

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860118

研究課題名(和文)トランスグルタミナーゼを標的とした糖尿病性腎症治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of anti-diabetic nephropathy drug targeting for transglutaminase

研究代表者

水野 智博(MIZUNO, Tomohiro)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：40711669

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)：本研究において、我々は終末糖化産物(AGEs)によるトランスグルタミナーゼ2(TG2)発現増加メカニズムについて、検討を行った。我々は、ヒト尿細管細胞において、AGEsがNF- $\kappa$ Bの活性化を介してTG2発現を増加させることを明らかにした。この増加は、AGEs受容体阻害薬によって抑制された。以上の結果から、AGEsは、AGEs受容体に結合し、NF- $\kappa$ Bの活性化を介してTG2を増加させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the mechanism of increasing the expression of transglutaminase 2 (TG2) induced by advanced glycation endproducts (AGEs). In human renal tubular cells, we elucidated that AGEs increased the expression of TG2 via activation of NF- $\kappa$ B. This increasing was inhibited by inhibitor of receptor for AGEs (RAGE). These results suggested that AGEs binds to RAGE and increases the expression of TG2 via activation of NF- $\kappa$ B.

研究分野：医療系薬学

キーワード：終末糖化産物 トランスグルタミナーゼ2

## 1. 研究開始当初の背景

トランスグルタミナーゼ 2 (TG2) は、生体内に広範に存在する酵素であり、蛋白質間のグルタミン残基とリジン残基との間にイソペプチド結合を形成させ、架橋化反応を触媒する。この反応によって、コラーゲンを含む基質タンパクが安定化する他、死細胞内容物の架橋化流出阻害に貢献する。しかしながら、疾患における機能面での寄与については、不明な点が多かった。近年、腎領域において TG2 の機能的役割の解明が進んできている。特に、糖尿病性腎症における TG2 の関与について、複数報告されており、1 型糖尿病モデルラット<sup>1</sup>およびヒト腎組織<sup>2</sup>にて、TG2 発現増加に伴い、糸球体もしくは尿細管での細胞外マトリックスの発現増加が確認されている。また、尿細管細胞では、高血糖下で TG2 発現が増加し、細胞外マトリックス産生増加が認められる<sup>3</sup>。糖尿病患者では、高血糖状態が長期継続することで、グルコース代謝物や終末糖化産物 (AGEs) 生成され、TGF- $\beta$  や増殖因子の産生を促し、糖尿病性腎症の発症・進展に関与する。高濃度グルコース下で TG2 の発現が増加するという報告はされているが<sup>3</sup>、グルコースの代謝物であり、より強力に酸化ストレスを惹起する AGEs が TG2 発現に与える影響は不明であった。AGEs の活性メカニズムへの関与も明らかにされていなかった。糖尿病性腎症において、どのように TG2 の発現変化および活性化が惹起されるのか、詳細なメカニズムは不明であった。

## 2. 研究の目的

ヒトメサンギウム細胞および尿細管細胞における TG2 発現に、AGEs および ACH が与える影響について検討した。

## 3. 研究の方法

ヒトアルブミンを用い、AGEs および AGEs にコレステロールを結合させたモデルタンパク (ACH) を作成し、ヒトメサンギウム細胞および尿細管細胞に対して、刺激実験を行った。経時的、濃度依存的な反応性を確認するため、AGEs、ACH は、それぞれ 1.25、2.5、3.75 mg/mL の濃度にて、24 時間刺激を行った。その後、2.5 mg/mL の濃度にて、0、6、12、24 時間刺激を行い、リアルタイム RT-PCR 法を用いて、TG2 の発現変化について解析を行った。

タンパクレベルでの発現変化を確認するため、免疫組織学的手法を用い、AGEs 刺激後の TG2 を蛍光染色し、オールインワン顕微鏡 (キーエンス社) を用い、画像を取得した。取得した画像は、Image express (モレキュラーデバイス社) を用い、画像解析を行った。すなわち、任意の 20 視野における細胞あた

りの TG2 発現面積および強度を算出し、Control 群と AGEs 刺激群間にて比較を行った。

AGEs による TG2 発現メカニズムに NF- $\kappa$ B および AGEs 受容体 (RAGE) が関与しているか否か検討するため、NF- $\kappa$ B 阻害薬 (10, 50  $\mu$ M) および RAGE 阻害薬 (10  $\mu$ g/mL) 処置下にて、AGEs 刺激実験を行い、TG2 発現に与える影響を検討した。尚、NF- $\kappa$ B および RAGE 阻害薬の対照群には相当量の DMSO を加えた。

統計解析は、SPSS statistics ver. 22 を用い実施した。独立 2 群間における比較は、Student-t test を用いた。多群間での比較は一元配置分散分析を実施した後、Scheffe test を行った。データは平均値  $\pm$  標準誤差で明示し、危険率が 0.05% 以下の場合を有意差有りとした。

## 4. 研究成果

当初の研究計画では、抗 TG2 薬を作製し、*in vivo* における抗糖尿病薬としての有効性を検討する予定であったが、共同研究者より有望な薬剤が報告されたことにより、開発を中断し、AGEs による TG2 発現増加メカニズムの解明を行った。

ヒトメサンギウム細胞では、AGEs、ACH 刺激による TG2 の発現変化は認められなかった (データ示さず)。一方、ヒト尿細管細胞では、AGEs および ACH 刺激により、TG2 の発現が増加した (図 1, 2)。上記理由として、TG2 の発現量としては、メサンギウム細胞に比して、尿細管細胞で多いこと、AGEs に対する反応性の違いが挙げられる。糖尿病患者において、尿中アルブミンに暴露される機会は、尿細管細胞の方が多いため、以降の実験はヒト尿細管細胞を用いて実施した。また、AGEs と ACH に対する反応性は同程度であったことから、コレステロールを結合させたことによる影響は軽微であると考え、以降の実験について、AGEs を用いて実施した。

先行研究により、AGEs が RAGE へ結合することで、NF- $\kappa$ B 関連シグナルが増大し、各種炎症性サイトカイン等の発現が促されることが示されている。また、腎臓領域以外では、NF- $\kappa$ B 関連シグナルが TG2 発現に関与することが報告されている。そこで、申請者は、それらのシグナル応答は、TG2 の発現にも関していると仮定し、検討を行った。

尿細管細胞における TG2 発現増加は、NF- $\kappa$ B 阻害薬存在下にて、抑制された (図 3)。また、RAGE 阻害薬を用いた検討においても、TG2 発現抑制傾向を示した (図 4)。

以上の結果から、AGEs による TG2 発現増加メカニズムは、AGEs-RAGE 結合反応、NF- $\kappa$ B が関与していることが示唆された。本メカニズムの解明により、糖尿病性腎症の発症および進展における TG2 の関与が示唆された。

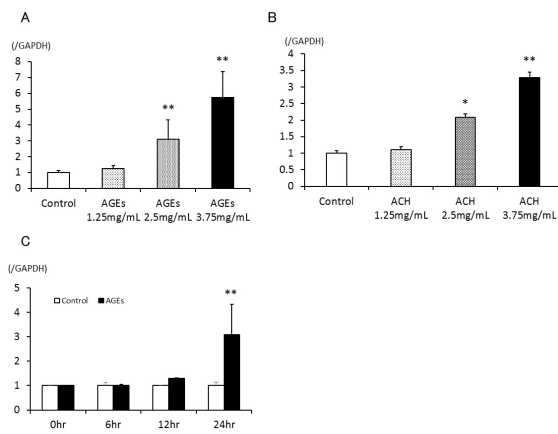


図 1. AGEs および ACH 刺激によるヒト尿細管細胞における TG2 発現変化  
AGEs (A) および ACH (B) による 24 時間刺激後の濃度依存的な TG2 発現変化を示す。リアルタイム RT-PCR 法を用いて、TG2mRNA 発現について、解析を行った。AGEs による経時的な TG2 発現変化 (C) も示す。  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs Control (Scheffe test) .

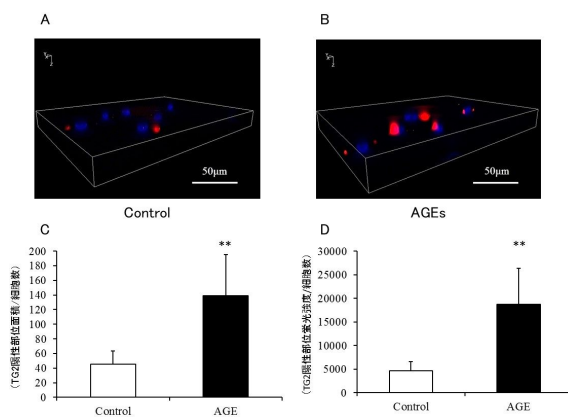


図 2. AGEs 刺激によるヒト尿細管細胞における TG2 発現変化  
AGEs による 24 時間刺激後を行い、タンパクレベルでの TG2 発現変化を示す。図 A, B において、青色部分は細胞核、赤色部分は TG2 陽性部位を示す。画像解析により任意の 20 視野における細胞あたりの TG2 発現面積 (図 C) および蛍光強度 (図 D) を算出した。  
\*\*  $p < 0.01$  vs Control (Student-t test) .

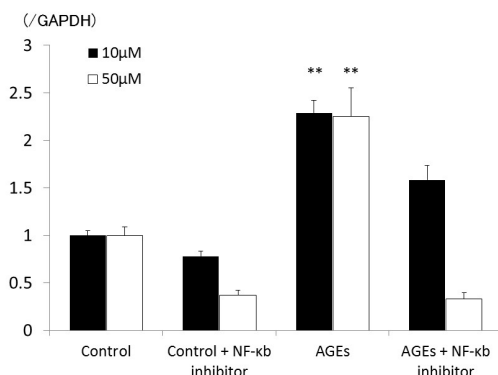


図 3. NF- $\kappa$ B 阻害薬存在下におけるヒト尿細管細胞における TG2 発現変化  
NF- $\kappa$ B 阻害薬 (10, 50  $\mu$ M) 処置下にて、AGEs 刺激実験を行い、TG2 発現に与える影響を検討した。尚、NF- $\kappa$ B 阻害薬の対照群には相当量の DMSO を加えた。リアルタイム RT-PCR 法を用いて、TG2mRNA 発現について解析を行った。  
\*\*  $p < 0.01$  vs Control (Student-t test)

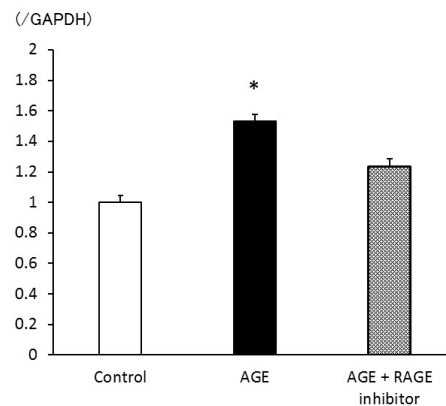


図 4. RAGE 阻害薬存在下におけるヒト尿細管細胞における TG2 発現変化  
RAGE 阻害薬 (10  $\mu$ g/mL) 処置下にて、AGEs 刺激実験を行い、TG2 発現に与える影響を検討した。尚、RAGE 阻害薬の対照群には相当量の DMSO を加えた。リアルタイム RT-PCR 法を用いて、TG2mRNA 発現について解析を行った。  
\*  $p < 0.05$  vs Control (Student-t test)

#### < 引用文献 >

1. Skill NJ et al. Increases in renal epsilon-(gamma-glutamyl)-lysine crosslinks result from compartment-specific changes in tissue transglutaminase in early experimental diabetic nephropathy: pathologic implications. Lab Invest. 2001; 81:705-716.
2. El Nahas AM et al. Elevated epsilon-(gamma-glutamyl)lysine in human diabetic nephropathy results from increased expression and cellular release of tissue transglutaminase. Nephron Clin Pract. 2004; 97: 108-117.
3. Skill NJ et al. Inhibition of transglutaminase activity reduces extracellular matrix accumulation induced by high glucose levels in proximal tubular epithelial cells. J Biol Chem. 2004; 279:47754-47762.

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2件)

水野智博、高橋和男、寺尾勇紀、秋山真一、丸山彰一、辰川英樹、人見清隆、永松 正、湯澤由紀夫：終末糖化産物は、ヒト尿細管細胞にて、トランスグルタミナーゼ2の発現を増加させる。第57回日本腎臓学会学術総会(2014年)

寺尾勇紀、水野智博、高橋和男、秋山真一、丸山彰一、辰川英樹、人見清隆、湯澤由紀夫、永松 正：終末糖化産物は、ヒト尿細管細胞にて、トランスグルタミナーゼ2の発現を増加させる。日本薬学会第135年会(2015年)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野智博 (MIZUNO, Tomohiro)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：40711669