改善した。

を抑制することにより抗 EndMT 効果を発揮することが報告されている microRNA let-7 および microRNA let-7 の発現に重要である fibroblast growth factor 受容体 1 (FGFR1) は共に糖尿病腎で抑制されていたが、AcSDKP はこれら両者の発現を in vivo、in vitro 共に増加させた。事実、糖尿病腎の内皮細胞に置いて TbetaR-I は過剰発現していたが、AcSDKP はそれを抑制した。

(2) STZ 誘導 1 型糖尿病 CD-1 マウスの糸球体硬化・腎線維化 (STZ 投与後 6 ヶ月) は、STZ

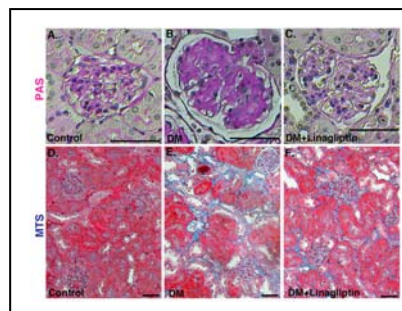


図 3. 糖尿病による糸球体、間質の線維化は linagliptin 投与によって改善した。

投与後 5 ヶ月からの DPP-4 阻害薬 linagliptin 投与により有

意に改善した (図 3)。糖尿病マウスでは血清、腎の DPP-4 活性が上昇しており、腎において糸球体基底膜、尿細管刷子縁、血管内皮細胞

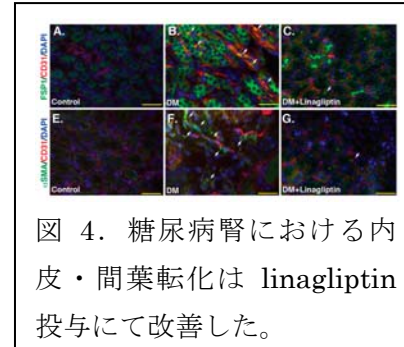


図 4. 糖尿病腎における内皮・間葉転化は linagliptin 投与にて改善した。

は血清、腎での DPP-4 活性を抑制し、腎での

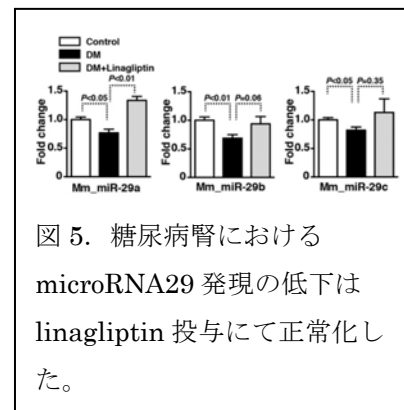


図 5. 糖尿病腎における microRNA29 発現の低下は linagliptin 投与にて正常化した。

linagliptin は糖尿病腎での EndMT を抑制した (図 4)。糖尿病腎では microRNA29a、b、c が低下していた (図 5)。これらの結果は、糖尿病腎において DPP-4 蛋白発現増加、microRNA29 抑制、および TGF-β 刺激伝達機構活性化の相互作用が糖尿病腎の線維化を惹起する可能性を示した。

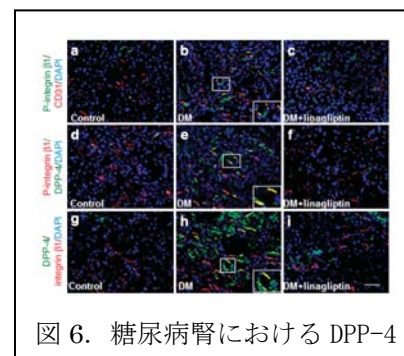


図 6. 糖尿病腎における DPP-4 と integrin β1 の相互作用は linagliptin 投与にて抑制された。

に DPP-4 蛋白発現が増加していた。Linagliptin は血清、腎での DPP-4 蛋白発現も抑制した。糖尿病腎では EndMT が増加しており、linagliptin は糖尿病腎での EndMT を抑制した (図 4)。糖尿病腎では microRNA29a、b、c が低下していた (図 5)。これらの結果は、糖尿病腎において DPP-4 蛋白発現増加、microRNA29 抑制、および TGF-β 刺激伝達機構活性化の相互作用が糖尿病腎の線維化を惹起する可能性を示した。さら

に、DPP-4 が TGF-beta/smad を活性化し EndMT を誘導する詳

細な分子機構を解明するために、DPP-4 と integrin beta1 の相互作用が TGF-beta/smad 刺激伝達機構、EndMT を誘導する可能性を探索した。前述の STZ 誘導 1 型糖尿病 CD-1 マウスの糸球体硬化・腎線維化(STZ 投与後 6 ヶ月)は、STZ 投与後 5 ヶ月からの linagliptin 投与により有意に改善し、TGF  $\beta$  受容体、DPP-4 および integrin beta1 の蛋白および、integrin beta1 リン酸化抑制を伴った。DPP-4 および integrin beta1 はともに糖尿病腎内皮細胞において強発現していた (図 6)。

#### 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 9 件)

- ① Nitta K, Shi S, Nagai T, Kanasaki M, Kitada M, Srivastava SP, Haneda M, Kanasaki K, Koya D. Oral Administration of N-Acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline Ameliorates Kidney Disease in Both Type 1 and Type 2 Diabetic Mice via a Therapeutic Regimen. *Biomed Res Int*. 2016;2016:9172157. doi: 10.1155/2016/9172157. 査読有
- ② Shi S, Kanasaki K, Koya D. Linagliptin but not Sitagliptin inhibited transforming growth factor-beta2-induced endothelial DPP-4 activity and the endothelial-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Feb 26;471(1):184-90. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.154. 査読有
- ③ Shi S, Koya D, Kanasaki K. Dipeptidyl peptidase-4 and kidney fibrosis in diabetes. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2016 Feb 13;9:1. doi: 10.1186/s13069-016-0038-0. 査読有
- ④ Shi S, Srivastava SP, Kanasaki M, He J, Kitada M, Nagai T, Nitta K, Takagi S, Kanasaki K, Koya D. Interactions of DPP-4 and integrin beta1 influences endothelial-to-mesenchymal transition. *Kidney Int*. 2015 Sep;88(3):479-89. doi: 10.1038/ki.2015.103. 査読有
- ⑤ Nagai T, Nitta K, Kanasaki M, Koya D, Kanasaki K. The biological significance of angiotensin-converting enzyme inhibition to combat kidney fibrosis. *Clin Exp Nephrol*. 2015 Feb;19(1):65-74. doi: 10.1007/s10157-014-1000-3. 査読有
- ⑥ Nagai T, Kanasaki M, Srivastava SP, Nakamura Y, Ishigaki Y, Kitada M, Shi S, Kanasaki K, Koya D. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline inhibits diabetes-associated kidney fibrosis and endothelial-mesenchymal transition. *Biomed Res Int*. 2014;2014:696475. doi: 10.1155/2014/696475. 査読有
- ⑦ Kanasaki K, Nagai T, Nitta K, Kitada M, Koya D. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline: a valuable endogenous anti-fibrotic peptide for combating kidney fibrosis in diabetes. *Front Pharmacol*. 2014 Apr 14;5:70. doi: 10.3389/fphar.2014.00070 査読有
- ⑧ Kanasaki K, Shi S, Kanasaki M, He J, Nagai T, Nakamura Y, Ishigaki Y, Kitada M, Srivastava SP, Koya D. Linagliptin-mediated DPP-4 inhibition ameliorates kidney fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by inhibiting endothelial-to-mesenchymal

transition in a therapeutic regimen.  
Diabetes. 2014 Jun;63(6):2120-31.  
doi: 10.2337/db13-1029. 査読有

- ⑨ Srivastava SP, Koya D, Kanasaki K.  
MicroRNAs in kidney fibrosis and  
diabetic nephropathy: roles on EMT and  
EndMT. Biomed Res Int.  
2013;2013:125469. doi:  
10.1155/2013/125469. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 永井貴子、Swayam Prakash Asrivastava、  
金崎啓造、古家大祐. 糖尿病腎線維化  
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  
microRNA クロストーク 第 30 回日本糖  
尿病合併症学会 2015 年 11 月 27 日 名  
古屋 ウィンク愛知 (愛知県名古屋市)
- ② Kanasaki K, Shi s, Kanasaki M, Koya D.  
The interaction between DPP-4 and  
integrin beta1 regulates the  
signaling responsible for induction  
of the endothelial to mesenchymal  
transition in diabetic kidney. 57<sup>th</sup> ADA  
Meeting 2015, June 5th Boston USA
- ③ Koya D. The role of autophagy in  
diabetic nephropathy. KSBMB  
International Conference 2015 May  
14th COEX (Seoul, Korea)
- ④ 古家大祐、金崎啓造、北田宗弘. 腎  
fibrosis をターゲットとした糖尿病腎  
症の治療戦略 第 58 回日本糖尿病学会  
2015 年 5 月 23 日 海峡メッセ下関 (山  
口県下関市)

[その他]

<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~endocrin/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古家 大祐 (KOYA, Daisuke)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 70242980

### (2) 研究分担者

金崎 啓造 (KANASAKI, Keizo)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 60589919

金崎 めぐみ (KANASAKI, Megumi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 50599355