

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06854

研究課題名(和文) 糖尿病性腎臓病を増悪化させるジペプチジルペプチダーゼIII標的ペプチドの機能解析

研究課題名(英文) Analyses for molecular mechanisms of dipeptidyl peptidase III-targeted peptide that deteriorates diabetic kidney disease

研究代表者

清水 昭男 (Shimizu, Akio)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：30769279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチドをN末端側より2アミノ酸ずつ加水分解する酵素ジペプチジルペプチダーゼIII(DPPIII)が糖尿病における役割を解析した。DPPIII投与は腎機能障害の指標である尿中アルブミン量を、血糖値に変動なく有意に抑制できた。DPPIIIで分解される血中ペプチドを網羅的なペプチドーム解析で探索したところ、C3b補体に由来するペプチドを同定できた。このペプチドは糖尿病時におけるdb/dbマウスにおいて増加し、DPPIIIによって分解されることを同定した。この候補ペプチドがアナフィラトキシン作用を有しており血管内皮細胞に対してRhoAを活性化し透過性を上昇させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、DPPIIIが2型糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスにおいて、糖尿病性腎症の増悪は、DPP III投与によって、血糖値、血圧、心機能に変動なく有意に抑制されることを見出した。つまり、DPP IIIは血糖や血圧の調節とは独立して糸球体保護作用を発揮し、糖尿病性腎症を抑制する全く新しい効果を有していることが判明した。糖尿病の治療は発達しているものの、糖尿病性腎症は増加傾向にある。このことは、糖尿病性腎症の克服には単に血糖値を正常化するだけでは不十分であり、新たな治療法の開発、創薬が必要であることを意味している。

研究成果の概要(英文)：Dipeptidyl peptidase III (DPPIII) treatment in diabetic db/db mice suppressed the DM-induced cardiac diastolic dysfunctions and renal injury without alteration of the blood glucose level. The treatment inhibited inflammatory cell infiltration and fibrosis in the heart, and blocked the increase in albuminuria by attenuating the disruption of the glomerular microvasculature and inhibiting the effacement of podocyte foot processes in the kidney. The beneficial role of DPPIII was mediated by the cleavage of a cytotoxic peptide, which was increased in db/db mice compared with normal mice. The peptide had an anaphylatoxin-like effect. The effect was dependent on its interaction with the C3a receptor and protein kinase C-mediated RhoA activation downstream of the receptor in endothelial cells. In conclusion, DPPIII plays a protective role in the heart and kidney in the DM animal model through cleavage of the peptide that is a part of C3.

研究分野：生化学 循環器内科学

キーワード：糖尿病性腎臓病 2型糖尿病 ペプチド ジペプチジルペプチダーゼIII DPPIII 血管障害 C3補体

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎臓病は進行性の腎障害であり、日本における透析導入原因の第一位である。日本では推定約 1,000 万人もの糖尿病患者がおり、その約 40%で糖尿病性腎臓病を発症している。内服治療薬やインスリン投与などによる既存の治療薬を組み合わせた集約的糖尿病治療により、多くの場合、糖尿病性腎臓病の改善は認められるものの完全な正常化は難しく、一方で、集約的治療でも改善がほとんど見られない症例も存在する (1)。したがって、糖尿病性腎臓病に対する新たな治療法の開発、創薬は喫緊の重要課題である。

申請者は、ペプチドを N 末端側より 2 アミノ酸ずつ加水分解する酵素ジペプチジルペプチダーゼ III (DPPIII) の生活習慣病に対する作用に着目して研究を行ってきた。DPPIII は、アミノ酸残基数 3-10 程度の比較的小さな特定のペプチドを分解する (2)。まず、糖尿病と並んで重要な生活習慣病である高血圧について、DPPIII が 8 アミノ酸で構成される強力な昇圧ホルモンのアンジオテンシン II (AngII) を分解して降圧作用を発揮し、高血圧による心臓、腎臓への臓器障害を抑制することを明らかにした (3)。しかし AngII 以外に DPPIII がペプチド分解し腎保護効果をもたらす役割が期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は糖尿病で増加し DPPIII の基質となる血中ペプチドを同定し、そのペプチドの分子作用機構を明らかにすると共に、このペプチドをターゲットとした糖尿病性腎臓病を阻止するための新たな治療法開発に向けた基盤を構築することである。

3. 研究の方法

(1) レプチン受容体遺伝子点変異により 2 型糖尿病を発症する db/db マウスに、精製リコンビナント DPPIII を投与した場合、コントロールの生理食塩水投与と比較して、腎機能障害の指標である尿中アルブミン量を、血糖値に変動なく有意に抑制できた。血糖低下作用のない DPPIII が、血糖非依存的に腎保護作用を発揮する機序を検討するため、糖尿病で増加し、DPPIII で分解される血中ペプチドを網羅的なペプチドーム解析で探索した。

(2) 候補ペプチドを正常マウスあるいは db/db マウスに投与し、腎障害の増悪化がどのように生じるか検討した。尿中アルブミン量および、腎糸球体の障害 (ポドサイトの電子顕微鏡観察による超微細構造解析および抗デスミン交代による免疫染色) を通して行った。同時に血糖や血清脂質なども計測し、候補ペプチドの投与による糖質・脂質代謝系への影響を調べた。

(3) 同定した候補ペプチドのアナフィラトキシン様生理活性を *in vitro*、*in vivo* の両面より解析を行った。具体的にはアナフィラトキシン様作用による血管透過性の亢進は、マウス尾静脈より Evans Blue 溶液を投与した後、候補ペプチドを皮下注射し、Evans Blue が血管外へ漏出する量を測定する方法 (マイルズアッセイ) で解析した。血管透過性の亢進には、血管内皮細胞内で低分子 G タンパク質 RhoA の活性化による細胞収縮と細胞間隙の増大が関わっていると想定されるため、RhoA の活性化においては、培養血管内皮細胞を用いて定量した。

4. 研究成果

(1) マウスから採取した血液を血漿化し、C18 逆相液体クロマトグラフィーによる分離後、質量分析器によって血漿中に含まれるペプチドの同定を行なった結果、C57BL6 または db/m マウスと比較して db/db マウスで増加しており、DPPIII によって分解されるペプチドを同定した。この候補ペプチドは、9 アミノ酸によって構成されており、そのアミノ酸配列解析から補体 C3 の分解産物で、腎臓内の血管にアナフィラトキシン様作用を惹起して、腎障害を引き起こすことが想定された。

(2) 同定した候補ペプチドを db/db マウス尾静脈より投与し、腎障害の病態悪化を、コントロールペプチド (アルブミン由来、DPPIII によって切断されない) 投与群と比較したところ *in vivo* で腎障害増悪化させることを明らかにした。尿中アルブミン量の顕著な上昇が確認され、糸球体において腎障害マーカーであるデスミンの発現量も有意に上昇していた。また電子顕微鏡観察による超微細構造解析において糸球体内のポドサイトの足突起消失が促進されていることが確認された。候補ペプ

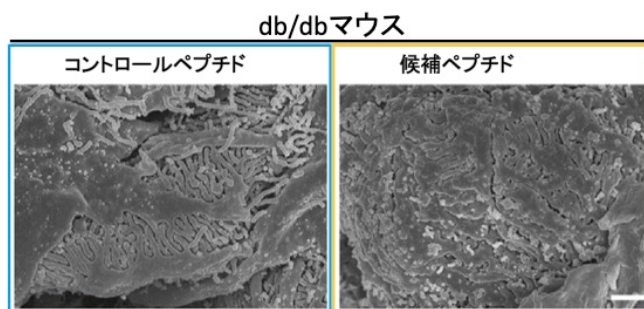


図1 同定した候補ペプチドの腎障害増悪化作用

チドによる血糖値の上昇および血中中性脂肪、コレステロールに変動は見られなかった。これらの結果より、候補ペプチドが血中糖および脂質の制御とは独立して、腎障害を増悪化させることを明らかにした (図 1)。

(3) マイルズアッセイにより候補ペプチドの血管透過性作用の検証を行ったところ、db/db マウス尾静脈より投与した候補ペプチドは、有意に血管より皮下組織への Evans Blue の滲出を増加させた。C3 の分解産物である同定した候補ペプチドが、血管内皮細胞の発現する C3a 受容体に結合することを明らかにした。培養血管内皮細胞に候補ペプチドを添加した後、RhoA の活性化を査定したところ、有意に上昇することが判明した。また、血管内皮細胞の形態は RhoA の活性化に伴い収縮し、細胞間接着が阻害された。C3a 受容体は G タンパク質共役型の受容体であり、PKC を活性化し RhoA を活性化させることが判明した。血管透過性が亢進することによる炎症細胞の血管外への走化性誘導機構、候補ペプチドが細胞外からその受容体などを介して血管内皮細胞に作用し RhoA を活性化する細胞内シグナル伝達機構を明らかにした (図 3)。これらの解析を通して候補ペプチドが持つ生理活性とその腎障害増悪化分子機構の全容を解明した。

図 2 候補ペプチドが RhoA が活性化し、血管内皮細胞を収縮させることで血管透過性が上昇する

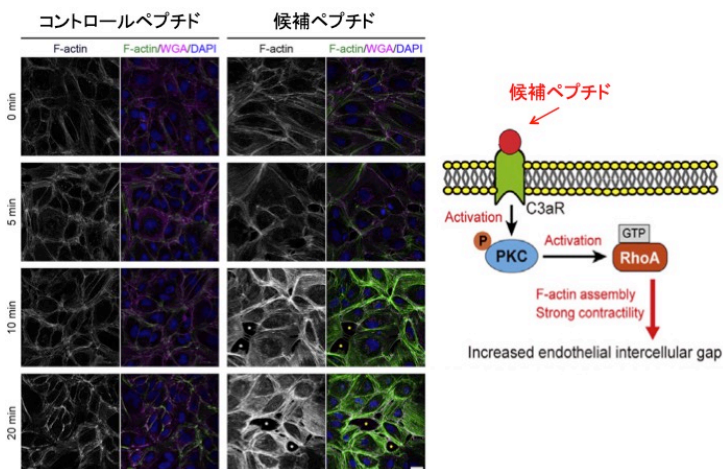


図2 候補ペプチドがRhoAが活性化し、血管内皮細胞を収縮させることで血管透過性が上昇する

引用文献

- 1) Wanner C, Inzucchi SE, Lachin JM, Fitchett D, von Eynatten M, Matthews M, Johansen OE, Woerle HJ, Broedl UC, Zinman B; EMPA-REG OUTCOME Investigators. (2016) *N Engl J Med.* 375, 323-34.
- 2) Prajapati SC, Chauhan SS (2011) *FEBS J.* 278, 3256-76
- 3) Pang X, Shimizu A, Kurita S, Zankov DP, Takeuchi K, Yasuda-Yamahara M, Kume S, Ishida T, Ogita H (2016) *Hypertension* 68, 630-41

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Molla Md Rasel, Shimizu Akio, Komeno Masahiro, Rahman Nor Idayu A., Soh Joanne Ern Chi, Nguyen Le Kim Chi, Khan Mahbubur Rahman, Tesega Wondwossen Wale, Chen Si, Pang Xiaoling, Tanaka-Okamoto Miki, Takashima Noriyuki, Sato Akira, Suzuki Tomoaki, Ogita Hisakazu	4. 巻 5
2. 論文標題 Vascular smooth muscle RhoA counteracts abdominal aortic aneurysm formation by modulating MAP4K4 activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04042-z	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 該当する

1. 著者名 Soh Joanne Ern Chi, Shimizu Akio, Molla Md Rasel, Zankov Dimitar P., Nguyen Le Kim Chi, Khan Mahbubur Rahman, Tesega Wondwossen Wale, Chen Si, Tojo Misa, Ito Yoshito, Sato Akira, Hitosugi Masahito, Miyagawa Shigeru, Ogita Hisakazu	4. 巻 299
2. 論文標題 RhoA rescues cardiac senescence by regulating Parkin-mediated mitophagy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102993 ~ 102993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.102993	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 該当する

1. 著者名 Nguyen Le Kim Chi, Shimizu Akio, Soh Joanne Ern Chi, Komeno Masahiro, Sato Akira, Ogita Hisakazu	4. 巻 170
2. 論文標題 Transmembrane protein 168 mutation reduces cardiomyocyte cell surface expression of Nav1.5 through B-crystallin intracellular dynamics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 577 ~ 585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab066	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 Sato Akira, Rahman Nor Idayu A., Shimizu Akio, Ogita Hisakazu	4. 巻 112
2. 論文標題 Cell to cell contact mediated regulation of tumor behavior in the tumor microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4005 ~ 4012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15114	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 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Md Mahbubur Rahman Khan , Akira Sato , Akio Shimizu , Masahiro Komeno , Md Rasel Molla , Hisakazu Ogita
2. 発表標題 Role of Afadin in vascular smooth muscle contraction via the Gq - phospholipase C β axis to enhance calcium signaling
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会(滋賀医科大学)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Joanne Ern Chi Soh , Akio Shimizu , Hisakazu Ogita
2. 発表標題 RhoA regulates senescence heart by maintaining mitochondrial function via Parkin-dependent mitophagy
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会(滋賀医科大学)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Le Kim Chi Nguyen , Akio Shimizu , Akira Sato , Hisakazu Ogita
2. 発表標題 Transmembrane protein 168 mutation that associates with Brugada syndrome recruits β crystallin to reduce cardiac Nav1.5 expression on the cardiomyocyte surface
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会(滋賀医科大学)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Md Rasel Molla , Akio Shimizu , Akira Sato , Tomoaki Suzuki , Hisakazu Ogita
2. 発表標題 Vascular Smooth Muscle RhoA Confers Protection Against Abdominal Aortic Aneurysm Formation by Inhibiting MAP4K4 Activity
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会(滋賀医科大学)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Le Kim Chi Nguyen, Akio Shimizu, Akira Sato, Hisakazu Ogita
2. 発表標題 Role of transmembrane protein 168 mutation in Brugada syndrome by alteration in subcellular localization of B-crystallin to modulate sodium channel Nav1.5 surface expression in cardiomyocytes
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（名古屋国際会議場）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Joanne Ern Chi Soh, Akio Shimizu, Rasel Md Molla, Hisakazu Ogita
2. 発表標題 Novel Protective Role of RhoA in the Senescence Heart by Regulating Parkin-mediated Mitophagy
3. 学会等名 第87 回日本循環器学会学術集会（福岡国際会議場）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米野雅大, Md Rasel Molla, 清水昭男, 扇田久和
2. 発表標題 Dipeptidyl peptidase IIIの糖尿病性腎臓病抑制機序
3. 学会等名 第67回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Joanne Ern Chi Soh, Akio Shimizu, Md Rasel Molla, Hisakazu Ogita
2. 発表標題 RhoA Protects Senescence Heart by Preserving Mitochondrial Function via Parkin
3. 学会等名 第5回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米野雅大, Md RaseI Molla, 清水昭男, 扇田久和
2. 発表標題 ジベプチジルペプチダーゼIIIが糖尿病性腎臓病を抑制する作用機序
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Md RaseI Molla, Akio Shimizu, Akira Sato, Hisakazu Ogita
2. 発表標題 Novel protective role of RhoA in vascular smooth muscle cells against aortic aneurysm formation
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 清水昭男、扇田久和	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社エル・アイ・シー	5. 総ページ数 594
3. 書名 モデル動物の作製と利用 - 循環器疾患2021 <上巻>	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------