

腎線維化と血管傷害における Vasohibin の 役割と治療的意義の検討

[1] 組織

代表者：田邊 克幸
(岡山大学病院血液浄化療法部)
対応者：佐藤 靖史
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費40万円

[2] 研究経過

本邦における慢性腎臓病 (CKD) 患者は1,330万人と推計されており、末期腎不全から透析療法を必要とする患者は2016年末で33万人近くまで増加している。CKD は心血管イベントのリスクを増大させることから、その治療戦略の開発は、ますますその重要性を増している。

CKD は多様な腎臓病または全身疾患を基礎として発生するが、その進行の過程においては共通して糸球体硬化と尿細管間質線維化が認められる。糸球体内皮や傍尿細管毛細血管の障害は、糸球体硬化や間質線維化を促進する。血管内皮成長因子 (VEGF) は、毛細血管を維持して保護的に作用し得る。このような線維化の過程には、尿細管上皮やメサンギウム細胞の上皮間葉転換 (EMT) 様変化も関与することが示唆されており、形質転換成長因子 β (TGF- β) が主要な促進因子となり得る。

Vasohibin-1 (VASH-1) は、腫瘍循環分野 佐藤教授らにより同定された血管新生抑制因子であり、他の血管新生抑制因子とは異なり、血管内皮に対して保護的に作用する。また、Vasohibin-2 (VASH-2) は、VASH-1 の homologue として同定された血管新生促進因子であり、腫瘍細胞での EMT を促進することが示唆されている。腎臓病での Vasohibin の発現を検討した研究は、本共同研究以外には公表されていない。

本共同研究では、内因性 VASH-2 の発現変化が糸球体硬化や尿細管間質障害の進展に関与し、その発現調節が病態の進展を制御するかを解明することを目的として行った。

以下、研究活動状況の概要を記す。平成 29 年度は、次に示すような成果を得た。

平成 30 年 2 月 24 日～25 日に、仙台市内で第 13 回 Vasohibin 研究会が開催されたが、この際に「腎疾患における Vasohibin-2 の役割に関する検討」の演題にて、研究成果を発表し、今後の研究計画についての打ち合わせを実施した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第 1 に、糸球体硬化への VASH2 の関与を検討するために、糖尿病性腎症における糸球体メサンギウム基質増加への VASH2 の関与を確認した。これまでの本共同研究にて、VASH2 欠損マウスにおける糖尿病の誘発が、野生型マウスと比較して尿蛋白及びメサンギウム基質拡大の進行抑制につながることを示した。VASH2 はメサンギウム細胞に発現する可能性が示唆されたことから、本年度は培養ヒトメサンギウム細胞 (HMC) を使用して、細胞外基質産生への VASH2 の関与を検討した。HMC への siRNA のトランスフェクションにより VASH2 のノックダウンを行った。HMC を通常ブドウ糖濃度 (NG) または高ブドウ糖濃度 (HG) 下で培養したところ、IV 型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖 mRNA 発現の増加が認められたが、これは VASH2 のノックダウンにより抑制された。また、線維化に関与する結合組織成長因子 (CTGF) の高ブドウ糖刺激による発現増加も VASH2 のノックダウンにより抑制された。従って、VASH2 は糖尿病に伴う糸球体メサンギウム基質増加を促進し、治療標的となり得ることが示唆された。

第 2 に、ヒト腎生検組織での VASH2 免疫組織化学の検討から、VASH2 は腎臓病患者で尿細管上皮に発現亢進することが示唆されたため (Arata Y et al. Acta Medica Okayama 2017)、培養尿細管上皮細胞での VASH2 発現亢進の意義について検討した。ヒト由来培養尿細管上皮細胞株 (HK-2) にアデノウイルスベクターを使用して VASH2 の過剰発現を

行った。VASH2 を過剰発現した HK-2 は間葉系マーカーである α -smooth muscle actin の発現が亢進し、EMT に関与する転写因子である ZEB2 と slug の mRNA レベルの上昇が認められた (図 1)。このため、尿細管上皮細胞における VASH2 の発現亢進は、尿細管上皮細胞の上皮間葉転換を促進する可能性があり、VASH2 は腎間質線維化を促進する因子であることが示唆された。

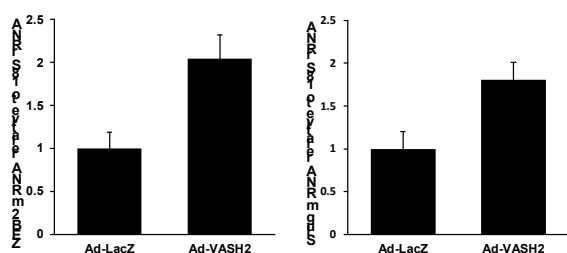


図 1 アデノウイルスベクターによる LacZ または VASH2 過剰発現に伴う培養尿細管上皮細胞 HK-2 での EMT 関連因子の発現変化

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、学外研究者との交流が飛躍的に活性化し、腎臓病や腫瘍を含めた複数の疾患領域における基礎及び臨床研究プロジェクトへと発展している。これまでの共同研究で明らかになった VASH1 による腎保護効果や腎臓病バイオマーカーとしての可能性に加えて、VASH2 は糸球体硬化や腎間質線維化に関与することが示唆され、Vasohibin が腎臓病において担う病態生理学的役割の解明と新規治療標的としての可能性につながっている。これらは新規の機序を持つ腎臓病治療薬の創薬やバイオマーカーの開発という研究領域の開拓に結びつき、今後の更なる発展が十分に期待される。

[4] 成果資料

(1) Nasu T, Maeshima Y, Kinomura M, Kawahara HK, Tanabe K, Sugiyama H, Sonoda H, Sato Y and Makino H.: Vasohibin-1, a negative feedback regulator of angiogenesis, ameliorates renal alterations in a mouse model of diabetic nephropathy. *Diabetes* 58(10):2365-2375, 2009.

(2) Miyake K, Nishida K, Kadota Y, Yamasaki H, Nasu T, Saito D, Tanabe K, Sonoda H, Sato Y, Maeshima Y and Makino H. Inflammatory cytokine-induced expression of Vasohibin-1 by rheumatoid synovial fibroblasts. *Acta Medica Okayama*. 63(6):349-358, 2009.

(3) Saito D, Maeshima Y, Nasu T, Yamasaki H, Tanabe K, Sugiyama H, Sonoda H, Sato Y, Makino H. Amelioration of renal alterations in obese type 2 diabetic mice by Vasohibin-1, a negative feedback regulator of angiogenesis. *Am J Physiol-Renal Physiol*. 300(4):F873-F886, 2011.

(4) Hinamoto N, Maeshima Y, Saito D, Yamasaki H, Tanabe K, Nasu T, Watatani H, Ujike H, Kinomura M, Sugiyama H, Sonoda H, Sato Y, Makino H. Urinary and plasma levels of vasohibin-1 can predict renal functional deterioration in patients with renal disorders. *PLoS ONE*. 9(6):e96932, 2014.

(5) Watatani H, Maeshima Y, Hinamoto N, Yamasaki H, Ujike H, Tanabe K, Sugiyama H, Otsuka F, Sato Y, Makino H. Vasohibin-1 deficiency enhances renal fibrosis and inflammation after unilateral ureteral obstruction. *Physiol Rep*. 2(6):pii:e12054, 2014.

(6) Hinamoto N, Maeshima Y, Saito D, Yamasaki H, Tanabe K, Nasu T, Watatani H, Ujike H, Kinomura M, Sugiyama H, Sonoda H, Kanomata N, Sato Y, Makino H. Renal distribution of Vasohibin-1 in patients with chronic kidney disease. *Acta Medica Okayama*. 68(4):219-233, 2014.

(7) Hinamoto N, Maeshima Y, Yamasaki H, Nasu T, Saito D, Watatani H, Ujike H, Tanabe K, Masuda K, Arata Y, Sugiyama H, Sato Y, Makino H. Exacerbation of diabetic renal alterations in mice lacking vasohibin-1. *PLoS ONE*. 9(9):e107934, 2014.

(8) Arata Y, Tanabe K, Hinamoto N, Yamasaki H, Sugiyama H, Maeshima Y, Kanomata N, Sato Y, Wada J. Immunohistochemistry of Vasohibin-2 in Human Kidney Disease: Implications in Impaired Glucose Tolerance and Reduced Renal Function. *Acta Medica Okayama*. 71(5):369-380, 2017.