

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08210

研究課題名(和文) 血管新生促進因子Vasohibin-2を標的とした慢性腎臓病の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of Vasohibin-2-targeting therapy against chronic kidney disease

研究代表者

田邊 克幸 (Tanabe, Katsuyuki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40534805

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)：本研究は腎疾患における新規の血管新生制御因子Vasohibin-1及びVasohibin-2の発現の不均衡が及ぼす影響を検討した。動物実験により、腎臓では、特にポドサイトにおいてVasohibin-1が微小管-チューブリンの脱チロシン化を制御し、糸球体濾過機能の維持に関与することが示された。また、Vasohibin-2発現の減少は、急性の腎障害過程では炎症細胞浸潤と尿細管細胞傷害を増悪させることが示された。このようなVasohibin-1とVasohibin-2の腎臓における新たな役割の解明により、腎疾患に対する治療標的としての可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は未だ有効な治療法が確立されていない糖尿病性腎症や腎線維化のような病態において、血管の形態・機能の制御にかかわる新たな蛋白質であるVasohibin-1とVasohibin-2の発現の不均衡が及ぼす影響を検討した。Vasohibinは微小管蛋白の修飾に関与することが知られているが、腎臓ではVasohibin-1がポドサイトでその役割を担うことを示した。また、Vasohibin-2の欠乏は急性の腎障害において炎症を増強させることを示し、Vasohibin-1とVasohibin-2の発現が腎疾患の治療の標的となる可能性が証明された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effects of imbalance between Vasohibin-1 and Vasohibin-2 expression in kidney diseases. Based on our animal experiments, Vasohibin-1 regulated detyrosination of microtubule -tubulin in podocytes and was involved in the maintenance of glomerular filtration barrier. In addition, Vasohibin-2 deficiency promoted inflammatory infiltration in the kidney during acute injury processes. Taken together, this study demonstrated that Vasohibin-1 and Vasohibin-2 expression could be novel therapeutic target in kidney diseases.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病 ポドサイト 腎線維化 Vasohibin

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) は、末期腎不全とともに心血管疾患の危険因子として主張されているが、その人口は本邦で 1300 万人以上と推計されており、成人人口の 8 人に 1 人という国民病となっている。CKD から末期腎不全に至り透析療法を必要とする患者数は、本邦で既に 34 万人を超えており、CKD に関連する心血管合併症の増加を考えると、その進展を抑制する戦略の開発は国家的な課題である。日本透析医学会によれば透析導入の原疾患として慢性糸球体腎炎が減少する一方、糖尿病性腎症はなお第 1 位であり、第 3 位の腎硬化症は原疾患の中で唯一増加を続けている。従って、糖尿病性腎症と腎硬化症の進展抑制は、CKD 全体の進行の大きな抑制につながることになる。組織学的に、糖尿病性腎症は糸球体毛細血管増生とメサンギウム基質増加を特徴とするのに対して、腎硬化症は傍尿細管毛細血管 (PTC) 減少と尿細管萎縮・間質線維化を示すことから、正常毛細血管の保護と線維化進展の抑制は、これら病態の異なる疾患に共通した治療戦略となり得る。

Vasohibin-1 (VASH1) は、内皮細胞由来の血管新生抑制因子として同定され、抗腫瘍効果を持つが、血管内皮細胞のストレス耐性を増大することで既存の血管に対しては内皮保護因子として作用することも示されている。我々は、VASH1 の過剰発現がマウス糖尿病性腎症及び腎線維化モデルで治療効果を発揮し、逆に VASH1 ノックアウト (KO) マウスは各病態を増悪させることを認めており、VASH1 は内皮細胞のみならずポドサイトや尿細管上皮細胞に直接的な保護効果を持つことを報告した。一方、VASH2 は VASH1 の homologue として同定されたが、VASH1 とは対照的に血管新生促進効果を有する。近年、VASH2 は腫瘍細胞で TGF- β シグナルを増幅し、上皮間葉転換 (EMT) を誘導することが報告された。我々は、腎臓での内因性 VASH2 がメサンギウム細胞及び間質線維芽細胞に発現し、VASH2 KO マウスでの糖尿病の誘発は野生型マウスと比較して蛋白尿と糸球体病変の軽減につながることを認め、VASH2 は糸球体毛細血管増生とメサンギウム基質増加に関与し得ることを示した。また、急性腎障害マウスやヒト腎生検組織で、VASH2 発現は傷害尿細管に誘導されることを認めた。線維芽細胞に加えて、尿細管上皮細胞での持続的な VASH2 発現は、上記の TGF- β シグナル亢進と EMT を介して腎線維化を促進する可能性がある。

更に近年、VASH1 及び VASH2 は癌細胞や神経細胞において微小管を構成する α -チューブリンの脱チロシン化を制御する酵素として作用することが報告されており、腎臓における微小管 α -チューブリンの脱チロシン化も VASH1 及び VASH2 によって制御されている可能性があるが、腎臓の脱チロシン化 α -チューブリンの発現意義はこれまでに検討されていない。

以上の知見より、生理的状态における VASH1 優位から VASH2 優位へと移行する VASH1/2 不均衡が、腎線維化などの病態を促進し、そのような不均衡は腎臓における微小管 α -チューブリンの脱チロシン化を変化させ、VASH2 優位を抑制する治療が腎疾患に対する新規の戦略となる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、腎臓における VASH1/VASH2 発現の不均衡が、マウス糸球体の微小管 α -チューブリン脱チロシン化の変化を介した蛋白尿の増加を引き起こすとともに、腎尿細管間質傷害の動物モデルにおける病変を増悪させるかを検討し、更に、抗 VASH2 療法としての VASH2 ペプチドワクチンによる治療の実行可能性について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) VASH1/VASH2 発現の不均衡が糸球体脱チロシン化 α -チューブリンの発現に及ぼす影響の検討

C57BL/6J 系統の雄性野生型マウス、Vash1^{-/-}マウス、Vash2^{-/-}マウスより腎臓を摘出し、凍結切片を作成して、脱チロシン化 α -チューブリンに対する特異的抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。糸球体の構造的変化は、パラフィン包埋切片を用いて光学顕微鏡また、これらのマウスの表現型を決定するために、採血、代謝ケージでの蓄尿を行った。

糸球体ポドサイトの微小管 α -チューブリン脱チロシン化における VASH1 の役割を検討するために、ヒト由来不死化ポドサイトを RPMI-1640 培地 (+10%FBS+ITS) 中で培養し、33 で増殖させ、37 で分化させた後に VASH1 に対する siRNA のトランスフェクションを行い、脱チロシン化 α -チューブリンの発現を western blot にて評価した。

(2) VASH2 発現の尿細管障害及び腎線維化における役割についての検討

C57BL/6J 系統の雄性野生型マウスと Vash1^{+/-}マウスに 20mg/kg のシスプラチンを単回腹腔内投与し、シスプラチン腎症を誘発した。また、同様の野生型マウスと Vash2^{-/-}マウスに両側腎臓の虚血再灌流処置を行い、急性腎障害を誘発した。各々の実験系で 72 時間後と 24 時間後に腎臓を摘出し、尿細管障害についての評価を行った。

C57BL/6J 系統の雄性野生型マウスと Vash2^{-/-}マウスを用いて、麻酔下での左尿管の結紮により片側尿管結紮 (UUO) による腎線維化モデルを作成した。UUO モデルの作成から 7 日後に腎臓を摘出して、腎線維化の程度についてパラフィン包埋切片での Masson-trichrome 染色標本を用いて画像解析により評価した。また、腎尿細管間質へのマクロファージの浸潤については凍結切片を用いて抗 F4/80 抗体を用いた免疫組織化学を行い、単位面積当たりの陽性細胞数として評価した。

(3) 抗 VASH2 療法としての VASH2 ペプチドワクチン療法の糖尿病性腎症モデルにおける実行可能性の検討

8 週齢雄性野生型マウスに 50mg/kg の streptozotocin を 5 日間連日で腹腔内投与することで糖尿病モデルを作成した。4 週後に高血糖を確認してから、VASH2 ペプチドワクチンを皮下投与し、更に 2 週後に皮下投与を追加した。初回の VASH2 ペプチドワクチン投与から 4 週及び 8 週後に尾静脈より微量採血を行って血清を分離し、VASH2 ペプチドをコーティングした ELISA プレート系を使用して血清中の抗 VASH2 抗体価の測定を行った。

4. 研究成果

(1) VASH1/VASH2 発現の不均衡が糸球体脱チロシン化 α -チューブリンの発現に及ぼす影響の検討

C57BL/6J 系統野生型マウスの腎臓におけるチロシン化及び脱チロシン化 α -チューブリンの発現を免疫蛍光染色により評価したところ、チロシン化 α -チューブリンの発現は主に尿細管上皮細胞に認められたのに対して、脱チロシン化 α -チューブリンの発現は主として糸球体、特にポドサイトに認められた(図1)。 α -チューブリン脱チロシン化への Vasohibin の効果を検討するために、VASH1 ノックアウトマウス及び VASH2 ノックアウトマウスの腎臓における脱チロシン化 α -チューブリンの発現を確認したところ、VASH2 ノックアウトマウスでは、糸球体の脱チロシン化 α -チューブリンの発現は野生型マウスと差がなかったのに対して、VASH1 ノックアウトマウスでは、糸球体の脱チロシン化 α -チューブリンの発現がほとんど消失していた(図1)。従って、腎臓、特に糸球体における微小管 α -チューブリンの脱チロシン化は VASH1 によって制御されていることが示された。

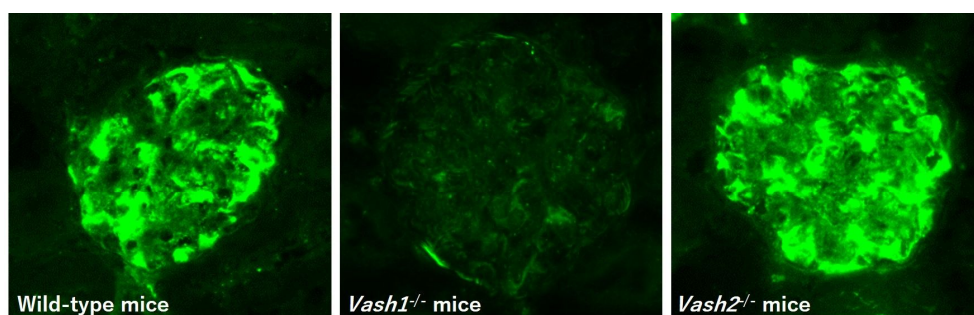


図1 糸球体における脱チロシン化 α -チューブリン発現

VASH1 の糸球体ポドサイトの微小管 α -チューブリンの脱チロシン化への直接的な効果を証明するために、ヒト由来不死化ポドサイトの培養を行い、ポドサイトでは未分化の増殖状態では α -チューブリンの脱チロシン化レベルが低い、分化に伴って脱チロシン化が促進されることが分かった。この分化した培養ポドサイトに VASH1 siRNA のトランスフェクションを行ったところ、Western blot にて確認された脱チロシン化 α -チューブリンの発現は有意に抑制された。このため、VASH1 はポドサイトの微小管 α -チューブリンの主たる脱チロシン化酵素であると考えられた。

このような VASH1 欠乏に伴うポドサイト微小管 α -チューブリンの脱チロシン化障害が糸球体の構造及び機能に影響を及ぼすかを確認するために、Vash1^{-/-}マウスの腎表現型を検討した。光学顕微鏡上、野生型マウスと Vash1^{-/-}マウスの糸球体には明らかな差は認められなかったが、Vash1^{-/-}マウスでは小さいが有意な尿中アルブミン排泄の増加が認められた。また、クレアチニンクリアランスは Vash1^{-/-}マウスで増加する傾向があったが、有意ではなかった。以上の結果から、VASH1 欠乏によるポドサイト微小管 α -チューブリンの脱チロシン化障害は、著明な糸球体構造の変化は引き起こさないが、ポドサイトの糸球体濾過障壁としての機能障害につながる可能性が示唆された。

(2) VASH2 発現の尿細管障害及び腎線維化における役割についての検討

腎臓における VASH1 及び VASH2 発現の意義を検討するために、Vash1^{+/-}マウスと Vash2^{-/-}マウスに各々シスプラチン腎症と虚血再灌流の急性腎障害モデルを作成し、尿細管傷害の評価を行った。いずれの場合も野生型マウスと比較して腎機能障害及び尿細管傷害は増悪したが、Vash1^{+/-}マウスでは有意な傍尿細管毛細血管喪失と ICAM1-発現の増加が認められ、より高度の炎症細胞浸潤と尿細管上皮傷害につながった。一方、VASH2 は傷害された尿細管上皮で発現が亢進し、Vash2^{-/-}マウスでは虚血再灌流後の腎臓内で傍尿細管毛細血管の減少とケモカイン発現の発現増加のために、尿細管傷害の増悪につながることを示唆された。これらの結果については、各々 American Journal of Physiology Renal Physiology 誌 (Tanimura S. et al. 2019) 及び International Journal of Molecular Science 誌 (Miyake H. et al. 2020) において論文での発表を行った。

次に、VASH1 の発現減少が腎線維化の増悪につながることを以前に報告していたが、VASH2 の発現減少が腎線維化に及ぼす影響について野生型マウスと VASH2^{-/-}マウスに UUO モデルを

作成して検討した。VASH2^{-/-}マウスの腎臓では野生型マウスと比較して UUO による腎線維化が増悪する傾向が認められた。また、腎尿細管間質へのマクロファージ浸潤は、VASH2^{-/-}マウスの方が有意に多く、上述の急性腎障害モデルに類似する結果であった。

(3) 抗 VASH2 療法としての VASH2 ペプチドワクチン療法の糖尿病性腎症モデルにおける実行可能性の検討

以前の報告から VASH2 欠損は糖尿病性腎症の動物モデルにおいて腎症の発生・進行を抑制することが示されているため、糖尿病性腎症に対する新規治療として抗 VASH2 療法が有効な可能性がある。このため、抗 VASH2 療法を行う手段として東北大学、大阪大学との共同研究として内因性抗 VASH2 抗体を産生するための VASH2 に対するペプチドワクチンを作成した。本研究では、この VASH2 ペプチドワクチンが糖尿病性腎症マウスモデルにおいて抗 VASH2 抗体の産生を誘導するかを確認し、抗 VASH2 療法の実行可能性について検討した。

Streptozotocin 投与により高血糖を確認されたマウスに対して、VASH2 ペプチドワクチンの皮下接種を 2 回行い、ELISA により血中抗 VASH2 抗体価の上昇を確認したところ、VASH2 ペプチドワクチンの非接種マウスでは抗 VASH2 抗体は検出されず、接種マウスでは初回接種から 4 週後に抗 VASH2 抗体価の上昇を認め、8 週後に 1:10,000 以上の抗 VASH2 抗体価が検出された(図 2)。従って、糖尿病性腎症のモデルマウスにおいて VASH2 ペプチドワクチン療法は実行可能であることが示されたが、ワクチン接種から 8 週目までに尿中アルブミン排泄の減少は認められず、有効な抗体価の上昇から VASH2 の作用抑制、更に腎障害の改善までには相当な時間を要すると考えられ、研究デザインの至適化が必要となる。

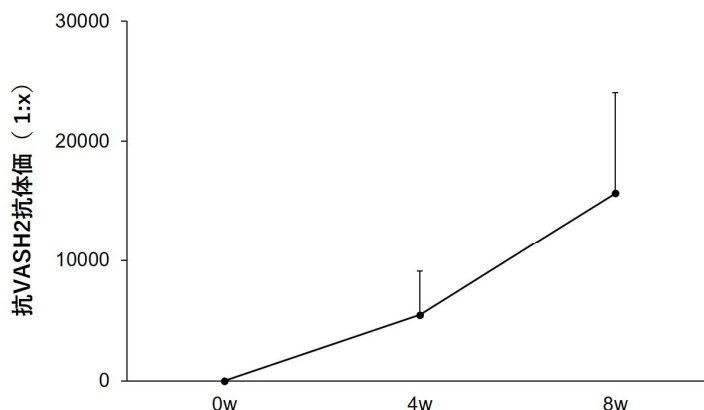


図2 ワクチン接種後の抗VASH2抗体価の推移

以上の結果から、腎臓においてポドサイトの微小管 -チューブリンの脱チロシン化は VASH2 ではなく VASH1 によって制御されており、VASH1 欠損によるポドサイト脱チロシン化 -チューブリン発現の減少は、軽度の尿中アルブミン排泄のようなポドサイトの濾過障壁としての機能異常につながるが、明らかな構造的変化はきたさないことが示された。また、腎臓における VASH2 の発現減少は急性の腎障害過程の動物モデルにおいて、腎傷害を増悪させ、炎症性サイトカインの発現と炎症細胞浸潤との増加につながることを示された。一方、腎線維化モデルである UUO マウスは比較的急性の経過を辿るため、他の急性腎障害モデルと同様に VASH2 の発現減少が炎症細胞浸潤の増悪につながったが、線維化への影響はより長期の腎線維化動物モデルにおいて検討する必要があると思われた。以上より、VASH1 及び VASH2 が腎疾患において担う新たな役割と治療標的としての可能性が示された。更に、糖尿病性腎症に対する抗 VASH2 療法は VASH2 ペプチドワクチンにより実施可能であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanabe Katsuyuki, Sato Yasufumi, Wada Jun	4. 巻 19
2. 論文標題 Endogenous Antiangiogenic Factors in Chronic Kidney Disease: Potential Biomarkers of Progression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19071859	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanimura Satoshi, Tanabe Katsuyuki, Miyake Hiromasa, Masuda Kana, Tsushida Keigo, Morioka Tomoyo, Sugiyama Hitoshi, Sato Yasufumi, Wada Jun	4. 巻 317
2. 論文標題 Renal tubular injury exacerbated by vasohibin-1 deficiency in a murine cisplatin-induced acute kidney injury model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F264 ~ F274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajprenal.00045.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyake Hiromasa, Tanabe Katsuyuki, Tanimura Satoshi, Nakashima Yuri, Morioka Tomoyo, Masuda Kana, Sugiyama Hitoshi, Sato Yasufumi, Wada Jun	4. 巻 21
2. 論文標題 Genetic Deletion of Vasohibin-2 Exacerbates Ischemia-Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21124545	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 森岡朋代, 田邊克幸, 谷村智史, 杉山斉, 佐藤靖史, 和田淳
2. 発表標題 vasohibin-1はポドサイトにおける微小管 α -tubulinの脱チロシン化を制御する
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Morioka T, Tanabe K, Tanimura S, Sugiyama H, Wada J
2. 発表標題 Vasohibin-1 is essential for the post-transcriptional modification of α -tubulin on microtubules in podocytes
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Morioka T, Tanabe K, Tanimura S, Sugiyama H, Sato Y, Wada J
2. 発表標題 Vasohibin-1 has α -tubulin detyrosinating activity in podocytes
3. 学会等名 The 9th Chronic Kidney Disease Frontier Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田邊克幸
2. 発表標題 腎疾患の進行におけるVasohibinの役割
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田邊克幸
2. 発表標題 Vasohibin-1及び2を標的とした糖尿病性腎症の治療戦略
3. 学会等名 第15回Vasohibin研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	佐藤 靖史 (Sato Yasufumi)	東北大学・未来科学技術共同研究センター・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------