

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16173

研究課題名（和文）糖尿病性腎症の進展における新規BMP拮抗分子の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of novel BMP antagonist as causal factor of kidney disease progression in diabetes

研究代表者

小林 洋輝（KOBAYASHI, Hiroki）

日本大学・医学部・助教

研究者番号：70802156

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：腎保護作用を持つBMP7のantagonistであるNBL1について、糖尿病性腎症における役割について検討した。ヒト近位尿細管細胞についてrecombinant NBL1を添加培養すると、TGF- $\beta$ 1やEMTマーカーの発現が上昇し、ノックダウンするとこれらの発現が抑制された。またストレプトゾトシン誘導糖尿病モデルマウスにおいてNBL1 KOマウスとWTマウスで比較検討したところ、非糖尿病マウスと比較して糖尿病マウスで有意に血中NBL1の上昇を認め、腎組織においては糖尿病WTマウスと比較して、糖尿病KOマウスにおいて腎線維化マーカーのmRNA、蛋白レベルでの発現の抑制を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症は透析導入原因疾患の第一位であり、多くの医療費が投じられているが、未だ有効な治療法は確立していない。今回、NBL1をノックダウンした近位尿細管細胞において、EMTに關与する蛋白の発現抑制を認め、マウスを用いた実験においても、NBL1 KOマウスが、糖尿病により誘導される腎線維化に対して保護的であることを明らかにした。以上より、NBL1が糖尿病による腎線維化に対する治療標的になる可能性が示唆された。糖尿病による臓器の線維化機構は各臓器で共通する経路があり、本結果を通して、臓器を超えた糖尿病合併症治療に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of NBL1, an antagonist of BMP7 with renal protective effects, in diabetic nephropathy. When recombinant NBL1 was added to human proximal tubular cells, the expression of TGF- $\beta$ 1 and EMT markers increased, and knockdown of NBL1 suppressed their expression. In a streptozotocin-induced diabetic mouse model, we compared NBL1 knockout (KO) mice with wild-type (WT) mice. Compared to non-diabetic mice, diabetic mice showed a significant increase in circulating NBL1 levels. In the renal tissue, compared to diabetic WT mice, diabetic KO mice showed suppressed mRNA and protein expression levels of renal fibrosis markers, including TGF- $\beta$ 1 and fibronectin.

研究分野：腎臓学

キーワード：BMP-7 antagonist 糖尿病性腎症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

現在、日本の人工透析医療費は年間総額 1.5 兆円を超えており、その原疾患として糖尿病性腎症がおよそ 45%を占め、従って糖尿病性腎症の病態解明、及び治療法の開発が喫緊の課題となっている。糖尿病性腎症の腎機能の経過は個々の患者で異なり同等の血糖コントロールでも数年で末期腎不全(ESRD)に至る患者もいれば、腎機能が数十年にわたって保たれる患者もいる。腎症進展のリスク群を早期に発見して治療介入することは腎予後、生命予後を改善する上で極めて重要であるが、患者によって腎症の進展度が異なる機序は未解明で、ESRD のリスク群を腎症早期の段階で発見するためのバイオマーカーも確立していない。筆者は糖尿病性腎症患者を対象にした血漿中蛋白の網羅的測定で、腎保護作用を持つ Bone morphogenetic protein (BMP)-7 の antagonist である neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1(NBL 1)が将来の末期腎不全(ESRD)を強力に予測するバイオマーカーであることを明らかにした(Kobayashi H, et al. Science Translational Medicine, 2022)。さらに NBL 1 は慢性腎臓病患者の近位尿細管細胞で高発現し、動物実験では NBL 1 ノックアウト(KO)マウスが一側尿管結紮(UUO)により誘導した腎線維化に対して抵抗性であることを見いだした(未発表)。糖尿病性腎症においても、このような効果を持つのであれば、線維化抑制の治療薬としての応用が期待され、新規の透析導入となる患者を減らすことができると考える。

## 2. 研究の目的

NBL 1 は血中の ESRD を予測するバイオマーカーとしてだけでなく、腎保護作用を持つ BMP-7 の作用を抑制することで、腎症進行の一因となるのではないかと仮説を立てた。そこで培養細胞を用いて NBL 1 の発現を刺激し、それによって線維化マーカーがどのように変化するかを検討する。同様 NBL 1 をノックダウンした場合についても検討する。また NBL 1 KO マウスの糖尿病モデルを作成して、糖尿病性腎症における NBL 1 の役割について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞における NBL 1 の役割について検討

ヒト近位尿細管細胞株(HK-2)を用いて、高血糖(グルコース濃度 3.3 mM、コントロール 5.6 mM)や TGF- $\beta$ 1 に対する NBL 1 の発現について検討した。また HK-2 細胞をヒトリコンビナント NBL1 と培養をした際の EMT への影響を検討した。さらに NBL 1 の siRNA を導入し、NBL 1 の発現抑制化において、HK-2 細胞を TGF- $\beta$ 1 で刺激をし、EMT に関する遺伝子や蛋白の発現について Real time PCR や Western blotting で検討した。

### (2) NBL 1 ノックアウトマウスを用いたストレプトゾトシン(STZ)投与モデルマウスに対する NBL 1 の役割についての検討

8 週齢の NBL 1 KO マウス(NBL 1 : -/-)と WT マウス(NBL 1 : +/+)は、イソフルラン麻酔下で、右腎臓を摘出した。術後、飼料を普通餌から高脂肪餌に変更して、2 週間の回復期間を与えた後に、STZ を腹腔内投与(40 mg/kg、5 日間連続)し、14 日後に血糖値が 300 mg/dl となった個体を糖尿病発症マウスとした。また STZ を投与せず普通餌で飼育する KO マウスと WT マウスはコントロール群とした。4 群とも糖尿病発症後 24 週まで飼育し、イソフルラン麻酔下で血液と組織

を採取した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 培養細胞における NBL 1 の役割についての検討

培養細胞における NBL 1 の刺激因子について

HK-2 細胞をプレートに播種し、70%コンフルエント後に、DMEM 無血清培地(グルコース:5.6 mM)で serum starvation を行った後、細胞を高グルコース(3.3 mM)で 24 時間刺激したところ、NBL 1 の mRNA は有意に上昇した。また HK-2 細胞を同様に recombinant human TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml)で刺激すると、コントロールと比べて NBL 1 の発現が上昇した。

recombinant NBL 1 及び TGF- $\beta$ 1 による細胞内 EMT マーカーの変化について

HK-2 細胞を recombinant NBL 1 (200 ng/ml)あるいは TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml)で 7 日間培養を行った。培地に NBL 1 を添加して培養を行うと、TGF- $\beta$ 1 や fibronectin の発現が増加し、E-cadherin の発現が減少した。TGF- $\beta$ 1 での刺激においても、NBL 1 と同様に EMT マーカーの変化が認められた。

NBL 1 ノックダウン下での細胞内 EMT マーカーの変化について

HK-2 細胞に NBL 1 の siRNA を導入した。細胞に 10 nM の siRNA をリパーストランスフェクションした後に、serum starvation を行い、TGF- $\beta$ 1 を添加して 24~72 時間刺激を行った。siRNA 導入細胞において、NBL 1 mRNA は negative control siRNA の 1/10 に発現が抑制されていた。この条件下において、SMA と fibronectin mRNA が negative control siRNA より発現が有意に低下していた。TGF- $\beta$ 1 による刺激を行うと、negative control siRNA では、SMA と fibronectin mRNA の増加が認められたが、NBL 1 をノックダウンした細胞では negative control よりも SMA や fibronectin の上昇が抑制された。

##### (2) NBL 1 ノックアウトマウスを用いたストレプトゾトシン(STZ)投与モデルマウスに対する NBL 1 の役割についての検討

飼育期間中の体重、血糖値等について

実験期間中におけるコントロール群、糖尿病群ともに WT マウスと KO マウスの間に体重、血糖値の差は認められなかった。

血中 NBL 1 及び尿中アルブミン・クレアチニン比について

実験終了時における、WT マウスの血清 NBL 1 値を ELISA 法にて測定すると、コントロール群と比べて糖尿病群で有意な上昇が認められた。実験終了時の尿中アルブミン・クレアチニン比については差が認められなかった。

腎臓組織での遺伝子及び蛋白の発現について

-80℃で凍結保存していた腎臓組織から Total RNA を精製して、逆転写後、real time PCR を行ったところ、糖尿病群の WT マウスと比較して、KO マウスで TGF- $\beta$ 1、CTGF、fibronectin 等の発現が低下していた。western blotting においても、TGF- $\beta$ 1 及び fibronectin において、WT マウスと比較して KO マウスで発現の低下が認められた。

糖尿病性腎症の患者において、血漿中 NBL 1 値は、健常者と比較して上昇していたが、糖尿病モデルマウスにおいても同様にコントロールマウスと比べて、NBL 1 の上昇が認められた。今後は、NBL 1 の具体的なメカニズムを解明することが重要であり、特に NBL 1 が BMP-7 のシグナル伝達にどのように干渉し、繊維化プロセスにどのように影響を与えるのかについての研究が必要で

ある。また、BMP-7を介さない経路でプロセスに影響を与えている可能性もあり、さらに検討を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Hiroki, Satake Eiichiro, Murata Yusuke, Otsuka Hiromasa, Tsunemi Akiko, Azuma Masaki, Nakamura Yoshihiro, Saito Tomoyuki, Abe Masanori	4. 巻 36
2. 論文標題 Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 is associated with the severity of interstitial fibrosis and kidney function decline in IgA nephropathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Nephrology	6. 最初と最後の頁 2245 ~ 2256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s40620-023-01704-x	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9件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林洋輝
2. 発表標題 糖尿病性腎臓病(DKD)の病態を包括的に捉えたバイオマーカーの開発
3. 学会等名 第59回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林洋輝
2. 発表標題 Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1)は糖尿病性腎臓病において腎障害進展の原因になる
3. 学会等名 第59回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、中尾賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林洋輝
2. 発表標題 糖尿病性腎症の早期治療介入を目指したバイオマーカーの開発と治療標的への応用
3. 学会等名 第34回日本糖尿病性腎症研究会、シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroki Kobayashi, Eiichiro Satake, Masanori Abe
2. 発表標題 Association of Neuroblastoma Suppressor of Tumorigenicity 1 (NBL1) with Interstitial Fibrosis Severity and Kidney Function Decline in IgA Nephropathy
3. 学会等名 The 55th Annual Meeting of the American Society of Nephrology Kidney Week (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林洋輝, Zaipul I. Md Do, 佐竹栄一郎, Andzej. Krolewski, 阿部雅紀
2. 発表標題 糖尿病性腎症におけるNBL1の腎線維化に対する役割について
3. 学会等名 第53回日本腎臓学会東部学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林洋輝, Zaipul I. Md Dom, 佐竹栄一郎, 阿部雅紀, Andrzej. Krolewski
2. 発表標題 NBL1は糖尿病性腎症において末期腎不全の予測因子になるだけでなく腎線維化の原因になる
3. 学会等名 第68回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroki Kobayashi
2. 発表標題 Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1) and risk of progression to end-stage kidney disease in diabetes
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会、YIA受賞講演 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林洋輝, Zaipul I. Md Dom, 佐竹栄一郎, 阿部雅紀, Andzej. Krolewski
2. 発表標題 Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1)は糖尿病性腎症において末期腎不全の予測因子になるだけでなく、腎線維化の原因になる
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林洋輝
2. 発表標題 糖尿病性腎症バイオマーカーの開発と治療標的への応用
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会、シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023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