

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790797

研究課題名（和文） 糖尿病性腎症に対する血管新生抑制因子による腎保護作用機序の解明

研究課題名（英文） Studies on action mechanism of protective effects of angiogenesis inhibitor against the diabetic nephropathy.

研究代表者

川崎 靖 (KAWASAKI YASUSHI)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：60385549

研究成果の概要（和文）：糖尿病の病態基盤は全身性の細小血管障害に起因している。本研究では血管新生抑制因子であるアンジオスタチンによる、糖尿病性腎症における腎保護作用機序の解析を行った。アンジオスタチンは炎症性サイトカインによる NF- $\kappa$ B の核移行抑制により、血管内皮細胞の障害を減弱した。アンジオスタチンの新規標的レセプターとの結合を証明した。これらの知見は、アンジオスタチンの治療応用に重要な知見を提供すると期待される。

研究成果の概要（英文）：The pathological conditions of diabetes originate in a systemic microangiopathy. In this study, we investigated the mechanisms of action by which angiogenesis inhibitor angiostatin protects the diabetic nephropathy. Angiostatin attenuated the endothelial dysfunction through the inhibition of nuclear translocation of NF- $\kappa$ B induced by inflammatory cytokine. We showed the binding between angiostatin and its novel target receptor. It is expected that these observations contribute to the therapeutic effects of angiostatin to the diabetic nephropathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：腎臓病学、腫瘍生物学

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：腎臓学、糖尿病性腎症、糖尿病、腎疾患、血管新生抑制因子

## 1. 研究開始当初の背景

日本は高度高齢化社会を迎え、糖尿病や高血圧等の生活習慣病に起因する腎不全患者数が増加の一途をたどっている。近年、I、II 型糖尿病患者の大規模臨床試験で、糖尿病性腎症の早期ではインスリン治療、降圧薬および低蛋白食による厳密な血糖・血圧・脂質値の維持により腎疾患の寛解が報告され、正常に近い生理条件に腎臓を維持すれば、治癒

が可能であることが示された。糖尿病性腎症の病態には糸球体での、糸球体基底膜の肥厚化やメサンギウム領域の拡大が観られ、アルブミン尿発症や糸球体高血圧の原因となる。糖尿病性腎症の進展に伴い、糸球体に結節性病変が形成され、最終的に糸球体硬化や血管閉塞によるネフロン減少を導き、腎病変の不可逆進行点(point of no-return)を越えてしまう。これらの病態機序は高血糖の他、

高血圧や脂質代謝異常からなる生活習慣病に起因した細小血管障害、糸球体内のメサンギウム細胞、糸球体上皮細胞(ポドサイト)ならびに血管内皮細胞等の傷害による炎症反応、糸球体高血圧や糸球体過剰ろ過による血行動態異常に起因する。また、血管内皮細胞の障害や血流減少による低酸素状態は、血管新生促進因子上昇と血管新生抑制因子の著しい減少を導き、異常な血管新生の亢進を引き起こす原因となっており、これら血管新生関連因子のバランスを正常に保つことで、血管系の機能回復が見込まれる。

## 2. 研究の目的

顕性糖尿病性腎症でみられる血管新生の亢進は、血管新生促進因子上昇と血管新生抑制因子の著しい減少が原因であり、これら血管新生関連因子のバランスを正常に保つことで、血管系の機能回復が期待される。生体内内在性の血管新生抑制因子であるアンジオスタチンは、糖尿病モデルラットの腎臓において著しい発現減少が観られ、血管新生促進因子である VEGF の過剰発現と相まって、糖尿病性腎症の病態発展に寄与していると推測される。アデノウィルスを用いたアンジオスタチン過剰発現により、腎症の進展に関わる VEGF, TGF $\beta$ 1 の発現低下により、糖尿病性腎症におけるアルブミン尿や糸球体肥大の減少が観られている。また、アンジオスタチンはリンパ球の誘因阻害やマクロファージの運動能抑制といった抗炎症作用を有することが明らかとなっているが、腎血管病変に対する治療効果に関しては明らかにされていない。

これらの事象を踏まえ、本研究では糖尿病性腎症におけるアンジオスタチンの治療効果を調べる目的で、糖尿病モデルラットへのアンジオスタチン投与および評価方法の確立、アンジオスタチンの作用機序を調べる目的でアンジオスタチン標的タンパク質の機能解析と血管内皮細胞に対するアンジオスタチンの抗炎症作用機序の解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖尿病モデルラットへのアンジオスタチン投与および評価方法の確立

#### ① His タグ付加アンジオスタチンの調製

His タグ付加アンジオスタチンを調製するために、pSecTag ベクターに4つのクイックドメイン(K1-K4)領域を含むアンジオスタチン遺伝子を組み込み、N末端に His を付加する His-アンジオスタチン発現ベクターを調製した。生理活性を有する His-アンジオスタチンを調製するために、CHO 細胞に His-アンジオスタチン発現ベクターを遺伝子導入し、培養上清より抗 6 x His 抗体アフィニティークラムと 6 x His ペプチドを用いて His-アン

ジオスタチンを精製した。精製した His-アンジオスタチンは PBS(-) に透析した後、純度と濃度をクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色と抗 6 x His 抗体によるウェスタンブロットにより解析した。

### ② 糖尿病モデルラットへのアンジオスタチン投与および評価方法の確立

糖尿病性腎症における腎血管機能解析手法の確立を目的として、共焦点レーザー顕微鏡を用いて *in vivo* イメージングにより、腎糸球体での血液動態の観察を行った。6 週齢のラットを頸椎脱臼後、蛍光物質キナクリン (0.3 mg/rat) とテトラメチルローダミン (TRITC) 標識デキストラン (70 kDa, 3 mg/rat) を尾静脈より投与し、5 分後に腎臓を背部より露出させ共焦点レーザー顕微鏡を用いて、腎臓の血液流動および糸球体での蛍光標識デキストランの漏出をタイムラプスで観察した。

### (2) 血管内皮細胞に対するアンジオスタチンの障害改善機序の解析

糖尿病での血管内皮細胞の障害に対するアンジオスタチンの保護作用機序を解析するために、高血糖 (30 mM グルコース) あるいは炎症性物質 (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  および TGF $\beta$ ) とアンジオスタチンをヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に添加し、血管内皮細胞に誘導される障害応答を ICAM-1, MCP-1 および eNOS タンパク質および mRNA の発現変化をウェスタンブロットおよびリアルタイム PCR により調べた。次に、アンジオスタチンの作用機序を調べるために、炎症反応の JNK, p38MAPK および NF- $\kappa$ B シグナル経路の活性を、各リン酸化抗体を用いたウェスタンブロットと免疫化学染色により解析した。

### (3) 新規アンジオスタチン標的タンパク質の機能解析

我々はアンジオスタチンの新規標的膜タンパク質として angiostatin binding protein1 (ABP1) を同定している。アンジオスタチンと ABP1 との相互作用を調べるために、*in vivo* でのアンジオスタチンと ABP1 の結合を調べた。Flag タグ ABP1 を過剰発現させた CHO 細胞に、His-アンジオスタチンを反応させ、お互いの局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、アンジオスタチンと ABP1 の結合が真であるか明らかにするために、GST 融合組換え体 ABP1 タンパク質 (GST-ABP1) を調製し、アンジオスタチンとの結合阻害実験を行い、上記と同様に共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 糖尿病モデルラットへのアンジオスタ

## チン投与および評価方法の確立

### ① His タグ付加アンジオスタチンの調製

外来性のアンジオスタチンを特異的に検出するため且つ生理活性を有するアンジオスタチンを調製するために、アンジオスタチンの N 末端領域に His タグを付加した His-アンジオスタチンベクターを CHO 細胞に遺伝子導入し、培養上清より His 抗体アフィニティーカラムを用いて His-アンジオスタチンを精製した(図 1)。得られた His アンジオスタチンは CBB 染色で単一バンドにまで精製でき、HUVEC に対する増殖抑制能を有していた。当初、リポソームに封入による His-アンジオスタチンの投与を検討していた。しかしながら、本調製方法では数 10  $\mu\text{g}$  の His-アンジオスタチンしか調製できず、リポソームに封入できるほど多量の His-アンジオスタチンの調製が困難であったため、大量調製法に関してはバキュロウイルスによる昆虫細胞の使用や His-アンジオスタチンを安定発現する細胞株の樹立を検討している。

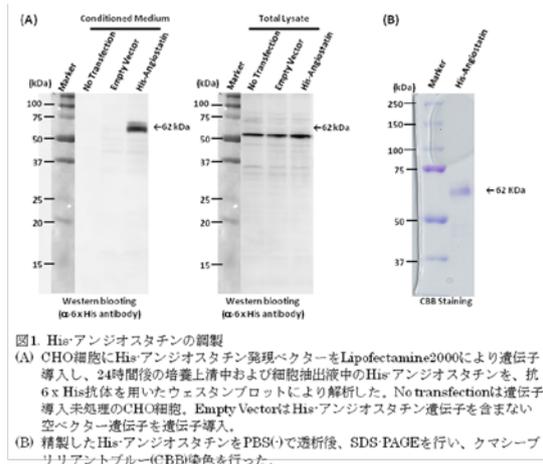


図1 His-アンジオスタチンの調製  
(A) CHO細胞にHis-アンジオスタチン発現ベクターをLipofectamine2000により遺伝子導入し、24時間後の培養上清および細胞抽出液中のHis-アンジオスタチンを、抗6xHis抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した。No transfectionは遺伝子導入未処理のCHO細胞、Empty VectorはHis-アンジオスタチン遺伝子を含まない空ベクター遺伝子を遺伝子導入。  
(B) 精製したHis-アンジオスタチンをPBS(-)で透析後、SDS-PAGEを行い、クマシールブリリアントブルー(CBB)染色を行った。

### ② 糖尿病モデルラットへのアンジオスタチン投与および評価方法の確立

アンジオスタチンによる腎保護作用機序の解明を目的として、*in vivo* イメージングシステムを用いた腎臓の血液動態を解析した。ラット尾静脈より蛍光物質キナクリンと蛍光標識アルブミンを投与し、腎臓の血液流動および糸球体での蛍光標識デキストランの漏出を共焦点レーザー顕微鏡を用いてタイムラプスで観察した。観察結果を図2に示した。キナクリンにより血管や尿細管構造が染色され、TRITC 標識デキストランによる血液動態および一部の尿細管における原尿動態が観察された。一方で、糸球体におけるTRITC 標識デキストランは検出されず、血液の過過程は観察できなかった。糸球体の検出深度まで顕微鏡のレーザーが届いていないと考えられ、多光子共焦点レーザー顕微鏡下での観察を検討している。また、アンジオスタチンの生体内への移植では、精製した His-

アンジオスタチンをスポンジゲルを用いて、腎皮質へと移植を行ったが、アンジオスタチンの分解が非常に早く、効果的な腎保護作用の検討は行えなかった。

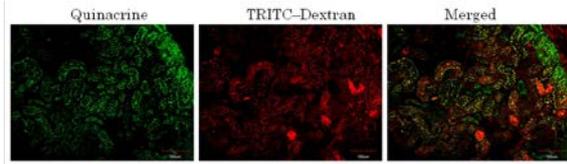


図2 *In vivo*イメージングシステムを用いた腎臓の血液動態の観察  
6週齢のラットを顕微鏡口後、蛍光物質キナクリン(0.3 mg/rat)とテトラメチルローダミン(TRITC)標識デキストラン(70 kDa, 3 mg/rat)を尾静脈より投与し、5分後に腎臓を背部より露出させ共焦点レーザー顕微鏡を用いて、腎臓の血液流動および糸球体での蛍光標識デキストランの漏出をタイムラプスで観察した。

### (2) 血管内皮細胞に対するアンジオスタチンの障害改善機序の解析

糖尿病の病態基盤は全身性の細小血管障害に起因しており、糖尿病性腎症においても腎糸球体および細小血管内皮細胞に誘導される炎症応答(微小炎症)が病態の進展に深く関わっている。血管新生抑制能や抗炎症作用を有するアンジオスタチンは、糖尿病性腎症の病態進展を抑制することが報告されているが、その詳細な作用機序は明らかにされていない。本研究では、アンジオスタチンによる腎保護作用機序の解明を目的として、アンジオスタチンが血管内皮細胞において障害を改善する機序について解析を行った。アンジオスタチン存在および非存在下で、高血糖あるいは炎症性物質をHUVECに添加し、HUVECに誘導される障害応答を白血球の誘因に係わるICAM-1、VCAM-1およびMCP-1とNOの産生に係わるeNOSの発現より調べた。その結果、IL-1 $\beta$ により誘導されるeNOSの発現低下をアンジオスタチンが抑制することが分かり、その詳細な作用機序の解析を行った。HUVECは炎症性サイトカインIL-1 $\beta$ により、eNOSの発現低下およびICAM-1の発現増加といった内皮細胞障害が誘導された(図3)。

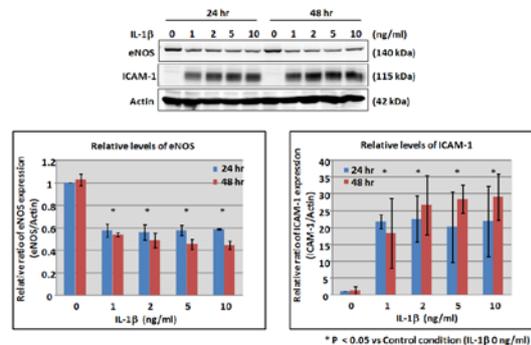


図3 IL-1 $\beta$ によりHUVECに血管内皮細胞の障害が誘導される  
IL-1 $\beta$  (1, 2, 5, 10 ng/ml)をHUVECに反応させ、24および48時間後のeNOSおよびICAM-1の発現をウェスタンブロットにより解析した。Actinの発現量を内部標準とし、IL-1 $\beta$ 非処理におけるeNOSおよびICAM-1の発現量を1として相対比を算出した。

IL-1 $\beta$ と共にアンジオスタチンを添加すると、IL-1 $\beta$ によるICAM-1の発現にアンジオスタチン

ンは影響を与えなかったが、eNOS 発現低下はアンジオスタチンの濃度依存的に回復し、リアルタイム PCR による mRNA の発現に関しても同様の結果が得られた(図 4)。

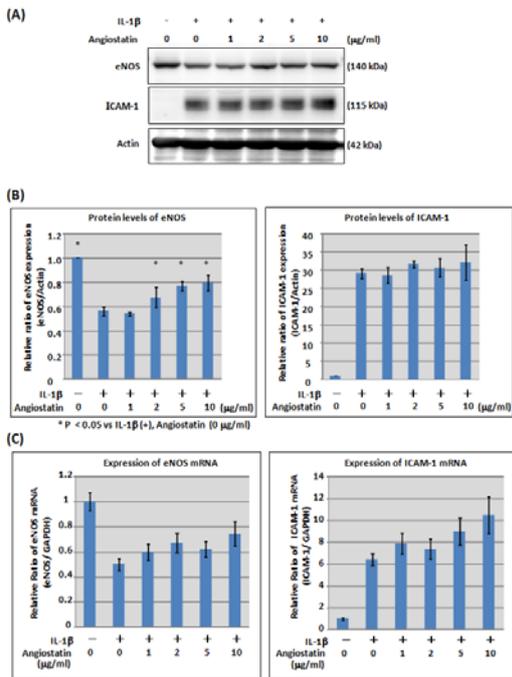


図4. IL-1βにより誘導されるeNOS発現低下に対するアンジオスタチンの作用。HUVECにアンジオスタチン(1, 2, 5, 10 μg/ml)を30分間反応させた後、IL-1β(1 ng/ml)を24時間反応させ、タンパク質およびRNAを調製した。(A) 抗eNOSおよび抗ICAM-1抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。Actinは内部標準として行った。(B) (A)のウェスタンブロットの結果を、Actinの発現量を内部標準とし、IL-1βおよびアンジオスタチン未処理におけるeNOSおよびICAM-1の発現量を1として、相対比を算出した。(C) eNOSおよびICAM-1 mRNAの発現量をリアルタイムPCRにより解析した。GAPDHの発現量を内部標準とし、IL-1βおよびアンジオスタチン未処理におけるeNOSおよびICAM-1 mRNAの発現量を1として、相対比を算出した。

次に、アンジオスタチンによる *eNOS* mRNA 発現低下抑制機序を明らかにするために、炎症応答により活性化されるシグナル伝達経路を調べた。これまでに *eNOS* 遺伝子の発現調節機構として、p38MAPK や JNK 経路の活性化を介した転写因子 ATF2 の活性化や NF-κB シグナルの活性化による *eNOS* 遺伝子の転写抑制が報告されている。そこで、IL-1βにより活性化が誘導される p38MAPK、JNK および NF-κB シグナル経路の活性化に対するアンジオスタチンの影響を解析した。その結果、図 5 に示したように、HUVEC では IL-1βに反応し 10 分および 15 分から p38MAPK や JNK カスケードが活性化し、ATF2 のリン酸化が誘導されていた。しかし、アンジオスタチンを IL-1β 添加 30 分前にプレインキュベートしても、p38 および JNK の活性化に変化は見られず、ATF2 のリン酸化もアンジオスタチン未添加の時と同様であった。このことから、アンジオスタチンは p38MAPK や JNK シグナル伝達経路には影響を与えないことが分かった。次に、NF-κB シグナル経路について調べた。アンジオスタチン存在および非存在下での IL-1βに

よる NF-κB の活性化を、免疫組織化学染色により経時的に調べた。図 6 に示したように IL-1β添加後 60 分後に、NF-κB は核に局在が移行したが、アンジオスタチン存在下ではその核への移行が減少していた。核における NF-κB 量を定量的に調べるために、核抽出液を調製し NF-κB の発現量をウェスタンブロットにより調べた結果、IL-1βによる核への NF-κB の蓄積は、アンジオスタチンの添加により約 3 割に減少した(図 7)。

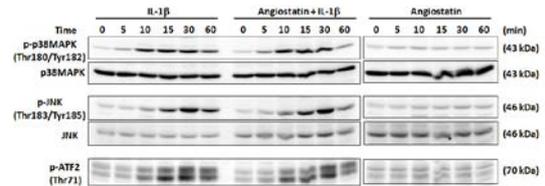


図5. 炎症シグナル伝達経路に対するアンジオスタチンの影響。HUVECにアンジオスタチン(10 μg/ml)、IL-1β(1 ng/ml)を5分間反応させた後、IL-1β(1 ng/ml)を5分間(0, 5, 10, 15, 30, 60分)にタンパク質抽出液を調製した。p38MAPKおよびJNKの活性化を、それぞれの特異的抗体を用いて検出した。

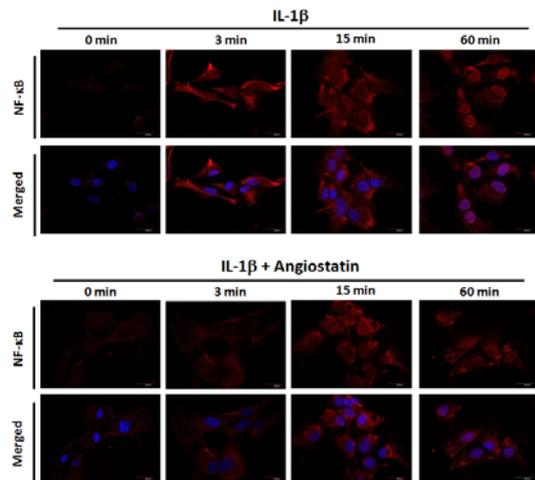


図6. NF-κBシグナルに対するアンジオスタチンの影響。HUVECにアンジオスタチン(10 μg/ml)を30分間反応させた後、IL-1β(10 ng/ml)を経時的(0, 3, 15, 60分)に反応させた後、メタノール:アセトン(1:1)で細胞を固定した。その後、抗NF-κB抗体とTRITC標識抗ラビット抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。核はHoechst33258により染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

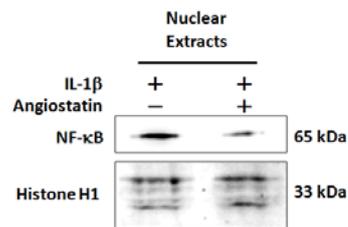


図7. IL-1βにより誘導されるNF-κBの核移行に対するアンジオスタチンの作用。HUVECにアンジオスタチン(10 μg/ml)を30分間反応させた後、IL-1β(10 ng/ml)を60分間反応させ、核抽出液を得た。NF-κBおよびHistone H1の発現をウェスタンブロットにより解析した。

これらのことから、アンジオスタチンによる IL-1β誘発血管内皮細胞の障害抑制機序として、図 8 のような経路が考えられ、NF-κB の核移行をアンジオスタチンが阻害し、血管内皮細胞の障害を改善することが明らかとなった。

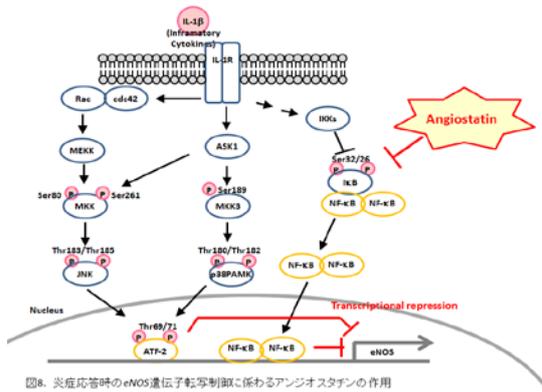


図8. 炎症応答時のeNOS遺伝子転写制御に関わるアンジオスタチンの作用

### (3) 新規アンジオスタチン標的タンパク質の機能解析

アンジオスタチンの作用機序を調べる中で、我々はアンジオスタチン標的タンパク質としてグリコシル化膜タンパク質の ABP1 を同定している。アンジオスタチンと ABP1 との相互作用を調べるために、*in vivo*でのアンジオスタチンと ABP1 の結合を調べた。Flag タグ ABP1 を過剰発現させた CHO 細胞に、His-アンジオスタチンを反応させ、お互いの局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、アンジオスタチンと ABP1 の局在は共に細胞膜上で観察され、共局在することが明らかとなった(図 9)。次に、アンジオスタチンと ABP1 の結合が真であるか明らかにするために、GST-ABP1 による競合阻害実験を行った。その結果、陰性コントロールである GST を加えた時はアンジオスタチンと ABP1 の結合は阻害されなかったが、GST-ABP1 を His-アンジオスタチンの 10 倍あるいは 100 倍量添加すると、His-アンジオスタチンと Flag タグ ABP1 の共局在が著しく抑制された(図 10)。このことより、実際に *in vivo*でアンジオスタチンと ABP1 が結合していることが明らかとなった。

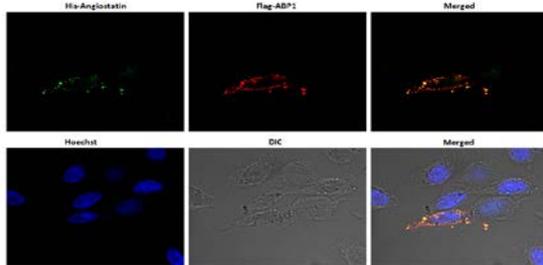


図9. アンジオスタチンと標的タンパク質ABP1との結合  
CHO細胞にFlag-ABP1を遺伝子導入し、24時間His-アンジオスタチン5nMを2時間反応させた後、4%パラホルムアルデヒドで固定後、抗Flag抗体および抗His抗体を用いて、免疫組織化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。Hoechstは核の染色を観ている。DAPIは核分染を画している。

本研究では糖尿病性腎症で観られる血管新生関連因子のバランス改善を目的として、血管新生抑制因子・アンジオスタチンに着目し、*in vivo*および*in vitro*での腎保護作用機序の解析を行った。HUVEC を用いた *in*

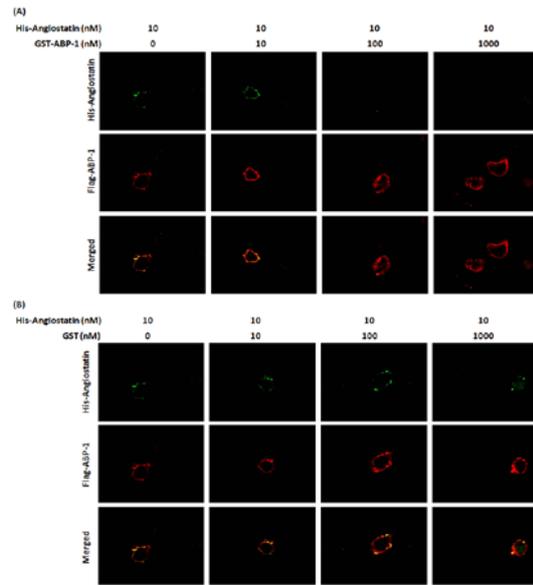


図10. アンジオスタチンと標的タンパク質ABP1との結合  
CHO細胞にFlag-ABP1を遺伝子導入し、24時間His-アンジオスタチン5nMを2時間反応させた後、His-アンジオスタチン(10nMを2時間反応させ、4%パラホルムアルデヒドで固定後、抗Flag抗体および抗His抗体を用いて、免疫組織化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

*vitro* の解析で、炎症性サイトカイン IL-1β による NF-κB の活性化経路をアンジオスタチンが抑制することを明らかにし、アンジオスタチンによる血管内皮細胞の障害改善機序の一端を明らかにした。また、アンジオスタチンの標的タンパク質 ABP1 との *in vivo*での結合を明らかにした。*In vivo*でのアンジオスタチンによる糖尿病性腎症の治療効果の解析は、His-アンジオスタチンの調製および腎糸球体における血行動態の観察方法の確立が困難であったが、*in vitro*でのアンジオスタチンの作用機序の解析結果より得られた知見を活かし、アンジオスタチンの生理活性部位の同定および多光子共焦点レーザー顕微鏡下での観察を検討している。

### 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)

[学会発表] (計 1 件)

①川崎 靖、横林 恵理子、坂本 健太郎、高木 はるか、米澤 正、杉山 晶規、名取 泰博、アンジオスタチンは血管内皮細胞の障害を抑制する、日本薬学会 第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、北海道大学

[その他]

ホームページ等

[http://gaia-sb.iwate-med.ac.jp/pharm/?page\\_id=38](http://gaia-sb.iwate-med.ac.jp/pharm/?page_id=38)

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 靖 (KAWASAKI YASUSHI)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：60385549