

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08714

研究課題名(和文) 糸球体内皮機能障害による糖尿病性腎臓病発症・進展機構の解明

研究課題名(英文) Role of endothelial dysfunction in diabetic kidney disease

研究代表者

川浪 大治 (Kawanami, Daiji)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：50568889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎臓病は我が国における透析導入原疾患の第一位であり、その成因の解明と新たな治療法の開発が急務の課題となっている。我々は本研究において低分子量GタンパクRhoのエフェクターであるROCK2が糖尿病環境下で糸球体内皮および上皮細胞機能を破綻させ糖尿病性腎臓病の発症・進展に重要な役割を担っていることが明らかになった。今後、ROCK2を標的とした新たな治療戦略の構築が望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者の末期腎不全への進展抑制は患者の生命予後改善のみならず医療経済的にも重要な課題である。糖尿病性腎臓病は現在のところ血糖、血圧、脂質といったリスクファクターの管理に大きく依存しており、成因の解明とそれに応じた治療法の開発が求められている。本研究ではROCK2が腎糸球体において内皮細胞機能および上皮細胞機能障害を誘導し、糖尿病性腎臓病の発症・進展を抑制することを明らかにした。ROCK2阻害薬は臨床応用に向けて開発が進んでおり、新たな糖尿病性腎臓病治療薬としての可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Diabetic kidney disease (DKD) is a leading cause of end stage renal disease. In the present study we demonstrated that ROCK2, an effector of small G protein Rho, induces glomerular endothelial and epithelial dysfunction, resulting in the development of DKD. ROCK2 could be an important therapeutic target of DKD.

研究分野：糖尿病性腎臓病

キーワード：糖尿病性腎臓病 糖尿病性腎症 Rho-kinase

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎臓病(DKD)は本邦における透析導入原疾患第一位であり、成因の究明と新たな治療戦略の構築が急務の課題となっている。糖尿病では血管内皮機能障害がみられ、DKDの重要な成因として注目されている。糸球体内皮における VEGF を介した血管新生亢進が糸球体過剰濾過につながり、血管内皮表面を覆う糖タンパクであるグリコカリックスの破壊および血管内皮における tight junction (TJ) protein の減少が血管透過性を亢進させる。さらに eNOS の発現減少が加わることで、アルブミン尿、糸球体硬化につながると考えられている。このような背景から、血管内皮機能障害を制御する因子を同定することは、DKD における新たな治療標的の確立に結びつく可能性がある。低分子量 G タンパク Rho とそのエフェクターである Rho-kinase はアクチン重合を介した細胞収縮のほか、増殖や遊走などを調節する細胞内シグナルである。申請者らは糖尿病環境下の腎組織では Rho-kinase が活性化しており、メサンギウム細胞において HIF-1 を介した低酸素応答による細胞外基質産生増加(Matoba, et al. *Kidney Int* 2013)、NF- κ B の活性化を介した腎組織へのマクロファージの浸潤(Matoba, et al. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014)を促進することを報告してきた。Rho-kinase には ROCK1 と ROCK2 の 2 つのアイソフォームがあり、機能分担が存在すると考えられている。我々は、ROCK2 が Notch シグナルを介したポドサイトのアポトーシスを制御することを明らかにした(Matoba et al. *Int J Mol Sci* 2017)。この結果は ROCK2 が DKD における重要な治療標的になることを示唆している。しかしながら、ROCK2 が糸球体血管内皮機能障害の成立にどのように関与するかは明らかにならず、この点に主眼をおいた研究がなされていなかった。

2. 研究の目的

DKD の治療は血糖や血圧といったリスクファクターの管理に大きく依存しており、特異的な治療法が確立されていない。近年、インクレチン関連薬や SGLT2 阻害薬の腎保護効果が注目されているが、薬剤が持つ多面的な効果の一つであることから、成因に応じた薬物療法の開発が求められている。さらに DKD 患者は末期腎不全だけではなく心血管疾患のハイリスク群であることから、包括的視点に立った治療戦略の確立が必須である。

このような背景から、申請者は糖尿病微小血管症および大血管症に共通する基盤病態である血管内皮機能に着目した。血管内皮機能を制御する因子の同定と、これを標的とした治療戦略の構築が、DKD が抱える臨床的課題の解決につながるのではないかとこの着想に至った。

申請者は、これまでの検討から ROCK2 が血管内皮機能を制御すること、そしてポドサイト機能を調節することを確認している。DKD の発症には血管内皮とポドサイトとの間にクロストークが存在すると考えられており、両者をつなぐ因子としての ROCK2 の役割も明らかにしていきたい。糸球体内皮機能障害は血行動態を悪化させるだけではなく、血管透過性の亢進、ポドサイトとのクロストークを介して DKD の発症・進展に重要な役割を果たすことが知られている。Rho-kinase は糖尿病環境下の腎組織において活性化している細胞内シグナルである。我々は Rho-kinase の活性化がメサンギウム細胞における細胞外基質やケモカインの産生増加に加え、ポドサイトのアポトーシス誘導にも関与することを報告してきた。Rho-kinase には ROCK1 と ROCK2 の 2 つのアイソフォームが存在する。申請者らは ROCK2 が血管内皮機能障害を惹起する主要アイソフォームであることを確認し、血管内皮特異的 ROCK2 欠損マウスを樹立した。本研究では、このマウスを用いて糖尿病モデルを作製し、糸球体内皮 ROCK2 が DKD に果たす機能を解析し、その治療学的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Cre-loxP システムを用いて血管内皮特異的(VE-cadherin-Cre)およびポドサイト特異的(Podocin-Cre)ROCK2 欠損マウスを作成した (Figure 1)。それぞれのマウスに糖尿病を発症させ、DKD の発症・進展に与える影響について解析を行った。また、培養細胞を用いた実験では siRNA を用いた ROCK2 のノックダウンを行った。ROCK2 欠損が糸球体硬化に与える影響とそれに関連する因子については RNA-seq による解析を行った。

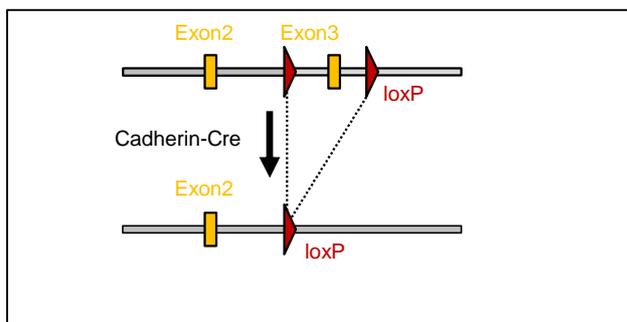


Figure 1. ROCK2 floxマウスの作成
Cre-loxPを用いて臓器特異的ROCK2欠損マウスを交配させた。

4. 研究成果

我々が独自に作製した ROCK2^{flox} マウスと、血管内皮特異的に Cre recombinase を発現する VE-cadherin Cre マウスを交配し、血管内皮特異的 ROCK2 欠損マウスを得た。60%高脂肪食投与下を行ったところ野生型マウスと比較して血管内皮特異的 ROCK2 欠損マウスでは体重増加が抑制されていた。また、内臓脂肪の蓄積、耐糖能の悪化が抑制された。さらに、血管内皮特異的 ROCK2 欠損マウスの白色脂肪組織重量は軽く、oil Red O 染色で検討したところ、脂肪細胞径も小さいことを見出した (Figure 2)。白色脂肪組織内に褐色脂肪細胞が誘導される“褐色化”は、個体の熱産生機能を活性化させ、肥満の抑制や糖・脂質代謝の改善効果が期待され、M2 マクロファージがこの促進因子として機能することが知られている。興味深いことに、血管内皮特異的 ROCK2 欠損マウスの白色脂肪組織では褐色化を誘導する転写因子 PPAR の発現増加と、この制御下にある褐色脂肪細胞特異的遺伝子の発現増加、M2 マクロファージマーカーの増加を認めた。また、コントロールマウスでは高脂肪食負荷においてアルブミン尿の排泄亢進を認め、糖尿病性腎臓病が発症したが、血管内皮特異的 ROCK2 欠損マウスではアルブミン尿の排泄低下がみられ、糖尿病性腎臓病の抑制効果が認められる可能性が明らかになった。このことは、ROCK2 が糖尿病性腎臓病の病態形成に極めて重要な意義を持つことを示している。これらの現象は ROCK2 欠損によって血管内皮機能が改善したことや、体重増加抑制、耐糖能改善など複合的な要因でもたらされたと考えられる。実際、ストレプトゾトシン糖尿病マウスや 2 型糖尿病モデルである db/db マウス、高脂肪食負荷マウスでは糸球体の中でもポドサイト(nephrin 陽性)における ROCK2 の発現が増加していた (Figure 3)。

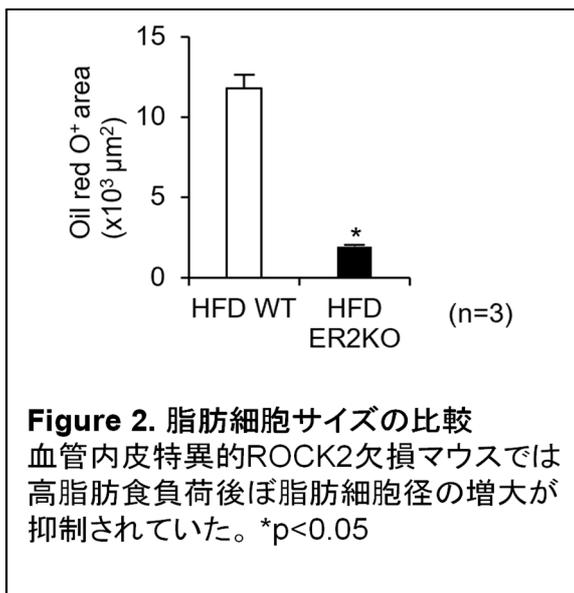


Figure 2. 脂肪細胞サイズの比較
血管内皮特異的ROCK2欠損マウスでは高脂肪食負荷後脂肪細胞径の増大が抑制されていた。*p<0.05

このことから、糸球体内皮だけではなく、ポドサイトにおいても ROCK2 は糖尿病性腎臓病の発症・進展に重要な役割を担っていることが予想された。

これを証明するため、ROCK2^{flox} マウスと podocin Cre マウスを交配させることによりポドサイト特異的 ROCK2 欠損マウスを作成して検討を行った。その結果、このマウスでは高脂肪食によって誘導された糖尿病環境下において尿中アルブミン排泄量や糸球体硬化が抑制された(Figure 4)。また、ポドサイトの喪失や足突起の融合といった糖尿病性腎臓病に特徴的な組織学的な変化が抑制されていることが電子顕微鏡を用いた検討で示された。培養ポドサイトを用いたメカニズムの検討では、ROCK2 を欠損したポドサイトでは PPAR α の発現が増加しており、このこと

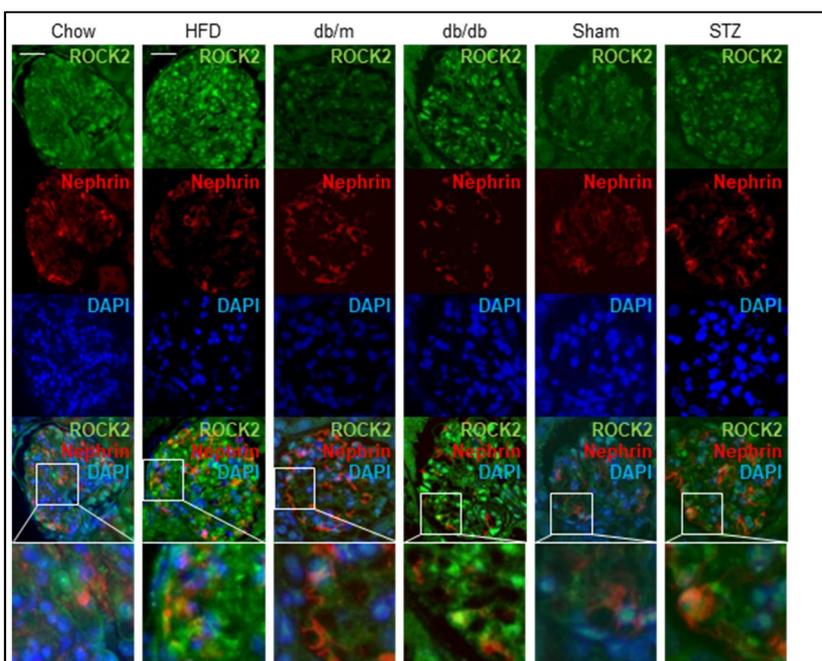
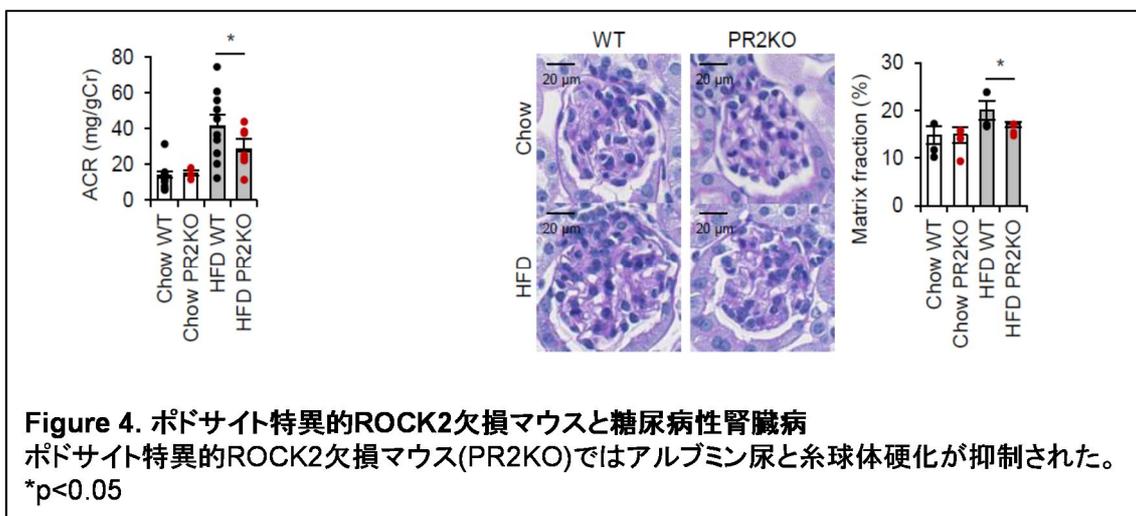


Figure 3. 糖尿病環境下におけるROCK2の発現
異なる糖尿病モデルにおいてポドサイトにおけるROCK2発現レベルは増加した。HFD, high-fat diet; STZ, streptozotocin

によって脂肪酸代謝障害が低減されていることが示された。さらには、TUNEL 染色で評価を行ったところ、ROCK2 をノックダウンしたポドサイトにおいては TGF- β によって誘導されるアポトーシスが抑制されていることが明らかになった。以上の結果から、ROCK2 は血管内皮とポドサイトにおいて細胞機能

を制御し、糖尿病性腎臓病の発症・進展に重要な役割を担うことが明らかになった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Kawanami Daiji, Takashi Yuichi, Muta Yoshimi, Oda Naoki, Nagata Dai, Takahashi Hiroyuki, Tanabe Makito	4. 巻 12
2. 論文標題 Mineralocorticoid Receptor Antagonists in Diabetic Kidney Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 754239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.754239	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 Takashi Yuichi, Kawanami Daiji	4. 巻 23
2. 論文標題 The Role of Bone-Derived Hormones in Glucose Metabolism, Diabetic Kidney Disease, and Cardiovascular Disorders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2376 ~ 2376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23042376	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 Keiichiro, Takeda Yusuke, Nagai Yosuke, Sekiguchi Kensuke, Ukichi Rikako, Takahashi Hiroshi, Aizawa Daisuke, Ikegami Masahiro, Tachibana Toshiaki, Kawanami Daiji, Kanazawa Yasushi, Yokota Tamotsu, Utsunomiya Kazunori, Nishimura Rimei	4. 巻 5
2. 論文標題 ROCK2-induced metabolic rewiring in diabetic podocytopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03300-4	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 Kawanami Daiji, Takashi Yuichi, Takahashi Hiroyuki, Motonaga Ryoko, Tanabe Makito	4. 巻 10
2. 論文標題 Renoprotective Effects of DPP-4 Inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 246 ~ 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10020246	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 Horikawa Tsuyoshi, Kawanami Takako, Hamaguchi Yuriko, Tanaka Yuki, Kita Shotaro, Ryorin Ryutaro, Takashi Yuichi, Takahashi Hiroyuki, Tanabe Makito, Yanase Toshihiko, Kawanami Daiji, Nomiya Takashi	4. 巻 6
2. 論文標題 Penafibrate, a PPAR alpha agonist, attenuates neointima formation after vascular injury in mice fed normal chow and a high-fat diet	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05431 ~ e05431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e05431	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 Keiichiro Matoba, Yusuke Takeda, Yosuke Nagai, Yasushi Kanazawa, Daiji Kawanami, Tamotsu Yokota, Kazunori Utsunomiya, Rimei Nishimura	4. 巻 3
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 154 ~ 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31662/jmaj.2020-0014	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 Yamauchi Toshimasa, Kamiya Hideki, Utsunomiya Kazunori, Watada Hirotsuka, Kawanami Daiji, Sato Junko, Kitada Munehiro, Koya Daisuke, Harada Norio, Shide Kenichiro, Joo Erina, Suzuki Ryo, Bouchi Ryotaro, Ohta Yasuharu, Kondo Tatsuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Medical nutrition therapy and dietary counseling for patients with diabetes-energy, carbohydrates, protein intake and dietary counseling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetology International	6. 最初と最後の頁 224 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13340-020-00437-7	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 Kawanami Daiji, Takashi Yuichi	4. 巻 11
2. 論文標題 GLP-1 Receptor Agonists in Diabetic Kidney Disease: From Clinical Outcomes to Mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 967 ~ 967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2020.00967	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 Kawanami Daiji, Takashi Yuichi, Tanabe Makito	4. 巻 21
2. 論文標題 Significance of Metformin Use in Diabetic Kidney Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4239 ~ 4239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21124239	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 Yusuke Takeda, Keiichiro Matoba, Daiji Kawanami, Yosuke Nagai, Tomoyo Akamine, Sho Ishizawa, Yasushi Kanazawa, Tamotsu Yokota, Kazunori Utsunomiya	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 E1331
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 -

1. 著者名 Keiichiro Matoba, Yusuke Takeda, Yosuke Nagai, Daiji Kawanami, Kazunori Utsunomiya, Rimei Nishimura.	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 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 E3393
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 Yosuke Nagai, Keiichiro Matoba, Daiji Kawanami, Yusuke Takeda, Tomoyo Akamine, Sho Ishizawa, Yasushi Kanazawa, Tamotsu Yokota, Kazunori Utsunomiya, Rimei Nishimura	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 American Journal of Physiology Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 839-851
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomoyo Akamine, Shizuka Takaku, Mari Suzuki, Naoko Niimi, Hideji Yako, Keiichiro Matoba, Daiji Kawanami, Kazunori Utsunomiya, Rimei Nishimura & Kazunori Sango	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 2019年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	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 Komatsu Shiho, Nomiya Takashi, Numata Tomohiro, Kawanami Takako, Hamaguchi Yuriko, Iwaya Chikayo, Horikawa Tsuyoshi, Fujimura-Tanaka Yuki, Hamanoue Nobuya, Motonaga Ryoko, Tanabe Makito, Inoue Ryuji, Yanase Toshihiko, Kawanami Daiji	4. 巻 67
2. 論文標題 SGLT2 inhibitor ipragliflozin attenuates breast cancer cell proliferation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 99 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ19-0428	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川浪大治, 的場圭一郎, 高土祐一, 前田泰孝, 竹田祐介, 永井洋介, 豊川恭子, 小田直樹, 南 昌江, 宇都宮一典, 西村理明
2. 発表標題 糖尿病性腎臓病におけるリン代謝、FGF23とRho-kinaseの関与
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021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	的場 圭一郎 (Keiichiro Matoba) (20459647)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	

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