

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17732

研究課題名(和文) ナノバイオテクノロジーを用いた糖尿病性腎症に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment for diabetic nephropathy using nanobiotechnology

研究代表者

広浜 大五郎 (Hirohama, Daigoro)

帝京大学・医学部・臨床助手

研究者番号：20749353

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)：糖尿病性腎症は進行性で、いまだに進行を十分に抑制する治療法がない。ヒト糖尿病性腎症に類似した病態を示すモデル動物が欠如していることも、創薬とその臨床応用を遅らせている一因といえる。本研究ではヒト糖尿病性腎症と類似した病態を示すモデルマウス(db/dbマウスに対して片腎摘出+高食塩負荷)を新規作製し、表現型を解析した。結果、本マウスは著明なアルブミン尿と糸球体障害、高血圧、低カリウム血症を認めることを明らかにした。さらに、遠位ネフロンおよび糸球体で小分子G蛋白Rac1-ミネラルコルチコイド受容体(MR)経路活性化が生じていること、同経路活性化が糖尿病性腎症進展に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症は末期腎不全の原疾患として最多だが、基盤となる病態は未解明であり、病態解明ならびに治療薬開発は喫緊の課題である。本研究は遠位ネフロンおよび糸球体におけるRac1-MR経路活性化が、高血圧および糸球体障害を介した糖尿病性腎症進行に関与していることを指摘した。これは糖尿病性腎症治療の戦略としてRac1阻害薬とともにMR拮抗薬の有効性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Diabetic nephropathy (DN) is progressive and there is still no cure to adequately control its progression. The lack of model animals showing similar pathophysiological conditions to human DN is also a key factor in delaying drug development and its clinical application.

In this study, we established a new mouse of DN (UNx-HS db/db mice; uninephrectomy + high-salt loading to db/db mice). To evaluate the involvement of the Rac1-MR pathway in the DN progression, we investigated the effects of the MR antagonist, and the Rac1 inhibitor, on blood pressure and glomerular injury in UNx-HS db/db mice. UNx-HS db/db mice showed massive albuminuria accompanied by glomerular injury with nodular lesions, hypertension and hypokalemia. We further demonstrated that activation of Rac1-MR pathway in distal tubules and glomeruli is involved in DN progression through hypertension and glomerular injury, respectively.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糖尿病性腎症 ミネラルコルチコイド受容体 MR Rac1 高血圧 アルドステロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病性腎症は進行性で、いまだに進行を十分に抑制する治療法がない。従来の糖尿病性腎症動物モデルはメサンギウム基質増加や糸球体基底膜肥厚が主病変であり、ヒト糖尿病性腎症像との間に乖離が存在する。ヒトと類似した病態を示すモデルマウスの開発を通じ、糖尿病性腎症の病態解明ならびに治療法開発が切望されていた。

(2) 近年 siRNA を用いて核酸医薬の画期的治療法の開発が相次いでいるが、腎臓疾患に対して臨床応用が実現しているものはない。申請者が所属していた研究室では、糸球体腎炎モデルマウスへの siRNA 含有 polyion complex ナノキャリア(PIC ナノキャリア)の腹腔内投与により、siRNA の糸球体選択的な導入および治療効果を報告している(J Am Soc Nephrol 2010)。この手法を用いて糖尿病性腎症治療への応用が期待されていた。

2. 研究の目的

本研究は(1)ヒト糖尿病性腎症と類似した病態を示すマウスモデルを確立すること(2)小分子量 G 蛋白 Rac1-ミネラルコルチコイド受容体(MR)系を標的とした糸球体メサンギウム細胞選択的な siRNA 導入により、効果が高く副作用の少ない新規糖尿病性腎症治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒトに近い糖尿病性腎症モデルとして UNx-HS db/db マウスの確立

肥満 2 型糖尿病モデルの db/db マウスは糖尿病性腎症モデルとして汎用されているが、一般に腎障害の程度は小さい。そこで腎障害を促進するために、同マウスに対して片腎摘出 + 高食塩負荷を行った(UNx-HS db/db マウス)。同マウスのアルブミン尿、腎病理組織像、腎機能障害、血漿カリウムを評価した。また、テレメトリー法により血圧も評価した。さらに腎糸球体、遠位ネフロンでの Rac1-MR 経路活性化の有無も評価した。

(2) UNx-HS db/db マウスへの Rac1 阻害薬投与での検討

UNx-HS db/db マウスの病態形成における Rac1 活性化の意義を検討するため、同マウスに Rac1 阻害薬の長期投与を行い、アルブミン尿、腎病理組織像、腎機能障害、血漿カリウムを評価した。また、テレメトリー法により血圧も評価した。

(3) UNx-HS db/db マウスへの MR 拮抗薬投与での検討

UNx-HS db/db マウスの病態形成における MR 活性化の意義を検討するため、同マウスに MR 拮抗薬の長期投与を行い、アルブミン尿、腎病理組織像、腎機能障害、血漿カリウムを評価した。また、テレメトリー法により血圧も評価した。

(4) ヒト糖尿病性腎症組織を用いた検討

UNx-HS db/db マウスとヒト糖尿病性腎症との類似性を検討するため、ヒト糖尿病性腎症組織を用いて、免疫蛍光染色で Rac1-MR 経路活性化の有無を評価した。

(5) Rac1-MR 系を標的としたナノキャリア siRNA による治療効果

UNx-HS db/db マウスを用いて PIC ナノキャリアによる糸球体特異的治療効果の評価を試みた。

4. 研究成果

(1) 新たな糖尿病性腎症モデルとして UNx-HS db/db マウスの確立

UNx-HS db/db マウスは顕著なアルブミン尿を呈し、ヒト糖尿病性腎症と類似の糸球体像(PAS 染色でのメサンギウム基質増加、結節性病変)線維化・炎症関連分子の発現増加が認められた。UNx-HS db/db マウスでは糸球体ポドサイトマーカーである WT1 陽性細胞数が減少しており、同マウスでのポドサイト障害が示唆された。また、ヒトの糖尿病性腎症では多くの症例で高血圧症を合併することがよく知られている。そのため、テレメトリー法で UNx-HS db/db マウスの血圧を評価したところ、高血圧を呈することが明らかとなった。さらに低カリウム血症も伴っていた。

(2) UNx-HS db/db マウスの腎臓では Rac1-MR 経路活性化を認める

次に UNx-HS db/db マウスの腎臓における Rac1-MR 経路活性化の有無を評価した。免疫蛍光染色で糸球体内の活性型 Rac1 シグナル増強が認められ、また、磁気ビーズ法で単離した糸球体で MR 標的遺伝子 Sgk1 発現増加を認めたことから、本マウスの糸球体で Rac1-MR 系活性化が生じていることが示唆された。

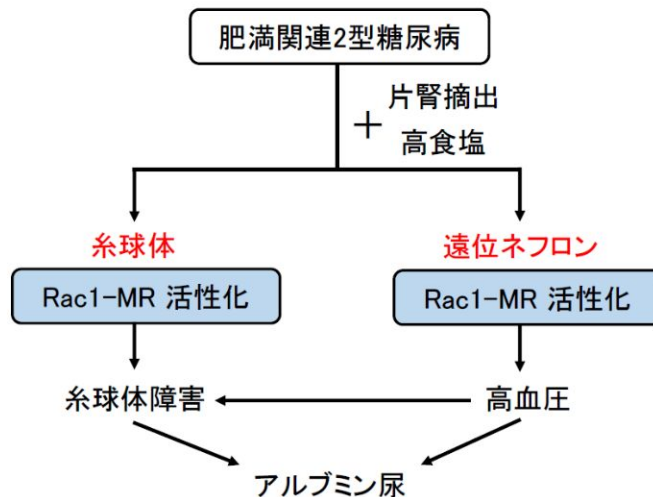
続いて腎皮質での Rac1-MR 経路活性化について評価すると、本マウスは糸球体だけでなく腎皮質でも Rac1 発現上昇、MR 標的遺伝子 Sgk1 発現上昇が認められた。さらに Sgk1 標的分子として知られる上皮性 Na チャネル(ENaC)発現の上昇が認められたことから、本マウスでは遠位ネフ

ロンの Rac1-MR-ENaC 経路活性化が、低カリウム血症、高血圧発症に寄与しているものと考えられた。

(3) Rac1-MR 経路活性化は UNx-HS db/db マウスの病態進展に寄与する

UNx-HS db/db マウス腎臓における Rac1-MR 経路活性化の生体内意義を明らかにするため、同マウスに対して Rac1 阻害薬、MR 拮抗薬を長期投与し、表現型の改善有無を評価した。すると、両薬剤によりモデルマウスの糸球体、遠位ネフロン Sgk1 発現は抑制され、低カリウム血症の改善、血圧上昇の抑制、糸球体障害の抑制が認められた。これらの結果から、糸球体、遠位ネフロン両者での Rac1-MR 経路活性化が糖尿病性腎症進展に寄与することが示唆された。

また、ヒト糖尿病性腎症組織を用いて同様の評価を行ったところ、UNx-HS db/db マウスと同様に糸球体の Rac1 活性化を示唆する蛍光染色像が認められた。ここまでで得られた成果をまとめて論文発表した (Hirohama D, et al. Activation of Rac1-mineralocorticoid receptor pathway contributes to renal injury in salt-loaded db/db mice Hypertension 78:82-93, 2021) (図)



図：UNx-HS マウスでの Rac1-MR 経路活性化によるアルブミン尿発症機序

(4) UNx-HS db/db マウスで Rac1-MR 系を標的としたナノキャリア siRNA による治療効果検討

申請者が所属していた研究室では、糸球体腎炎モデルマウスへの siRNA 含有 polyion complex ナノキャリア (PIC ナノキャリア) の腹腔内投与により、siRNA の糸球体選択的な導入および治療効果を報告している (J Am Soc Nephrol 2010)。しかし、糖尿病マウスについては効果が未知であり、UNx-HS db/db マウスを用いて PIC ナノキャリアによる糸球体特異的治療についても研究を試みた。しかし生体内への最適な投与量を模索する過程で予想以上に時間を要し、研究期間内には表現型改善効果を評価するまでには至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirohama Daigoro, Susztak Katalin	4. 巻 18
2. 論文標題 From mapping kidney function to mechanism and prediction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Reviews Nephrology	6. 最初と最後の頁 76 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41581-021-00512-5	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 Hirohama Daigoro, Nishimoto Mitsuhiro, Ayuzawa Nobuhiro, Kawarazaki Wakako, Fujii Wataru, Oba Shigeyoshi, Shibata Shigeru, Marumo Takeshi, Fujita Toshiro	4. 巻 78
2. 論文標題 Activation of Rac1-Mineralocorticoid Receptor Pathway Contributes to Renal Injury in Salt-Loaded Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 82 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17263	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 Ochiai-Homma Fumika, Kuribayashi-Okuma Emiko, Tsurutani Yuya, Ishizawa Kenichi, Fujii Wataru, Odajima Kohei, Kawagoe Mika, Tomomitsu Yoshihiro, Murakawa Masataka, Asakawa Shinichiro, Hirohama Daigoro, Nagura Michito, Arai Shigeyuki, Yamazaki Osamu, Tamura Yoshifuru, Fujigaki Yoshihide, Nishikawa Tetsuo, Shibata Shigeru	4. 巻 44
2. 論文標題 Characterization of pendrin in urinary extracellular vesicles in a rat model of aldosterone excess and in human primary aldosteronism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 1557 ~ 1567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-021-00710-5	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 Hirohama Daigoro, Kawarazaki Wakako, Nishimoto Mitsuhiro, Ayuzawa Nobuhiro, Marumo Takeshi, Shibata Shigeru, Fujita Toshiro	4. 巻 21
2. 論文標題 PGI2 Analog Attenuates Salt-Induced Renal Injury through the Inhibition of Inflammation and Rac1-MR Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4433 ~ 4433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21124433	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 Kawarazaki Wakako, Mizuno Risuke, Nishimoto Mitsuhiro, Ayuzawa Nobuhiro, Hirohama Daigoro, Ueda Kohei, Kawakami-Mori Fumiko, Oba Shigeyoshi, Marumo Takeshi, Fujita Toshio	4. 巻 130
2. 論文標題 Salt causes aging-associated hypertension via vascular Wnt5a under Klotho deficiency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 4152 ~ 4166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI134431	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 Marumo Takeshi, Hoshino Junichi, Kawarazaki Wakako, Nishimoto Mitsuhiro, Ayuzawa Nobuhiro, Hirohama Daigoro, Yamanouchi Masayuki, Ubara Yoshifumi, Okaneya Toshikazu, Fujii Takeshi, Yuki Kazunari, Atsumi Yoshihito, Sato Atsuhisa, Arai Eri, Kanai Yae, Shimosawa Tatsuo, Fujita Toshio	4. 巻 8
2. 論文標題 Methylation pattern of urinary DNA as a marker of kidney function decline in diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Research & Care	6. 最初と最後の頁 e001501 ~ e001501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjdr-2020-001501	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 Yamazaki Osamu, Hirohama Daigoro, Ishizawa Kenichi, Shibata Shigeru	4. 巻 21
2. 論文標題 Role of the Ubiquitin Proteasome System in the Regulation of Blood Pressure: A Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5358 ~ 5358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21155358	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 Murakawa Masataka, Arai Shigeyuki, Kawagoe Mika, Tomomitsu Yoshihiro, Odajima Kohei, Ueno Masaki, Asakawa Shinichiro, Hirohama Daigoro, Nagura Michito, Yamazaki Osamu, Tamura Yoshifuru, Uchida Shunya, Shibata Shigeru, Fujigaki Yoshihide	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 A Ruptured Jejunal Arterial Aneurysm in a Young Woman Undergoing Chronic Hemodialysis Due to Myeloperoxidase-antineutrophil Cytoplasmic Antibody-associated Vasculitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.6721-20	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 柴田 茂、広浜 大五郎	4. 巻 62
2. 論文標題 【水電解質】集合管の生理学 主細胞と間在細胞の協調作用のメカニズム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本腎臓学会誌	6. 最初と最後の頁 783 ~ 789
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 無
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 広浜 大五郎、藤田 敏郎	4. 巻 78巻増刊号1
2. 論文標題 ミネラルコルチコイド受容体関連高血圧 (MR-pendrin系など)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床増刊	6. 最初と最後の頁 301-307
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 無
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 Ayuzawa N, Nishimoto M, Ueda K, Hirohama D, Kawarazaki W, Shimosawa T, Marumo T, Fujita T.	4. 巻 31
2. 論文標題 Two Mineralocorticoid Receptor-Mediated Mechanisms of Pendrin Activation in Distal Nephrons.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Am Soc Nephrol.	6. 最初と最後の頁 748-764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2019080804.	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 Hirohama D, Fujita T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Evaluation of the pathophysiological mechanisms of salt-sensitive hypertension.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertens Res.	6. 最初と最後の頁 1848-1857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-019-0332-5.	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12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安川 穂, 新井 繁幸, 奈倉 倫人, 浅川 信一郎, 広浜 大五郎, 山崎 修, 田村 好古, 藤垣 嘉秀, 児玉 浩子, 内田 俊也, 柴田 茂
2. 発表標題 血液透析患者における血清セレン濃度とESA反応性との関連の検討
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河原崎 和歌子, 鮎澤 信宏, 広浜 大五郎, 西本 光宏, 大庭 成喜, 丸茂 丈史, 藤田 敏郎
2. 発表標題 血中 Klotho 減少は高カリウム血症の原因となりうる
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 広浜大五郎、西本光宏、鮎澤信宏、河原崎和歌子、藤井航、大庭成喜、柴田茂、丸茂丈史、藤田敏郎
2. 発表標題 Rac1-ミネラルコルチコイド受容体系活性化は糖尿病性腎臓病進展に寄与する
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 広浜 大五郎, 西本 光宏, 鮎澤 信宏, 河原崎 和歌子, 大庭 成喜, 丸茂 丈史, 藤田 敏郎
2. 発表標題 ポドサイトRac1-ミネラルコルチコイド受容体(MR)系活性化は糖尿病性腎臓病進展に寄与する
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 広浜 大五郎, 西本 光宏, 鮎澤 信宏, 河原崎 和歌子, 大庭 成喜, 柴田 茂, 丸茂 丈史, 藤田 敏郎
2. 発表標題 新たな糖尿病性腎臓病モデルの開発とミネラルコルチコイド受容体の関与の解明
3. 学会等名 第56回高血圧関連疾患モデル学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鮎澤 信宏, 広浜 大五郎, 西本 光宏, 河原崎 和歌子, 丸茂 丈史, 藤田 敏郎
2. 発表標題 アルドステロン過剰時のPendrin制御と β -ケトグルタル酸
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河原崎 和歌子, 水野 理介, 西本 光宏, 鮎澤 信宏, 広浜 大五郎, 大庭 成喜, 丸茂 丈史, 藤田 敏郎
2. 発表標題 加齢に伴う食塩感受性高血圧発症における腎血管性機序の検討
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸茂 丈史, 星野 純一, 山内 真之, 乳原 善文, 河原崎 和歌子, 西本 光宏, 鮎澤 信宏, 広浜 大五郎, 藤田 敏郎
2. 発表標題 糖尿病性腎症に生じたメタボリックメモリー関連遺伝子のDNAメチル化異常
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸茂 丈史, 星野 純一, 河原崎 和歌子, 西本 光宏, 鮎澤 信宏, 広浜 大五郎, 佐藤 敦久, 乳原 善文, 下澤 達雄, 藤田 敏郎
2. 発表標題 エビジェネティック尿検査による糖尿病性腎症悪化の診断
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原崎 和歌子, 水野 理介, 西本 光宏, 鮎澤 信宏, 広浜 大五郎, 大庭 成喜, 丸茂 丈史, 藤田 敏郎
2. 発表標題 加齢に伴う食塩感受性高血圧発症機序の解明
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原崎 和歌子, 水野 理介, 西本 光宏, 鮎澤 信宏, 広浜 大五郎, 森 典子, 大庭 成喜, 丸茂 丈史, 藤田 敏郎
2. 発表標題 加齢に伴う食塩感受性高血圧発症機序の解明
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鮎澤 信宏, 広浜 大五郎, 西本 光宏, 河原崎 和歌子, 丸茂 丈史, 藤田 敏郎
2. 発表標題 ミネラルコルチコイド過剰による食塩感受性高血圧におけるPendrin活性化機構
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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