

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15985

研究課題名(和文) 糖尿病腎症における糸球体メサンギウム細胞ROCK1の意義

研究課題名(英文) ROCK1 activation induces mesangial damage in diabetes

研究代表者

的場 圭一郎(Matoba, Keiichiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20459647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病腎症の病態進行にともなう健康寿命の低下は、現在大きな臨床的課題となっている。低分子量GTP結合蛋白Rhoの下流分子であるROCK1は、糖尿病腎症の腎組織で活性化されており、エネルギー代謝異常を介した組織障害に関与することが明らかとなった。本研究は、ROCK1が新たな糖尿病腎症の治療標的となることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病腎症に対するこれまでの治療は、糖尿病や高血圧などのリスク因子管理が主体であり、病態に直接アプローチする方法が存在しなかった。本研究は、ROCK1が糖尿病腎症の糸球体エネルギー代謝異常に強く関与することを示唆しており、新たな創薬ターゲットとして期待される。

研究成果の概要(英文)：Given the worldwide increase in diabetes and end-stage renal disease, with increased risk of death, there is a pressing need to stop the progression of renal dysfunction. Although efforts have been made to develop medications for chronic kidney disease (CKD) in patients with diabetes, there still remains a high residual risk for CKD progression and cardiovascular mortality. The present study identifies ROCK1 as a critical regulator of glomerular metabolism in diabetes. Specifically, we show that ROCK1-deficient mice are protected from albuminuria and mesangial expansion in type 2 diabetes model. Mechanistically, our studies suggest that ROCK1 regulates fatty acid utilization and redox homeostasis. When considered alongside previous reports demonstrating pathogenic roles of ROCK1 in other renal cells, these observations identify ROCK1 as a promising therapeutic target against CKD in patients with diabetes.

研究分野：糖尿病腎症

キーワード：糖尿病腎症 糖尿病 慢性腎臓病 Rho-kinase ROCK1 エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

糖尿病腎症を有する患者数は世界的規模で増加の一途を辿っており、そのステージ進行にともなう生命予後低下と quality of life (QOL) 悪化が大きな臨床的課題となっている。Rho-kinase (ROCK) は糖尿病の腎皮質で活性化されており、糖尿病腎症の病態に関与している。一方、ROCK には ROCK1・2 という二つのアイソフォームが存在するが、機能的分担は十分理解されていない。これまでの予備的検討では、糸球体メサンギウム細胞において、ROCK1 が脂質エネルギー代謝に関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、ROCK1 欠損マウスを用いて糖尿病モデルマウスを作製し、糖尿病腎症の進展過程における ROCK1 の役割を明らかにする。ROCK1 を介した糖尿病腎症の未だ解明されていない分子メカニズムを同定し、腎不全への進行を阻止する新たな治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

腎糸球体メサンギウム細胞における ROCK1 のアイソフォーム特異的な役割を、分子生物学的手法を用いて明らかにする。ROCK1 には特異的な阻害薬が存在しないため、その役割を解析するには遺伝子操作が不可欠であり、RNAi を利用した *in vitro* の予備実験データを基に、申請者らが保有している ROCK1 欠損マウス (以下、R1KO) を用いた研究を行った。

4. 研究成果

(1) ROCK1 欠損マウスから単離したメサンギウム細胞を用いた *ex vivo* 解析

糖尿病腎症を含む慢性腎臓病患者の腎組織では、脂肪酸代謝酵素の発現低下から ATP 産生が障害され、細胞死が引き起こされている。申請者らは、培養メサンギウム細胞において、transforming growth factor (TGF- β) がこのような代謝障害を誘導する因子であることを見出した。脂肪酸代謝関連遺伝子の発現は AMP-activated protein kinase (AMPK) によって調節を受けているが、ROCK1 をノックダウンしたところ、AMPK シグナルの低下が回復した。

以上より、ROCK1 は AMPK を介して脂質エネルギー代謝を負に制御すると考えられる。R1KO から糸球体メサンギウム細胞を初代培養し、TGF- β の刺激下で脂肪酸代謝経路の酵素発現レベルと ATP 産生量、ミトコンドリア呼吸 (酸素消費速度) を評価したところ、培養メサンギウム細胞と同様の結果が得られた。

(2) 糖尿病モデルマウス作製と単離糸球体メサンギウム細胞の網羅的遺伝子解析

ROCK1 は全身に広く発現しているため、糸球体構成細胞における役割を生体で解析するには、組織特異的遺伝子改変が望ましい。しかし、メサンギウム細胞特異的にこのような操作を行う技術は確立されていないため、R1KO を実験に用いた。R1KO に対して高脂肪食を投与することで腎症の発症・進展を評価したところ、R1KO では糖尿病腎症の特徴的所見である尿アルブミン値の増加や糸球体硬化が軽度であった。

次に、磁気ビーズとコラゲナーゼ処理により、マウス腎組織からメサンギウム細胞を分取し、

脂肪酸代謝関連遺伝子の発現を qPCR で確認するとともに、RNA-Seq による遺伝子発現プロファイリングを行った。その結果、ROCK1 欠損によって代謝経路の transcriptome に大きな変化を認め、腎症の表現型差異を決定する経路の一つと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matoba K, Takeda Y, Nagai Y, Kanazawa Y, Kawanami D, Yokota T, Utsunomiya K, Nishimura R	4. 巻 in press
2. 論文標題 ROCK inhibition may stop diabetic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JMA Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Matoba K, Takeda Y, Nagai Y, Yokota T, Utsunomiya K, Nishimura R	4. 巻 8
2. 論文標題 Targeting redox imbalance as an approach for diabetic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 E40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines8020040	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 -
1. 著者名 Akamine T, Takaku S, Suzuki M, Niimi N, Yako H, Matoba K, Kawanami D, Utsunomiya K, Nishimura R, Sango K	4. 巻 153
2. 論文標題 Glycolaldehyde induces sensory neuron death through activation of the c-Jun N-terminal kinase and p-38 MAP kinase pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol	6. 最初と最後の頁 111-119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-019-01830-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagai Y, Matoba K, Kawanami D, Takeda Y, Akamine T, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Utsunomiya K, Nishimura R	4. 巻 317
2. 論文標題 ROCK2 regulates TGF- β -induced expression of CTGF and profibrotic genes via NF- κ B and cytoskeleton dynamics in mesangial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Physiol Renal Physiol	6. 最初と最後の頁 F839-F851
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajprenal.00596.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matoba K, Takeda Y, Nagai Y, Kawanami D, Utsunomiya K, Nishimura R	4. 巻 20
2. 論文標題 Unraveling the role of inflammation in the pathogenesis of diabetic kidney disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 3393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20143393	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 -

1. 著者名 Han S, Ray JW, Pathak P, Sweet DR, Zhang R, Gao H, Jain N, Koritzinsky EH, Matoba K, Xu W, Chan ER, Simon DI, Jain MK	4. 巻 1
2. 論文標題 KLF15 regulates endobiotic and xenobiotic metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Metab	6. 最初と最後の頁 422-430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-019-0054-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeda Yusuke, Matoba Keiichiro, Kawanami Daiji, Nagai Yosuke, Akamine Tomoyo, Ishizawa Sho, Kanazawa Yasushi, Yokota Tamotsu, Utsunomiya Kazunori	4. 巻 20
2. 論文標題 ROCK2 Regulates Monocyte Migration and Cell to Cell Adhesion in Vascular Endothelial Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1331 ~ 1331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20061331	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15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Matoba K, Takeda Y, Nagai Y, Akamine T, Kanazawa Y, Yokota T, Utsunomiya K, Nishimura R
2. 発表標題 Renal distribution and expression analysis of ROCK isoforms in diabetic kidney disease
3. 学会等名 American Diabetes Association 80th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeda Y, Matoba K, Kawanami D, Nagai Y, Kanazawa Y, Kawanami D, Utsunomiya K, Nishimura R
2. 発表標題 Ablation of endothelial ROCK2 promotes fat browning and improves metabolic dysfunction
3. 学会等名 American Diabetes Association 80th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nagai Y, Matoba K, Takeda Y, Akamine T, Yokota T, Kawanami D, Utsunomiya K, Nishimura R
2. 発表標題 ROCK1/AMPK axis regulates the development of diabetic kidney disease via modulation of fatty acid metabolism
3. 学会等名 American Diabetes Association 80th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 的場 圭一郎, 竹田 裕介, 永井 洋介, 赤嶺 友代, 金澤 康, 川浪 大治, 横田 太持, 宇都宮 一典, 西村 理明
2. 発表標題 腎糸球体ROCK2の生理的機能と糖尿病腎症における病態意義
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹田 裕介, 的場 圭一郎, 永井 洋介, 金澤 康, 川浪 大治, 横田 太持, 宇都宮 一典, 西村 理明
2. 発表標題 血管内皮ROCK2欠損は白色脂肪細胞の褐色化を介して糖・脂質代謝を改善する
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永井 洋介, 的場 圭一郎, 竹田 裕介, 赤嶺 友代, 横田 太持, 川浪 大治, 八子 英司, 三五 一 憲, 宇都宮 一典, 西村 理明
2. 発表標題 ROCK1/AMPK axisによる脂肪酸の利用障害を介した糖尿病腎症進展機構
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matoba K, Kawanami D, Takeda Y, Nagai Y, Utsunomiya K
2. 発表標題 ROCK2 activation accelerates podocyte injury in diabetic kidney disease
3. 学会等名 American Diabetes Association 79th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeda Y, Matoba K, Kawanami D, Nagai Y, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Utsunomiya K
2. 発表標題 ROCK2 regulates monocyte migration and cell to cell adhesion in vascular endothelial cells
3. 学会等名 American Diabetes Association 79th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagai Y, Kawanami D, Matoba K, Takeda Y, Akamine T, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Utsunomiya K
2. 発表標題 ROCK2 regulates TGF- β -induced expression of CTGF and profibrotic genes via NF- κ B and cytoskeleton dynamics in the mesangial cells
3. 学会等名 American Diabetes Association 79th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 的場 圭一郎, 川浪 大治, 永井 洋介, 赤嶺 友代, 竹田 裕介, 石澤 将, 金澤 康, 横田 太持, 宇都宮 一典
2. 発表標題 腎組織におけるROCKアイソフォーム発現分布
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

1. 発表者名 竹田 裕介, 的場 圭一郎, 川浪 大治, 永井 洋介, 石澤 将, 金澤 康, 横田 太持, 宇都宮 一典
2. 発表標題 ROCK2は血管内皮において単球の遊走と接着を制御する
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

1. 発表者名 永井 洋介, 的場 圭一郎, 川浪 大治, 竹田 裕介, 赤嶺 友代, 石澤 将, 金澤 康, 横田 太持, 宇都宮 一典
2. 発表標題 ROCK1/AMPKシグナルを介した脂肪酸代謝障害による糖尿病腎症進展機構
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

1. 発表者名 竹田 裕介, 的場 圭一郎, 川浪 大治, 永井 洋介, 赤嶺 友代, 石澤 将, 金澤 康, 横田 太持, 宇都宮 一典
2. 発表標題 ROCK2は血管内皮における接着分子の発現と単球接着を制御する
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 永井 洋介, 川浪 大治, 的場 圭一郎, 竹田 裕介, 赤嶺 友代, 石澤 将, 金澤 康, 横田 太持, 宇都宮 一典
2. 発表標題 Rho-kinaseはメサングウム細胞においてアクチン動態を介して糸球体硬化を制御する
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 川浪 大治, 的場 圭一郎, 永井 洋介, 竹田 裕介, 赤嶺 友代, 石澤 将, 金澤 康, 横田 太持, 宇都宮 一典
2. 発表標題 糖尿病腎症の病態解明cutting edge 糖尿病腎症の発症・進展におけるRho-kinaseの意義
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/keiichiro.matoba/
--

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------