

機関番号：37104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790824

研究課題名（和文） 色素上皮由来因子トランスジェニックマウスの糖尿病腎症保護効果

研究課題名（英文） Protective role of PEDF in transgenic diabetic nephropathy mouse.

研究代表者

松井 孝憲 (MATSUI TAKANORI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10425233

研究成果の概要（和文）：

糖尿病腎症の進展阻止が期待される蛋白質として色素上皮由来因子（Pigment epithelium-derived factor:以下 PEDF）に着目した。PEDF の抗酸化ストレス活性が腎症の初期病変を改善するのか検討するために、テトラサイクリン投与によりヒト PEDF の発現が誘導されるマウスを作製を試みた。

研究成果の概要（英文）：

Pigment epithelium derived factor (PEDF) is expected to lead to improved therapies for the treatment of diabetic nephropathy. To clarify whether PEDF improves early-stage diabetic nephropathy by antioxidative stress activities, production of transgenic mouse which express of PEDF is induced by tetracycline was attempted.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：血管細胞生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：糖尿病、シグナル伝達

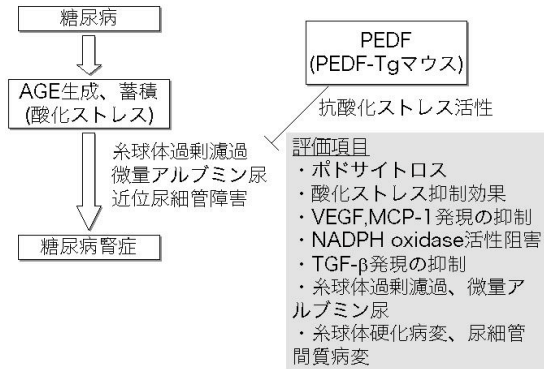
1. 研究開始当初の背景

我が国の糖尿病患者は年々増え続けており、平成18年において糖尿病が強く疑われる人は約820万人、可能性が否定できない人は約1,050万人、計約1,870万人と推定されている。これに伴って、糖尿病腎症を発症する患者数も増加しており、現在、糖尿病腎症は新規透析導入（14,000人/年）の原因疾患第一位となっており、糖尿病患者のQOL低下を招いている。したがって糖尿病腎症の進展機構を明らかにし、治療のために新しい原理を見出すことは、緊急に取り組まねばならない重要課題のひとつと言える。そこで我々は糖尿病腎症の進展阻止が期待される蛋白

質として色素上皮由来因子（Pigment epithelium-derived factor:以下 PEDF）に着目した。

近年、糖尿病血管合併症のメカニズムを考える上で注目を集めているのがI型糖尿病初期の血糖コントロールが不十分であると、その後厳格に血糖を管理できても合併症の進展を食い止めるのは難しくなる「高血糖の記憶」が存在しているという考えである。「高血糖の記憶」を説明する原因物質が、糖尿病状態で促進的に形成される終末糖化産物（Advanced glycation end-products:以下 AGE）である。AGEは高血糖状態で促進的に且つ不可逆的に生成されることから、AGE

病因仮説は「高血糖の記憶」という現象と最もよく符合する。



一方、我々が着目している PEDF は 1989 年にヒト網膜色素上皮細胞から単離された分子量約 50kDa の分泌性蛋白質で、酸化ストレスによる神経細胞傷害を抑制することが明らかにされ (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 1526-1530, 1993)、各主要臓器をはじめとして血中等様々な組織に存在することが報告された (Mol. Vis. 2(11), 1996)。我々は最近、PEDF が AGE のシグナルをブロックすることにより、血管内皮保護的に作用し糖尿病網膜症の初期病変である網膜周皮細胞の選択的消失のみならず血管透過性の亢進や血管閉塞を抑制しうることを見出した (J. Biol. Chem. 281, 20213-20220, 2006; Microvascular Res. 72, 86-90, 2006)。そこで糖尿病腎症においても同様に PEDF が AGE シグナルを阻害し、腎症の発症、進展を阻止すると期待された。

また、我々は AGE と腎症の関わりについても AGE が糸球体構成細胞上に存在する受容体 RAGE を介して細胞内酸化ストレスを惹起し、腎糸球体上皮細胞(ポドサイト)のアポトーシスを引き起こすこと、AGE が VEGF や MCP-1 の発現亢進を介して、糸球体過剰濾過や微量アルブミン尿の出現に関与することを明らかにした (J. Biol. Chem. 277, 20309-20315, 2002)。また、糖尿病腎症の予後決定因子である近位尿細管障害についても、AGE が酸化ストレスを亢進させることにより腎尿細管細胞を萎縮させる一方、虚血性、線維性変化を引き起こすと推定されている。我々は上記の糖尿病腎症における AGE 作用の根幹に及ぼす PEDF の効果を次のように見出している。1) PEDF が AGE による NADPH oxidase の活性化を抑え、細胞内酸化ストレスの産生亢進を抑制することと、2) PEDF が VEGF および MCP-1 の発現を抑えることである (Diabetologia 46, 284-287, 2003; Biochem. Biophys. Res. Comm. 296, 877-882, 2002; J. Mol. Cell. Cardiol. 37,

497-506, 2004)。以上の知見に基づき、我々は「PEDF は AGE シグナルをブロックすることで、糖尿病腎症の発症・進展を阻止できるのではないか」と期待するものである。

2. 研究の目的

糖尿病腎症で PEDF の影響を検討するために、まずヒト PEDF 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (PEDF-Tg マウス) を作成する。PEDF-Tg マウスにストレプトゾトシンを投与し、糖尿病腎症を発症させ以下の条件で検討する。糖尿病腎症に認められるポドサイトロスの鍵の一つは AGE 由来の酸化ストレスであり、上で述べたように我々は PEDF が酸化ストレスに対して抑制的に働くことを明らかにしてきた。そこで PEDF の抗酸化ストレス活性が腎症の初期及び後期病変を改善するのか、PEDF-Tg と野生型マウスで以下の項目を検討する。(1) アポトーシスによるポドサイトロスの抑制効果。(2) 酸化ストレス(細胞内活性酸素種)抑制の検討。(3) NADPH oxidase 活性の測定。(4) VEGF 遺伝子及び MCP-1 遺伝子発現の定量。(5) 糸球体過剰濾過や微量アルブミン尿の測定。以上、腎症の初期病変の検討と併せて腎症の後期病変が改善されるか、(6) 糸球体硬化病変や尿細管間質病変等の組織学的評価及び、(7) TGF-β の発現抑制について検討をおこなう。

3. 研究の方法

1. PEDF トランスジェニックマウス (PEDF-Tg マウス) の作製、確立 ヒト cDNA ライブラリーより PEDF 遺伝子を PCR にて単離し、発現ベクターに組み込んで、ヒト PEDF 発現プラスミドを構築する。得られたプラスミドを HEK293 細胞に導入して PEDF 蛋白質が発現することを確認する。プラスミドから CMV プロモーターとヒト PEDF の配列を含んだ遺伝子領域を切り出し、C57BL/6J JAX マウス前核期卵へマイクロインジェクションする。得られた PEDF 遺伝子導入卵をマウスに戻し、出産後、得られた産仔の尾部 DNA を用いて PEDF 遺伝子導入マウス (PEDF トランスジェニックマウス: 以下 PEDF-Tg マウス) のスクリーニングをおこない、複数の PEDF-Tg マウス系統を確立させる。得られた系統を以下に示す形態組織学および分子生物学的検討に供する。また、発現した PEDF レベルの指標となる血中 PEDF 濃度については、我々がすでに新しく開発した PEDF の ELISA 系を用いて定量をおこなうものとする。なお、一連の実験は、久留米大学医学部動物実験倫理委員会の承認を受けておこなうものとする。

I. 1 型糖尿病モデルの作製 クエン酸緩衝液で調整したストレプトゾトシン

(Streptozotocin:以下 STZ) 溶液を、野生型マウスおよび PEDF-Tg マウスの腹腔内に 100mg-STZ/体重 (g) で注射する。STZ により膵臓のβ細胞が破壊され、インスリンが分泌されなくなり、1 型糖尿病初期にみられる高血糖状態になる。48 時間後の血中グルコース濃度を測定し、血中グルコース濃度が 300mg/dl 以上を糖尿病発症とみなす。尚、対照実験としてクエン酸緩衝液を腹腔内注射した群を設ける。経時的に (約 5 ヶ月) 以下の項目について検討をおこなう。

II. 糖尿病腎症への効果

- ① 腎機能、腎重量、血圧などに及ぼす影響を検討する (1、3、5 ヶ月目)。
- ② 尿中微量アルブミン量、蛋白尿ならびに尿中ネフリン排泄や尿細管障害マーカー排泄に及ぼす影響を測定する (1、3、5 ヶ月目)。
- ③ 微量アルブミン尿の出現やポドサイトの障害には、酸化ストレスの産生や炎症反応に関わることが知られている。そこで、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の尿中排泄量や腎組織における VEGF、MCP-1 の発現を ELISA 法や real-time PCR ならびに immuno blot を用いて検討する (1、3 ヶ月目)。
- ④ 糸球体硬化症や尿管間質病変について、組織切片の染色後に該当領域の抽出および定量をコンピューター上で NIH-Image を用いて評価する。合わせてポドサイトロスの程度や足突起の癒合についても形態学的な検討を加える (3、5 ヶ月目)。
- ⑤ 糖尿病腎症の発症、進展との関与が指摘されている TGF-β の発現について、real-time PCR ならびに immuno blot で評価する (3、5 ヶ月目)。

4. 研究成果

テトラサイクリン依存的に PEDF の発現が誘導されるプラスミドベクターを構築した。Clontech 社の pTetOnAdvance (図 1) と pTRE-Tight システムを用いた。pTRE-Tight の multi cloning site にヒト PEDF 遺伝子を挿入した pTRE-Tight-PEDF を作製した (図 2)。テトラサイクリンにより PEDF 発現が誘導されるか、HEK293 細胞を用いて確認した。HEK293 細胞に pTRE-Tight-PEDF と pTetOnAdvance の両方を導入した細胞、pTRE-Tight-PEDF のみを導入した細胞、pTetOnAdvance のみを導入した細胞を準備し、培地にテトラサイクリンを加えた。24 時間後に培地を回収し、電気泳動に続いてウェスタンブロット法により、PEDF 蛋白の発現誘導を確認した。pTRE-Tight-PEDF と pTetOnAdvance の両方を導入した細胞のみで、テトラサイクリン依存的な PEDF 蛋白質の発現誘導が確認

できた。そこで、pTRE-Tight-PEDF と pTetOnAdvance マウス胚に注入した。注入の際に pTRE-Tight-PEDF は ApaLI を用いて制限酵素処理し、pTetOnAdvance は XhoI と HindIII を用いて制限酵素処理をおこなった。得られた DNA 鎖をマウス胚に注入したところヒト PEDF 遺伝子を有するマウスを作製する事が出来た。テトラサイクリン投与により PEDF の発現が誘導されるマウスを用いて、ストレプトゾトシン投与による糖尿病モデルを用いて糖尿病網膜症の抑制効果を確認することが可能になった。

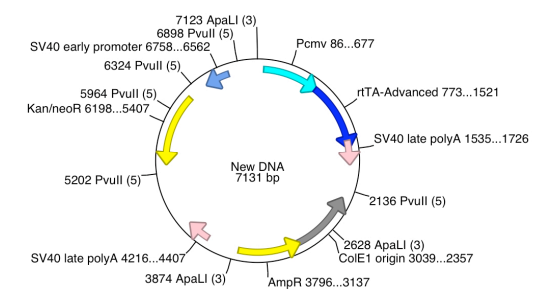


図 1 pTetOnAdvance プラスミドの構造模式図

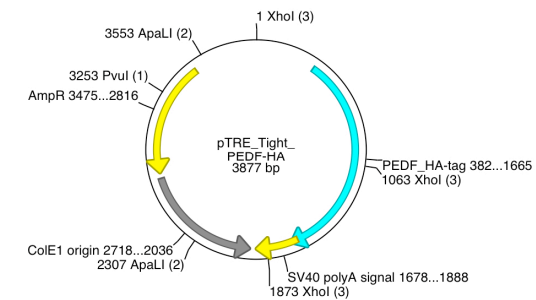


図 2 pTre-Tight-PEDF プラスミドの構造模式図

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 0 件)

〔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 :

出願年月日 :

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 孝憲 (MATSUI TAKANORI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10425233

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：