

## 主論文

### Deletion of pro-angiogenic factor vasohibin-2 ameliorates glomerular alterations in a mouse diabetic nephropathy model

(血管新生促進因子 vasohibin-2 欠損は、糖尿病性腎症マウスモデルにおける糸球体変化を改善させる)

#### 【緒言】

糖尿病性腎症は末期腎不全の主要な原因疾患である。腎症早期には、糸球体過剰濾過、糸球体肥大、糸球体基底膜肥厚、微量アルブミン尿が観察され、メサンギウム基質拡大、蛋白尿がそれに続く。さらに進行すると結節性硬化、蛋白尿の増加を認める。

糖尿病性腎症の発症には、血管新生の関与が示唆されており、糸球体内の **Vascular endothelial growth factor (VEGF)** 発現の増加が証明されている。動物実験では、VEGF シグナルの阻害が早期糖尿病性腎症の進行を抑制することが証明されている。

**Vasohibin-1 (VASH1)** は血管内皮由来の血管新生抑制因子であり、内皮細胞の増殖や遊走を阻害するが、糖尿病モデルマウスにおいて腎症の進展抑制効果が示されている。**Vasohibin-2 (VASH2)** は、**VASH1** のホモログとして同定されたが、**VASH1** とは対照的に、血管新生促進作用を持つ。さらに、**VASH2** は腫瘍細胞で **TGF- $\beta$**  シグナルを増強させることが証明されており、血管新生と **TGF- $\beta$**  シグナルを介して糖尿病性腎症の進行に関与する可能性がある。

本研究では、内因性 **VASH2** の欠損が糖尿病性腎症の進行に与える影響について動物モデルと培養細胞を用いて検討を行った。

#### 【材料と方法】

##### 動物実験プロトコール

雄性 C57BL/6J 系統-Wild-type (WT) 及び、**VASH-2<sup>LacZ/LacZ</sup>** マウスに、streptozotocin (STZ, 50mg/kg 体重) を 5 日間連日腹腔内注射し、1 型糖尿病モデルを作成した。投与開始後 2 週で高血糖を確認し、さらに 16 週後に採血して腎臓を摘出した。

##### 血液、尿検査と血圧測定

24 時間蓄尿を行い、尿中アルブミン及びクレアチニン排泄量、尿量を測定した。血糖は尾静脈血で確認した。血清クレアチニン、HbA1c の測定を行った。血圧測定は、テールカフ法で行った。

### 組織解析

10%ホルマリン固定パラフィン包埋組織から 4 $\mu$ m 切片を作成し, PAS 染色を行った. それぞれの腎組織切片から 20 個の糸球体を選択し, Lumina Vision software を使って平均糸球体容積, メサンギウム基質領域の評価を行った.

### 免疫蛍光法

凍結切片を用い 4 $\mu$ m 切片を作成し, 二重染色を行い, 共焦点レーザー顕微鏡で解析を行った.

### 透過電子顕微鏡

腎組織を 2.5%グルタルアルデヒド前固定, 1%四酸化オスミウム後固定後, エポキシ樹脂包埋を行い, 超薄切片を作成し, 透過電子顕微鏡により撮影した. 各糸球壁より 10 か所の lamina densa の厚さを基底膜厚として測定した. また, 糸球長も測定し, スリットの密度を評価した.

### イムノブロット法

マウス腎臓または培養細胞より蛋白質を抽出し, ウェスタンブロッティングを行った. 一次抗体として抗 VEGF-A 抗体, 抗 VEGFR2 抗体, 抗 IV 型コラーゲン抗体, 抗ヒト VASH2 抗体, 抗  $\beta$ -アクチン抗体を使用し, 二次抗体として HRP 標識抗ラビット, 抗マウス IgG 抗体を使用した.

### real-time PCR

マウス腎臓または培養細胞より RNA を抽出し, cDNA へ変換後に, リアルタイム PCR 増幅を SYBR Green PCR Master Mix を用いて行った.

### 細胞培養

ヒトメサンギウム細胞を 10%FBS, ペニシリン(100U/ml), ストレプトマイシン(100ug/ml)含有 DMEM で培養し, 通常ブドウ糖濃度 (5mM)または高ブドウ糖濃度 (25mM)による刺激を行い, VASH2 mRNA の発現レベルを評価した. また, VASH2 遺伝子ノックダウンの効果を観察するため, siRNA のトランスフェクションを行って高ブドウ糖濃度刺激し, 細胞外基質産生の評価を行った.

### 統計学的解析

結果はすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で表記した. 群間の比較は Kruskal-Wallis 法を用いて行い, 有意水準は  $P<0.05$  とした. 統計解析には JMP version10 を用いた.

## 【結果】

### VASH2 欠損マウスでは糖尿病による尿中アルブミン排泄と糸球体過剰濾過が改善した

糖尿病群では非糖尿病群に比して有意に HbA1c, 収縮期血圧の上昇を認めたが, 血清クレアチニンレベルには差が見られなかった. 体重, 収縮期血圧, HbA1c, 血清クレアチニンでは VASH2 欠損の影響は見られなかった. 糖尿病発症後も, WT マウスと VASH2 欠損マウスの間で, これらパラメーターの差は有意でなかった. 非糖尿病では, VASH2 欠損は尿中アルブミン排泄やクレアチニンクリアランスに影響を及ぼさなかった. WT マウスの糖尿病群では尿中アルブミンの著明な増加を認めたが, その増加は VASH2 欠損によって抑制された. 更に, WT マウスの糖尿病群で見られたクレアチニンクリアランスレベルの上昇は, VASH2 欠損マウスで有意に減少した.

### VASH2 欠損マウスでは糖尿病による糸球体変化が改善した

WT マウスでの糖尿病による糸球体肥大やメサンギウム拡大は VASH2 欠損で有意に改善を認めた. 電子顕微鏡で観察される糸球体濾過バリア構造も, 非糖尿病群では WT マウスと VASH2 欠損マウスの間で差はみられなかったが, 糖尿病 WT マウスで観察される基底膜肥厚やスリット密度の減少は, VASH2 欠損マウスで有意に抑制された.

### VASH2 欠損マウスでは糖尿病による糸球体毛細血管の変化が改善した

WT マウスにおいて, CD31 陽性の糸球体毛細血管領域は, 糖尿病群で著明に増加した. 非糖尿病群の WT マウスと VASH2 欠損マウスでは糸球体 CD31 陽性領域に有意差はなかったが, 糖尿病群の VASH2 欠損マウスは, 糖尿病群の WT マウスと比較しその有意な減少を示した.

非糖尿病群では, WT マウスと VASH2 欠損マウスの間で VEGF-A と VEGFR2 レベルに有意差は見られなかった. 糖尿病による VEGF-A の増加には, VASH2 欠損による影響はみられなかった. しかし, 糖尿病群で上昇した VEGFR2 発現は, VASH2 欠損により有意に抑制された.

### VASH2 欠損マウスでは糖尿病によるメサンギウム基質蓄積が改善した

糖尿病群の WT マウスでは糸球体への IV 型コラーゲンの著明な蓄積が認められた. VASH2 欠損によりそのような IV 型コラーゲン蓄積が有意に抑制され, さらにイムノブロットでも糖尿病による IV 型コラーゲン発現増加が VASH2 欠損で有意に抑制された. TGF- $\beta$ 1 は, メサンギウム細胞での細胞外基質蛋白産生を促進することが知られているが, 腎皮質の TGF- $\beta$ 1 mRNA 発現は, 糖尿病群で顕著に増加し, そのような TGF- $\beta$ 1 レベルの上昇は, VASH2 欠損により有意に抑制された.

### 糸球体での内因性 VASH2 の発現

腎皮質の内因性 VASH2 mRNA 発現は、糖尿病群で有意に上昇していた。VASH2 ノックアウトマウスでは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal) 遺伝子が VASH2 遺伝子領域に挿入されているため、VASH2 欠損マウス腎での  $\beta$ -gal 染色を行い、発現部位を確認した。非糖尿病群、糖尿病群ともに VASH2 欠損マウスでは、糸球体に  $\beta$ -gal 陽性領域を認めた。二重染色では、 $\beta$ -gal の免疫反応は、platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  陽性のメサンギウム細胞領域と一致した。

### メサンギウム細胞での細胞外基質産生への VASH2 発現の作用

培養ヒトメサンギウム細胞を用い、通常ブドウ糖濃度(NG)または高ブドウ糖濃度(HG)刺激を行い VASH2 発現の役割について検討した。HG 刺激により、VASH2 mRNA は、NG に比べ有意に上昇した。NG 下のメサンギウム細胞に VASH2 siRNA のトランスフェクションを行うことで、VASH2 蛋白発現の低下を確認した。HG 下では IV 型コラーゲン発現の上昇が観察された。VASH2 発現を抑制しても、NG ではコラーゲン産生に影響は見られなかったが、HG では有意にその産生を抑制した。

### **【考察】**

糸球体では、VEGF-A はポドサイトにより産生され、内皮細胞に作用し、糸球体の構造と機能を維持する。しかし、糖尿病により VEGF が増加すると、糸球体毛細血管数の増加とともに、糸球体内皮の透過性亢進から、濾過バリアを破綻させ蛋白尿を引き起こす。本研究では、VASH2 欠損は、糖尿病による糸球体毛細血管領域の増加を抑制したが、非糖尿病群でも糖尿病群でも VEGF レベルに影響を与えなかった。一方、糖尿病で増加する VEGFR2 発現は、VASH2 欠損で抑制され、VASH2 が内皮細胞での VEGF シグナルを亢進する可能性が示唆された。VEGF を標的とする抗血管新生療法は、血管内皮傷害を引き起こす懸念があるが、糖尿病性腎症において VASH2 を標的とする治療は、糸球体内皮傷害を引き起こさずに進行を抑制する可能性がある。

また、メサンギウム基質拡大は、糖尿病性腎症に特徴的な糸球体変化であり、その後の糸球体硬化につながる。糖尿病では、メサンギウム細胞は高血糖刺激をうけ、細胞外基質蛋白の産生を特徴とする線維芽細胞様の特性を獲得する。本研究では、VASH2 は糸球体メサンギウム細胞に局在し、糖尿病によるメサンギウム細胞の細胞外基質産生や腎 TGF- $\beta$  発現に関与することが示された。最近、VASH2 発現の増加は癌細胞の上皮間葉転換に関連することが報告されており、VASH2 は糖尿病で誘発されるメサンギウム細胞から線維芽細胞様細胞への転換に関与する可能性もある。

## 【結論】

内因性 VASH2 発現は、糸球体内皮細胞の VEGF シグナルやメサンギウム細胞の細胞外基質産生を促進させ、糖尿病性腎症の進行に関与し、新たな治療標的となる可能性が示唆された。