

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09824

研究課題名(和文) 糖尿病腎症におけるプロテインSによるマクロファージを介する炎症抑制機序の解析

研究課題名(英文) Mechanism of anti-inflammatory effect of protein S via regulation of macrophage activity in diabetic nephropathy

研究代表者

矢野 裕 (Yano, Yutaka)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10263021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、プロテインS(PS)がマクロファージ系培養細胞をM2に誘導することを示した。更に、PSの受容体に関与するMMP-2(Matrix Metalloproteinase-2)について、ヒトMMP-2過剰発現マウスとMIN6細胞を用い細胞でのアポトーシス抑制とAkt/BAD経路を介する機序を明らかにした。更に、糖尿病腎症の進展要因であるTGF- β 1を糸球体に過剰発現したマウスの腎線維化が進展することを確認し、PSの関連蛋白のトロンボモジュリンが、アポトーシス抑制を介して腎線維化を抑制することを示した。G蛋白からAktを介する経路が関与していることをポドサイト系培養細胞で明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規透析患者の中で糖尿病を原因とする患者の割合が最も多い。糖尿病腎症による末期腎不全患者の生命予後は悪く、他の合併症を併発し生活の質が低下する場合も多い。現在の降圧、血糖制御による治療は一定の効果を認められるが限界があり、腎症進展の機序を更に解析し、新規治療法を開発する必要がある。本研究は、凝固抑制蛋白であるプロテインSと関連する蛋白に注目し、マウスと培養細胞を用いて、アポトーシスの抑制による糖尿病及び糖尿病腎症に対する効果を確認し、細胞に対する機序も明らかにした。本結果は、糖尿病及び、腎症の新規治療法の開発に結び付く可能性があり、糖尿病患者の予後と生活の質の改善に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Protein S (PS) promotes M2 differentiation of cultured macrophages. TAM receptors that mediate the cytoprotective activity of PS are affected by matrix metalloproteinase-2 (MMP2). The diabetic h(human) MMP2 transgenic mice improved insulin secretion because hMMP2 inhibits islet β -cells apoptosis. MMP2 inhibits apoptosis by increasing the activation of the intracellular Akt/BAD pathway in MIN-6 β -cells. PS is an important component of the protein C/PS/thrombomodulin (TM) system. We evaluated the effect TM on kidney fibrosis and renal failure. We generated a novel glomerulus-specific human transforming growth factor- β 1 transgenic mouse that develops progressive glomerular sclerosis with renal failure. Therapy with recombinant TM ameliorated renal fibrosis and renal dysfunction by inhibiting apoptosis of podocytes. To inhibit apoptosis TM interacts with G-protein coupled receptor15 to activate the Akt signaling pathway and to upregulate the expression of anti-apoptotic proteins.

研究分野：糖尿病、内分泌

キーワード：凝固抑制蛋白 アポトーシス TGF- β 1 MMP-2 プロテインS 糖尿病腎症 トロンボモジュリン 細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 世界規模で糖尿病は増加しており、腎症による末期腎不全患者数も増加している。末期腎不全患者の生命予後は悪く、他の合併症を併発し QOL も著しく低下する。現在の降圧、血糖制御による治療は一定の効果を認めるが進展抑制には限界があるため、腎症の進展機序を更に解析し新規治療法を開発する必要がある。

(2) 活性化プロテインCの補因子であるプロテインSが、受容体である Tyro3, Ax1, Mer(TAM)受容体チロシンキナーゼを介し細胞に作用することが知られているが詳細は不明である。このプロテインSによるアポトーシスの抑制が、糖尿病においてβ細胞の保護作用と、腎症に対し進展抑制作用を有することを報告してきた。プロテインSの作用機序の解析とプロテインSに関連する蛋白で、アポトーシスの抑制に関与していると考えられる蛋白について糖尿病及び、腎症に関しての効果を検討することは、新規治療法の開発に有用であると考えられる。

2. 研究目的

(1) プロテインSによるマクロファージへの作用を検討する。

(2) プロテインSのTAM受容体チロシンキナーゼに影響を及ぼすMatrix Metalloproteinase-2(MMP-2)について、アポトーシス抑制作用の報告があり糖尿病の病態に対する影響を明らかにし、細胞レベルの機序を解析する。

(3) プロテインCの活性化の経路では、最初にトロンボモジュリンにより複合体を形成し、その後プロテインSが補因子として作用する。トロンボモジュリンがアポトーシス抑制作用を有しており、糖尿病腎症への影響とその詳細な機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウスマクロファージ由来の培養細胞である RAW264.7 細胞を用いてプロテインSによる M1 及び M2 マーカーの発現への影響を確認する。

(2) MMP-2 に関して、ヒト MMP-2 過剰発現 (hMMP2-TG) マウスをストレプトゾトシン (STZ) により糖尿病とし、hMMP-2 過剰発現による影響を検討する。また、MIN6 β 細胞を用い、hMMP-2 の作用機序を解析する。

(3) 我々が作成した腎臓の糸球体に特異的にヒト TGF-β1 を過剰発現させた Glomerulus-hTGF-β1Tg マウスを用いる。本マウスは週令とともに腎臓の線維化が進行し腎機能が悪化する性質がある。本マウスを用い、腎臓の線維化に対するヒトリコンビナントトロンボモジュリン(rhTM)の作用を検討する。更にヒト由来ポドサイド系培養細胞を用い、細胞内での作用機序を解析する。

4. 研究成果

(1) RAW264.7 細胞に対し、プロテインSにより M1 マーカーは変化なく、M2 マーカーの発現が上昇した。

(2) STZ で処理した群において、hMMP2-TG 群では野生型マウスに比較して血糖上昇が抑制され、腹腔内ブドウ糖注入試験でも同様の結果であった。hMMP2-TG 糖尿病マウスでは STZ 投与

による膵 β 細胞のアポトーシスが抑制され、細胞数が野生型マウスと比較し増加していた (図 1)。この効果は、hMMP2 の作用を阻害するドキシサイクリンの投与で抑制された。

(3) hMMP-2 により Akt が活性化され、更に BAD を活性化することが MIN6 β 細胞と STZ で処置した hMMP2-TG マウスで明らかになった

(図 2)。この経路により抗アポトーシス作用が認められることが明らかになった。また、この経路に、細胞膜上に存在するインテグリン $\beta 3$ が関与することが明らかになった。hMMP-2 が、この経路によりアポトーシスを抑制し、 β 細胞を保護している可能性が示された。

(4) Glomerulus-hTGF- $\beta 1$ Tg マウスに対して rhTM を投与したところ糸球体硬化症スコアの低下と尿細管間質の線維化の抑制が認められ、線維化マーカーの低下も認められた。アポトーシスについては、カスパーゼ 3、BAX の発現抑制、Bcl2、Bcl-XL の発現上昇を認め、抗アポトーシス作用の関与が推測された。

(5) ヒト由来ポドサイト系培養細胞を用いた検討では、TGF- $\beta 1$ による刺激でアポトーシスの促進が認め

られ、カスパーゼ 3、BAX の発現上昇が認められた。rhTM の投与によりカスパーゼ 3、BAX の発現抑制が認められ、アポトーシスの抑制が認められた。rhTM の経路の解析では、GPR15 を介する経路が明らかになり、その下流に Akt のリン酸化が促進され、カスパーゼ 3 を抑制することが明らかになった。以上より、TGF- $\beta 1$ による腎臓の線維化の促進に対し、rhTM が GPR15 を介する抗アポトーシス作用により線維化を抑制する可能性が示唆された。

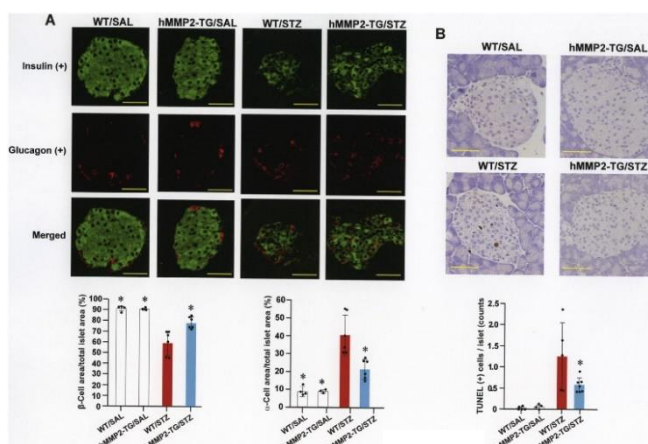


図 1

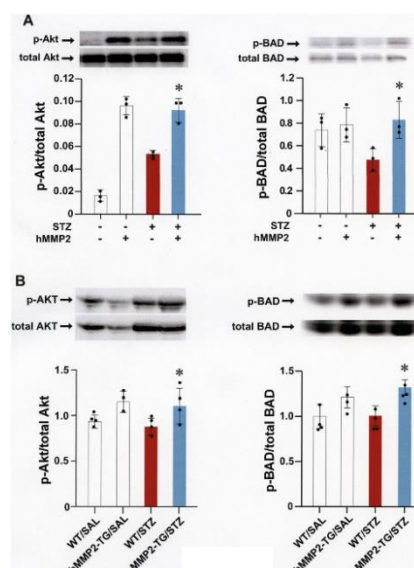


図 2

<引用文献>

1) Anti-apoptotic activity of human matrix metalloproteinase-2 attenuates diabetes mellitus.

Nishihama K, Yasuma T, Yano Y, D' Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Hinneh JA, Baffour Tonto P, Takeshita A, Totoki T, Mifuji-Moroka R, Kobayashi T, Iwasa M, Takei Y, Morser J, Cann I, Gabazza EC. *Metabolism*, 82:88-99, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishihama Kota, Yasuma Taro, Yano Yutaka, D' Alessandro-Gabazza Corina N., Toda Masaaki, Hinneh Josephine A., Baffour Tonto Prince, Takeshita Atsuro, Totoki Toshiaki, Mifuji-Moroka Rumi, Kobayashi Tetsu, Iwasa Motoh, Takei Yoshiyuki, Morser John, Cann Isaac, Gabazza Esteban C.	4. 巻 82
2. 論文標題 Anti-apoptotic activity of human matrix metalloproteinase-2 attenuates diabetes mellitus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Metabolism	6. 最初と最後の頁 88 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.metabol.2018.01.016	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

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Atsuro Takeshita, Taro Yasuma, Kenta Hozumi, Kota Nishihama, Corina N. D' Alessandro-Gabazza, Toshiaki Totoki, Masaaki Toda, Yutaka Yano, Esteban C Gabazza.
2. 発表標題 A novel mouse model of kidney fibrosis induced by glomerulus-specific overexpression of the full-length of human transforming growth factor- 1 gene
3. 学会等名 American Society for Investigative Pathology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹下 敦郎 西瀨 康太, 安間 太郎, 十時 利明、藤原研太郎、Buffour Tonto Prince, D'Alessandro-Gabazza Corina, 戸田 雅昭、小林 哲、矢野 裕、Gabazza Esteban
2. 発表標題 慢性腎疾患のマウスモデルの作成
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安間太郎, 竹下敦郎, 西瀨康太, ガバザ・コリーナ, 戸田雅昭、 矢野裕、ガバザ・エステバン
2. 発表標題 糖尿病腎症の新規治療法基盤の開発
3. 学会等名 第6回日本糖尿病療養指導学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西濱康太、安間太郎、竹下 敦郎、ガバザ コリーナ、戸田 雅昭、矢野 裕、ガバザ エステバン
2. 発表標題 遺伝子改変マウスを用いた糖尿病腎症モデルの作成
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 プロテイン S による腎保護作用の検討
2. 発表標題 矢野 裕、安間 太郎、西濱 康太、竹下 敦郎、鈴木 俊成、ガバザ エステバン
3. 学会等名 第32回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nishihama K, Yasuma T, Takeshita A, D' Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Fujiwara K, Harada E, Yano Y, Gabazza EC.
2. 発表標題 Role of matrix metalloproteinase-2 and correlation with the anticoagulant system in diabetes
3. 学会等名 The International Society on Thrombosis and Hemostasis (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 , Yasuma T, Takeshita A, Nishihama K, D' Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Fujiwara K, Harada E, Yano Y, Gabazza EC.
2. 発表標題 Protein S inhibits apoptosis of islet cells via regulating BIRC3 expression and AKT signaling
3. 学会等名 The International Society on Thrombosis and Hemostasis (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuko Okano, Akihiro Uchida, Atsuro Takeshita, Kota Nishihama, Taro Yasuma, Corina N. D'Allessandro-Gabazza, Masaaki Toda, Yutaka Yano, Esteban C. Gabazza
2. 発表標題 Protective effect of thrombomodulin against the development of diabetic nephropathy
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹下敦郎, 安間太郎, 西瀨康太, 井上知紗, 岡野優子, ガバザコリナ, 戸田雅昭, 矢野裕, ガバザエステバン
2. 発表標題 トロンボモジュリンによる慢性腎不全の制御
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担者	G a b a z z a E s t e b a n (Gabazza Esteban) (00293770)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	