

一瀬邦弘 論文内容の要旨

主 論 文

Antiangiogenic endostatin peptide ameliorates renal alterations in the early stage of a type 1 diabetic nephropathy model

(血管新生抑制因子 Endostatin peptide による早期糖尿病性腎症進展抑制効果の検討)

(一瀬邦弘, 前島洋平, 山本佳彦, 来山浩之, 高沢有紀, 広越久美子, 杉山 斉, 山崎康司, 江口勝美, 榎野博史)

(Diabetes・54 巻 10 号 2891-2903 2005 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：江口勝美教授)

緒 言

現在、我が国において維持透析患者の原因疾患では、糖尿病性腎症が最多であり、糖尿病性腎症の進展機序の解明および新たな治療法の開発は重要な課題である。糖尿病性腎症では、早期に糸球体過剰濾過・糸球体肥大、引き続いて糸球体基底膜の肥厚・メサンギウム基質の増加や尿中アルブミン排泄増加が認められ最終的には糸球体硬化に到る。腎症早期の段階で、糸球体係蹄数の増加・既存の血管の伸長等の「血管新生」様の現象が認められる。1 型及び 2 型糖尿病の進展に TGF-beta1, IGF-1 等の種々の増殖因子が関与するが、血管新生促進因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) の関与が報告された。血管基底膜を形成する XVIII 型コラーゲンの NC ドメインに由来する Endostatin は、血管新生・腫瘍増殖を阻害する。また、Endostatin はこれまでに固形腫瘍を対象として米国等にて臨床試験が実施されており、重大な副作用発生事例の報告は無く、投与時の安全性も確立されていると考えられる。

今回、血管新生抑制物質 Endostatin peptide を 1 型糖尿病モデルマウスに投与し腎症進展制御効果を検討した。

対象と方法

雄性 C57/BL6 マウスを実験に用いた。C57/BL6 マウスに streptozotocin (100 mg/kg) を隔日 3 回腹腔内投与し、高血糖(250 mg/dl 以上)を確認した後に、PBS (対照群) もしくは endostatin peptide (1 or 5 mg/kg 体重) を浸透圧ミニポンプに充填し皮下に埋め込み、4 週間にわたり持続投与した(n=6)。その後、血糖値、尿中アルブミン・クレ

アチニン比 (UACR), 24 時間クレアチンクリアランス (Ccr), 体重, 腎重量を測定した。PAS 染色光顕切片にて糸球体容積およびメサンギウム matrix index を測定した。酵素抗体法を用いて、単球/マクロファージのマーカーである F4/80 発現を観察し、間接蛍光抗体法を用いて内皮細胞マーカー CD31、IV 型コラーゲン発現、および $\alpha 5$ インテグリンと CD31 の二重染色を行った。また腎皮質より RIPA buffer を用いて蛋白抽出し、Western blot により VEGF, angiopoietin (Ang)-1, -2 及び Flk-1, (VEGF の受容体), Tie-2 (Ang-1 の受容体), nephrin (糸球体上皮細胞に存在するスリット膜構成蛋白) の発現変化を検討した。さらに腎皮質より total RNA を抽出し real-time PCR 法にて IL-6, MCP-1, nephrin の発現変化を検討した。

結 果

治療開始後 4 週の時点で、糖尿病マウスにて高血糖値, 体重減少を認めたが、endostatin peptide 投与による影響は認められなかった。腎重量 / 体重比は糖尿病マウス群にて非糖尿病マウス群に比して有意に増加したが、endostatin peptide 投与群にて有意な抑制効果を認めた。UACR 及び Ccr は糖尿病マウス群にて非糖尿病マウス群に比して有意に高値を呈したが、endostatin peptide 投与により濃度依存性に有意な抑制効果を認めた (糸球体過剰濾過の是正効果)。糸球体容積は、糖尿病マウス群にて非糖尿病マウス群に比して増加し、endostatin peptide 投与により濃度依存性に有意な抑制効果を認めた (糸球体肥大の抑制効果)。糖尿病群の糸球体における、メサンギウム基質の増加、IV 型コラーゲン陽性領域の増加が endostatin peptide 投与により濃度依存性に有意に抑制された。さらに、糸球体内単球/マクロファージ浸潤も endostatin peptide 投与により抑制された。糸球体における CD31(+)内皮細胞領域は糖尿病群にて増加したが、endostatin peptide 投与により抑制された。腎皮質における VEGF, angiopoietin-2 蛋白発現は糖尿病マウス群にて非糖尿病マウス群に比して有意に増加し、endostatin peptide 投与群にて有意な抑制効果を認めた。angiopoietin-1, Tie-2 発現は群間での差を認めなかった。real-time PCR により nephrin mRNA 発現について検討したが、糖尿病群にて nephrin 発現が低下し、endostatin peptide 投与群にて部分的な回復効果を認めた。Endostatin の受容体である $\alpha 5$ インテグリンと CD31 の蛍光二重染色では、糖尿病群で共在しかつ発現が増加しており、endostatin peptide が主として糸球体内皮細胞を介して作用するものと考えられた。

考 察

endostatin peptide は、1 型糖尿病性腎症モデルにおける腎病変の進展を血管新生関連因子制御等の機序を介して、抑制し得たものと考えられた。