

令和元年6月17日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09636

研究課題名(和文) 内皮細胞特異的分子エンドカンによる糖尿病性腎症治療法構築のための基盤研究

研究課題名(英文) A Basic Research for Constructing a Treatment for Diabetic Kidney Disease by Endocan, a Endothelial specific molecule.

研究代表者

桑原 篤憲 (Kuwabara, Atsunori)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50368627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：合成エンドカンと糖鎖のないエンドカン(糖鎖欠損型)を腎臓由来の培養細胞に発現させた。これらをその細胞の上清から集めた。これらは、腎系球体内皮細胞や腎メサンギウム細胞(腎系球体に存在する特殊な細胞)に対して、細胞増殖、細胞死、細胞遊走、血管新生に影響を与えなかった。血管内皮増殖因子との共刺激によっても、影響を与えなかった。一方、NOシグナルが低下した場合、血管内皮細胞でのエンドカンの発現は増加しなかったが、酸化ストレスが亢進した場合、エンドカンの発現が増加した。血管内皮特異的にエンドカンの遺伝子を過剰発現させるマウスを作成しようとしたが遺伝子の発現量が低く、実験に用いることが出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エンドカンは血管内皮細胞で作られ、可溶性の特殊な構造をもつ糖とタンパク質の複合体である。その血中レベルは敗血症の重症度と相関し、内皮障害の信頼できるバイオマーカーと考えられている。慢性腎臓病患者では、エンドカンの血中濃度が増加し、エンドカンの増加は心血管イベント発症と相関することが報告されている。この研究では、エンドカン発現増加には血管内皮細胞への一酸化窒素によるシグナル低下よりも酸化ストレス亢進の方が大きく影響していることを明らかにした。エンドカンが、酸化ストレスが亢進している糖尿病性腎症の治療標的となる可能性があり、社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Synthetic endocan and endoglycan without glycan (glycan deficient type) were expressed in cultured cells from kidney. These were collected from the supernatant of the cells. These did not affect cell proliferation, cell death, cell migration, or angiogenesis on renal glomerular endothelial cells or renal mesangial cells (special cells present in renal glomeruli). Costimulation with vascular endothelial growth factor also had no effect. On the other hand, when the NO signal decreased, endocan expression did not increase in vascular endothelial cells, but when oxidative stress increased, endocan expression increased. We tried to create a mouse that overexpresses endocan gene specifically in the vascular endothelium, but the gene expression level was too low to use in experiments.

研究分野：腎臓病学

キーワード：糖鎖異常 系球体内皮 糖尿病性腎症 血管新生 糖タンパク デルマタン硫酸

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 , CK - 19 ( 共通 )

#### 1 . 研究開始当初の背景

エンドカン, は主に肺・腎臓組織の内皮細胞で発現しているデルマタン硫酸プロテオグリカンである. このエンドカンの発現は, 炎症性サイトカイン, 血管新生前駆分子等によって増加する. エンドカンは慢性腎臓病患者や糖尿病患者において腎機能低下と共に血中濃度が上昇し, 心血管病の発症リスクと正の相関関係がある. 一方, 糖尿病患者において, 血糖コントロールの改善とともに低下する.

#### 2 . 研究の目的

本研究は「糖鎖欠損型エンドカンの糖尿病性腎症に対する治療効果を検討する」ことを目的に行った. 具体的には以下の2項目を本研究の目的とした.

- I. 糖鎖型/糖鎖欠損型エンドカンの系球体内皮細胞/メサンギウム細胞に対する特性を検討すること
- II. エンドカン過剰発現マウスおよび糖鎖欠損エンドカン過剰発現マウスを作成すること

#### 3 . 研究の方法

##### I. 合成エンドカン/糖鎖欠損型エンドカンの系球体内皮細胞に対する効果の検討

###### (1) エンドカン/糖鎖欠損型エンドカンの精製

HEK293 細胞に糖鎖型エンドカン発現プラスミド, または糖鎖欠損型エンドカン発現プラスミドを遺伝子導入試薬 Lipofectamine 3000 を用いて遺伝子導入した. 48 時間培養後, 上清に分泌されたエンドカンを回収した. 回収した上清はフィルター濾過, 遠心分離後, イオン交換クロマトグラフィーで精製した.

###### (2) 系球体内皮細胞およびメサンギウム細胞に対する効果の検討

系球体内皮およびメサンギウム細胞に対するエンドカンの役割が, デルマタン硫酸糖鎖の有無により違いが生じるのかを培養系球体内皮細胞 (hGEnC) / 培養メサンギウム細胞 (MES) と, 合成糖鎖型エンドカン/合成糖鎖欠損型エンドカンを用いて検討した. 分離精製したエンドカンを hGEnC, MES の培養液に添加し, 増殖 Assay, 血管新生 Assay, Apoptosis に対する反応の解析を行った. Recombinant エンドカン (糖鎖無し) も購入し, 実験を行った.

###### (3) Endocan の内皮細胞に対する直接的影響

Recombinant Endocan を作成後, Endocan 濃度を調節 (0, 1, 10 ug/mL) し, ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC), ヒト腎系球体血管内皮細胞 (hGEnC) に添加し, 細胞増殖, 細胞死, 細胞遊走, 血管新生につき検討した. Endocan の糖鎖の影響を調べるため, 糖鎖結合部位のセリンをアラニンに置換した糖鎖不全 Endocan (S137A) を作成し, 同様に検討した.

###### (4) 一酸化窒素 (NO) シグナルが, Endocan の発現に及ぼす影響

HUVEC を用い, NO donor, NOS 阻害薬, SGC inhibitor, PKG inhibitor, で 24 時間刺激を行い, Endocan の発現変化を検討した. また, 転写調節部位を特定するため, Endocan プロモーター (-4000~+50 bp) 下流に Luciferase 遺伝子を挿入し, レポーターアッセイを行った.

##### II. エンドカン/糖鎖欠損型エンドカン過剰発現マウスの作成とその確認

内皮特異的ドキシサイクリン調節性エンドカン過剰発現マウスを作成のため, Jackson-Lab より VEcadherin-tTA 過剰発現マウスを購入した.

#### 4 . 研究成果

エンドカンの糖鎖結合部位のアミノ酸の遺伝子に一塩基遺伝子変異を入れることで他のアミノ酸に置換し, 糖鎖の結合しない糖鎖欠損型エンドカン (S137A) を作成した. HEK293 細胞に糖鎖型/非糖鎖型エンドカン発現 plasmid を導入し, 分泌型エンドカンを培養上清より回収した.

Recombinant エンドカンは, hGEnC, MES のいずれの細胞に対しても, 細胞増殖, 細胞死, 細胞遊走, 血管新生に影響を与えなかった. HEK 細胞で合成した糖鎖不全エンドカン (S137A) も, 糖鎖不全のないエンドカンも同様に, 細胞増殖, 細胞死, 細胞遊走, 血管新生に影響を与えなかった. In vitro において, エンドカン単独では内皮細胞, メサンギウム細胞へは何ら影響を及ぼさないことが判明した. VEGF との共刺激による血管新生 Assay も行ったが, 合成糖鎖型エンドカン/合成糖鎖欠損型エンドカンいずれも作用に差がなかった.

Jackson-Lab より購入した VEcadherin-tTA 過剰発現マウスの tTA 発現量が低く, 実験に用いることが出来なかった. また, TRE-エンドカン過剰発現マウスも 2 系統しか出来ず, いずれも遺伝子導入数が十分でなく, 内皮特異的ドキシサイクリン調節性エンドカン過剰発現マウスの作成が困難であった.

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 6件)

<発表者名> Minoru Satoh.

<発表標題> Endothelial dysfunction in CKD and CVD.

<学会等名> ISN Frontiers Meetings (国際学会)

<発表年> 2018年

<発表者名> 佐藤稔、花田里美、桑原篤憲、長洲一、城所研吾、角谷裕之、佐々木環、柏原直樹

<発表標題> 内皮障害マーカーであるエンドカンの発現調節機構の検討

<学会等名> 第30回腎とフリーラジカル研究会

<発表年> 2018年

<発表者名> 佐藤稔、花田里美、桑原篤憲、長洲一、城所研吾、佐々木環、柏原直樹

<発表標題> 内皮由来可溶性糖タンパクであるエンドカンの内皮細胞へ作用の検討

<学会等名> 第60回日本腎臓学会学術総会

<発表年> 2017年

<発表者名> 花田里美、佐藤稔、桑原篤憲、長洲一、城所研吾、板野精之、内田篤志、十川裕史、佐々木環、柏原直樹

<発表標題> 内皮由来可溶性糖タンパクであるエンドカンの発現調節機構の検討

<学会等名> 第60回日本腎臓学会学術総会

<発表年> 2017年

<発表者名> 佐藤稔、花田里美、桑原篤憲、柏原直樹

<発表標題> 内皮由来可溶性糖蛋白質エンドカンの内皮細胞へ作用の検討

<学会等名> 第21回日本心血管内分泌代謝学会学術総会

<発表年> 2017年

<発表者名> 佐藤稔、花田里美、桑原篤憲、柏原直樹

<発表標題> 内皮由来可溶性糖タンパク質エンドカンの発現調節機構の検討

<学会等名> 第21回日本心血管内分泌代謝学会学術総会

<発表年> 2017年

〔図書〕(計 0件)

〔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:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 柏原 直樹

ローマ字氏名:(KASHIHARA, naoki)

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：10233701

研究分担者氏名：佐藤 稔

ローマ字氏名：( SATOH, minoru )

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70449891

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。