

TGF- β の細胞内情報伝達系を target とした
糖尿病性腎症治療法の開発

研究課題番号 12470227

平成12年度～平成14年度科学研究費補助金
基盤研究 (B) (2) 研究成果報告書

平成15年6月

研究代表者 吉川隆一
(滋賀医科大学学長)

研究組織

研究代表者：吉川 隆一（滋賀医科大学）

研究分担者：羽田 勝計（滋賀医科大学医学部）

研究分担者：古家 大祐（滋賀医科大学医学部）

研究協力者：杉本俊郎、荒木信一、磯野元秀、一色啓二、猪木健、

西尾利樹、澤野宏隆、金崎啓造、郭宝良

研究経費

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	8,400 千円	0 千円	8,400 千円
平成13年度	3,400 千円	0 千円	3,400 千円
平成14年度	2,700 千円	0 千円	2,700 千円
総計	14,500 千円	0 千円	14,500 千円

滋賀医科大学附属図書館



2002018292

研究発表

英文学会誌

1. Inoki K, Haneda M, Ishida T, Mori H, Maeda S, Koya D, Sugimoto T, Kikkawa R: Role of mitogen-activated protein kinases as downstream effectors of transforming growth factor-beta in mesangial cells. *Kidney Int* 77, suppl.: S76-S80, 2000
2. Nishio T, Haneda M, Koya D, Inoki K, Maeda S, Kikkawa R: Cyclic AMP inhibits stretch-induced overexpression of fibronectin in glomerular mesangial cells. *Eur J Pharmacol* 437:113-122, 2002
3. Sawano H, Haneda M, Sugimoto T, Inoki K, Koya D, Kikkawa R: 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits IL-1 beta-induced cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells. *Kidney Int* 61: 1957-1967, 2002
4. Kanasaki K, Koya D, Sugimoto T, Isono M, Kashiwagi A, Haneda M: N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline inhibits TGF- β -mediated plasminogen activator inhibitor-1 expression via inhibition of Smad pathway in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 14:863-872, 2003
5. Haneda M, Koya D, Isono M, Kikkawa R: Overview of glucose signaling in mesangial cells in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14:1374-1382, 2003

口頭発表

1. 一色啓二、羽田勝計、古家大祐、杉本俊郎、前田士郎、吉川隆一: チアゾリジン誘導体は糖尿病状態の DAG-PKC 経路活性化を抑制する. 第 43 回日本腎臓学会学術総会、2000 年 5 月 11~13 日、名古屋
2. 羽田勝計、古家大祐、吉川隆一: Nephropathy. 第 43 回日本糖尿病学会年次学術集会、シンポジウム「New therapeutic approaches to diabetic complications」、2000 年 5 月 25~27 日、名古屋
3. Nishio T, Haneda M, Maeda S, Sugimoto T, Koya D, Kikkawa R: Cyclic nucleotides inhibit stretch-induced activation of MAPK cascades in rat glomerular mesangial cells. 33rd Annual Meeting, American Society of Nephrology, Oct 13-16, 2000, Toronto, Canada
4. 西尾利樹、羽田勝計、古家大祐、杉本俊郎、猪木 健、吉川隆一. 機械的伸展刺激による MAPKs の活性化および fibronectin の発現は cyclic nucleotides により抑制される. 第 44 回日本糖尿病学会年次学術集会、2001 年 4 月 16-18 日、京都
5. Haneda M, Koya D, Kikkawa R: Cellular mechanisms of the progression of diabetic nephropathy: Activation of DAG-PKC-ERK pathway. Symposium: Daibetic Nephropathy. The Second International Congress on Uremia Research, April 26-28, 2001, Nara, Japan
6. 澤野宏隆、羽田勝計、杉本俊郎、古家大祐、吉川隆一. メサンギウム細胞における 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) による cyclooxygenase-2 (COX-2) 発現の調節. 第 44 回日本腎臓学会学術総会、2001 年 5 月 27-29 日、東京
7. Haneda M, Kikkawa R: Pathogenesis of diabetic nephropathy: Significance of changes in cell signalling. IUPS Satellite Meeting on Diabetic Complications: Mechanisms Underlying

Neuronal and Vascular Changes, September 3-5, 2001, Melbourne, Australia

8. Inoki K, Haneda M, Koya D, Gao B, Kanazaki K, Kikkawa R: MEK pathway is positively and smads pathway is negatively involved in TGF- β 1-induced rat PAI-1 gene expression in glomerular mesangial cells. ASN/ISN World Congress of Nephrology, Oct 10-17, 2001, San Francisco, CA, USA
9. Sawano H, Haneda M, Sugimoto T, Inoki K, Koya D, Kikkawa R: 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 inhibits interleukin-1 β -induced cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells. ASN/ISN World Congress of Nephrology, Oct 10-17, 2001, San Francisco, CA, USA
10. Nishio T, Haneda M, Koya D, Sugimoto T, Kikkawa R: Cyclic AMP inhibits stretch-induced overexpression of fibronectin mRNA in rat glomerular mesangial cells. ASN/ISN World Congress of Nephrology, Oct 10-17, 2001, San Francisco, CA, USA
11. 磯野元秀、羽田勝計、吉川隆一、Fuad Ziyadeh: 糖尿病性腎症における TGF- β system の活性化とその抑制効果. 第 45 回日本糖尿病学会年次学術集会、シンポジウム「腎症の病態と遺伝子研究最前線」、2002 年 5 月 17-19 日、東京
12. 磯野元秀、羽田勝計、古家大祐、柏木厚典、吉川隆一、Fuad Ziyadeh: 糖尿病マウスおよび高糖濃度培養メサンギウム細胞における Smad 情報伝達経路の活性化とフィブロネクチンの発現調節. 第 45 回日本糖尿病学会年次学術集会、2002 年 5 月 17-19 日、東京
13. 古家大祐、羽田勝計、吉川隆一: 細胞内代謝異常からみた腎症治療のターゲット分子. 第 45 回日本腎臓学会学術総会、シンポジウム「糖尿病性腎症の成因と治療-Update」、2002 年 5 月 23-25 日、大阪
14. 西尾利樹、羽田勝計、前田士郎、古家大祐、猪木健、吉川隆一: 機能的伸展刺激に

- より過剰発現する fibronectin mRNA は cAMP により抑制される. 第 45 回日本腎臓学会学術総会、2002 年 5 月 23–25 日、大阪
15. 金崎啓造、羽田勝計、陳雅美、杉本俊郎、古家大祐、吉川隆一: ACE 阻害薬により増加するペプチド (Ac-SDKP) はメサンギウム細胞において DNA 合成を抑制する. 第 45 回日本腎臓学会学術総会、2002 年 5 月 23–25 日、大阪
 16. 郭宝良、羽田勝計、古家大祐、磯野元秀、澤野宏隆、吉川隆一: メサンギウム細胞における 15d-PGJ2 の TGF- β による Fibronectin 産生に対する抑制効果. 第 45 回日本腎臓学会学術総会、2002 年 5 月 23–25 日、大阪
 17. Guo B, Koya D, Isono M, Kikkawa R, Haneda M: 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 inhibits TGF-beta1-induced fibronectin expression in mouse mesangial cells. 35th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Oct 31-Nov 4, 2002, Philadelphia, USA.
 18. Kanasaki K, Koya D, Kikkawa R, Isono M, Haneda M: N-Acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline inhibits transforming growth factor-beta-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in human mesangial cells. 35th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Oct 31-Nov 4, 2002, Philadelphia, USA.
 19. 古家大祐、羽田勝計: PKC 活性と酸化ストレス. 第 46 回日本糖尿病学会年次学術集会、シンポジウム「糖尿病性腎症の発症機序の解明とその展望」、2003 年 5 月 22–24 日、富山
 20. 金崎啓造、古家大祐、羽田勝計、杉本俊郎、磯野元秀、柏木厚典、吉川隆一、羽田勝計: ACE 阻害薬により増加するペプチド (Ac-SDKP) はメサンギウム細胞において TGF- β /Smad 刺激伝達系を阻害する. 第 46 回日本腎臓学会学術総会、2003 年 5 月 22–24 日、東京

21. 郭宝良、羽田勝計、古家大祐、磯野元秀、澤野宏隆、吉川隆一：メサングウム細胞において 15d-PGJ2 の TGF- β による Fibronectin mRNA 発現を抑制する. 第 46 回日本腎臓学会学術総会、2003 年 5 月 22-24 日、東京

研究成果

糖尿病性腎症の組織学的特徴は糸球体メサンギウム領域における細胞外基質の過剰蓄積であり、その発症・進展には Transforming growth factor (TGF)- β の関与が示唆されている。すなわち、糖尿病動物や高ブドウ糖条件下で培養した腎臓構成細胞で TGF- β の発現が亢進し、糖尿病動物に抗 TGF- β 抗体の投与することにより TGF- β を抑制すると、細胞外基質蛋白の蓄積が抑制されることから、TGF- β が細胞外基質蛋白産生増加に中心的な役割を演じているサイトカインであると考えられている[1, 2]。したがって、TGF- β の細胞外基質蛋白産生作用を抑制することは糖尿病性腎症の有効な治療手段となり得ると考えられる。しかしながら、TGF- β の細胞外基質発現の細胞内情報伝達機構は十分に解明されておらず、抗 TGF- β 抗体などの投与は実用化されるに至っていない。

そこで本研究では腎臓における細胞外基質産生細胞として重要である腎糸球体メサンギウム細胞を用いて、まず TGF- β の細胞外基質である fibronectinの発現増強作用に関与する細胞内情報伝達経路を解析した。培養ラットメサンギウム細胞において、TGF- β 1 は Smad2, 3, 4 の核内移行を促進し、また mitogen-activated protein kinases (MAPKs)のうち ERK と JNK のリン酸化を亢進させた。また TGF- β 1 は fibronectin mRNA の発現を増加させ、特異的 MEK 阻害剤 (PD98059) は容量依存性に TGF- β 1 による fibronectinの遺伝子発現を抑制した。また PD98059 は Smad2, 3, 4 の核内移行には影響を及ぼさなかった[3]。以上のことより、TGF- β 1による fibronectin遺伝子発現には MEK-ERK カスケードの活性化が重要であることが示唆された。

我々は以前より高ブドウ糖条件下で培養したメサンギウム細胞や糖尿病モデル動物

の腎糸球体[4]や、糸球体高血圧の *in vitro* モデルである周期的進展刺激下のメサングウム細胞で ERK が活性化されること[5]を報告しており、ERK の活性化が糖尿病性腎症の発症進展に関わる細胞内情報伝達経路異常として重要であることを提唱してきた[6]。実際に、インスリン抵抗性改善薬のトログリタゾンを糖尿病ラットに投与すると、ERK の活性化を抑制し、糸球体過剰濾過やアルブミン尿、さらに TGF- β 1 や細胞外基質蛋白の発現を抑制することを既に報告した[7]。そこで今回はまず周期的進展刺激下の ERK の活性化や細胞外基質の発現に対する細胞内 cAMP 増加物質の prostaglandin I₂ アナログであるベラプロストソディウムの効果を検討した。ベラプロストソディウムは周期的進展刺激下の ERK の活性化さらに ERK の下流に存在する activator protein-1(AP-1)の活性化とともに fibronectin の発現増加も抑制した[8]。したがって細胞内 cAMP 増加物質は糖尿病性腎症をはじめとする糸球体高血圧を生じる腎疾患に対する有効な薬剤となりうる可能性が示唆された。

次にトログリタゾンと同様なインスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾンの TGF- β 1 による細胞外基質産生作用に対する効果を検討した。ピオグリタゾンは TGF- β 1 による fibronectin の発現増加を抑制した。ピオグリタゾンは TGF- β 1 による ERK の活性化には影響せず、AP-1 の活性化を抑制した。ピオグリタゾンは核内受容体 PPAR- γ の合成リガンドであるが、内因性の PPAR- γ リガンドである 15d-PGJ₂[9]についても検討を加えた。15d-PGJ₂ はピオグリタゾン同様 TGF- β 1 による fibronectin の発現増加を抑制したが、ERK と AP-1 の活性化をともに抑制した（投稿準備中）。以上の結果よりすでに臨床で使用されている薬剤であるベラプロストソディウムやピオグリタゾンは ERK あるいは AP-1 の活性化抑制を介して抗線維化作用を有することが明らかとなり、糖尿病性腎症に対する有効な薬剤となる可能性が示唆された。

現在まで糖尿病動物に対する抗 TGF- β 抗体投与や TGF- β 受容体キメラの過剰発現を行ない TGF- β 活性を抑制することにより、腎糸球体での細胞外基質蛋白の蓄積や腎機能障害を抑制しうる可能性が報告されている [1, 10]が、これらの手段は、安全性を含め問題点も多く臨床応用はされていない。現在、糖尿病性腎症をはじめとする進行性腎疾患に対して、腎保護作用を有する降圧薬であるアンギオテンシン変換酵素阻害薬 (ACE-I) の有効性が示されており、この薬剤の降圧作用以外の腎保護作用が注目されている。そこで我々は ACE-I により血中濃度が増加する血液幹細胞増殖抑制因子 N-Acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (Ac-SDKP)に着目し、TGF- β の細胞外基質産生作用に対する Ac-SDKP の効果を検討した。ヒト培養メサングウム細胞において、TGF- β 1 刺激後の plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), α 2(I)collagen 2 (COL1A2) の遺伝子発現は Ac-SDKP の前孵置により有意に抑制された。Ac-SDKP は TGF- β 1 刺激による Smad2 のリン酸化、Smad2,3 の核内移行、及び Smad 結合領域を含むレポーター活性を抑制した。また、Smad2 リン酸化抑制効果には Ac-SDKP の前孵置 1 時間以上が必要であった。一方、Ac-SDKP は TGF- β 1 による ERK のリン酸化を抑制せず、抑制型 Smad である Smad7 の遺伝子発現には影響を及ぼさなかった。過剰発現した Smad7 は Ac-SDKP により核から細胞質に局在変化した。この局在変化は Ac-SDKP 孵置 1 時間後から認められた [11]。以上の結果より、Ac-SDKP は抑制型 Smad である Smad7 の核から細胞質への移行を促進することにより、受容体調節型 Smad のリン酸化、核内移行を抑制し、細胞外基質関連蛋白である PAI-1、COL1A2 の発現を抑制することが明らかとなった。本研究により ACE-I は Ac-SDKP の血中濃度増加を介した新たな抗線維化作用を有することが明らかとなり、Ac-SDKP が糖尿病性腎症に対する創薬を考えていく上で新たな標的となる可能性が示された。

References

1. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-de la Cruz MC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan TA, Sharma K: Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression and glomerular mesangial matrix expression by treatment with monoclonal anti-TGF- β antibody in *db/db* diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8015-8020, 2000
2. Chen S, Hong SW, Iglesias-de la Cruz MC, Isono M, Casaretto A, Ziyadeh FN: The key role of the transforming growth factor-beta system in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Ren Fail* 23:471-481, 2001
3. Inoki K, Haneda M, Ishida T, Mori H, Maeda S, Koya D, Sugimoto T, Kikkawa R: Role of mitogen-activated protein kinases as downstream effectors of transforming growth factor-beta in mesangial cells. *Kidney Int* 77, suppl.:S76-S80, 2000
4. Haneda M, Araki S, Togawa M, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R: Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes* 46:847-853, 1997
5. Ishida T, Haneda M, Maeda S, Koya D, Kikkawa R: Stretch-induced overproduction of fibronectin in mesangial cells is mediated by the activation of mitogen-activated protein kinase. *Diabetes* 48:595-602, 1999
6. Haneda M, Koya D, Isono M, Kikkawa R: Overview of glucose signaling in mesangial cells in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14:1374-1382, 2003

7. Isshiki K, Haneda M, Koya D, Maeda S, Sugimoto T, Kikkawa R: Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats. *Diabetes* 49:1022-1032, 2000
8. Nishio T, Haneda M, Koya D, Inoki K, Maeda S, Kikkawa R: Cyclic AMP inhibits stretch-induced overexpression of fibronectin in glomerular mesangial cells. *Eur J Pharmacol* 437:113-122, 2002
9. Sawano H, Haneda M, Sugimoto T, Inoki K, Koya D, Kikkawa R: 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits IL-1 beta-induced cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells. *Kidney Int* 61: 1957-1967, 2002
10. Imai E, Isaka Y: Strategies of gene transfer to the kidney. *Kidney Int* 53:264-272, 1998
11. Kanasaki K, Koya D, Sugimoto T, Isono M, Kashiwagi A, Haneda M: N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline inhibits TGF- β -mediated plasminogen activator inhibitor-1 expression via inhibition of Smad pathway in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 14:863-872, 2003